

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΙΟΛΟΓΙΑΣ**  
(Διευθυντής: Καθηγητής Δημήτριος Α. Σπαντίδος)

**ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ Ν. ΔΗΜΗΤΡΟΠΟΥΛΟΥ**  
**ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

**ΕΝΤΟΠΙΣΗ, ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΚΑΙ ΡΥΘΜΙΣΗ**  
**ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΓΑΛΟΪΟΥ**  
**ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΕΝΕΡΓΗΣ ΛΟΙΜΩΣΗΣ**



**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2010**

*Στους γονείς μου,  
που είναι πάντα δίπλα μου*

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Ολοκληρώνοντας την διδακτορική μου διατριβή, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους βοήθησαν στην επίτευξη αυτού του στόχου, από τον σχεδιασμό, την υλοποίηση μέχρι και την πραγματοποίησή του.

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Ιολογίας της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Ιολογίας, κ. Δημήτριου Α. Σπαντίδου, τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά. Κατά την διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριό του, ήταν πάντα πρόθυμος να μου παρέχει τις επιστημονικές συμβουλές του, και παράλληλα το ενδιαφέρον του παρέμεινε αμείωτο για την πρόοδο της διατριβής.

Ιδιαίτερως ευχαριστώ τον συνεπιβλέποντα Επίκουρο Καθηγητή Κλινικής Ιολογίας, κ. Γεώργιο Σουρβίνο για την επιστημονική καθοδήγηση, την ηθική συμπαράστασή του και την ουσιαστική συμβολή του στην επιτυχή περάτωση της παρούσας διατριβής. Μου μετέδωσε πολύτιμες επιστημονικές γνώσεις και εμπειρίες και κυρίως ήταν συνεχώς διαθέσιμος να λύσει οποιαδήποτε απορία μου.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή Παθολογίας-Ογκολογίας, κ. Γ. Σαμώνη, ως μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής μου Επιτροπής καθώς και τους: Καθηγητή κ. Η. Κραμποβίτη, Αν. Καθηγητή κ. Α. Ηλιόπουλο, Επικ. Καθηγητή κ. Α. Ζαφειρόπουλο και Επικ. Καθηγητή κ. Χ. Τσατσάνη για την προθυμία τους να συνεισφέρουν στην αξιολόγηση της παρούσας διατριβής.

Ευχαριστώ επίσης θερμά, τον Καθηγητή Gavin W Wilkinson του Πανεπιστημίου του Cardiff, Wales, UK, ο οποίος με δέχτηκε στο ερευνητικό εργαστήριο Μικροβιολογίας στο Cardiff, όπου κατάφερα να πραγματοποιήσω μέρος της παρούσας μελέτης και να συνεργαστώ με ερευνητές και του δικού του επιστημονικού πεδίου. Από το εργαστήριο στο Cardiff, ευχαριστώ τους ερευνητές Brian McSharry, Richard Stanton, Virginie Prod'Homme και Peter Tomasec για τις πολύτιμες συμβουλές τους και τη συνεργασία τους κατά τη διάρκεια της παραμονής μου στο εξωτερικό.

Η εκπόνηση της παρούσας διατριβής τα τελευταία χρόνια μου έδωσε την ευκαιρία να γνωρίσω αξιόλογους συνεργάτες και πολύτιμους φίλους, με τους

οποίους μοιραστήκαμε καθημερινές επιστημονικές και μη ανησυχίες, στόχους και όνειρα, μαθαίνοντας να αποφεύγουμε τα αδιέξοδα είτε στην επιστήμη είτε στη ζωή.

Ευχαριστώ λοιπόν πολύ για όλα, τους: Ευαγγελία Κουγιουμουτζή, Πέπη Δάλπα, Ειρήνη Νεοφύτου, Ντίνα Βογιατζή, Βίκτωρα Γκούρβα, Δανάη Παπαδογιάννη, Νίκο Σουλπιζή, Μαρία Κιμούλη, Χάρη Φιλιππάκη, Φίλιππο Πορίχη, Γιάννα Σούφλα, Πέγκυ Κανέλλου, Αντιγόνη Μώρου, Βασίλη Μπαλή, Σταύρο Αποστολάκη, Βίρνα Αμανατίδου, Νεκταρία Γουλιδάκη, Εύη Βλαχάβα, Γιώργο Σιακαλή, Έλσα Παπαδημητρίου, Ευαγγελία Κουρεπίνη και Μαρία Ψαρρού, οι περισσότεροι από τους οποίους αποτέλεσαν στο παρελθόν ή αποτελούν ακόμα μέλη του εργαστηρίου Κλινικής Ιολογίας ή άλλων εργαστηρίων του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Θα ήθελα, τέλος, να ευχαριστήσω τον Ηλία μου, για την εμπιστοσύνη του στις δυνατότητες και τους στόχους μου, και για την ύπαρξη του, η οποία αποτέλεσε έμπνευση και μου μετέδωσε περισσότερη θέληση και πείσμα για την ολοκλήρωση αυτής της διατριβής.

Το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στην οικογένειά μου, την αδελφή μου Ντιάνα και τους γονείς μου, για τις πολύτιμες συμβουλές τους και την επιμονή τους να εξελίσσω συνεχώς τους στόχους μου. Με την αμέριστη αγάπη και κατανόησή τους, αλλά και με την ηθική και υλική υποστήριξή τους μπορώ κάνω κάθε όνειρό μου πραγματικότητα.

## ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

**ΕΠΩΝΥΜΟ:** ΔΗΜΗΤΡΟΠΟΥΛΟΥ

**ΟΝΟΜΑ:** ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ

**ΟΝΟΜΑ ΠΑΤΡΟΣ:** ΝΙΚΟΛΑΟΣ

**ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΓΕΝΝΗΣΕΩΣ:** 01-02-1983

**ΤΟΠΟΣ ΓΕΝΝΗΣΕΩΣ:** Τρίπολη Αρκαδίας

**ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ΚΑΤΟΙΚΙΑΣ** Γορτύνης 15- Καμίνια, Ηράκλειο Κρήτης, Τ.Κ.71303

**ΤΗΛΕΦΩΝΟ ΚΑΤΟΙΚΙΑΣ:** 27310 27229 (κιν.: 6974798422)

**E-MAIL:** [gjota.dim@gmail.com](mailto:gjota.dim@gmail.com)

### ΣΠΟΥΔΕΣ

**1997 - 2000 :** Β' Ενιαίο Λύκειο Σπάρτης,

Βαθμός απολυτηρίου: Άριστα 18 και 7/10

**2000 - 2004 :** Πανεπιστήμιο Κρήτης, σπουδές στο τμήμα Βιολογίας,

Σχολή Θετικών Επιστημών

Πτυχίο Βιολογίας – Κατεύθυνση Μοριακής Βιολογίας

Μέσος όρος βαθμολογίας : Λίαν Καλώς 6,94

Μαθήματα: Συστηματική Φυτών, Φυσική, Γενική Χημεία, Οργανική Χημεία I και II, Βιοχημεία I και II, Κλασσική Γενετική, Μικροβιολογία, Μοριακή Βιολογία, Κυτταρική Βιολογία, Ζωολογία, Δομή Φυτικών Οργανισμών, Οικολογία, Βιολογία και Συστηματική Ζώων, Εξέλιξη, Ανοσοβιολογία, Ενζυμική Βιοτεχνολογία, Φυσιολογία Φυτών, Ιατρική Εντομολογία, Λειτουργική Μορφολογία Σπονδυλωτών, Μοριακή Φυσιολογία, Σύγχρονη Μικροσκοπία, Βιομαθηματικά, Μοριακή Γενετική, Αναπτυξιακή Βιολογία, Γενετική Ανθρώπου, Μοριακή Ογκογένεση, Κυτταρική Διαφοροποίηση, Φυσική Γεωγραφία και Γεωμορφολογία, Κοινωνιολογία της Εκπαίδευσης

**2003 – 2004** Εκπόνηση Διπλωματικής Εργασίας στο εργαστήριο  
Φαρμακολογίας του καθηγητή Γραβάνη Αχιλλέα  
στο τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης, με θέμα:  
*«Μελέτη της επίδρασης των νευροστεροειδών στα κύρια σηματοδοτικά  
μονοπάτια επιβίωσης των κυττάρων PC12»*

**2005 – σήμερα:** Εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής στο Εργαστήριο Ιολογίας  
του Καθ. κ. Δ. Α. Σπαντίδου, στην Ιατρική σχολή  
του Πανεπιστημίου Κρήτης, με θέμα:  
*«Εντόπιση, οργάνωση και ρύθμιση του γονιδιώματος του Κυτταρομεγαλοϊού  
(CMV) κατά τη διάρκεια ενεργής λοίμωξης».*

**7/1/2008 – 7/7/2008** Συμμετοχή σε πρόγραμμα διακίνησης φοιτητών  
της Ε.Ε. Erasmus σε μεταπτυχιακό επίπεδο.

*Ίδρυμα υποδοχής:* Πανεπιστήμιο του Cardiff, Wales, UK.

Συμμετοχή σε *ερευνητικό πρόγραμμα* σε εργαστήριο Μικροβιολογίας του  
Πανεπιστημίου με υπεύθυνο τον καθηγητή G.W.Wilkinson

*Θέμα:* Δημιουργία ανασυνδυασμένων κλώνων του ανθρώπινου  
Κυτταρομεγαλοϊού (HCMV), κατασκευή πλασμιδίων που εκφράζουν ιϊκές  
πρωτεΐνες, μελέτη της ενεργοποιούμενης έκφρασης του NKG2D υποδοχέα,  
ULBP2, από την άμεσα πρώιμη πρωτεΐνη του HCMV, IE1. Ανάλυση της  
έκφρασης ιϊκών γονιδίων καθώς και των αλληλεπιδράσεων ιού – κυττάρου.

## **ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ**

**1997 – 2000 :** Υποτροφία από το Ίδρυμα Αθανασίου Ματάλα, για άριστη  
επίδοση σε γραπτές εξετάσεις βασικών μαθημάτων Λυκείου

**2005 – 2006 :** Υποτροφία μεταπτυχιακού κύκλου από το  
Ευρωπαϊκό Πρόγραμμα Marie Curie European Re-integration Grant,  
Contact Number: MERG-CT-2004-513448

## ΕΡΓΑΣΙΑΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

**Μάρτιος 2005 – Φεβρουάριος 2006 :** Σύμβαση Ανάθεσης Έργου με τον Ειδικό Λογαριασμό Πανεπιστημίου Κρήτης. Εκτέλεση του εργαστηριακού μέρους του προγράμματος με Κ.Α. 2056 και τίτλο "Localization dynamics and regulation of human cytomegalovirus genomes during lytic and quiescent infection"

**Μάρτιος 2006 – Μάρτιος 2008 :** Σύμβαση Ανάθεσης Έργου με τον Ειδικό Λογαριασμό Πανεπιστημίου Κρήτης, ως ερευνήτρια. Συμμετοχή στο Ερευνητικό πρόγραμμα, με Κ.Α. 847, του Πανεπιστημίου Κρήτης με τίτλο «Μοριακή Διάγνωση και Ανίχνευση ιών με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης με πολυμεράση ».

**Ιανουάριος 2010 – σήμερα :** Σύμβαση Ανάθεσης Έργου με τον Ειδικό Λογαριασμό Πανεπιστημίου Κρήτης, ως ερευνήτρια. Συμμετοχή στο Ερευνητικό πρόγραμμα, με Κ.Α. 2852, του Πανεπιστημίου Κρήτης με τίτλο «Ποσοτικός προσδιορισμός ιϊκού φορτίου σε ανθρώπινες ιογενείς λοιμώξεις».

Γνώση εργαστηριακών τεχνικών: Κυτταροκαλλιέργειες, επίστρωση κυττάρων, transfection, DNA, RNA και protein extraction, Western Blotting, Καλλιέργειες βακτηρίων, Transformation βακτηρίων, Cloning, PCR, Real Time PCR, μέτρηση πρωτεϊνών με ELISA, ιολογία: ανάπτυξη και δημιουργία ιϊκών stock, δημιουργία ανασυνδυασμένων ιϊκών κλώνων, επιμόλυνση κυττάρων

## ΔΙΔΑΚΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

**Σχολικό Διδακτικό Έτος 2008 – 2009 :** - Μαθήματα Βιολογίας σε μαθητές Β΄ και Γ΄ Λυκείου στο Γενικό Λύκειο Πόμπιας, στην περιφέρεια Ηρακλείου Κρήτης, στα πλαίσια της «Πρόσθετης Διδακτικής Στήριξης»

- Ιδιαίτερα μαθήματα σε μαθητές Γυμνασίου – Λυκείου στα μαθήματα Βιολογία (Γενικής Παιδείας και Θετικής Κατεύθυνσης) και Χημεία.

## ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

**Αγγλικά** : πτυχίο Proficiency – Grade C

University of Cambridge

- Άδεια επάρκειας γνώσης της Αγγλικής γλώσσας από το Υπ. Εθνικής Παιδείας & Θρησκευμάτων ( 31/1/2002)

**Γερμανικά** : πτυχίο Grundstufe – Befriedigend

Goethe Institute

## ΓΝΩΣΗ Η/Υ

Επιτυχής παρακολούθηση μαθημάτων πανεπιστημιακού επιπέδου :

1. Σεμινάριο στους Ηλεκτρονικούς υπολογιστές
2. Στατιστική σε Υπολογιστές

Χρήση Windows, Word, PowerPoint, Internet, Excel

## ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Panagiota Dimitropoulou, Richard Caswell, Brian P. McSharry, Richard F. Greaves, Demetrios A. Spandidos, Gavin W.G. Wilkinson, George Sourvinos.

**Differential relocation and stability of PML-body components during productive human cytomegalovirus infection: Detailed characterization by live-cell imaging.** Eur. J. Cell Biol. 2010 May.

*(Impact Factor: 3.955)*

## Υπο συγγραφή:

1. Panagiota Dimitropoulou, Nektaria Goulidaki, Demetrios A. Spandidos, Gavin W. Wilkinson, George Sourvinos. **Block in the progression of mitosis in HCMV primary infected fibroblasts.**



2. Charilaos Filippakis, Panagiota Dimitropoulou, Aristides G. Eliopoulos, Demetrios A. Spandidos, George Sourvinos. **Human cytomegalovirus infection is mediated by the host-cell Ras signalling pathway.**

#### **ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ - ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ**

1. Δημητροπούλου Παναγιώτα, Ζαραβίνος Απόστολος, Σούφλα Γιαννούλα, Μπαριτάκη Σταυρούλα, Κουρεπίνη Ευαγγελία, Σηφάκης Σταύρος, Σουρβίνος Γεώργιος, Σπαντίδος Δ.Α. **Ανίχνευση και τυποποίηση του ιού HPV σε τραχηλικό κυτταρολογικό υλικό γυναικών της Κρήτης με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης με πολυμεράση (PCR).** 3<sup>ο</sup> Εθνικό Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας – 9<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσοκομειακών Λοιμώξεων και Υγιεινής, Αθήνα, 6-8 Φεβρουαρίου 2007

2. Ζαραβίνος Απόστολος, Δημητροπούλου Παναγιώτα, Σούφλα Γιαννούλα, Μπαριτάκη Σταυρούλα, Κουρεπίνη Ευαγγελία, Εργαζάκη Μαρία, Σουρβίνος Γεώργιος, Σπαντίδος Δ.Α. **Ανίχνευση των ερπητοϊών HSV, CMV, EBV ΚΑΙ VZV σε εγκεφαλονωτιαίο υγρό ασθενών με συμπτώματα εγκεφαλίτιδας με την τεχνική της Αλυσιδωτής Αντίδρασης με Πολυμεράση (PCR).** 3<sup>ο</sup> Εθνικό Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας – 9<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσοκομειακών Λοιμώξεων και Υγιεινής, Αθήνα, 6-8 Φεβρουαρίου 2007

3. Panagiota Dimitropoulou, Demetrios Spandidos, George Sourvinos. **HCMV Immediate Early 1 protein targets both ND10 and metaphase chromatin in live infected cells.** 3<sup>rd</sup> European Congress of Virology, Nuremberg, Germany, 1-5 Σεπτεμβρίου 2007

4. Charilaos Filippakis, Panagiota Dimitropoulou, Aristides Eliopoulos, Demetrios Spandidos, George Sourvinos. **Activation of the Ras signalling pathway enhances the permissiveness to Human Cytomegalovirus (HCMV).** 3<sup>rd</sup> European Congress of Virology, Nuremberg, Germany, 1-5 Σεπτεμβρίου 2007

5. Panagiota Dimitropoulou, Demetrios Spandidos, George Sourvinos. **Dynamics of human cytomegalovirus immediate early 1 protein in association with ND10 and cellular chromatin in live infected cells.** 12<sup>th</sup> World Congress on Advances in Oncology - 10<sup>th</sup> International Symposium on Molecular Medicine, Χερσόνησος, Κρήτη, Οκτώβριος 2007
6. Charilaos Filippakis, Panagiota Dimitropoulou, Aristides G. Eliopoulos, Demetrios A. Spandidos, George Sourvinos. **Human Cytomegalovirus Infection is mediated by the Host-Cell RAS signalling pathway.** 12<sup>th</sup> World Congress on Advances in Oncology - 10<sup>th</sup> International Symposium on Molecular Medicine, Χερσόνησος, Κρήτη, Οκτώβριος 2007
7. Panagiota Dimitropoulou, Demetrios Spandidos, George Sourvinos. **Visualization of HCMV Immediate Early 1 protein in association with both ND10 and metaphase chromatin in live infected cells.** 162<sup>nd</sup> SGM (Society of General Microbiology) Meeting, Edinburgh, UK, 31 Μαρτίου- 3 Απριλίου 2008
8. Panagiota Dimitropoulou, Brian McSharry, Richard Stanton, Virginie Prod'Homme, Peter Tomasec, Demetrios A. Spandidos, George Sourvinos, Gavin Wilkinson. **Regulation of NKG2D ligand expression by herpesvirus immediate early proteins.** 13<sup>th</sup> World Congress on Advances in Oncology - 11<sup>th</sup> International Symposium on Molecular Medicine, Χερσόνησος, Κρήτη, Οκτώβριος 2008
9. Panagiota Dimitropoulou, Gavin W.G. Wilkinson, Demetrios A. Spandidos, George Sourvinos. **Live cell imaging of IE1 pp75, PML, Sp100 and STAT2 (but not hDaxx or STAT1) with metaphase chromatin in HCMV-infected cells.** 12<sup>th</sup> International CMV/BetaHerpesvirus Workshop, Boston, MA, 10-14 Μαΐου 2009

10. Panagiota Dimitropoulou, Nektaria Goulidaki, Demetrios A. Spandidos, Gavin W. Wilkinson, George Sourvinos. **Block in the progression of mitosis in HCMV primary infected fibroblasts.** 14<sup>th</sup> World Congress on Advances in Oncology - 12<sup>th</sup> International Symposium on Molecular Medicine, Λουτράκι Οκτώβριος 2009

#### **ΣΥΝΕΔΡΙΑ – ΟΡΓΑΝΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΕΜΠΕΙΡΙΑ**

**Νοέμβριος 2003 :** Παρακολούθηση 55<sup>ου</sup> Πανελληνίου Συνεδρίου της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών

**Οκτώβριος 2004 :** Μέλος της τοπικής οργανωτικής επιτροπής των συνεδρίων 9<sup>th</sup> World Congress on Advances in Oncology και 7<sup>th</sup> International Symposium on Molecular Medicine, Χερσόνησος, Κρήτη

**Ιανουάριος 2005:** Παρακολούθηση 1<sup>ου</sup> Πολυθεματικού συνεδρίου Ιατρικής σχολής Πανεπιστημίου Κρητης στο Ηράκλειο

**Οκτώβριος 2005 :** Μέλος της τοπικής οργανωτικής επιτροπής των συνεδρίων 10<sup>th</sup> World Congress on Advances in Oncology και 8<sup>th</sup> International Symposium on Molecular Medicine, Χερσόνησος, Κρήτη

**Οκτώβριος 2006 :** Μέλος της τοπικής οργανωτικής επιτροπής των συνεδρίων 11<sup>th</sup> World Congress on Advances in Oncology και 9<sup>th</sup> International Symposium on Molecular Medicine, Χερσόνησος, Κρήτη

**Οκτώβριος 2007 :** Μέλος της τοπικής οργανωτικής επιτροπής των συνεδρίων 12<sup>th</sup> World Congress on Advances in Oncology και 10<sup>th</sup> International Symposium on Molecular Medicine, Χερσόνησος, Κρήτη

**Οκτώβριος 2008 :** Μέλος της τοπικής οργανωτικής επιτροπής των συνεδρίων  
13<sup>th</sup> World Congress on Advances in Oncology και 11<sup>th</sup>  
International Symposium on Molecular Medicine,  
Χερσόνησος, Κρήτη

**Οκτώβριος 2009 :** Μέλος της τοπικής οργανωτικής επιτροπής των συνεδρίων  
14<sup>th</sup> World Congress on Advances in Oncology και 12<sup>th</sup>  
International Symposium on Molecular Medicine,  
Λουτράκι.

#### **ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝΤΑ**

- Μουσική : Σπουδές στη μουσική - Μαθήματα πιάνου για 9 χρόνια (1992-2000)
  - Πτυχίο Ειδικού Αρμονίας (Ιούνιος 2000)
- Μέλος της Ευρωπαϊκής Επιστημονικής Οργάνωσης Κλινικής Ιολογίας
- Μέλος της Πανελλήνιας Ένωσης Βιοεπιστημόνων

***Περιεχόμενα***

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

|   |              |
|---|--------------|
| <b><u>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ</u></b> .....                                     | <b>I</b>     |
| <b><u>ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ</u></b> .....                             | <b>III</b>   |
| <b><u>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</u></b> .....                                     | <b>XI</b>    |
| <b><u>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</u></b> .....  | <b>XVI</b>   |
| <b><u>SUMMARY</u></b> .....   | <b>XVIII</b> |
| <b><u>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</u></b> .....  | <b>1</b>     |
| <b><u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 - ΕΡΠΗΤΟΪΟΙ</u></b> .....                          | <b>2</b>     |
| 1.1 ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ.....                                      | 2            |
| 1.2 ΟΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟΙ ΑΝΤΙΠΡΟΣΩΠΟΙ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ .....               | 4            |
| <b><u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 - Ο ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΣ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΓΑΛΟΪΟΣ</u></b> .....      | <b>6</b>     |
| 2.1 Ο ΙΟΣ.....  | 6            |
| 2.1.1. Η ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΙΟΥ HCMV .....                                    | 6            |
| 2.1.2. ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΤΩΝ HCMV ΙΟΣΩΜΑΤΙΩΝ .....                          | 7            |
| 2.2 Η ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΟΥ ΙΟΥ .....                                     | 8            |
| 2.2.1. Η ΕΙΣΟΔΟΣ ΤΟΥ ΙΟΥ ΣΤΟ ΚΥΤΤΑΡΟ .....                          | 9            |
| 2.2.2. ΛΥΤΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ – ΛΥΣΙΓΟΝΙΑ.....                              | 10           |
| 2.3 Το HCMV ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ .....   | 12           |
| 2.3.1. Η ΚΥΡΙΑ ΑΜΕΣΑ ΠΡΩΙΜΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΜΟΝΑΔΑ (MIE GENREGION)..... | 13           |
| 2.3.2. ΟΙ ΑΜΕΣΑ ΠΡΩΙΜΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ IE1 ΚΑΙ IE2 .....                 | 14           |
| 2.3.3. ΤΕΧΝΗΤΑ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΑ ΜΕΣΩ ΒΑC ΜΕΤΑΛΛΑΞΙΓΕΝΕΣΗΣ.....           | 17           |
| <b><u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 - Η HCMV ΛΟΙΜΩΞΗ</u></b> .....                     | <b>20</b>    |
| 3.1 ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΜΕ ΤΟΝ ΞΕΝΙΣΤΗ .....                            | 20           |
| 3.1.1. ΑΜΕΣΑ ΠΡΩΙΜΕΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ .....                          | 20           |
| 3.1.2. ND10 ΠΥΡΗΝΙΚΑ ΣΩΜΑΤΙΑ.....                                   | 22           |
| 3.1.3. ΑΝΑΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ .....                             | 24           |
| 3.1.4. HCMV ΜΟΛΥΝΣΗ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ .....                     | 26           |
| 3.2 Η ΑΝΟΣΟΣ ΑΠΑΝΤΗΣΗ .....   | 28           |
| 3.2.1. ΈΜΦΥΤΗ (ΦΥΣΙΚΗ) ΑΝΟΣΙΑ.....                                  | 29           |
| 3.2.2. ΕΠΙΚΤΗΤΗ (ΕΙΔΙΚΗ), ΑΝΟΣΙΑ .....                              | 31           |
| 3.3 Ο HCMV ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ.....  | 34           |
| 3.3.1. ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ .....   | 35           |
| 3.3.2. ΔΙΑΓΝΩΣΗ .....   | 37           |
| 3.3.3. ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΣΗ – ΘΕΡΑΠΕΙΑ .....                                 | 38           |

|  |           |
|--|-----------|
| <b><u>ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....</u></b>  | <b>40</b> |
| <b><u>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</u></b>   | <b>41</b> |
| <b><u>ΜΕΘΟΔΟΙ.....</u></b>   | <b>42</b> |
| <b><u>1. ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ.....</u></b>  | <b>42</b> |
| 1.1 ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ .....  | 42        |
| 1.2 ΤΡΥΠΣΙΝΟΠΟΙΗΣΗ.....  | 43        |
| 1.3. ΜΕΤΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΑΙΜΟΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΟ ΝΕUBAUER. ....                                       | 43        |
| 1.4. ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΣΥΓΧΡΟΝΙΣΜΟΣ ΜΕΣΩ ΕΛΛΕΙΨΗΣ ΟΡΟΥ (SERUM STARVATION) .....                       | 44        |
| 1.5. ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ (INFECTION).....  | 44        |
| 1.6. ΠΑΡΟΔΙΚΗ ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ (TRANSFECTION).....  | 45        |
| <b><u>2. ΙΟΙ .....</u></b>   | <b>46</b> |
| 2.1 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΙΟΥ ΑΠΟΘΕΜΑΤΟΣ (STOCK) HCMV ΙΟΥ .....  | 46        |
| 2.2 ΤΙΤΛΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ PLAQUE ASSAY .....  | 47        |
| 2.3 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΤΕΧΝΗΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΩΝ (BAC) ΚΑΙ ΑΝΑΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΤΟΥ HCMV BAC ΙΟΥ .....  | 49        |
| 2.4. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΙΙΚΟΥ STOCK ΜΕ CsCL .....  | 49        |
| <b><u>3. ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ .....</u></b>   | <b>51</b> |
| 3.1 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR) ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΕΠΙΘΥΜΗΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ .....           | 51        |
| 3.2 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ.....                                       | 52        |
| 3.3 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ.....  | 53        |
| 3.4 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ ΜΕ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ .....  | 54        |
| A) ΕΠΙΛΟΓΗ DNA ΤΜΗΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ .....  | 54        |
| B) ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΣΥΝΔΕΣΗΣ (LIGATION) .....   | 54        |
| 3.5 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ (TRANSFORMATION).....  | 55        |
| 3.6 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΜΙΚΡΗΣ Η ΜΕΓΑΛΗΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ .....                                 | 56        |
| A) MINI PREPS (ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΜΙΚΡΗΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ) - ΔΙΑΛΥΜΑ STET ΚΑΙ QIAGEN KIT ..... | 56        |
| B) MIDI PREPS (ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΜΕΣΑΙΑΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ).....                               | 57        |
| Γ) MAXI PREPS (ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΜΕΓΑΛΗΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ).....                               | 58        |
| 3.7 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟΥ ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ ΚΑΙ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ (SEQUENCING) .....           | 59        |
| 3.8 ΦΩΤΟΜΕΤΡΗΣΗ – GLYCEROL STOCKS .....  | 60        |
| 3.9 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ .....                                      | 60        |
| <b><u>4. ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ.....</u></b>   | <b>64</b> |
| <b><u>5. IN SITU ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ (FISH).....</u></b>                                    | <b>65</b> |
| <b><u>6. ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΣΕ ΖΩΝΤΑΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ.....</u></b>   | <b>66</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>7. ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ - FACS ANALYSIS</b> .....  | <b>67</b> |
| <b>8. ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ</b> .....   | <b>69</b> |
| 8.1 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΑ.....   | 69        |
| 8.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΟΣΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ .....   | 69        |
| 8.3 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ (SDS-PAGE).....   | 70        |
| 8.4 ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΚΑΤΑ WESTERN (WESTERN BLOT).....   | 71        |
| <b>ΥΛΙΚΑ</b> .....  | <b>73</b> |
| <b>1. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ</b> .....   | <b>73</b> |
| 1.1 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ DNA .....  | 73        |
| 1.2 ΔΙΑΛΥΜΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.....   | 73        |
| 1.3 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ.....  | 73        |
| 1.4 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΥ.....   | 74        |
| 1.5 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ.....  | 74        |
| 1.6 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ CsCl.....   | 75        |
| <b>2. ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ</b> .....  | <b>75</b> |
| <b>3. ΕΝΖΥΜΑ</b> .....  | <b>75</b> |
| <b>4. ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ</b> .....   | <b>76</b> |
| <b>5. ΚΙΤ</b> .....   | <b>76</b> |
| <b>6. PCR</b> .....   | <b>76</b> |
| <b>7. ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ</b> .....   | <b>77</b> |
| <b>8. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΕΤΑΙΡΙΕΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ</b> .....   | <b>77</b> |
| <b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....   | <b>78</b> |
| <b>ΜΕΡΟΣ Α'</b> .....   | <b>79</b> |
| 1. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ HCMV CR401 ΙΟΥ .....   | 79        |
| 2. Ο ΕΝΔΟΠΥΡΗΝΙΚΟΣ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΙΕ1 ΑΛΛΑΖΕΙ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΜΙΑΣ HCMV ΜΟΛΥΝΣΗΣ. ....           | 82        |
| 3. ΕΠΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΔΙΑΣΠΑΣΗΣ ΤΩΝ PML ΚΑΙ ΑΠΟ-SUMO-ΥΛΙΩΣΗ ΑΠΟ ΤΟΝ HCMV CR401 ΙΟ .....                  | 84        |
| 4. ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΤΩΝ Sp100 ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΔΙΑΣΠΑΣΗΣ ΤΩΝ ND10 ΣΤΗΝ HCMV ΜΟΛΥΝΣΗ ..... | 86        |
| 5. Η ΤΑΧΕΙΑ ΕΞΑΛΕΙΨΗ ΤΩΝ ND10 ΠΡΑΓΜΑΤΟΠΟΙΕΙΤΑΙ ΜΟΝΟ ΣΤΟ ΠΛΑΙΣΙΟ ΤΗΣ ΠΚΗΣ ΜΟΛΥΝΣΗΣ .....           | 90        |



---

|  |            |
|--|------------|
| 6. ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΕΝΤΟΠΙΣΗ ΤΗΣ ΙΕ1-72Κ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΑ HCMV ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΑ.....             | 94         |
| 7. ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΕΝΤΟΠΙΣΗ ΤΩΝ ΙΕ1-72Κ ΚΑΙ ΙΕ2-86Κ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΖΩΝΤΑΝΑ ΜΟΛΥΣΜΕΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ.....        | 96         |
| 8. ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ ΤΗΣ ΙΕ1-72Κ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΣΤΗ ΜΕΤΑΦΑΣΙΚΗ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗ ΣΕ ΖΩΝΤΑΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ.....             | 98         |
| 9. Η ΙΕ1-72Κ ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΟΔΗΓΕΙ ΤΙΣ PML ΚΑΙ Sp100, ΑΛΛΑ ΟΧΙ ΤΗΝ HDAXX ΣΤΗΝ ΜΙΤΩΤΙΚΗ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗ ..... | 102        |
| 10. ΕΝΤΟΠΙΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΙΕ1-72Κ, STAT1 ΚΑΙ STAT2 ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ HCMV ΜΟΛΥΝΣΗΣ .....         | 105        |
| 11. ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ ΤΗΣ ΕΞΕΛΙΞΗΣ ΤΗΣ ΜΙΤΩΣΗΣ ΣΕ HCMV ΜΟΛΥΣΜΕΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ.....                           | 108        |
| <br>   |            |
| <b><u>ΜΕΡΟΣ Β΄</u></b> .....   | <b>111</b> |
| <br>   |            |
| ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ NKG2D ΠΡΟΣΔΕΤΩΝ ΑΠΟ ΤΙΣ ΑΜΕΣΑ ΠΡΩΙΜΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΤΩΝ ΕΡΙΠΗΤΟΪΩΝ.....     | 111        |
| <br>   |            |
| <b><u>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</u></b> .....   | <b>117</b> |
| <br>   |            |
| <b><u>ΕΠΙΛΟΓΟΣ</u></b> .....   | <b>126</b> |
| <br>   |            |
| <b><u>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</u></b> .....   | <b>127</b> |
| <br>   |            |
| <b><u>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ</u></b> .....  | <b>139</b> |

## Περίληψη

Ο ανθρώπινος Κυτταρομεγαλοϊός (HCMV) είναι ένας DNA ερπητοϊός και αποτελεί ένα κοινό παθογόνο με αξιοσημείωτο κλινικό ενδιαφέρον. Η ικανότητά του να προκαλεί λανθάνουσα μόλυνση είναι οξείας σημασίας, εφόσον ο ιός μπορεί να επανενεργοποιηθεί προκαλώντας σημαντικά κλινικά προβλήματα, σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα και μεταμοσχευμένους ασθενείς, καθώς και κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, καταλήγοντας σε μια κατάσταση που μπορεί να απειλεί και τη ζωή. Ο μηχανισμός με τον οποίο ο HCMV επανενεργοποιείται από την λανθάνουσα κατάσταση, δεν είναι πλήρως κατανοητός.

Στον έλεγχο του διακόπτη από τη λυσιγονία στη λυτική μόλυνση, τα άμεσα πρώιμα (IE) γονίδια είναι τα πρώτα που εμπλέκονται στην παθογένεια των ερπητοϊών. Για να καταφέρουμε να οπτικοποιήσουμε την κύρια 72kDa άμεσα πρώιμη πρωτεΐνη 1 του ανθρώπινου κυτταρομεγαλοϊού (HCMV), κατασκευάστηκε ένας ανασυνδυασμένος ιός που είχε την ικανότητα να κωδικοποιεί την IE1 συνδεδεμένη με την φθορίζουσα EGFP στο καρβοξυτελικό της άκρο (HCMV-CR401). Χρησιμοποιώντας αυτόν τον ιό, η IE1-EGFP πρωτεΐνη ανιχνεύθηκε στα ND10 (PML-σωμάτια) μέσα σε διάστημα 2 ωρών μετά τη μόλυνση (h.p.i.) ενώ η πλήρης διάσπαση των ND10 παρατηρήθηκε μέχρι τις 6 h p.i. Τα HCMV γονιδιώματα και η IE2-86K πρωτεΐνη μπορούσαν να ανιχνευθούν παραπλεύρως των, βραδέως διασπώμενων, IE1-72K/ND10 εστιών. Η IE1-72K συνδέεται με τη μεταφασική χρωματίνη, παίρνοντας μαζί της και τις δυο, PML και STAT-2. Οι πρωτεΐνες hDaxx, STAT-1 και IE2-86K δεν μετατοπίστηκαν στη μεταφασική χρωματίνη; η μοίρα της hDaxx είναι ιδιαίτερα σημαντική καθώς η πρωτεΐνη αυτή συμβάλλει ως ένα εσωτερικό φράγμα της HCMV μόλυνσης. Ενώ συμμετέχει σε ένα σύμπλοκο με τη χρωματίνη, τα PML, τη STAT-2 και τα Sp100, η IE1-72K πρωτεΐνη, απελευθερώνει την hDaxx από τα ND10 παρόλο που δεν εμφανίζεται να συνδέεται με αυτή.

Μεταξύ άλλων επιδράσεων στον ξενιστή, ο ανθρώπινος κυτταρομεγαλοϊός (HCMV) διακόπτει την κυτταρική διαίρεση κατά την ιική μόλυνση. Καθώς η πρόοδος της μίτωσης σε μολυσμένα κύτταρα δεν έχει μελετηθεί εκτενώς, χρησιμοποιήσαμε τον ανασυνδυασμένο HCMV-CR401 ιό ώστε να παρακολουθήσουμε αυτό το δυναμικό φαινόμενο σε ζωντανούς πρωτογενείς ινοβλάστες. Προηγούμενες μελέτες σε μονιμοποιημένα κύτταρα

έχουν δείξει ότι η HCMV IE1 πρωτεΐνη εντοπίζεται στα μεταφασικά χρωμοσώματα κατά τη διάρκεια της μίτωσης. Η μικροσκοπία σε ζωντανά HeLa κύτταρα που εξέφραζαν τις διαμολυσμένες EGFP-IE1 και HcRed1-H2A πρωτεΐνες αποκάλυψε πως η IE1 συνδεόταν ξεκάθαρα με τη συμπυκνωμένη χρωματίνη σε διάφορα στάδια της μίτωσης, και τελικά τα κύτταρα που παροδικά εξέφραζαν την IE1 ολοκλήρωναν την διαίρεσή τους με επιτυχία. Μικροσκοπική παρατήρηση μεμονωμένων HCMV μολυσμένων ινοβλαστών έδειξε ότι ένα μικρό ποσοστό των κυττάρων που ξεκινούσαν τη μίτωση, προχωρούσαν στην πρόφαση και τη μετάφαση άμεσα και με ευκολία. Παρόλα αυτά, στα ελάχιστα κύτταρα που έφταναν στην ανάφαση, τα χρωμοσώματα δεν κατάφερναν να μετατοπιστούν ομαλά στους πόλους. Η πιθανή καταστροφή της μιτωτικής ατράκτου εξαιτίας μιας HCMV πρωτεΐνης, που οδηγεί σε αδυναμία διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων, χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση.

Ο υποδοχέας ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού, NKG2D εκφράζεται στα NK, αβ και γδ T κύτταρα, όπου παίζει κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση των απαντήσεων της φυσικής και της ειδικής ανοσίας. Διέγερση του NKG2D υποδοχέα είναι αρκετή από μόνη της να προωθήσει την NK κυτταρική επίθεση. Ο NKG2D υποδοχέας είναι σημαντικός αφού αναγνωρίζει 7 διαφορετικούς προσδέτες η έκφραση των οποίων βρίσκεται υπό καταστολή σε κανονικές συνθήκες αλλά ενεργοποιείται ως απάντηση στο κυτταρικό στρες, στις ιικές μολύνσεις, στο θερμικό σοκ, στην κυτταρική εξαλλαγή και σε βλάβες του DNA. Στη μελέτη αυτή παρουσιάζεται η ικανότητα των HCMV IE πρωτεϊνών να ρυθμίζουν θετικά την έκφραση των ULBP2 και MICA/B προσδετών, προάγοντας την NK ενεργοποίηση. Μια ομάδα ανασυνδυασμένων αδενοϊών που εξέφραζαν μεταλλαγμένες μορφές της IE1 πρωτεΐνης κατασκευάστηκε και χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη του μηχανισμού ενεργοποίησης του ULBP2. Επιπλέον οι EBV IE πρωτεΐνες Zta και Rta βρέθηκαν να προκαλούν ισχυρή ενεργοποίηση της έκφρασης των MICA, MICB και ULBP2 στην κυτταρική επιφάνεια. Η ενεργοποίηση των NKG2D προσδετών φαίνεται να είναι εξαιρετικά ευαίσθητη στην έκφραση των άμεσα πρώιμων γονιδίων των ερπητοϊών. Ο NKG2D υποδοχέας ίσως έχει ένα ρόλο κλειδί στην ανίχνευση και στην προστασία έναντι των μολύνσεων από τους ερπητοϊούς, όχι μόνο κατά τη διάρκεια μιας ενεργής λοίμωξης αλλά και κατά τη διάρκεια μιας ολόκληρης ζωής στην ανίχνευση της επανενεργοποίησης του ιού από την λανθάνουσα φάση.

## Summary

Human Cytomegalovirus (HCMV) is a DNA herpes virus and a common human pathogen of considerable clinical interest. The ability to establish a latent infection is of crucial importance since in cases of cell-mediated immunity depression the virus can reactivate, presenting significant clinical problems to immunocompromised individuals and certain transplant patients, as well as during pregnancy, resulting in a life-threatening disease. The mechanism by which HCMV reactivates from latency has not been well understood.

In controlling the switch from latency to lytic infection, the immediate early (IE) genes lie at the core of herpesvirus pathogenesis. To image the 72kDa human cytomegalovirus (HCMV) major IE protein (IE1-72K), a recombinant virus encoding IE1 fused with EGFP was constructed (HCMV-CR401). Using this construct, the IE1-EGFP fusion was detected at ND10 (PML-bodies) within 2 h post infection (p.i.) and the complete disruption of ND10 imaged through to 6 h p.i. HCMV genomes and IE2-86K protein could be detected adjacent to the slowly degrading IE1-72K/ND10 foci. IE1-72K associates with metaphase chromatin, recruiting both PML and STAT2. hDaxx, STAT1 and IE2-86K did not re-locate to metaphase chromatin; the fate of hDaxx is particularly important as this protein contributes to an intrinsic barrier to HCMV infection. While IE1-72K participates in a complex with chromatin, PML, STAT2 and Sp100, IE1-72K releases hDaxx from ND10 yet does not appear to remain associated with it.

Among other effects to the host, Human Cytomegalovirus (HCMV) stalls cell division upon viral infection. Since the progress of mitosis in infected cells has not thoroughly studied, we used the recombinant HCMV CR401 to visualize this dynamic phenomenon in living primary fibroblasts. Previous studies in fixed cells have shown that the HCMV IE1 protein tethers to metaphase chromosomes during mitosis. Time-lapse microscopy in transiently expressing EGFP-IE1 and HcRed1-H2A HeLa cells revealed that IE1 was clearly associated with condensed chromatin at various stages of mitosis and eventually the IE1-expressing cells successfully completed cell division. Monitoring of individually infected fibroblasts by live cell imaging showed that a

small proportion of cells initiated mitosis, progressing to prometaphase and metaphase quite readily. However, in the very few cells continuing to anaphase, lagging chromosomes were evident. The destruction of the mitotic spindle because of a HCMV expressed protein resulting in severe chromosome segregation defects is under investigation.

The activating receptor NKG2D is ubiquitously expressed on natural killer (NK),  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T cells where it plays a central role in regulating both the innate and adaptive immune responses. Stimulation of the NKG2D receptor is sufficient by itself to promote NK cell attack. NKG2D is remarkable in recognizing 7 distinct ligands (MICA/B, ULBP1-4 and RAET1G) whose expression of NKG2DLs is normally suppressed, but is activated in response to cellular stress. Virus infection, heat shock, cellular transformation and DNA damage are all associated with the expression of NKG2D ligands. We demonstrate here that the human cytomegalovirus (HCMV) immediate early (IE) proteins IE1 and IE2 differentially upregulate expression of ULBP2 and MICA/B, respectively. Expression of either HCMV IE protein in target cells was sufficient by itself to promote NK cell activation. A panel of replication-deficient adenovirus recombinants encoding defined HCMV IE1 mutants has been generated, and is being used to characterize the mechanism responsible for promoting the ULBP2 response. Furthermore, the EBV IE proteins Zta and Rta were also found to provide a dramatic upregulation of MICA, MICB and ULBP2 surface expression. The NKG2D receptor thus, appears to be exquisitely sensitive to herpesvirus IE gene expression. This receptor is likely to play a key role in combating herpesvirus infections not only during overt clinical disease, but also (throughout life) in sensing virus reactivation from latency.

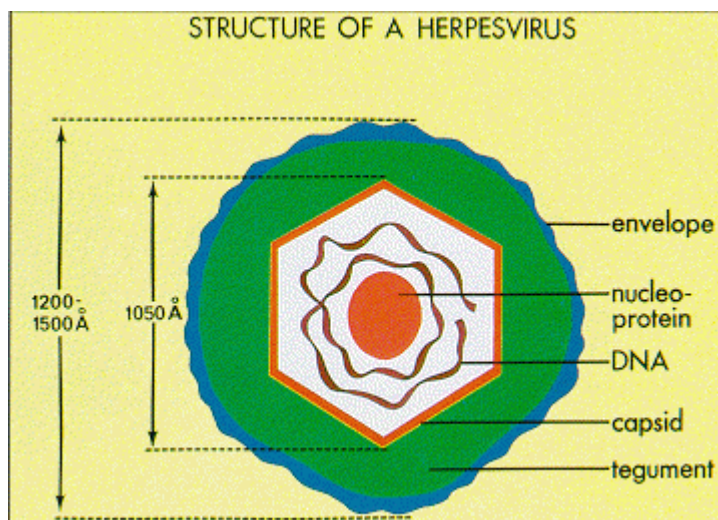
***Εισαγωγή***

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 - ΕΡΠΗΤΟΪΟΙ

### 1.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Οι έρπητοϊοί είναι μια από τις κυριότερες αιτίες των προερχόμενων από ιό ασθενειών, δεύτερη μετά τη γρίπη και το κοινό κρυολόγημα. Οφείλουν το όνομά τους στην ελληνική λέξη «έρπω», λόγω των λανθανουσών, χρόνιων και υποτροπιαζόντων λοιμώξεων που προκαλούν. Οι ερπητοϊοί διαφέρουν από άποψη γονιδιακής ακολουθίας και πρωτεϊνών αλλά όλοι είναι παρόμοιοι από άποψη δομής ιικού καψιδίου και οργάνωσης του γονιδιώματός τους. Σε ένα πληθυσμό ιοσωματίων, πολλά δεν έχουν έλυτρο και πολλά είναι άδεια καψίδια. Τα συστατικά του ιοσωματίου διατάσσονται ως εξής:

1. DNA με ένα εσωτερικό κέλυφος διαμέτρου 75nm,
2. ένα εικοσαεδρικό καψίδιο διαμέτρου 95-105 nm το οποίο αποτελείται από 162 εξαγωνικά καψομερίδια,



3. μία περιβάλλουσα κοκκιώδη ζώνη (tegument) αποτελούμενη από σφαιρικές πρωτεΐνες και
4. ένα περιβάλλον έλυτρο το οποίο περιέχει γλυκοπρωτεΐνες (Εικ.1.1).

**Εικόνα 1.1.** Η βασική δομή των ερπητοϊών.

Το DNA είναι ένα μεγάλο γραμμικό δίκλωνο μόριο, βάρους 130-230 kbp. Το γονιδίωμα τους φέρει μοναδικές μεγάλες (UL) και μοναδικές μικρές (US) κωδικοποιούσες περιοχές, οι οποίες περιβάλλονται από τελικές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (IR). Οι επαναλαμβανόμενες αυτές αλληλουχίες αναστρέφονται επιτρέποντας την αναδιάταξη των περιοχών UL και

US. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να υπάρχει το γονιδίωμα των ερπητοϊών σε τέσσερις ισομερείς μορφές. Επίσης η ύπαρξη αυτών των αλληλουχιών επιτρέπει την κυκλοποίηση του DNA, που απαιτείται κατά την διάρκεια του διπλασιασμού. Το μεγάλο γονιδίωμα των ερπητοϊών κωδικοποιεί για 100 περίπου πεπτίδια. Από αυτά πολλά είναι ένζυμα που ενέχονται στη σύνθεση του DNA, όπως η DNA πολυμεράση, ενώ άλλα εμπλέκονται στην διαδικασία της πρωτεϊνοσύνθεσης, όπως είναι οι πρωτεϊνικές κινάσες.

Το έλυτρο των ερπητοϊών περιέχει γλυκοπρωτεΐνες οι περισσότερες από τις οποίες φαίνεται να είναι απαραίτητες για να εκδηλωθεί η μολυσματική δράση του ιού. Η αλληλεπίδραση αυτών των γλυκοπρωτεϊνών με κυτταρικούς υποδοχείς του ξενιστή οδηγεί στην άμεση σύντηξη του ελύτρου με την κυτταρική μεμβράνη. Ενδοκύττωση δεν είναι απαραίτητη, αλλά μπορεί να συμβεί (εναλλακτικός τρόπος διείσδυσης). Η σύντηξη εναποθέτει το καψίδιο μέσα στο κυτταρόπλασμα, και στη συνέχεια το καψίδιο μεταναστεύει στον πυρήνα. Το εσωτερικό κέλυφος του ιού εισέρχεται μέσω μίας πυρηνικής οπής και ακολούθως το DNA του ιού κυκλοποιείται. Από την RNA polymerase II του κυττάρου-ξενιστή παράγονται περίπου 50 αγγελιοφόρα RNAs (mRNAs).

Διακρίνονται 3 ξεχωριστές κατηγορίες παραγόμενων mRNAs: τα α-mRNAs (ή άμεσα πρώιμα) είναι οι πρωτεΐνες που συντίθενται πρώτες και επιτρέπουν την μεταγραφή του mRNA για την επόμενη ομάδα πρωτεϊνών (β ή πρώιμες). Τα β-mRNAs επιτρέπουν την συνέχιση της μεταγραφής του DNA, η οποία ακολουθείται από την εμφάνιση των τελευταίων πρωτεϊνών (γ-mRNAs ή όψιμων). Η γονιδιακή έκφραση ρυθμίζεται ως εξής: εάν η μετάφραση διακοπεί νωρίς μετά την λοίμωξη, τα α-mRNAs συσσωρεύονται στον πυρήνα, και δεν μεταγράφονται άλλα ιικά mRNAs. Η σύνθεση των πρώιμων γονιδιακών προϊόντων απενεργοποιεί τα α-mRNAs και αποτελεί την έναρξη για την αντιγραφή του DNA. Κάποιες από τις όψιμες πρωτεΐνες παράγονται ανεξάρτητα από την αντιγραφή του DNA ενώ άλλες παράγονται μόνο μετά την αντιγραφή.

Τόσο οι α όσο και οι β πρωτεΐνες είναι απαραίτητες για τον γονιδιακό διπλασιασμό. Στην αντιγραφή εμπλέκονται μία εξαρτώμενη από το DNA του ιού DNA πολυμεράση και μία πρωτεΐνη συνδέουσα το DNA, σε συνδυασμό με μία πλειάδα ενζύμων όπως είναι η κινάση της θυμιδίνης, τα οποία τροποποιούν την κυτταρική βιοχημεία του ξενιστή. Επιπλέον, για την αντιγραφή του ιικού γενώματος απαιτούνται και κυτταρικές πρωτεΐνες ενώ τελικώς μόνο το 25% του



ϊικού DNA/παραγόμενη πρωτεΐνη ενσωματώνεται σε ισωμάτια. Τα υπόλοιπα συσσωρεύονται μέσα στο κύτταρο του ξενιστή το οποίο τελικά πεθαίνει. Το αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι η παραγωγή χαρακτηριστικών σωματιδίων με πυρηνικά έγκλειστα. Η αντιγραφή του ιικού DNA αποτελεί τον στόχο αρκετών επιτυχών αντι-ϊικών φαρμάκων, όπως η ακυκλοβίρη.

## 1.2 Οι ταυτοποιημένοι αντιπρόσωποι στον άνθρωπο

Η οικογένεια Herpesviridae περιλαμβάνει περίπου 100 ιούς. Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί 8 από αυτούς ως υπεύθυνοι για λοιμώξεις στον άνθρωπο και χωρίζονται σε τρεις υποοικογένειες (πίνακας 1.2).

Πίνακας 1.2.: ερπητοϊοί που έχουν ταυτοποιηθεί.

| <u>Alpha herpesviruses</u>          | <u>Beta herpesviruses</u>        | <u>Gamma herpesviruses</u>  |
|-------------------------------------|----------------------------------|---|
| Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) | Cytomegalovirus (CMV)            | Epstein- Barr virus (EBV)   |
| Herpes simplex virus type 2 (HSV-2) | Human herpesvirus type 6 (HHV-6) | Human herpesvirus type 8 (HHV-8), also known as Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus |
| Varicella zoster virus (VZV)        | Human herpesvirus type 7 (HHV-7) |   |

Η υποοικογένεια Alphaherpesviridae περιλαμβάνει τον ιό του απλού έρπητα τύπου 1 (HSV-1) στοματικά και οφθαλμικά τραύματα (fever blisters), εγκεφαλίτιδα, τον ιό του απλού έρπητα τύπου 2 (HSV-2), γεννητικά και πρωκτικά τραύματα (φουσκάλες πυρετού), σοβαρές μολύνσεις νεογνών και τον ερπητοϊό του ανθρώπου τύπου 3 ή Varicella-Zoster (VZV), ανεμοβλογιά (πρωταρχική μόλυνση), έρπητος ζωστήρας (επανενεργοποίηση).

Η υποοικογένεια Betaherpesviridae περιλαμβάνει τον ερπητοϊό του ανθρώπου τύπου 5 ή κυτταρομεγαλοϊός (CMV), λοιμώδης μονοπυρήνωση,

βαριάς μορφής εκ γενετής μόλυνση, μολύνσεις στους δέκτες αλλομοσχευμάτων (πνευμονία), τον ερπητοϊό του ανθρώπου τύπου 6 (HHV-6), Roseola στα νήπια (αρχική μόλυνση), μολύνσεις στους δέκτες αλλομοσχευμάτων (πνευμονία, αποτυχία μυελού), πιθανός ρόλος στην πολλαπλή σκλήρυνση και τον ερπητοϊό του ανθρώπου τύπου 7 (HHV-7), μερικές περιπτώσεις roseola (αρχική μόλυνση) και πιτυρίαση.

Η υποοικογένεια Gammaherpesviridae περιλαμβάνει τον ερπητοϊό του ανθρώπου τύπου 4 ή ιός Epstein-Barr (EBV), λοιμώδης μονοκυττάρωση (αρχική μόλυνση), περιλαμβάνει τους όγκους Β λεμφοκυττάρων (το λέμφωμα Burkitt, ανοσοβλαστικά λεμφώματα) συν το ρινοφαρυγγικό καρκίνωμα, μερικοί όγκοι Τ λεμφοκυττάρων και τον ερπητοϊό του ανθρώπου τύπου 8 (HHV-8), σάρκωμα Kaposi, όγκοι που συμπεριλαμβάνουν το Kaposi και κάποια λεμφώματα Β λεμφοκυττάρων.

Το χαρακτηριστικό γνώρισμα όλων των ερπητοϊών είναι ότι μπορούν να βρίσκονται στον οργανισμό σε λανθάνουσα κατάσταση. Η κατάσταση αυτή έχει 3 φάσεις: την καθιέρωση κατά την εισαγωγή των ιών στα κύτταρα, τη συντήρηση τους στο εσωτερικό των κυττάρων σαν να είναι τμήμα τους, και τέλος την επανενεργοποίηση τους όταν ο οργανισμός εξασθενεί λόγω ηλικίας ή λόγω ανοσοκαταστολής (1). Για πολλά χρόνια, η επιδημιολογία των κοινών λοιμώξεων από ερπητοϊούς ήταν ασαφής. Το 1950, οι Burnet και Buddingh έδειξαν ότι ο ιός του απλού έρπητα μετά την πρωτοπαθή λοίμωξη, μπορούσε να μεταπέσει σε λανθάνουσα κατάσταση και να επανενεργοποιηθεί αργότερα μετά από κάποιο εκλυτικό αίτιο. Το 1954 ο Weller απομόνωσε τον ιό του έρπητα ζωστήρα και από την ανεμοβλογιά και από τον έρπητα ζωστήρα, δείχνοντας ότι και για τις δύο νόσους υπεύθυνος είναι ο ίδιος ιός.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 - Ο ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΣ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΓΑΛΟΪΟΣ

### 2.1 Ο Ιός

Ο ανθρώπινος Κυτταρομεγαλοϊός (HCMV ή HHV-5) αποτελεί πρότυπο μέλος των β-ερπητοϊών (οικογένεια *Herpesviridae*), τη βασικότερη ιική αιτία συγγενούς δυσπλασίας ενώ συνδέεται και με ένα μεγάλο εύρος κλινικών νοσημάτων. Ο HCMV είναι ένας συνήθης ιός και η πλειονότητα των HCMV λοιμώξεων έχουν ομαλή έκβαση. Παρ' όλα αυτά, όπως για όλους τους ερπητοϊούς, η πρωτογενής μόλυνση οδηγεί σε μια εφ' όρου ζωής παρουσία του ιού, που απαιτεί συνεχή καταστολή από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή. Ο ιός εμφανίζεται συνήθως σε λυσιγονία στα πρόδρομα μυελικά κύτταρα, ενώ επανενεργοποιείται κατά την διαφοροποίηση τους σε μακροφάγα ή δενδριτικά.

Αρχικά περιγράφηκε ως το αίτιο της "νόσου των μεγαλοκυτταρικών εγκλείστων", ώσπου το 1956 απομονώθηκε σε καλλιέργειες κυττάρων και πήρε το όνομά του από τον Weller. Από τότε έως σήμερα αποτέλεσε στόχο πολυάριθμων μελετών που αφορούν στον τροπισμό του, τις βιολογικές του ιδιότητες και την μολυσματικότητά του, αφού αποτελεί σημαντικό αίτιο νοσηρότητας και θνητότητας, νεογνών και παιδιών, ανοσοκατεσταλμένων και μεταμοσχευμένων ασθενών.

#### 2.1.1. Η Δομή του ιού HCMV

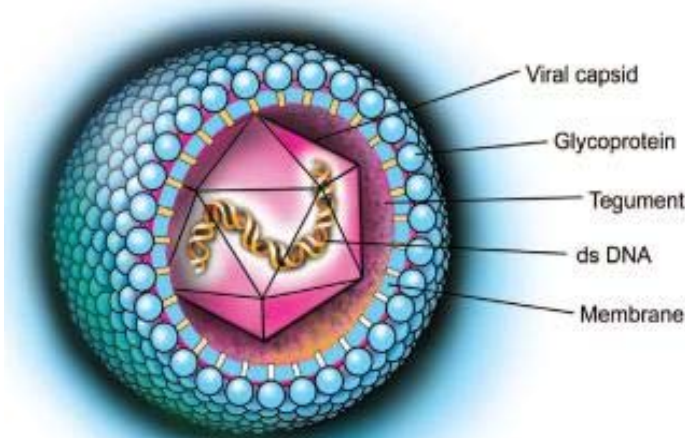
Το ώριμο HCMV ιοσωμάτιο έχει 150-200nm διάμετρο και αποτελείται από:

- ένα 100nm εικοσάεδρο καψίδιο με 162 καψομερίδια, το οποίο περιέχει ένα γραμμικό 230 kbp δίκλωνο μόριο DNA με ενσωματωμένες πρωτεΐνες
- μια μεγάλη περιβάλλουσα κοκκιώδη ζώνη (tegument), συγκριτικά με αυτήν του HSV και

- ένα εξωτερικό φάκελο (έλυτρο), το οποίο αποτελείται από μια κυτταρική λιπιδική διπλοστιβάδα με ιικές γλυκοπρωτεΐνες (Mocarski and Courcelle, 2001).

Τα HCMV μολυσμένα κύτταρα παράγουν τρεις διαφορετικούς τύπους ιοσωματίων οι οποίοι περιλαμβάνουν τα μολυσματικά ώριμα ιοσωμάτια που

περιγράφηκαν παραπάνω, τα μη-μολυσματικά σωματίδια που περιβάλλονται μόνο από το έλυτρο (non-infectious enveloped particles-NIEPs), και τα μη-αντιγραφόμενα ιικά σωματίδια (dense bodies-DBs). Τα NIEPs αποτελούνται από τις ίδιες ιικές πρωτεΐνες με τα μολυσματικά ιοσωμάτια και έχουν καψίδιο αλλά στερούνται ιικού γονιδιώματος. Τα DBs αποτελούν μοναδικά χαρακτηριστικά σωματίδια του ανθρώπινου κυτταρομεγαλοϊού



HCMV Human Cytomegalovirus

**Εικόνα 2.1.1.** Σχηματική απεικόνιση της δομής του HCMV

και του CMV του πιθήκου, είναι μη αντιγραφόμενα και ενώ περιβάλλονται από έλυτρο-φάκελο αποτελούνται κυρίως από την tegument πρωτεΐνη pp65 (UL83).

### 2.1.2. Πρωτεΐνες των HCMV ιοσωματίων

Το HCMV καψίδιο συγκροτείται στον πυρήνα από πέντε ιικές πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα UL86, UL85, UL80, UL48.5 και UL46 γονίδια. Περιβάλλεται από την κοκκιώδη ζώνη (tegument) η οποία δημιουργείται και από τον πυρήνα και από το κυτταρόπλασμα του μολυσμένου κυττάρου. Υπάρχουν 20-25 tegument πρωτεΐνες, πολλές από τις οποίες είναι φωσφορυλιωμένες και έχουν άγνωστες λειτουργίες (Mocarski and Courcelle, 2001). Μερικές από τις πιο βασικές tegument πρωτεΐνες είναι οι UL83 (pp65), UL82 (pp71), UL99 (pp28), UL32 (pp150), UL48, UL69, UL82, TRS1, IRS1. Τα κυτταροπλασματικά

ικκά καψίδια που περιέχουν κοκκιώδη ζώνη αποκτούν το έλυτρο περνώντας μέσα από το trans Golgi δίκτυο. Το έλυτρο περιέχει 8 ιικές γλυκοπρωτεΐνες, τις gB (UL55), gM (UL100), gH (UL75), gL (UL115), gO (UL74), gN (UL73), gp48 (UL4) και UL33 (Mocarski and Courcelle, 2001). Συνολικά περίπου 35 ιικά κωδικοποιημένες πρωτεΐνες έχουν αναγνωρισθεί στα HCMV ιοσωμάτια, ενώ σε αυτές τις δομικές πρωτεΐνες προστίθεται και ένας μικρός αριθμός κυτταρικών πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην συγκρότηση των ιοσωματίων, όπως η α- και β-ακτίνη, η τουμπουλίνη, διάφορες ανεξίνες και άλλες (Baldick and Shenk, 1996; Gibson, 1996; Michelson et al., 1996). Οι αναγνωρισμένες πρωτεΐνες των ιοσωματίων περιλαμβάνουν 5 πρωτεΐνες του καψιδίου, 14 tegument πρωτεΐνες, 11 γλυκοπρωτεΐνες, 13 πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην αντιγραφή και μεταγραφή του DNA και 2 G συζευγμένες πρωτεΐνες. Αναλογικά 50% των πρωτεϊνικών πεπτιδίων είναι της κοκκιώδους ζώνης, 30% του καψιδίου, 13% του ελύτρου και 7% πεπτιδία που εμπλέκονται σε διαδικασίες όπως η αντιγραφή και η μεταγραφή του DNA.

## **2.2 Η Αναπαραγωγή του ιού**

Όλοι οι ιοί χρειάζεται να μεταφέρουν το γονιδίωμά τους στα κύτταρα ξενιστές για να ξεκινήσει η μόλυνση. Το κυτταρόπλασμα του κυττάρου αποτελεί ένα πρώτο φραγμό που πρέπει να προσπεραστεί ώστε να πραγματοποιηθεί η μόλυνση. Στον άνθρωπο, ο κυτταρομεγαλοϊός έχει την ικανότητα να προσβάλλει ινοβλάστες, ενδοθηλιακά κύτταρα, επιθηλιακά κύτταρα, μονοκύτταρα / μακροφάγα, λεία μυϊκά κύτταρα, στρωματικά κύτταρα, νευρώνες, ουδετερόφιλα και ηπατοκύτταρα (Ibanez et al., 1991; Sinzger et al., 2000). Η αντιγραφή και αναπαραγωγή του HCMV *in vitro* μπορεί να υποστηριχθεί μόνο σε ινοβλάστες, ενδοθηλιακά και διαφοροποιημένα κύτταρα του μυελού των οστών καθώς και σε καθορισμένες κυτταρικές σειρές αστροκυττάρων (Ibanez et al., 1991).

Η διαδικασία αναπαραγωγής του ιού είναι σχετικά παρατεταμένη συγκρινόμενη με άλλων ερπητοϊών. Μετά την είσοδό του στο κύτταρο- ξενιστή, το γονιδίωμά του μεταγράφεται αργά σε μια καθορισμένη αλληλουχία και περιλαμβάνει τρεις περιόδους: την άμεσα πρώιμη, την πρώιμη και την όψιμη. Την άμεσα πρώιμη περίοδο αποτελούν οι πρώτες τέσσερις ώρες μετά τη

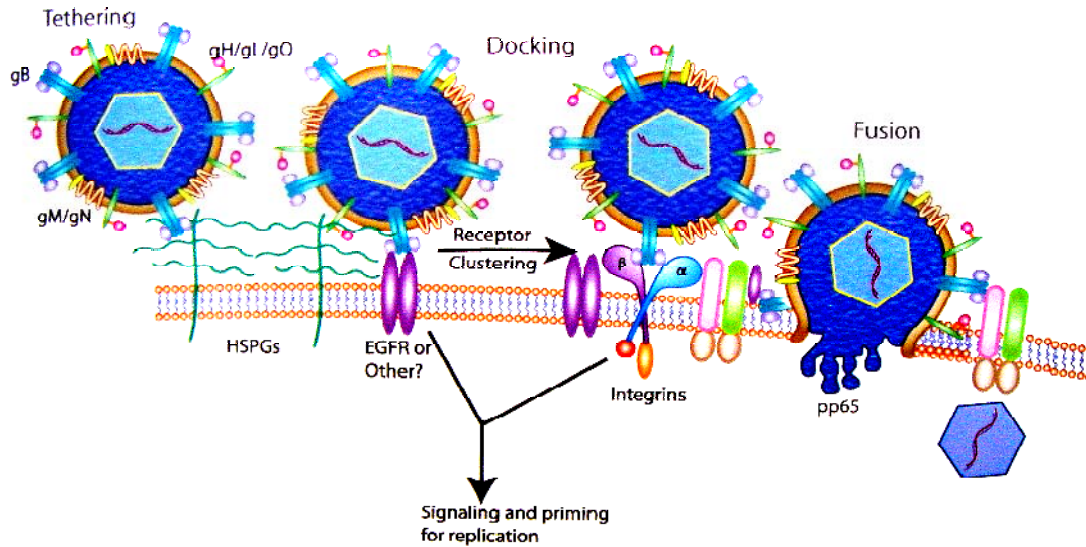
μόλυνση και κατά τη διάρκεια της περιορισμένης μεταγραφής συγκεκριμένων τμημάτων του γενετικού υλικού του ιού, παρέχεται η δυνατότητα παραγωγής ορισμένων ρυθμιστικών πρωτεϊνών, που επιτρέπουν στον ιό να θέσει υπό τον έλεγχό του την σύνθεση μακρομορίων του κυττάρου ξενιστή. Η επόμενη περίοδος, η πρώιμη, διαρκεί 20 περίπου ώρες και χαρακτηρίζεται από την αναπαραγωγή του γονιδιώματος του ιού καθώς και την παραγωγή μολυσματικών πρωτεϊνών. Τέλος στην όψιμη περίοδο, που αρχίζει 24 ώρες μετά τη μόλυνση του κυττάρου-ξενιστή, τα δομικά συστατικά του ιού απελευθερώνονται από το κύτταρο (Demmler, 1994).

Η σύνθεση του ιικού DNA και η συγκρότηση των καψιδίων πραγματοποιείται μέσα στον πυρήνα του μολυσμένου κυττάρου και τα νέα μολυσματικά ιοσωμάτια απελευθερώνονται μέσω του πυρηνικού φακέλου. Η χαρακτηριστική μορφολογία ενός CMV μολυσμένου κυττάρου είναι αυτή ενός μεγάλου κυττάρου με έναν εμφανώς διακριτό πυρήνα. Κατά την λοίμωξη με τον CMV, ιικά σωμάτια με έλυτρο παρατηρούνται με την μορφή κενοτοπίων στο κυτταρόπλασμα και συντήκονται με τις κυτταρικές μεμβράνες επιτρέποντας την έξοδο των ώριμων σωματιδίων του ιού. Ιικά σωμάτια ωριμάζουν επίσης στο σύστημα Golgi και εξέρχονται από το μολυσμένο κύτταρο κατά τον ίδιο τρόπο, παρασύροντας κατά την έξοδό τους γλυκοπρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης του κυττάρου-ξενιστή, που είναι ειδικές για τον ιό.

### **2.2.1. Η είσοδος του ιού στο κύτταρο**

Η εισαγωγή του καψιδίου του ιού στα κύτταρα μέσω της μεμβράνης ακολουθεί τρία βήματα προσβολής (Εικόνα 2.2.1):

1. Πρόσδεση στην θειϊκή ηπαράνη, πρωτεογλυκάνη της κυτταρικής μεμβράνης (HSPG) μέσω των γλυκοπρωτεϊνών του φακέλου gM, gB.
2. Πρόσδεση και με άλλες πρωτεΐνες υποδοχής του κυττάρου: EGFR και ιντεγκρίνες, οι οποίες στέλνουν σήματα στο εσωτερικό του κυττάρου, προετοιμάζοντάς το για την ιική αντιγραφή.
3. Σύντηξη με την κυτταρική μεμβράνη μέσω της γλυκοπρωτεΐνης του φακέλου gB, gH, gL, gO και απελευθέρωση του καψιδίου στο εσωτερικό του κυττάρου.



Εικόνα 2.2.1. Εισαγωγή του ιικού καψιδίου στα κύτταρα μέσω της μεμβράνης.

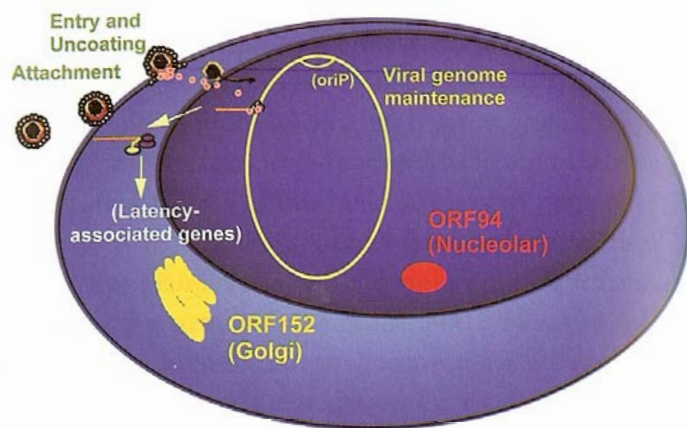
## 2.2.2. Λυτικός κύκλος – Λυσιγονία

Ο ανθρώπινος κυτταρομεγαλοϊός ακολουθεί δυο χαρακτηρισμένες πορείες μέσα σε ένα κύτταρο ξενιστή, της παραγωγικής μόλυνσης και της λυσιγονίας (Εικ. 2.2.2A). Κατά την τελευταία συντηρεί μια εφ' όρου ζωής παρουσία μέσα στον ξενιστή με σποραδική επανενεργοποίηση είτε τυχαία είτε προκαλούμενη από παράγοντες όπως η ανοσοκαταστολή. Το HCMV γονιδίωμα παραμένει ως ένα κυκλικό πλασμίδιο στα μολυσμένα περιφερικά μυελικά κύτταρα του αίματος και χαρακτηρίζεται από την έκφραση συγκεκριμένων μεταγράφων στα μονοπύρνα (Bolovan-Fritts et al., 1999; Hahn et al., 1998). Κατά την κατάσταση της Λυσιγονίας, μετά την είσοδο του ιού στο κύτταρο, το HCMV γονιδίωμα αποθέτεται στον πυρήνα, ενώ κωδικοποιούνται δυο πρωτεΐνες από τα open reading frames - ORF94 και ORF152 (UL124) (White et al., 2000). Η πρώτη παραμένει στον πυρηνίσκο ενώ η δεύτερη εντοπίζεται στο σύμπλεγμα Golgi. Μια συντηρημένη περιοχή έναρξης της αντιγραφής του DNA, η oriP, είναι απαραίτητη για την συντήρηση του ιικού γονιδιώματος.

Τα στάδια μιας παραγωγικής μόλυνσης από την άλλη μεριά συμπεριλαμβάνουν την πρόσδεση του ιού, την είσοδο του καψιδίου, την μεταφορά του DNA στον πυρήνα, την αντιγραφή του DNA, την δημιουργία νέων καψιδίων, την συσσώματωση των απαραίτητων πρωτεϊνών, την προσθήκη του ελύτρου και την αποβολή από το κύτταρο (Mocarski and Courcelle, 2001) (Εικ. 2.2.2B). Η τοποθέτηση του ιικού γονιδιώματος στον πυρήνα συνοδεύεται από ένα καταρράκτη παραγωγικής μεταγραφής και μετάφρασης γονιδίων που διαιρείται σε τρεις φάσεις όπως έχει περιγραφεί παραπάνω.

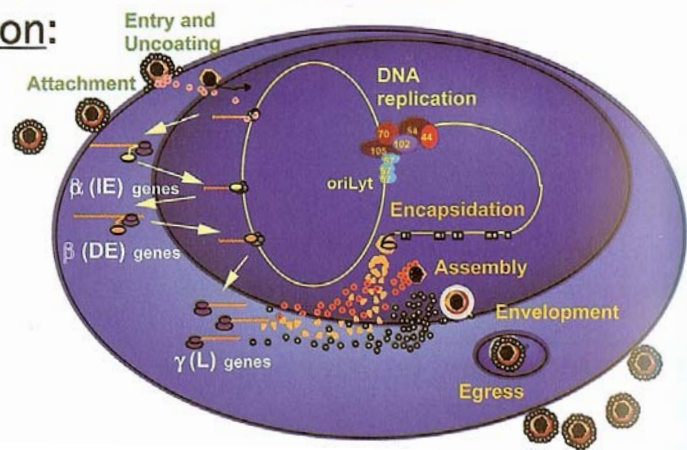
### CMV Latent Infection:

- Myelomonocytic cell.
- Low genome copy number.
- Restricted viral gene expression dependent on differentiation state.



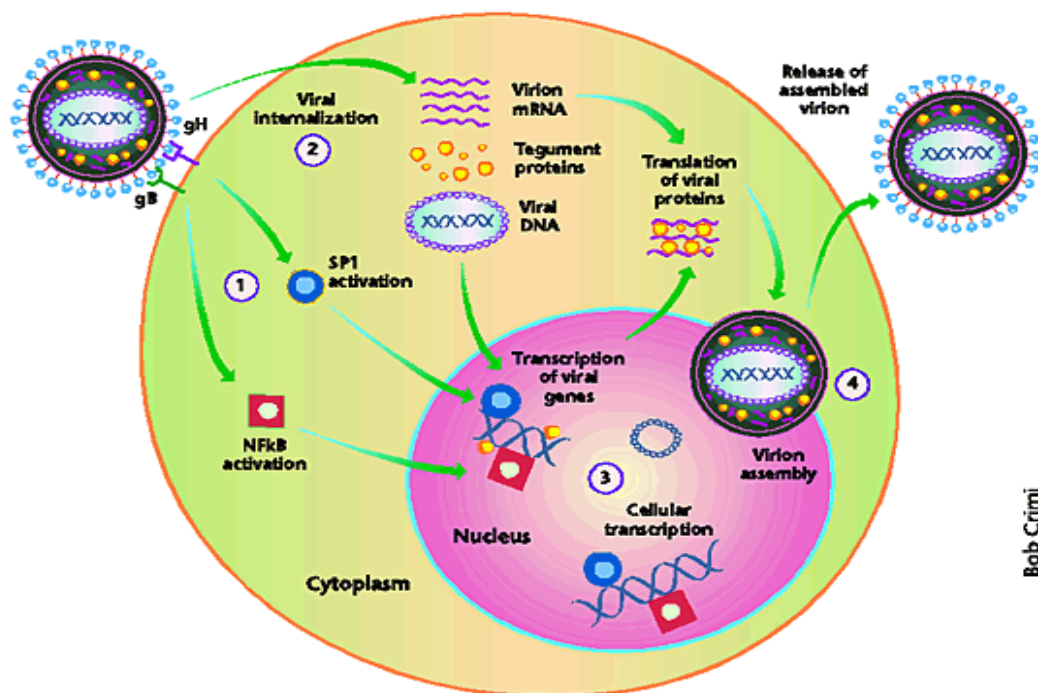
### CMV Productive Infection:

- Differentiated cell types.
- Leads to cell death.
- Virus produced.



Εικόνα 2.2.2A. Λυτικός κύκλος και Λυσιγονία – Σχηματική απεικόνιση





Bob Crimi

**Εικόνα 2.2.2B.** HCMV lytic life cycle.

- 1, Η πρόσδεση των HCMV γλυκοπρωτεϊνών gB και gH σε κυτταρικούς υποδοχείς ενεργοποιεί κυτταρικούς μεταγραφικούς παράγοντες, όπως οι NF-κB και Sp1.
- 2, Ο ιός στη συνέχεια εισέρχεται στο κύτταρο, απελευθερώνοντας το ιικό DNA, τις ιικές πρωτεΐνες και τα ιικά mRNA μετάγραφα μέσα στο κυτταρόπλασμα, όπου τα ιικά mRNAs μεταφράζονται. Το ιικό DNA και συγκεκριμένες ιικές πρωτεΐνες μεταφέρονται στον πυρήνα.
- 3, Μέσα στον πυρήνα, ιικά και κυτταρικά γονίδια εκφράζονται με τη βοήθεια των ενεργοποιημένων μεταγραφικών παραγόντων, και το ιικό DNA αντιγράφεται.
- 4, Το ιικό DNA, ιικές και κυτταρικές πρωτεΐνες και ιικά μετάγραφα πακετάρονται στο ιοσωμάτιο με ένα μηχανισμό που δεν έχει ακόμα καθοριστεί. Κατά την αποβολή του ιοσωματίου από το κύτταρο, δημιουργείται το ιικό έλυτρο και ένα μολυσματικό ιικό σωματίδιο απελευθερώνεται.

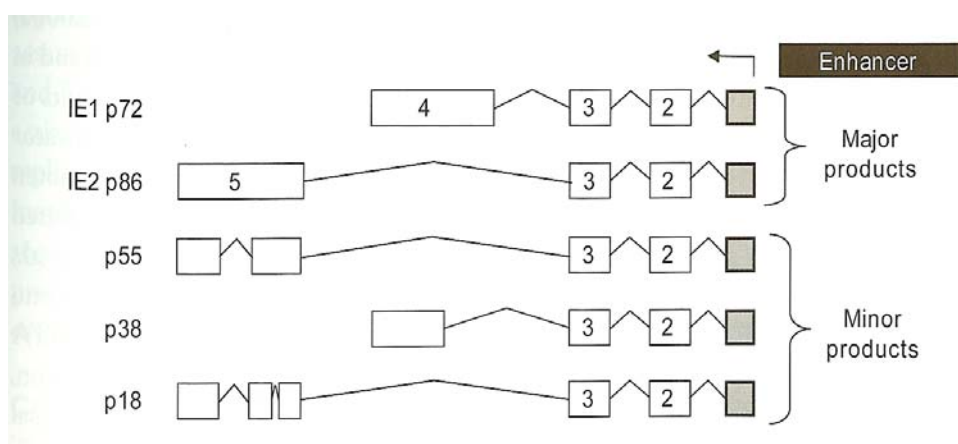
### 2.3 Το HCMV Γονιδίωμα

Ο HCMV θεωρείται ένας πολύπλοκος ιός ενώ το σύνθετο γονιδίωμά του οργανώνει και ρυθμίζει την μεταγραφή των γονιδίων του σε τρεις φάσεις. Το γονιδίωμά του αποτελείται από διπλή έλικα DNA, περίπου 235.000 bp σε μέγεθος ( $150 \times 10^6$  d, γουανίνη και κυτοσίνη σε 58%) και διαθέτει την ικανότητα του ισομερισμού (Ho, 1991). Περιέχει πάνω από 200 ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (open reading frames, ORFs), που είναι συντηρημένα και στα πέντε CMV κλινικά στελέχη που έχουν αλληλουχηθεί (Murphy et al., 2003), και κωδικοποιεί για περισσότερες από 100 πρωτεΐνες (Davison et al., 2003; Yu et al., 2003).

Ο ιός εκφράζει τα mRNAs του την ίδια στιγμή που το κύτταρο ξενιστής συνθέτει και επεξεργάζεται τα δικά του μετάγραφα. Παρόλα αυτά ο HCMV επηρεάζει την κυτταρική ιική μεταγραφή με πολλαπλούς τρόπους. Οι ιικές γλυκοπρωτεΐνες gB και gH επάγουν την ενεργοποίηση κυτταρικών μεταγραφικών παραγόντων την στιγμή που συνδέονται με μόρια της επιφάνειας του κυττάρου (Yurochko et al., 1997), ιικές πρωτεΐνες όπως η pp71 καθοδηγούν την αποικοδόμηση κυτταρικών μεταγραφικών καταστολέων και ενεργοποιούν την μεταγραφή (Kalejta et al., 2003), ιικές πρωτεΐνες που εκφράζονται άμεσα μετά τη μόλυνση, όπως οι IE1 και IE2, ρυθμίζουν την λειτουργία διαφόρων υποκινητών ανταγωνιζόμενες την λειτουργία της κυτταρικής απακυλίωσης ιστονών (Malone et al., 1990; Nevels et al., 2004b; Stenberg et al., 1990), και τελικά η μόλυνση αναπρογραμματίζει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου με αναπόφευκτες αλλαγές στην έκφραση των κυτταρικών γονιδίων (Bresnahan et al., 1996; Jault et al., 1995; Lu and Shenk, 1996).

### 2.3.1. Η Κύρια Άμεσα Πρώιμη Μεταγραφική Μονάδα (MIE Genregion)

Ο HCMV MIE γονιδιακός τόπος συμπεριλαμβάνει την MIE ρυθμιστική περιοχή, πέντε εξόνια και δύο σήματα πολυαδενυλίωσης. Ο υποκινητής του παράγει ένα αρχικό μετάγραφο το οποίο υπόκειται από διαφορικό μάτισμα και πολυαδενυλίωση, ώστε να δημιουργηθούν τελικά πολλαπλά είδη mRNA (Εικ.2.3.1). Ο ενισχυτής της MIE περιοχής, αποτελείται από ~540 bp και είναι



**Εικόνα 2.3.1.** Διαφορικό μάτισμα του αρχικού μεταγράφου οδηγεί σε πολλαπλά είδη mRNA

ουσιώδης παράγοντας στη ρύθμιση της λειτουργίας του MIE υποκινητή, της ιικής αντιγραφής και της παθογένειας. Απώλεια ολόκληρου ή μέρους του ενισχυτή οδηγεί σε ανικανότητα της αντιγραφής ή σε μειωμένη μολυσματικότητα αντίστοιχα (Isomura and Stinski, 2003), ενώ η εκάστοτε φάση της μόλυνσης προκύπτει από την δυναμική αλληλεπίδραση μεταξύ κυτταρικών και ιικών παραγόντων που δρουν πάνω στον ενισχυτή και υποκινητή της MIE περιοχής με θετικό ή αρνητικό τρόπο ρύθμισης.

Η κύρια άμεσα πρώιμη ρυθμιστική περιοχή (MIE) διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ισορροπία μεταξύ λυτικής και λανθάνουσας μόλυνσης. Η έκφραση των γονιδίων της μεταγραφικής αυτής μονάδας οδηγεί σε παραγωγική μόλυνση, ενώ κατά την λυσιγονία σπάνια αυτά εκφράζονται (Meier and Stinski, 1996). Οι μηχανισμοί κατά τους οποίους ο MIE ενισχυτής / υποκινητής απενεργοποιείται ώστε να εγκαθιδρυθεί η λυσιγονία, δεν έχουν γίνει πλήρως κατανοητοί. Η ετεροχρωματίνη πιθανώς συμμετέχει στην απενεργοποίηση, καθώς τα συστατικά της, οι υποακυλιωμένες ιστόνες, η πρωτεΐνη ετεροχρωματίνης 1 και η απακετυλάσες των ιστονών (HDAC) έχουν παρατηρηθεί να συμπυκνώνονται πάνω σε ανενεργούς MIE ενισχυτές / υποκινητές, σε συνθήκες λυσιγονίας (Murphy et al., 2002; Reeves et al., 2006). Κατά την επανενεργοποίηση σιωπηλών CMV γονιδιωμάτων η ρύθμιση του MIE υποκινητή είναι από τα πρώτα γεγονότα. Επίδραση με αναστολείς των HDACs οδηγεί σε αναίρεση της καταστολής και έναρξη της παραγωγικής ιικής αντιγραφής (Meier, 2001; Murphy et al., 2002).

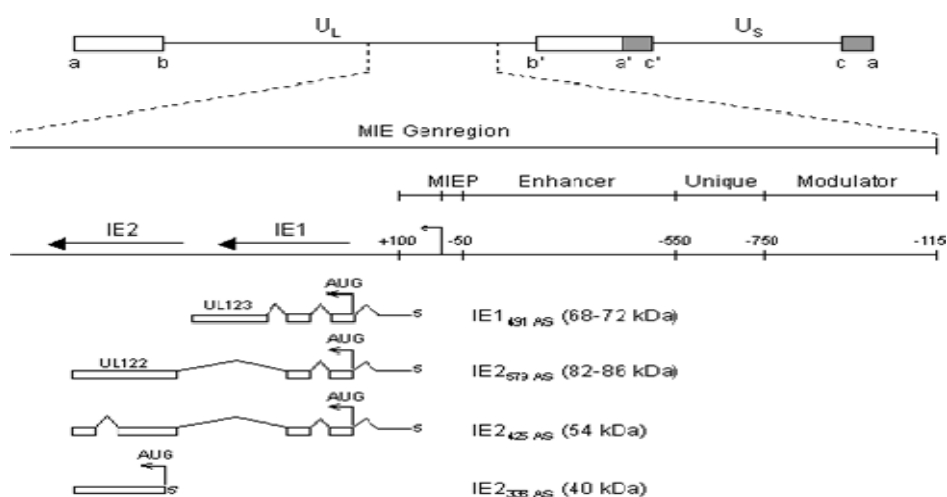
### **2.3.2. Οι Άμεσα Πρώιμες Πρωτεΐνες IE1 και IE2**

Κατά την ιική μόλυνση, τρεις κατηγορίες ιικών γονιδίων, τα άμεσα πρώιμα (IE), τα πρώιμα και τα όψιμα γονίδια, εκφράζονται προσδευτικά με το πέρασμα του χρόνου (Demarchi, 1981; McDonough and Spector, 1983; Wathen et al., 1981). Εξ' ορισμού, τα άμεσα πρώιμα γονίδια (IE) εκφράζονται πρώτα και είναι υπεύθυνα για την ενεργοποίηση της μεταγραφής των HCMV πρώιμων γονιδίων.

Τα αρχικά και πιο άφθονα ιικά άμεσα πρώιμα μετάγραφα προέρχονται από την άμεσα πρώιμη μεταγραφική μονάδα, υπό τον έλεγχο του κύριου IE

υποκινητή (MIEP), και εκφράζουν τις IE1p72 (72kDa – 491 αμινοξέα) και IE2p86 (86kDa – 579 αμινοξέα) πρωτεΐνες (Kerry et al., 1995; Wilkinson et al., 1984). Οι δύο αυτές κύριες, άμεσα πρώιμες, ιικές πρωτεΐνες, εκφράζονται μέσω διαφορετικού ματίσματος από ένα μοναδικό μετάγραφο που αποτελείται από 5 εξόνια (Stenberg et al., 1984; Stenberg et al., 1985).

Το IE1 mRNA περιλαμβάνει τα εξόνια 1 έως 4, ενώ το IE2 mRNA αποτελείται από τα εξόνια 1 έως 3 και 5 (Εικ. 2.3.2). Κατά συνέπεια, οι δύο κύριες IE πρωτεΐνες μοιράζονται μια κοινή αμινοτελική περιοχή 85 αμινοξέων (aa). Οι δύο αυτές πρωτεΐνες αποτελούν βασικούς πλειοτροπικούς ρυθμιστές του ιικού λυτικού κύκλου και παρόλο που μοιράζονται ορισμένα χαρακτηριστικά, οι IE1 p72 και IE2 p86 είναι εμφανώς διαφορετικές στη δομή και τη λειτουργία.



**Εικόνα 2.3.2.** Εξόνια των IE1 και IE2 mRNAs

Ενώ η κύρια άμεσα πρώιμη πρωτεΐνη IE1-72kDa, δεν είναι απαραίτητη για την αντιγραφή του ιού *in vitro*, μια μετάλλαξη στο εξόνιο 4 του IE1 γονιδίου οδηγεί σε διαταραχή της αντιγραφής και αναπαραγωγής του ιού σε συνθήκες χαμηλού ιικού φορτίου (multiplicity of infection-m.o.i) και σε ατελή ενεργοποίηση πρώιμων και όψιμων ιικών γονιδίων (Gawn and Greaves, 2002; Greaves and Mocarski, 1998; Mocarski et al., 1996). Το HCMV IE1 γονίδιο έχει πολλαπλές λειτουργίες, καθώς οδηγεί σε θετική ρύθμιση τον ίδιο του τον υποκινητή (Cherrington and Mocarski, 1989), ανταγωνίζεται την απακετυλίωση των ιστονών (Nevels et al., 2004a; Reeves et al., 2006), αποτελεί μια κινάση ικανή να αυτό-φοσφωρυλιώνεται, να φωσφορυλιώνει και να στοχεύει μεταγραφικούς

παράγοντες όπως οι E2F-1-3, c- Jun, Rb, p107 και p130 (Pajovic et al., 1997), αναστέλλει την απόπτωση οδηγώντας το κύτταρο σε μια κατάσταση S – φάσης (Castillo et al., 2000; Fortunato et al., 2002), προάγει την διάσπαση των ND10 πυρηνικών σωματίων (Ahn et al., 1998; Ahn and Hayward, 1997; Kelly et al., 1995; Koriath et al., 1996; Wilkinson et al., 1998) και την καταστολή της απόκρισης ιντερφερόνης (Boyle et al., 1999; Browne et al., 2001; Navarro et al., 1998; Simmen et al., 2001; Zhu et al., 1997), αφού στοχεύει και ανταγωνίζεται τους μεταγωγείς σημάτων και μεταγραφικούς ενεργοποιητές STAT1 και STAT2 (Paulus et al., 2006). Σε κύτταρα που βρίσκονται στη φάση της μίτωσης, η IE1 πρωτεΐνη παρουσιάζεται να στοχεύει τη συμπυκνωμένη χρωματίνη (Lafemina et al., 1989).

Κατά την ενεργή μόλυνση η IE1 λειτουργεί συνεργατικά με την IE2 (Lukac et al., 1994), η οποία φαίνεται να είναι απολύτως απαραίτητη για την ανάπτυξη του HCMV, καθώς αποτελεί ισχυρό μεταγραφικό trans-ενεργοποιητή άλλων ιικών γονιδίων (Klucher et al., 1993; Malone et al., 1990; Pizzorno et al., 1988) και αλληλεπιδρά με διάφορες κυτταρικές πρωτεΐνες που επιτρέπουν την εξέλιξη της μόλυνσης (Marchini et al., 2001; Sanders et al., 2008; Sourvinos et al., 2007). Η IE2 δημιουργεί ομοδιμερή και εντοπίζεται μαζί με τα ιικά γονιδιώματα στην περιφέρεια των ND10 πυρηνικών περιοχών, χωρίς να προκαλεί την διάσπασή τους (Ishon et al., 1997). Παρόλο που οι δυο αυτές πρωτεΐνες συνεργάζονται για την ενεργοποίηση των πρώιμων πρωτεϊνών του ιού, φαίνεται ότι δρουν ανταγωνιστικά στην ρύθμιση του δικού του κοινού υποκινητή (MIEP). Σε αντίθεση με την IE1, η IE2 είναι απολύτως απαραίτητη στην εξέλιξη της ιικής αντιγραφής και μια σειρά μελετών καθιστούν την IE2 ως ένα ισχυρό trans – ενεργοποιητή πολλαπλών ιικών και κυτταρικών υποκινητών και ως έναν trans- καταστολέα του δικού της υποκινητή (Marchini et al., 2001; White et al., 2004). Η IE2 πρωτεΐνη παρουσιάζεται να δρα μέσω κυτταρικών μεταγραφικών παραγόντων προσδεδεμένων σε TATA περιοχές και μέσω διαφόρων *cis* στοιχείων, ώστε να διεγείρει την RNA πολυμεράση II – εξαρτώμενη μεταγραφή. Έτσι εντοπίζεται να έχει φυσική αλληλεπίδραση με πρωτεΐνες του βασικού συμπλόκου έναρξης της μεταγραφής (π.χ. TBP, TFIIIB, TAF<sub>II</sub>130/TAF4) (Caswell et al., 1993; Lukac et al., 1997; Lukac et al., 1994), με μεταγραφικούς παράγοντες ειδικούς υποκινητών (π.χ. Rb, p53, TEF-1, AP1 και SP1) (Bonin and McDougall, 1997; Fortunato et al., 1997; Lukac et al., 1994;

Sommer et al., 1994), και με ακέτυλο-τρανφεράσες ιστονών (π.χ. CBP, PCAF) (Bryant et al., 2000; Schwartz et al., 1996). Η μετα-μεταγραφική τροποποίηση της ανθρώπινης IE2 p86 πρωτεΐνης με φωσφορυλίωση ή SUMO-ύλίωση ρυθμίζει την ιδιότητα της μεταγραφικής ενεργοποίησης (Ahn et al., 2001; Hofmann et al., 2000). Σε πειράματα παροδικής έκφρασης έχει δειχθεί πως η IE2 p86 ενεργοποιεί την G1 φάση του κυτταρικού κύκλου και σταματά την μετάβαση από την G1 στην S φάση, σε p53<sup>+</sup> κύτταρα, ενώ σε p53<sup>-</sup> κύτταρα ο κύκλος σταματά στην S ή στην G2/M φάση (Murphy et al., 2000; Song and Stinski, 2005).

Τα προϊόντα του IE γονιδίου ενεργοποιούν πρώιμες και όψιμες φάσεις της γονιδιακής έκφρασης και με τον τρόπο αυτό ρυθμίζουν τη μετάβαση στο λυτικό κύκλο, ενώ αδυναμία έκφρασης των IE1 και IE2 πρωτεϊνών ίσως προάγει την εγκαθίδρυση της λανθάνουσας φάσης (Malone et al., 1990; Stenberg et al., 1990).

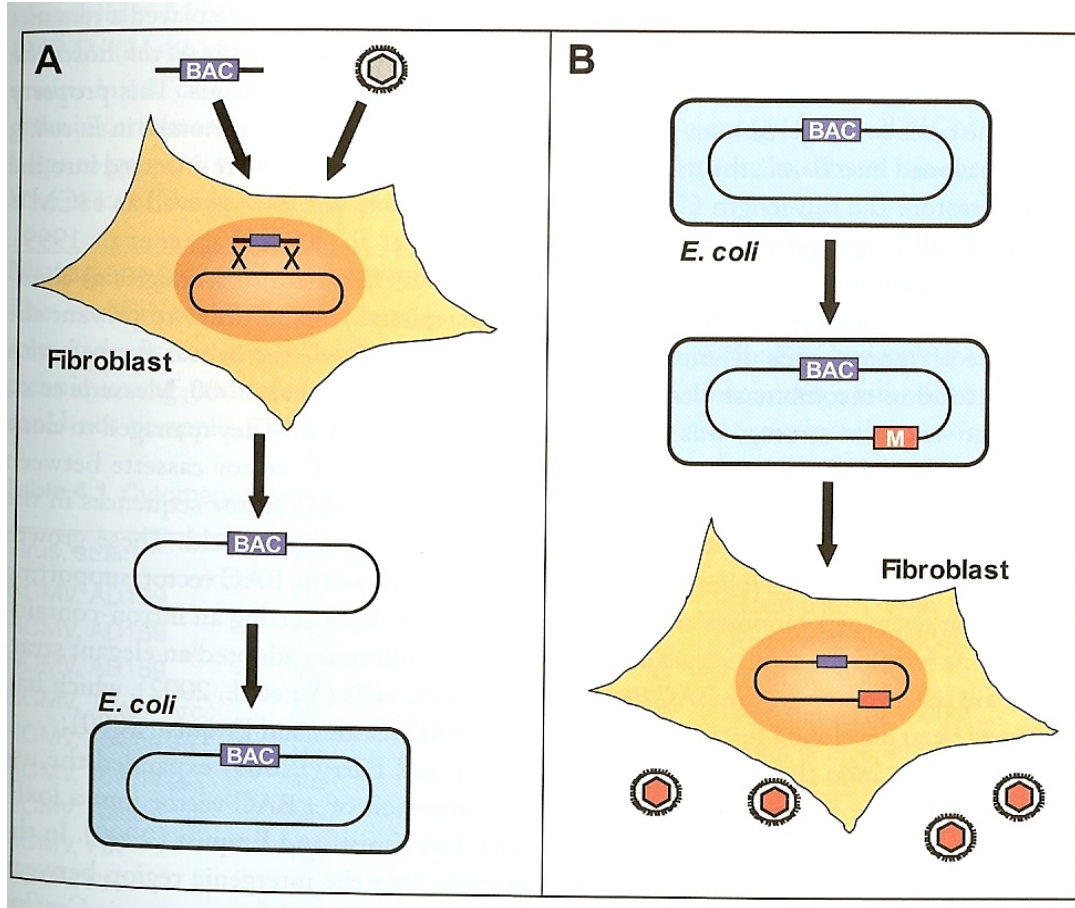
### **2.3.3. Τεχνητά γονιδιώματα μέσω BAC μεταλλαξιγένεσης**

Η γνώση μας για τις λειτουργίες των γονιδίων του CMV εξελίσσονται σχετικά αργά παρόλο που η αλληλούχιση του γονιδιώματος του HCMV στελέχους AD169, είναι γνωστή από το 1990 (Chee et al., 1990). Οι λόγοι για την έλλειψη δεδομένων είναι ο μεγάλος αριθμός των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται και το μέγεθος των γονιδιωμάτων με τις επακόλουθες δυσκολίες για την δημιουργία μεταλλαγμένων στελεχών. Η πλειονότητα των HCMV πρωτεϊνών δεν έχει ακόμα χαρακτηριστεί ενώ ακόμα και για εκείνες που έχουμε μια λειτουργική γνώση, όπως π.χ. οι γλυκοπρωτεΐνες του ελύτρου, μια ξεκάθαρη κατανόηση του τρόπου της δράσης τους συνήθως λείπει. Ένας αριθμός από ORFs έχουν κλωνοποιηθεί σε πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης και οι λειτουργίες τους έχουν μελετηθεί ανεξάρτητα από μια ιική μόλυνση και ξεχωριστά από άλλα ιικά γονίδια, μέσω πειραμάτων παροδικής διαμόλυνσης. Εντούτοις, πολλές ιικές πρωτεΐνες πρέπει να αλληλεπιδράσουν με άλλες ιικές ή κυτταρικές πρωτεΐνες ώστε να αναπτύξουν τη δράση τους, ενώ πολλά γονίδια παρουσιάζουν παροδική έκφραση μόνο κατά τη διάρκεια ενός μολυσματικού

κύκλου. Έτσι φαίνεται πως είναι απαραίτητο να μελετηθεί ο ρόλος του εκάστοτε γονιδίου στα πλαίσια μιας ιικής μόλυνσης.

Η γενετική ανάλυση πολλών μικρών DNA ιών ωφελούνταν από την δυνατότητα της κλωνοποίησης ολόκληρου του ιικού τους γονιδιώματος σε πλασμιδιακούς φορείς και του χειρισμού των ιικών DNA αλληλουχιών με εξελιγμένες μοριακές τεχνικές *in vitro* ή μέσα σε *E.coli*. Η ανάπτυξη νέων φορέων κλωνοποίησης, όπως το *E.coli* – F – factor προερχόμενο, τεχνητό βακτηριακό χρωμόσωμα BAC (Bacterial Artificial Chromosome), προσέφερε τη δυνατότητα κλωνοποίησης μέχρι και 300 kbp, κάνοντας το μέγεθος του CMV γονιδιώματος μη απαγορευτικό παράγοντα. Έτσι, το BAC replicon, που στα άκρα του έχουν τοποθετηθεί ιικές αλληλουχίες, διαμολύνεται σε ινοβλάστες ήδη μολυσμένους με CMV. Τα ιικά γονιδιώματα που έχουν ενσωματώσει την BAC αλληλουχία μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού απομονώνονται και διαμολύνονται σε *E.coli*. Το CMV γονιδίωμα που διατηρείται ως ένα BAC χρωμόσωμα μέσα σε *E.coli* μπορεί να χρησιμοποιηθεί πλέον σαν στόχος μεταλλάξεων. Τα μεταλλαγμένα BACs διαμολύνονται ξανά πίσω σε ινοβλάστες απ' όπου μπορούν τελικά να παράγουν μεταλλαγμένα ιικά στελέχη (Εικ.2.3.3).

Η δυνατότητα στοχευόμενης μεταλλαξιγένεσης έκανε εφικτό τον έλεγχο υποθέσεων σχετικά με το ρόλο ιικών γονιδίων κατά τη διάρκεια της CMV μόλυνσης. Οι πρώτες μεταλλάξεις στόχευσαν τα άμεσα πρώιμα γονίδια IE1, IE2 και IE3 (Greaves and Mocarski, 1998; Messerle et al., 1997; Mocarski et al., 1996; White et al., 2004).



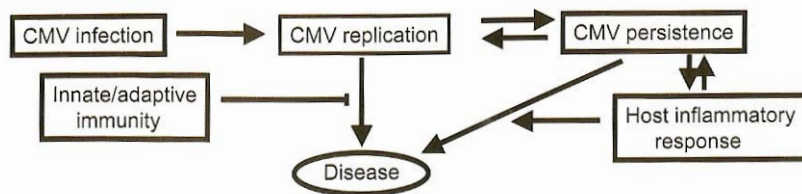
**Εικόνα 2.3.3.** A) Κλωνοποίηση ενός CMV γονιδιώματος ως BAC. Το BAC ρεπλικόνιο (μπλε), όπου στα άκρα του έχουν προστεθεί ιικές αλληλουχίες, διαμολύνεται σε ινοβλάστες, οι οποίοι έχουν μολυνθεί με CMV. Τα ιικά γονιδιώματα που έχουν ενσωματώσει την BAC κασέτα, μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού, απομονώνονται και διαμολύνονται σε *E.coli*. B) Η διαδικασία δημιουργίας ανασυνδυασμένων CMVs με τη χρήση της BAC τεχνολογίας. Το CMV γονιδίωμα που διατηρείται ως BAC μέσα σε *E.coli*, χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα για την εισαγωγή μεταλλάξεων (M κόκκινη). Το μεταλλαγμένο BAC διαμολύνεται στη συνέχεια σε ινοβλάστες έτσι ώστε να παραχθούν μεταλλαγμένα ιοσωμάτια.



## Κεφάλαιο 3 - Η HCMV Λοίμωξη

### 3.1 Αλληλεπιδράσεις με τον Ξενιστή

Κατά τη διάρκεια μιας HCMV λοίμωξης είναι ξεκάθαρο πως επικρατεί μια ισορροπία μεταξύ της άμυνας του ξενιστή και της τοξικότητας του ιού (Εικ.3.1). Η ισορροπία αυτή μπορεί να μετατοπιστεί σε επιτυχημένη καταστολή ή επιτυχημένη επαγωγή της αντιγραφής του ιού, και επηρεάζεται από την ικανότητα του ξενιστή να σιγήσει το ιικό γονιδίωμα και την ικανότητα του ιού αντίστοιχα να ρυθμίσει την μεταγραφή του μέσω του κύριου άμεσα πρώιμου υποκινητή (MIEP). Το αποτέλεσμα εξαρτάται από πολλούς παράγοντες και από το κυτταρικό υπόβαθρο. Μια μετατόπιση της ισορροπίας, έστω και μικρή, ευνοϊκή για τον ξενιστή, μπορεί να οδηγήσει σε δυσανάλογα κατασταλτικά αποτελέσματα, μετρώντας τον αριθμό των μολυσμένων κυττάρων ή το πλήθος των ισωματίων που παράγονται.

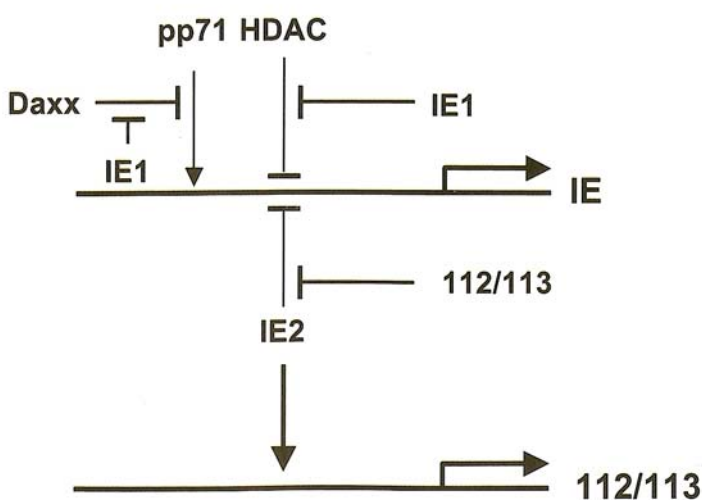


Εικόνα 3.1. Ανοσία του ξενιστή και CMV μόλυνση/ασθένεια

#### 3.1.1. Άμεσα Πρώιμες Αλληλεπιδράσεις

Αφού περάσουν στον πυρήνα του κυττάρου ξενιστή, τα ιικά γονιδιώματα συναντούν τις ιστόνες και πιθανώς χρωματινοποιούνται, πριν ενεργοποιηθούν από trans - ενεργοποιητές όπως η tegument πρωτεΐνη pp71. Σε αυτό το στάδιο, ξεκινά η μεταγραφή των ιικών γονιδιωμάτων και συνεχίζει μέχρι να απενεργοποιηθούν από τις κυτταρικές δεακετυλάσες των ιστονών HDAC, την ιική IE2, την υδρόλυση ή τον διαχωρισμό της πρωτεΐνης pp71 από την κυτταρική hDaxx στα ND10. Τα γονιδιώματα που πλησιάζουν τα ND10

πυρηνικά σωμάτια φαίνεται να προστατεύονται από την πιθανή αποικοδόμηση. Αυτά τα ιικά γονιδιώματα συνδέονται με τα ND10 πιθανώς μέσω DNA/πρωτεϊνικών συμπλόκων που δημιουργούνται μεταξύ της pp71, της Daxx, των PML και του ιικού DNA (Hofmann et al., 2002; Ishov et al., 2002). Το αν η Daxx πρωτεΐνη του κυττάρου με την πολύ μικρή της συγγένεια στα ND10 απενεργοποιεί ή επάγει την ενεργοποίηση της ιικής μεταγραφής/αντιγραφής, μέσω της pp71, παραμένει αδιευκρίνιστο. Μετά την αρχική, αλλά ελάχιστη, μετάφραση των άμεσα πρώιμων IE ιικών πρωτεϊνών, ο πρώιμος 112/113 υποκινητής ενεργοποιείται και οι 112/113 πρωτεΐνες παράγονται (Ahn et al., 1999; Malone et al., 1990). Την ίδια στιγμή, οι IE1 και IE2 πρωτεΐνες προσπαθούν να διατηρήσουν ενεργό τον κύριο άμεσα πρώιμο υποκινητή (MIEP) ή να τον σιωπήσουν αντίστοιχα. Παρόλα αυτά, τα 112/113 προϊόντα, καθώς παράγονται μπλοκάρουν τη δράση του IE2 καταστολέα του MIEP, ο οποίος δεν επιτρέπει την περαιτέρω ενεργοποίηση της πρώιμης και όψιμης μεταγραφής των ιικών γονιδίων και τελικά την ιική αντιγραφή. Η καταστολή αυτή προέρχεται από τον ξενιστή μέσω των HDAC και από τον ιό μέσω της IE2, ενώ γίνεται προσπάθεια να ανατραπεί μέσω των ιικών IE1 και 112/113 πρωτεϊνών (Iwayama et al., 1994; Kerry et al., 1996; Tang and Maul, 2003). Η IE1 πρωτεΐνη προσδένεται στις ελεύθερες HDAC, εμποδίζοντας τες να καταστέλλουν τα χρωματινοποιημένα ιικά γονιδιώματα, ενώ οι 112/113

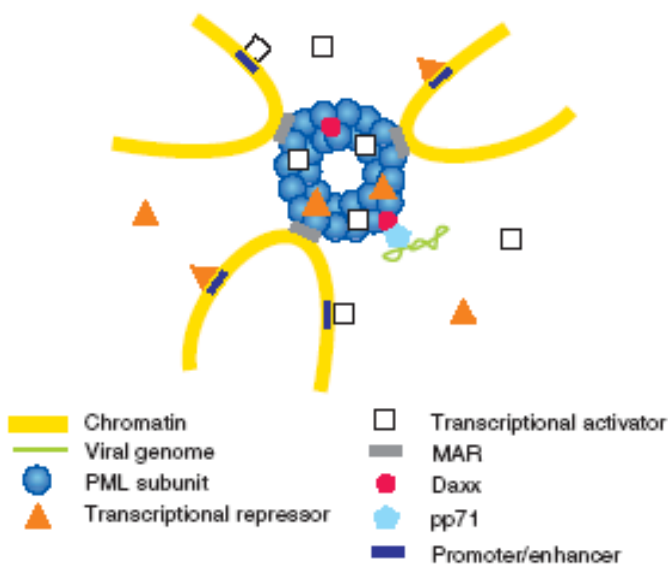


πρωτεΐνες ανταγωνίζονται την κατασταλτική δράση της IE2. Η κατανόηση της ρύθμισης των παραπάνω ισορροπιών θα οδηγήσει στην εξήγηση των γεγονότων που είναι υπεύθυνα για την εξέλιξη μιας παραγωγικής λυτικής μόλυνσης ή μιας κατάστασης λυσιγονίας (Εικ.3.1.1).

**Εικόνα 3.1.1.** Ανταγωνιστές στην ρύθμιση του κύριου άμεσα πρώιμου υποκινητή/ενισχυτή.

### 3.1.2. ND10 Πυρηνικά Σωματίδια

Τα γονικά ιικά γονιδιώματα διαφόρων DNA ιών έχουν ανιχνευθεί σε στενή σύνδεση με συστατικές πρωτεΐνες μικρών πυρηνικών δομών, γνωστών ως ND10 (Ishov and Maul, 1996). Τα ND10 είναι διάσπικτα σφαιρικά ενδοπυρηνικά σωματίδια, συνδεδεμένα με την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη PML, ενώ είναι επίσης γνωστά ως PML σωματίδια ή PML ογκογόνες περιοχές (PODs). Τα γονιδιώματα των ερπητοϊών αποθέτονται δίπλα στα ND10 αμέσως μετά την μόλυνση του κυττάρου, και αυτή είναι η θέση όπου ξεκινά η μεταγραφή και η αντιγραφή του ιικού DNA (Ahn et al., 1999; Everett et al., 2003; Ishov and Maul, 1996; Ishov et al., 1997; Maul et al., 1996; Sourvinos and Everett, 2002; Sourvinos et al., 2007). Τα ND10 απαντώνται στον πυρηνικό σκελετό, ενώ εμπλέκονται στην κυτταρική μεταγραφή, τη δομή της χρωματίνης, την επιδιόρθωση του DNA, τη μίτωση και την απόπτωση (Bernardi and Pandolfi, 2003; Borden, 2002; Dellaire and Bazett-Jones, 2004; Maul et al., 2000). Παρόλο που καθορίζονται από την παρουσία των PML, οι κυτταρικές πρωτεΐνες που συνδέονται με τα ND10 περιλαμβάνουν και τις Sp100, hDaxx, SUMO-1, p53, STAT-1, STAT-2 και ATRX (Choi et al., 2006; Negoren and Maul, 2001; Paulus et al., 2006; Tang et al., 2004). (Εικ. 3.1.2)



**Εικόνα 3.1.2.** Σχηματική απεικόνιση των ND10 και των δομών που αλληλεπιδρούν.

Η δομή των δυναμικών αυτών σωματίων επηρεάζεται από διάφορες μορφές στρες, όπως το θερμικό σοκ, η απόκριση ιντερφερόνης και η ιική μόλυνση (Everett, 2001; Everett et al., 2006; Maul, 1998). Έχει παρατηρηθεί ότι σε ένα αριθμό παθολογικών καταστάσεων ή περιβαλλοντικής διέγερσης, οι ND10 συστατικές πρωτεΐνες μετατοπίζονται ή αποδιοργανώνονται. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η PML είναι μια πρωτεΐνη που επάγει την

απόκριση ιντερφερόνης και πολλοί είναι οι DNA ιοί που επιδρούν στα σωμάτια των ND10.

Ο πιθανός ρόλος των ND10 στην αναπαραγωγή των DNA ιών είναι αμφιλεγόμενος. Τα ND10 είναι συνδεδεμένα με ενεργές μεταγραφικές περιοχές στον πυρήνα (Ching et al., 2005), υποδεικνύοντας ένα θετικό ρόλο στην εξέλιξη της έκφρασης των ιικών γονιδίων και κατά συνέπεια στην παραγωγική ιική μόλυνση (Maul, 1998). Από την άλλη μεριά, διάφορες μελέτες υποστηρίζουν την ιδέα των ND10 ως αντι-ιικό παράγοντα του αμυντικού μηχανισμού του κυττάρου (Everett and Chelbi-Alix, 2007; Preston, 2000; Tavalai et al., 2006) καθώς, πολλές ND10 πρωτεΐνες, όπως οι Sp100, hDaxx και HP1, έχουν δείξει κατασταλτική επίδραση σε μια πληθώρα πειραμάτων γονιδιακής έκφρασης (Ahn and Hayward, 2000; Saffert and Kalejta, 2007; Woodhall et al., 2006), ενώ είναι επιπροσθέτως επαγώγιμες από ιντερφερόνη (Chelbi-Alix et al., 1995; Guldner et al., 1992; Taylor et al., 2000). Τα ND10 σωμάτια σήμερα θεωρείται ότι αποτελούν ένα ενδογενή κυτταρικό φραγμό στις ιικές μολύνσεις. Σύμφωνα με αυτή τη θεωρία, η σίγηση μέσω RNAi των PML ή Daxx, ενίσχυσε σημαντικά την αντιγραφή των HCMV και HSV-1 ιών (Everett, 2006; Lukashchuk et al., 2008; Tavalai et al., 2006; Tavalai et al., 2008).

Όπως συμβαίνει και με άλλους DNA ιούς, το γονιδίωμα του HCMV που πολλαπλασιάζεται στον πυρήνα του μολυσμένου κυττάρου, αλληλεπιδρά και επάγει την ανακατανομή πολλών κυτταρικών πρωτεϊνών. Το γονικό HCMV DNA έχει δειχθεί ότι συνδέεται με τα ND10 κατά τις πρώτες στιγμές μετά τη μόλυνση, ενώ τα HCMV σύμπλοκα αντιγραφής αναπτύσσονται από τα αρχικά γονιδιώματα μόνο στην περιφέρεια αυτών των πυρηνικών δομών (Ahn et al., 1999; Ishov and Maul, 1996; Ishov et al., 1997), μια παρατήρηση που συμπεριλαμβάνει μέλη όλων των ερπητο-ιών αδeno-ιών και παποβα-ιών (Everett, 2001; Maul, 1998).

Η IE1 πρωτεΐνη του HCMV, αρχικά στοχεύει και συγκεντρώνεται στις ND10 περιοχές και ακολούθως επάγει τη διάσπασή τους (Ahn and Hayward, 1997; Koriath et al., 1996; Muller and Dejean, 1999; Wilkinson et al., 1998). Ένα ανάλογο φαινόμενο, περιγράφεται για τον HSV1 ιό, όπου η άμεσα πρώιμη πρωτεΐνη του, ICP0, στοχεύει και διασπά τις ND10 δομές. Παρόλο που η IE1 συνεννοπίζεται απόλυτα με τα ND10 κατά τις πρώτες ώρες μετά τη μόλυνση, η IE2 πρωτεΐνη μπορεί να βρεθεί μόνο σε θέσεις γειτονικές των ND10 στα

μολυσμένα κύτταρα (Ahn and Hayward, 1997; Ahn et al., 1999; Ishov et al., 1997; Koriath et al., 1996). Έτσι οι δυο ιικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες δεν φαίνεται να καταλαμβάνουν τον ίδιο χώρο αλλά τοποθετούνται η μία δίπλα στην άλλη κατά την εξέλιξη της μόλυνσης. Για την IE1 έχει αναφερθεί μια άμεση αλληλεπίδρασή της με την, ND10 συστατική πρωτεΐνη, PML (Ahn et al., 1998), παρόλο που η σύνδεσή τους είναι παροδική, καθώς η IE1 είναι ικανή να προάγει τη διάσπαση των ND10 από τις 3h.p.i.(Ahn and Hayward, 1997; Koriath et al., 1996; Wilkinson et al., 1998). Σύμφωνα με τα παραπάνω η μόλυνση κυττάρων ελλειμματικών σε PML, παρουσιάζει μια διάχυτη εικόνα της IE1 στον πυρήνα (Tavalai et al., 2006), σε αντίθεση με τη διάστικτη μορφή που έχει σε φυσιολογικούς ινοβλάστες. Η IE2 πρωτεΐνη αντίθετα παραμένει κατανεμημένη σε διάστικτες εστίες παρόλη τη διάσπαση των ND10 ή την πιθανή έλλειψή τους (Tavalai et al., 2006). Οι παρατηρήσεις ότι η ιική μεταγραφή πραγματοποιείται στα ND10, η IE1 CMV πρωτεΐνη διασπά και η ιντερφερόνη επάγει τις ND10 συνδεδεμένες πρωτεΐνες, υποδηλώνουν μια τουλάχιστον όχι τυχαία σχέση της ιικής μεταγραφής και των πυρηνικών αυτών δομών.

Η διάσπαση των ND10 δομών τελικά φαίνεται ότι δεν συμβαίνει μέσω μιας ενζυμικής δράσης, αλλά με την επέμβαση της ιικής IE1 πρωτεΐνης, η οποία συνδέεται με τις ND10-συστατικές πρωτεΐνες, PML (Ahn et al., 1998) και Daxx (Tang and Maul, 2003) και τις απομακρύνει από το σύμπλοκο. Σε αντίθεση με τον HSV, ο CMV λοιπόν, ανταγωνίζεται τους κυτταρικούς καταστολείς απενεργοποιώντας τους μέσω της πρόσδεσης με την IE1 πρωτεΐνη του, χωρίς να χρειάζεται να τους οδηγεί στο μονοπάτι του πρωτεοσώματος για αποικοδόμηση.

### **3.1.3. Ανακατανομή της Χρωματίνης**

Η δομή του νουκλεοσώματος, της βασικής δομικής μονάδας της χρωματίνης, διασαφηνίστηκε για πρώτη φορά πριν από περίπου 30 χρόνια, ως ένα σύμπλοκο χρωμοσωμικού DNA και πρωτεϊνικών ιστονών (H1, H2A, H2B, H3, H4) (Kornberg, 1974). Καθώς έχει γίνει ξεκάθαρο ότι το μεταγραφικά ενεργό DNA δεν είναι απαραίτητα ελεύθερο ιστονών (Kuo and Allis, 1998), θεωρείται

σήμερα ότι βιοχημικές τροποποιήσεις αυτών των ιστονών, σε συγκεκριμένα αμινοξέα στις αμινοτελικές περιοχές τους, είναι υπεύθυνες για μια πιο “κλειστή” ή πιο “ανοιχτή” δομή της χρωματίνης που οδηγεί σε γονιδιακή σιώπηση ή έκφραση, αντίστοιχα. Αυτές οι τροποποιήσεις συμπεριλαμβάνουν : μεθυλίωση, ακετυλίωση, απακυλίωση, SUMO-υλίωση, ουβικιτίνωση και φωσφορυλίωση. Η ακετυλίωση των ιστονών συσχετίζεται στενά με την μεταγραφική ενεργοποίηση, ενώ η μεθυλίωσή τους αντίθετα συνδέεται με μεταγραφικά ανενεργές περιοχές.

Έτσι, φαίνεται πως η δομή της χρωματίνης έχει προφανή ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης των ευκαρυωτικών γονιδίων, και κατ’ επέκταση πιθανό ρόλο στην ρύθμιση της ιικής λυσιγονίας και ιικής επανενεργοποίησης *in vivo*. Τα γονιδιώματα μερικών ερπητοϊών συνδέονται με τις ιστόνες στον πυρήνα του κυττάρου ξενιστή, χρωματινοποιούνται όπως η κυτταρική χρωματίνη και ρυθμίζουν έτσι την έκφραση των γονιδίων τους. Ο ανθρώπινος κυτταρομεγαλοϊός ρυθμίζει την έκφραση των άμεσα πρώιμων γονιδίων του και την επανενεργοποίηση του από τη λυσιγονία, με την ανακατανομή της χρωματίνης. Έχει δειχθεί ότι σε κύτταρα όπου ο MIEP είναι ανενεργός, ο ίδιος είναι συνδεδεμένος με απακυλιωμένες ιστόνες και με την κατασταλτική πρωτεΐνη HP1 (Murphy et al., 2002). Ακετυλίωση των ιστονών και απομάκρυνση της HP1, ενεργοποίησε τον MIEP και οδήγησε σε μια παραγωγική μόλυνση.

Τροποποίηση της δομής της χρωματίνης, προκαλούν μέσω διαφόρων παραγόντων, και οι πρωτεΐνες IE1 και IE2, ώστε να ρυθμίσουν την έκφραση ιικών και κυτταρικών γονιδίων. Πέρα από την αλληλεπίδρασή της με τα ND10, η IE1-72kDa πρωτεΐνη είναι γνωστό ότι συνδέεται με την συμπυκνωμένη χρωματίνη σε HCMV μολυσμένα κύτταρα, κατά τη διάρκεια της μίτωσης (Ahn et al., 1998; Lafemina et al., 1989; Wilkinson et al., 1998). Μετά από μια αρχική σύνδεση με τα ND10, η IE1 πρωτεΐνη μεταναστεύει και οδηγεί σε ανακατανομή της κυτταρικής χρωματίνης αλληλεπιδρώντας με τις ιστόνες (Nitzsche et al., 2008). Άμεσα μετά από μια λυτική μόλυνση παρατηρείται μια σημαντική απόθεση ανθρώπινων ιστονών στα CMV γονιδιώματα, ενώ οι IE1 και IE2 πρωτεΐνες προωθούν την ιική μεταγραφή ανταγωνιζόμενες την απακετυλίωση των ιστονών (Ioudinkova et al., 2006; Murphy et al., 2002; Nevels et al., 2004a; Reeves et al., 2006).

### 3.1.4. HCMV μόλυνση και Κυτταρικός Κύκλος

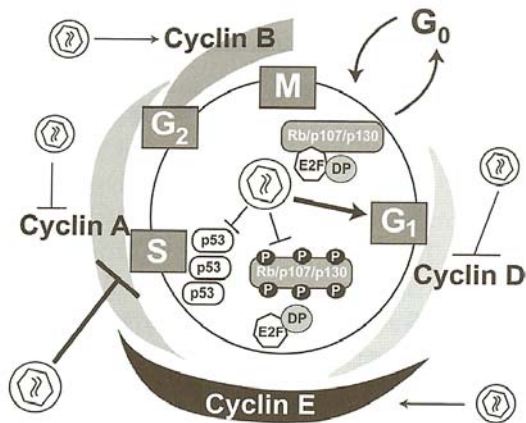
Ο κυτταρικός κύκλος είναι μια ισχυρά ρυθμιζόμενη αλληλουχία γεγονότων μέσω της οποίας το κύτταρο αντιγράφει το γονιδίωμά του και διαιρείται σε δύο θυγατρικά κύτταρα. Η  $G_0$  είναι μια φάση ηρεμίας, ενώ διέγερση από σήματα ανάπτυξης οδηγεί τα κύτταρα να εισέλθουν στην  $G_1$  φάση, η οποία προετοιμάζει το κύτταρο για την S φάση όπου αντιγράφει το DNA του. Ακολουθούν οι φάσεις  $G_2$  και M, όπου το κύτταρο διαιρείται. Την μετάβαση από το ένα στάδιο στο άλλο ρυθμίζουν διάφορες κυκλίνες, ενώ τον κυριότερο λόγο έχουν οι πρωτεΐνες p53 και Rb (Rb, p107, p130).

Ο ανθρώπινος κυτταρομεγαλοϊός έχει αναπτύξει πολλαπλούς μηχανισμούς για τον χειρισμό των μεταβολικών και ρυθμιστικών συστημάτων του κυττάρου ξενιστή, έτσι ώστε να μπορεί να δημιουργεί ένα περιβάλλον που να ευνοεί την παραγωγική μόλυνση. Ένας αριθμός μελετών εμπλέκουν τον HCMV στην τροποποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών, του κυτταρικού κύκλου, της άνοσου απάντησης και της απόπτωσης (Castillo and Kowalik, 2002) (Fortunato et al., 2000). Από τα άμεσα πρώιμα στάδια της μόλυνσης, οι ιικές πρωτεΐνες στοχεύουν παράγοντες κλειδιά στο μηχανισμό του κυτταρικού κύκλου ώστε να τον σταματήσουν και να μπλοκάρουν την αντιγραφή του κυτταρικού DNA, συντηρώντας το βέβαια σε μια ενεργή κατάσταση που θα επιτρέψει την αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος. Η επιτυχής αναπαραγωγή του ιού καθιστά αναγκαία την εξασθένιση της κυτταρικής απόκρισης στο στρες που προκαλεί η μόλυνση. Σε αυτό το σημείο ο ιός έχει αναπτύξει μεθόδους να παρακάμπτει το πρόγραμμα της απόπτωσης και να παρατείνει την ζωή του κυττάρου.

Όταν τα κύτταρα μολύνονται από τον HCMV ιό στην  $G_0$  ή στην αρχή της  $G_1$  φάσης, η έκφραση των ιικών γονιδίων ξεκινά πολύ γρήγορα και η μόλυνση προχωρά χωρίς καθυστέρηση, παράλληλα με την αναστολή της αντιγραφής του κυτταρικού DNA (Bresnahan et al., 1996; Dittmer and Mocarski, 1997; Lu and Shenk, 1996; Salvant et al., 1998). Αντίθετα όταν τα κύτταρα μολύνονται κοντά η κατά την διάρκεια της S φάσης, πολλά από αυτά καταφέρνουν να πραγματοποιήσουν την S φάση και να οδηγηθούν στη μίτωση πριν την διακοπή του κυτταρικού κύκλου. Σε αυτή την περίπτωση παρατηρείται καθυστέρηση στην εξέλιξη της μόλυνσης και αναστολή στην σύνθεση των άμεσα πρώιμων και

των πρώιμων πρωτεϊνών του ιού (Salvant et al., 1998). Οι άμεσα πρώιμες πρωτεΐνες καταφέρνουν τελικά να εκφραστούν όταν το κύτταρο περάσει στην φάση G<sub>1</sub> (Fortunato et al., 2002).

Οι HCMV πρωτεΐνες έχουν την ιδιότητα να τροποποιούν την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου (Εικ. 3.1.4). Οι tegument πρωτεΐνες ppUL69 και pp71 αναπτύσσουν τη δράση τους στον κυτταρικό κύκλο κατά την είσοδο του ιού στο



**Εικόνα 3.1.4.** Επιδράσεις της HCMV μόλυνσης στον κυτταρικό κύκλο.

κύτταρο. Η ppUL69 προκαλεί την διακοπή του κύκλου στην G<sub>1</sub> φάση, μέσω ενός άγνωστου μηχανισμού (Lu and Shenk, 1999). Η pp71, προϊόν του γονιδίου UL82, στοχεύει τις υπο-φωσφορυλιωμένες μορφές των πρωτεϊνών pRb, p130 και p107, για αποικοδόμησή τους μέσω του πρωτεοσώματος, και προωθεί την είσοδο στην φάση S (Bresnahan et al., 1996; Kalejta et al., 2003). Η αποικοδόμηση των παραπάνω

πρωτεϊνών ίσως έχει ανάλογο αποτέλεσμα με τη φωσφορυλίωσή τους, οδηγεί δηλαδή στην επαγωγή της ενεργοποίησης του μεταγραφικού μηχανισμού του κυττάρου και στην έκφραση γονιδίων υπεύθυνων για την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου. Οι άμεσα πρώιμες πρωτεΐνες IE1-72 και IE2-86 και οι δύο προωθούν την διακοπή του κύκλου στη φάση S. Η IE1-72 εμποδίζει την λειτουργία των πρωτεϊνών p107 και p130, ενώ η IE2-86 εμπλέκεται στις δράσεις των Rb και p53 (Castillo et al., 2000; Murphy et al., 2000; Noris et al., 2002; Pajovic et al., 1997; Wiebusch et al., 2003; Zhang et al., 2003).

Οι ιικές πρωτεΐνες IE1 και IE2 εμπλέκονται επίσης στην αναστολή του κυτταρικού θανάτου, μπλοκάροντας την απόπτωση. Είναι ικανές να ενεργοποιήσουν το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/Akt που αναστέλλει την απόπτωση και παράλληλα η IE2 προσδένεται στην p53, η οποία οδηγεί σε απόπτωση, εμποδίζοντας την (Fortunato and Spector, 1998; Tanaka et al., 1999).



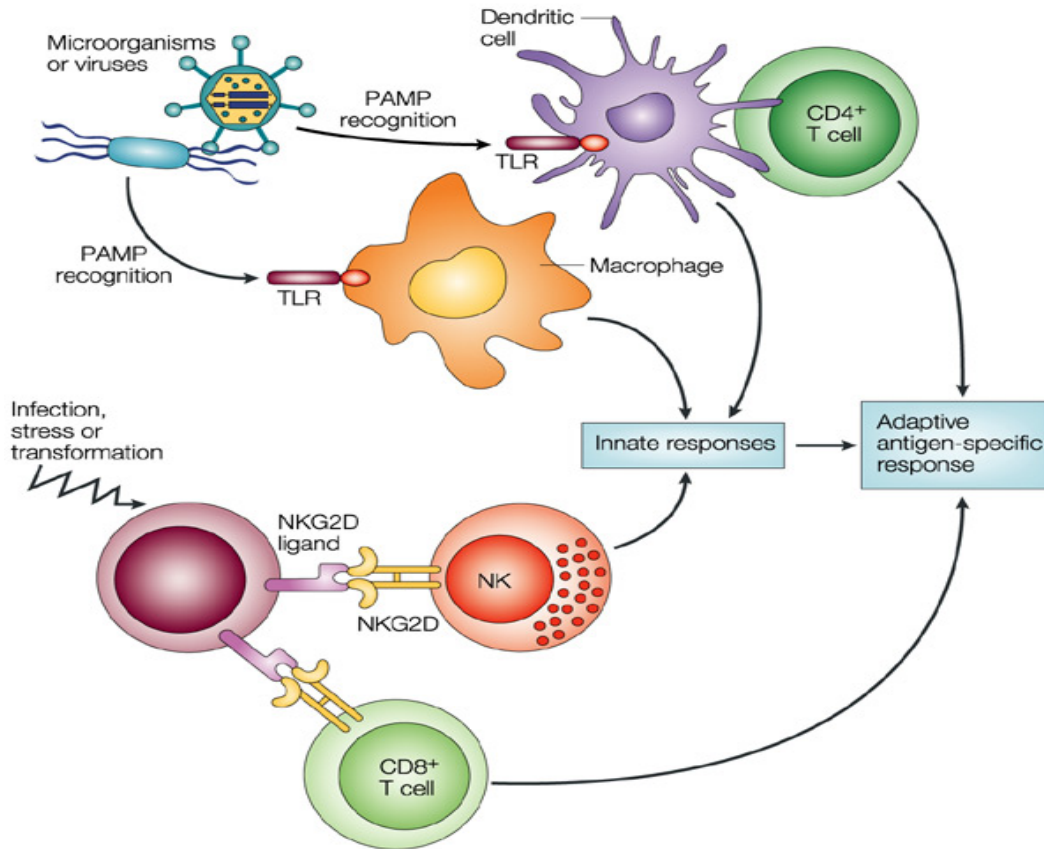
### 3.2 Η Άνοσος Απάντηση

Για να εγκαθιδρυθεί ένα περιβάλλον συμβατό με την αποτελεσματική αντιγραφή του ιού, η έκφραση των άμεσα πρώιμων γονιδίων λειτουργεί ανταγωνιστικά με την εσωτερική, έμφυτη (φυσική) και επίκτητη (ειδική), ανοσία του ξενιστή. Οι πρωτεΐνες UL36 και UL37 αναστέλλουν την απόπτωση (Goldmacher et al., 1999; Skaletskaya et al., 2001), οι IRS1/TRS1 καταστέλλουν την απόκριση ιντερφερόνης (Child et al., 2004), ενώ η US3 μειώνει την έκφραση των MHC τάξεως I γονιδίων στην επιφάνεια του κυττάρου (Ahn et al., 1996).

Η κυτταρική άνοσος απάντηση του οργανισμού έναντι του ιού περιλαμβάνει τόσο ειδικούς όσο και μη ειδικούς μηχανισμούς (Εικ.3.2). Στους μη ειδικούς περιλαμβάνονται τα φυσικά κύτταρα φονιάδες (NK cells) και η παραγωγή ιντερφερόνης. Λαμβάνουν χώρα πολύ πρώιμα μετά την λοίμωξη, όταν αντιγόνα του ιού παράγονται ήδη, άλλα πριν τα λοιμογόνα στελέχη του να απελευθερωθούν από τα μολυσμένα κύτταρα. Παράλληλα τα κυτταροτοξικά T-κύτταρα κατευθύνονται εναντίον αυτών των πρώιμων αντιγόνων του ιού και πιθανά είναι ο σπουδαιότερος αμυντικός μηχανισμός έναντι του κυτταρομεγαλοϊού. Προκαλούν λύση των μολυσμένων κυττάρων και δημιουργούν αποτρεπτικές συνθήκες για μελλοντικές επανενεργοποιήσεις του ιού. Ασθενείς με ανεπάρκεια στην ανοσοαπάντηση των T-κυττάρων είναι υποψήφιοι για επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις από τον HCMV (Griffiths and Grundy, 1987).

Αντίθετα με τα παραπάνω η χυμική άνοσος απάντηση εμφανίζεται να είναι λιγότερο σπουδαία στην άμυνα του οργανισμού εναντίον του HCMV. Έτσι το έμβρυο μπορεί να υποστεί ενδομήτρια μετάδοση του ιού μετά από επαναδραστηριοποίησή του, σε έγκυες γυναίκες που ήταν ήδη οροθετικές πριν την εγκυμοσύνη τους και νεογνά συχνά μολύνονται περιγεννητικά από κολποτραχηλικές εκκρίσεις ή από μητρικό γάλα παρά την παρουσία παθητικά αποκτούμενων από τη μητέρα αντισωμάτων έναντι του ιού (Dworsky et al., 1983). Η παρουσία ειδικών έναντι του ιού αντισωμάτων, θεωρείται περισσότερο χρήσιμη σαν δείκτης παρελθούσης ή παρούσης λοίμωξης από τον ιό παρά σαν μέσο ή μέτρο ανοσίας. Παρ' όλα αυτά η παρουσία αντισωμάτων φαίνεται να ελαττώνει τη βαρύτητα των συμπτωμάτων που σχετίζονται με λοίμωξη από τον

ιό. Γενικότερα όμως τα ειδικά έναντι του HCMV αντισώματα δεν έχουν καθοριστικό ρόλο στην άνοσο απάντηση του οργανισμού (Britt and Vigler, 1990).



Nature Reviews | Immunology

Εικόνα 3.2. Ειδικό και μη ειδικό μηχανισμοί άμυνας

### 3.2.1. Έμφυτη (φυσική) Άνοσία

Ως έμφυτη (φυσική) άνοσία φέρεται το σύνολο των αμυντικών μηχανισμών του οργανισμού που βρίσκονται σε άμεση ετοιμότητα και κινητοποιούνται ευθύς μετά από την εισβολή των εξωγενών παθογόνων, προκειμένου να εξυπηρετήσουν την άμυνα του οργανισμού μέχρι να αναπτυχθεί η ειδική ανοσιακή απάντηση. Οι μηχανισμοί της φυσικής άνοσίας χαρακτηρίζονται από την ικανότητα αδρής διάκρισης μεταξύ παθογόνων και μη παθογόνων στοιχείων του εξωτερικού περιβάλλοντος, καθώς και από τα

περιορισμένα περιθώρια επαγωγής τους από το αντιγονικό ερέθισμα. Σε αντίθεση επίσης με την ειδική ανοσιακή απάντηση, η κινητοποίηση των μηχανισμών της φυσικής ανοσίας δεν οδηγεί στην ανάπτυξη ανοσιακής μνήμης, με αποτέλεσμα η φυσική ανοσιακή απόκριση, σε κάθε νέα επαφή με το ίδιο αντιγόνο, να εξελίσσεται με την ίδια ένταση, όπως και η προηγούμενη.

Στην περίπτωση των ιών, η ενδοκυττάρια φάση τους αρχίζει μετά από την είσοδό τους στα κύτταρα του ξενιστή, η οποία επιτυγχάνεται μέσω της σύνδεσής τους με λειτουργικής σημασίας μεμβρανικά μόρια (συνήθως υποδοχείς) των φυσιολογικών κυττάρων. Εντός του κυττάρου, τα λυσοσωμικά ένζυμα καταστρέφουν τις καψιδικές πρωτεΐνες και αποκαλύπτεται το γένωμα του ιού. Τα υποεπιθηλιακά μακροφάγα, τα μακροφάγα των λεμφαδενικών κόλπων στη συνέχεια, και τέλος, τα μακροφάγα και τα σιτευτικά κύτταρα του ήπατος και του σπλήνα είναι υπεύθυνα για τη φαγοκυττάρωση των ιών, που προσβάλλουν τον οργανισμό και επιτυγχάνουν να διαπεράσουν τους φραγμούς της φυσικής ανοσίας. Τα ηπατικά και τα σπληνικά φαγοκύτταρα, όπως είναι φυσικό ευθύνονται εξ' ολοκλήρου για την φαγοκυττάρωση των ιών που εισέρχονται απ' ευθείας στην κυκλοφορία. Η φαγοκυττάρωση βέβαια δεν επιτυγχάνει πάντα την καταστροφή των ιών. Πολλά ιοσωμάτια διαφεύγουν και προσβάλλουν άλλα κύτταρα του οργανισμού ή εμφανίζουν αντοχή στους μηχανισμούς της ενδοφαγοσωματικής καταστροφής τους, με αποτέλεσμα την επί μακρόν ενδοκυττάρια παραμονή τους (Γερμένης, 2000).

Όταν κάποιος ιός μολύνει ένα κύτταρο, προκαλεί την παραγωγή ειδικών πρωτεϊνών, των ιντερφερονών (IFNs). Σε ένα πρώτο στάδιο, οι ιντερφερόνες ανιχνεύονται στο κυτταρόπλασμα των μολυσμένων κυττάρων, σε επόμενο όμως στάδιο, απελευθερώνονται στο μεσοκυττάριο υγρό και από εκεί συνδέονται με υποδοχείς των γειτονικών υγιών κυττάρων. Με τη σύνδεσή τους αυτή ενεργοποιείται το σηματοδοτικό μονοπάτι Jak-Stat, το οποίο έχει την ικανότητα να παρεμποδίζει τον πολλαπλασιασμό των ιών, επάγωντας τη σύνθεση κατάλληλων κυτταρικών πρωτεϊνών. Οι ιντερφερόνες έχουν παράλληλα την ικανότητα να αυξάνουν την έκφραση των MHC τάξεως I μορίων και την παρουσίαση αντιγόνου σε όλα τα κύτταρα (Janeway and Travers, 2002). Ο ανθρώπινος κυτταρομεγαλοϊός έχοντας ως στόχο να ανταγωνιστεί την κυτταρική άμυνα, επεμβαίνει στους αμυντικούς μηχανισμούς, μπλοκάροντας την παραγωγή IFN (με τις ιικές πρωτεΐνες TRS1/IRS1), την ενεργοποίηση των NF-

κΒ και IRF3-Interferon Regulatory Factor 3 (με την ιική πρωτεΐνη pp65), και την μεταγραφή του IFN-β γονιδίου. Στο σηματοδοτικό μονοπάτι Jak-Stat επεμβαίνει στοχεύοντας και αλληλεπιδρώντας με τις κυτταρικές Jak1, STAT2 και p48.

Μετά τη συνάντησή τους με τον CMV, τα δενδριτικά κύτταρα και τα μακροφάγα εκκρίνουν χυμοκίνες και κυτοκίνες, συμπεριλαμβανομένων και των IFN-α/β, που είναι σημαντικές για την ενεργοποίηση των NK κυττάρων. Τα τελευταία με τη σειρά τους είναι σημαντικά για την προστασία των δενδριτικών κυττάρων. Τα NK-κύτταρα αναπτύσσουν την αντι-ιική τους δράση μέσω έκκρισης διαφορετικών κυτοκινών και μέσω της άμεσης λύσης των μολυσμένων κυττάρων. Η IFN-γ που προέρχεται από τα NK-κύτταρα, ανήκει στην ειδική ανοσία και επάγει την έκφραση των MHC μορίων και την ενεργοποίηση των δενδριτικών, των μακροφάγων και των T-κυττάρων (Reddehase, 2006).

### **3.2.2. Επίκτητη (ειδική), Ανοσία**

Η ειδική ανοσιακή απάντηση έναντι των ιών μεσολαβείται από ποικίλους χυμικούς και κυτταρικούς μηχανισμούς, που λειτουργούν μόνοι ή σε συνδυασμό. Τα αντισώματα αποτελούν σημαντικό αμυντικό μηχανισμό για την αντιμετώπιση των ιογενών λοιμώξεων, κυρίως κατά τη φάση εισόδου των ιών στον οργανισμό. Ιδιαίτερος είναι ο ρόλος των εξουδετερωτικών IgA-αντισωμάτων έναντι των ιών, που εισέρχονται στον οργανισμό διά του πεπτικού ή του αναπνευστικού συστήματος. Αντίθετα, όταν πλέον οι ιοί εισέλθουν στην αιματική κυκλοφορία, τα αντισώματα αδυνατούν να προλάβουν την εμφάνιση της λοίμωξης και η δράση τους είναι μόνο υποβοηθητική των κυτταρικών μηχανισμών που κατατείνουν στον περιορισμό της.

Η δράση των ειδικών αντι-ιικών αντισωμάτων έγκειται είτε στην εξουδετέρωση των ιών, είτε στη μεσολάβησή τους στην κυτταροτοξικότητα (ADCC) των μολυσμένων κυττάρων, αφού συνδεθούν με τα ιικά αντιγόνα που τα τελευταία εκφράζουν στην επιφάνειά τους. Η εξουδετέρωση των ιών από τα αντισώματα επιτυγχάνεται κυρίως με την άμεση σύνδεσή τους με τα ιικά σωματίδια, αποτέλεσμα της οποίας είναι η αδυναμία σύνδεσης των τελευταίων με τους αντίστοιχους κυτταρικούς υποδοχείς. Τα αντισώματα είναι επίσης δυνατόν

να παρεμποδίζουν γενικότερα τη διαδικασία εισόδου των ιών στα κύτταρα ή την ενδοκυττάρια αποκάλυψη του ιικού γενώματος.

Η είσοδος των ιών στα κύτταρα του οργανισμού συνεπάγεται την εγκατάσταση της ιογενούς λοίμωξης. Αυτό οδηγεί στην εξαφάνιση των ιικών σωματίων από τους διακυτταρικούς χώρους και την αδυναμία αναγνώρισής τους από το ανοσιακό σύστημα. Η αντιμετώπιση, επομένως, της ιογενούς λοίμωξης, σε αυτό το στάδιο, είναι εφικτή μόνο με την καταστροφή των μολυσμένων κυττάρων που επιτυγχάνεται κυρίως με την μεσολάβηση των κυτταροτοξικών T-κυττάρων. Συγκεκριμένα, όλοι οι ιοί φαίνεται ότι αναπτόφευκτα προσβάλλουν κάποιον αριθμό αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων, όπως τα δενδριτικά κύτταρα και τα B-κύτταρα των περιφερικών λεμφικών οργάνων. Ένα μέρος των ιικών πρωτεϊνών που συντίθενται στο κυτταρόπλασμα αυτών των κυττάρων αποδομούνται από το πρωτεόσωμα και τα πεπτιδία που προκύπτουν, συνδέονται και παρουσιάζονται από τα τάξης I MHC-μόρια στα παρθένα CD8<sup>+</sup> T-κύτταρα. Παράλληλα ένα άλλο μέρος των ιικών πρωτεϊνών φαίνεται ότι μεταφέρονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και από εκεί στην κυτταρική επιφάνεια, απ' όπου όμως εισέρχονται και πάλι στο κύτταρο, με αποτέλεσμα να ακολουθήσουν την εξωγενή πλέον οδό επεξεργασίας και παρουσιάσής τους μέσω των τάξης II MHC-μορίων. Η αναγνώρισή τους από τα παρθένα βοηθητικά T-κύτταρα, παρουσία της IL-2 και της IFN- $\gamma$  που παράγονται από τα ενεργοποιημένα μακροφάγα και τα NK-κύτταρα, έχει ως αποτέλεσμα τη διαφοροποίηση των βοηθητικών T-κυττάρων προς T<sub>H</sub>1-κύτταρα. Η παραγωγή IL-2 από αυτά τα κύτταρα προάγει τη διαφοροποίηση των CD8<sup>+</sup> T-κυττάρων προς κυτταροτοξικά T-κύτταρα, τα οποία αναγνωρίζουν τα συμπλέγματα των ιικών πεπτιδίων με τα τάξης I MHC-μόρια στην επιφάνεια των μολυσμένων κυττάρων και τα καταστρέφουν.

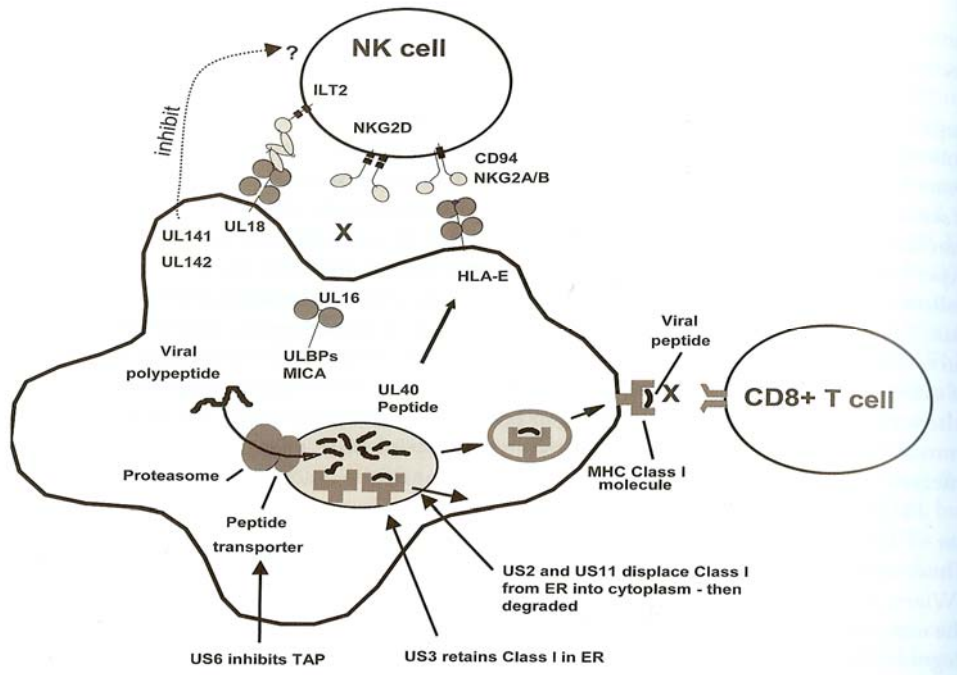
Τα ενεργοποιημένα T<sub>H</sub>1-κύτταρα, εκτός από IL-2, παράγουν επίσης IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  και άλλες κυτταροκίνες. Η IFN- $\gamma$  έχει αφ' εαυτής αντι-ιική δράση, ενώ η IL-2 και ο TNF- $\alpha$  ενεργοποιούν τα NK-κύτταρα τα οποία παράγουν επιπλέον IFN- $\gamma$ . Τα NK-κύτταρα εξάλλου, αναγνωρίζουν και καταστρέφουν τα προσβεβλημένα κύτταρα, λόγω της καταστολής της έκφρασης των τάξης I MHC-μορίων που προκαλείται από τους ιούς. Τέλος ο TNF- $\alpha$  έχει τη δυνατότητα να επιφέρει απευθείας λύση των προσβεβλημένων από ιούς κυττάρων (Γερμένης, 2000).

Η αποφυγή των CD8<sup>+</sup> και NK κυττάρων από τον HCMV, επιτυγχάνεται με τη βοήθεια των διαφόρων ιικών πρωτεϊνών (Πίνακας 3.2.2). Οι US2, 3, 6 και 11 στοχεύουν και ελαττώνουν προοδευτικά το ποσοστό των τάξης I MHC μορίων στην επιφάνεια των μολυσμένων κυττάρων, εμποδίζοντας τη ροή τους από το ενδοπλασματικό δίκτυο στην εξωτερική μεμβράνη και την αναγνώρισή τους από τα CD8<sup>+</sup> (Εικ.3.2.2). Τέλος οι ιικές πρωτεΐνες UL16, UL18, UL40, UL141 και UL142 εμποδίζουν την ενεργοποίηση των NK κυττάρων (Reddehase, 2006).

|      |   |  |  |
|------|---|--|--|
| HCMV | <i>UL16</i>   | Blocks ULBP1, 2 and MICB in the ER/ <i>cis</i> -Golgi compartment, thereby preventing their cell surface expression and recognition by NKG2D           | Dunn et al. (2003)<br>Wu et al. (2003)       |
|      | <i>UL18</i>   | Serves as a ligand for LIR-1 inhibitory receptor marginally expressed on NK cells  | Reyburn et al. (1997)                        |
|      | <i>UL40</i>   | HLA-E-bound UL40-derived peptide serves as a ligand for inhibitory NK cell receptor CD94/NKG2A   | Tomasec et al. (2000)                        |
|      | <i>US2</i> and <i>US11</i>                          | Selectively down-regulate MHC class Ia molecules while sparing MHC class Ib molecules, thereby preserving the inhibition of NK cells through CD94NKG2A | Llano et al. (2003)<br>Schust et al. (1998)  |
|      | <i>UL119-118</i> ,<br><i>TRL11</i> and <i>IRL11</i> | Encode gp68 and gp34, which serve as viral Fc receptors to prevent ADCC  | Atalay et al. (2002)<br>Lilley et al. (2001) |

**Πίνακας 3.2.2.** CMV γονίδια που βοηθούν τον ιό να αποφύγει την ενεργοποίηση των NK κυττάρων.

Ο NKG2D υποδοχέας των NK-κυττάρων αναγνωρίζει μια σειρά από προσδέτες στην επιφάνεια των κυττάρων που έχουν σχέση με τα MHC τάξης I μόρια και οι οποίοι εκφράζονται σε καταστάσεις στρες, μόλυνσης ή μετασχηματισμού (Cerwenka and Lanier, 2003). Γνωστοί NKG2D προσδέτες στα ανθρώπινα κύτταρα είναι τα μόρια MICA και MICB, καθώς και οι πρωτεΐνες ULBP1, ULBP2, ULBP3 και ULBP4. Η HCMV πρωτεΐνη UL16 μπλοκάρει την έκκριση των ULBP1,2 και MICB από το σύστημα Golgi, αποτρέποντας την έκφρασή τους στην επιφάνεια των μολυσμένων κυττάρων και κατ' επέκταση την ενεργοποίηση των NK-κυττάρων μέσω του NKG2D υποδοχέα (Dunn et al., 2003; Wu et al., 2003) (Εικ.3.2.2).



**Εικόνα 3.2.2.** Αποφυγή των CD8+ T και των NK κυττάρων από τα HCMV μολυσμένα κύτταρα.

### 3.3 Ο HCMV στον άνθρωπο

Αναγνωρίζονται 4 διαφορετικοί τύποι αλληλεπίδρασης μεταξύ ιού και ανθρώπου (ξενιστή):

α) Πρωτογενής λοίμωξη κατά την οποία ο ιός εγκαθίσταται αρχικά στον ξενιστή. Η μεγάλη πλειοψηφία των λοιμώξεων αυτών είναι ασυμπτωματικές για τα φυσιολογικά άτομα παρόλο που η διαπλακουντιακή μετάδοση του ιού κατά τη διάρκεια της κύησης μπορεί να προκαλέσει στο έμβρυο τη νόσο των μεγαλοκυτταρικών εγκλείστων. Η πιο συχνή κλινική εκδήλωση της λοίμωξης σε προηγουμένως υγιείς ενήλικες είναι η λοιμώδης μονοπυρήνωση.

β) Χρόνια επιμένουσα λοίμωξη: παρατηρείται ασυμπτωματική αποβολή του ιού από διάφορες εστίες (ούρα, σίελο, σπέρμα, εκκρίσεις τραχήλου και κόλπου) για μήνες ή χρόνια παρά την ύπαρξη ειδικής ανοσολογικής αντίδρασης εκ μέρους του ξενιστή.

γ) Λανθάνουσα λοίμωξη ή παραμονή του CMV σε κύτταρα ή ιστούς του ξενιστή σε μη αναδιπλασιαζόμενη μορφή.

δ) Επανενεργοποίηση ή υποτροπιάζουσα λοίμωξη κατά την οποία ο CMV επανεμφανίζεται σε αναδιπλασιαζόμενη μορφή.

### 3.3.1. Κλινική εικόνα

Η μετάδοση του Ανθρώπινου Κυτταρομεγαλοϊού (HCMV), μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω σιέλου, ούρων, τραχηλικών ή κολπικών εκκρίσεων, σπέρματος, γάλατος κατά το θηλασμό, κοπράνων και ούρων. Η πορεία της μετάδοσης του HCMV από τη μητέρα στο έμβρυο δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί. Είναι πιθανό η μετάδοση να συμβαίνει μέσω του αίματος του ομφάλιου λώρου ή μέσω του πλακούντιου ιστού και των αμνιακών κυττάρων.

Στα μονοκύτταρα ο ιός παραμένει σε λανθάνουσα κατάσταση, ενώ αν επανενεργοποιηθεί, παρουσιάζει σημαντικά κλινικά προβλήματα σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα και μεταμοσχευμένους ασθενείς, απειλώντας ακόμα και τη ζωή (Emery et al., 1999). Ο HCMV όταν εντοπίζεται σε προγεννητικά μολυσμένα νεογνά, τα συμπτώματα μπορούν να οδηγήσουν σε σοβαρές ασθένειες με απώλεια ακοής, τύφλωση, διανοητική καθυστέρηση και διαταραχές του κεντρικού νευρικού συστήματος (Casavant et al., 2006). Η εξάπλωση του συνδρόμου επίκτητης ανοσοανεπάρκειας συνδέεται με την ενεργοποίηση του HCMV. Η HCMV μόλυνση αποτελεί την πιο κοινή περιστασιακή ιική μόλυνση σε ασθενείς με AIDS ενώ έχει ενοχοποιηθεί ως ένας παράγοντας στην παθογένεια του ιού HIV καθώς και στην εμφάνιση συγκεκριμένων καρκινικών τύπων (Cobbs et al., 2002; Harkins et al., 2002). Οι κίνδυνοι που ενέχονται κατά την έκθεση στον HCMV, καθιστούν την κατανόηση των ρυθμιστικών μηχανισμών της αντιγραφής του ιού και των αλληλεπιδράσεων του με τον ξενιστή, ένα σημαντικό αντικείμενο μελέτης.

Οι λοιμώξεις από CMV, οι περισσότερες από τις οποίες είναι υποκλινικές, είναι συχνές σε όλον τον κόσμο. Παρόλο που λίγα είναι γνωστά για την μετάδοση του ιού μεταξύ ατόμων, ο κίνδυνος απόκτησης CMV λοίμωξης είναι εν μέρει κατανοητός για ορισμένες ομάδες ηλικιών. Η λοίμωξη μπορεί να μεταδοθεί στο νεογέννητο κατά την δίοδό του μέσα από τον γεννητικό σωλήνα, όπου οι εκκρίσεις τραχήλου και κόλπου μπορεί να περιέχουν μολυσματικό ιό. Ο CMV μπορεί επίσης να μεταδοθεί στο νεογέννητο με το μητρικό γάλα κατά τον θηλασμό (Stagno et al., 1983). Ως εκ τούτου, η αποβολή του CMV στα ούρα ή την σίελο είναι συχνή σε υγιή μικρά παιδιά, ιδιαίτερα σε παιδικούς σταθμούς. Είναι πιθανόν η ευρέως διαδεδομένη λοίμωξη ανάμεσα σε ασυμπτωματικά παιδιά να παίζει σημαντικό ρόλο στην εξάπλωση του ιού σε άλλα παιδιά και



ενήλικες. Παρόλο που ο κίνδυνος λοίμωξης μετά από δεδομένη επαφή με ασυμπτωματικό άτομο που αποβάλλει τον ιό φαίνεται να είναι πολύ χαμηλός, ο ιός βρίσκεται σε τέτοια έκταση παντού, ώστε αναμφίβολα παρουσιάζονται επανειλημμένες ευκαιρίες έκθεσης. Υπάρχουν ενδείξεις ότι σε έφηβους και ενήλικες μολυσματικός ιός που υπάρχει στις κολπικές εκκρίσεις, το σπέρμα και την σίελο μπορεί επίσης να μεταδοθεί με την σεξουαλική δραστηριότητα. Τελικά είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι σε οποιαδήποτε ομάδα ηλικιών ο ιός μπορεί να μεταφερθεί από το δότη στο λήπτη με τις μεταγγίσεις αίματος και την μεταμόσχευση οργάνων (νεφρού, καρδιάς, πνευμόνων και ήπατος).

Πάνω από 95% των μητρικών λοιμώξεων πρωτογενών ή επιμενουσών είναι ασυμπτωματικές. Σποραδικά η CMV παρουσιάζεται σαν μια συνδρομή Λοιμώδους Μονοπυρήνωσης με λευκοκυττάρωση, διαταραγμένες δοκιμασίες λειτουργίας ήπατος, πυρετό. Η μετρίου βαθμού φαρυγγίτιδα, μικρή λεμφαδενοπάθεια και απουσία ηπατοσπληνομεγαλίας και ο ίκτερος βοηθούν στην διαφοροδιάγνωση της λοίμωξης από CMV από το σύνδρομο της Λοιμώδους Μονοπυρήνωσης.

Το φάσμα της κλινικής εικόνας που προκαλείται από τον CMV στο έμβryo και στο νεογνό είναι πολύ ευρύ. Από τα μολυσμένα νεογνά με συγγενή λοίμωξη 95% είναι τελείως ασυμπτωματικά κατά τη γέννηση, όμως ένα μικρό ποσοστό εμφανίζει συμπτώματα με την πρόοδο της ηλικίας. Κλινικώς εμφανής νόσος λαμβάνει χώρα σε 5% των απογόνων με συγγενή λοίμωξη από CMV, η συνδρομή που εμφανίζουν είναι γνωστή ως «νόσος των μεγαλοκυτταρικών εγκλείστων» και η πρόγνωσή τους είναι κακή (Preece et al., 1984). Σε σοβαρότερες νεογνικές λοιμώξεις η κλινική εικόνα περιλαμβάνει: ηπατοσπληνομεγαλία, ίκτερο, θρομβοκυτοπενία, μικροκεφαλία, κώφωση, χοριοαμφιβληστροειδίτιδα, οπτική ατροφία, εγκεφαλικές αποπιτανώσεις.

Η CMV λοίμωξη σε μη ανοσοκατεσταλμένους ενήλικες συνήθως διαδράμει υποκλινικά. Όμως μπορεί να εκδηλωθεί και ως CMV λοιμώδης μονοπυρήνωση. Αυτό μπορεί να συμβεί και κατά την επανενεργοποίηση του CMV αλλά είναι λιγότερο συχνό από ότι κατά την πρωτοπαθή λοίμωξη. Ο CMV ευθύνεται για το 8% των μονοπυρηνώσεων και η CMV λοιμώδης μονοπυρήνωση μοιάζει με αυτήν που προκαλείται από τον EBV, αλλά τα συμπτώματα είναι λιγότερο σοβαρά και συνίστανται σε επίμονο εμπύρετο, μυαλγία, αμυγδαλίτιδα και τραχηλική λεμφαδενοπάθεια (Watanabe et al., 1997).

Μετά την πρόδρομη περίοδο εμφανίζεται δερματικό εξάνθημα το οποίο δύναται να συνδυαστεί με σύνδρομο Guillain-Barre, μηνιγγίτιδα, ηπατίτιδα, πνευμονία, αιμολυτική αναιμία και θρομβοκυττοπενία (Cohen and Corey, 1985). Χαρακτηριστικά εργαστηριακά ευρήματα αποτελούν η παρουσία στο περιφερικό αίμα άτυπων λεμφοκυττάρων και υψηλών τρανσαμινασών. Τα άτυπα λεμφοκύτταρα είναι κυρίως CD8+ T κύτταρα που εκφράζουν CD57 αντιγόνα (Wang et al., 1993).

Ανοσοκατεσταλμένοι ασθενείς έχουν αυξημένες πιθανότητες να εμφανίσουν μολύνσεις από CMV. Συνήθως παρουσιάζουν δεκατική πυρετική κίνηση η οποία υποχωρεί εντός ολίγων ημερών. Ορισμένοι αναπτύσσουν ιαιμία η οποία μοιάζει με σηψαιμία και μπορεί να συνοδεύεται από ηπατίτιδα και πνευμονία. Στις περιπτώσεις που επιπλέκονται με πνευμονία η πρόγνωση είναι κακή (80-90% θνησιμότητα). Επίσης, το σάρκωμα Kaposi έχει συσχετισθεί ορολογικά και ιολογικά με μόλυνση από CMV.

### **3.3.2. Διάγνωση**

Στην μητρική λοίμωξη επειδή είναι πάντα ασυμπτωματική η διάγνωσή της σπανίως είναι στις υποψίες του γιατρού. Ακόμα και όταν η κλινικώς εμφανής νόσος λαμβάνει χώρα, είναι γενικώς μετρίου βαθμού και η CMV λοίμωξη συνήθως δεν εκτιμάται ως πιθανή αιτία. Αξιόπιστες δοκιμασίες ανίχνευσης IgG αντισωμάτων έναντι του CMV: Έμμεσος ανοσοφθορισμός, οροσυγκολλητικές αντιδράσεις, ανοσοενζυμική μέθοδος (ELISA). Άνω του 80% των ενηλίκων είναι οροθετικοί, γεγονός που είναι ενδεικτικό προηγηθείσας έκθεσης στον ιό (Kano and Shiohara, 2000). Ένα μοναδικό θετικό αποτέλεσμα δεν οδηγεί απαραίτητα στην κατάδειξη πρόσφατης ή τρέχουσας λοίμωξης. Η ανάδειξη της ορομετατροπής είναι η καλύτερη πιστοποίηση της πρωτογενούς λοίμωξης. Αν η λοίμωξη έλαβε χώρα μέσα στους προηγούμενους 4 έως 8 μήνες, ειδικά IgM αντισώματα μπορούν να ανιχνευτούν στον ορό.

Μέθοδοι μοριακού πολλαπλασιασμού έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί όπως είναι η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Λόγω της υψηλής της ευαισθησίας, τα αποτελέσματα της PCR θα πρέπει να ερμηνεύονται προσεκτικά

διότι μια τόσο ευαίσθητη τεχνική μπορεί να ανιχνεύσει την παρουσία των ιών, χωρίς να υπάρχει αιτιολογική συσχέτιση με την νόσο.

Προσφάτως, η προγεννητική διάγνωση της επίκτητης ενδομητρικής συγγενούς CMV λοίμωξης του εμβρύου έγινε διαθέσιμη χρησιμοποιώντας: υπερηχογράφημα, αμνιοπαρακέντηση και λήψη τροφοβλάστης και συμπληρωματική λήψη εμβρυϊκού δείγματος αίματος από τον ομφάλιο λώρο.

Τα ούρα, η σίελος, ηπαρινισμένα δείγματα αίματος και βιοψίες ιστών από τις βλάβες αποτελούν τα καταλληλότερα δείγματα για την απομόνωση του CMV. Ο κυτταρομεγαλοϊός αναγνωρίζεται σε ιστολογικά παρασκευάσματα από τα χαρακτηριστικά ενδοκυτταρικά έγκλειστα, γνωστά ως «μάτια κουκουβάγιας». Τα έγκλειστα αυτά παρατηρούνται σε κύτταρα των νεφρικών σωληναρίων, των χοληφόρων, στο πνευμονικό και ηπατικό παρέγχυμα αλλά σπάνια σε εγκεφαλικό ιστό. Η μέθοδος αυτή παρουσιάζει μικρή ευαισθησία (Tong, 1997). Βιοψίες ιστών δύνανται να περιέχουν κύτταρα μολυσμένα με CMV τα οποία γίνονται ορατά μετά από χρώση, χρησιμοποιώντας ειδικά για τον ιό μονοκλωνικά αντισώματα.

### **3.3.3. Ανοσοποίηση – Θεραπεία**

Η διαμόρφωση ενός εμβολίου έναντι του CMV προτάθηκε ως ένας τρόπος πρόληψης της συγγενούς CMV λοίμωξης. Αν και ο CMV βρίσκεται στον ξενιστή ακόμα και με την εμφάνιση υψηλών τίτλων ειδικών αντισωμάτων και το υπάρχον μητρικό αντίσωμα δεν προστατεύει ενάντια σε συγγενείς λοιμώξεις, προηγούμενη λοίμωξη μειώνει σημαντικά τον κίνδυνο σοβαρής λοίμωξης του εμβρύου, ιδίως προστατεύει έναντι: θνησιμότητα, πνευματική καθυστέρηση, σημαντικά νευρολογικά προβλήματα. Ένα εμβόλιο με ζωντανό αδρανοποιημένο στέλεχος δοκιμάστηκε σε εθελοντές. Καθαρά με τεχνικές μοριακής βιολογίας ένα συνδυασμένο εμβόλιο μπορεί να επιτευχθεί για τον CMV. Η αξία αυτού του εμβολίου μπορεί να προλάβει όλους τους ενδομήτριους θανάτους και περίπου 90% των σοβαρών νευρολογικών επακόλουθων που σχετίζονται με τον συγγενή CMV δευτερευόντως της πρωτογενούς λοίμωξης η οποία λαμβάνει χώρα κάθε χρόνο στις ΗΠΑ.

Εμβόλιο που έχει παρασκευαστεί από το Towne στέλεχος του CMV φαίνεται να προστατεύει τους μεταμοσχευμένους με νεφρό αλλά απέτυχε να επάγει επαρκή παραγωγή αντισωμάτων σε φυσιολογικές γυναίκες που φροντίζουν μικρά παιδιά. Η παθητική ανοσοποίηση επιτυγχάνεται με χορήγηση υψηλών τίτλων αντισωμάτων CMV, προστατεύοντας τους ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς από την CMV πνευμονίτιδα.

Δεν υπάρχει κάποια ειδική θεραπεία της CMV λοίμωξης. Στις γυναίκες με συνδρομή όμοια με Λοιμώδη Μονοπυρήνωση η θεραπεία είναι συμπτωματική. Δεν υπάρχει διαθέσιμη ικανοποιητική θεραπεία για την συγγενή CMV λοίμωξη. Έγιναν προσπάθειες να χρησιμοποιήσουν αντι-ιικούς παράγοντες όπως: η αραβινοσίδη (Ara- A) και κυτοσίνη – αραβινοσίδη (Ara- C) για νεογνά με σοβαρή κλινική λοίμωξη αλλά αυτά τα φάρμακα είναι τοξικά. Λόγω τοξικότητας αυτά τα αντι-ιικά φάρμακα δεν χρησιμοποιούνται στην ασυμπτωματική CMV λοίμωξη. Η ακυκλοβίρη δεν είναι δραστική έναντι του CMV ο οποίος αντίθετα με το σύμπλεγμα των Ερπητοϊών δεν συνθέτει δική του θυμιδινική κινάση. Γανκυκλοβίρη πρόσφατα δείχθηκε να είναι αποτελεσματική στη θεραπεία της CMV αμφιβληστροειδίτιδας στους HIV – μολυσμένους ασθενείς.

Νεότερα εξίσου αποτελεσματικά φάρμακα είναι η φוסκαρνέτη, η σιντοφοβίρη και η βαλγκανσυκλοβίρη (Collier, 2006). Ωστόσο, καμία δημοσιευμένη εμπειρία με αυτά τα φάρμακα στην εγκυμοσύνη ή στα νεογνά είναι διαθέσιμη σήμερα.

## Σκοπός της μελέτης

Η ανακατανομή της χρωματίνης από τον κύριο άμεσα πρώιμο υποκινητή (MIEP) και η ακόλουθη κυτταρική διαφοροποίηση, θα μπορούσε να αποτελεί καταλυτικό παράγοντα στην επανενεργοποίηση του HCMV από τη λανθάνουσα κατάσταση, και για το λόγο αυτό η εντόπιση και οι δυναμικές των HCMV ιικών γονιδιωμάτων αποτελούν ερωτήματα μεγάλου επιστημονικού ενδιαφέροντος. Επίσης ο τρόπος με τον οποίο, οι ιδιότητες της IE1 να στοχεύει και να διασπά τα PML σωμάτια παράλληλα με τη σύνδεσή της στη μιτωτική χρωματίνη, συνδέονται με το ρόλο της στο να προάγει την αναπαραγωγή του HCMV, δεν έχει ακόμα προσδιοριστεί. Σε αυτή τη μελέτη, δημιουργήθηκε ένας ανασυνδυασμένος HCMV ιός, ο οποίος είχε τη δυνατότητα να εκφράζει την φθορίζουσα EGFP (enhanced green fluorescent protein) πρωτεΐνη συνδεδεμένη με το καρβοξυτελικό άκρο της IE1. Χρησιμοποιώντας τον παραπάνω ιό, εξετάστηκε η ανάμειξη της IE1 στην συγκέντρωση των διαφόρων νουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων που εμπλέκονται στην μεταγραφή και την αντιγραφή του ιού, καθώς και η πυρηνική εντόπιση και οργάνωση του ιικού DNA, της IE1 και των ND10 συστατικών πρωτεϊνών (PML, Sp100, hDaxx) στο χρόνο και στο χώρο, με άμεση μικροσκοπική παρατήρηση ζωντανών μολυσμένων κυττάρων κατά τα πρώιμα στάδια της μόλυνσης. Παρατηρήθηκαν κατά την ενεργή λοίμωξη, η στόχευση και διάσπαση των ND10 από την IE1-72K αμέσως μετά την μόλυνση, παράλληλα με τη στενή της σύνδεση με την IE2-86K και τα HCMV ιικά γονιδιώματα. Τέλος μελετήθηκε ο ρόλος της IE1-72K στην ανακατανομή της μεταφασικής χρωματίνης και στην διακοπή του κυτταρικού κύκλου των HCMV μολυσμένων κυττάρων καθώς και η επίδρασή της στην έκφραση των NKG2D προσδετών κατά την άνοσο απάντηση του ξενιστή.

***Υλικά και Μέθοδοι***

## ΜΕΘΟΔΟΙ

### 1. Κυτταροκαλλιέργειες

#### 1.1 Κυτταρικές σειρές

Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, είναι οι: HFF, HeLa, mcherry-sp100 και PML knockdown κύτταρα. Οι πρωτογενείς ανθρώπινοι ινοβλάστες HFF και τα HeLa κύτταρα διατηρούνταν σε Dulbecco's τροποποιημένο Eagle's θρεπτικό (Biosera, UK) εμπλουτισμένο με 10% βόειο εμβρυϊκό ορό (FCS). Τα HFFs που σταθερά εξέφραζαν την Sp100 πρωτεΐνη συνδεδεμένη με τη μονομερή κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη mCherry, δημιουργήθηκαν μέσω μεταγωγής ρετροϊού, με τη χρήση του Vira - Power lentiviral system, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Invitrogen, Karlsruhe, Germany), και διατηρούνταν σε Dulbecco's στοιχειώδες θρεπτικό, εμπλουτισμένο με 10% βόειο εμβρυϊκό ορό (FCS) και την προσθήκη 2 µg/ml blasticidin. Τα HFF που σταθερά εξέφραζαν ένα μικρό siRNA που οδηγούσε στην αποσιώπηση των PML, διατηρούνταν σε Dulbecco's στοιχειώδες θρεπτικό, εμπλουτισμένο με 10% βόειο εμβρυϊκό ορό (FCS) και την προσθήκη 5 µg puromycin/ml (προσφορά του Thomas Stamminger, University Erlangen-Nürnberg, Germany (Tavalai et al., 2006)

Όλα τα πειράματα που περιλαμβάνουν κυτταρικές σειρές και ιούς, γίνονται σε κατάλληλα διαμορφωμένο χώρο, στέρων συνθηκών (Class II cabinet). Τέτοιες συνθήκες απαιτούνται ώστε να αποφευχθούν τυχόν μολύνσεις από ιούς βακτήρια ή μύκητες. Όλες οι κυτταροκαλλιέργειες συντηρούνται σε περιβάλλον 37°C, με 90% υγρασία και 5% διοξείδιο του άνθρακα. Η υγρασία είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη των κυττάρων, ενώ το διοξείδιο σταματά την ανάπτυξη μικροοργανισμών.

## 1.2 Τρυψινοποίηση

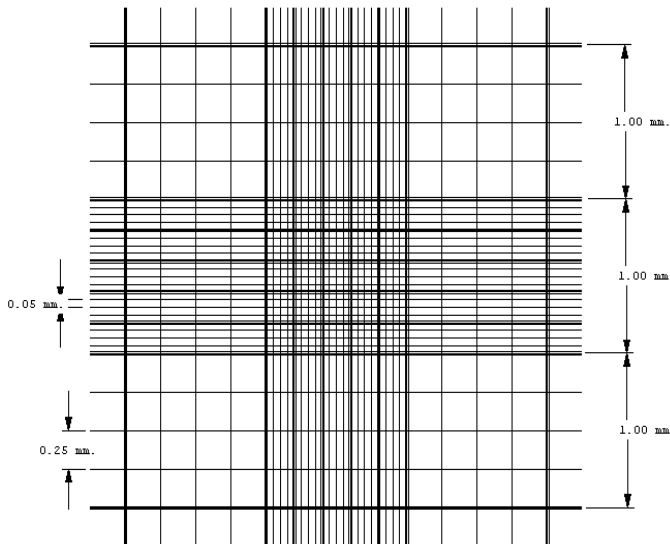
Αφαιρείται το παλιό θρεπτικό από την φλάσκα της καλλιέργειας και ακολουθεί ξέπλυμα 2 φορές με PBS ώστε να φύγει κάθε ίχνος ορού, ο οποίος είναι αναστολέας της Τρυψίνης. Ακολουθεί προσθήκη τρυψίνης 0,25% με 1mM EDTA (2ml στη φλάσκα των 75cm<sup>2</sup> και 1ml στη φλάσκα των 25cm<sup>2</sup>). Μετά από 4-5 λεπτά ακολουθεί μικροσκοπική παρακολούθηση της φλάσκας ώστε όλα τα κύτταρα της καλλιέργειας να έχουν αποκολληθεί από την επιφάνεια της φλάσκας. Κατόπιν τα κύτταρα συλλέγονται χρησιμοποιώντας 3-4ml φρέσκου θρεπτικού. Στην νέα φλάσκα έχει ήδη προστεθεί περίπου 11-12ml φρέσκου θρεπτικού υλικού, όπου προστίθεται μια μικρή ποσότητα από τα κύτταρα της παλιάς.

## 1.3. Μέτρηση Κυττάρων σε Αιμοκυτταρόμετρο Neubauer.

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των κυττάρων σε ένα διάλυμα χρησιμοποιείται το αιμοκυτταρόμετρο Neubauer. Πρόκειται για μια αντικειμενοφόρο πλάκα με ειδική χάραξη που επιτρέπει τη συγκέντρωση ορισμένου όγκου διαλύματος στις αύλακές της (Εικόνα 1.3). Η περιοχή στην οποία μετρώνται τα κύτταρα έχει διαστάσεις 1mm x 1mm. Αποτελείται από 25 μικρότερα τετράγωνα που κάθε ένα από αυτά αποτελείται από 16 επιμέρους τετράγωνα. Η χαραγμένη περιοχή έχει βάθος 0,10mm έτσι ώστε ο όγκος του υγρού ανάμεσα σε κάθε ένα από τα 16 αυτά τετράγωνα του αιμοκυτταρόμετρου και την καλυπτρίδα να ισούται με 0,00025mm<sup>3</sup> που συνεπάγεται ότι στο σύνολο της περιοχής ο όγκος του υγρού ισούται με 0.1mm<sup>3</sup>. Επειδή 1ml=1000mm<sup>3</sup> συνεπάγεται ότι 0,1mm<sup>3</sup> αντιστοιχούν σε 10<sup>-4</sup> ml. Άρα η συγκέντρωση των κυττάρων του διαλύματός μας σε 1ml προκύπτει ως εξής:

Αριθμός κυττάρων στο ml= Αριθμός κυττάρων στο mm<sup>2</sup> X αραίωση X 10<sup>4</sup>. Κατά τη μέτρηση των κυττάρων δεν μετρώνται εκείνα που έχουν βαφεί από τη χρωστική Trypan Blue γιατί είναι νεκρά.





**Εικόνα 1.3.** Αιμοκυτταρόμετρο Neubauer.

Μέτρηση των κυττάρων σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer:

A. Ανάμιξη κυττάρων με Trypan Blue σε αναλογία 1:1 (10μl κυττάρων και 10μl Trypan Blue).

B. Υπολογισμός συγκέντρωσης κυττάρων ως εξής:

$\alpha \times 2 \times 10^4 = \beta \text{ cells/ml}$  όπου:

$\alpha$ = αριθμός κυττάρων που μετρήθηκαν στο αιμοκυτταρόμετρο και

$\beta$ = συγκέντρωση των κυττάρων στο διάλυμα.

#### **1.4. Κυτταρικός συγχρονισμός μέσω έλλειψης ορού (serum starvation)**

HFF κύτταρα μεγάλης πυκνότητας επωάστηκαν με θρεπτικό απουσία ορού για 48 ώρες, με σκοπό να συγχρονιστούν στη φάση G0. Στη συνέχεια ακολουθούσε επανενεργοποίηση των κυττάρων αυξάνοντας τη συγκέντρωση του ορού στο 10%. Τη στιγμή της μόλυνσης, τα κύτταρα απελευθερώνονταν από την G0 με τρυψινοποίηση, μολύνονταν με m.o.i=0,5 ή 5 pfu/ml και ξαναστρώνονταν με μικρότερη πυκνότητα.

#### **1.5. Επιμόλυνση κυττάρων (infection)**

Για τις επιμολύνσεις, τα κύτταρα επιστρώνονταν σε κατάλληλα πηγαδάκια σε συγκέντρωση 90% (confluence), και είτε μολύνονταν με τον αγρίου τύπου HCMV ή τους ανασυνδρασμένους φθορίζοντες HCMV ιούς σε διάφορα ιικά φορτία (m.o.i). Ο ιός αφηνόταν να απορροφηθεί για 2 ώρες και στη συνέχεια ακολουθούσε αφαίρεση του ιικού υπερκειμένου και επαναφορά του απλού θρεπτικού των κυττάρων.

### **1.6. Παροδική διαμόλυνση κυττάρων (*transfection*)**

Για τα πειράματα διαμόλυνσης, πρωτογενή κύτταρα ανθρώπινων ινοβλαστών (HFFs), mCh-Sp100 ή HeLa κύτταρα επιστρώθηκαν είτε σε γυάλινες καλυπτρίδες είτε σε τριβλία με γυάλινο πάτο (Lab-Tek; Nunc). Σε αυτά τα πειράματα, DNA (1μg/well) διαμόλυνε κύτταρα μέτριας πυκνότητας χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο TransPEI (Eurogentec, Belgium) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το TransPEI (Polyethylenimine) προσδένεται ισχυρά στο DNA δημιουργώντας μικρά συμπλέγματα τα οποία εισέρχονται στο κύτταρο με ενδοκυττάρωση. Για διαμόλυνση κυττάρων με 1μg DNA χρησιμοποιήθηκαν 2μl TransPEI. Το DNA διαλύεται σε 50μl 150mM NaCl και αντίστοιχα το Trans PEI διαλύεται σε διαφορετικό σωληνάριο σε επίσης 50μl 150mM NaCl. Το διάλυμα του Trans PEI προστίθεται στο διάλυμα του DNA και το μίγμα επωάζεται για 15-30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το μίγμα DNA-TransPEI προστίθεται τέλος στο πηγάδι των κυττάρων και αναμιγνύεται με το θρεπτικό υλικό. Η παρουσία ορού στο θρεπτικό των κυττάρων δεν επηρεάζει την αποτελεσματικότητα της διαμόλυνσης.

Πειράματα διαμόλυνσης πραγματοποιήθηκαν επίσης με Lipofectamine. Το πλασμιδιακό DNA (4μg/μl) αναμιγνύεται με 50μl/πηγάδι θρεπτικό ελεύθερο ορού (Serum Free Medium, SFM). Επίσης αναμιγνύεται: Lipofectamine: 10 μl /πηγάδι με 200 μl SFM. Αναμονή για 5 λεπτά ώστε να δημιουργηθούν τα συμπλέγματα λιποσωματιδίων. Αναμιγνύονται τα δυο μίγματα και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά. Το θρεπτικό αφαιρείται από τα κύτταρα και ξεπλένονται με SFM 3 φορές. Τοποθετούνται 250 μl του μίγματος σε κάθε πηγάδι. Σε κάθε πηγάδι προστίθεται SFM ώστε ο τελικός όγκος να φτάσει τα 3ml. Κατόπιν το θρεπτικό αντικαθίσταται μετά από 4 ώρες με φρέσκο (10% FBS DMEM). Την επόμενη μέρα παρατηρούμε τα κύτταρα στο ανάστροφο μικροσκόπιο φθορισμού.

## 2. Ιοί

Οι ιοί που χρησιμοποιήθηκαν συμπεριλαμβάνουν τους:

- Αγρίου τύπου HCMV AD169 στέλεχος
- HCMV BAC CR401 (EGFP-IE1)
- HCMV BAC EGFP-IE2 (Sourvinos et al., 2007)

### 2.1 Κατασκευή Ιού αποθέματος (*stock*) HCMV ιού

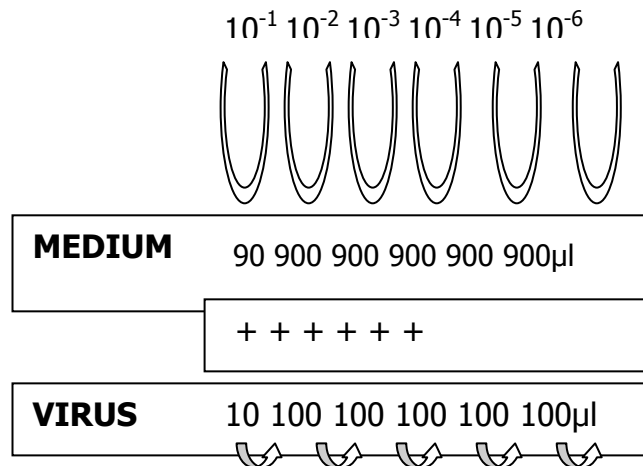
Αρχικά τα κύτταρα στρώνονται σε τριβλία των 100mm<sup>2</sup> σε αριθμό 10<sup>6</sup> και επωάζονται για μία μέρα. Ακολουθεί μόλυνση των κυττάρων με το εργαστηριακό στέλεχος του HCMV ιού, AD169, σε m.o.i (multiplicity of infection) = 0.5. Τα κύτταρα αφήνονται σε επώαση μέχρι να παρατηρηθεί αποκόλληση τους από την επιφάνεια του τριβλίου (cytopathic effect). Ακολουθεί συγκομιδή των κυττάρων με τη βοήθεια ειδικού ξέστρου και τοποθέτηση τους σε έναν 15ml σωλήνα falcon. Τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται στις 2.000rpm για 10 λεπτά στους 4°C.

Η πελέτα, που περιέχει τον ενδοκυτταρικό ιό CAV (Cell Associated Virus), επαναδιαλύεται σε 1ml θρεπτικού και ακολουθεί sonication του μείγματος με υπερήχους σε υψηλές συχνότητες. Το sonication γίνεται ώστε τα κύτταρα να διαλυθούν και να απελευθερωθούν τα ιικά σωματίδια. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 13000rpm και συλλογή του υπερκείμενου.

Το υπερκείμενο που προκύπτει μετά την πρώτη φυγοκέντρηση των κυττάρων περιέχει τον ιό που έχει ήδη απελευθερωθεί από τα κύτταρα (Cell Releasing Virus ή CRV). Το τελευταίο υφίσταται φυγοκέντρηση για 3 ώρες, στις 13000 rpm, στους 4°C, σε αποστειρωμένα vials. Η διάρκεια των 3 ωρών είναι απαραίτητη ώστε τα ιικά σωματίδια να συγκεντρωθούν υπό μορφή πελέτας. Κατόπιν, η πελέτα επαναδιαλύεται σε 1ml φρέσκου θρεπτικού και τοποθετείται στους 4°C ολονυκτίως ώστε να γίνει ομαλή επαναδιάλυση της. Ο ιός που προκύπτει, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μαζί με τον CAV για μολύνσεις κυττάρων. Ο ιός τοποθετείται στους -80°C, όπου και συντηρείται.

## 2.2 Τιτλοποίηση με Plaque Assay

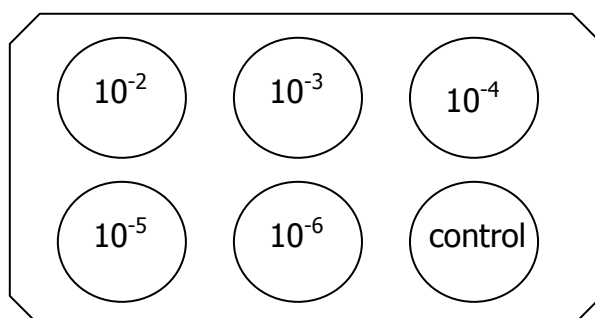
Τα πειράματα ιικών πλακών (plaque assays) πραγματοποιήθηκαν σε ινοβλάστες HFFs σύμφωνα με τα καθιερωμένα πρωτόκολλα. Χρησιμοποιώντας



**Εικόνα 2.2A.** Διαδοχικές αραιώσεις του ιού

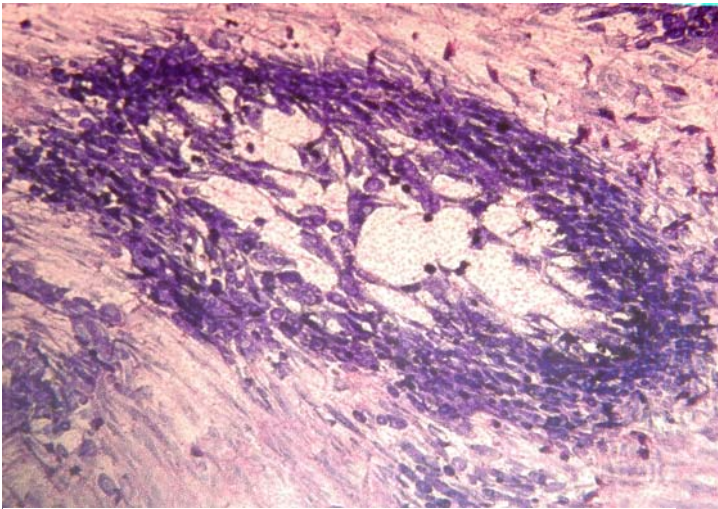
κύτταρα HFF, πραγματοποιούνται οι παρακάτω επιμολύνσεις για plaque assay, με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων στα διαλύματα που περισυλλέξαμε τον ιό κατά τη δημιουργία του stock. Ετοιμάζονται οι αραιώσεις του HCMV ως εξής:

Ο αριθμός των κυττάρων που τοποθετούμε σε κάθε πηγάδι (σε 6-well plate) είναι τέτοιος ώστε να γεμίσουν το πηγάδι σε ποσοστό (confluency) 90%. Αρχικά, αφαιρούμε τόσο θρεπτικό, ώστε τα κύτταρα απλά να καλύπτονται. Το θρεπτικό φυλάσσεται στον επωαστήρα ώστε να χρησιμοποιηθεί αργότερα.



**Εικόνα 2.2B.** Ξεκινώντας με 10μl ιικού αποθέματος, καταλήγουμε σε αραιώση της τάξης  $10^{-6}$  + mock infected.

Χρησιμοποιούνται 100μl από την κάθε αραιώση και μολύνουν τα αντίστοιχα πηγαδάκια με HFF (Εικόνα 2.2B). Το πιάτο παραμένει για 2 ώρες στον επωαστήρα, ενώ ανακινείται κάθε 10 λεπτά. Αφαιρείται το λίγο θρεπτικό που υπάρχει, και τα κύτταρα ξεπλένονται με PBS. Εντωμεταξύ, παρασκευάζεται το μείγμα του θρεπτικού με τον ορό για τον ιό. Ο ορός έχει αντισώματα (IgG) κατά του HCMV. Παρασκευάζουμε 30μl ορού (1/100) ανά 3ml του αρχικού θρεπτικού (inoculum). Στη συνέχεια, προστίθεται το μίγμα θρεπτικού-ορού και τα κύτταρα επωάζονται για περίπου 10 ημέρες.



**Εικόνα 2.2Γ.** CMV plaque – Giemsa staining

Η χρώση με Giemsa γίνεται με προσθήκη 500μl της χρωστικής σε κάθε πηγάδι. Το πιάτο παραμένει ακίνητο για μια ώρα ώστε να βάψει και στη συνέχεια ξεπλένεται προσεκτικά η χρωστική με νερό. Μετά τη χρώση, με τη βοήθεια στερεοσκοπίου, μετρώνται οι πλάκες που έχει δημιουργήσει ο ιός (Εικόνα 2.2Γ). Με βάση τον

αριθμό των πλακών που σχηματίζονται στο πηγάδι με τις λιγότερες πλάκες, υπολογίζεται ο τίτλος του ιού, ανάγοντας τον αριθμό των πλακών στην αραιώση που αντιστοιχεί. Η μονάδα μέτρησης του ιικού τίτλου είναι pfu/ml (plaque forming units per ml).

Τίτλος: αριθμός πλακών x αραιώση x 10 = PFU/ml

Για να γίνει χαρακτηρισμός και καθορισμός των ιδιοτήτων ανάπτυξης του CR401 ιού, σχεδιάστηκαν καμπύλες ανάπτυξης παράλληλα με άλλες του αγρίου τύπου HCMV AD169, και ο τίτλος του εκάστοτε ιικού φορτίου καθοριζόταν μέσω χρώσης της IE1 πρωτεΐνης (Andreoni et al., 1989).

### **2.3 Κατασκευή τεχνητών βακτηριακών χρωμοσωμάτων (BAC) και ανακατασκευή του HCMV BAC ιού**

Η αναπαραγωγή των BAC DNAs έγινε όπως έχει ήδη περιγραφεί σε προηγούμενες μελέτες (Borst et al., 1999). Το BAC πλασμίδιο ρHB5 (Borst et al., 1999) χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή του CR401 ιού, όπως περιγράφεται. Το *ie1*-εξόνιο 4 αφαιρέθηκε από το πλασμίδιο ρHB5 μετά από πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *Accl*, δημιουργώντας ένα ενδιάμεσο BAC με απαλοιφή του εξονίου 4. Ένα *BglII-XhoI* κομμάτι DNA από το ρG303-EGFP πλασμίδιο, που περιλάμβανε τις EGFP αλληλουχίες και τις πλευρικές περιοχές των *ie1* και *ie2* γονιδίων, κλωνοποιήθηκε μεταξύ των *BamHI* και *Sall* περιοριστικών θέσεων του παλινδρομικού φορέα ρKOV-KanF (Lalioiti and Heath, 2001). Ομογενή ακέραια κομμάτια αυτού του φορέα και του ρHB5 BAC απομονώθηκαν, και στη συνέχεια διαχύθηκαν σε DH10B βακτήρια, σύμφωνα με τη μέθοδο των Lalioiti και Heath. Η δομή των ανασυνδυασμένων BACs που προέκυψαν και περιείχαν την συγχωνευμένη *ie1*-EGFP αλληλουχία επιβεβαιώθηκε μέσω ηλεκτροφόρησης πήγματος αντιστροφής πεδίου (FIGE), και αποδόθηκε το BAC CR401 (Fig.1 A and B). Ο ανασυνδυασμένος CR401 ιός ανασυστάθηκε σύμφωνα με τα καθιερωμένα πρωτόκολλα (βλέπε εισαγωγή κεφάλαιο 2.3.3) (Reboredo et al., 2004).

### **2.4. Καθαρισμός Ιικού stock με CsCl**

Ο καθαρισμός των ιικών stock που απομονώνονται από τα μολυσμένα κύτταρα μπορεί να γίνει με τη χρήση διαβαθμίσεων συγκέντρωσης χλωριούχου κεσίου (CsCl). Η επαναδιάλυση της ιικής πελέτας που προκύπτει από φυγοκέντρηση του υπερκλειμένου CRV, γίνεται σε 7ml RT PBS. Προστίθεται ίση ποσότητα (7ml) τετραχλωροεθυλένιο και το μίγμα ανακινείται ελαφρά (δεν χρησιμοποιούνται πλαστικά vials γιατί λιώνουν με το τετραχλωροεθυλένιο). Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 20 min στις 2200rpm σε RT και η πάνω φάση του διαλύματος, που περιέχει τον ιό, μεταφέρεται σε νέο σωλήνα falcon. Σε ένα καθαρό γυάλινο σωλήνα προστίθεται 1.6ml CsCl υψηλής συγκέντρωσης και

ομαλά με αργή ροή προσθέτονται 3ml CsCl χαμηλής συγκέντρωσης δημιουργώντας μια δεύτερη φάση από πάνω. Ο ιός μεταφέρεται ομαλά πάνω από τις δυο φάσεις CsCl, και τελικά προστίθεται PBS ισοζυγίζοντας τους σωλήνες με τους διάφορους ιούς. Οι σωλήνες φυγοκεντρούνται στα 90.000g (23.000K) σε RT και η λεπτή φάση που δημιουργείται και περιέχει τον ιό απομακρύνεται με την λεπτή βελόνα μιας σύριγγας.

Για να απομακρύνουμε όσο CsCl έχει απομείνει στον ιό, χρησιμοποιούμε ένα αποστειρωμένο buffer: 1mM MgCl<sub>2</sub>, 135mM NaCl, 10mM Tris pH 7.8 και 10% γλυκερόλη. Τοποθετούμε τον ιό σε ειδικές κολώνες που τον συγκρατούν στο εσωτερικό τους και τις αφήνουμε να επιπλέουν στο buffer αρχικά για 4 ώρες και με νέο buffer overnight στους 4°C. Όλη η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιείται σε στείρο περιβάλλον.

### 3. Πλασμίδια

#### 3.1 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) για την ενίσχυση επιθυμητών γονιδίων

Η Αλυσιδωτή Αντίδραση με Πολυμεράση (Polymerase Chain Reaction, PCR) αποτελεί μια από τις πλέον σημαντικές τεχνικές της Μοριακής Βιολογίας με πολλές εφαρμογές τόσο στη βασική έρευνα όσο και στην κλινική διαγνωστική. Ανακαλύφθηκε το 1985 από την ερευνητική ομάδα του K.B. Mullis, στον οποίο και αποδόθηκε για την ανακάλυψή του αυτή το βραβείο Νόμπελ το 1993. Η μέθοδος της PCR επιτρέπει την εκλεκτική ενίσχυση συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA με εκθετικό τρόπο, ώστε να είναι δυνατή η περαιτέρω μελέτη τους. Εκμεταλλεύεται τον ημισυντηρητικό τρόπο διπλασιασμού του DNA σε συνδυασμό με τη χρήση θερμοανθεκτικών DNA πολυμερασών. Το υπόστρωμα DNA επωάζεται σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει μια θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση, μίγμα δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) και το ζεύγος των εκκινητών (primers). Οι εκκινητές είναι ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες που παρουσιάζουν ομολογία ως προς δυο θέσεις εκατέρωθεν της DNA αλληλουχίας που πρόκειται να ενισχυθεί και προσδένονται σε αυτές.

Αρχικά γίνεται θερμική αποδιάταξη του δίκλωνου DNA στους 95°C για 5 min, ώστε να διαχωριστούν οι αλυσίδες και να μπορέσει να γίνει ο υβριδισμός. Ο υβριδισμός σηματοδοτεί την έναρξη της προσθήκης, από την DNA πολυμεράση, δεοξυριβονουκλεοτιδίων ομόλογων προς τις αντίστοιχες θέσεις της μητρικής αλυσίδας. Ακολουθούν 30-35 κύκλοι ο καθένας από τους οποίους αποτελείται από τρία στάδια: αποδιάταξη στους 94°C, υβριδισμός των εκκινητών στους 55-60°C και πολυμερισμός στους 72°C. Η διάρκεια κάθε σταδίου είναι 30-40 sec. Η χρονική διάρκεια όλων των σταδίων θα πρέπει να διατηρείται όσο το δυνατόν μικρότερη προς αποφυγήν παραγωγής μη ειδικών προϊόντων. Ο χρόνος της επέκτασης του τελευταίου κύκλου είναι συνήθως μεγαλύτερος (5-10 min) ώστε να έχουν επεκταθεί πλήρως όλα τα νεοσυντιθέμενα μόρια.



Το προϊόν PCR το οποίο παράγεται αποτελείται εξολοκλήρου από μόρια DNA. Επειδή τα προϊόντα κάθε κύκλου συμπεριλαμβάνονται στη συνέχεια στο υπόστρωμα του επόμενου κύκλου, αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την εκθετική αύξηση του αριθμού των αντιγράφων σύμφωνα με την εξίσωση  $N = n(1+e)^a$ , όπου  $N$  = η τελική ποσότητα του προϊόντος,  $n$  = η αρχική ποσότητα του υποστρώματος και  $a$  = ο αριθμός των κύκλων της PCR. Όταν όμως η συγκέντρωση του προϊόντος ξεπεράσει κάποια τιμή, τότε σταματάει η παραγωγή και η αντίδραση μπαίνει σε φάση κορεσμού.

Πρόκειται για μια μέθοδο με μεγάλη ευαισθησία, ειδικότητα και ταχύτητα. Η τεράστια απόδοση της αντίδρασης καθιστά δυνατή την ενίσχυση αλληλουχιών ακόμα και όταν αυτές βρίσκονται σε ελάχιστο αριθμό αντιγράφων ή όταν το DNA έχει υποστεί σχετική αποδιάταξη. Η ανακάλυψη της PCR αποτέλεσε αναμφίβολα επανάσταση στη βιοϊατρική έρευνα με ένα ευρύτατο φάσμα συνεχώς εξελισσόμενων εφαρμογών τόσο στον τομέα της βασικής έρευνας, όσο και της κλινικής διαγνωστικής. Οι εφαρμογές της PCR στην ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών (ιών, βακτηρίων, παρασίτων, μυκήτων) έχουν καταστήσει τη μέθοδο αυτή βασικό εργαλείο της σύγχρονης μικροβιολογίας και ιολογίας. Η μέθοδος της PCR χρησιμοποιείται, επίσης, για τον προσδιορισμό μεταλλάξεων με στόχο τη διάγνωση γενετικών νοσημάτων, όπως η κυστική ίνωση, η μυϊκή δυστροφία Duchenne και το σύνδρομο Ehlers-Danlos, την ανίχνευση γενετικών πολυμορφισμών των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας, γεγονός αναγκαίο σε περιπτώσεις μεταμόσχευσης καθώς και την ανάλυση αποτυπώματος του DNA που χρησιμεύει στον προγενετικό και ιατροδικαστικό έλεγχο. Επιπλέον, η PCR χρησιμεύει στην ανίχνευση γενετικών αλλοιώσεων (σημειακές μεταλλάξεις, γονιδιακή επέκταση, ανακατατάξεις) σε μια σειρά καθορισμένων για κάθε τύπο καρκίνου ογκογονιδίων και ογκοκατασταλτικών γονιδίων.

### **3.2 Ηλεκτροφόρηση PCR προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης**

Η ηλεκτροφόρηση συνίσταται στο διαχωρισμό μορίων με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου με βάση το μέγεθος και το φορτίο τους. Στην περίπτωση του DNA η ηλεκτροφόρηση των μορίων μπορεί να γίνει είτε σε πήκτωμα αγαρόζης

είτε σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Η επιλογή του πηκτώματος καθώς και της συγκέντρωσής του γίνεται με βάση το μέγεθος του DNA που πρόκειται να ηλεκτροφορηθεί καθώς και την απαιτούμενη διακριτική ικανότητα της πειραματικής διαδικασίας. Το πήκτωμα αγαρόζης (συνήθως συγκέντρωση 1-2%) χρησιμοποιείται για την ηλεκτροφόρηση μεγάλων DNA τμημάτων καθώς και για μεγάλες διαφορές μεγέθους των τμημάτων που πρόκειται να διαχωριστούν. Όσον αφορά στον τρόπο παρασκευής του πηκτώματος αγαρόζης, η επιθυμητή ποσότητα αγαρόζης διαλύεται σε διάλυμα 0.5 X TBE και η αγαρόζη τήκεται με βρασμό σε φούρνο μικροκυμάτων για περίπου 2 λεπτά. Το TBE είναι ρυθμιστικό διάλυμα με pH 8.3 το οποίο αποτελείται από 10.8 g/l Tris, 5.5 g/l βορικό οξύ και 0.002M EDTA. Ακολούθως, η αγαρόζη αφήνεται να κρυώσει έως τους 60°C και προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) σε τελική συγκέντρωση 0.5 µg/ml. Το EtBr προσδένεται στο DNA και το τελευταίο γίνεται ορατό όταν φωτιστεί με υπεριώδες φως. Το διάλυμα τοποθετείται σε δοχείο που περιέχει «κτένα» η οποία δημιουργεί τα «πηγάδια» για το φόρτωμα των δειγμάτων. Η πήξη για την αγαρόζη επιτυγχάνεται με την πτώση της θερμοκρασίας της. Το στερεοποιημένο πήκτωμα μετά την αφαίρεση της «κτένας», εμβαπτίζεται σε συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει 0.5 X TBE. Το δείγμα DNA που πρόκειται να ηλεκτροφορηθεί, επαναιωρείται σε διάλυμα φόρτωσης (loading buffer) και εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση. Το διάλυμα φόρτωσης περιέχει 0.25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0.25% κυανό του ξυλενίου και 25% φικόλη. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης οι ζώνες του DNA γίνονται άμεσα ορατές με έκθεση του πηκτώματος σε υπεριώδη (UV) ακτινοβολία

### ***3.3 Καθαρισμός και απομόνωση PCR προϊόντων***

Για την απομόνωση των PCR προϊόντων από το πηκτωμα αγαρόζης μετά την ηλεκτροφόρησή τους, χρησιμοποιήθηκε το Gel Extraction Kit της Qiagen ή το Nucleospin Extract II kit. Αρχικά πραγματοποιείται κόψιμο των περιοχών του πηκτώματος, όπου βρίσκονται τα επιθυμητά προϊόντα και ακολουθεί θέρμανσή τους, ώστε να λιώσει ξανά το πηκτωμα αγαρόζης και να απελευθερώσει τα γραμμικά DNA προϊόντα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για σύνδεση (ligation).

### 3.4 Κατασκευή πλασμιδίων με Κλωνοποίηση

#### A) Επιλογή DNA τμημάτων για κλωνοποίηση

Τα επιθυμητά τμήματα DNA που προορίζονται για σύνδεση μπορούν να προέλθουν είτε ως PCR προϊόντα στοχευμένων DNA περιοχών, είτε μετά από πέψη διαφόρων κυκλικών DNA φορέων (vectors) με ειδικά περιοριστικά ένζυμα, ώστε να προκύψουν γραμμικά τμήματα. Το μέγεθος των τμημάτων αυτών ελέγχεται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, η συγκέντρωσή τους προσδιορίζεται με φωτομέτρηση, ενώ υφίστανται και επιπλέον επεξεργασία όταν αυτό κρίνεται απαραίτητο. Η επεξεργασία αυτή αφορά στη μορφή των άκρων τους, ώστε αυτά να γίνουν συμβατά για συγκόλληση. Στην περίπτωση των PCR προϊόντων οι εκκινητές επιλέγονται με τέτοιο τρόπο ώστε να δημιουργούνται συμβατά άκρα στα προϊόντα για την πρόοδο της διαδικασίας. Περαιτέρω πέψη του φορέα ή του ενθέτου, με ειδικά περιοριστικά ένζυμα, επιτρέπει την δημιουργία συμπληρωματικών άκρων. Επίσης επώαση στους 37°C για 30 λεπτά με Klenow πολυμεράση παράγει ένα 3' «τυφλό» άκρο στο DNA ώστε να είναι ευκολότερη η πρόσδεση του εισερχόμενου κομματιού. Επεξεργασία τέλος με C.I.A.P (S.A.P) φωσφορυλιώνει τα άκρα των ανοιγμένων φορέων ώστε να μην μπορούν αυτοί να συνδέονται χωρίς να έχει συμπεριληφθεί το ένθετο. Το επεξεργασμένο DNA κατόπιν καθαρίζεται με την χρήση οξικού νατρίου (sodium acetate) και ξηπλώνεται με αιθανόλη.

#### B) Αντίδραση σύνδεσης (ligation)

Η αντίδραση σύνδεσης των επιθυμητών τμημάτων DNA γίνεται με την βοήθεια του ενζύμου T4 DNA λιγάσης, η οποία συγκολλά τα συμβατά ελεύθερα άκρα. Συγκεκριμένα, ο φορέας (vector) και το ένθετο (insert) τοποθετούνται σε σωλήνα erpendorf σε αναλογία 1:10. Με τη βοήθεια ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα (gel) αγαρόζης προσδιορίζεται το μέγεθος του φορέα καθώς και του ενθέτου. Προσδιορίζεται η αναλογία των άκρων φορέα και ενθέτου, ώστε για x άκρα φορέα έχουμε ax άκρα ενθέτου εξαιτίας του γεγονότος ότι το δεύτερο είναι μικρότερο σε μήκος (αριθμό βάσεων). Γνωρίζοντας με τη χρήση του nanodrop (φωτομέτρηση) την συγκέντρωση των διαλυμάτων σε DNA (ng/μl) υπολογίζεται

η ποσότητα φορέα και ενθέτου που πρέπει να χρησιμοποιηθεί. Προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα της εταιρείας και T4 DNA λιγάση. Επίσης, προστίθεται H<sub>2</sub>O ώστε να συμπληρωθεί ο επιθυμητός όγκος στα 20μl και το μείγμα της αντίδρασης επωάζεται ολονυκτίως σε θερμοκρασία δωματίου.

### **3.5 Μετασχηματισμός βακτηρίων (*transformation*)**

Το πλασμιδιακό ανασυνδυασμένο DNA, που έχει προκύψει από την σύνδεση (ligation), εισάγεται σε επιδεκτικά (competent) βακτηριακά κύτταρα DH5α. Βακτήρια SW102 που να περιέχουν ένα επιθυμητό πλασμίδιο-φορέα, μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν και να εισαχθεί σε αυτά μόνο το ένθετο με τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης (electroporation). Χρησιμοποιούνται 125ng πλασμιδιακού DNA σε 20μl DH5α κυττάρων, σε στείρες συνθήκες, και το μείγμα επωάζεται σε πάγο για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, τα κύτταρα επωάζονται για 45 δευτερόλεπτα στους 42°C και κατόπιν για 2 λεπτά στον πάγο (Heatshock). Ακολουθεί προσθήκη 500μl LBroth ή SOC medium και επώαση στον επωαστήρα στους 37°C για 1h. Χρησιμοποιούνται από 50 έως 200μl μετασχηματισμένων βακτηρίων και επιστρώνονται σε τριβλία με στερεό θρεπτικό μέσο (LB-agar) που περιέχει 100μg/ml κατάλληλου αντιβιοτικού (αμπικικιλίνη, καναμυκίνη χλωραμφενικόλη) ανάλογα με το γονίδιο ανθεκτικότητας του πλασμιδίου που θέλουμε να κλωνοποιήσουμε. Τα τριβλία επωάζονται στους 37°C ολονυκτίως ώστε να εμφανιστούν οι αποικίες, ανθεκτικών στο εκάστοτε αντιβιοτικό, βακτηρίων. Στη συνέχεια, γίνεται τυχαία επιλογή αποικιών από το τριβλίο και καλλιεργούνται ολονυκτίως στους 37°C με 5ml LBroth και αντιβιοτικό. Τέλος ακολουθεί εκχύλιση του πλασμιδιακού DNA από την κάθε βακτηριακή καλλιέργεια και έλεγχος της επιτυχίας του ανασυνδυασμού κατά τη σύνδεση (ligation), με πέψεις με κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα καθώς και με αλληλούχιση. Η βακτηριακή καλλιέργεια που έχει μετασχηματιστεί από το σωστά ανασυνδυασμένο πλασμίδιο χρησιμοποιείται για επίστρωση νέου τρυβλίου με άγαρ για περεταίρω επεξεργασία. Η παραπάνω διαδικασία του μετασχηματισμού βακτηρίων πραγματοποιείται σε στείρες συνθήκες.

### 3.6 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής ή μεγάλης κλίμακας

#### A) Mini Preps (απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας) - Διάλυμα STET και Qiagen kit

Από τις καλλιέργειες στα πιάτα με άγαρ απομονώνεται μία αποικία και καλλιεργείται σε LBroth medium (5ml LB + 1 αποικία). 1.5ml από την καλλιέργεια του πλασμιδίου τοποθετείται σε erpendorf και φυγοκεντρείται για 2 λεπτά στις 4000rpm. Κατόπιν, η πελέτα επαναδιαλύεται σε 200μl STET, προστίθενται 5μl Λυσοζύμης (10mg/ml STET) και ακολουθεί άμεση ανάδευση. Τα κύτταρα υφίστανται βρασμό, για 45 δευτερόλεπτα και φυγοκεντρούνται για 15 λεπτά στις 13000rpm. Στη συνέχεια, απομονώνεται το υπερκείμενο και αυξάνεται ο όγκος μέχρι τα 200 μl με STET. Ακολουθεί κατακρήμνιση του DNA με 150 μl ισοπροπανόλη, και φυγοκέντρηση για ακόμα 2 λεπτά στις 13000rpm. Το ίζημα ξεπλένεται με 70% αιθανόλη. Τέλος, η πλασμιδιακή πελέτα, αφήνεται να στεγνώσει από την αιθανόλη και επαναδιαλύεται σε 30μl ddH<sub>2</sub>O ή TE.

Εναλλακτικά για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας χρησιμοποιήθηκε το mini prep kit της Qiagen το οποίο βασίζεται σε τρία διαφορετικά διαλύματα:

S1: TE και RNase

S2: 200mM NaOH κ 1% SDS που προκαλούν λύση των κυττάρων.

S3: 2,8M KAc pH 5.1 για εξουδετέρωση του NaOH

Η διαδικασία έχει ως εξής:

- ~1ml από κάθε καλλιέργεια μεταφέρεται κ σε ένα διαφορετικό erpendorf
- Φυγοκέντρηση για 15sec, στις 14000 rpm.
- Αφαίρεση θρεπτικού.
- Προσθήκη στην πελέτα 100μl διαλύματος S1.
- Vortex μέχρι να επαναδιαλυθεί η πελέτα.
- Προσθήκη 100μl διαλύματος S2.
- Ήπια ανάδευση.
- Προσθήκη 100μl διαλύματος S3.
- Ήπια ανάδευση.
- Φυγοκέντρηση για 10min στις 14000 rpm.

- Μεταφορά υπερκειμένου σε νέα erpendorf.
- Προσθήκη 2,5V 100% αιθανόλης.
- Φυγοκέντρηση για 5min στις 14000 rpm.
- Αφαίρεση υπερκειμένου.
- Προσθήκη 50μl ddH<sub>2</sub>O ή elution Buffer TE.

## **B) Midi Preps (απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας)**

Η διαδικασία είναι ίδια με την απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας με το midi prep Qiagen kit μέχρι και την προσθήκη του διαλύματος S3. Η διαφορά βρίσκεται στην ποσότητα της καλλιέργειας από την οποία απομονώνουμε το πλασμιδιακό DNA που είναι ~100ml. Μετά από την προσθήκη διαλύματος S3 και ήπια ανάδευση ακολουθούν:

- Φυγοκέντρηση στις 3000 rpm για 5min
- Μεταφορά υπερκειμένου σε νέο falcon
- Προσθήκη 0,7V ισοπροπανόλης
- Ανάδευση
- Φυγοκέντρηση στις 3000 rpm για 20min
- Απόρριψη υπερκειμένου
- Επαναδιάλυση του DNA σε 400λ H<sub>2</sub>O
- Προσθήκη ίσου όγκου μείγματος φαινόλης-χλωροφορμίου (=ίσος όγκος φαινόλης και χλωροφορμίου στο μείγμα)
- Φυγοκέντρηση στις 14000 rpm για 5min
- Απομόνωση υδατικής φάσης
- Προσθήκη ίσου όγκου χλωροφορμίου
- Φυγοκέντρηση στις 14000 rpm για 5min
- Απομόνωση υδατικής φάσης
- Κατακρήμνιση με αιθανόλη
- Επαναδιάλυση σε 100 μl TE

### Γ) Maxi preps (απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεγάλης κλίμακας)

Η ποσότητα της καλλιέργειας από την οποία γίνεται η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA εδώ αυξάνεται στα 300ml.

- Φυγοκέντρηση για 20min στις 5000rpm
- Απομάκρυνση υπερκλειμένου
- Προσθήκη 12 ml διαλύματος S1
- Ανάδευση με τη βοήθεια Vortex για επαναδιάλυση της πελέτας
- Προσθήκη 12 ml διαλύματος S2
- Ήπια ανάδευση
- Προσθήκη 12 ml διαλύματος S3
- Το δείγμα προστίθεται σε κολώνα
  - προσθήκη στην κολώνα 6 ml διαλύματος N2 (equilibration buffer)
  - προσθήκη φίλτρου στην κολώνα
  - προσθήκη του δείγματος
  - προσθήκη διαλύματος N3 (wash buffer)
  - προσθήκη 15 ml elution buffer – απομακρύνει το DNA από την κολώνα
- Προσθήκη στο φιλτραρισμένο διάλυμα DNA 10,5 ml ισοπροπανόλης
- Φυγοκέντρηση για 30min στις 3000rpm με σκοπό την κατακρήμνιση του DNA
- Αφαίρεση υπερκλειμένου
- Καλό στέγνωμα της πελέτας
- Επαναδιάλυση σε 400 μl TE

### **3.7 Ταυτοποίηση πλασμιδίου με περιοριστικά ένζυμα και αλληλούχιση (sequencing)**

Για να επιβεβαιωθεί ότι τα κύτταρα έχουν προσλάβει πλασμίδιο το οποίο έχει ενσωματώσει το επιθυμητό γονίδιο, δηλαδή για να επιβεβαιωθεί η επιτυχία του ανασυνδυασμού, πέπτεται μια ποσότητα του DNA που απομονώθηκε από τα μετασχηματισμένα βακτήρια με το κατάλληλο περιοριστικό ένζυμο περιμένοντας να ανιχνευθούν συγκεκριμένες ζώνες σε πήκτωμα αγαρόζης.

#### Master mix Πέψης:

- 1μl περιοριστικό ένζυμο
- 2μl buffer του ενζύμου που χρησιμοποιούμε
- 12μl ddH<sub>2</sub>O

Προσθέτουμε σε 5μl κάθε δείγματος το master mix και επωάζουμε για 2h στους 37°C

Στη συνέχεια προσθέτουμε 4μl loading buffer σε κάθε δείγμα και τρέχουμε σε gel αγαρόζης 1%, 20μl από κάθε δείγμα και 5μl marker. Το πήκτωμα φωτογραφείται με έκθεση σε υπεριώδες φως ώστε να πιστοποιηθεί το αναμενόμενο προϊόν.

Ταυτοποίηση του σωστού ανασυνδυασμού, με μεγαλύτερη ευαισθησία, πραγματοποιείται με τη μέθοδο της αλληλούχισης (sequencing). Με τη χρήση ειδικών εκκινήτων ενισχύεται με PCR η περιοχή του πλασμιδίου όπου έχει γίνει ο εκάστοτε ανασυνδυασμός και τα PCR προϊόντα χρησιμοποιούνται για αλληλούχιση. Κατά τη διαδικασία αυτή μας γίνεται γνωστή η ακριβής αλληλουχία των βάσεων της νουκλεοτιδικής αλυσίδας και έτσι μπορούμε να ελέγξουμε πιθανά λάθη από τυχαίες ενθέσεις ή απώλειες μέχρι και μιας βάσης στο πλαίσιο διαβάσματος.

Στην περίπτωση που εντοπίσουμε τον επιθυμητό κλώνο, από τις ζώνες που θα παρατηρήσουμε στο gel αγαρόζης, ή από το sequencing, εμβολιάζουμε νέο θρεπτικό υλικό-μεγαλύτερης ποσότητας, με τα κύτταρα της αποικίας που αντιστοιχούν στον κλώνο αυτό (αρχίζουμε διαδικασία maxi prep).



### 3.8 Φωτομέτρηση – Glycerol Stocks

Για να προσδιοριστεί η ποσότητα και η καθαρότητα του κάθε πλασμιδιακού DNA, έγινε φωτομέτρηση τους στα 260 και στα 280nm. Από την απορρόφηση στα 260nm προσδιορίζεται η συγκέντρωση τους, ενώ ο λόγος 260/280 δίνει την καθαρότητα τους (κατά πόσο υπάρχουν υπολείμματα πρωτεϊνών ή και DNA στην περίπτωση του RNA). Λόγοι από 1.5 έως 1.8 είναι ιδανικοί για το DNA.

Τα μετασχηματισμένα βακτήρια που περιέχουν τον σωστό κλώνο, το σωστά ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, αποθηκεύονται με γλυκερόλη στους -80°C για μεγάλα χρονικά διαστήματα και για περαιτέρω χρήση.

Glycerol Stocks: ίση ποσότητα γλυκερόλης – μετασχηματισμένων βακτηρίων ή 700μl βακτηρίων με 300μl γλυκερόλη 87%

### 3.9 Δημιουργία πλασμιδίων της συγκεκριμένης μελέτης

1) Για τη δημιουργία της σύνδεσης της IE1 πρωτεΐνης με τη φθορίζουσα EGFP (**IE1exon 4-EGFP**), χρησιμοποιήθηκε αρχικά το πλασμίδιο pON2512 (Gawn and Greaves, 2002), το οποίο περιείχε μια DNA αλληλουχία από το γονιδίωμα του HCMV Towne στελέχους. Η αλληλουχία αυτή περιελάμβανε το τμήμα, του *ie1/ie2* γενετικού τόπου, από την περιοριστική θέση *Bgl*II του εξονίου 4 έως την περιοριστική θέση *Sal*I μετά το εξόνιο 5. Με τοποκατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση και χρησιμοποιώντας το ολιγονουκλεοτίδιο 5' TAT ATA CAA TAG GTA CCT GGT CAG CCT TGC 3' (μεταλλαξιγόνες βάσεις σε μαύρο) αφαιρέθηκε το κωδικόνιο λήξης του εξονίου 4 ενώ ταυτόχρονα έγινε εισαγωγή μιας μοναδικής *Kpn*I περιοριστικής θέσης έτσι ώστε να δημιουργηθεί το pON2512Kpn πλασμίδιο. Παράλληλα, η κωδική αλληλουχία EGFP αφαιρέθηκε από το πλασμίδιο pEGFP-N1 (Clontech) μετά από πέψη με *Not*I και ακολούθησε επώαση με *Klen*ow και περαιτέρω πέψη του φορέα (vector) με *Kpn*I. Στο πλασμίδιο pON2512Kpn έγινε πέψη στην αρχική *Kpn*I και στην *Bst*I 1071 θέση, που βρίσκεται μεταξύ του τέλους της κωδικής περιοχής του εξονίου 4 και του *ie1* poly A σήματος, και τελικά συνδέθηκε (εντός πλαισίου ανάγνωσης) με την EGFP αλληλουχία ώστε να δημιουργηθεί το pON2512Kpn-GFP πλασμίδιο.

Το τελευταίο κόπηκε στη θέση *Bgl*III καθώς και στην *Xba*I, η οποία βρίσκεται ακριβώς καθοδικά της *Sal*I και κλωνοποιήθηκε στις ίδιες θέσεις του pG303 πλασμιδίου, δίνοντας τελικά το **pG303-EGFP** πλασμίδιο. Το pG303 πλασμίδιο περιείχε ήδη ολόκληρη την περιοχή του κυρίως άμεσα πρώιμου υποκινητή (MIEP – Major Immediate Early Promoter region) και ανοδικά τα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORFs), UL127- UL130 από το HCMV Towne στέλεχος. Ολόκληρη η κωδική περιοχή *ie1-ie2* σε αυτό το τελευταίο πλασμίδιο αλληλουχήθηκε, αποδεικνύοντας ότι καμία μη αναμενόμενη μετάλλαξη δεν είχε δημιουργηθεί είτε κατά την τοποκατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση είτε σε κάποιο από τα στάδια της κλωνοποίησης.

2) Το πλασμίδιο **pEGFP-IE1** δημιουργήθηκε μετά από εισαγωγή του *ie1* γονιδίου, που προήλθε από το pGEX-3X-IE1 (Caswell et al., 1993), στον φορέα pEGFP-C2 της Clontech. Πιο συγκεκριμένα, το πλασμίδιο-φορέας (pEGFP-C2) υφίσταται πέψη με το ένζυμο BamHI ώστε από κυκλικό να γίνει γραμμικό και να πραγματοποιηθεί η εισαγωγή του εισερχομένου τμήματος DNA (insert) με την διαδικασία της σύνδεσης (ligation). Για να είναι δυνατή η σύνδεση του επιθυμητού τμήματος DNA στον πλασμιδιακό φορέα, το ένθετο υφίσταται πέψη με τα ένζυμα EcoRI και BamHI.

3) Το πλασμίδιο **pEGFP-IE2**, δημιουργήθηκε με PCR ενίσχυση του IE2-p86 cDNA, ακολουθούμενη από εισαγωγή του στο πλασμίδιο pEGFP-N1, με τη χρήση των BglIII και Asp718 περιοριστικών ενζύμων (Sourvinos et al., 2007).

4) Ο αυτό-φθορίζον φορέας **pHcRed1-H2A** κατασκευάστηκε μετά από PCR ενίσχυση του H2A γονιδίου και εισαγωγή του στην περιοριστική θέση *EcoRV* του pBlueScript KS φορέα (Stratagene, La Jolla, CA). Στη συνέχεια το *Xho*I-*Eco*RI κομμάτι αφαιρέθηκε και συνδέθηκε στις ίδιες θέσεις του φορέα pHcRed1-N1/1 (Clontech), ώστε να δημιουργηθεί το πλασμίδιο pHcRed1-H2A.

5) Για τη δημιουργία ενός φορέα που να εκφράζει την IE1 πρωτεΐνη συνδεδεμένη με mRFP1, η κωδική αλληλουχία της IE1 ενισχύθηκε από το pGEX-3X-IE1 πλασμίδιο με PCR, χρησιμοποιώντας τους εκκινητές:

IE1-FOR: 5' AAGAGAATTCATGGAGTCCTCTGCCAAGAG 3' και

IE1-REV: 5' CCTTGAATTCCTTACTGGTCAGCCTTGCTTC 3',

που περιέχουν *EcoRI* περιοριστικές θέσεις. Το καθαρισμένο PCR προϊόν κλωνοποιήθηκε στη συνέχεια στην *EcoRI* θέση του pRSET<sub>B</sub>mRFP1 φορέα, ο οποίος εκφράζει τη μονομερή κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη mRFP1, ώστε να προκύψει το pRSET<sub>B</sub>mRFP1-IE1 πλασμίδιο.

6) Τα **STAT1** και **STAT2** cDNAs κλωνοποιήθηκαν σε σύνδεση με την **mCherry** πρωτεΐνη υπό τον έλεγχο του HCMV MIEP υποκινητή χρησιμοποιώντας την τεχνολογία του ανασυνδυασμού (Stanton et al., 2008). Χρησιμοποιήθηκε ο φορέας pAL1212, ο οποίος περιέχει μια C-τελική mcherry περιοχή για συνδέσεις γονιδίων. Επίσης περιέχει το Ad5 γονιδίωμα, CMV υποκινητή, χειριστή Tet, κασέτα amp-lacZ-sacB, mcherry, CMVIE1 και σήμα polyA. Τα SW102 βακτήρια περιέχουν έναν ελλειματικό φάγο που εκφράζει τα λ-red γονίδια, τα οποία μεσολαβούν στον ομόλογο ανασυνδυασμό μεταξύ τμημάτων DNA ακόμα και μικρών μέχρι 50bp. Τα γονίδια βρίσκονται υπο τον έλεγχο της αύξομείωσης της θερμοκρασίας και δεν εκφράζονται όταν η θερμοκρασία είναι στους 32°C ή επάγονται τοποθετώντας τα βακτήρια στους 42°C για 15min.

Ενισχύθηκαν με PCR τα STAT1 και STAT2 γονίδια χρησιμοποιώντας ειδικούς ενισχυτές που περιείχαν:

Prim F: 50bp+ περιοχή ομολογίας στον CMV υποκινητή &

Prim R: αφαιρείται το κωδικόνιο λήξης του γονιδίου μας και προστίθεται μια περιοχή ομολογίας με την έναρξη του mcherry ORF + έναν linker αμινοξέων (gsa)

**STAT1-FOR:**

AGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTGGATCCCCACCATGTCTCAGTGGT  
ACGAACTT

**STAT1-REV:**

CATCGCGGACCCTGCTGATCCAGCGCTACCTACTGTGTTTCATCATACTGTC

**STAT2-FOR:**

AGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTGGATCCCCACCATGGCGCAGTGG  
GAAATGCTG

**STAT2-REV:**

CATCGCGGACCCTGCTGATCCAGCGCTACCGAAGTCAGAAGGCATCAAGG

Χρήση της Phusion Polymerase.

Τα SW102 βακτήρια επεξεργάζονται για να γίνουν επιδεκτικά, τα γονίδια του ανασυνδυασμού επάγονται και τα PCR προϊόντα, καθαρισμένα εισάγονται στα βακτήρια με ηλεκτροδιάτρηση. Όταν πραγματοποιήθηκε ο ανασυνδυασμός ολόκληρη η κασέτα Amp-lacZ-SacB αντικαταστήθηκε από το γονίδιο μας + τον gsa linker. Τα βακτήρια επιλέγονται σε τρυβλία που περιέχουν σουκρόζη 5%, έτσι ώστε εκείνα στα οποία δεν έχει πραγματοποιηθεί ο ανασυνδυασμός (και έτσι δεν περιέχουν sacB) δεν επιβιώνουν. Για επιπλέον έλεγχο τα τρυβλία περιέχουν και XGal, έτσι ώστε οι σωστές αποικίες έχουν άσπρο χρώμα και όχι μπλέ. Τα τρυβλία περιέχουν επιπλέον θρεπτικό LB + IPTG + Cloramphenicol (OXI ampicillin )

7) Ο φορέας έκφρασης **pmcherryDaxx** δημιουργήθηκε με την παραπάνω διαδικασία σε SW102 βακτήρια με ειδικούς εκκινητές για το Daxx γονίδιο:

**Daxx-FOR:**

GACACCGGGACCGATCCAGCCTGGATCCCCACCATGGCCACCGCTAACAGCATC

**Daxx-REV:**

CATCGCGGACCCTGCTGATCCAGCGCTACCATCAGAGTCTGAGAGCACGAT

8) Ο φορέας **pmCherrySp100** (Sourvinos et al., 2007) εκφράζει την Sp100 ισομορφή A συνδεδεμένη με την φθορίζουσα πρωτεΐνη mCherry. Δημιουργήθηκε με PCR ενίσχυση της mCherry κωδικής αλληλουχίας από το πλασμίδιο pRSET-B-mCherry. Παράλληλα η κωδική περιοχή του Sp100 γονιδίου ενισχύθηκε με εκκινητές 5'\_Sp100-mCherry και 3'\_FL-Sp100. Τελικά, εκκινητές 5'\_mCherry/BstXI-Sp100 και 3'\_Sp100/ApaI-mCherry χρησιμοποιήθηκαν για μια υβριδική PCR ώστε να προκύψει το mCherry-Sp100 συνδεδεμένο γονίδιο, το οποίο εισήχθη με τη χρήση των περιοριστικών ενζύμων BstXI και ApaI στον pLenti6/V5-D-Topo φορέα (Invitrogen).

9) Ο **pECFP-PML** φορέας (Everett et al., 2003) περιέχει το cDNA του καταλοίπου 633 της ισομορφής IV της PML πρωτεΐνης, συνδεδεμένο in frame στο πλασμίδιο pECFP-N1.

## 4. Ανοσοφθορισμός

Για την έμμεση ανάλυση ανοσοφθορισμού, πρωτογενείς ινοβλάστες HFF ( $1 \times 10^5$ ) αναπτύχθηκαν σε καλυπτρίδες και ακολούθησε παροδική διαμόλυνση ή HCMV μόλυνση τους. Οι συνθήκες της παροδικής διαμόλυνσης των HFFs, καθώς και αυτές της μονιμοποίησης και της άνοσο-ανίχνευσης των ιικών και κυτταρικών πρωτεϊνών, έχουν ήδη περιγραφεί (Everett et al., 2003) και αναλύονται παρακάτω.

Πιο συγκεκριμένα, τα κύτταρα στρώνονται σε 24-well πιάτα, στα οποία έχουν προηγουμένως τοποθετηθεί γυάλινες καλυπτρίδες. Οι καλυπτρίδες βοηθούν στον χειρισμό των κυττάρων αργότερα, καθώς είναι ευκολότερη η μεταχείριση τους. Στη συνέχεια το πιάτο τοποθετείται στον επωαστήρα ολονυκτίως. Την επόμενη ημέρα τα κύτταρα μολύνονται με τον εκάστοτε ιό ή διαμολύνονται με το κατάλληλο πλασμίδιο και ακολουθεί περεταίρω επώαση για μερικές ώρες ακόμα, τόσες ώστε να έχει εκφραστεί η πρωτεΐνη που θα μελετηθεί.

Το πρώτο βήμα είναι τα μονιμοποιηθούν τα κύτταρα πάνω στην καλυπτρίδα. Για αυτό το σκοπό, χρησιμοποιείται διάλυμα PBS που περιέχει αζίδιο νατρίου, στο οποίο επωάζονται τα κύτταρα για 10 λεπτά. Στην συνέχεια ακολουθεί η διαπερατοποίηση των κυττάρων χρησιμοποιώντας διάλυμα PBS που περιέχει Nonidet P-40 (NP-40) για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα αυτό προκαλεί την διεύρυνση των πόρων στην επιφάνεια των κυττάρων, απαραίτητη διαδικασία για την πρόσδεση των αντισωμάτων στην πρωτεΐνη. Στην συνέχεια ακολουθεί ξέπλυμα των κυττάρων με PBS και τοποθέτηση του πρώτου αντισώματος. Κατόπιν, τα κύτταρα τοποθετούνται στον επωαστήρα για 60 λεπτά με συνθήκες αυξημένης υγρασίας ώστε το αντίσωμα να προσδέσει στην ιική πρωτεΐνη. Το περίσσιο αντίσωμα ξεπλένεται με PBS και προστίθεται για 60 λεπτά το δεύτερο αντίσωμα που ονομάζεται FITC (Fluorescein Isothiocyanate). Το αντίσωμα αυτό έχει κοινούς επιτόπους με το πρώτο και έτσι είναι ικανό να προσδέθει πάνω του. Τα κύτταρα ξεπλένονταν μερικές φορές ξανά, αφήνονταν να στεγνώσουν με τον αέρα, και τέλος τοποθετούνταν σε γυάλινα πλακάκια μικροσκοπίου με τη χρήση ενός διαλύματος γλυκερόλης – PBS (mounting solution-CitiFluor).

Τα πλακάκια παρατηρήθηκαν με τη χρήση ενός Leica DMIRE2 ανάστροφου μικροσκοπίου φθορισμού και τραβήχτηκαν εικόνες με μια Leica DFC300 FX ψηφιακή κάμερα σε συνθήκες που ελαχιστοποιούσαν την πιθανή επικάλυψη των διαφορετικών καναλιών. Οι εικόνες εξάγονταν ως TIFF αρχεία και τέλος επεξεργάζονταν με Photoshop.

## 5. *In situ* Υβριδοποίηση φθορισμού (FISH)

Η *in situ* υβριδοποίηση φθορισμού πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με πρωτόκολλο που έχει προηγουμένα περιγραφεί (Everett and Murray, 2005) με τις απαραίτητες τροποποιήσεις για τον HCMV ιό (Sourvinos et al., 2007). Τα HFF κύτταρα επιστρώθηκαν σε γυάλινες καλυπτρίδες διαμέτρου 13-mm και στη συνέχεια μολύνθηκαν με τον αγρίου τύπου HCMV AD169 ιό, σε υψηλό (1 PFU/cell) ή χαμηλό (0.1 PFU/cell) ιικό φορτίο (m.o.i.).

Σε διαφορετικές χρονικές στιγμές μετά τη μόλυνση, τα κύτταρα πλένονταν δυο φορές με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού φυσιολογικού ορού (PBS), που περιείχε 1% βόειο εμβρυϊκό ορό (FCS), και στη συνέχεια μονιμοποιούνταν με επώαση για 5 λεπτά στους 20°C με παγωμένο διάλυμα 95% αιθανόλης - 5% κρυσταλλικού οξικού οξέως. Τα κύτταρα στη συνέχεια πλένονταν 3 φορές με PBS–1% FCS και διατηρούνταν στους 4°C μέχρι την επόμενη χρήση. Ο ανιχνευτής (probe) για την υβριδοποίηση *in situ* ήταν ένα BAC DNA που περιείχε ολόκληρο το HCMV γονιδίωμα (Borst et al., 1999) (μια προσφορά από τον Ulrich H. Koszinowski, Munich, Germany). Μετά από επώαση με DNAάσηI, ο probe σημαινόταν μέσω μετάφρασης εξ' εγκοπής με Cy3-dCTP (Amersham), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τα κύτταρα υβριδοποιούνταν εκ των προτέρων μέσω επώασης για 30 λεπτά στους 37°C με 20μl ρυθμιστικού διαλύματος υβριδοποίησης (50% φορμαμίδιο, 10%θειϊκή δεξτράνη, 4x SSC [1x SSC είναι 0.15 M NaCl με 0.015 M κιτρικό νάτριο]), μέσα σε ένα τριβλίο για microarray υβριδοποίηση (Camlab) σε υγρό περιβάλλον. Οι καλυπτρίδες στη συνέχεια απομακρύνονταν από το chamber και αφήνονταν να στεγνώσουν. Ο probe αραιωνόταν στο ρυθμιστικό διάλυμα υβριδοποίησης σε συγκέντρωση 1ng/μl, και κάθε καλυπτρίδα επωαζόταν με αυτόν στους 95°C για 2 λεπτά, έτσι ώστε να αποδιαταχθεί ο probe και το

δείγμα. Οι καλυπτρίδες και το μίγμα υβριδοποίησης τοποθετούνταν στη συνέχεια στο, γεμάτο υγρασία, chamber, και η υβριδοποίηση συνεχιζόταν μέχρι την επόμενη μέρα (overnight) στους 37°C.

Τα κύτταρα ύστερα πλένονταν για 5 λεπτά στους 60°C με 2xSSC και μια φορά με 2x SSC σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από ένα ακόμα πλύσιμο με PBS–1% FCS, οι καλυπτρίδες επωάζονταν με το anti-IE1 αντίσωμα για 1 ώρα. Ύστερα από μερικά επιπλέον πλυσίματα, τα κύτταρα επωάζονταν με φλουορεσκεΐνη ισοθειοκυανική (FITC) – συζευγμένη sheep anti-mouse ανοσοσφαιρίνη G (Sigma) για 1 ακόμα ώρα. Τα κύτταρα ξεπλένονταν μερικές φορές, αφήνονταν να στεγνώσουν με τον αέρα, και τέλος τοποθετούνταν σε γυάλινα πλακάκια με τη χρήση ενός διαλύματος γλυκερόλης – PBS (mounting solution-CitiFluor).

Τα πλακάκια παρατηρήθηκαν με τη χρήση ενός Leica DMIRE2 ανάστροφου μικροσκοπίου φθορισμού και τραβήχτηκαν εικόνες με μια Leica DFC300 FX ψηφιακή κάμερα σε συνθήκες που ελαχιστοποιούσαν την πιθανή επικάλυψη των διαφορετικών καναλιών. Οι εικόνες εξάγονταν ως TIFF αρχεία και τέλος επεξεργάζονταν με Photoshop.

## 6. Μικροσκοπία σε ζωντανά κύτταρα

Τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε τριβλία τεσσάρων θέσεων με γυάλινο πάτο (Lab-Tek; Nunc) σε πυκνότητα  $1 \times 10^5$  κύτταρα ανά θέση, μια ημέρα πριν από κάθε πείραμα. Τα ζωντανά κύτταρα παρατηρούνταν με τη βοήθεια  $\times 63$  ξηρών αντικειμενικών φακών ενός Leica DMIRE2 ανάστροφου μικροσκοπίου φθορισμού, εξοπλισμένο με μια Leica DFC300 FX ψηφιακή κάμερα. Η τράπεζα του μικροσκοπίου ήταν καλυμμένη μέσα σε ένα ελεγχόμενο περιβάλλον σταθερής θερμοκρασίας (37°C), 5% CO<sub>2</sub> και 90% υγρασίας έτσι ώστε να διατηρεί την βιωσιμότητα των κυττάρων κατά τη διάρκεια των πειραμάτων. Η διέγερση μήκους κύματος ρυθμιζόταν από το φωτισμό μιας λάμπας υδραργύρου και ένα χειροκίνητο τροχό φίλτρων εξοπλισμένο με φίλτρα κατάλληλα για EGFP, τη μονομερή κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη mCherry, ECFP και DAPI. Επιπλέον προσοχή δόθηκε στην προσπάθεια να αποφευχθεί η επικάλυψη μεταξύ των καναλιών, συγκεντρώνοντας τα δεδομένα διαδοχικά από

κάθε κανάλι και διαβιβάζοντας τα εκλυόμενα σήματα μέσα από κατάλληλα φίλτρα. Ο χειρισμός της εικόνας της κάμερας γινόταν με τη χρήση του IM50 λογισμικού (Leica). Μεμονωμένες εικόνες είτε ακολουθίες εικόνων σε τακτά χρονικά διαστήματα εξάγονταν ως TIFF αρχεία από το IM50 λογισμικό. Ενδεικτικές εικόνες προετοιμάζονταν για παρουσίαση με τη χρήση του Photoshop.

## 7. Κυτταρομετρία ροής - FACS Analysis

Η ανοσοφαινοτυπική ανάλυση διαφόρων κυτταρικών πληθυσμών πραγματοποιείται με κυτταρομετρία ροής. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στη διέγερση και αποδιέγερση χρωμοφόρων μορίων τα οποία έχουν προηγουμένως συζευχθεί με αντισώματα για την ανίχνευση πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, μετά την πρόσδεση των αντισωμάτων στα κύτταρα, τα χρωμοφόρα διεγείρονται σε υψηλής ενέργειας τροχιακά από την ακτίνα λέιζερ του κυτταρομετρητή και η αποδιέγερσή τους προς τη θεμελιώδη κατάσταση προκαλεί εκπομπή φωτονίων συγκεκριμένου μήκους κύματος που ανιχνεύεται από μια ομάδα φωτοανιχνευτών. Επιπλέον, η σκέδαση του φωτός από το κύτταρο δίνει πληροφορίες ως προς το μέγεθος και την κοκκίωση του κυττάρου.

Ως προς την πειραματική διαδικασία, τα κύτταρα μεταφέρονται σε κατάλληλο για κυτταρομετρία ροής δοκιμαστικό σωλήνα και βάφονται για μία ή περισσότερες πρωτεΐνες αρκεί τα διάφορα αντισώματα να είναι συζευγμένα με διαφορετικά χρωμοφόρα μόρια. Υπάρχουν διάφορες παραλλαγές του πρωτοκόλλου ανάλογα με τον κυτταρικό πληθυσμό και τη θέση της πρωτεΐνης που θέλουμε να ανιχνεύσουμε στο κύτταρο (ενδοκυττάρια ή εξωκυττάρια). Μεγαλύτερος αριθμός κυττάρων από  $10^5$  ενδείκνυται αν και η μέτρηση μπορεί να πραγματοποιηθεί και με λιγότερα κύτταρα.

1. Προετοιμασία δοκιμαστικών σωλήνων κυτταρομετρίας με την κατάλληλη ένδειξη στο τοίχωμά τους.
2. Μεταφορά συγκεκριμένου αριθμού κυττάρων σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα.
3. Προσθήκη διαλύματος κυτταρομετρίας μέχρι συμπλήρωσης των  $\frac{3}{4}$  κάθε δοκιμαστικού σωλήνα [5ml FCS και 8ml 5%azide (το αζίδιο



χρησιμοποιείται σαν συντηρητικό του διαλύματος. Για τον λόγο αυτό αν το διάλυμα καταναλώνεται γρήγορα δεν κρίνεται απαραίτητη η χρήση αζιδίου) σε 1000ml PBS].

4. Φυγοκέντρηση στις 1700rpm για 7-10min.
5. Απομάκρυνση υπερκειμένου.
6. Προσθήκη 40ml γ-HAG και ανάδευση (vortex).
7. Επώαση στους 4°C για 10min.
8. Προσθήκη των κατάλληλων αντισωμάτων και ανάδευση (η ποσότητα ποικίλει ανάλογα με το αντίσωμα και την εταιρεία).
9. Επώαση για 20-40 min στους 4°C (ο χρόνος ποικίλει ανάλογα με το αντίσωμα).
10. Προσθήκη διαλύματος κυτταρομετρίας (βλέπε βήμα 3).
11. Φυγοκέντρηση στις 1700rpm για 7-10min.
12. Απομάκρυνση υπερκειμένου.
13. Προσθήκη 200-400ml 2% PFA για μονιμοποίηση των κυττάρων (η ποσότητα εξαρτάται από την επιθυμητή τελική συγκέντρωση των κυττάρων στο διάλυμα ώστε να διευκολύνεται η γρήγορη διέλευσή τους από τον κυτταρομετρητή και προσδιορίζεται εμπειρικά).
14. Τα δείγματα φυλάσσονται στους 4°C μέχρι τη μέτρησή τους στον κυτταρομετρητή.

## 8. Πρωτεΐνες

### 8.1 Εκχύλιση πρωτεϊνών από κύτταρα

Τα κύτταρα επιστρώνονται σε τριβλία (6-well plate) και μολύνονται με τον εκάστοτε ιό. Σε διαφορετικές χρονικές περιόδους, συλλέγονται με την διαδικασία που ακολουθεί. Τα κύτταρα ξεπλένονται με PBS και αποκολλώνται με τη βοήθεια ειδικού ξέστρου. Στην συνέχεια, φυγοκεντρώνονται για 10 λεπτά στις 2.500 rpm ώστε να δημιουργηθεί το ίζημα των κυττάρων. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε διάλυμα μερκαπτοαιθανόλης (mercaptoethanol). Η μερκαπτοαιθανόλη, προκαλεί την λύση των κυττάρων και την απελευθέρωση των πρωτεϊνών από αυτά.

Εναλλακτικά χρησιμοποιείται το M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent (Thermo scientific), εμπλουτισμένο με αναστολέα πρωτεασών –Halt Protease inhibitor Cocktail Kit (Thermo scientific), σε αραιώση 1/100. Το παραπάνω ίζημα κυττάρων επαναδιαλύεται σε lysis buffer και αναδεύεται ομαλά για 10 min στους 4°C. Η υπερκείμενη πρωτεΐνη απομονώνεται, από τις κυτταρικές μεμβράνες και τα υπολείμματα, με φυγοκέντρηση στα 14.000 x g για 15min στους 4°C. Τα δείγματα στη συνέχεια μπορούν να συντηρηθούν στους -20°C ή στους -80°C.

### 8.2 Προσδιορισμός της ποσότητας της πρωτεΐνης

Η μέθοδος προσδιορισμού της ποσότητας των πρωτεϊνών κατά Bradford στηρίζεται στη μέτρηση της απορρόφησης της πρωτεΐνης σε ρυθμιστικό διάλυμα 1x PBS στα 595nm με τη χρήση κατάλληλης χρωστικής, γνωστής ως διάλυμα Bradford. Αρχικά πραγματοποιείται μέτρηση της απορρόφησης στα 595nm πρότυπων διαλυμάτων βόειου αλβουμίνης (BSA) γνωστής συγκέντρωσης: 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20 μg/ml, και από τα αποτελέσματα κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη της απορρόφησης ως συνάρτηση της συγκέντρωσης της αλβουμίνης (μg/ml). Υπολογίζεται η εξίσωση που διέπει την

πρότυπη καμπύλη που είναι της μορφής:  $y=ax+b$ . Ακολουθεί φωτομέτρηση στο ίδιο μήκος κύματος των δειγμάτων πρωτεΐνης εις διπλούν και υπολογισμός της μέσης τιμής απορρόφησης κάθε δείγματος. Με τη βοήθεια της καμπύλης αναφοράς υπολογίζεται η συγκέντρωση της πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα.

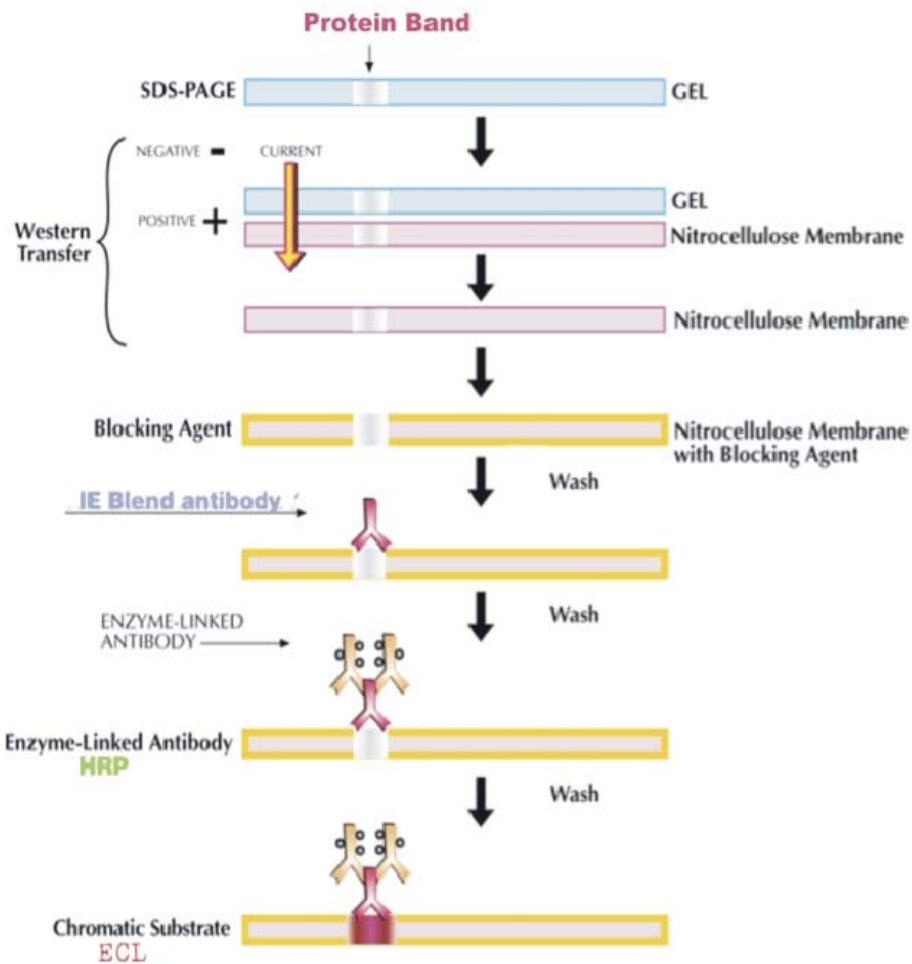
### **8.3 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών (SDS-PAGE)**

Για το στύπωμα κατά Western, εκχύλισμα από μολυσμένα κύτταρα παρασκευάστηκε σε διάλυμα φόρτωσης δωδεκυλοθειϊκού νατρίου (SDS), διαχωρίστηκε σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου - 8 με 15% SDS, και μεταφέρθηκε σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης. Το στύπωμα κατά Western και η ανίχνευση χημειοφωταύγειας εκτελέστηκαν όπως έχει προηγουμένα περιγραφεί (Everett et al., 2003).

Πιο αναλυτικά, για την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών, τα δείγματα με την μερκαπτοαιθανόλη αναμιγνύονται με το διάλυμα φόρτωσης-αποδιάταξης και αποδιάσσονται με βρασμό στους 95°C για 10 λεπτά και ταχεία ψύξη στον πάγο. Το διάλυμα φόρτωσης-αποδιάταξης περιλαμβάνει μερκαπτοαιθανόλη και SDS ως αποδιατακτικούς παράγοντες των πρωτεϊνών, και κυανό της βρωμοφαινόλης ως χρωστική που κάνει ορατές τις πρωτεΐνες κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης στο πήκτωμα. Στην συνέχεια, ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου - 8 ή 12% SDS-PAGE (29:1 ακρυλαμίδιο/δισ-ακρυλαμίδιο) για 1.5 ώρα στα 100-120V. Το πήκτωμα παρασκευάζεται σε δύο στάδια. Το πρώτο (διαχωριστικό πήκτωμα-Resolving Gel), παρασκευάζεται σε συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου 8 ή 12% ώστε να είναι δυνατός ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών σε αυτό. Το δεύτερο στάδιο (πήκτωμα επιστοιβάξης - Stacking Gel), παρασκευάζεται με συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου 5%, ώστε να εξασφαλιστεί η ομοιόμορφη εισαγωγή όλης της ποσότητας των δειγμάτων στο πήκτωμα διαχωρισμού.

#### 8.4 Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western Blot)

Η διαδικασία περιλαμβάνει τη μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με τη βοήθεια ειδικής συσκευής, σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς πρωτεϊνών. Η αρχή λειτουργίας της συσκευής είναι πολύ απλή: διοχετεύεται ηλεκτρικό ρεύμα κατά τέτοιο τρόπο ώστε να μεταφέρονται οι πρωτεΐνες (αρνητικά φορτισμένες) από το πήκτωμα στη μεμβράνη. Ακολουθεί δέσμευση των ελεύθερων πρωτεϊνών περιοχών της μεμβράνης (blocking), μέσω επώασης της μεμβράνης για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, με διάλυμα 5% (w/v) αποβουτυρωμένου γάλατος (σε σκόνη) σε ρυθμιστικό διάλυμα TBS-T 1×. Κατόπιν η μεμβράνη εκπλένεται από την περίσσεια του διαλύματος blocking με διάλυμα TBS-T (Tris buffer saline, 1% Tween 20) 3 φορές, για διάστημα 10 λεπτών κάθε φορά. Στη συνέχεια προστίθεται διάλυμα του πρώτου αντισώματος κατάλληλης αραιώσης (1:1000 mouse anti-actin) σε διάλυμα TBS που περιέχει 1% γάλα, και επώαση της μεμβράνης στους 4°C κατά τη διάρκεια της νύχτας. Ακολουθούν εκπλύσεις του αντισώματος όπως και προηγουμένως, και προσθήκη του δεύτερου αντισώματος σε κατάλληλη αραιώση (1:10.000 anti-rabbit και 1:2000 anti-mouse), που είναι συζευγμένο με το ένζυμο HRP (υπεροξειδάση του ραπανιού) και επώαση της μεμβράνης για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Η μεμβράνη στη συνέχεια εκπλένεται όπως και προηγουμένως, και αφού έρθει σε επαφή για 1-3 λεπτά με το διάλυμα εμφάνισης ECL, εκτίθεται σε φωτογραφικό φιλμ όπου αποτυπώνεται η εκπομπή χημειοφωταύγειας από τις πρωτεΐνες. Μετά την εμφάνιση των φιλμ στο μηχάνημα της Kodak τα φιλμ σαρώνονται σε έναν ψηφιακό σαρωτή εικόνας (Agfa Snap-Scan 1212u). Η ενοποιημένη πυκνότητα των ζωνών (πυκνότητα ζώνης προϊόντος-πυκνότητα ζώνης υποβάθρου) χρησιμοποιήθηκε ως ποσοτική παράμετρος και υπολογίστηκε με ανάλυση ψηφιακής εικόνας (AlphaImager, AlphaInnotech). Ο λόγος της ενοποιημένης πυκνότητας του κάθε πρωτεΐνης διαιρεμένο με αυτόν της β-ακτίνης, χρησιμοποιήθηκε για τον ημι-ποσοτικό καθορισμό των αποτελεσμάτων.



**Εικόνα 8.4.** Συνοπτική απεικόνιση του πρωτοκόλλου western. Η πρωτεΐνη διαχωρίζεται στο πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμιδίου και μεταφέρεται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Προστίθεται το διάλυμα κάλυψης των μη-ειδικών θέσεων και κατόπιν το πρωτογενές αντισώμα. Ακολουθούν, πλυσίματα και επώαση του δευτερογενούς αντισώματος. Η οπτικοποίηση της πρωτεΐνης γίνεται με την προσθήκη του εμφανιστικού υγρού ECL.

## ΥΛΙΚΑ

### 1. Διαλύματα

#### 1.1 Διαλύματα απομόνωσης DNA

- Φαινόλη (Gibco BRL)
- Χλωροφόρμιο (Fluka)
- EtOH 70% και 100% (Merck)
- PBS: 0.8% NaCl, 0.02% KCl, 0.14% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.02% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH= 7.4.
- Διάλυμα αναδιάλυσης του DNA (TE): 10mM Tris, pH=8, 1mM Na<sub>2</sub>EDTA.

#### 1.2 Διάλυμα απομόνωσης πρωτεϊνών

- 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 20% glycerol, 2% SDS και 5% β-mercaptoethanol σε δις απεσταγμένο νερό

#### 1.3 Ηλεκτροφορητικά διαλύματα

- Διάλυμα ηλεκτροφόρησης DNA σε πήκτωμα αгарόζης (0.5× TBE): 0.09 TrisHCl, 0.09M Βορικό οξύ, 2.5mM EDTA, pH 8.3
- Διάλυμα φόρτωσης DNA: 0.25% κυανού της βρωμοφαινόλης, 0.25% κυανού του ξυλενίου και 40% γλυκερόλη
- Διάλυμα φόρτωσης-αποδιάταξης πρωτεϊνών 3×: 0.2 M Tris.HCl, 6% SDS, 6% μερκαπτοαιθανόλη, 15% γλυκερόλη και 0.03 % κυανού της βρωμοφαινόλης
- Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτώματος διαχωρισμού πρωτεϊνών (separating or resolving gel buffer): 1.5 M Tris.HCl, 4% SDS (w/v), pH 8.8
- Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτώματος επιστοιβάξης πρωτεϊνών (stacking gel buffer): 1M Tris.HCl, 1.6% SDS (w/v), pH 6.8
- Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών 10×: 0.25mM Tris base, 1.92mM γλυκίνη, 1% SDS (w/v), pH 8.3

- Ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς πρωτεϊνών στη μεμβράνη (transfer buffer)  
1x: 0.025mM Tris base, 0.192mM γλυκίνη, 20% μεθανόλη, pH 8.3
- Διάλυμα έκπλυσης μεμβρανών ανοσοαποτύπωσης: TBS, 0.1% Tween (v/v)
- Διάλυμα χημειοφωταυγούς ανίχνευσης πρωτεϊνών (ELC): ChemiLucent Western blot detection system (Chemicon)

#### **1.4 Διαλύματα ανοσοφθορισμού**

- Mounting Fluid - Κάθε μπουκαλάκι των 10 ml περιέχει Tris buffered glycerin, ενισχυτή φθορισμού (fluorescence enhancer) και λιγότερο από 0.1% sodium azide (Chemicon).
- Fixative solution - 50 ml formalin, 20 g sucrose, QS to 1l με PBS (pH 7.2 - 7.6) (Chemicon).
- Permeabilization Solution - 0.5% Nonidet P-40, 10% sucrose, 1% fetal bovine serum, 0.01% sodium azide σε PBS (Chemicon).

#### **1.5 Διαλύματα μετασχηματισμού βακτηρίων**

- L-Broth (Θρεπτικό μέσο βακτηρίων): 1% Tryptone, 0.5% Yeast Extract, 1% NaCl, 0.05% αμπικιλίνη ή τετρακυκλίνη ή χλωραμφενικόλη.
- Διάλυμα αποθήκευσης των μετασχηματισμένων κυττάρων στους -80°C: 20% γλυκερόλη σε L-Broth με βακτήρια 0.8ml L-Broth με βακτήρια + 0.2 ml γλυκερόλη.
- L-Broth: 300ml H<sub>2</sub>O + 6gr LB.
- Agar: 300ml H<sub>2</sub>O + 6gr LB + 3.6gr LB agar.
- STET: 40 gr 8% Sucrose, 25ml 5% Triton X-100, 125ml 50mM EDTA PH=8, 12.5ml 50mM Tris PH=8.
- Lysozyme: 10mg/1ml STET.
- DH5a κύτταρα για transformation

### 1.6 Διαλύματα CsCl

- CsCl υψηλής συγκέντρωσης 3.6M (1.45g/ml): 12.1gr CsCl + 20ml (5mM) Tris Ακολουθεί αποστείρωση με φίλτρο.
- CsCl χαμηλής συγκέντρωσης 2.6M (1.33g/ml): 8.74gr CsCl + 20ml (1mM) EDTA (5mM) Tris
- Buffer καθαρισμού από CsCl: 1mM MgCl<sub>2</sub>, 135mM NaCl, 10mM Tris pH 7.8 και 10% γλυκερόλη.

## 2. Αντισώματα

Τα προϊόντα των HCMV IE1 και IE2 γονιδίων ανιχνεύτηκαν με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων για τις IE1-72K (BS500) και IE2-86K (SMX) (Plachter et al., 1993). Για την ανίχνευση των ενδογενών πρωτεϊνών PML, Sp100 και hDaxx τα μονοκλωνικά αντισώματα PML (H-238), Sp100 (H-60) και Daxx (M-112) (rabbit πολυκλωνικό) από τη Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz CA) χρησιμοποιήθηκαν, αντίστοιχα. Το μονοκλωνικό αντίσωμα (MAb) Ac-15 το οποίο αναγνωρίζει την β-ακτίνη προήλθε από την Chemicon International, Inc. Τα anti-mouse και anti-rabbit ραφανιδικής υπεροξειδάσης (HRP)-συζευγμένα δευτερεύοντα αντισώματα προήλθαν από τη Sigma ενώ τα Alexa 488-, Alexa 555- και Cy3-συζευγμένα από τη Molecular Probes. Τέλος χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα anti-IgG, anti-ULBP2, anti ULBP1, anti-ULBP3 και anti MICA/B για τα Western και τις αναλύσεις FACS του δεύτερου πειραματικού μέρους.

## 3. Ένζυμα

- GoTaq Flexi DNA πολυμεράση (Promega)
- Πρωτεΐνάση K - 20mg/ml (Promega)
- Ένζυμα περιορισμού - New England Biolabs/ Gibco BRL
- CIAP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase) (Initrogen)



#### 4. Αντιβιοτικά

- Αμπικιλλίνη 10mg/ml
- Καναμυκίνη (600μl/300ml θεραπευτικού)
- Chloramphenicol
- Blastidicin (Invitrogen)

#### 5. Kit

- Gel extraction kit (QIAGEN)
- Mini-prep kit (QIAGEN)
- Midi-prep kit (QIAGEN)
- Maxi-prep kit (QIAGEN)
- Lipofectamine 2000 (Invitrogen).
- TransPEI Transfection – Eurogentec
- M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent (Thermo scientific)
- Halt Protease inhibitor Cocktail Kit (Thermo scientific)
- Nucleospin plasmid (Lab supplies)
- Κιτ ανοσοφθορισμού - Complete CMV pp65 Antigenemia IFA Kit –

LIGHT DIAGNOSTICS

#### 6. PCR

- 10X buffer solution-MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen).
- MgCl<sub>2</sub> 50mM (Invitrogen).
- Εκκινητές 10mM or 25Mm stock.
- dNTPs 2.5mM (Fermentas).
- Sterile water.
- Πλασμίδια για θετικά controls
- Phusion Polymerase (Finnzymes).
- DNA template
- DNA ladders (Fermentas).

## 7. Κυτταροκαλλιέργειες

- PBS: 0.01M
- Trypsin/ EDTA
- Θρεπτικό: GIBCO => 1 bottle D-MEM+4500mg/L glucose+ L-Glutamine – Pyruvate + 5% FBS (Fetal Bovine Serum),
- Φλάσκες: 25cm<sup>2</sup>, 72 cm<sup>2</sup>, 162cm<sup>2</sup>.
- Ανθρώπινος ορός με anti-CMV, anti-HSV IgG αντισώματα.
- GIEMSA.

## 8. Υλικά και εταιρίες προέλευσης

### Υλικό – Εταιρία

FBS (Fetal Bovine Serum)  
 Bromophenol blue-Sigma  
 DH5a (βακτηριακά κύτταρα) – Invitrogen

EDTA-BDH  
 Klenow Polymerase – New England BioLabs  
 Pyruvate – Gibco  
 SDS- Sigma  
 Serum Free Medium (Θρεπτικό κυττάρων χωρίς ορό) - Gibco  
 TEMED – Sigma  
 Tris base-BDH  
 Triton-X-100- Sigma  
 Tween 20-Sigma

Άγαρ – Invitrogen  
 Αγαρόζη-Invitrogen  
 Αιθανόλη – Sigma  
 Αιθυλο-διαμινο-τετραοξικό οξύ (EDTA) – Sigma  
 Ακρυλαμίδιο – BDH  
 Αμπικιλίνη – Sigma  
 Ανθρακικό νάτριο-Sigma  
 Βορικό οξύ – BDH  
 Βρωμιούχο αιθίδιο-BDH  
 Γενετισίνη (Geneticin G418) - Gibco  
 Γλυκερόλη (Glycerol) – Sigma  
 Γλυκίνη – BDH

### Υλικό – Εταιρία

Διθειοθρεϊτόλη-Sigma  
 Διμέθυλο-σουλφοξείδιο (DMSO) – BDH  
 Εκχύλισμα Ζύμης (Yeast Extract) - Difco  
 Θειϊκό Αμμώνιο (Ammonium Sulphate) – BDH

Θρεπτικό κυττάρων: D-MEM+4500mg/L Glucose + L-Glutamine – Gibco  
 Ισοπροπανόλη- Merck  
 Κιτρικό νάτριο-BDH

Κυανό της βρωμοφαινόλης - Sigma  
 Λυσοζύμη (Lysozyme) – Sigma  
 Μεθανόλη (Methanol) – Sigma  
 Μεμβράνες νιτροκυτταρίνης – 3M  
 Οξικό οξύ-BDH  
 Ορός εμβρύου μόσχου (Fetal Bovine Serum) – Gibco  
 Τρυψίνη (Trypsin/EDTA) - Gibco  
 Υδροξείδιο του νατρίου - Sigma

Υδροχλωρική γουανιδίνη-BDH  
 Υδροχλωρικό οξύ-BDH  
 Φαινόλη - Gibco BRL  
 Φιλμ αυτοραδιογραφίας – Fuji  
 Φορμαδεύδη-BDH  
 Χλωριούχο κάλιο  
 Χλωριούχο μαγνήσιο - 50mM-Sigma  
 Χλωριούχο νάτριο – Sigma  
 Χλωροφόρμιο – Sigma

***Αποτελέσματα***

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

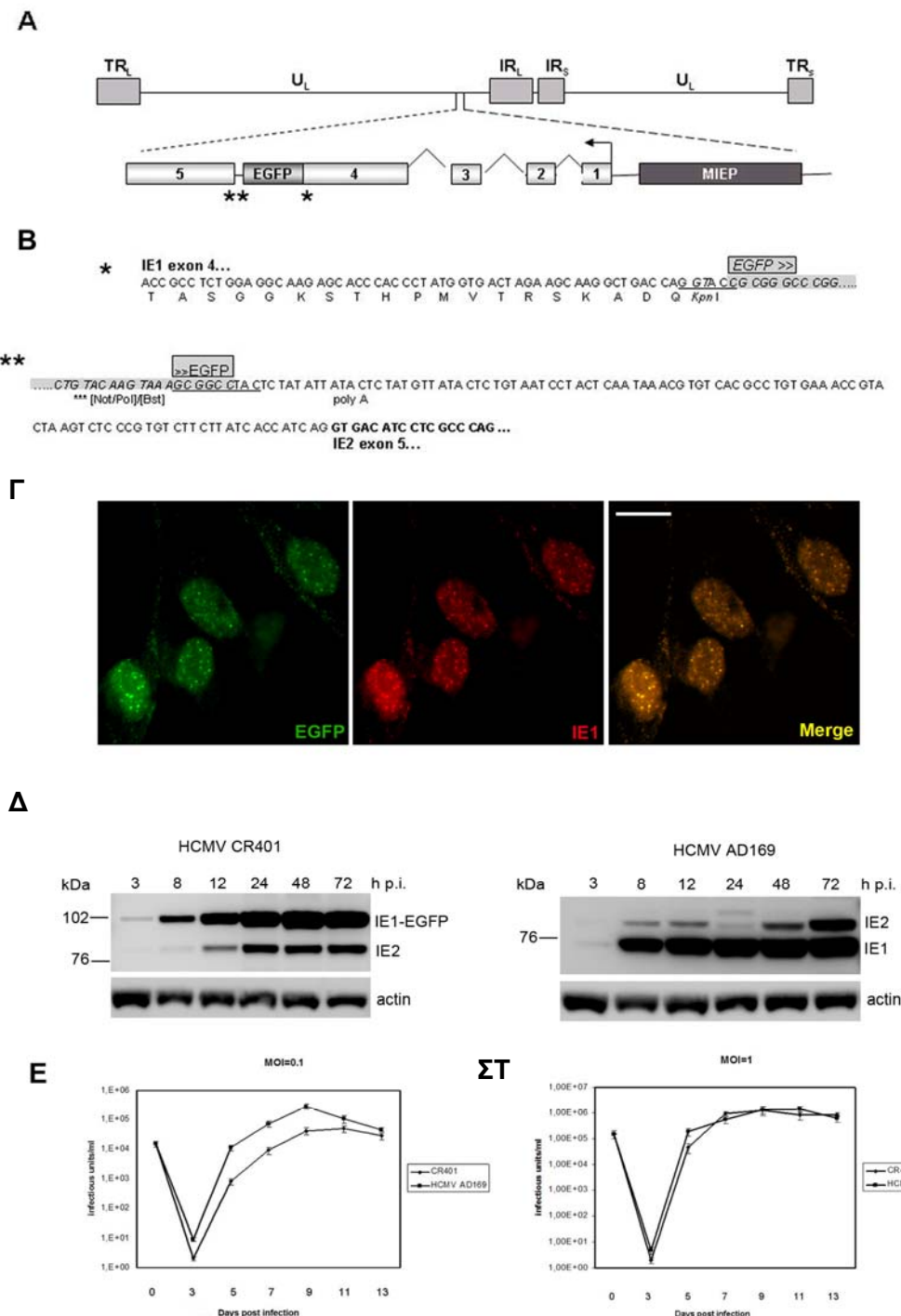
### ΜΕΡΟΣ Α'

#### 1. Χαρακτηρισμός του HCMV CR401 ιού

Για να γίνει εφικτή η παρατήρηση της IE1-72K πρωτεΐνης άμεσα και από τη φυσική της θέση, κατά τη διάρκεια της μόλυνσης, κατασκευάστηκε ο ανασυνδυασμένος HCMV CR401 ιός με, εντός πλαισίου ανάγνωσης, εισαγωγή του EGFP στο καρβοξυ-τελικό άκρο της IE1 (Εικόνα 1.1 A-B). Στα HCMV CR401 μολυσμένα κύτταρα (3h.p.i.–ώρες μετά τη μόλυνση), η IE1-GFP πρωτεΐνη παρουσίασε μια διαχεόμενη πυρηνική κατανομή με εστιακές συγκεντρώσεις στα ND10 (Εικόνα 1.1 Γ), παρόμοια με το πρότυπο χρώσης που παρατηρήθηκε με την IE1-72K πρωτεΐνη του αγρίου τύπου HCMV ιού (Kelly et al., 1995). Η χρώση με ένα IE1-ειδικό αντίσωμα συνεντοπίστηκε με τον EGFP φθορισμό (Εικόνα 1.1 Γ). Επιπροσθέτως, το EGFP-IE1 σήμα συνεντοπίστηκε επακριβώς με την IE1-72K, σε κύτταρα μολυσμένα με τον αγρίου τύπου HCMV και παράλληλα διαμολυσμένα με το pEGFP-IE1 πλασμίδιο (Εικόνα 1.2). Η μειωμένη σχετική ευκινησία της IE1-GFP (100 kDa) σε σχέση με την IE1 (72kDa) ήταν ανάλογη με την προβλεπόμενη αύξηση του μεγέθους της πρωτεΐνης μετά την προσθήκη του GFP. Η συγχωνευμένη πρωτεΐνη δεν ήταν μόνο σταθερή αλλά παρουσιάστηκε επίσης με ανάλογη κινητική και αφθονία με την μη τροποποιημένη IE1 (Εικόνα 1.1 Δ).

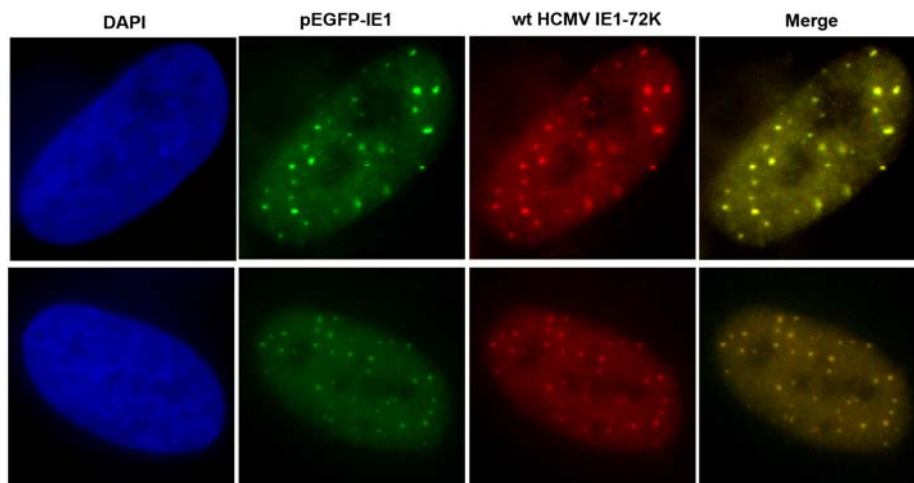
Για το χαρακτηρισμό του HCMV CR401 ιού, οι ιδιότητες ανάπτυξής του, συγκρίθηκαν με αυτές του στελέχους AD169. Σε συνθήκες μόλυνσης με υψηλό ιικό φορτίο (multiplicity of infection, m.o.i.=1), οι κινητικές ανάπτυξης του HCMV CR401 ήταν πανομοιότυπες με εκείνες του γονικού ιού. Παρόλα αυτά, ο HCMV CR401 παρουσίασε χαμηλότερες κινητικές και μειωμένη απόδοση αντιγραφής, σε χαμηλό ιικό φορτίο (m.o.i.=0.1) (Εικόνα 1.1, Ε και ΣΤ). Οι πρωτεΐνες IE1-72K και IE2-86K παράγονται με διαφορετικό μάτισμα από την ίδια μεταγραφική περιοχή, καθώς η IE1-72K κωδικοποιείται από τα εξόνια 1, 2, 3, & 4 ενώ το κύριο μετάγραφο της IE2-86K συνίσταται από τα εξόνια 1, 2, 3 & 5. Η έκφραση του κυρίου 86kDa IE2 γονιδιακού προϊόντος δεν επηρεάστηκε από την εισαγωγή του GFP στον συγκεκριμένο γονιδιακό τόπο (Εικόνα 1.1 Δ). Η

δημιουργία ενός ανασυνδυασμένου HCMV ιού, ο οποίος κωδικοποιεί την IE1-72K πρωτεΐνη από τον φυσιολογικό γενετικό της τύπο, με την καρβοξυ-τελική συγχώνευση ενός GFP σήματος, κάνει δυνατή την παρακολούθηση της βασικής IE1-72K πρωτεΐνης και των αλληλεπιδράσεών της με κυτταρικές πρωτεΐνες στα πλαίσια μιας παραγωγικής μόλυνσης.



**Εικόνα 1.1.** Κατασκευή και χαρακτηρισμός του HCMV CR401 ιού. (A) Σχηματική απεικόνιση της HCMV γονιδιακής περιοχής, όπου προστέθηκε η *ie1*-exon 4-EGFP κωδική αλληλουχία. (B) Οι αστερίσκοι δείχνουν τις αλληλουχίες

μεταξύ του *ie1*-exon 4 και της EGFP κωδικής αλληλουχίας, καθώς και μεταξύ των EGFP ORF και *ie2*-exon 5. (Γ) Ενδοκυτταρικός εντοπισμός της IE1 (κόκκινη) και του EGFP (πράσινο), τα οποία ανιχνεύονται από πειράματα έμμεσου ανοσοφθορισμού σε CR401-μολυσμένα HFF κύτταρα, 3 h p.i. (Δ) Κινητικές της IE ιικής αντιγονικής έκφρασης. Τα ιικά άμεσα πρώιμα αντιγόνα IE1-72K και IE2-86K ανιχνεύτηκαν σε HCMV CR401 και wt HCMV AD169-μολυσμένα HFF κύτταρα, σε m.o.i=1, μέσω στυπώματος κατά western, στις αναγραφόμενες χρονικές στιγμές. (Ε και ΣΤ) HFF κύτταρα μολύνθηκαν παράλληλα σε m.o.i=0.1 και m.o.i=1 με HCMV αγρίου τύπου AD169 (κουκίδες) ή με CR401 (ρόμβοι), τα οποία τυποποιήθηκαν για ίση έκφραση της IE1 πρωτεΐνης στις 24 h p.i. Τα θυγατρικά ιοσωμάτια, στο υπερκείμενο των μολυσμένων κυτταρικών καλλιιεργειών, συγκεντρώθηκαν και απομονώθηκαν σε διαφορετικά χρονικά σημεία μετά τη μόλυνση, ενώ ακολούθησε προσδιορισμός της ποσότητας του ιικού φορτίου μέσω του φθορισμού της IE1. Ράβδοι σφάλματος δείχνουν την σταθερή απόκλιση που προκύπτει από τρία διαφορετικά πειράματα.



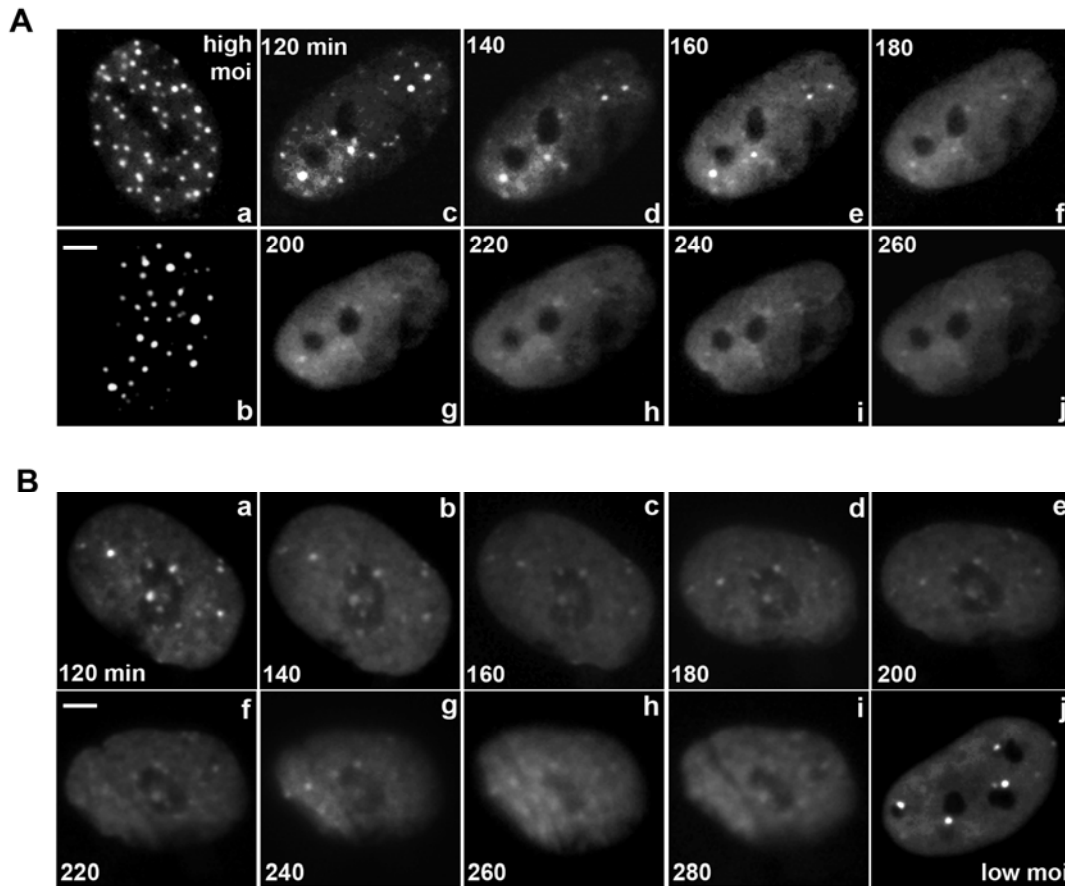
**Εικόνα 1.2.** Η πλασμιδιακή EGFP-IE1 και η ιική IE1-72K συνεντοπίζονται επακριβώς σε κύτταρα μολυσμένα με τον αγρίου τύπου AD169 HCMV και ταυτόχρονα διαμολυσμένα με το EGFP-IE1 πλασμίδιο.

## **2. Ο ενδοπυρηνικός εντοπισμός της IE1 αλλάζει κατά τη διάρκεια μιας HCMV μόλυνσης.**

Προηγούμενες μελέτες έμμεσου ανοσοφθορισμού σε μονιμοποιημένα κύτταρα έχουν δείξει ότι η IE1p72 πρωτεΐνη εντοπίζεται ως ένα συνδυασμό πυρηνικής διάχυσης και διάστικτης κατανομής στις άμεσα πρώιμες στιγμές μιας παραγωγικής μόλυνσης (Ahn et al., 1998; Ahn and Hayward, 1997). Χρησιμοποιώντας το πλεονέκτημα της μικροσκοπίας σε ζωντανά κύτταρα, που προσφέρει αυξημένη ευαισθησία, χαμηλότερο μη ειδικό σήμα και απουσία πιθανών ψευδών αποτελεσμάτων που προκαλούνται από την μονιμοποίηση και την προετοιμασία των δειγμάτων, ερευνήσαμε την ενδοκυτταρική εντόπιση της IE1 πρωτεΐνης σε ζωντανά κύτταρα. Με σκοπό να παρατηρήσουμε την IE1 σε ζωντανά κύτταρα, πρωτογενείς ανθρώπινοι ινοβλάστες μολύνθηκαν με τον CR401 ιό με μεγάλο ιικό φορτίο ( $m.o.i.=2.5$ ) και εξετάστηκαν σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα αργότερα. Ακόμα και σε πολύ πρώιμες στιγμές της μόλυνσης, αμέσως μόλις έγινε δυνατή η εντόπιση της φθορίζουσας IE1, παρατηρήσαμε την εμφάνιση διάστικτων πρωτεϊνικών εστιών, διάσπαρτων μαζί με διαχεόμενη χρώση στην πλειονότητα των μολυσμένων κυττάρων (Εικόνα 2.1 A, subpanel a). Παρόλα αυτά η μικροσκοπία σε ζωντανά κύτταρα αποκάλυψε επίσης πως ένα ποσοστό των μολυσμένων κυττάρων παρουσίασε ένα αποκλειστικά διάστικτο πρότυπο στις ίδιες πρώιμες στιγμές της μόλυνσης (Εικόνα 2.1 A, subpanel b). Με την πρόοδο της μόλυνσης, η IE1 αρχίζει να διαχέεται ενώ 5 ώρες αργότερα, η κατανομή της ήταν αποκλειστικά διάχυτη (Εικόνα 2.1 A, subpanels c-j). Η συμπεριφορά της IE1 πρωτεΐνης σε συνθήκες χαμηλού ιικού φορτίου είναι ανάλογη, με την εμφάνιση αρχικά διακριτών εστιών που προοδευτικά οδηγούνται σε διάχυση στον πυρήνα (Εικόνα 2.1 B, subpanels a-i).

Ο ρυθμός της ανακατανομής της IE1-72K σε διάστικτες εστίες ή σε διαχεόμενη μορφή στον πυρήνα ήταν ανάλογος μεταξύ χαμηλού και υψηλού  $m.o.i.$ , υποδηλώνοντας ότι η συμπεριφορά της IE1 πρωτεΐνης ήταν ανεξάρτητη του ιικού φορτίου. Παρόλα αυτά ο αριθμός των IE1-72K κουκίδων ήταν εξαρτώμενος από το  $m.o.i$ . Σε χαμηλό είτε σε υψηλό ιικό φορτίο αναλύθηκαν κύτταρα από ένα μεγάλο εύρος τυχαίων πεδίων που παρατηρήθηκαν 3 h p.i.; ο

μέσος αριθμός των IE1-72K κουκίδων σε  $m.o.i=1$  ήταν εμφανώς υψηλότερος, σχεδόν τρεις φορές μεγαλύτερος ( $19\pm 4$ ) από αυτόν που παρατηρήθηκε σε  $m.o.i=0.1$  ( $7\pm 2$ ).



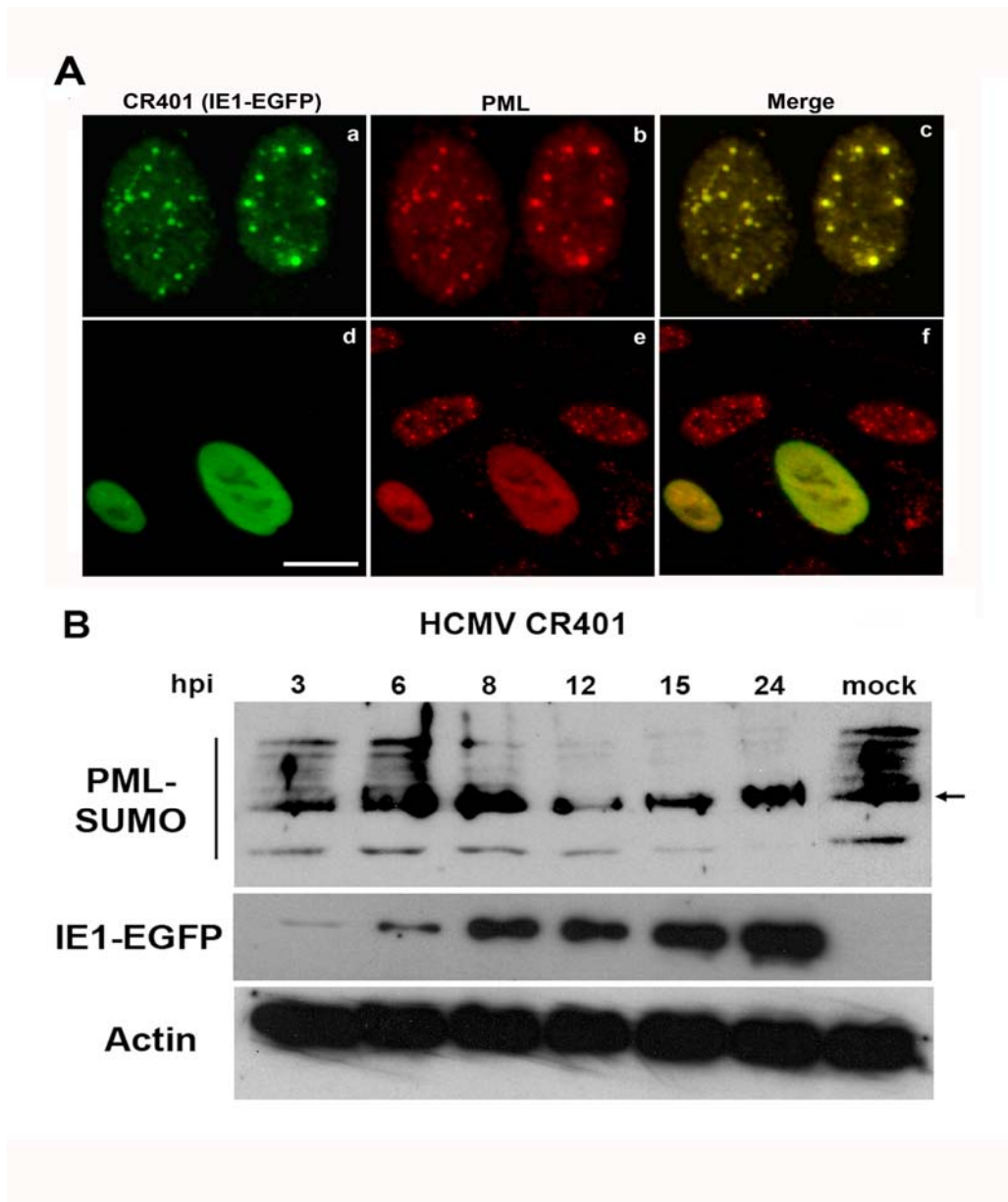
**Εικόνα 2.1.** Ενδοπυρηνικός εντοπισμός της IE-72kDa πρωτεΐνης. Μικροσκοπική παρατήρηση ενός μεμονωμένου μολυσμένου κυττάρου σε: (A) Συνθήκες υψηλού ιικού φορτίου, (B) Συνθήκες χαμηλού ιικού φορτίου. (A) HFF κύτταρα μολύνθηκαν με CR401 σε  $m.o.i=1$  και οι εικόνες προέκυψαν με μικροσκοπία σε ζωντανά κύτταρα. Η IE1 εμφανίστηκε σε διακριτές εστίες, που διασπείρονταν μαζί με ένα διαχεόμενο πρότυπο στον πυρήνα (a), ενώ σε ένα ποσοστό μολυσμένων κυττάρων η IE1 ήταν αποκλειστικά καταμεμημένη σε διακριτές έντονες εστιακές δομές (b) στις 2 h p.i. Ο αριθμός των IE1 εστιών διέφερε όταν τα κύτταρα μολύνθηκαν με  $m.o.i=0.1$  (a vs c).



### **3. Επαγωγή της διάσπασης των PML και από-SUMO-υλίωση από τον HCMV CR401 ιό**

Πριν το ξεκίνημα μιας ενεργής ιικής αναπαραγωγής, μελέτες σε μονιμοποιημένα κύτταρα έχουν δείξει πως η IE1 πρωτεΐνη στοχεύει τα ND10 και στη συνέχεια μετατοπίζει την κυτταρική PML από το σύμπλοκο των ND10, ενώ οι δυο πρωτεΐνες ανακατανέμονται σε μια πυρηνική διάχυση αργότερα κατά τη διάρκεια της μόλυνσης (Ahn et al., 1998; Ahn and Hayward, 1997; Kelly et al., 1995; Koriath et al., 1996; Wilkinson et al., 1998). Επίσης η διάσπαση των ND10 από την IE1 έχει συσχετιστεί με την αποτελεσματικότητα της έκφρασης των ιικών γονιδίων στα αρχικά στάδια, καθώς και της αντιγραφής του DNA στην HCMV μόλυνση (Ahn and Hayward, 2000).

Ο HCMV CR401 ιός επιτρέπει την απεικόνιση της IE1-72K πρωτεΐνης σε ζωντανά κύτταρα κατά τη διάρκεια της μόλυνσης, παρέχει αυξημένη ευαισθησία εντοπισμού ενώ εξαλείφει πιθανά τεχνικά προβλήματα που σχετίζονται με την μονιμοποίηση και την προετοιμασία των δειγμάτων. Με τη χρήση του HCMV CR401, η IE1-EGFP πρωτεΐνη ήταν δυνατόν να εντοπιστεί από τις 2 h p.i., κατά κύριο λόγο συνδεδεμένη με τα ND10, διάσπαρτη, με διάστικτη χρώση στην πλειονότητα των μολυσμένων κυττάρων (Εικόνα 3.1 A, a-c). Καθώς η μόλυνση εξελισσόταν τα PML μετατοπίζονταν από τα ND10, έτσι ώστε μέχρι τις 6 h p.i. τα ενδογενή PML, σε κύτταρα τα οποία εξέφραζαν την IE1-EGFP πρωτεΐνη, παρουσίαζαν πλήρη διάχυση μέσα στο πυρηνόπλασμα (Εικόνα 3.1 A, d-f). Παρόλο που τα PML διατηρούνται σταθερά κατά τη διάρκεια της μόλυνσης, ο ιός HCMV μεταβάλλει την τροποποίηση των PML με τα SUMO προϊόντα προσθήκης (Lee et al., 2004; Muller and Dejean, 1999). Η SUMO-υλίωση των PML σε διαφορετικές θέσεις οδηγεί στην έκφραση μιας ομάδας ισομορφών μικρότερου μεγέθους (mock sample; Εικόνα 3.1 B). Η IE1-72K πρωτεΐνη υποστηρίζεται πως είναι υπεύθυνη για την απώλεια των SUMO-υλιωμένων ισομορφών των PML κατά τη διάρκεια της HCMV μόλυνσης (Muller and Dejean, 1999) και αυτή η ιδιότητα φαίνεται να διατηρείται από την IE1-GFP στον HCMV CR401 ιό (Εικόνα 3.1 B).



**Εικόνα 3.1.** (A) Έκφραση και κατανομή της HCMV CR401 IE1-EGFP και των PML σε μονιμοποιημένα κύτταρα. Τα HFF κύτταρα μολύνθηκαν με τον CR401 ιό και έγινε χρώση για PML άμεσα μετά τη μόλυνση. Έμμεση ανάλυση ανοσοφθορισμού έδειξε απόλυτο συνεντοπισμό της IE1-EGFP και των ενδογενών PML στις 2 hpi (a-c). Ταυτόχρονη διάχυση και των δύο πρωτεϊνών, IE1-EGFP και PML, παρατηρήθηκε κατά τις 6 h p.i. (d-f). Παρατηρώντας τα μη μολυσμένα κύτταρα, διακρίνουμε τη διατήρηση των φυσιολογικών ND10 (κόκκινες εστίες). (B) Επίδραση της CR401 μόλυνσης στα ενδογενή PML. HFF κύτταρα μολύνθηκαν με τον CR401 ιό σε m.o.i=0.5; τα κύτταρα συγκεντρώθηκαν σε διαφορετικές χρονικές στιγμές μετά την μόλυνση και οι κυτταρικές πρωτεΐνες αναλύθηκαν με στύπωμα κατά western.

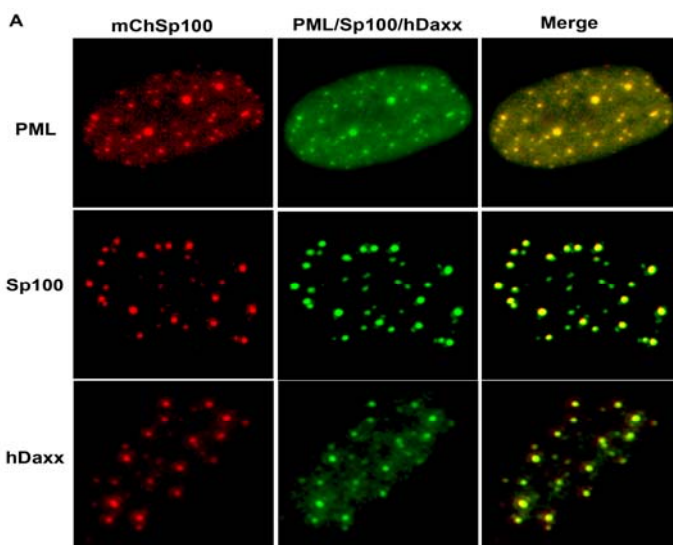
#### **4. Απεικόνιση των Sp100 πρωτεϊνών κατά τη διάρκεια της διάσπασης των ND10 στην HCMV μόλυνση**

Χρησιμοποιώντας το GFP σήμα στον HCMV CR401 ιό, η δυναμική αλληλεπίδραση μεταξύ των IE1-72K και ND10 μπορεί να παρατηρηθεί σε ζωντανά μολυσμένα κύτταρα. Πρωτογενείς ανθρώπινοι ινοβλάστες που εκφράζουν σταθερά την, ND10 - πρωτεΐνη, Sp100 (ισομορφή A), συνδεδεμένη με μια κόκκινη (mCherry) φθορίζουσα (mChSp100), μολύνθηκαν με τον CR401 ιό και η εντόπιση της HCMV IE1 και της κυτταρικής Sp100 αναλύθηκε με μικροσκοπία ζωντανών κυτάρων.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.1 A, η αυτοφθορίζουσα συγχωνευμένη mch-Sp100 πρωτεΐνη συνεντοπίστηκε με τα ενδογενή PML, Sp100 και hDaxx και έτσι μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως ένας πιστός δείκτης για τα ενδογενή ND10. Επιτυχημένη αναπαραγωγή του αγρίου τύπου HCMV AD169 στα mch-Sp100 κύτταρα έχει ήδη περιγραφεί σε προηγούμενες μελέτες (Sourvinos et al., 2007). Με σκοπό να χαρακτηρίσουμε την ικανότητα αυτής της κυτταρικής σειράς να υποστηρίξει μια λυτική μόλυνση του ανασυνδυασμένου HCMV CR401, πραγματοποιήθηκε ανάλυση της καμπύλης ανάπτυξης του παράλληλα με αυτή του αγρίου τύπου ιικού στελέχους. Για τις αναλύσεις αυτές, παρακολούθησαμε την αντιγραφή του ιού και για τα δυο ιικά στελέχη σε HFF ή mch-Sp100 κύτταρα. Σε διαφορετικά χρονικά σημεία μετά τη μόλυνση (1,3,5,7,9, και 11 μέρες), δείγματα από τα υπερκείμενα των μολυσμένων κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν για τιτλοποίηση μέσω σχηματισμού ιικών πλακών. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.1 B, οι δυο ιοί παρουσίασαν συγκρίσιμες κινητικές στις καμπύλες ανάπτυξης τους, είτε στα HFF είτε στα mch-Sp100 κύτταρα, καθιστώντας τα τελευταία κατάλληλα για τη μελέτη μας.

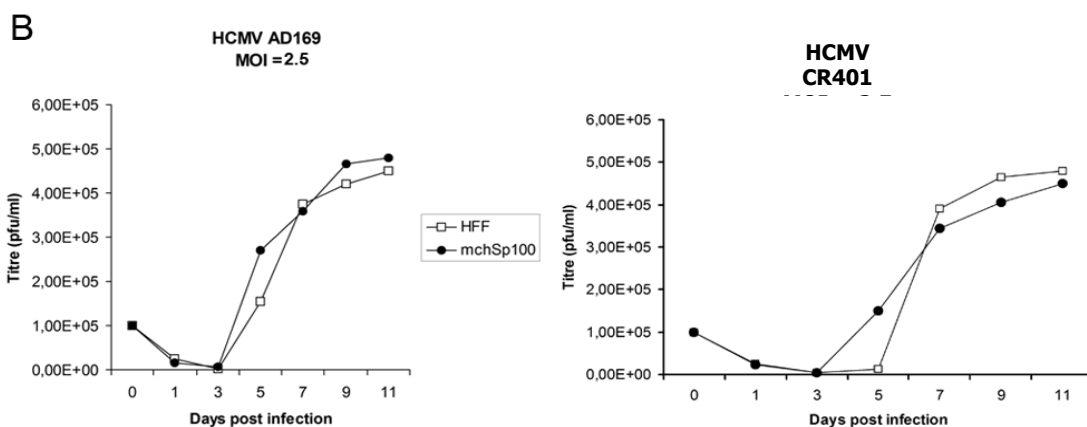
Η Εικόνα 4.2 A και B, παρουσιάζει μια ακολουθία εικόνων ενός ενδεικτικού ζωντανού μολυσμένου κυττάρου κατά την εξέλιξη της μόλυνσης. Η συντριπτική πλειοψηφία των IE1-GFP συνεντοπίστηκαν με τα Sp100 μόρια στα 200 λεπτά μετά τη μόλυνση (min p.i.) και οι IE1 και Sp100 παρέμειναν σε στενή σύνδεση, με μικρές μετατοπίσεις στο πέρασμα του χρόνου. Αργότερα στην ακολουθία των εικόνων, η IE1-GFP άλλαξε από εστιακή σε πυρηνικά διαχεόμενη κατανομή ενώ τα ND10 διασπάστηκαν. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι, με τη διάσπαση των ND10 και αντίθετα με την διαχεόμενη

κατανομή των PML στον πυρήνα, το mChSp100 σήμα προοδευτικά εξασθενίζει στον πυρήνα. Η ταχύτητα της εξάλειψης των Sp100 ήταν συγκρίσιμη των διαφορετικών m.o.i όπως απέδειξαν πειράματα μικροσκοπίας σε ζωντανά κύτταρα. Δεδομένου πως η Sp100 είναι μια πρωτεΐνη σε χαμηλή αφθονία (Negorev et al., 2006), ερευνήσαμε το βιοχημικό αποτέλεσμα της IE1-EGFP πάνω στην Sp100 πρωτεΐνη, κατά τα πρώτα στάδια της μόλυνσης, με στύπωμα κατά western σε ινοβλάστες οι οποίοι υπερ-εξέφραζαν την Sp100 πρωτεΐνη συνδεδεμένη με mCherry. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.2 Γ, η HCMV CR401 μόλυνση οδήγησε στην προοδευτική απώλεια της SUMO-1 τροποποίησης της Sp100, και στις 8 h.p.i. το SUMO-1-Sp100 σύμπλοκο ήταν μετά βίας ανιχνεύσιμο. Τα αποτελέσματα από την μικροσκοπία σε ζωντανά κύτταρα καθώς και η βιοχημική ανάλυση, οδηγούν σε μια απτή απόδειξη σχετικά με τη μοίρα των Sp100 κατά την HCMV μόλυνση, δείχνοντας ότι κυρίως η SUMO-1 τροποποιημένη ισομορφή των Sp100 διασπάται από τα ND10 μέσω ενός IE1-72K-εξαρτώμενου τρόπου.

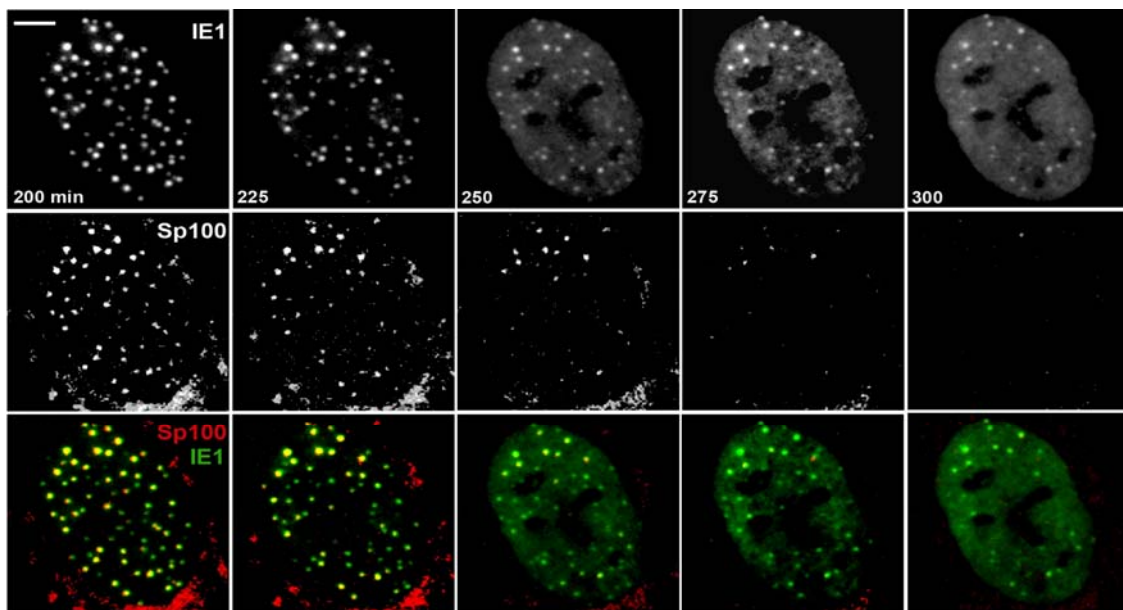


**Εικόνα 4.1.** Εξακρίβωση της καταλληλότητας των mcherry-Sp100 κυττάρων για την μελέτη μας.

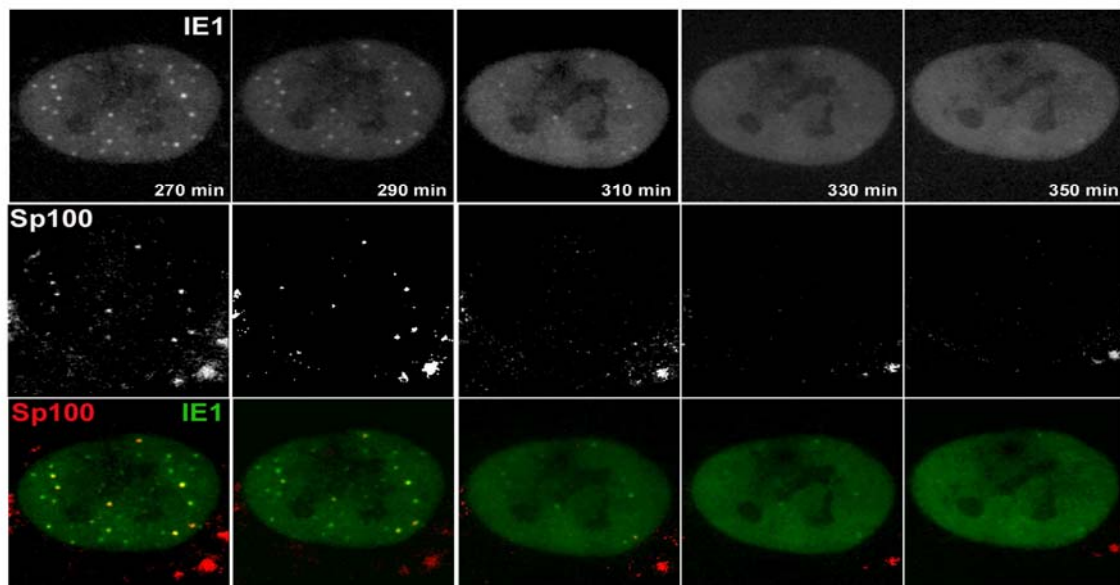
(A) mcherry-Sp100 vs ενδογενών PML, Sp100, Daxx, (B) ο HCMV CR401 ιός μολύνοντας τα mcherry-Sp100 κύτταρα.



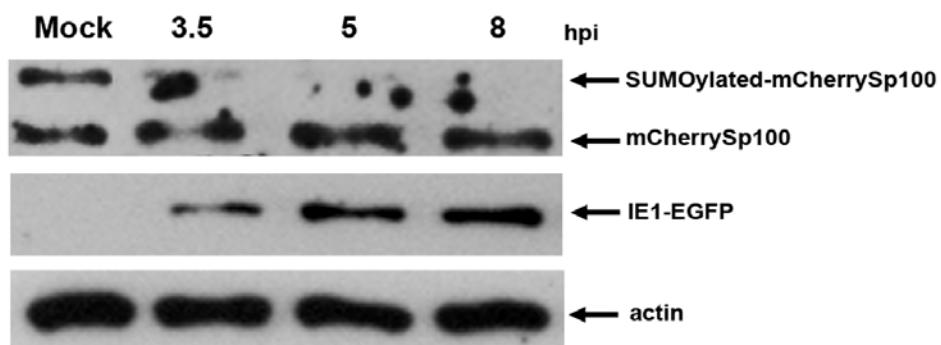
A



B



Γ



**Εικόνα 4.2.** Δυναμική πυρηνική ανακατανομή της IE1 και παρατήρηση της Sp100 καθώς τα ND10 διασπώνται σε ζωντανά μολυσμένα κύτταρα. (A) Ζωντανοί ανθρώπινοι ινοβλάστες, που εξέφραζαν mCherrySp100, μολύνθηκαν με CR401 με  $m.o.i=1$  και παρατηρήθηκαν τις πρώτες ώρες μετά τη μόλυνση. Οι IE1 εστίες που δημιουργούνταν αρχικά διαλύονταν με την εξέλιξη μιας

παραγωγικής μόλυνσης (200-300 min). Παρουσιάζονται επιλεγμένες εικόνες διπλής χρώσης-σήμανσης, που δείχνουν τη δυναμική διάσπαση των Sp100 από την IE1 (bars, 10  $\mu$ m). (B) Η αρχική διάσπαση των Sp100 ακολουθείται από την πλήρη διάχυση της IE1. (Γ) mCherrySp100 κύτταρα μολύνθηκαν με τον HCMV CR401 ιό με m.o.i=1; τα μολυσμένα ή μη κύτταρα συγκεντρώθηκαν σε διαφορετικές χρονικές στιγμές μετά την απορρόφηση του ιού και η συνολική ποσότητα των κυτταρικών πρωτεϊνών αναλύθηκε με στύπωμα κατά western.

## **5. Η ταχεία εξάλειψη των ND10 πραγματοποιείται μόνο στο πλαίσιο της ιικής μόλυνσης**

Προηγούμενες μελέτες σε μονιμοποιημένα κύτταρα έχουν δείξει ότι η έκφραση της πρωτεΐνης IE1-72K και μόνο, είναι επαρκής για να προκαλέσει διάσπαση των ND10 (Ahn et al., 1998; Ahn and Hayward, 1997; Ishov et al., 1997; Kelly et al., 1995; Koriath et al., 1996). Οι παρατηρήσεις σε αυτές τις μελέτες προέκυψαν από πειράματα παροδικής έκφρασης σε χρονικές στιγμές πολύ αργότερα από τη διαμόλυνση (48-72 h.p.t) και έτσι, τα ενδιάμεσα στάδια της στόχευσης των ND10, σε πρώιμες στιγμές της μόλυνσης δεν μπορούσαν να διευκρινιστούν. Χρησιμοποιώντας το πλεονέκτημα της αυτό-φθορίζουσας GFP πρωτεΐνης, μπορέσαμε να ακολουθήσουμε την πορεία της IE1 σε σχέση με τα ND10 σωμάτια σε ζωντανά διαμολυσμένα κύτταρα (Tavalai et al., 2006). Ένα πλασμιδίο που κωδικοποιούσε την EGFP-IE1 συγχωνευμένη πρωτεΐνη (pEGFP-IE1), χρησιμοποιήθηκε για να διαμολύνει mChSp100 κύτταρα, και εικόνες ελήφθησαν με το πέρασμα του χρόνου. Κατά τη μόλυνση με τον HCMV CR401 ιό, αποτελεσματική έκφραση της IE1-EGFP και εξασθένηση του mChSp100 σήματος παρατηρήθηκε στις 6 h p.i. (Εικόνα 5.1. A, row A). Με την DNA διαμόλυνση, το IE1-EGFP σήμα ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά στις 9 h, ενώ την ίδια ώρα η mChSp100 μπορούσε εύκολα να παρατηρηθεί σε εστίες που συνεντοπίζονταν με την IE1 (Εικόνα 5.1. A, row B). Στις 12 και 15 h.p.t., ο αριθμός των IE1 και Sp100 εστιών είχαν μειωθεί προοδευτικά αλλά καμία πρωτεΐνη δεν είχε εξαφανιστεί ολοκληρωτικά. Διάχυση της IE1 και απώλεια των Sp100 εστιών συνέβη τελικά πολύ αργότερα. Ενδιαφέρον παρουσίασε η παρατήρηση πως στον πυρήνα μεμονωμένων κυττάρων, ακόμα και μετά την διάσπαση της πλειονότητας των ND10, ένας αριθμός παρέμενε ορατός (βλέπε τα βέλη στην Εικόνα 5.1. A, row B), υποδηλώνοντας μια υπό-ομάδα των ND10 με μεγαλύτερη σταθερότητα.

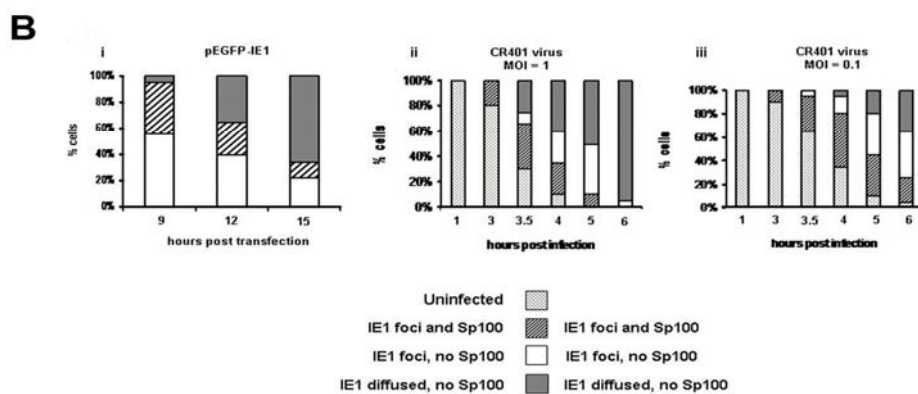
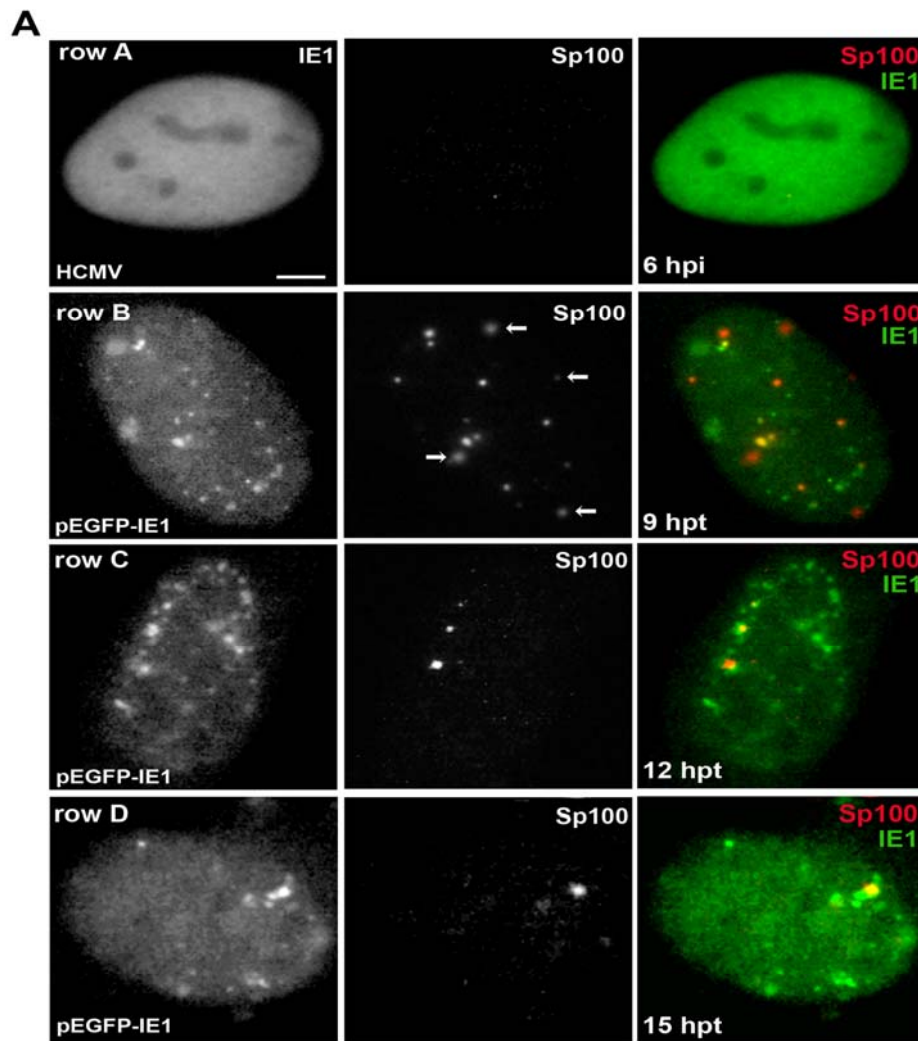
Εφόσον η εντόπιση της IE1 άλλαζε σε κάθε δεδομένη χρονική στιγμή, ανάλογα με τον τρόπο έκφρασής της, αναλύσαμε την σύνδεση των IE1 και ND10 με πειράματα χρονικής συνέχειας (time course). Η κατανομή της IE1 σε χώρο και ποσότητα σε σχέση με τα Sp100, ανιχνεύτηκε μετά από DNA διαμόλυνση του πλασμιδίου pEGFP-IE1, καθώς και μετά από CR401 μόλυνση

mChSp100 κυττάρων, σε υψηλό και χαμηλό m.o.i. Για κάθε χρονικό σημείο μετρήθηκαν περισσότερα από 100 κύτταρα και ακολούθησε ποσοτική σύγκριση για κάθε ομάδα κυττάρων που παρουσίαζαν διαφορετικά πρότυπα Sp100 χρώσης μεταξύ των IE1-θετικών κυττάρων (Εικόνα 5.1. Β).

Κατά την απουσία της έκφρασης ιικών γονιδίων, το 55% των διαμολυσμένων κυττάρων παρουσίασαν ένα διάσπικτο πρότυπο της IE1 με ταυτόχρονη διάσπαση των Sp100 στις 9 h.p.t., ενώ σχεδόν στο 40% των κυττάρων οι IE1 και Sp100 συνεντοπίζονταν δημιουργώντας διακριτές εστίες. Οι δυο παραπάνω ομάδες κυττάρων μειώθηκαν 3 ώρες αργότερα με ανάλογη αύξηση της διάχυτης IE1 κατανομής και της οριστικής απώλειας του Sp100 σήματος. Η τελευταία κυτταρική ομάδα επικράτησε των IE1 διάσπικτων κυττάρων 15 ώρες μετά τη διαμόλυνση. Ενδιαφέρον παρουσίασε το γεγονός ότι σε μερικά κύτταρα Sp100 εστίες παρέμειναν άθικτες μέχρι πολύ αργότερα.

Αντιθέτως, κατά τη διάρκεια μιας ενεργής μόλυνσης με τον CR401 ιό σε δυο διαφορετικά ιικά φορτία (m.o.i), παρατηρήθηκε το ίδιο πρότυπο κατανομής των δυο πρωτεϊνών αλλά σε σημαντικά μικρότερες χρονικές περιόδους (Εικόνα 5.1. Bii και Biii). Από τις 3 ώρες μετά τη μόλυνση, ένα ποσοστό των IE1 μορίων συνεντοπίζονταν επακριβώς με τα Sp100 για περισσότερο από 1 ώρα σε υψηλό m.o.i. και για λίγο περισσότερο σε χαμηλό m.o.i. Στις 4 ώρες μετά τη μόλυνση, τα Sp100 εξακολουθούσαν να είναι συνδεδεμένα με την IE1 σε πολλά κύτταρα ενώ περίπου 20% των κυττάρων εμφάνιζαν μόνο την IE1 διαχυμένη στον πυρήνα. Έτσι η IE1 συνδέεται αρχικά με τα ND10 και στη συνέχεια διαχέεται στον πυρήνα είτε ταυτόχρονα είτε λίγο μετά τη διάσπαση των ND10. Η Sp100 διαλύθηκε οριστικά σε σχεδόν όλα τα κύτταρα κατά τις 5-6 h.p.i.





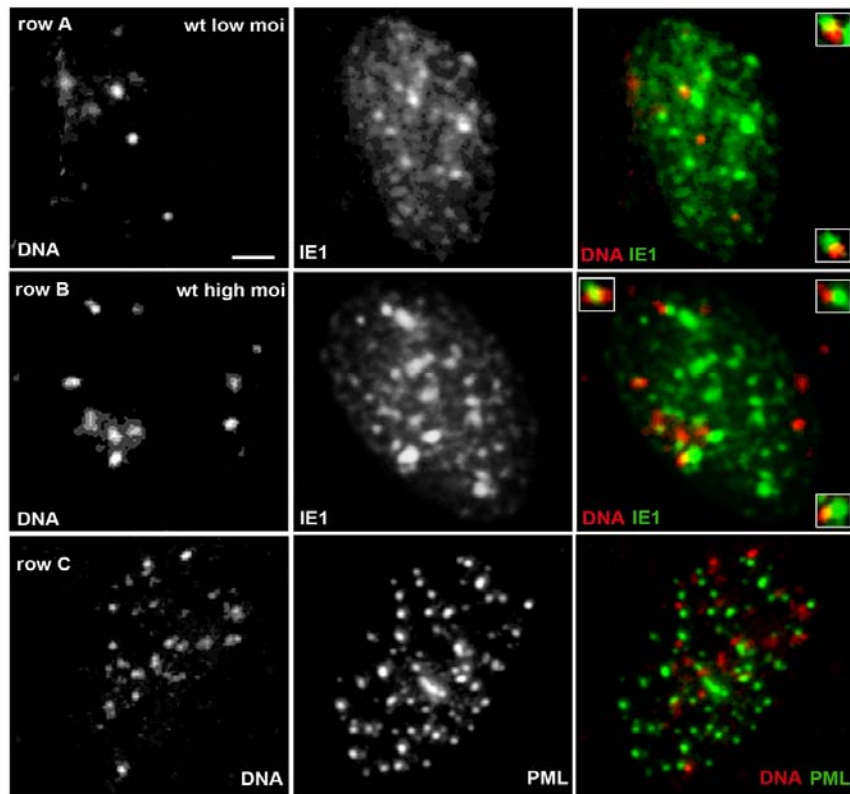
**Εικόνα 5.1.** Ενδοκυτταρική εντόπιση της IE1 πρωτεΐνης σε διαφορετικά χρονικά σημεία και σε σχέση με την, ND10 συστατική πρωτεΐνη, Sp100. (A) Τα Sp100 διασπάστηκαν πλήρως από την IE1 στη διάρκεια μιας ενεργής HCMV μόλυνσης (row A), ενώ αυτή η διάσπαση καθυστερούσε σημαντικά όταν η IE1 εκφραζόταν παροδικά με διαμόλυνση (rows B-D). Παρατηρήθηκε διαφορετική εξάλειψη των ND10 στις περιοχές όπου μερικές Sp100 δομές δεν μετατοπίστηκαν αλλά

παρέμειναν για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα (βλέπε βέλη). (bars, 10  $\mu$ m). (B) Γραφική αναπαράσταση των διαφορετικών ND10 προτύπων σε IE1-θετικά κύτταρα. Περισσότερα από 100 κύτταρα υπολογίστηκαν σε κάθε χρονικό σημείο για την Sp100 και την IE1. Τα mChSp100 κύτταρα είτε διαμολύνθηκαν με ένα φορέα έκφρασης της EGFP-IE1, είτε μολύνθηκαν με τον ανασυνδυασμένο CR401 σε υψηλό m.o.i (m.o.i=1) ή χαμηλό m.o.i (m.o.i=0.1). Κάθε κύτταρο προστέθηκε σε μια από τις τέσσερις κατηγορίες: μη μολυσμένα κύτταρα; αποκλειστική παρουσία IE1 εστιών; Διαχεόμενη κατανομή της IE1; ή ταυτόχρονη παρουσία των IE1 και Sp100. Τα δεδομένα που παρουσιάζονται προέρχονται από ένα μοναδικό πείραμα με >95% μολυσμένα κύτταρα στις 6 ώρες μετά τη μόλυνση (h.p.i).

## 6. Ενδοκυτταρική εντόπιση της IE1-72K πρωτεΐνης σε σχέση με τα HCMV γονιδιώματα

Οι DNA ιοί που αντιγράφονται μέσα στον πυρήνα των μολυσμένων κυττάρων παρουσιάζουν μια στενή αλληλεπίδραση με τα ND10 πυρηνικά σωματίδια σε διάφορα επίπεδα, αποθέτοντας και τα ιικά γονιδιώματα και τις ιικές πρωτεΐνες στα ND10 (Ching et al., 2005; Everett, 2001; Everett, 2006; Maul, 1998). Η χωρική οργάνωση των ND10, των HCMV γονιδιωμάτων και μεταγράφων καθώς και των κυτταρικών σωματίων ματίσματος έχει απεικονιστεί (Ishov and Maul, 1996; Ishov et al., 1997). Έχει επίσης περιγραφεί η ιδιότητα της HCMV IE2 πρωτεΐνης να συσσωρεύεται πάνω στα ιικά γονιδιώματα κατά τα πρώιμα στάδια της μόλυνσης (Chiou et al., 1993; Lang and Stamminger, 1993; Sourvinos et al., 2007).

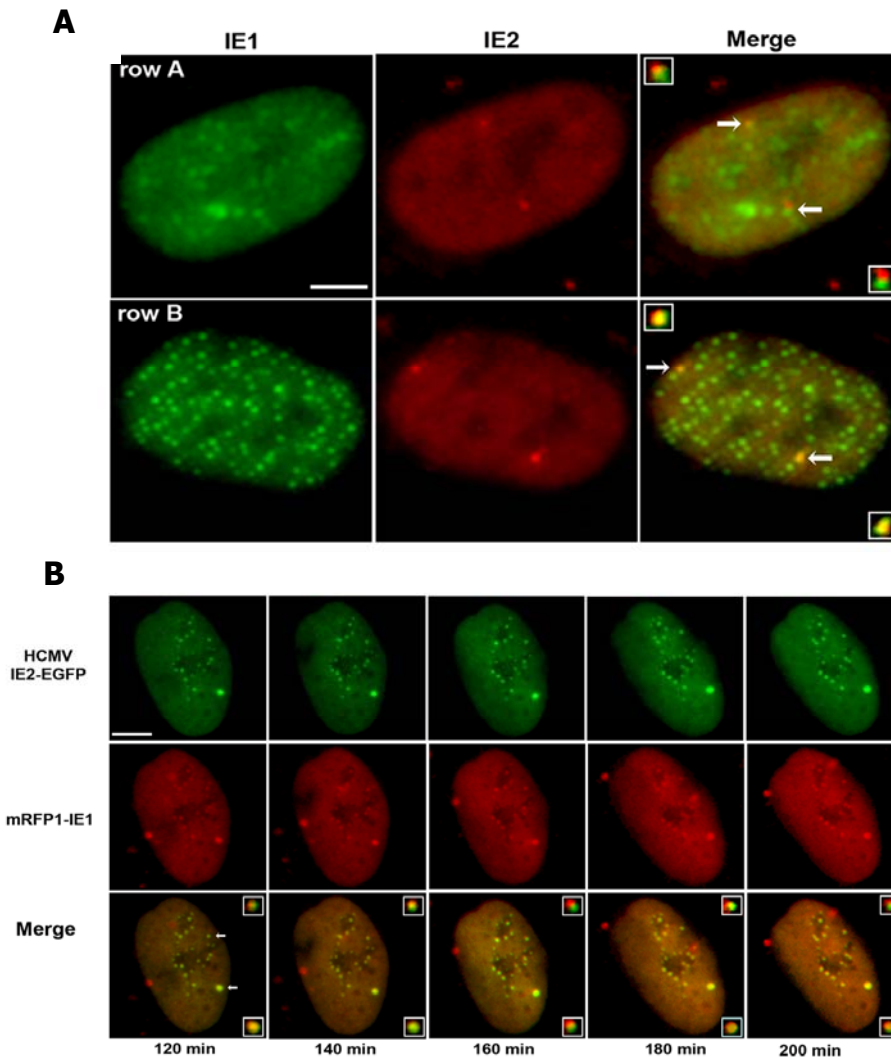
Συνδυασμένη χρήση της υβριδοποίησης φθορισμού *in situ* για να ανιχνευθεί το HCMV γενωμικό DNA, μαζί με χρώση ανοσοφθορισμού για την IE1 πρωτεΐνη, μας βοήθησε να εξακριβώσουμε την τοποθέτηση της IE1 σε σχέση με τα ιικά γονιδιώματα στο εσωτερικό των μολυσμένων κυττάρων. Φυσιολογικοί ινοβλάστες μολύνθηκαν με τον HCMV CR401 ιό με διαφορετικά ιικά φορτία και μονιμοποιήθηκαν 2.5 ώρες μετά τη μόλυνση, πριν την πιθανή διάχυση της IE1. Τη στιγμή της μόλυνσης, ένα μεγάλο ποσοστό του ιικού DNA βρισκόταν ακόμα στο κυτταρόπλασμα, παρόλο που μερικά γονιδιώματα είχαν ήδη μεταφερθεί στον πυρήνα. Άμεσα μετά τη μόλυνση, όλα τα σημασμένα HCMV CR401 ιικά DNA ήταν συνδεδεμένα με εστίες της IE1 πρωτεΐνης (Εικόνα 6.1, rows A & B), ανεξαρτήτως του ιικού φορτίου της μόλυνσης. Από την αρχή υπήρχαν ξεκάθαρα πολύ περισσότερες εστίες της IE1 πρωτεΐνης από ότι HCMV γονιδιώματα, αλλά η αναλογία μίκραινε με την αύξηση του ιικού φορτίου (m.o.i). Εξετάστηκε ένας μεγάλος αριθμός μολυσμένων κυττάρων, δείχνοντας ότι τα ιικά DNA και οι IE1 κουκίδες δεν συνεντοπίζονταν επακριβώς, αλλά ήταν γειτονικά τοποθετημένα και μερικώς επικαλυπτόμενα. Ένα παρόμοιο πρότυπο παρατηρήθηκε για τα μόρια του HCMV DNA και αυτά των PML (Εικόνα 6.1, row C).



**Εικόνα 6.1.** Διαφορική εντόπιση της IE1 με τα HCMV μητρικά γονιδιώματα, κατά την άμεσα πρώιμη φάση της μόλυνσης. *In situ* υβριδοποίηση του HCMV DNA, συνδυασμένη με ανοσοφθορισμό για την IE1, σε CR401-μολυσμένα HFFs κύτταρα, σε  $m.o.i=0.1$  (row A) είτε σε  $m.o.i=1$  (row B), έδειξε σύνδεση των δυο σημάτων στις 2.5h p.i., ανάλογη με τη σύνδεση που παρατηρείται μεταξύ του ιικού DNA και των ND10 (row C).

## **7. Διαφορική εντόπιση των IE1-72K και IE2-86K πρωτεϊνών σε ζωντανά μολυσμένα κύτταρα**

Οι IE1-72K και IE2-86K πρωτεΐνες λειτουργούν συνεργατικά ως οι κεντρικοί ρυθμιστές της μεταγραφής των ιικών γονιδίων και διαμορφώνοντας την έκφραση διαφόρων κυτταρικών γονιδίων. Αμέσως μετά την εισαγωγή του ιού στο κύτταρο η IE1-72K πρωτεΐνη συνεντοπίζεται με τα ND10, ενώ η IE2-86K μεταναστεύει στο γειτονικό περιβάλλον των ND10 και παρατηρείται δίπλα σε αυτά. Σε HCMV CR401-μολυσμένα κύτταρα, αυτή η γειτνίαση ήταν ξεκάθαρα εμφανής όταν η έκφραση της IE2-86K πρωτεΐνης ανιχνευόταν με ανοσοφθορισμό (Εικόνα 7.1. Α). Η σχέση των ND10 και IE2-86K είναι δυναμική (Sourvinos et al., 2007). Σε αυτή τη μελέτη έγινε προσπάθεια ταυτόχρονης απεικόνισης των IE1-72K και IE2-86K κατά τη διάρκεια μιας ενεργής μόλυνσης. Ανθρώπινοι ινοβλάστες, HFFs, διαμολύνθηκαν αρχικά με ένα πλασμίδιο που κωδικοποιούσε την mRFP1-IE1 και στη συνέχεια μολύνθηκαν με τον HCMV AD169/IE2-EGFP ιό (m.o.i=1). Τα κύτταρα άρχισαν να παρακολουθούνται στο μικροσκόπιο από τη στιγμή που ανιχνεύθηκε η IE2-86K (2h p.i.; Εικόνα 7.1 Β). Οι IE1 και IE2 εστίες στην πλειονότητά τους ήταν διακριτές και σε στενή σύνδεση. Ενδιαφέρον παρουσίασε το γεγονός ότι κατά την εξέλιξη της μόλυνσης, οι διακριτές κουκίδες των δύο πρωτεϊνών συνεχώς άλλαζαν τις σχετικές τους θέσεις. Λεπτομερής ανάλυση σε υψηλή μεγέθυνση έδειξε μια δυναμική αλληλεπίδραση, με τις IE1-72K και IE2-86K σε γειτονικές θέσεις για μεγάλα χρονικά διαστήματα ενώ μερικές από αυτές απότομα συνδέονταν σε ακριβή συνεντοπισμό για περιορισμένο χρόνο, ώστε να ακολουθήσει ξανά ο διαχωρισμός τους. Τα δεδομένα αυτά είναι σύμφωνα με την ιδιότητα της IE1-72K πρωτεΐνης να συνεντοπίζεται επακριβώς με τα ND10, καθώς τα IE2-86K μόρια δημιουργούν διακριτές εστίες, που αποτελούν ξεχωριστές δομές οι οποίες συχνά συνδέονται με τα ND10-IE1 συσσωματώματα στα αρχικά στάδια της HCMV μόλυνσης.



**Εικόνα 7.1.** (A) HFFs κύτταρα μολύνθηκαν με CR401 και ακολούθησε χρώση για IE2 κατά τις πρώτες ώρες της μόλυνσης. Όλες οι IE2 εστίες είτε συνδέθηκαν, είτε συνεντοπίστηκαν μερικώς με IE1 δομές. Η μόλυνση στην σειρά A τερματίστηκε λίγο αργότερα (4h p.i.) από ότι στη σειρά B (3h p.i.) και για το λόγο αυτό η IE1 εμφανίζεται ως διάστικτες εστίες σε συνδυασμό με μια διαχεόμενη χρώση. (B) *In vivo* δυναμικές της IE1 σε σχέση με αυτές της IE2 πρωτεΐνης. HFF κύτταρα διαμολυσμένα με το πλασμίδιο mRFP-IE1, υπερμολύνθηκαν στη συνέχεια με τον HCMV AD169/IE2-EGFP ίο με m.o.i=1 και παρακολούθηθηκαν μικροσκοπικά τις πρώτες ώρες της μόλυνσης. Παρουσιάζονται επιλεγμένες εικόνες, οι οποίες φανερώνουν ένα δυναμικό πρότυπο σύνδεσης όπου, σε διαστήματα λεπτών, οι IE1 και IE2 εστίες συνεχώς αλλάζουν τις σχετικές τους θέσεις, έτσι ώστε, είτε να συνεντοπίζονται πλήρως είτε να παρατηρούνται η μια δίπλα στην άλλη. Τα μικρότερα εικονίδια εμφανίζουν κυτταρικές περιοχές σε μεγαλύτερη ανάλυση (bars, 10 μm). Σε όλες τις περιπτώσεις, οι εικόνες που παρουσιάζονται είναι αντιπροσωπευτικές του πληθυσμού των κυττάρων που αναλύθηκαν στα πειράματα.

## **8. Μετατόπιση της IE1-72K πρωτεΐνης στη μεταφασική χρωματίνη σε ζωντανά κύτταρα**

Σε μονιμοποιημένα κύτταρα, η HCMV IE1-72K πρωτεΐνη μπορεί να ανιχνευθεί συνδεδεμένη στα μιτωτικά χρωμοσώματα είτε όταν αυτή έχει εκφραστεί μεμονωμένα, είτε μέσω μιας HCMV μόλυνσης (Ahn et al., 1998; Lafemina et al., 1989; Wilkinson et al., 1998). Όταν εξετάσθηκαν HCMV CR401-μολυσμένες καλλιέργειες κυττάρων, η IE1-EGFP σήμανε την συμπυκνωμένη χρωματίνη όλων των μολυσμένων κυττάρων που βρίσκονταν σε μίτωση (Εικόνα 8.1. Α) ενώ παρατηρήθηκε ότι συνεντοπιζόταν με την ιστόνη H2A (Εικόνα 8.1. Β), ξεκινώντας από τις 12 h.p.i. Παρόλα αυτά, όταν παρατηρήθηκαν μέσω μικροσκοπίας σε ζωντανά κύτταρα, τα τελευταία απέτυχαν να προσπεράσουν τη φάση της μετάφασης στην κυτταρική διαίρεση, εμποδίζοντας την μετάδοση του HCMV των μολυσμένων κυττάρων μέσω κυτταρικής διαίρεσης, με την συνεχή έκφραση των κύριων ιικών trans-ενεργοποιητικών πρωτεϊνών. Έτσι, ο αποκλεισμός αυτών των κυττάρων στη μίτωση τα καθιστά μη παραγωγικά, σε αντίθεση με τον MCMV (mouse) ιό, όπου παρά την παρουσία των πρωτεϊνών IE1/IE3-GFP, τα μολυσμένα κύτταρα μπορούν να οδηγηθούν σε πολλαπλούς κυτταρικούς κύκλους (Maul and Negorev, 2008). Μια επιπλέον ενδιαφέρουσα παρατήρηση, μέσω της μικροσκοπίας σε ζωντανά κύτταρα, ήταν ότι δεν κατάφεραν όλα τα μολυσμένα κύτταρα που εξέφραζαν την IE1-EGFP πρωτεΐνη να είναι παραγωγικά, όπως θα μαρτυρούσε μια πιθανή δημιουργία ενός δακτυλίου νέων μολυσμένων κυττάρων 72 ώρες αργότερα. Αντίθετα, κάποια από τα μολυσμένα ανθρώπινα κύτταρα μεγάλωσαν σε μέγεθος, κάποια συγχωνεύονταν και τελικά οδηγούνταν σε απόπτωση.

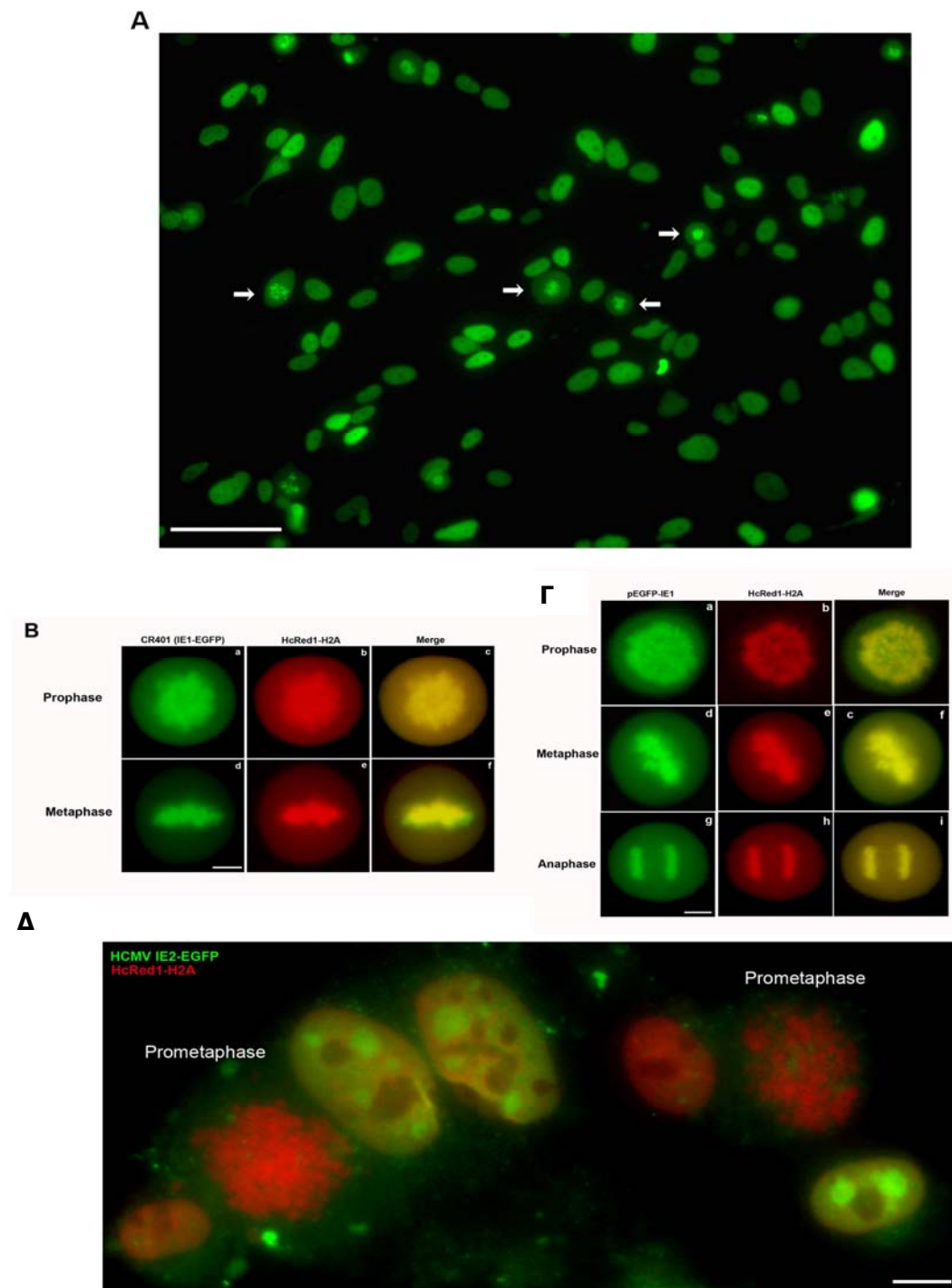
Καθώς ο HCMV διακόπτει την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, η σύνδεση της IE1-72K με τη μεταφασική χρωματίνη είναι ευκολότερο να αναλυθεί σε διαμολυσμένα κύτταρα (Nevels et al., 2004a; Reinhardt et al., 2005). Όταν η χρωματίνη ξεκίνησε να συμπυκνώνεται, στην πρόφαση, η H2A συνδέθηκε με τα συμπυκνωμένα χρωμοσώματα (Εικόνα 8.1. Γb, 8.2. Α) ενώ κατά την ίδια μιτωτική φάση, η IE1-72K άλλαξε την αρχική διαχεόμενη πυρηνική εντόπιση της σε ένα συμπυκνωμένο πρότυπο το οποίο ήταν πανομοιότυπο με αυτό της H2A

ιστόνης (Εικόνα 8.1. Γα, 8.2. Α). Ο έντονος φθορισμός των πρωτεϊνών IE1-72K και H2A συνδεδεμένων με χρωμοσώματα ήταν εμφανέστερος στη φάση της προμετάφασης και αργότερα στη μετάφαση (Εικόνα 8.1. Γ, d-f, 8.2. Α). Αξιοσημείωτη είναι η παρατήρηση ότι οι IE1-72K και H2A συνέχισαν να συνεντοπίζονται, συνδεδεμένες με τα μιτωτικά χρωμοσώματα, μέχρι τα τελικά στάδια της κυτταρικής διαίρεσης (Εικόνα 8.1. Γ, g-l, 8.2. Α). Η φθορίζουσα πρωτεΐνη EGFP από μόνη της δεν μπόρεσε να συνδεθεί με τη μεταφασική χρωματίνη.

Τα IE1 και IE2 μετάγραφα μοιράζονται τα εξόνια 1-3 (Εικόνα 1.1 Β), ενώ οι κωδικοποιημένες τους πρωτεΐνες μεταναστεύουν στα ND10 και παρουσιάζουν και οι δύο μια διάχυτη πυρηνική κατανομή κατά την εξέλιξη της μόλυνσης. Παρόλα αυτά, η IE2-GFP ξεκάθαρα δεν προσδένεται στην μεταφασική χρωματίνη (Εικόνα 8.1. Δ, 8.2. Β). Ακόμα και κατά τη διάρκεια της μεσόφασης, τα πρότυπα χρώσης της IE2-86K και της ιστόνης H2A ήταν διακριτά και διαφορετικά.

Τα παραπάνω πειράματα αποδεικνύουν ότι υπάρχει εμφανής διαφορά όσον αφορά στην εξέλιξη της μίτωσης, ανάλογα με τον τρόπο έκφρασης της IE1-72K. Παρόλο που τα IE1-διαμολυσμένα κύτταρα μπορούν εύκολα να παρατηρηθούν κατά τη διάρκεια της μίτωσης, δεν συμβαίνει το ίδιο σε HCMV-μολυσμένες κυτταρικές σειρές, όπου τα κύτταρα τείνουν να παραμένουν στη φάση της πρόφασης ή μετάφασης ενώ πολύ λίγα κύτταρα προχωρούν στην ανάφαση.

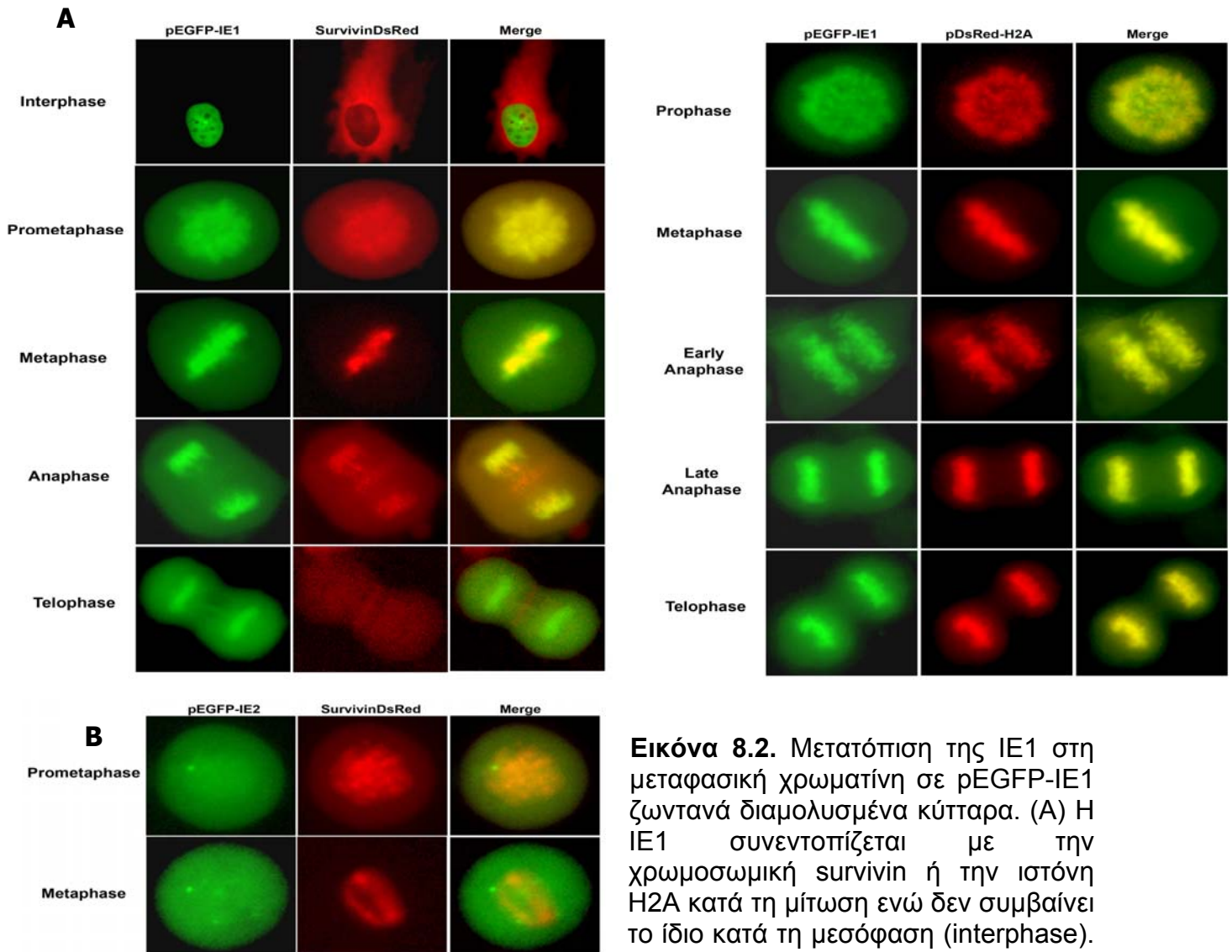




**Εικόνα 8.1.** Παρατήρηση της μετατόπισης της IE1 στη μεταφασική χρωματίνη σε ζωντανά CR401 μολυσμένα κύτταρα. (Α) Μη συγχρονισμένα HFF κύτταρα μολύνθηκαν με τον HCMV CR401 ιό με  $m.o.i=1$  και οι φωτογραφίες ελήφθησαν σε ζωντανά κύτταρα 72 hpi. Τα βέλη υποδεικνύουν την εντόπιση της IE1 στην χρωματίνη (bar, 10 $\mu$ m).

(Β) Η φθορίζουσα IE1-EGFP παρουσιάζει ένα πρότυπο πανομοιότυπο με αυτό της H2A στη φάση της μίτωσης, σε CR401-μολυσμένους ινοβλάστες που εξέφραζαν την HcRed1-H2A. (Γ) HeLa κύτταρα συν-διαμολύνθηκαν παροδικά με τα πλασμίδια pEGFP-IE1 και pHcRed1-H2A και παρακολούθηθηκαν μικροσκοπικά σε όλη τη διάρκεια της μίτωσης. Η μικροσκοπία σε ζωντανά

κύτταρα αποκάλυψε ότι η IE1 συνδεόταν εμφανώς με τη συμπυκνωμένη χρωματίνη σε διάφορες φάσεις της κυτταρικής διαίρεσης. (Δ) Εντόπιση της HCMV IE2 πρωτεΐνης κατά τη διάρκεια της μίτωσης. Φυσιολογικοί ινοβλάστες μολύνθηκαν με τον HCMV AD169/IE2-EGFP ιό και διαμολύνθηκαν με το ρHcRed1-H2A πλασμίδιο. Στα κύτταρα που εισέρχονταν στη μίτωση (2<sup>ο</sup> και 6<sup>ο</sup>, από αριστερά προς δεξιά), η IE2 πρωτεΐνη εμφανιζόταν κυρίως διάχυτη στο πυρηνόπλασμα και δεν συνδεόταν με τη μεταφασική χρωματίνη. Εμφανή είναι τα καλά σχηματισμένα ιικά σωμάτια αντιγραφής (3<sup>ο</sup>, 4<sup>ο</sup>, 7<sup>ο</sup> κύτταρο, από αριστερά προς δεξιά) όπως αυτά υποδεικνύονται από την συγκέντρωση της IE2.



**Εικόνα 8.2.** Μετατόπιση της IE1 στη μεταφασική χρωματίνη σε pEGFP-IE1 ζωντανά διαμολυσμένα κύτταρα. (A) Η IE1 συνεντοπίζεται με την χρωμοσωμική survivin ή την ιστόνη H2A κατά τη μίτωση ενώ δεν συμβαίνει το ίδιο κατά τη μεσόφαση (interphase). (B) Διαμόλυση της IE2 πρωτεΐνης

αντίθετα δεν οδηγεί στην μετατόπισή της στη μεταφασική χρωματίνη, αλλά παρουσιάζει ένα διαχεόμενο πρότυπο στον πυρήνα, σε σύγκριση με την κόκκινη φθορίζουσα χρωμοσωμική survivin πρωτεΐνη, η οποία χρησιμεύει σαν δείκτης.

## **9. Η IE1-72K πρωτεΐνη οδηγεί τις PML και Sp100, αλλά όχι την hDaxx στην μιτωτική χρωματίνη**

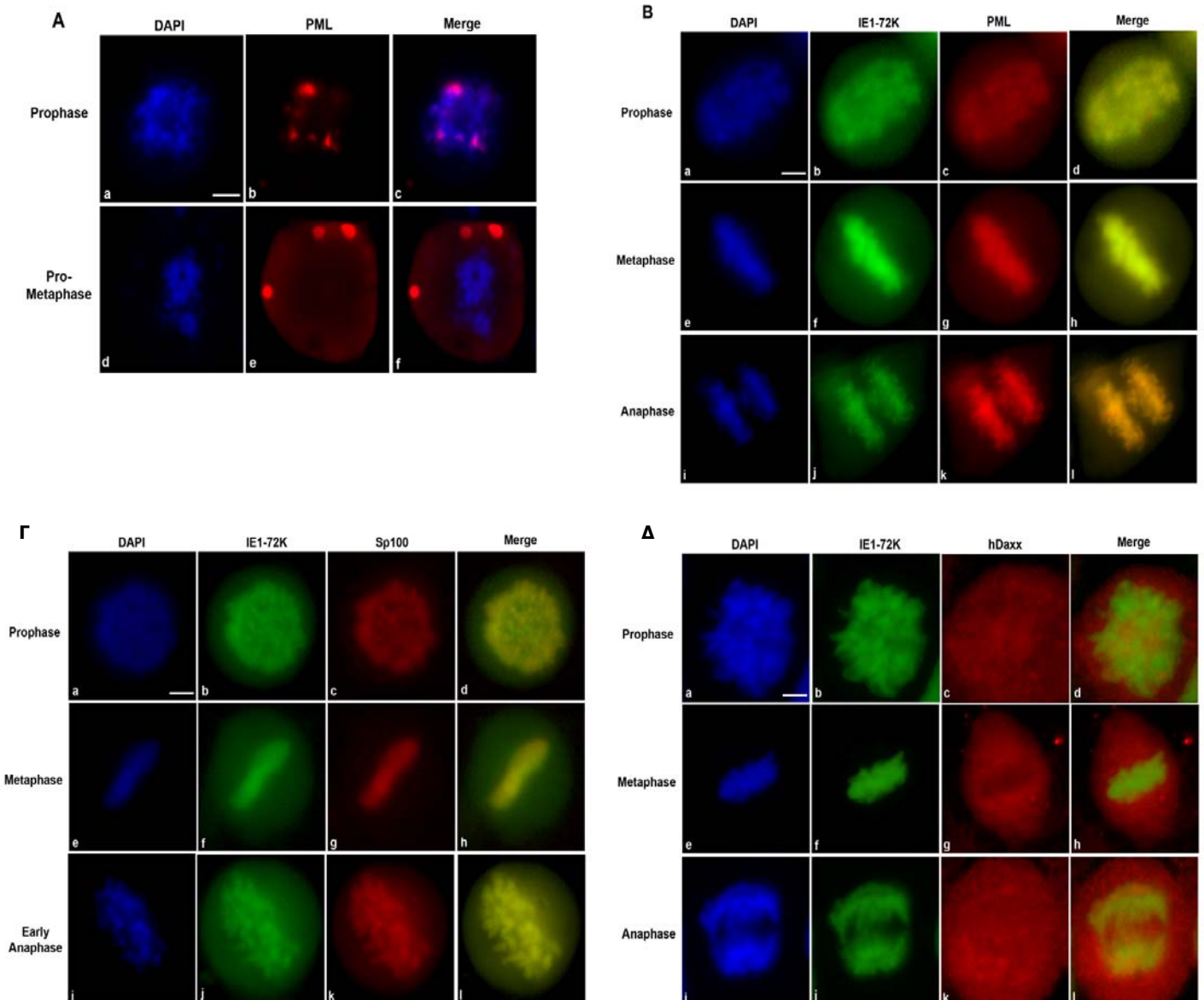
Αντικείμενο μελέτης αποτέλεσε στη συνέχεια η σύνδεση των ND10-συστατικών πρωτεϊνών με τη μεταφασική χρωματίνη σε ζωντανά κύτταρα και κατά τη διάρκεια μιας HCMV μόλυνσης. Σε κύτταρα στα οποία απουσίαζε η IE1-72K, οι ECFP-PML εστίες παρέμειναν κατά τη διάρκεια της μίτωσης στον πυρήνα, με τη μορφή ακανόνιστων συσσωματωμάτων που ξεχώριζαν από τις δομές τις συμπυκνωμένης χρωματίνης (Εικόνα 9.1. Α). Στη φάση της πρόφασης, ο αριθμός αυτών των εστιών ανά κύτταρο ήταν γενικά μικρότερος από τον αντίστοιχο των ND10 στη φάση της μεσόφασης, και μειώθηκε ακόμα περισσότερο στη φάση της προμετάφασης; οι PML δομές ίσως συγχωνεύονται είτε αποσυναρμολογούνται κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας. Κατά τη μετάφαση και την ανάφαση, φωτεινότερα ECFP-PML συσσωματώματα έτειναν να εντοπίζονται δίπλα στη μεταφασική χρωματίνη (Εικόνα 9.1. Α, d-f). Αυτές οι κατανομές των PML διατηρούνταν καθ' όλη τη διάρκεια της μίτωσης μέχρι και τα πρώτα στάδια της G1 φάσης.

Σε πειράματα παροδικής ταυτόχρονης έκφρασης, τα EGFP-IE1 και ECFP-PML συνδέθηκαν με τη μιτωτική χρωματίνη (Εικόνα 9.1. Β). Όταν τα κύτταρα προχωρούσαν στην πρόφαση, τα πρότυπα φθορισμού των EGFP-IE1 (Εικόνα 9.1. Β,a) και ECFP-PML ήταν πανομοιότυπα (Εικόνα 9.1. Β,b); το παραπάνω υποδηλώνει ότι ένα σημαντικό ποσοστό της EGFP-IE1 παρέμεινε συνδεδεμένο με τα χρωμοσώματα καθώς τα κύτταρα εισήλθαν στη μίτωση. Η σύνδεση της IE1-72K και των PML με τη χρωματίνη διήρκεσε καθ' όλη τη μίτωση (Εικόνα 9.1 Β, d-i); η έκφραση της IE1-72K από μόνη της φαίνεται να είναι επαρκής για να προκαλέσει την PML σύνδεση με τη μιτωτική χρωματίνη.

Η Sp100 πρωτεΐνη επίσης βρέθηκε να συνδέεται με τη χρωματίνη, όταν εκφραζόταν σε συνδυασμό με την EGFP-IE1 μέσω DNA διαμόλυνσης. Και οι δύο πρωτεΐνες οδηγούνταν στα συμπυκνωμένα χρωμοσώματα κατά την πρόφαση και παρέμεναν συνδεδεμένες καθ' όλη τη διάρκεια της μίτωσης (Εικόνα 9.1. Γ). Αντίθετα με τα παραπάνω, η mCherry-hDaxx πρωτεΐνη εντοπιζόταν εκτός της περιοχής που καταλάμβαναν τα μιτωτικά χρωμοσώματα

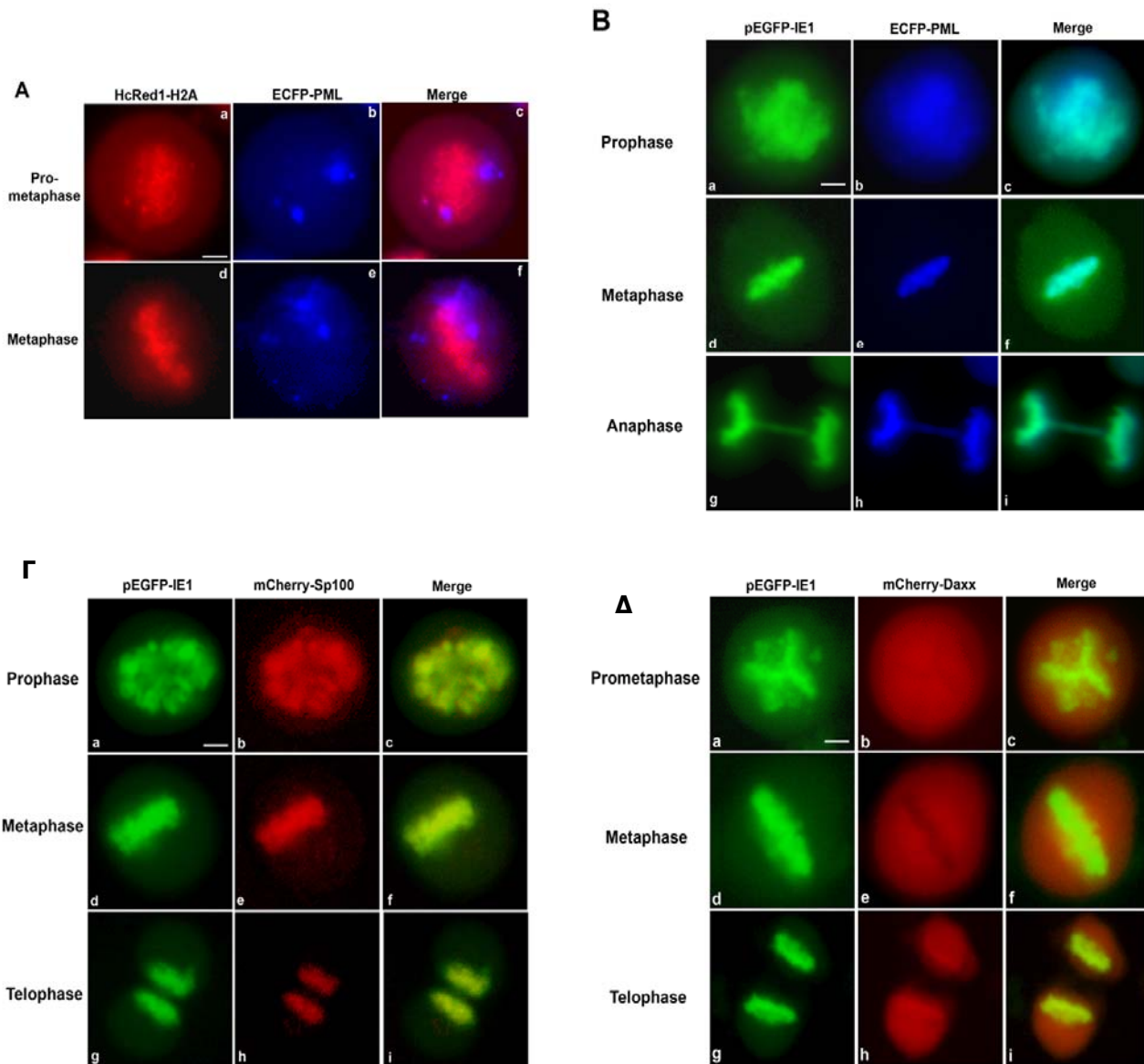
(Εικόνα 9.1. Δ, d-f). Ομοίως, διαχεόμενη κατανομή της hDaxx παρατηρήθηκε ακόμα και με ταυτόχρονη υπερέκφραση της ECFP-PML.

Τα αποτελέσματα αυτά αποτελούν ένδειξη ότι η IE1 πρωτεΐνη ίσως δρα κατασταλτικά στην δεδομένη σύνδεση μεταξύ PML και hDaxx, έτσι ώστε κατά τη διάρκεια της μίτωσης η hDaxx δεν καταφέρνει να αλληλεπιδράσει με τα PML ή τη χρωματίνη.



**Εικόνα 9.1.** Η IE1 οδηγεί τις PML και Sp100 αλλά όχι την hDaxx πάνω στη μίτωτική χρωματίνη κατά τη διάρκεια της μίτωσης σε HCMV μολυσμένα κύτταρα. Τα HFF κύτταρα είτε δεν μολύνθηκαν (A) είτε μολύνθηκαν με τον wild-type AD169 (B-Δ) και μονιμοποιήθηκαν στις 72h p.i. Ακολούθησε ανοσοφθορισμός για τις IE1-72K, PML, Sp100 και Daxx, και επώαση με ένα mouse-specific Alexa Fluor 488 ή ένα rabbit-specific Cy3 δεύτερο αντίσωμα, και

με DAPI. (A) Τα PML δημιουργούν ακανόνιστα συσσωματώματα στα μιτωτικά HeLa κύτταρα που δεν είχαν μολυνθεί. (B) Η ταυτόχρονη έκφραση της IE1 πρωτεΐνης αλλάζει δραστικά την εντόπιση των PML κατά τη μίτωση, τα οποία συνδέονται πλέον με τη συμπυκνωμένη χρωματίνη. (Γ). Τα Sp100 μεταφέρονται στη μεταφασική χρωματίνη όταν εκφράζεται παράλληλα η IE1. (Δ). Η hDaxx παραμένει διαχεόμενη κατά τη μίτωση παρόλη την παρουσία της IE1. Χαρακτηριστικό είναι το πρότυπο της hDaxx, ειδικά κατά την μετάφαση (g), που την αποκλείει από το χώρο που καταλαμβάνουν τα συμπυκνωμένα χρωμοσώματα (bars, 10  $\mu$ m).



**Εικόνα 9.2.** Η IE1 οδηγεί τις PML και Sp100 αλλά όχι την hDaxx στη συμπυκνωμένη χρωματίνη κατά τη διάρκεια της μίτωσης. HeLa κύτταρα συνδιαμολύνθηκαν με ένα συνδυασμό φθορίζοντων πλασμιδίων που εξέφραζαν EGFP-IE1, ECFP-PML, mCherrySp100 ή mCherryhDaxx, και ελήφθησαν φωτογραφίες με τη χρήση μικροσκοπίας σε ζωντανά κύτταρα.

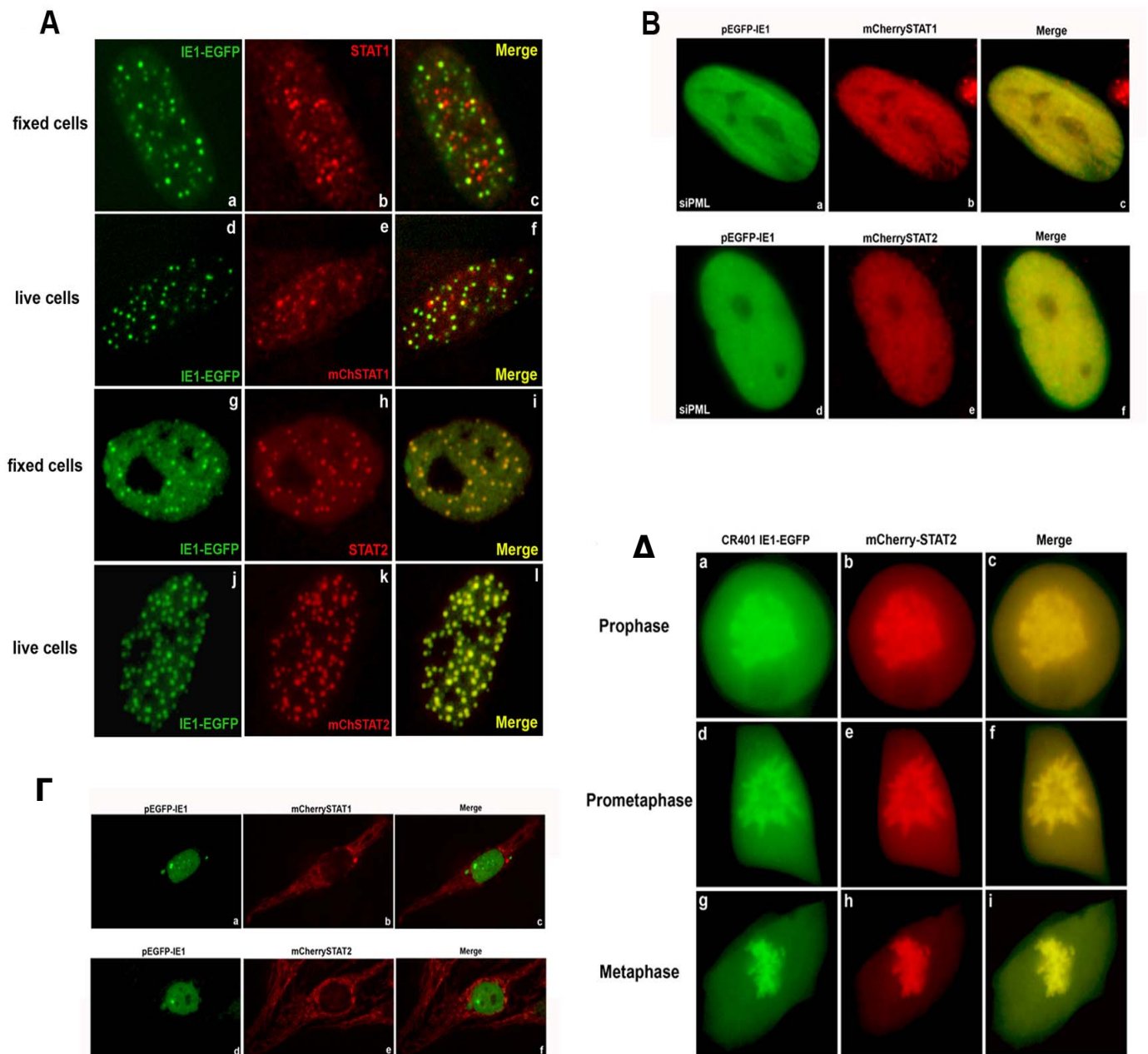
## 10. Εντόπιση των πρωτεϊνών IE1-72K, STAT1 και STAT2 κατά τη διάρκεια HCMV μόλυνσης

Η IE1-72K πρωτεΐνη αναστέλλει την επαγωγή της ιντερφερόνης τύπου 1 σχηματίζοντας ένα φυσικό σύμπλοκο με τις STAT1 και STAT2 πρωτεΐνες του κυττάρου; ακόμα έχειδειχθεί μέσω ανοσοφθορισμού ότι η STAT-2 συνδέεται με τη μιτωτική χρωματίνη σε μια κυτταρική σειρά η οποία εξέφραζε την IE1 (Paulus et al., 2006). Σε αυτή τη μελέτη ερευνήθηκε η χωρική οργάνωση των STAT1 και STAT2 πρωτεϊνών κατά τη διάρκεια μιας παραγωγικής μόλυνσης από τον HCMV CR401 ιό. Άμεσα μετά τη μόλυνση, και οι δύο πρωτεΐνες μετατοπίστηκαν στον πυρήνα. Καθώς η STAT1 μεταναστεύει σε εστίες στον πυρήνα, μόνο μια μικρή ποσότητα της πρωτεΐνης συνεντοπίζεται με την IE1-72K (Εικόνα 10.1. A, a-c). Αντίθετα, η συνεντόπιση της STAT2 με εστίες της IE1-72K ήταν ολοκληρωτική (Εικόνα 10.1. A, g-i). Ανάλογα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν σε μονιμοποιημένα παρασκευάσματα καθώς και σε ζωντανά κύτταρα με μικροσκοπία (Εικόνα 10.1. A, d-f, j-i).

Ο ρόλος της IE1-72K αναλύθηκε περαιτέρω σε ανθρώπινους ινοβλάστες, τα PML-kd κύτταρα, με τη σταθερή παρουσία ενός siRNA που προκαλούσε σίγηση των PML (Tavalai et al., 2006). Σε PML-kd κύτταρα, μολυσμένα με τον CR401 ιό, η IE1-72K καθώς και οι STAT1 ή STAT2 πρωτεΐνες εμφανίζονταν σε πυρηνικές διάχυτες δομές (Εικόνα 10.1. B), υποδηλώνοντας αναγκαία την παρουσία των PML για την εστιακή κατανομή των παραπάνω πρωτεϊνών κατά τα πρώτα στάδια της μόλυνσης. Η ιική μόλυνση ή η επαγωγή ιντερφερόνης ήταν ικανή να μετατοπίσει τις STAT-1 και STAT-2 από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα; η έκφραση της EGFP-IE1, μεμονωμένα, δεν ήταν αρκετή. Σε πειράματα παροδικής έκφρασης, η EGFP-IE1 πρωτεΐνη εντοπίστηκε στον πυρήνα ενώ οι mCherrySTAT1 και mCherrySTAT2 παρέμεινε κυτταροπλασματική (Εικόνα 10.1 Γ).

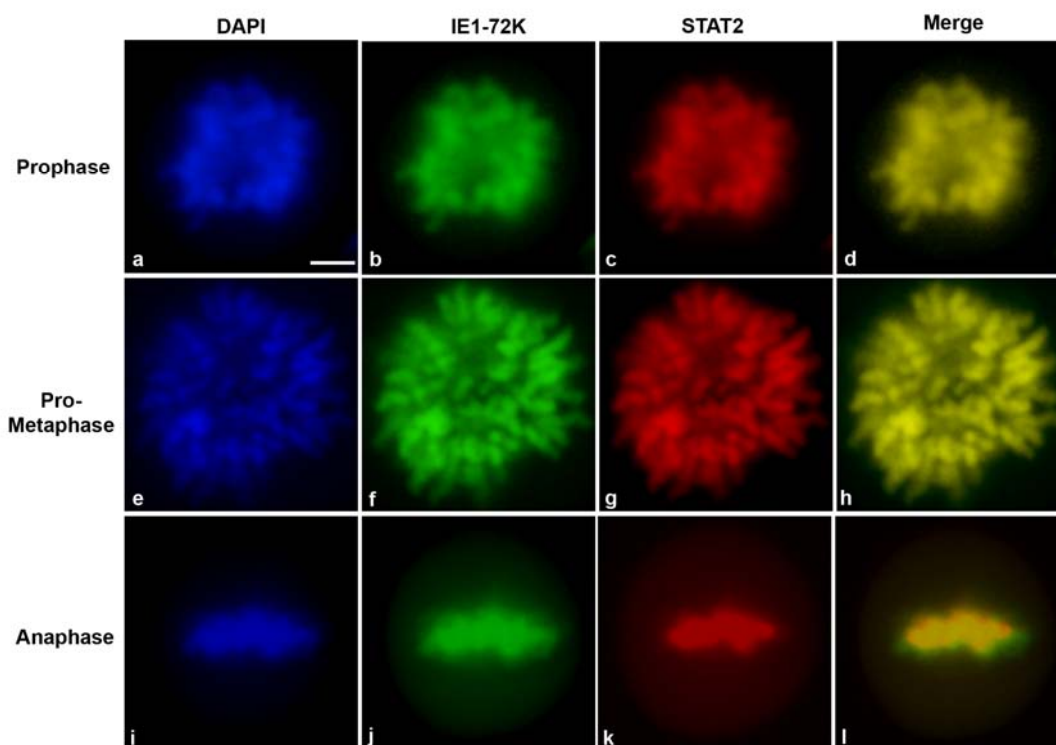
Η STAT2 συνδέεται με τη συμπυκνωμένη χρωματίνη σε μονιμοποιημένα κύτταρα τα οποία σταθερά εξέφραζαν την IE1-72K και είχαν επωαστεί με ιντερφερόνη (Paulus et al., 2006). Ακολουθώντας το σήμα της mCherry-STAT2 σε ζωντανά κύτταρα μετά την μόλυνση με HCMV CR401 ιό, διαπιστώσαμε ότι οι IE1-EGFP και mCherry-STAT2 συνεντοπίζονταν με τα ND10. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι στο μικρό ποσοστό των κυττάρων που περνούσαν στη

μίτωση, οι IE1-72K και STAT2 μετατοπίζονταν στα συμπυκνωμένα χρωμοσώματα (Εικόνα 10.1. Δ). Η στόχευση των IE1-72K και STAT2 στα μεταφασικά χρωμοσώματα ήταν εμφανής από τα πρώτα στάδια της μίτωσης και μέχρι τη μετάφαση (Εικόνα 10.1. Δ). Αντίθετα, η STAT1 απείχε από την μιτωτική χρωματίνη ακόμα και παρουσία της IE1-72K. Οι παρατηρήσεις αυτές προτείνουν μια θεωρία όπου η HCMV μόλυνση επάγει την ενεργοποίηση της STAT-2, ενώ η ακόλουθη μεταφορά της STAT-2 στον πυρήνα προκαλείται από την IE1-72K.



**Εικόνα 10.1.** Εντόπιση των IE1, STAT1 και STAT2 κατά την HCMV μόλυνση. (Α) HFF κύτταρα μολύνθηκαν με τον CR401 ιό με m.o.i=1, και ακολούθησε

χρώση ανοσοφθορισμού για τις STAT1 (a-c) και STAT2 (g-i) στις 2-3h p.i. Εικόνες από ζωντανά κύτταρα επίσης ελήφθησαν μετά από διαμόλυνση HFF κυττάρων με τα πλασμίδια mCherrySTAT1 (d-f) και mCherrySTAT2 (j-i), και ακόλουθη υπερμόλυνση με τον CR401 με m.o.i=1 για 2.5h p.i. (B) Διάχυτη εντόπιση των IE1 και STAT1 (a-c) ή STAT2 (d-f) σε παροδικά διαμολυσμένα PML-kd κύτταρα. (Γ) Οι STAT1/2 πρωτεΐνες εντοπίζονται σε ξεχωριστά κυτταρικά διαμερίσματα απουσία ιικής μόλυνσης. HeLa κύτταρα συν-διαμολύνθηκαν με τα πλασμίδια pEGFP-IE1 και mCherrySTAT1 (a-c) ή mCherrySTAT2 (d-f). (Δ) Εικόνες από ζωντανά μιτωτικά, CR401 μολυσμένα, HFF κύτταρα, τα οποία εξέφραζαν mCherrySTAT2, δείχνουν τη μεταφορά των IE1 και STAT2 πάνω στα συμπυκνωμένα χρωμοσώματα σε διαφορετικά στάδια της κυτταρικής διαίρεσης (a-i).



**Εικόνα 10.2.** Εντόπιση των IE1-72K και STAT2 κατά τη διάρκεια μιας HCMV μόλυνσης σε μονιμοποιημένα μιτωτικά κύτταρα. Τα HFFs μολύνθηκαν με τον αγρίου τύπου AD169 HCMV σε m.o.i=1 και ακολούθησε ανοσοφθορισμός για τις IE1-72K και STAT2 και επώαση με mouse-specific Alexa Fluor 488 ή rabbit-specific Cy3-δεύτερο αντίσωμα και DAPI. Τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν στις 72h p.i. Αντιπροσωπευτικές χρώσεις μιτωτικών κυττάρων δείχνουν την σύνδεση των IE1-72K και STAT2 σε διαφορετικά στάδια της κυτταρικής διαίρεσης (a-l), (bars, 10  $\mu$ m).



## **11. Παρατήρηση της εξέλιξης της μίτωσης σε HCMV μολυσμένα κύτταρα.**

Καθώς ο ανθρώπινος κυτταρομεγαλοϊός θεωρείται ότι μπλοκάρει τον κυτταρικό κύκλο ζωής, αυτό φαίνεται να συμβαίνει σε συνθήκες που πλησιάζουν την όψιμη G1/S φάση. Παρ' όλα αυτά, μιτωτικά κύτταρα ήταν εύκολα ανιχνεύσιμα από την IE1-EGFP χρώση της χρωματίνης σε ένα πολύ μικρό πληθυσμό HCMV CR401-μολυσμένων κυττάρων (βλέπε Εικόνα 8.2. Α). Η παρατήρηση αυτή είναι συνεπής με ανάλογα δεδομένα από αναλύσεις FACS, που δείχνουν ότι ένας πολύ μικρός πληθυσμός από τα κύτταρα που έχουν μολυνθεί και καθώς αυτά αντιγράφουν ενεργά το γονιδίωμά τους, είναι ικανά να εκφράζουν τις άμεσα πρώιμες IE πρωτεΐνες κατά την G2/M φάση του κυτταρικού κύκλου.

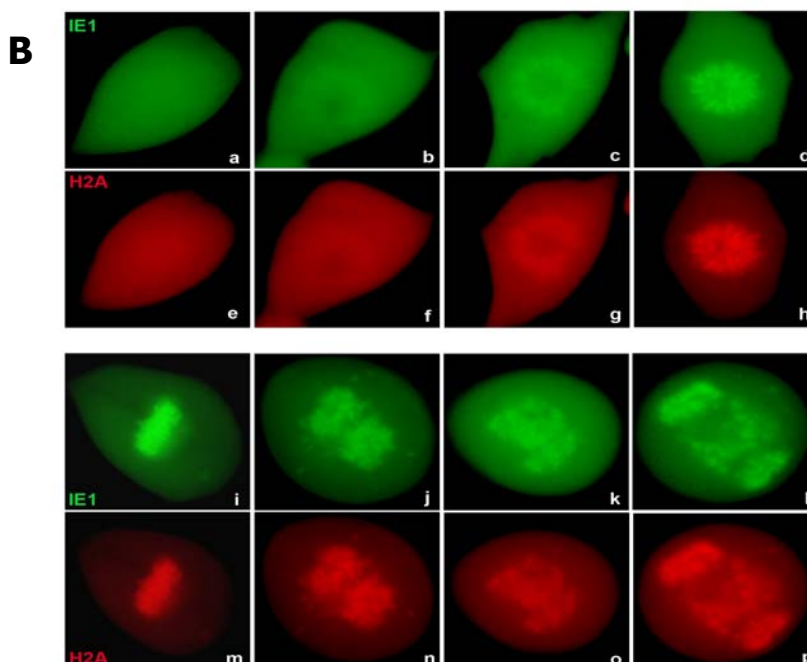
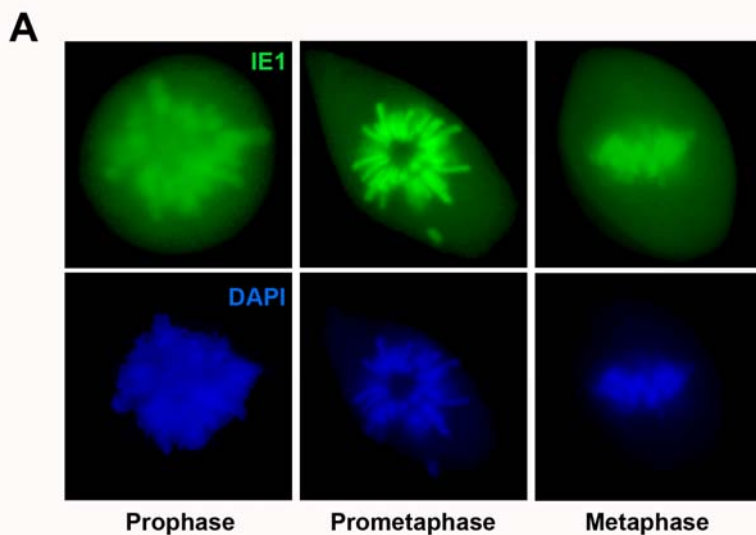
Με στόχο να ελέγξουμε το επίπεδο της εξέλιξης της μίτωσης των HCMV μολυσμένων κυττάρων, φυσιολογικοί ινοβλάστες μολύνθηκαν με τον CR401 ιό και παράλληλα διαμολύνθηκαν με ένα πλασμίδιο που εξέφραζε την ιστόνη H2A συνδεδεμένη με την DsRed φθορίζουσα. Τα μολυσμένα κύτταρα μπορούσαν να ξεκινήσουν την διαίρεσή τους, προχωρώντας στην Πρόφαση και την Προμετάφαση με αρκετή ευκολία όμως τα περισσότερα κύτταρα σταματούσαν στη Μετάφαση. Μια μειοψηφία αυτών των κυττάρων προχώρησαν στην Ανάφαση αλλά φαίνεται πως ο ιός προκαλεί κάποιες ανωμαλίες στον διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων και έτσι ούτε ένα κύτταρο εντοπίστηκε στην Τελόφαση (Εικόνα 11.1 Γ, Δ). Τα συμπυκνωμένα χρωμοσώματα κατανέμονταν με το φυσιολογικό τρόπο κατά την πρόφαση ή τη μετάφαση, ενώ στη φάση της ανάφασης η κατανομή τους ήταν τυχαία, δημιουργώντας ορισμένες φορές ομάδες και συσσωματώματα.

Παρακολουθώντας ένα συγκεκριμένο CR401 μολυσμένο κύτταρο να μπαίνει στη μίτωση, στα πολύ πρώιμα στάδια, μπορούσαμε να δούμε ότι προχωρούσε στα στάδια της μίτωσης με φυσιολογικό τρόπο αλλά με μεγάλη καθυστέρηση. Παρόλα αυτά, μετά τη Μετάφαση, τα χρωμοσώματα άρχισαν να συμπεριφέρονται παράξενα, καθώς δεν μετακινούνταν στους πόλους με τον φυσιολογικό τρόπο και εντοπίζονταν σε τυχαίες θέσεις στον πυρήνα. Το συγκεκριμένο κύτταρο δεν προχώρησε σε επόμενο στάδιο (Εικόνα 11.1 Β).

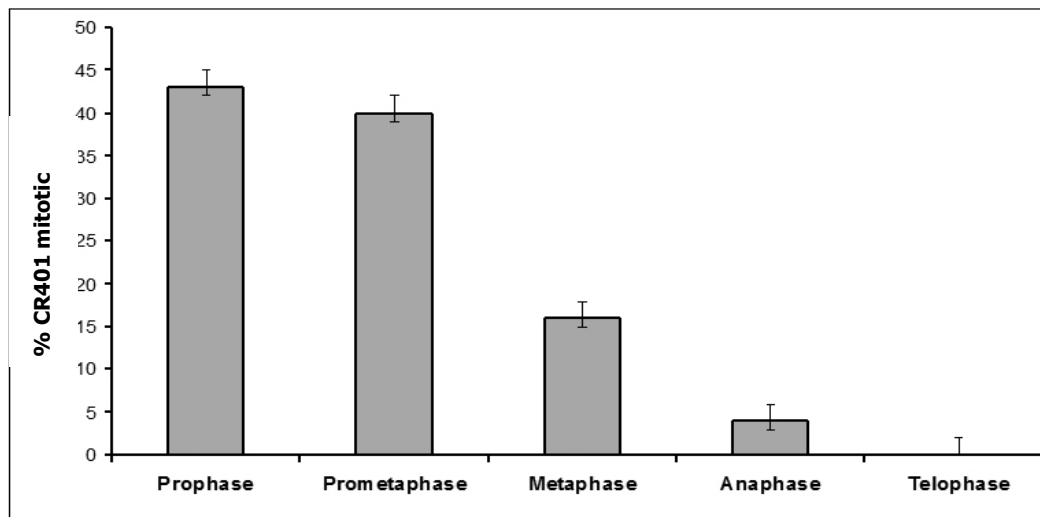
Η μικροσκοπία σε ζωντανά κύτταρα αποκάλυψε ότι ο HCMV πιθανώς προκαλεί μια διάσπαση της μιτωτικής ατράκτου, οδηγώντας σε αδυναμία διαχωρισμού των συμπυκνωμένων χρωμοσωμάτων και τελικά στην διακοπή της κυτταρικής διαίρεσης. Η πρόσδεση της IE1-72K στη συμπυκνωμένη χρωματίνη ήταν άμεσα διακριτή σε προσωρινά διαμολυσμένα κύτταρα, όπου η έκφραση της IE είναι πλήρως συμβατή με την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου (βλέπε Εικόνα 8.3. A, 11.1 A). Έτσι, καθώς κατά τη HCMV ενεργή μόλυνση, τα κύτταρα απέτυχαν να βγουν από τη μετάφαση και να προχωρήσουν σε κυτταρική διαίρεση, ένα γονίδιο του ανθρώπινου κυτταρομεγαλοϊού, εκτός της IE1-72K, φαίνεται να έχει την ιδιότητα μπλοκάρει την κυτταρική μίτωση.

**Εικόνα 11.1.** (A) Η IE1 πρωτεΐνη, όταν αυτή εκφράζεται σε διαμολυσμένα κύτταρα, συνδέεται με τα μιτωτικά χρωμοσώματα σε όλα τα διαφορετικά στάδια της μίτωσης.

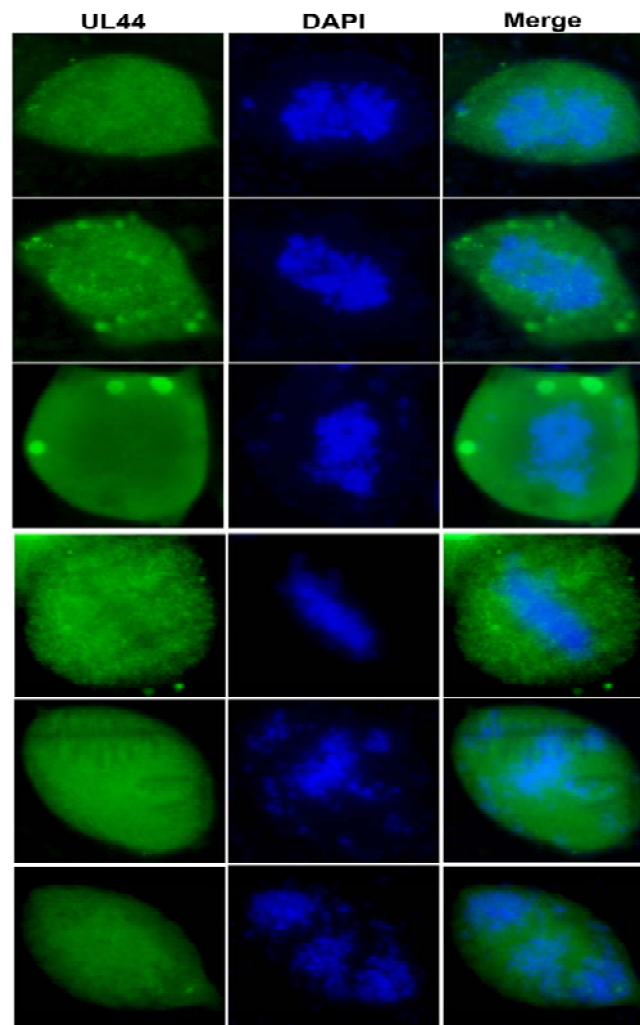
(B) Ένα μεμονωμένο CR401 μολυσμένο κύτταρο που εισέρχεται στη μίτωση, από τα πολύ πρώιμα στάδια. Μετά τη Μετάφαση, τα χρωμοσώματα συμπεριφέρονται παράξενα, καθώς δεν μετακινούνται στους πόλους με τον φυσιολογικό τρόπο και εντοπίζονταν σε τυχαίες θέσεις στον πυρήνα (j-l).



Γ



Δ



(Γ) Υπολογίζοντας σε ποσοστά, τα μολυσμένα μιτωτικά κύτταρα προχωρούσαν με ευκολία στην πρόφαση (45%) και προμετάφαση (40%), ένα 20% έφτανε στην μετάφαση, ενώ κανένα κύτταρο δεν εντοπίστηκε να έχει φτάσει στην φάση της τελόφασης.

(Δ) HCMV πρωτεΐνες διαφορετικές της IE1, ίσως οδηγούν σε σοβαρές ανωμαλίες στον διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων, πιθανώς καταστρέφοντας τη μιτωτική άτρακτο.

---

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### ΜΕΡΟΣ Β΄

***Ρύθμιση της έκφρασης των NKG2D προσδετών από τις άμεσα πρώιμες πρωτεΐνες των ερπητοϊών.***

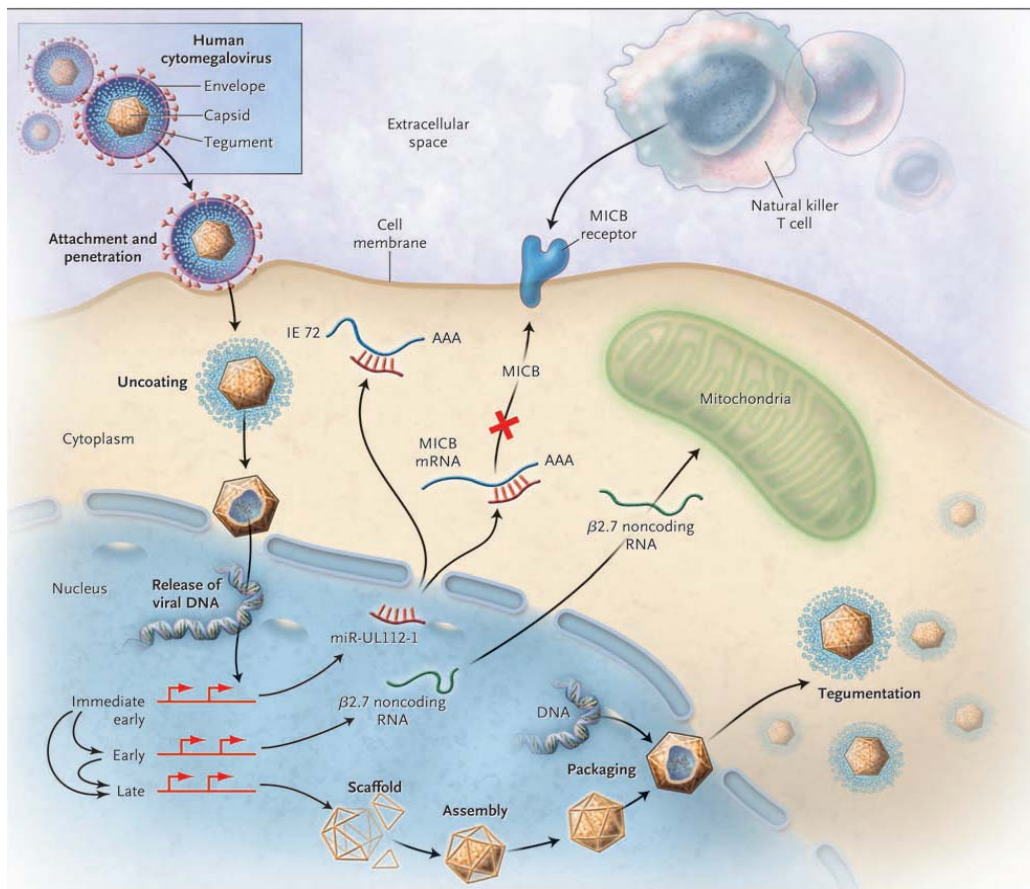
***Department of Medical Microbiology, Cardiff University, Cardiff, CF14 4XX, UK.***

Ο NKG2D (Natural killer group 2, member D) είναι ένας ισχυρός υποδοχέας ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού και είχε αρχικά χαρακτηριστεί ως ένας NK κυτταρικός υποδοχέας. Σήμερα είναι γνωστό ότι εκφράζεται σε έναν αριθμό κυτάρων τελεστών του ανοσοποιητικού όπως τα αβ και γδ Τ κύτταρα, όπου παίζει κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση των απαντήσεων της φυσικής και της ειδικής ανοσίας. Διέγερση του NKG2D υποδοχέα είναι αρκετή από μόνη της να προωθήσει την NK κυτταρική επίθεση, ενώ το γεγονός που καθιστά την αναγνώριση του NKG2D αξιοσημείωτη είναι η ποικιλία των προσδετών του. Οι πρώτοι πρωτεϊνικοί προσδέτες για τον ανθρώπινο NKG2D που αναγνωρίστηκαν ήταν τα MHC τάξης I – συνδεόμενα μόρια MICA και MICB, ενώ προσφάτως μια οικογένεια πέντε πρωτεϊνών, τα ULBP και RAET μόρια, έχουν αναγνωριστεί επίσης ως προσδέτες. Η έκφραση αυτών των προσδετών βρίσκεται υπό καταστολή σε κανονικές συνθήκες αλλά ενεργοποιείται ως απάντηση στο κυτταρικό στρες, στις ιικές μολύνσεις, στο θερμικό σοκ, στην κυτταρική εξαλλαγή και σε βλάβες του DNA.

Η μόλυνση των κυτάρων από έναν αριθμό διαφορετικών ιών, λειτουργεί ως συναγερμός για το ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού ξενιστή. Στον αγώνα αυτό ιοί συμπεριλαμβανομένων των HCMV, MCMV, Influenza A, EBV αναπτύσσουν διαφορετικούς μηχανισμούς για να αναστείλουν την έκφραση των NKG2D προσδετών στην επιφάνεια των μολυσμένων κυτάρων και να καταφέρουν να διαφύγουν της άνοσου απάντησης.

Στα πλαίσια της HCMV μόλυνσης, τουλάχιστον 4 διαφορετικές λειτουργίες ενεργοποιούνται, ώστε να ρυθμιστεί και να εμποδιστεί η έκφραση των NKG2D προσδετών, διατηρώντας τους ενδοκυτταρικά. Έτσι, οι πρωτεΐνες

UL16, UL142, miR-UL112 και US11, φαίνεται να στοχεύουν τους διαφορετικούς προσδέτες, να προσδένονται σε αυτούς και να αναστέλλουν την μεταφορά τους στην κυτταρική επιφάνεια (Wilkinson et al., 2008). Οι άμεσα πρώιμες πρωτεΐνες IE1 και IE2, από την άλλη μεριά, φαίνεται να διαδραματίζουν έναν σημαντικό ρόλο, καθώς έχει δειχθεί ότι και οι δυο, με διαφορετικό τρόπο, ρυθμίζουν θετικά την έκφραση των ULBP2 και MICA/B προσδετών, αντίστοιχα (Routes et al., 2005; Tomasec et al., 2007; Venkataraman et al., 2007). Η έκφραση οποιασδήποτε από τις δυο αυτές HCMV πρωτεΐνες σε κύτταρα στόχους, ήταν ικανή να προωθήσει την ενεργοποίηση των NK κυττάρων (Εικόνα Β1).

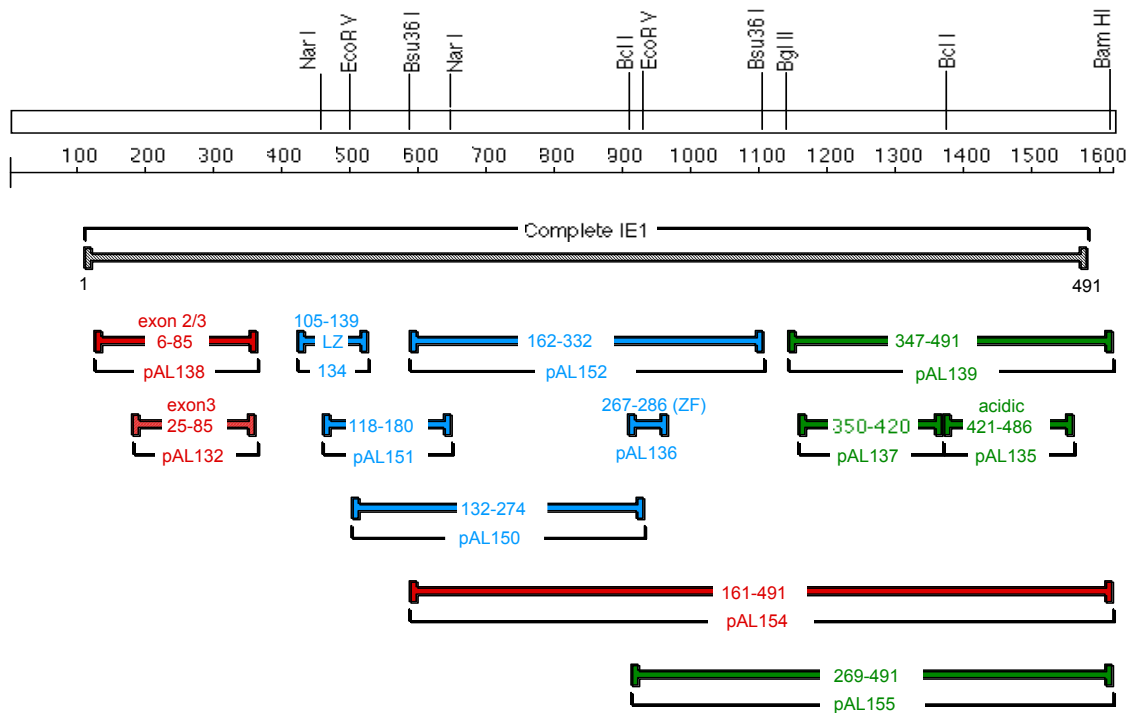


Εικόνα Β1

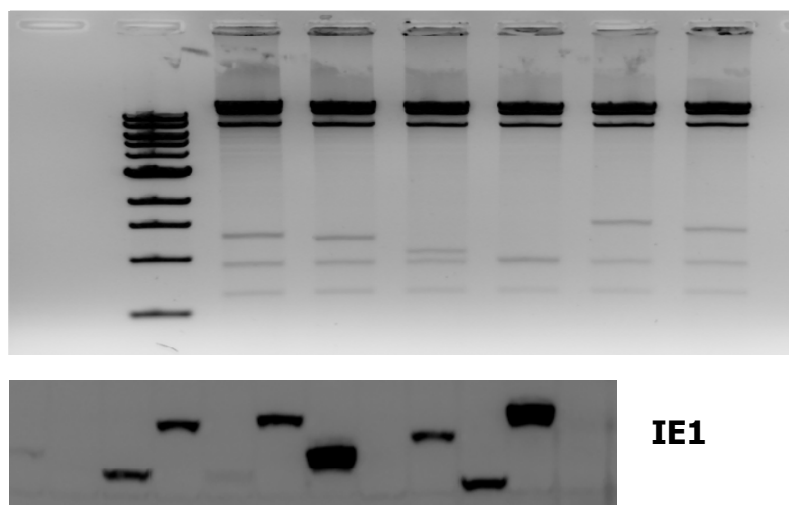
Έχοντας ως στόχο να μελετήσουμε τον μοριακό μηχανισμό που είναι υπεύθυνος για την προώθηση της άνοσου απάντησης των NKG2D προσδετών, χρησιμοποιήσαμε την AdZ τεχνολογία. Το σύστημα αυτό επιτρέπει την άμεση παραγωγή ανασυνδυασμένων αδενοϊών με επιλεγμένα PCR προϊόντα και προσφέρεται για την αποτελεσματική έκφραση trans-γονιδίων από διαφορετικούς τύπους κυττάρων. Στη συγκεκριμένη μελέτη το χρησιμοποιήσαμε

ως ένα υπέρ-αποτελεσματικό όχημα μεταφοράς γονιδίων και δημιουργήσαμε ανασυνδυασμένους αδενοϊούς με ανεπάρκεια αντιγραφής, οι οποίοι έχουν την δυνατότητα να κωδικοποιούν συγκεκριμένες HCMV και EBV άμεσα πρώιμες μεταλλαγμένες πρωτεΐνες.

Για να δημιουργηθούν οι ανασυνδυασμένοι αδενοϊοί, πραγματοποιήθηκαν συγκεκριμένες απαλείψεις στην κωδική περιοχή της HCMV IE1 πρωτεΐνης (Εικόνα B2).



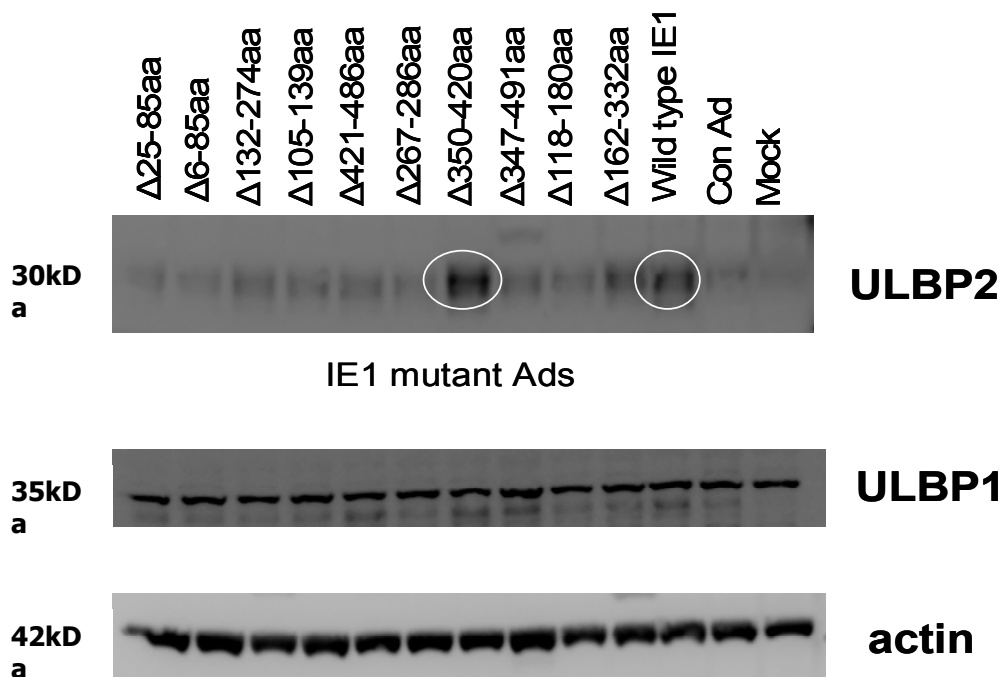
Εικόνα B2



Εικόνα B3

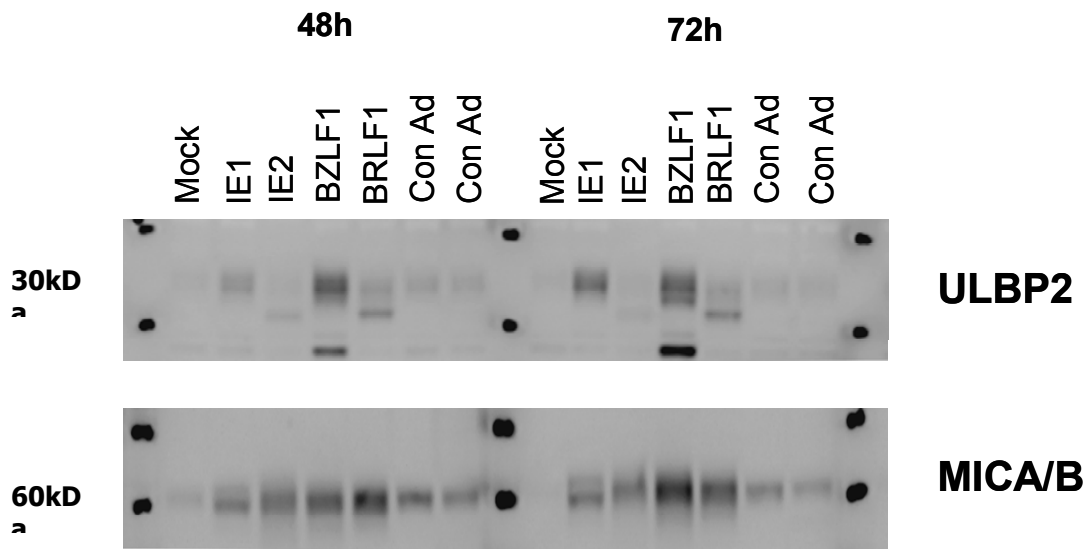
Έτσι, παράλληλα με την αγρίου τύπου IE1, διαφορετικοί αδενοϊοί κατασκευάστηκαν ώστε να εκφράζουν αυτές τις μεταλλάξεις. Ανάλυση του αρχικού ανασυνδυασμού, μας έδωσε τις διαφορετικές μεταλλαγμένες μορφές της IE1 (Εικόνα B3) και μόλυνση ινοβλαστών με αυτούς τους αδενοϊούς αποκάλυψε πως αυτές οι μορφές εκφράζονταν φυσιολογικά στα κύτταρα.

Οι ινοβλάστες μολύνθηκαν με τους μεταλλαγμένους αδενοϊούς σε  $m.o.i=10$  και ακολούθησε ανάλυση με στύπωμα κατά western, 48hpi, για τους NKG2D προσδέτες, ULBP2, ULBP1 και ULBP3. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως μερικές μεταλλαγμένες IE1 μορφές διατηρούσαν την ικανότητα να ρυθμίζουν θετικά τον ULBP2 προσδέτη (Εικόνα B4). Από την άλλη μεριά, καμία μεταλλαγμένη μορφή ούτε η αγρίου τύπου IE1 παρουσίασε κάποια επίδραση στην έκφραση των ULBP1 και ULBP3 προσδετών (Εικόνα B4).



Εικόνα B4

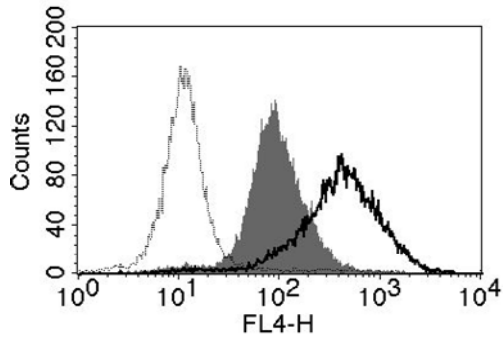
Το ίδιο πείραμα πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ανασυνδυασμένους αδενοϊούς που εξέφραζαν τις EBV άμεσα πρώιμες πρωτεΐνες BZLF1 και BRLF1. Ανάλυση κατά western, 48 και 72 ώρες μετά τη μόλυνση, αποκάλυψε πως οι EBV άμεσα πρώιμες πρωτεΐνες επίσης προκαλούν μια δραματικά θετική ρύθμιση στην επιφανειακή έκφραση των προσδετών MICA, MICB και ULBP2, συγκρινόμενη με την έκφραση στα μη μολυσμένα κύτταρα ή τα μολυσμένα με τον άδειο αδενοϊό (Εικόνα B5).



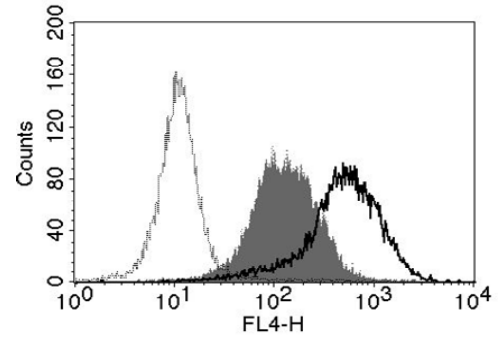
Εικόνα B5



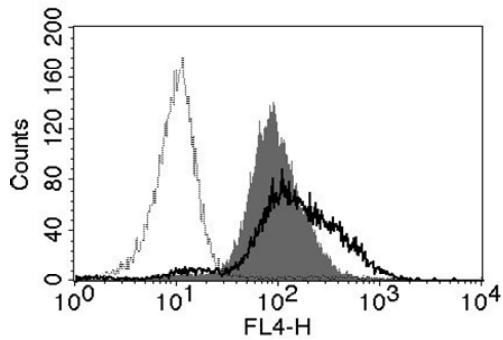
Περαιτέρω ανάλυση με FACS επιβεβαίωσε τα παραπάνω. Η έκφραση των CMV και EBV άμεσα πρώιμων γονιδίων οδήγησε σε μια ισχυρή θετική ρύθμιση της έκφρασης στην κυτταρική επιφάνεια των προσδετών ULBP2, MICA και MICB (Εικόνα B6).



**RAd-BZLF1**

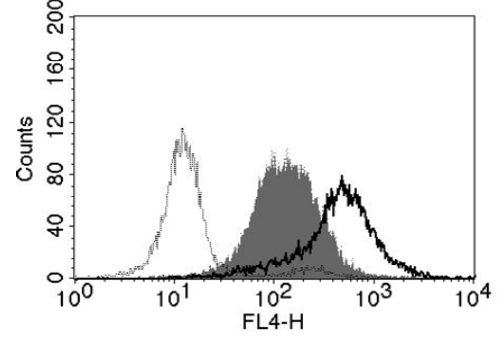
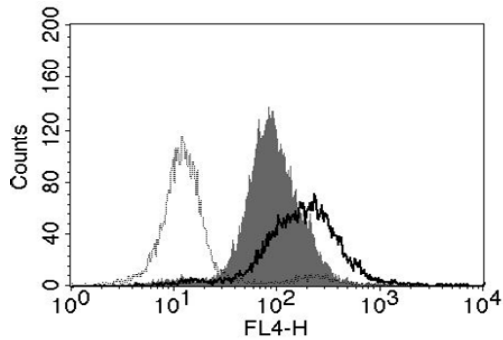
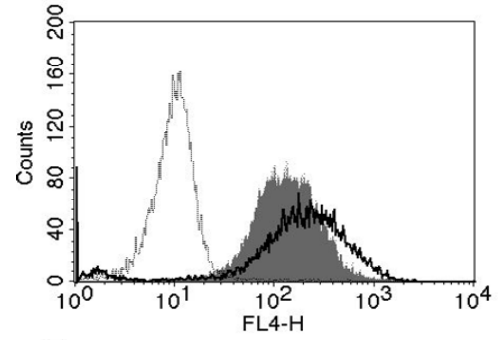


**RAd-IE1**



**RAd-BRLF1**

*Thin line :  
control IgG  
Grey fill :  
Control Ad  
Thick line :  
Specific Ad*



Εικόνα B6

## Συζήτηση

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο ανθρώπινος Κυτταρομεγαλοϊός (HCMV) αποτελεί ένα κοινό παθογόνο με αξιοσημείωτο κλινικό ενδιαφέρον. Η ικανότητά του να προκαλεί λανθάνουσα μόλυνση είναι οξείας σημασίας, εφόσον ο ιός μπορεί να επανενεργοποιηθεί προκαλώντας σημαντικά κλινικά προβλήματα, σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα και μεταμοσχευμένους ασθενείς, καταλήγοντας σε μια κατάσταση που μπορεί να απειλεί και τη ζωή. Η κατάσταση λυσιγονίας του HCMV είναι, σύμφωνα με τα παραπάνω, ένας βασικός παράγοντας για τη βιολογική και κλινική σημασία του ιού, και έτσι οι επικείμενοι μηχανισμοί αποτελούν αντικείμενο μεγάλου ενδιαφέροντος. Ο μηχανισμός με τον οποίο ο HCMV επανενεργοποιείται από την λανθάνουσα κατάσταση, δεν είναι πλήρως κατανοητός. Πρόσφατα δεδομένα παρέχουν αποδείξεις ότι η ισορροπία ανάμεσα στην λυτική και τη λανθάνουσα κατάσταση ρυθμίζεται από παράγοντες τόσο του ιού όσο και του ξενιστή. Ένα σημαντικό μόριο του HCMV είναι η άμεσα πρώιμη ρυθμιστική πρωτεΐνη IE1 (Immediate Early-1), κατά την απουσία της οποίας φαίνεται να ευνοείται η λανθάνουσα κατάσταση.

Η δημιουργία ανασυνδυασμένων ιών οι οποίοι κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες IE1-72K (HCMV BAC CR401) και IE2-86K (HCMV BAC EGFP-IE2), συνδεδεμένες με EGFP, προσφέρει πλέον μια τεχνολογία, που επιτρέπει την μικροσκοπική απεικόνιση και παρατήρηση της έκφρασης των HCMV άμεσα πρώιμων πρωτεϊνών, σε ζωντανά κύτταρα και σε πραγματικό χρόνο. Η μικροσκοπία σε ζωντανά κύτταρα δίνει τη δυνατότητα να αποφευχθούν πιθανά τεχνικά προβλήματα που δημιουργούνται κατά τη διαδικασία μονιμοποίησης των κυττάρων, ενώ παράλληλα επιτρέπει την παρακολούθηση, σε πραγματικό χώρο και χρόνο, της γονιδιακής έκφρασης και των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων.

Λεπτομερής χαρακτηρισμός των αναπτυξιακών ιδιοτήτων του HCMV CR401 ιού πραγματοποιήθηκε πριν την έναρξη των πειραμάτων μικροσκοπίας. Ενώ η ποσότητα και οι κινητικές της έκφρασης των άμεσα πρώιμων IE1-72K(-EGFP) και IE2-86K πρωτεϊνών ήταν συγκρίσιμες με το αγρίου τύπου ιικό στέλεχος, CMV AD169, παρατηρήθηκε μια καθυστέρηση στην ανάπτυξη του ιού άλλα μόνο κατά τη μόλυνση με χαμηλό ιικό φορτίο ( $m.o.i < 1$  pfu/cell). Η δομή και

η ρύθμιση της κύριας IE μεταγραφικής μονάδας είναι πολύπλοκη ενώ με πολλαπλό μάτισμα, πρῶιμα καθώς και ὄψιμα μετάγραφα προέρχονται από αυτή την περιοχή (Meier and Stinski, 1996). Η ένθεση μιας επιπρόσθετης αλληλουχίας (EGFP) στην παραπάνω μεταγραφική μονάδα ίσως αναμένεται να έχει κάποια επίδραση στην ωρίμανση του RNA (White and Spector, 2005). Η σύντηξη της φθορίζουσας πρωτεΐνης EGFP, στο καρβοξυτελικό άκρο του *ie1* γονιδίου πιθανώς επηρεάζει την ικανότητα συμμετοχής της IE1-72K πρωτεΐνης στην αποτελεσματική αντιγραφή του ιού.

Σε αυτή τη μελέτη, εστίασαμε αρχικά στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των IE1-72K και ND10 συστατικών πρωτεϊνών κατά τα πρῶιμα στάδια (6 hours post infection, h.p.i) μιας HCMV παραγωγικής μόλυνσης και σε κύτταρα που βρίσκονταν στη φάση της μίτωσης. Η μικροσκοπία σε ζωντανά, HCMV CR401-μολυσμένα κύτταρα, απεικόνισε την μετάβαση της IE1-72K πρωτεΐνης στις ND10 δομές, δύο ώρες μετά τη μόλυνση, με ακόλουθη, βαθμιαία αλλά αποτελεσματική, καταστροφή της ακεραιότητας τους μέσα στις 6 h.p.i. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας τα PML από-SUMO-υλιώθηκαν με παρόμοιες κινητικές συγκριτικά με τον αγρίου τύπου HCMV, ενώ η πρωτεΐνη IE1 από εστιακή κατανομή, παρουσίασε διαχεόμενο πρότυπο στον πυρήνα μετά τις πρώτες 5 ώρες της μόλυνσης. Εφόσον δεν παρατηρήθηκε μια m.o.i-εξαρτώμενη αύξηση του μεγέθους των IE1 εστιών, φαίνεται απίθανο κάποια υπάρχουσα κυτταρική δομή να λειτουργεί ως θέση συσσωμάτωσης των IE1 μορίων. Αντίθετα, η διαπίστωση ότι η ποσότητα των IE1-72K κουκίδων είναι ανάλογη του m.o.i υποδηλώνει ότι στη δημιουργία τους ίσως συμβάλλουν ιικοί ή κυτταρικοί παράγοντες που επάγονται από τον ιό. Θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι κάποιος ιικός παράγοντας που εισάγεται κατά τη μόλυνση ίσως είναι υπεύθυνος για τη δημιουργία των IE1 εστιακών δομών, όπως συμβαίνει και με τη δημιουργία των IE2 εστιών (Sourvinos et al., 2007).

Ενώ τα PML παραμένουν από-SUMO-υλιωμένα στον πυρήνα μετά τη διάσπαση των ND10, η τύχη των Sp100 είναι διαφορετική. Όταν εκφράζεται σε κύτταρα μέσω διαμόλυνσης, η πρωτεΐνη IE1-72K διασπά τον ομοιοπολικό δεσμό SUMO-1 με Sp100, καθώς παρατηρείται η παρουσία Sp100 δομών χαμηλότερου μοριακού βάρους (Muller and Dejean, 1999). Οι δυσκολίες στην οπτικοποίηση της ενδογενούς Sp100 πρωτεΐνης παρεμποδίζουν την άμεση ανάλυση της χωρικής της εντόπισης, κατά τη διάρκεια μιας πραγματικής HCMV

μόλυνσης. Για το λόγο αυτό έγινε χρήση των mcherry-Sp100 κυττάρων, που εξέφραζαν την Sp100 πρωτεΐνη συνδεδεμένη με την κόκκινη φθορίζουσα mcherry. Η διάσπαση των Sp100, όπως παρατηρείται στη μικροσκοπία ζωντανών κυττάρων, συνδυασμένη με την απώλεια της SUMO-υλιωμένης Sp100 μορφής που αποκάλυψε η βιοχημική ανάλυση κατά τα πρώτα στάδια της μόλυνσης, επιβεβαιώνει την ήδη παρατηρημένη διάσπαση των Sp100 συσσωματωμάτων, τα οποία δημιουργούνται παροδικά αμέσως μετά τη μόλυνση, απουσία των PML, και με τρόπο εξαρτώμενο της IE1-72K πρωτεΐνης (Tavalai et al., 2006).

Μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση μέσω της μικροσκοπίας σε ζωντανά κύτταρα, είναι ότι η ταχεία εξάλειψη των ND10 πραγματοποιείται μόνο στο πλαίσιο της ιικής μόλυνσης, καθώς σε συνθήκες IE1-διαμόλυνσης κυττάρων η διάσπαση των ND10 καθυστερούσε σημαντικά. Κατά συνέπεια, ο τρόπος έκφρασης της IE1-72K έχει συνέπειες στις επακόλουθες δράσεις της πρωτεΐνης στην τροποποίηση του πυρηνικού περιβάλλοντος. Σε αυτό συμβάλει η ικανότητα του HCMV κύριου IE υποκινητή (MIEP) να διεγείρεται από ιικές πρωτεΐνες, όταν αυτές εκφράζονται από τον ίδιο τον ιό. Παρόλα αυτά επιπρόσθετες *de novo* HCMV-κωδικευμένες λειτουργίες μπορούν επίσης να επηρεάσουν τα γεγονότα.

Η κατανομή στο χώρο των ιικών γονιδιωμάτων στον πυρήνα αποτελεί στοιχείο κλειδί στην εξέλιξη μιας ιικής μόλυνσης. Οι μελέτες μας εμπλέκουν την IE1-72K πρωτεΐνη στην δημιουργία αυτού του νουκλεο-πρωτεϊνικού συμπλόκου κατά τα πρώιμα στάδια της μόλυνσης. Οι IE1 εστίες τοποθετούνταν παρακείμενα των ιικών γονιδιωμάτων ή συνεντοπίζονταν μερικώς με αυτά με τρόπο που θύμιζε την γειτονική τοποθέτηση των HCMV γονιδιωμάτων με τα ND10 (Ahn and Hayward, 1997; Ahn et al., 1999; Ishov et al., 1997; Sourvinos et al., 2007). Λαμβάνοντας υπόψη ότι σε ανάλογα χρονικά σημεία της μόλυνσης, HCMV μετάγραφα προερχόμενα από ND10-συνδεδεμένα γονιδιώματα, έχουν επίσης ανιχνευθεί (Ishov et al., 1997; Maul and Negorev, 2008), θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι τα χαμηλού ποσοστού μη IE1-72K-συνδεδεμένα ιικά γονιδιώματα είναι μεταγραφικά ανενεργά. Η IE2-86K πρωτεΐνη αποτελούσε επίσης τμήμα αυτού του ιικού νουκλεο-πρωτεϊνικού συμπλόκου στα πρώιμα στάδια της μόλυνσης, παρόλο που υπήρχαν ελάχιστες διαφορές στην IE1-72K και IE2-86K εντόπιση. Ενώ οι πρωτεΐνες αυτές θεωρείται ότι

δρουν συνεργατικά στην ενεργοποίηση της μεταγραφής, τα δεδομένα μας δείχνουν ότι διαχωρίζονται κατά τη μόλυνση, χωρίς καμία ένδειξη άμεσης αλληλεπίδρασης, παρόλο που και οι δύο εντοπίζονται στον πυρήνα. Έτσι, από τα άμεσα πρώιμα στάδια, η ιική μόλυνση πρέπει να συμπεριλαμβάνει μια δομική συγκρότηση ιικών πρωτεϊνών και DNA σε αρμονία με την κυτταρική αρχιτεκτονική, η οποία πιθανώς είναι κρίσιμη για την εξέλιξη της μόλυνσης και παρόμοια για τους άλφα- και βήτα- ερπητοϊούς (Everett et al., 2003).

Η χωρική εντόπιση των ND10 συστατικών πρωτεϊνών επίσης επηρεάστηκε δραματικά από την HCMV IE1-72K πρωτεΐνη στα μιτωτικά κύτταρα, με τις PML και Sp100 να μετατοπίζονται πάνω στη μεταφασική χρωματίνη λόγω της έκφρασης της IE1-72K, ενώ η hDaxx παρουσίασε διαχεόμενη κατανομή μετά την διάσπαση του πυρηνικού φακέλου. Δεδομένης της ειδικής αλληλεπίδρασης μεταξύ των PML και της αγρίου τύπου IE1-72K πρωτεΐνης (Ahn et al., 1998), θα μπορούσαμε να προτείνουμε πως αυτό το ιικό άμεσα πρώιμο μόριο ίσως λειτουργεί ως μια πρωτεΐνη προσαρμοστής, που μεσολαβεί στην καθοδήγηση των PML αλλά και των Sp100 μορίων πάνω στα χρωμοσώματα των διαιρούμενων κυττάρων. Η έκφραση της IE1-72K αποδεικνύεται να αποτελεί έναν ισχυρό μεσολαβητή ο οποίος αλλάζει δραματικά την εντόπιση των Sp100 στον πυρήνα και καταλήγει στην δημιουργία νέων αλληλεπιδράσεων με τη μεταφασική χρωματίνη, οι οποίες ευνοούν ή αναστέλλουν τις λειτουργίες των Sp100.

Η λειτουργική σημασία της διαφορικής συσσώρευσης των ND10 συστατικών πρωτεϊνών πάνω στη μεταφασική χρωματίνη κατά τη διάρκεια της μίτωσης και με αφορμή την IE1-72K έκφραση, παραμένει να διερευνηθεί. Η μεταγραφική κατάσταση των γονιδίων σχετίζεται με την ενδοκυτταρική εγγύτητα στην ετεροχρωματίνη, ενώ η συμπυκνωμένη χρωματίνη θεωρείται ως θέση μεταγραφικής καταστολής που επίσης περιλαμβάνει την μεταγραφικά σιωπηλή ετεροχρωματίνη των κεντρομερών. Έχει ενδιαφέρον να σκεφτούμε ότι η IE1-72K πρωτεΐνη συμμετέχει στις τροποποιήσεις και αναδομήσεις της χρωματίνης στη διάρκεια της αντιγραφής καθώς και στην ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης μέσω των δομικών μηχανισμών της χρωματίνης, όπως η αναδιοργάνωση των ND10 συστατικών πρωτεϊνών. Στο σύνολό τους, τα αποτελέσματά μας προσφέρουν σημαντικές πληροφορίες για την περεταίρω έρευνα του φυσικού ρόλου της IE1-72K και της σχέσης της με άλλες διαδικασίες.

Η μικροσκοπία σε ζωντανά κύτταρα με τη χρήση του CR401 ιού αναπαρήγαγε την παρατήρηση, που είχε γίνει σε μονιμοποιημένα κύτταρα, ότι η πρωτεΐνη IE1-72K συνδέεται ισχυρά με τη STAT-2 κατά την παραγωγική μόλυνση, και ασθενώς με την STAT-1 (Huh et al., 2008; Paulus et al., 2006). Η HCMV μόλυνση και πρόσδεση στην κυτταρική επιφάνεια είναι γνωστό ότι επάγει μια ισχυρή αντίδραση ιντερφερόνης, η οποία μετριάζεται από μηχανισμούς του ιού με σκοπό την διαφυγή του από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή (Browne and Shenk, 2003; Browne et al., 2001). Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι ο HCMV μετατοπίζει τις STAT1 και STAT2 μέσα στον πυρήνα, απενεργοποιώντας με αυτόν τον τρόπο τον σημαντικό αυτόν ενδιάμεσο του σήματος IFN ώστε να εξελιχθεί η ιική αντιγραφή. Η μετατόπιση των STAT1 και STAT2 παρατηρείται μόνο στα πλαίσια μιας παραγωγικής μόλυνσης, υποδηλώνοντας ότι ιικοί παράγοντες καθορίζουν το φαινόμενο. Η μεταφορά της STAT2 πρωτεΐνης από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα ήταν ανεξάρτητη της IE1-72K, και έτσι η IE1-72K φαίνεται να δρα σε κάποιο στάδιο μετά την ενεργοποίηση της STAT2, απομακρύνοντάς την. Τα αποτελέσματά μας επιβεβαιώνουν την πρόσφατη βιοχημική αλληλεπίδραση που έχει περιγραφεί μεταξύ των IE1 και STAT2 υποδηλώνοντας μια άμεση σύνδεση πρωτεΐνης με πρωτεΐνη (Huh et al., 2008; Paulus et al., 2006). Η αδυναμία της STAT1 να συνδεθεί στη μεταφασική χρωματίνη, σε αντίθεση με τη STAT2, παρέχει μια επιπλέον απόδειξη για μια έμμεση αυτή τη φορά σύνδεση αυτών των δυο πρωτεϊνών. Τα αποτελέσματά μας δηλώνουν ότι η ιική πρωτεΐνη εμποδίζει κάποιο ενδοπυρηνικό στάδιο, μεταγενέστερο της πυρηνικής μετατόπισης και προγενέστερο της σύνδεσης με το DNA του επαγόμενου από ιντερφερόνη, γονιδιακού παράγοντα 3 (IFN-stimulated gene factor 3, ISGF3), πιθανώς με το να παρεμβάλλεται στην ακεραιότητα και/ή τη σωστή πυρηνική τοποθέτηση του πρωτεϊνικού αυτού συμπλόκου. Το σύμπλοκο IE1-72K/STAT-2/PML φαίνεται πως είναι σταθερό, καθώς συνδέεται εμφανώς με τη μιτωτική χρωματίνη. Οι σταθερές αλληλεπιδράσεις με την IE1-72K θα μπορούσαν να σχετίζονται με απομόνωση και απώλεια της λειτουργίας των εκάστοτε πρωτεϊνών.

Η hDaxx πρωτεΐνη ταυτοποιήθηκε μέσω της κυτταροπλασματικής της αλληλεπίδρασης με τη Fas, και αφού διεγερθεί έχει προ-αποπτωτική δράση. Η hDaxx είναι παρούσα ως συστατικό στοιχείο του πυρήνα, όπου συνδέεται με τα ND10, και λειτουργεί κατασταλτικά στην έκφραση των HCMV άμεσα πρώιμων

IE γονιδίων (Cantrell and Bresnahan, 2006; Preston and Nicholl, 2006; Saffert and Kalejta, 2006; Woodhall et al., 2006). Η HCMV πρωτεΐνη της περιβάλλουσας κοκκιώδους ζώνης, pp71, προάγει την αποικοδόμηση της hDaxx, μέσω του πρωτεασώματος, και έτσι ανακουφίζει την καταστολή της έκφρασης των IE γονιδίων (Saffert and Kalejta, 2006). Η hDaxx φυσιολογικά συσσωρεύεται στις συμπυκνωμένες περιοχές της ετεροχρωματίνης κατά το τέλος της S φάσης του κυτταρικού κύκλου (Ishov et al., 1999), αλλά όχι στη μεταφασική χρωματίνη (Pluta et al., 1998). Η παρατηρημένη αλληλεπίδραση μεταξύ των hDaxx και PML εξαρτάται από τη SUMOυλίωση (Ishov et al., 1999; Li et al., 2000), συνεπώς η από-SUMO-υλίωση των PML μέσω της IE1 αναμένεται να διασπά αυτό το σύμπλοκο κατά τη διάρκεια μιας HCMV μόλυνσης. Το γεγονός ότι η PML πρωτεΐνη, και όχι η hDaxx προσδένεται, μέσω της IE1-72K, στη μεταφασική χρωματίνη, είναι επακόλουθο του φαινομένου διαχωρισμού των hDaxx-PML κατά τη μόλυνση. Η απελευθέρωση της hDaxx στο κυτταρόπλασμα, υποδηλώνει ότι αρκεί η διάσπαση της σύνδεσης με τα PML/ND10, για να αποφευχθεί η καταστολή της HCMV μόλυνσης από την hDaxx. Καθώς η σύνδεση της hDaxx με τα PML είναι προ-αποπτωτική, υπάρχουν στοιχεία ότι η hDaxx πρωτεΐνη πιθανώς να έχει αντι-αποπτωτικές ιδιότητες όταν είναι ελεύθερη των PML (Chen and Chen, 2003). Απελευθερώνοντάς την στο πυρηνόπλασμα διαχωρισμένη από τα PML, η IE1 ίσως επιλεκτικά μπορεί να ελέγχει την λειτουργία της hDaxx.

Το καρβοξυτελικό άκρο της IE1-72K πρωτεΐνης είναι απαραίτητο για την αλληλεπίδραση με τη χρωματίνη, αλλά όχι για την διάσπαση των ND10 (Wilkinson et al., 1998) ή για την παραγωγική αντιγραφή του ιού *in vitro* (Reinhardt et al., 2005). Έτσι, η σημασία της αλληλεπίδρασης της IE1 με πυρηνικές δομές του κυττάρου ξενιστή, όπως παρατηρείται σε αυτή τη μελέτη, παραμένει αβέβαιη. Επίσης μένει να εξακριβωθεί εάν υπάρχει κάποια λειτουργική σημασία στη διαφορική συσσώρευση των ND10 συστατικών πρωτεϊνών πάνω στη μεταφασική χρωματίνη, με την παράλληλη έκφραση της IE1-72K.

Η πρόσδεση της IE1-72K πρωτεΐνης στη συμπυκνωμένη χρωματίνη ήταν άμεσα διακριτή σε προσωρινά διαμολυσμένα κύτταρα και σε αυτά η έκφραση της IE1 ήταν πλήρως συμβατή με την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Καθώς η μόλυνση από τον ανθρώπινο κυτταρομεγαλοϊό θεωρείται ότι μπλοκάρει τον



κυτταρικό κύκλο ζωής, αυτό φαίνεται να συμβαίνει σε συνθήκες που πλησιάζουν την όψιμη G1/S φάση (Bresnahan et al., 1996; Jault et al., 1995). Παρ' όλα αυτά, μιτωτικά κύτταρα ήταν εύκολα ανιχνεύσιμα από την IE1-EGFP χρώση της χρωματίνης σε ένα πολύ μικρό πληθυσμό HCMV CR401-μολυσμένων κυττάρων. Η παρατήρηση αυτή είναι συνεπής με ανάλογα δεδομένα από αναλύσεις FACS, που δείχνουν ότι ένας πολύ μικρός πληθυσμός από τα κύτταρα που έχουν μολυνθεί, και ενώ αυτά αντιγράφουν ενεργά το γονιδίωμά τους, είναι ικανά να εκφράζουν τις άμεσα πρώιμες IE πρωτεΐνες κατά την G2/M φάση του κυτταρικού κύκλου (Fortunato et al., 2002). Ωστόσο, όταν παρακολουθήθηκαν μικροσκοπικά, αυτά τα κύτταρα απέτυχαν να βγουν από τη μετάφαση και να προχωρήσουν σε κυτταρική διαίρεση. Η πλειοψηφία των μιτωτικών HCMV μολυσμένων κυττάρων, παρατηρήθηκαν να βρίσκονται στην πρόφαση ή την προμετάφαση, ένα πολύ μικρό ποσοστό στην αναφαση, ενώ κανένα κύτταρο δεν είχε καταφέρει να φτάσει στην τελόφαση και κατά συνέπεια να διαιρεθεί. Τα χρωμοσώματα μετά την φάση της μετάφασης συμπεριφέρονταν με μη φυσιολογικό τρόπο καθώς αδυνατούσαν να διαχωριστούν και να φτάσουν στους πόλους και παρουσίαζαν τυχαία κατανομή. Η δυνατότητα των IE1-διαμολυσμένων κυττάρων να προχωρούν φυσιολογικά σε όλα τα στάδια της μίτωσης, υποδηλώνει πως μια πρωτεΐνη του ανθρώπινου κυτταρομεγαλοϊού, εκτός της IE1-72K, φαίνεται να έχει την ιδιότητα μπλοκάρει την κυτταρική μίτωση.

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει πως η έκφραση των άμεσα πρώιμων HCMV πρωτεϊνών IE1-72K και IE2-86K, διαδραματίζουν έναν σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της άνοσου απάντησης του ξενιστή, καθώς και οι δυο, με διαφορετικό τρόπο, ρυθμίζουν θετικά την έκφραση των NKG2D προσδετών, ULBP2 και MICA/B, αντίστοιχα (Routes et al., 2005; Tomasec et al., 2007; Venkataraman et al., 2007). Η έκφραση οποιασδήποτε από τις δυο αυτές HCMV πρωτεΐνες σε κύτταρα στόχους, ήταν ικανή να προωθήσει την ενεργοποίηση των NK κυττάρων. Με τη χρήση ανασυνδυασμένων αδενοϊών έγινε δυνατή η μελέτη της δράσης των άμεσα πρώιμων πρωτεϊνών των ερπητοϊών HCMV και EBV, στην έκφραση των NKG2D προσδετών.

Τα αποτελέσματα έδειξαν πως μερικές μεταλλαγμένες IE1 μορφές διατηρούσαν την ικανότητα να ρυθμίζουν θετικά τον ULBP2 προσδέτη. Μια από αυτές τις μορφές είχε το έλλειμμα στο C-τελικό άκρο της IE1, επιτρέποντάς μας

να θεωρήσουμε το άκρο αυτό της πρωτεΐνης δεν εμπλέκεται στο παραπάνω φαινόμενο. Οι άμεσα πρώιμες πρωτεΐνες του EBV ερπητοϊού, BRLF1 και BZLF1, επίσης προκάλεσαν μια δραματικά θετική ρύθμιση στην επιφανειακή έκφραση των προσδετών MICA, MICB και ULBP2. Συμπερασματικά η ενεργοποίηση των NKG2D προσδετών φαίνεται να είναι εξαιρετικά ευαίσθητη στην έκφραση των άμεσα πρώιμων γονιδίων των ερπητοϊών. Ο NKG2D υποδοχέας ίσως έχει ένα ρόλο κλειδί στην ανίχνευση και στην προστασία έναντι των μολύνσεων από τους ερπητοϊούς, όχι μόνο κατά τη διάρκεια μιας ενεργής λοίμωξης αλλά επίσης κατά τη διάρκεια μιας ολόκληρης ζωής στην ανίχνευση της επανενεργοποίησης του ιού από την λανθάνουσα φάση.

## Επίλογος

Η χρήση της τεχνολογίας των ανασυνδυασμένων αδενοϊών (AdZ) ως ένα όχημα μεταφοράς ιικών γονιδίων μας έδωσε τη δυνατότητα να παρατηρήσουμε τον ρόλο των άμεσα πρώιμων πρωτεϊνών στην άνοσο απάντηση του ξενιστή και παράλληλα, δημιουργώντας στοχευόμενες μεταλλάξεις, να εξετάσουμε ποιο μέρος της HCMV IE1 πρωτεΐνης είναι υπεύθυνο για τις εκάστοτε αλληλεπιδράσεις.

Τέλος η μικροσκοπία σε ζωντανά κύτταρα, με τη χρήση του ανασυνδυασμένου HCMV ιού που εκφράζει την IE1 πρωτεΐνη συνδεδεμένη με GFP, έδειξε ότι η IE1-72K συνδέεται με τις PML, Sp100 και STAT2 πρωτεΐνες, οδηγώντας τες στη μεταφασική χρωματίνη, ενώ δεν παρατηρείται το ίδιο με τις hDaxx και STAT1. Η δυναμική και διαφορική αναδιοργάνωση των ND10 συστατικών πρωτεϊνών στην κυτταρική χρωματίνη (PML, STAT2), στην αποικοδόμηση (Sp100) ή στην απελευθέρωση τους στο πυρηνόπλασμα (hDaxx), μπορεί να θεωρηθεί ότι συνδέεται μηχανιστικά με τον λειτουργικό ρόλο της IE1 στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και στην προετοιμασία του κυττάρου για τη μόλυνση.

Οι ανασυνδυασμένοι ιοί που κωδικοποιούν φθορίζουσες πρωτεΐνες ώστε να μπορούν να παρατηρηθούν μικροσκοπικά, έχουν ευρεία εφαρμογή σε πειραματικά μοντέλα μελέτης της ιικής λύσης και λυσιγονίας καθώς και της απόκρισης σε αντι-ιικά σκευάσματα, καθιστώντας την χρήση τους απαραίτητη στην έρευνα για την εξέλιξη της κλινικής ιολογίας.

***Βιβλιογραφία***

## Βιβλιογραφία

1. <http://www-micro.msb.le.ac.uk/3035/Herpesviruses.html>
- Ahn, J. H., Brignole, E. J., 3rd and Hayward, G. S.** (1998). 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* **18**, 4899-913.
- Ahn, J. H. and Hayward, G. S.** (1997). The major immediate-early proteins IE1 and IE2 of human cytomegalovirus colocalize with and disrupt PML-associated nuclear bodies at very early times in infected permissive cells. *J Virol* **71**, 4599-613.
- Ahn, J. H. and Hayward, G. S.** (2000). Disruption of PML-associated nuclear bodies by IE1 correlates with efficient early stages of viral gene expression and DNA replication in human cytomegalovirus infection. *Virology* **274**, 39-55.
- Ahn, J. H., Jang, W. J. and Hayward, G. S.** (1999). 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* **73**, 10458-71.
- Ahn, J. H., Xu, Y., Jang, W. J., Matunis, M. J. and Hayward, G. S.** (2001). Evaluation of interactions of human cytomegalovirus immediate-early IE2 regulatory protein with small ubiquitin-like modifiers and their conjugation enzyme Ubc9. *J Virol* **75**, 3859-72.
- Ahn, K., Angulo, A., Ghazal, P., Peterson, P. A., Yang, Y. and Fruh, K.** (1996). Human cytomegalovirus inhibits antigen presentation by a sequential multistep process. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 10990-5.
- Andreoni, M., Faircloth, M., Vugler, L. and Britt, W. J.** (1989). A rapid microneutralization assay for the measurement of neutralizing antibody reactive with human cytomegalovirus. *J Virol Methods* **23**, 157-67.
- Baldick, C. J., Jr. and Shenk, T.** (1996). Proteins associated with purified human cytomegalovirus particles. *J Virol* **70**, 6097-105.
- Bernardi, R. and Pandolfi, P. P.** (2003). Role of PML and the PML-nuclear body in the control of programmed cell death. *Oncogene* **22**, 9048-57.
- Bolovan-Fritts, C. A., Mocarski, E. S. and Wiedeman, J. A.** (1999). Peripheral blood CD14(+) cells from healthy subjects carry a circular conformation of latent cytomegalovirus genome. *Blood* **93**, 394-8.
- Bonin, L. R. and McDougall, J. K.** (1997). Human cytomegalovirus IE2 86-kilodalton protein binds p53 but does not abrogate G1 checkpoint function. *J Virol* **71**, 5861-70.
- Borden, K. L.** (2002). Pondering the promyelocytic leukemia protein (PML) puzzle: possible functions for PML nuclear bodies. *Mol Cell Biol* **22**, 5259-69.
- Borst, E. M., Hahn, G., Koszinowski, U. H. and Messerle, M.** (1999). Cloning of the human cytomegalovirus (HCMV) genome as an infectious bacterial artificial chromosome in *Escherichia coli*: a new approach for construction of HCMV mutants. *J Virol* **73**, 8320-9.
- Boyle, K. A., Pietropaolo, R. L. and Compton, T.** (1999). Engagement of the cellular receptor for glycoprotein B of human cytomegalovirus activates the interferon-responsive pathway. *Mol Cell Biol* **19**, 3607-13.
- Bresnahan, W. A., Boldogh, I., Thompson, E. A. and Albrecht, T.** (1996). Human cytomegalovirus inhibits cellular DNA synthesis and arrests productively infected cells in late G1. *Virology* **224**, 150-60.

**Britt, W. J. and Vigler, L. G.** (1990). Antiviral antibody responses in mothers and their newborn infants with clinical and subclinical congenital cytomegalovirus infections. *J Infect Dis* **161**, 214-219.

**Browne, E. P. and Shenk, T.** (2003). Human cytomegalovirus UL83-coded pp65 virion protein inhibits antiviral gene expression in infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 11439-44.

**Browne, E. P., Wing, B., Coleman, D. and Shenk, T.** (2001). Altered cellular mRNA levels in human cytomegalovirus-infected fibroblasts: viral block to the accumulation of antiviral mRNAs. *J Virol* **75**, 12319-30.

**Bryant, L. A., Mixon, P., Davidson, M., Bannister, A. J., Kouzarides, T. and Sinclair, J. H.** (2000). The human cytomegalovirus 86-kilodalton major immediate-early protein interacts physically and functionally with histone acetyltransferase P/CAF. *J Virol* **74**, 7230-7.

**Cantrell, S. R. and Bresnahan, W. A.** (2006). Human cytomegalovirus (HCMV) UL82 gene product (pp71) relieves hDaxx-mediated repression of HCMV replication. *J Virol* **80**, 6188-91.

**Casavant, N. C., Luo, M. H., Rosenke, K., Winegardner, T., Zurawska, A. and Fortunato, E. A.** (2006). Potential role for p53 in the permissive life cycle of human cytomegalovirus. *J Virol* **80**, 8390-401.

**Castillo, J. P. and Kowalik, T. F.** (2002). Human cytomegalovirus immediate early proteins and cell growth control. *Gene* **290**, 19-34.

**Castillo, J. P., Yurochko, A. D. and Kowalik, T. F.** (2000). Role of human cytomegalovirus immediate-early proteins in cell growth control. *J Virol* **74**, 8028-37.

**Caswell, R., Hagemeier, C., Chiou, C. J., Hayward, G., Kouzarides, T. and Sinclair, J.** (1993). 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 TFIIB via regions of IE2 required for transcriptional regulation. *J Gen Virol* **74 ( Pt 12)**, 2691-8.

**Cerwenka, A. and Lanier, L. L.** (2003). NKG2D ligands: unconventional MHC class I-like molecules exploited by viruses and cancer. *Tissue Antigens* **61**, 335-43.

**Chee, M. S., Bankier, A. T., Beck, S., Bohni, R., Brown, C. M., Cerny, R., Horsnell, T., Hutchison, C. A., 3rd, Kouzarides, T., Martignetti, J. A. et al.** (1990). Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr Top Microbiol Immunol* **154**, 125-69.

**Chelbi-Alix, M. K., Pelicano, L., Quignon, F., Koken, M. H., Venturini, L., Stadler, M., Pavlovic, J., Degos, L. and de The, H.** (1995). Induction of the PML protein by interferons in normal and APL cells. *Leukemia* **9**, 2027-33.

**Chen, L. Y. and Chen, J. D.** (2003). Daxx silencing sensitizes cells to multiple apoptotic pathways. *Mol Cell Biol* **23**, 7108-21.

**Cherrington, J. M. and Mocarski, E. S.** (1989). Human cytomegalovirus ie1 transactivates the alpha promoter-enhancer via an 18-base-pair repeat element. *J Virol* **63**, 1435-40.

**Child, S. J., Hakki, M., De Niro, K. L. and Geballe, A. P.** (2004). Evasion of cellular antiviral responses by human cytomegalovirus TRS1 and IRS1. *J Virol* **78**, 197-205.

**Ching, R. W., Dellaire, G., Eskiw, C. H. and Bazett-Jones, D. P.** (2005). PML bodies: a meeting place for genomic loci? *J Cell Sci* **118**, 847-54.

**Chiou, C. J., Zong, J., Waheed, I. and Hayward, G. S.** (1993). Identification and mapping of dimerization and DNA-binding domains in the C terminus of the IE2 regulatory protein of human cytomegalovirus. *J Virol* **67**, 6201-14.

- Choi, Y. H., Bernardi, R., Pandolfi, P. P. and Benveniste, E. N.** (2006). The promyelocytic leukemia protein functions as a negative regulator of IFN-gamma signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 18715-20.
- Cobbs, C. S., Harkins, L., Samanta, M., Gillespie, G. Y., Bharara, S., King, P. H., Nabors, L. B., Cobbs, C. G. and Britt, W. J.** (2002). Human cytomegalovirus infection and expression in human malignant glioma. *Cancer Res* **62**, 3347-50.
- Cohen, J. I. and Corey, G. R.** (1985). Cytomegalovirus infection in the normal host. *Medicine (Baltimore)* **64**, 100-14.
- Collier, L.** (2006). *Oxford J.*
- Davison, A. J., Dolan, A., Akter, P., Addison, C., Dargan, D. J., Alcendor, D. J., McGeoch, D. J. and Hayward, G. S.** (2003). The human cytomegalovirus genome revisited: comparison with the chimpanzee cytomegalovirus genome. *J Gen Virol* **84**, 17-28.
- Dellaire, G. and Bazett-Jones, D. P.** (2004). PML nuclear bodies: dynamic sensors of DNA damage and cellular stress. *Bioessays* **26**, 963-77.
- Demarchi, J. M.** (1981). Human cytomegalovirus DNA: restriction enzyme cleavage maps and map locations for immediate-early, early, and late RNAs. *Virology* **114**, 23-38.
- Demmler, G. J.** (1994). Cytomegalovirus. In *Viral Diseases in Pregnancy*, (ed. E. B. Gonic). New York: Springer-Verlag.
- Dittmer, D. and Mocarski, E. S.** (1997). Human cytomegalovirus infection inhibits G1/S transition. *J Virol* **71**, 1629-34.
- Dunn, C., Chalupny, N. J., Sutherland, C. L., Dosch, S., Sivakumar, P. V., Johnson, D. C. and Cosman, D.** (2003). Human cytomegalovirus glycoprotein UL16 causes intracellular sequestration of NKG2D ligands, protecting against natural killer cell cytotoxicity. *J Exp Med* **197**, 1427-39.
- Dworsky, M., Yow, M., Stagno, S., Pass, R. F. and Alford, C.** (1983). Cytomegalovirus infection of breast milk and transmission in infancy. *Pediatrics* **72**, 295-9.
- Emery, V. C., Cope, A. V., Bowen, E. F., Gor, D. and Griffiths, P. D.** (1999). The dynamics of human cytomegalovirus replication in vivo. *J Exp Med* **190**, 177-82.
- Everett, R. D.** (2001). DNA viruses and viral proteins that interact with PML nuclear bodies. *Oncogene* **20**, 7266-73.
- Everett, R. D.** (2006). Interactions between DNA viruses, ND10 and the DNA damage response. *Cell Microbiol* **8**, 365-74.
- Everett, R. D. and Chelbi-Alix, M. K.** (2007). PML and PML nuclear bodies: implications in antiviral defence. *Biochimie* **89**, 819-30.
- Everett, R. D. and Murray, J.** (2005). ND10 components relocate to sites associated with herpes simplex virus type 1 nucleoprotein complexes during virus infection. *J Virol* **79**, 5078-89.
- Everett, R. D., Rechter, S., Papior, P., Tavalai, N., Stamminger, T. and Orr, A.** (2006). PML contributes to a cellular mechanism of repression of herpes simplex virus type 1 infection that is inactivated by ICP0. *J Virol* **80**, 7995-8005.
- Everett, R. D., Sourvinos, G. and Orr, A.** (2003). Recruitment of herpes simplex virus type 1 transcriptional regulatory protein ICP4 into foci juxtaposed to ND10 in live, infected cells. *J Virol* **77**, 3680-9.
- Fortunato, E. A., McElroy, A. K., Sanchez, I. and Spector, D. H.** (2000). Exploitation of cellular signaling and regulatory pathways by human cytomegalovirus. *Trends Microbiol* **8**, 111-9.

- Fortunato, E. A., Sanchez, V., Yen, J. Y. and Spector, D. H.** (2002). Infection of cells with human cytomegalovirus during S phase results in a blockade to immediate-early gene expression that can be overcome by inhibition of the proteasome. *J Virol* **76**, 5369-79.
- Fortunato, E. A., Sommer, M. H., Yoder, K. and Spector, D. H.** (1997). Identification of domains within the human cytomegalovirus major immediate-early 86-kilodalton protein and the retinoblastoma protein required for physical and functional interaction with each other. *J Virol* **71**, 8176-85.
- Fortunato, E. A. and Spector, D. H.** (1998). p53 and RPA are sequestered in viral replication centers in the nuclei of cells infected with human cytomegalovirus. *J Virol* **72**, 2033-9.
- Gawn, J. M. and Greaves, R. F.** (2002). 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* **76**, 4441-55.
- Gibson, W.** (1996). Structure and assembly of the virion. *Intervirology* **39**, 389-400.
- Goldmacher, V. S., Bartle, L. M., Skaletskaya, A., Dionne, C. A., Kedersha, N. L., Vater, C. A., Han, J. W., Lutz, R. J., Watanabe, S., Cahir McFarland, E. D. et al.** (1999). A cytomegalovirus-encoded mitochondria-localized inhibitor of apoptosis structurally unrelated to Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 12536-41.
- Greaves, R. F. and Mocarski, E. S.** (1998). Defective growth correlates with reduced accumulation of a viral DNA replication protein after low-multiplicity infection by a human cytomegalovirus ie1 mutant. *J Virol* **72**, 366-79.
- Griffiths, P. D. and Grundy, J. E.** (1987). Molecular biology and immunology of cytomegalovirus. *Biochem J* **241**, 313-24.
- Guldner, H. H., Szosteki, C., Grotzinger, T. and Will, H.** (1992). IFN enhance expression of Sp100, an autoantigen in primary biliary cirrhosis. *J Immunol* **149**, 4067-73.
- Hahn, G., Jores, R. and Mocarski, E. S.** (1998). Cytomegalovirus remains latent in a common precursor of dendritic and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 3937-42.
- Harkins, L., Volk, A. L., Samanta, M., Mikolaenko, I., Britt, W. J., Bland, K. I. and Cobbs, C. S.** (2002). Specific localisation of human cytomegalovirus nucleic acids and proteins in human colorectal cancer. *Lancet* **360**, 1557-63.
- Ho, M.** (1991). History of Cytomegalovirus. In *Cytomegalovirus. Biology and Infection*, (ed. M. Ho), pp. 1-6, 7-10, 57-60, 189-203.
- Hofmann, H., Floss, S. and Stamminger, T.** (2000). Covalent modification of the transactivator protein IE2-p86 of human cytomegalovirus by conjugation to the ubiquitin-homologous proteins SUMO-1 and hSMT3b. *J Virol* **74**, 2510-24.
- Hofmann, H., Sindre, H. and Stamminger, T.** (2002). Functional interaction between the pp71 protein of human cytomegalovirus and the PML-interacting protein human Daxx. *J Virol* **76**, 5769-83.
- Huh, Y. H., Kim, Y. E., Kim, E. T., Park, J. J., Song, M. J., Zhu, H., Hayward, G. S. and Ahn, J. H.** (2008). Binding STAT2 by the acidic domain of human cytomegalovirus IE1 promotes viral growth and is negatively regulated by SUMO. *J Virol* **82**, 10444-54.
- Ibanez, C. E., Schrier, R., Ghazal, P., Wiley, C. and Nelson, J. A.** (1991). Human cytomegalovirus productively infects primary differentiated macrophages. *J Virol* **65**, 6581-8.
- Ioudinkova, E., Arcangeletti, M. C., Rynditch, A., De Conto, F., Motta, F., Covan, S., Pinardi, F., Razin, S. V. and Chezzi, C.** (2006). Control of human



cytomegalovirus gene expression by differential histone modifications during lytic and latent infection of a monocytic cell line. *Gene* **384**, 120-8.

**Ishov, A. M. and Maul, G. G.** (1996). The periphery of nuclear domain 10 (ND10) as site of DNA virus deposition. *J Cell Biol* **134**, 815-26.

**Ishov, A. M., Sotnikov, A. G., Negorev, D., Vladimirova, O. V., Neff, N., Kamitani, T., Yeh, E. T., Strauss, J. F., 3rd and Maul, G. G.** (1999). PML is critical for ND10 formation and recruits the PML-interacting protein daxx to this nuclear structure when modified by SUMO-1. *J Cell Biol* **147**, 221-34.

**Ishov, A. M., Stenberg, R. M. and Maul, G. G.** (1997). Human cytomegalovirus immediate early interaction with host nuclear structures: definition of an immediate transcript environment. *J Cell Biol* **138**, 5-16.

**Ishov, A. M., Vladimirova, O. V. and Maul, G. G.** (2002). Daxx-mediated accumulation of human cytomegalovirus tegument protein pp71 at ND10 facilitates initiation of viral infection at these nuclear domains. *J Virol* **76**, 7705-12.

**Isomura, H. and Stinski, M. F.** (2003). The human cytomegalovirus major immediate-early enhancer determines the efficiency of immediate-early gene transcription and viral replication in permissive cells at low multiplicity of infection. *J Virol* **77**, 3602-14.

**Iwayama, S., Yamamoto, T., Furuya, T., Kobayashi, R., Ikuta, K. and Hirai, K.** (1994). Intracellular localization and DNA-binding activity of a class of viral early phosphoproteins in human fibroblasts infected with human cytomegalovirus (Towne strain). *J Gen Virol* **75 ( Pt 12)**, 3309-18.

**Janeway and Travers.** (2002). ΚΛΙΝΙΚΗ ΑΝΟΣΟΒΙΟΛΟΓΙΑ Το ανοσολογικό σύστημα στην υγεία και τη νόσο: Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης.

**Jault, F. M., Jault, J. M., Ruchti, F., Fortunato, E. A., Clark, C., Corbeil, J., Richman, D. D. and Spector, D. H.** (1995). Cytomegalovirus infection induces high levels of cyclins, phosphorylated Rb, and p53, leading to cell cycle arrest. *J Virol* **69**, 6697-704.

**Kalejta, R. F., Bechtel, J. T. and Shenk, T.** (2003). Human cytomegalovirus pp71 stimulates cell cycle progression by inducing the proteasome-dependent degradation of the retinoblastoma family of tumor suppressors. *Mol Cell Biol* **23**, 1885-95.

**Kano, Y. and Shiohara, T.** (2000). Current understanding of cytomegalovirus infection in immunocompetent individuals. *J Dermatol Sci* **22**, 196-204.

**Kelly, C., Van Driel, R. and Wilkinson, G. W.** (1995). Disruption of PML-associated nuclear bodies during human cytomegalovirus infection. *J Gen Virol* **76 ( Pt 11)**, 2887-93.

**Kerry, J. A., Priddy, M. A., Jervey, T. Y., Kohler, C. P., Staley, T. L., Vanson, C. D., Jones, T. R., Iskenderian, A. C., Anders, D. G. and Stenberg, R. M.** (1996). Multiple regulatory events influence human cytomegalovirus DNA polymerase (UL54) expression during viral infection. *J Virol* **70**, 373-82.

**Kerry, J. A., Sehgal, A., Barlow, S. W., Cavanaugh, V. J., Fish, K., Nelson, J. A. and Stenberg, R. M.** (1995). Isolation and characterization of a low-abundance splice variant from the human cytomegalovirus major immediate-early gene region. *J Virol* **69**, 3868-72.

**Klucher, K. M., Sommer, M., Kadonaga, J. T. and Spector, D. H.** (1993). In vivo and in vitro analysis of transcriptional activation mediated by the human cytomegalovirus major immediate-early proteins. *Mol Cell Biol* **13**, 1238-50.

**Koriath, F., Maul, G. G., Plachter, B., Stamminger, T. and Frey, J.** (1996). The nuclear domain 10 (ND10) is disrupted by the human cytomegalovirus gene product IE1. *Exp Cell Res* **229**, 155-8.

- Kornberg, R. D.** (1974). Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* **184**, 868-71.
- Kuo, M. H. and Allis, C. D.** (1998). Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *Bioessays* **20**, 615-26.
- Lafemina, R. L., Pizzorno, M. C., Mosca, J. D. and Hayward, G. S.** (1989). Expression of the acidic nuclear immediate-early protein (IE1) of human cytomegalovirus in stable cell lines and its preferential association with metaphase chromosomes. *Virology* **172**, 584-600.
- Lalioti, M. and Heath, J.** (2001). A new method for generating point mutations in bacterial artificial chromosomes by homologous recombination in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* **29**, E14.
- Lang, D. and Stamminger, T.** (1993). 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* **67**, 323-31.
- Lee, H. R., Kim, D. J., Lee, J. M., Choi, C. Y., Ahn, B. Y., Hayward, G. S. and Ahn, J. H.** (2004). Ability of the human cytomegalovirus IE1 protein to modulate sumoylation of PML correlates with its functional activities in transcriptional regulation and infectivity in cultured fibroblast cells. *J Virol* **78**, 6527-42.
- Li, H., Leo, C., Zhu, J., Wu, X., O'Neil, J., Park, E. J. and Chen, J. D.** (2000). Sequestration and inhibition of Daxx-mediated transcriptional repression by PML. *Mol Cell Biol* **20**, 1784-96.
- Lu, M. and Shenk, T.** (1996). Human cytomegalovirus infection inhibits cell cycle progression at multiple points, including the transition from G1 to S. *J Virol* **70**, 8850-7.
- Lu, M. and Shenk, T.** (1999). Human cytomegalovirus UL69 protein induces cells to accumulate in G1 phase of the cell cycle. *J Virol* **73**, 676-83.
- Lukac, D. M., Harel, N. Y., Tanese, N. and Alwine, J. C.** (1997). TAF-like functions of human cytomegalovirus immediate-early proteins. *J Virol* **71**, 7227-39.
- Lukac, D. M., Manuppello, J. R. and Alwine, J. C.** (1994). 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* **68**, 5184-93.
- Lukashchuk, V., McFarlane, S., Everett, R. D. and Preston, C. M.** (2008). Human cytomegalovirus protein pp71 displaces the chromatin-associated factor ATRX from nuclear domain 10 at early stages of infection. *J Virol* **82**, 12543-54.
- Malone, C. L., Vesole, D. H. and Stinski, M. F.** (1990). 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* **64**, 1498-506.
- Marchini, A., Liu, H. and Zhu, H.** (2001). Human cytomegalovirus with IE-2 (UL122) deleted fails to express early lytic genes. *J Virol* **75**, 1870-8.
- Maul, G. G.** (1998). Nuclear domain 10, the site of DNA virus transcription and replication. *Bioessays* **20**, 660-7.
- Maul, G. G., Ishov, A. M. and Everett, R. D.** (1996). Nuclear domain 10 as preexisting potential replication start sites of herpes simplex virus type-1. *Virology* **217**, 67-75.
- Maul, G. G. and Negorev, D.** (2008). Differences between mouse and human cytomegalovirus interactions with their respective hosts at immediate early times of the replication cycle. *Med Microbiol Immunol* **197**, 241-9.

**Maul, G. G., Negorev, D., Bell, P. and Ishov, A. M.** (2000). Review: properties and assembly mechanisms of ND10, PML bodies, or PODs. *J Struct Biol* **129**, 278-87.

**McDonough, S. H. and Spector, D. H.** (1983). Transcription in human fibroblasts permissively infected by human cytomegalovirus strain AD169. *Virology* **125**, 31-46.

**Meier, J. L.** (2001). 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* **75**, 1581-93.

**Meier, J. L. and Stinski, M. F.** (1996). Regulation of human cytomegalovirus immediate-early gene expression. *Intervirology* **39**, 331-42.

**Messerle, M., Crnkovic, I., Hammerschmidt, W., Ziegler, H. and Koszinowski, U. H.** (1997). Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 14759-63.

**Michelson, S., Turowski, P., Picard, L., Goris, J., Landini, M. P., Topilko, A., Hemmings, B., Bessia, C., Garcia, A. and Virelizier, J. L.** (1996). Human cytomegalovirus carries serine/threonine protein phosphatases PP1 and a host-cell derived PP2A. *J Virol* **70**, 1415-23.

**Mocarski, E. S. and Courcelle, C. T.** (2001). Cytomegalovirus and their replication. In *In Fields Virology*, (ed. S. E. Straus), pp. 2629-2673. Philadelphia, Lippincott-Raven.

**Mocarski, E. S., Kemble, G. W., Lyle, J. M. and Greaves, R. F.** (1996). 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* **93**, 11321-6.

**Muller, S. and Dejean, A.** (1999). Viral immediate-early proteins abrogate the modification by SUMO-1 of PML and Sp100 proteins, correlating with nuclear body disruption. *J Virol* **73**, 5137-43.

**Murphy, E., Yu, D., Grimwood, J., Schmutz, J., Dickson, M., Jarvis, M. A., Hahn, G., Nelson, J. A., Myers, R. M. and Shenk, T. E.** (2003). Coding potential of laboratory and clinical strains of human cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 14976-81.

**Murphy, E. A., Streblow, D. N., Nelson, J. A. and Stinski, M. F.** (2000). The human cytomegalovirus IE86 protein can block cell cycle progression after inducing transition into the S phase of permissive cells. *J Virol* **74**, 7108-18.

**Murphy, J. C., Fischle, W., Verdin, E. and Sinclair, J. H.** (2002). Control of cytomegalovirus lytic gene expression by histone acetylation. *Embo J* **21**, 1112-20.

**Navarro, L., Mowen, K., Rodems, S., Weaver, B., Reich, N., Spector, D. and David, M.** (1998). Cytomegalovirus activates interferon immediate-early response gene expression and an interferon regulatory factor 3-containing interferon-stimulated response element-binding complex. *Mol Cell Biol* **18**, 3796-802.

**Negorev, D. and Maul, G. G.** (2001). Cellular proteins localized at and interacting within ND10/PML nuclear bodies/PODs suggest functions of a nuclear depot. *Oncogene* **20**, 7234-42.

**Negorev, D. G., Vladimirova, O. V., Ivanov, A., Rauscher, F., 3rd and Maul, G. G.** (2006). Differential role of Sp100 isoforms in interferon-mediated repression of herpes simplex virus type 1 immediate-early protein expression. *J Virol* **80**, 8019-29.

**Nevels, M., Brune, W. and Shenk, T.** (2004a). SUMOylation of the human cytomegalovirus 72-kilodalton IE1 protein facilitates expression of the 86-kilodalton IE2 protein and promotes viral replication. *J Virol* **78**, 7803-12.

**Nevels, M., Paulus, C. and Shenk, T.** (2004b). Human cytomegalovirus immediate-early 1 protein facilitates viral replication by antagonizing histone deacetylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 17234-9.

**Nitzsche, A., Paulus, C. and Nevels, M.** (2008). Temporal dynamics of cytomegalovirus chromatin assembly in productively infected human cells. *J Virol* **82**, 11167-80.

**Noris, E., Zannetti, C., Demurtas, A., Sinclair, J., De Andrea, M., Gariglio, M. and Landolfo, S.** (2002). Cell cycle arrest by human cytomegalovirus 86-kDa IE2 protein resembles premature senescence. *J Virol* **76**, 12135-48.

**Pajovic, S., Wong, E. L., Black, A. R. and Azizkhan, J. C.** (1997). Identification of a viral kinase that phosphorylates specific E2Fs and pocket proteins. *Mol Cell Biol* **17**, 6459-64.

**Paulus, C., Krauss, S. and Nevels, M.** (2006). A human cytomegalovirus antagonist of type I IFN-dependent signal transducer and activator of transcription signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 3840-5.

**Pizzorno, M. C., O'Hare, P., Sha, L., LaFemina, R. L. and Hayward, G. S.** (1988). trans-activation and autoregulation of gene expression by the immediate-early region 2 gene products of human cytomegalovirus. *J Virol* **62**, 1167-79.

**Plachter, B., Britt, W., Vornhagen, R., Stamminger, T. and Jahn, G.** (1993). Analysis of proteins encoded by IE regions 1 and 2 of human cytomegalovirus using monoclonal antibodies generated against recombinant antigens. *Virology* **193**, 642-52.

**Pluta, A. F., Earnshaw, W. C. and Goldberg, I. G.** (1998). Interphase-specific association of intrinsic centromere protein CENP-C with HDaxx, a death domain-binding protein implicated in Fas-mediated cell death. *J Cell Sci* **111 ( Pt 14)**, 2029-41.

**Preece, P. M., Pearl, K. N. and Peckham, C. S.** (1984). Congenital cytomegalovirus infection. *Arch Dis Child* **59**, 1120-6.

**Preston, C. M.** (2000). Repression of viral transcription during herpes simplex virus latency. *J Gen Virol* **81**, 1-19.

**Preston, C. M. and Nicholl, M. J.** (2006). Role of the cellular protein hDaxx in human cytomegalovirus immediate-early gene expression. *J Gen Virol* **87**, 1113-21.

**Reboredo, M., Greaves, R. F. and Hahn, G.** (2004). Human cytomegalovirus proteins encoded by UL37 exon 1 protect infected fibroblasts against virus-induced apoptosis and are required for efficient virus replication. *J Gen Virol* **85**, 3555-67.

**Reddehase, M. J.** (2006). CYTOMEGALOVIRUSES Molecular Biology and Immunology. U.K.: Caister Academic Press.

**Reeves, M., Murphy, J., Greaves, R., Fairley, J., Brehm, A. and Sinclair, J.** (2006). Autorepression of the human cytomegalovirus major immediate-early promoter/enhancer at late times of infection is mediated by the recruitment of chromatin remodeling enzymes by IE86. *J Virol* **80**, 9998-10009.

**Reinhardt, J., Smith, G. B., Himmelheber, C. T., Azizkhan-Clifford, J. and Mocarski, E. S.** (2005). The carboxyl-terminal region of human cytomegalovirus IE1491aa contains an acidic domain that plays a regulatory role and a chromatin-tethering domain that is dispensable during viral replication. *J Virol* **79**, 225-33.

**Routes, J. M., Ryan, S., Morris, K., Takaki, R., Cerwenka, A. and Lanier, L. L.** (2005). Adenovirus serotype 5 E1A sensitizes tumor cells to NKG2D-dependent NK cell lysis and tumor rejection. *J Exp Med* **202**, 1477-82.

**Saffert, R. T. and Kalejta, R. F.** (2006). Inactivating a cellular intrinsic immune defense mediated by Daxx is the mechanism through which the human

cytomegalovirus pp71 protein stimulates viral immediate-early gene expression. *J Virol* **80**, 3863-71.

**Saffert, R. T. and Kalejta, R. F.** (2007). Human cytomegalovirus gene expression is silenced by Daxx-mediated intrinsic immune defense in model latent infections established in vitro. *J Virol* **81**, 9109-20.

**Salvant, B. S., Fortunato, E. A. and Spector, D. H.** (1998). Cell cycle dysregulation by human cytomegalovirus: influence of the cell cycle phase at the time of infection and effects on cyclin transcription. *J Virol* **72**, 3729-41.

**Sanders, R. L., Clark, C. L., Morello, C. S. and Spector, D. H.** (2008). Development of cell lines that provide tightly controlled temporal translation of the human cytomegalovirus IE2 proteins for complementation and functional analyses of growth-impaired and nonviable IE2 mutant viruses. *J Virol* **82**, 7059-77.

**Schwartz, R., Helmich, B. and Spector, D. H.** (1996). 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* **70**, 6955-66.

**Simmen, K. A., Singh, J., Luukkonen, B. G., Lopper, M., Bittner, A., Miller, N. E., Jackson, M. R., Compton, T. and Fruh, K.** (2001). Global modulation of cellular transcription by human cytomegalovirus is initiated by viral glycoprotein B. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 7140-5.

**Sinzger, C., Kahl, M., Laib, K., Klingel, K., Rieger, P., Plachter, B. and Jahn, G.** (2000). Tropism of human cytomegalovirus for endothelial cells is determined by a post-entry step dependent on efficient translocation to the nucleus. *J Gen Virol* **81**, 3021-35.

**Skaletskaya, A., Bartle, L. M., Chittenden, T., McCormick, A. L., Mocarski, E. S. and Goldmacher, V. S.** (2001). A cytomegalovirus-encoded inhibitor of apoptosis that suppresses caspase-8 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 7829-34.

**Sommer, M. H., Scully, A. L. and Spector, D. H.** (1994). Transactivation by the human cytomegalovirus IE2 86-kilodalton protein requires a domain that binds to both the TATA box-binding protein and the retinoblastoma protein. *J Virol* **68**, 6223-31.

**Song, Y. J. and Stinski, M. F.** (2005). Inhibition of cell division by the human cytomegalovirus IE86 protein: role of the p53 pathway or cyclin-dependent kinase 1/cyclin B1. *J Virol* **79**, 2597-603.

**Sourvinos, G. and Everett, R. D.** (2002). Visualization of parental HSV-1 genomes and replication compartments in association with ND10 in live infected cells. *Embo J* **21**, 4989-97.

**Sourvinos, G., Tavalai, N., Berndt, A., Spandidos, D. A. and Stamminger, T.** (2007). Recruitment of human cytomegalovirus immediate-early 2 protein onto parental viral genomes in association with ND10 in live-infected cells. *J Virol* **81**, 10123-36.

**Stagno, S., Pass, R. F., Dworsky, M. E. and Alford, C. A.** (1983). Congenital and perinatal cytomegalovirus infections. *Semin Perinatol* **7**, 31-42.

**Stanton, R. J., McSharry, B. P., Armstrong, M., Tomasec, P. and Wilkinson, G. W.** (2008). Re-engineering adenovirus vector systems to enable high-throughput analyses of gene function. *Biotechniques* **45**, 659-62, 664-8.

**Stenberg, R. M., Fortney, J., Barlow, S. W., Magrane, B. P., Nelson, J. A. and Ghazal, P.** (1990). Promoter-specific trans activation and repression by human cytomegalovirus immediate-early proteins involves common and unique protein domains. *J Virol* **64**, 1556-65.

- Stenberg, R. M., Thomsen, D. R. and Stinski, M. F.** (1984). Structural analysis of the major immediate early gene of human cytomegalovirus. *J Virol* **49**, 190-9.
- Stenberg, R. M., Witte, P. R. and Stinski, M. F.** (1985). Multiple spliced and unspliced transcripts from human cytomegalovirus immediate-early region 2 and evidence for a common initiation site within immediate-early region 1. *J Virol* **56**, 665-75.
- Tanaka, K., Zou, J. P., Takeda, K., Ferrans, V. J., Sandford, G. R., Johnson, T. M., Finkel, T. and Epstein, S. E.** (1999). Effects of human cytomegalovirus immediate-early proteins on p53-mediated apoptosis in coronary artery smooth muscle cells. *Circulation* **99**, 1656-9.
- Tang, J., Wu, S., Liu, H., Stratt, R., Barak, O. G., Shiekhatter, R., Picketts, D. J. and Yang, X.** (2004). A novel transcription regulatory complex containing death domain-associated protein and the ATR-X syndrome protein. *J Biol Chem* **279**, 20369-77.
- Tang, Q. and Maul, G. G.** (2003). Mouse cytomegalovirus immediate-early protein 1 binds with host cell repressors to relieve suppressive effects on viral transcription and replication during lytic infection. *J Virol* **77**, 1357-67.
- Tavalai, N., Papior, P., Rechter, S., Leis, M. and Stamminger, T.** (2006). Evidence for a role of the cellular ND10 protein PML in mediating intrinsic immunity against human cytomegalovirus infections. *J Virol* **80**, 8006-18.
- Tavalai, N., Papior, P., Rechter, S. and Stamminger, T.** (2008). Nuclear domain 10 components promyelocytic leukemia protein and hDaxx independently contribute to an intrinsic antiviral defense against human cytomegalovirus infection. *J Virol* **82**, 126-37.
- Taylor, J. L., Unverrich, D., O'Brien, W. J. and Wilcox, K. W.** (2000). Interferon coordinately inhibits the disruption of PML-positive ND10 and immediate-early gene expression by herpes simplex virus. *J Interferon Cytokine Res* **20**, 805-15.
- Tomasec, P., Wang, E. C., Groh, V., Spies, T., McSharry, B. P., Aicheler, R. J., Stanton, R. J. and Wilkinson, G. W.** (2007). Adenovirus vector delivery stimulates natural killer cell recognition. *J Gen Virol* **88**, 1103-8.
- Tong, C. Y.** (1997). Diagnosis of cytomegalovirus infection and disease. *J Med Microbiol* **46**, 717-9.
- Venkataraman, G. M., Suci, D., Groh, V., Boss, J. M. and Spies, T.** (2007). Promoter region architecture and transcriptional regulation of the genes for the MHC class I-related chain A and B ligands of NKG2D. *J Immunol* **178**, 961-9.
- Wang, E. C., Taylor-Wiedeman, J., Perera, P., Fisher, J. and Borysiewicz, L. K.** (1993). Subsets of CD8+, CD57+ cells in normal, healthy individuals: correlations with human cytomegalovirus (HCMV) carrier status, phenotypic and functional analyses. *Clin Exp Immunol* **94**, 297-305.
- Watanabe, S., Arima, K., Nishioka, M., Yoshino, S., Hasui, H. and Fujikawa, M.** (1997). Comparison between sporadic cytomegalovirus hepatitis and Epstein-Barr virus hepatitis in previously healthy adults. *Liver* **17**, 63-9.
- Wathen, M. W., Thomsen, D. R. and Stinski, M. F.** (1981). Temporal regulation of human cytomegalovirus transcription at immediate early and early times after infection. *J Virol* **38**, 446-59.
- White, E. A., Clark, C. L., Sanchez, V. and Spector, D. H.** (2004). Small internal deletions in the human cytomegalovirus IE2 gene result in nonviable recombinant viruses with differential defects in viral gene expression. *J Virol* **78**, 1817-30.

**White, E. A. and Spector, D. H.** (2005). Exon 3 of the human cytomegalovirus major immediate-early region is required for efficient viral gene expression and for cellular cyclin modulation. *J Virol* **79**, 7438-52.

**White, K. L., Slobedman, B. and Mocarski, E. S.** (2000). Human cytomegalovirus latency-associated protein pORF94 is dispensable for productive and latent infection. *J Virol* **74**, 9333-7.

**Wiebusch, L., Uecker, R. and Hagemeyer, C.** (2003). Human cytomegalovirus prevents replication licensing by inhibiting MCM loading onto chromatin. *EMBO Rep* **4**, 42-6.

**Wilkinson, G. W., Akrigg, A. and Greenaway, P. J.** (1984). Transcription of the immediate early genes of human cytomegalovirus strain AD169. *Virus Res* **1**, 101-6.

**Wilkinson, G. W., Kelly, C., Sinclair, J. H. and Rickards, C.** (1998). Disruption of PML-associated nuclear bodies mediated by the human cytomegalovirus major immediate early gene product. *J Gen Virol* **79** ( Pt 5), 1233-45.

**Wilkinson, G. W., Tomasec, P., Stanton, R. J., Armstrong, M., Prod'homme, V., Aicheler, R., McSharry, B. P., Rickards, C. R., Cochrane, D., Llewellyn-Lacey, S. et al.** (2008). Modulation of natural killer cells by human cytomegalovirus. *J Clin Virol* **41**, 206-12.

**Woodhall, D. L., Groves, I. J., Reeves, M. B., Wilkinson, G. and Sinclair, J. H.** (2006). Human Daxx-mediated repression of human cytomegalovirus gene expression correlates with a repressive chromatin structure around the major immediate early promoter. *J Biol Chem* **281**, 37652-60.

**Wu, J., Chalupny, N. J., Manley, T. J., Riddell, S. R., Cosman, D. and Spies, T.** (2003). Intracellular retention of the MHC class I-related chain B ligand of NKG2D by the human cytomegalovirus UL16 glycoprotein. *J Immunol* **170**, 4196-200.

**Yu, D., Silva, M. C. and Shenk, T.** (2003). Functional map of human cytomegalovirus AD169 defined by global mutational analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 12396-401.

**Yurochko, A. D., Hwang, E. S., Rasmussen, L., Keay, S., Pereira, L. and Huang, E. S.** (1997). The human cytomegalovirus UL55 (gB) and UL75 (gH) glycoprotein ligands initiate the rapid activation of Sp1 and NF-kappaB during infection. *J Virol* **71**, 5051-9.

**Zhang, Z., Huong, S. M., Wang, X., Huang, D. Y. and Huang, E. S.** (2003). Interactions between human cytomegalovirus IE1-72 and cellular p107: functional domains and mechanisms of up-regulation of cyclin E/cdk2 kinase activity. *J Virol* **77**, 12660-70.

**Zhu, H., Cong, J. P. and Shenk, T.** (1997). Use of differential display analysis to assess the effect of human cytomegalovirus infection on the accumulation of cellular RNAs: induction of interferon-responsive RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 13985-90.

**Γερμένης, Α. Ε.** (2000). Ιατρική Ανοσολογία. Αθήνα: Παπαζήση ΑΕΒΕ.

***Παράρτημα***





Contents lists available at ScienceDirect

## European Journal of Cell Biology

journal homepage: [www.elsevier.de/ejcb](http://www.elsevier.de/ejcb)

# Differential relocation and stability of PML-body components during productive human cytomegalovirus infection: Detailed characterization by live-cell imaging

Panagiota Dimitropoulou<sup>a</sup>, Richard Caswell<sup>b</sup>, Brian P. McSharry<sup>c</sup>, Richard F. Greaves<sup>d</sup>,  
Demetrios A. Spandidos<sup>a</sup>, Gavin W.G. Wilkinson<sup>c</sup>, George Sourvinos<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Virology, Faculty of Medicine, University of Crete, Heraklion 71003, Crete, Greece

<sup>b</sup> Cardiff School of Biosciences, Cardiff University, Cardiff, Wales, United Kingdom

<sup>c</sup> Department of Infection, Immunity and Biochemistry, Tenovus Building, Cardiff University, Heath Park, Cardiff CF14 4XN, United Kingdom

<sup>d</sup> Department of Virology, Division of Investigative Science, Imperial College Faculty of Medicine, St Mary's Campus, Norfolk Place, London W2 1PG, United Kingdom

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 5 March 2010

Received in revised form 14 May 2010

Accepted 26 May 2010

## Keywords:

HCMV

IE1-72K

ND10

PML

Sp100

hDaxx

STAT1

STAT2

Condensed chromatin

Live-cell microscopy

## ABSTRACT

In controlling the switch from latency to lytic infection, the immediate early (IE) genes lie at the core of herpesvirus pathogenesis. To image the 72 kDa human cytomegalovirus (HCMV) major IE protein (IE1-72K), a recombinant virus encoding IE1 fused with EGFP was constructed. Using this construct, the IE1-EGFP fusion was detected at ND10 (PML-bodies) within 2 h post infection (p.i.) and the complete disruption of ND10 imaged through to 6 h p.i. HCMV genomes and IE2-86K protein could be detected adjacent to the slowly degrading IE1-72K/ND10 foci. IE1-72K associates with metaphase chromatin, recruiting both PML and STAT2. hDaxx, STAT1 and IE2-86K did not re-locate to metaphase chromatin; the fate of hDaxx is particularly important as this protein contributes to an intrinsic barrier to HCMV infection. While IE1-72K participates in a complex with chromatin, PML, STAT2 and Sp100, IE1-72K releases hDaxx from ND10 yet does not appear to remain associated with it.

© 2010 Elsevier GmbH. All rights reserved.

## Introduction

Human cytomegalovirus (HCMV) is the prototype member of the *Betaherpesvirinae* (family *Herpesviridae*), the major viral cause of congenital malformation and is associated with a wide range of clinical disease, particularly in immunocompromised individuals. However, HCMV is a ubiquitous virus and the vast majority of infections is well tolerated. As with other herpesviruses, primary infection is followed by lifelong persistence that must be continuously restrained by host immune surveillance. Myeloid progenitor cells appear to be the primary site of latency/persistence, with virus reactivation being associated with differentiation into macrophages or dendritic cells. *In vivo*, virus replication can be detected in a wide range of cell types (Sinzger et al., 1995).

By definition, the immediate early (IE) genes are expressed first and are responsible for activating the transcription of HCMV early genes. IE2-86K encodes a powerful, promiscuous transcriptional trans-activator that plays the major role in advancing the tran-

scriptional cascade (Marchini et al., 2001; Pizzorno et al., 1988). To establish an environment compatible with efficient virus replication, IE gene expression acts to counter intrinsic, innate and adaptive host immune defenses. UL36 and UL37 inhibit apoptosis (Goldmacher et al., 1999; Skaletskaya et al., 2001), IRS1/TRS1 suppress the interferon response (Child et al., 2004) while US3 downregulates cell surface expression of MHC class I gene expression (Ahn et al., 1996). While the 72 kDa major IE protein (encoded by IE1) is not essential for virus replication *in vitro*, an IE1 (exon 4) deletion mutant exhibits a growth defect at low multiplicity of infection (Greaves and Mocarski, 1998; Mocarski et al., 1996). The HCMV IE1-72K has pleiotropic functions, it upregulates its own promoter (Cherrington and Mocarski, 1989), enhances transcriptional activation by IE2-86K (Malone et al., 1990), antagonizes histone deacetylation (Nevels et al., 2004; Reeves et al., 2006), is a kinase capable of autophosphorylation in addition to targeting E2F-1-3, p107 and p130 (Pajovic et al., 1997), promotes cell cycle progression (Castillo et al., 2000; Fortunato et al., 2002), suppression of the interferon response (Boyle et al., 1999; Browne et al., 2001; Navarro et al., 1998; Simmen et al., 2001; Zhu et al., 1997) and disruption of ND10 (Ahn et al., 1998; Ahn and Hayward, 1997; Kelly et al., 1995; Koriath et al., 1996; Wilkinson et al., 1998). ND10 are punctate

\* Corresponding author.

E-mail address: [sourvino@med.uoc.gr](mailto:sourvino@med.uoc.gr) (G. Sourvinos).

intranuclear bodies associated with the tumour suppressor protein PML, and are also known as PML-bodies or PML oncogenic domains (PODS).

Herpesvirus genomes are deposited adjacent to ND10 immediately following infection, and this is the site at which virus transcription and DNA replication are initiated (Ahn et al., 1999; Everett et al., 2003; Ishov and Maul, 1996; Ishov et al., 1997; Maul et al., 1996; Sourvinos and Everett, 2002; Sourvinos et al., 2007). ND10 are dynamic intranuclear domains bound to the nuclear matrix, implicated in cellular transcription, chromatin structure, DNA repair, mitosis and apoptosis (Bernardi and Pandolfi, 2003; Dellaire and Bazett-Jones, 2004). While they are defined by the presence of PML, cellular proteins that have been associated with ND10 include: Sp100, hDaxx, SUMO-1, p53, STAT1, STAT2, ATRX (Choi et al., 2006; Ishov et al., 2004; Lukashchuk et al., 2008; Negorev and Maul, 2001; Paulus et al., 2006; Tang et al., 2004). Interestingly, PML is an interferon-inducible protein and many DNA viruses impact on the integrity of ND10. PML-bodies are now recognized to constitute an intrinsic barrier to virus infection. In this context, RNAi knockdown of either PML or hDaxx significantly enhanced HCMV or HSV-1 replication (Everett, 2006; Lukashchuk et al., 2008; Tavalai et al., 2006; Tavalai et al., 2008).

Besides its interaction with ND10, IE1-72K is also known to associate with condensed chromatin in HCMV-infected cells during mitosis (Ahn et al., 1998; Lafemina et al., 1989; Wilkinson et al., 1998). Exactly how the targeting and overt physical disruption of PML-bodies together with IE1's association with mitotic chromatin relate to its roles in promoting virus replication have yet to be determined. In this study, IE1-72K targeting and disruption of ND10 immediately following infection, together with the close association with both IE2-86K and the HCMV parental genomes were visualized in lytic infection. Live-cell imaging with an HCMV recombinant encoding an IE1-EGFP fusion protein clearly demonstrated IE1-72K associated with PML, Sp100 and STAT2 on metaphase chromatin, but not with hDaxx or STAT1. The dynamic and differential re-organization of ND10 components to cellular chromatin (PML, STAT2), degradation (Sp100) or release into the nucleoplasm (hDaxx) can be expected to relate mechanistically with IE1's functional role in regulating gene expression and preparing the cell for infection.

## Materials and methods

### Plasmids

For the construction of IE1 (exon 4)-EGFP fusion, the plasmid pON2512 (Gawn and Greaves, 2002) was initially used, containing a HCMV Towne strain DNA fragment from *Bgl*III site in exon 4 to *Sall* site downstream of exon 5 of the *ie1/ie2* locus. Site-directed mutagenesis was carried out using the oligonucleotide 5' TAT ATA CAA TAG **GTA CCT GGT CAG CCT TGC** 3' (mutagenic bases in bold) to remove the stop codon of exon 4 and simultaneously introduce a unique *Kpn*I site, to generate the plasmid pON2512Kpn. In parallel, the EGFP coding sequence was excised from plasmid pEGFP-N1 (Clontech) after digestion with *Not*I restriction enzyme followed by treatment with Klenow fragment and further digestion of the vector with *Kpn*I. The pON2512Kpn was digested at the novel *Kpn*I site and at the *Bst*I 1071 site located between the end of exon 4 coding sequence and *ie1* poly A signal, and subsequently was ligated in frame with EGFP fragment to form pON2512Kpn-GFP. The latter was digested with *Bgl*III and at the *Xba*I site located immediately downstream of *Sall* site and cloned into the same sites of pG303. pG303 contains the entire MIEP region, and upstream ORFs UL127–UL130 from Towne, on a 7.4 kb *Sall* fragment, generating pG303-EGFP. Subsequently, the entire *ie1-ie2* coding region was

sequenced in this plasmid, showing that no unexpected mutations had been introduced either during the site-directed mutagenesis or subsequent sub-cloning steps.

Plasmid pEGFP-IE1 was generated after fusion of the *ie1* gene derived from the pGEX-3X-IE1 (Caswell et al., 1993) to the Clontech vector pEGFP-C2. The autofluorescent expression vector pHcRed1-H2A was constructed after PCR amplification of the H2A gene and its insertion into the *EcoRV* site of the pBlueScript KS vector (Stratagene, La Jolla, CA). Subsequently, the *Xho*I-*Eco*RI fragment was excised and ligated into the same sites of the vector pHcRed1-N1/1 (Clontech) to create pHcRed1-H2A. For construction of a vector expressing IE1 fused to mRFP1, the IE1 coding sequence was amplified from pGEX-3X-IE1 by PCR using the primers: Forward 5' AAGAGAATTCATGGAGTCTCTGCAAGAG 3' and Reverse 5' CCTTGAATTCTTACTGGTCAGCCTTGCTTC 3', containing *Eco*RI restriction sites. The purified PCR product was subsequently cloned into the *Eco*RI site of the pRSET<sub>B</sub>mRFP1 vector, expressing the monomeric red fluorescent protein, to produce pRSET<sub>B</sub>mRFP1-IE1. STAT1 and STAT2 cDNAs were cloned in fusion with mCherry under the control the HCMV MIEP using recombinering technology as described (Stanton et al., 2008).

The expression vectors pEGFP-IE2 and pmCherrySp100 (Sourvinos et al., 2007) as well as pECFP-PML (Everett et al., 2003) have been described previously.

For transfection experiments, primary human foreskin fibroblasts (HFFs), mChSp100 cells or HeLa cells were seeded either on glass coverslips or into four-well, chambered coverglass units with coverslip quality glass bottoms (Lab-Tek; Nunc). For transient expression assays, DNA (1 µg/well) was introduced in subconfluent cells using the TransPEI transfection reagent (Eurogentec, Belgium) according to the manufacturer's instructions.

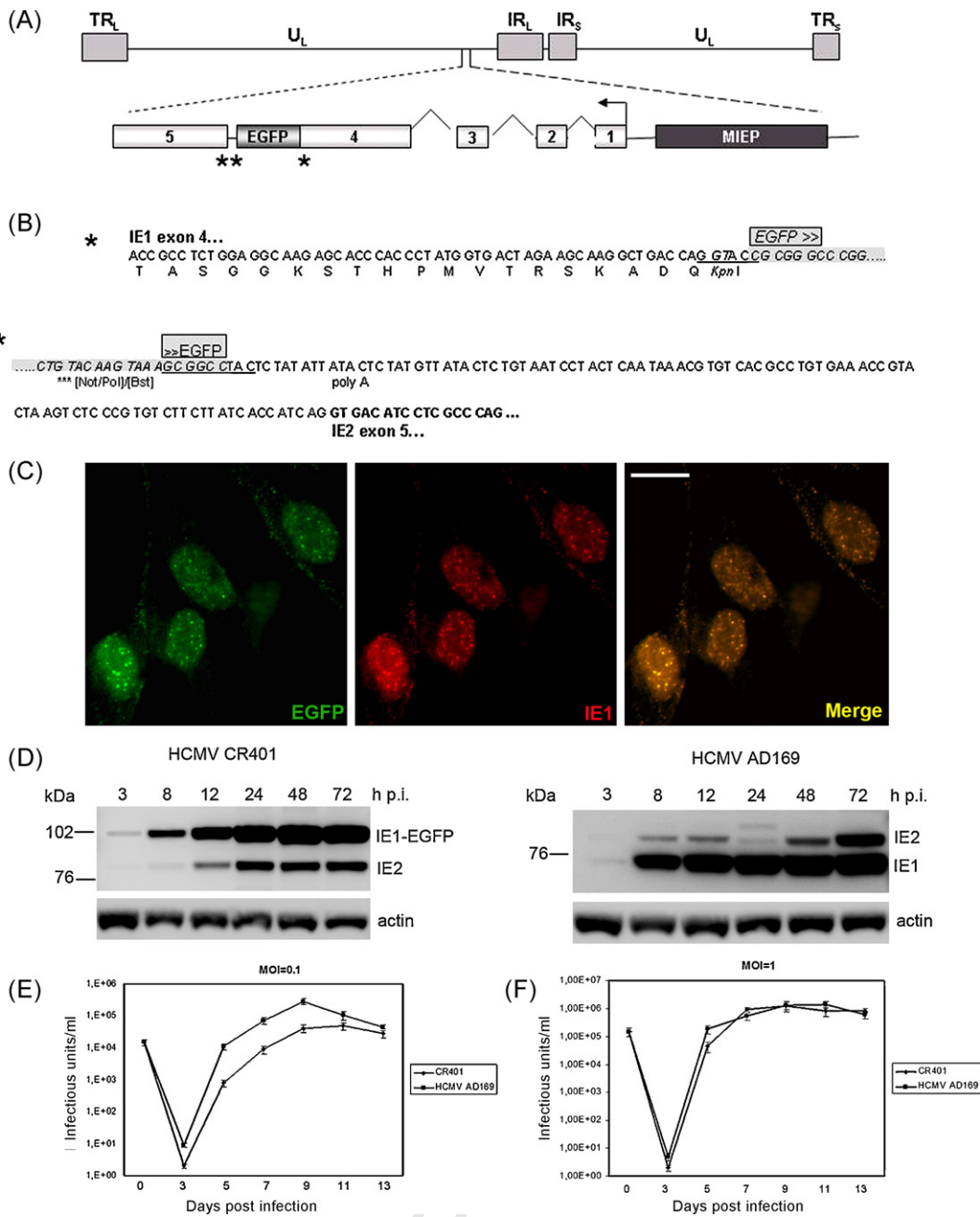
### Cells and viruses

HFF and HeLa cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (Biosera, UK) supplemented with 10% fetal calf serum. HFFs stably expressing the Sp100A isoform fused to the monomeric red autofluorescent protein mCherry were maintained as previously described (Sourvinos et al., 2007). HFFs with a stable small interfering RNA-mediated kd of PML were cultured in Dulbecco minimal essential medium supplemented with 10% fetal calf serum and 5 µg of puromycin/ml (kind gift of Thomas Stamminger, University Erlangen-Nürnberg, Germany (Tavalai et al., 2006)). The wild-type HCMV strain AD169 as well as HCMV AD169/IE2-EGFP (Sourvinos et al., 2007) was also employed.

Virus plaque assays were performed on HFFs according to standard protocols. To characterize the growth properties of the CR401 virus, single-step growth curves were performed in parallel with wt HCMV AD169 and the viral titres were determined via IE1 staining (Andreoni et al., 1989).

### Bacterial artificial chromosome (BAC) generation and reconstitution of the HCMV BAC virus

BAC DNAs were propagated as previously described (Borst et al., 1999). The BAC plasmid pHB5 (Borst et al., 1999) was used for the construction of the CR401 virus, as follows. The *ie1*-exon 4 was removed from pHB5 after digestion with *Acc*I, generating an intermediate exon 4-deleted BAC. A *Bgl*III-*Xho*II fragment from pG303-EGFP, including EGFP sequences and flanking regions of *ie1* and *ie2* genes was sub-cloned between *Bam*HI and *Sall* sites of shuttle vector pKOV-KanF (Lalioi and Heath, 2001). Co-integrants between this vector and pHB5 BAC were isolated and then resolved in DH10B bacteria, according to the method of Lalioi and Heath (2001). The structure of the resultant recombinant BACs carrying



**Fig. 1.** Construction and characterization of the HCMV CR401 virus. (A) Schematic representation of the HCMV genome region in which the *ie1*-exon 4-EGFP coding sequence was inserted. (B) The asterisks show the sequences between *ie1*-exon 4 and the EGFP coding sequence as well as between EGFP ORF and *ie2*-exon 5. (C) Subcellular **co-localization** of IE1 (red) and EGFP (green) detected by indirect-immunofluorescence assays in CR401-infected HFF 3 h p.i. (D) Kinetics of IE viral antigen expression. Viral immediate-early antigen IE1-72K and IE2-86K were detected in both HCMV CR401 and wt HCMV AD169-infected HFF at MOI = 1 by **Western blotting** at the indicated time points. (E and F) HFF cells were infected in parallel at M.O.I. = 0.1 and M.O.I. = 1 with viral inocula of wt HCMV AD169 (filled rectangles) or CR401 (filled diamonds) which were standardized for equal IE1 expression at 24 h p.i. The virus progeny in the supernatants of infected cell cultures were harvested at different time points p.i. as indicated, followed by quantification of the viral load via **IE1 fluorescence**. Error bars indicate the standard deviation derived from three independent **experiments** (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.).

the *ie1*-EGFP fusion were verified by FIGE, to yield BAC CR401 (Fig. 1 A and B). The recombinant CR401 virus was reconstituted as previously described (Reboredo et al., 2004).

### Immunofluorescence and Western blot

The HCMV IE1 and IE2 gene products were detected using monoclonal antibodies against IE1-72K (BS500) and IE2-86K (SMX) as previously described (Plachter et al., 1993). For the detection of endogenous PML, Sp100, hDaxx, STAT1 and STAT2 the monoclonal antibodies PML (H-238), Sp100 (H-60), Daxx (M-

112), STAT1 (H-95) and STAT2 (H-190) (rabbit polyclonal) from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) were used, respectively. Sp100 was detected in Western blots using a rabbit polyclonal anti-SP100 antibody GH3 (kind gift of Hans Will, Heinrich-Pette Institute, Germany (Milovic-Holm et al., 2007)). The monoclonal antibody (MAb) Ac-15 which recognizes  $\beta$ -actin was purchased from Chemicon International, Inc. Anti-mouse as well as anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies were obtained from Sigma while Alexa 488-, Alexa 555- and Cy3-conjugated secondary antibodies were purchased from Molecular Probes.

For indirect-immunofluorescence analysis, primary HFF cells ( $1 \times 10^5$ ) were grown on coverslips for transient transfection or HCMV infection, respectively. The conditions for transfection of HFFs, as well as for fixation and immunodetection of viral and cellular proteins, were as previously described (Everett et al., 2003).

For Western blotting, extracts from infected cells were prepared in sodium dodecyl sulfate loading buffer, separated on sodium dodecyl sulfate-containing 8–15% polyacrylamide gels, and transferred to nitrocellulose membranes. Western blotting and chemiluminescence detection were performed as previously described (Everett et al., 2003).

#### Fluorescence in situ hybridization

Fluorescence in situ hybridization was performed according to a previously described protocol (Everett and Murray, 2005) with appropriate modifications for HCMV (Sourvinos et al., 2007). HFF cells were grown on 13-mm diameter glass coverslips and then infected with HCMV AD169 either at a multiplicity of infection of 0.1 PFU/cell or 1 PFU/cell.

#### Time-lapse microscopy of live cells

Cells were seeded into four-well, chambered coverglass units with coverslip quality glass bottoms (Lab-Tek; Nunc) at a density of  $1 \times 10^5$  cells per well the day before each experiment. Live cells were observed using the  $\times 63$  dry objective lens of a Leica DMIRE2 inverted fluorescence microscope equipped with a Leica DFC300 FX digital camera. The microscope stage was enclosed within a controlled environment of constant temperature, CO<sub>2</sub> and humidity in order to maintain cell viability during experiments. Excitation wavelength was controlled by mercury lamp illumination and a manual filter wheel equipped with filters suitable for EGFP, the monomeric red fluorescent protein mCherry and DAPI. The camera image acquisition was controlled by the IM50 software (Leica). Special care was taken in order to avoid overlap between channels by collecting the data from each channel sequentially and routing the emission signals through appropriate band pass filters. Single images or timed image sequences were exported as TIFF files from the IM50 software.

## Results

### Characterization of HCMV CR401

In order to visualize the IE1-72K protein directly during infection, the recombinant HCMV CR401 was generated by in-frame insertion of EGFP at the C-terminus of IE1 (Fig. 1A and B). In HCMV CR401-infected cells (3 h p.i.), IE1-GFP protein exhibited a diffuse nuclear distribution with focal concentrations at ND10 (Fig. 1C), similar to the staining pattern observed with IE1-72K in the parental virus (Kelly et al., 1995). Furthermore, staining with an IE1-specific antibody co-localized with EGFP fluorescence (Fig. 1C). Additionally, the EGFP-IE1 signal precisely co-localized with IE1-72K in cells infected with wild-type HCMV and co-transfected with pEGFP-IE1 (Fig. S1). The reduced relative mobility of IE1-GFP (100 kDa) to IE1 (72 kDa) was consistent with the predicted size increase associated with GFP fusion. The fusion protein was not only stable, but produced with similar kinetics and abundance to unmodified IE1 (Fig. 1D).

To characterize HCMV CR401, its growth properties were compared with strain AD169. At an M.O.I. of one, the growth kinetics of HCMV CR401 was identical to that of the parental virus. However, HCMV CR401 exhibited delayed kinetics and reduced peak yield virus at an M.O.I. of 0.1 (Fig. 1E and F). IE1-72K and IE2-86K are derived by differential splicing from the same transcriptional unit,

IE1-72K being encoded by exons 1, 2, 3, and 4 while the predominant IE2-86K transcript comprises exons 1, 2, 3 and 5. Expression of the predominant 86 kDa IE2 gene product was not overtly impaired by insertion of GFP insertion at this locus (Fig. 1D). By generating an HCMV recombinant encoding IE1-72K from its orthotopic position with a C-terminal GFP fusion, it becomes possible to image the major IE1-72K protein and its interaction with cellular proteins in the context of a productive infection.

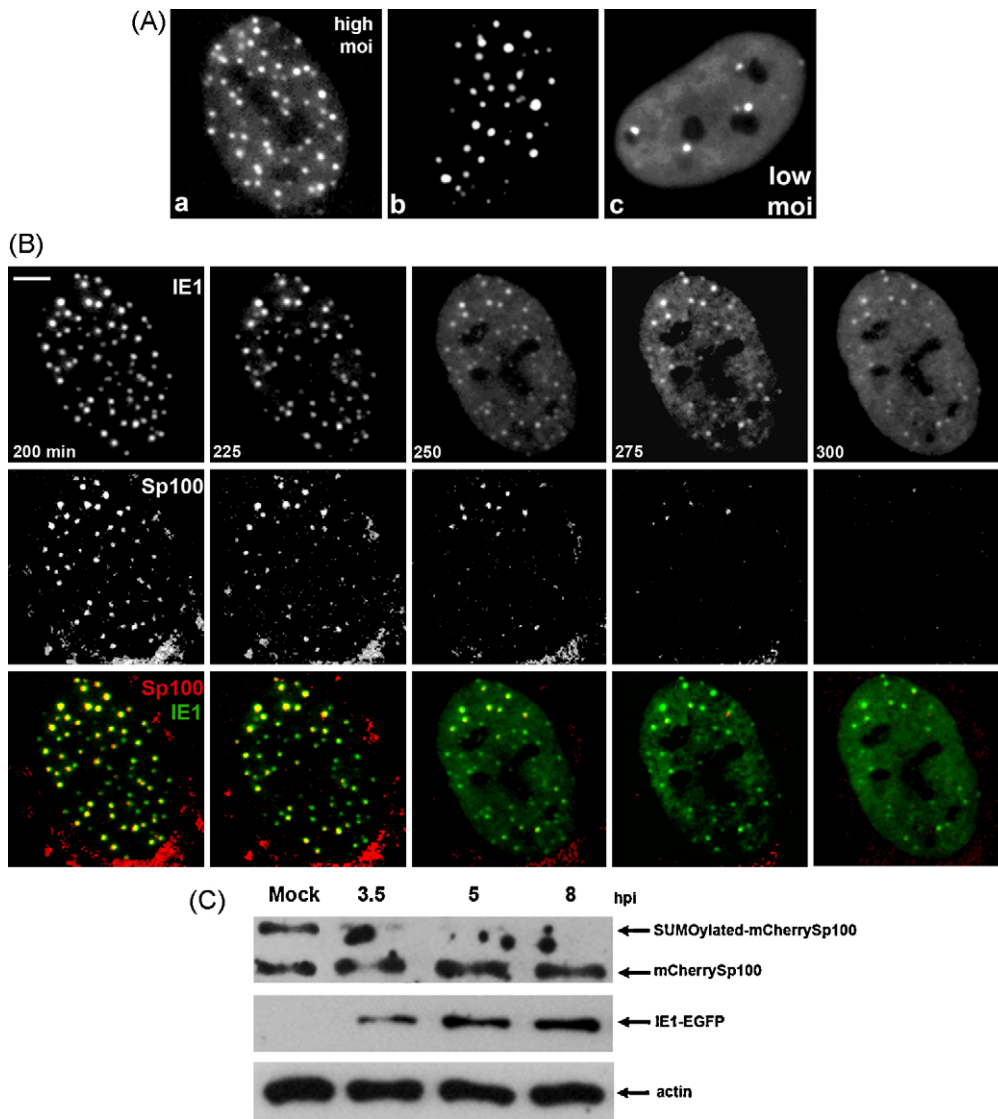
### Induction of PML dispersal and desumoylation by HCMV CR401

HCMV CR401 permits live-cell imaging of IE1-72K during infection, provides enhanced sensitivity of detection while eliminating potential artefacts associated with sample fixation and preparation. With HCMV CR401, IE1-EGFP was readily detected as early as 2 h p.i. and was predominantly associated with ND10, interspersed with diffuse staining in the majority of infected cells (Fig. S2A fixed cells, Fig. 2A a live-cell imaging). As the infection progressed PML was displaced from ND10, so that by 6 h p.i. endogenous PML was completely dispersed throughout the nucleoplasm in cells expressing IE1-EGFP (Fig. S2A (d–f)). While PML remains stable throughout infection, HCMV alters the extent of PML modification by SUMO adducts (Lee et al., 2004; Muller and Dejean, 1999). Sumoylation of PML at multiple sites produces a series of slower migrating forms of the protein (mock sample; Fig. S2B). IE1-72K is responsible for loss of sumoylated forms of PML during HCMV infections (Muller and Dejean, 1999) and this property was clearly retained by IE1-GFP in HCMV CR401 (Fig. S2B).

The rate of the IE1-72K redistribution to and from punctate foci was comparable at different M.O.I.s (data not shown). However, the number of IE1-72K foci was dependent on the multiplicity of the infection (compare Fig. 2A, a and c). Cells were analyzed from a large number of random fields captured 3 h p.i.; the average number of IE1-72K foci at M.O.I. = 1 was approximately three-fold higher ( $19 \pm 4$ ) than that at M.O.I. = 0.1 ( $7 \pm 2$ ). The finding that the amount of formation of IE1-72K foci is proportional to the M.O.I. suggests that viral or virally induced host factors might contribute to their formation.

### Imaging Sp100 as ND10 disperse in HCMV infection

Studies in fixed cells have shown that IE1-72K traffics to ND10 and causes cellular PML to be displaced, with both proteins redistributing to a nuclear-diffuse pattern (Ahn et al., 1998; Ahn and Hayward, 1997; Koriath et al., 1996; Wilkinson et al., 1998). By utilizing the EGFP tag in HCMV CR401, the dynamic interaction between IE1-72K and ND10 can be imaged in live, infected cells. Primary human fibroblasts stably expressing the ND10 protein Sp100 (isoform A) fused with a red (mCherry) fluorescent protein (mChSp100) were infected with CR401 and the localization of HCMV ie1 gene product and of the cellular Sp100 was analyzed by time-lapse microscopy. Fig. 2B presents a sequence of images of an individual live, infected cell during the course of the infection. The vast majority of IE1-EGFP co-localized with Sp100 in ND10 at 200 min p.i. and IE1 and Sp100 remained in close association, with minimal movement, throughout the sequence. Over time, IE1-EGFP changed from a focal to a nuclear-diffuse distribution as ND10 disintegrated. Remarkably, with the disruption of ND10 and in contrast to the diffuse distribution of PML in the nucleus, the mChSp100 signal progressively faded in the nucleus. The rate of Sp100 elimination was comparable at different M.O.I.s as time-lapse experiments demonstrated. Given that Sp100 is a low-abundance protein (Negorev et al., 2006), we sought to investigate biochemically the effect of IE1-EGFP on Sp100 at early stages of the infection by Western blot in fibroblasts overexpressing the Sp100 protein fused to mCherry. As shown in Fig. 2C, HCMV CR401



**Fig. 2.** Dynamic nuclear redistribution of IE1 and imaging of Sp100 as ND10 disperse in live-infected cells. (A) HFF cells were infected with CR401 at M.O.I. = 1 and images were obtained by live-cell microscopy. IE1 displayed punctate foci, interspersed with a diffuse pattern in the nucleus (a), while in a proportion of infected cells IE1 was exclusively distributed in discrete intense dot-like structures (b) at 2 h p.i. The number of IE1 foci differed when cells were infected at M.O.I. = 0.1 (compare a and c). (B) Live human fibroblasts expressing mCherrySp100, infected with CR401 at M.O.I. = 1 were monitored at immediate early times after infection. The initially formed IE1 foci were dispersed during the course of a productive infection (200–300 min). Presented are selected double-labelled images that illustrate the dynamic dispersal of Sp100 by IE1 (bars, 10  $\mu$ m). (C) mCherrySp100 cells were infected with HCMV CR401 at MOI = 1 or were mock infected; cells were harvested at the indicated time points after virus adsorption and total cell proteins were analyzed by Western blotting.

infection resulted in the progressive abolishment the SUMO-1 modification of Sp100 and by 8 h p.i. the SUMO-1-Sp100 conjugate was barely detectable. The results from both time-lapse and biochemical analysis provide solid evidence regarding the fate of Sp100 during HCMV infection, showing that the SUMO-1 modified isoform of Sp100 is predominantly dispersed from ND10 in an IE1-72K-dependent-manner.

#### Rapid elimination of ND10 takes place only in the context of viral infection

IE1-72K alone is sufficient to cause disruption of ND10. A plasmid encoding the EGFP-IE1 fusion protein (pEGFP-IE1) was transfected in mChSp100 cells and images were acquired over time. During infections with HCMV CR401, efficient IE1-EGFP expression and degradation of the mChSp100 signal was observed by 6 h p.i. (Fig. S3A, row A). With DNA transfection, the IE1-EGFP signal was first detected after 9 h, at which time mChSp100 could readily be

detected in foci co-localized with IE1 (Fig. S3A, row B). The numbers of IE1 and Sp100 foci diminished progressively over time (Fig. S3A, rows C and D), and eventually disappeared (not shown). Within an individual cell, even after the majority of ND10 had been dispersed a number could be observed to persist (see arrows in Fig. S3A, row B), indicating a subset of ND10 were more resilient.

Subsequently, we quantified the association between IE1-72K and Sp100 by time-course analysis both after DNA transfection and CR401 infection of mChSp100 cells. In transfected cells, there was almost equal distribution at 9 h post-transfection of cells displaying either focal co-localization of IE1 and Sp100 and those showing punctate distribution of IE1 but with simultaneous dispersal of Sp100. Over the following 6 h, this pattern changed such that the majority of cells showed diffuse IE1 localization along with loss of Sp100 signal (Fig. S3Bi). Interestingly, in a few cells Sp100 foci remained intact until later times. In contrast, during productive infection with CR401 at two M.O.I.s, a similar pattern of redistribution of IE1 and Sp100 took place but over significantly shorter

periods (Fig. S3Bii and Fig. S3Biii). Thus, the mode of expression of IE1-72K has consequences for the subsequent effects of the protein in modifying the sub-nuclear environment. This time course is consistent with the HCMV major IE promoter (MIEP) being stimulated by virion components when delivered by the virus. Yet additional *de novo* HCMV-encoded functions could also influence events.

#### Subcellular localization of IE1-72K and HCMV parental genomes

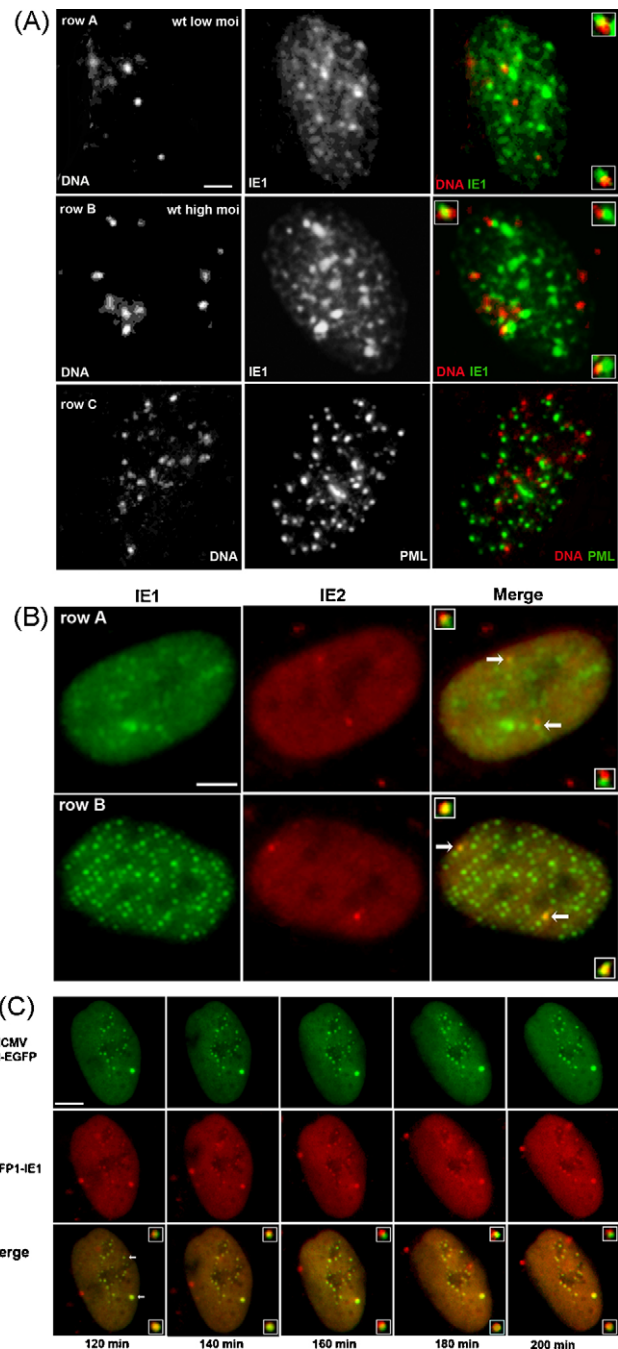
Fluorescent *in situ* hybridization was employed to detect HCMV genomic DNA within infected cells. Early during infection, nearly all HCMV CR401 viral DNA labelling was associated with IE1 foci (Fig. 3A, rows A and B). Viral DNA and IE1 foci did not precisely co-localize, but were juxtaposed or partially overlapped. Considering that at similar time points of infection, HCMV transcripts emanating from ND10-associated genomes have also been detected (Ishov et al., 1997; Maul and Negorev, 2008), we might assume that the low proportion of non-IE1-72K-associated genomes are transcriptionally inactive. A similar pattern was observed for HCMV DNA and PML (Fig. 3A, row C). There were clearly many more IE1 foci than HCMV genomes, although the ratio closed at increasing M.O.I.

#### Differential localization of IE1-72K and IE2-86K in live-infected cells

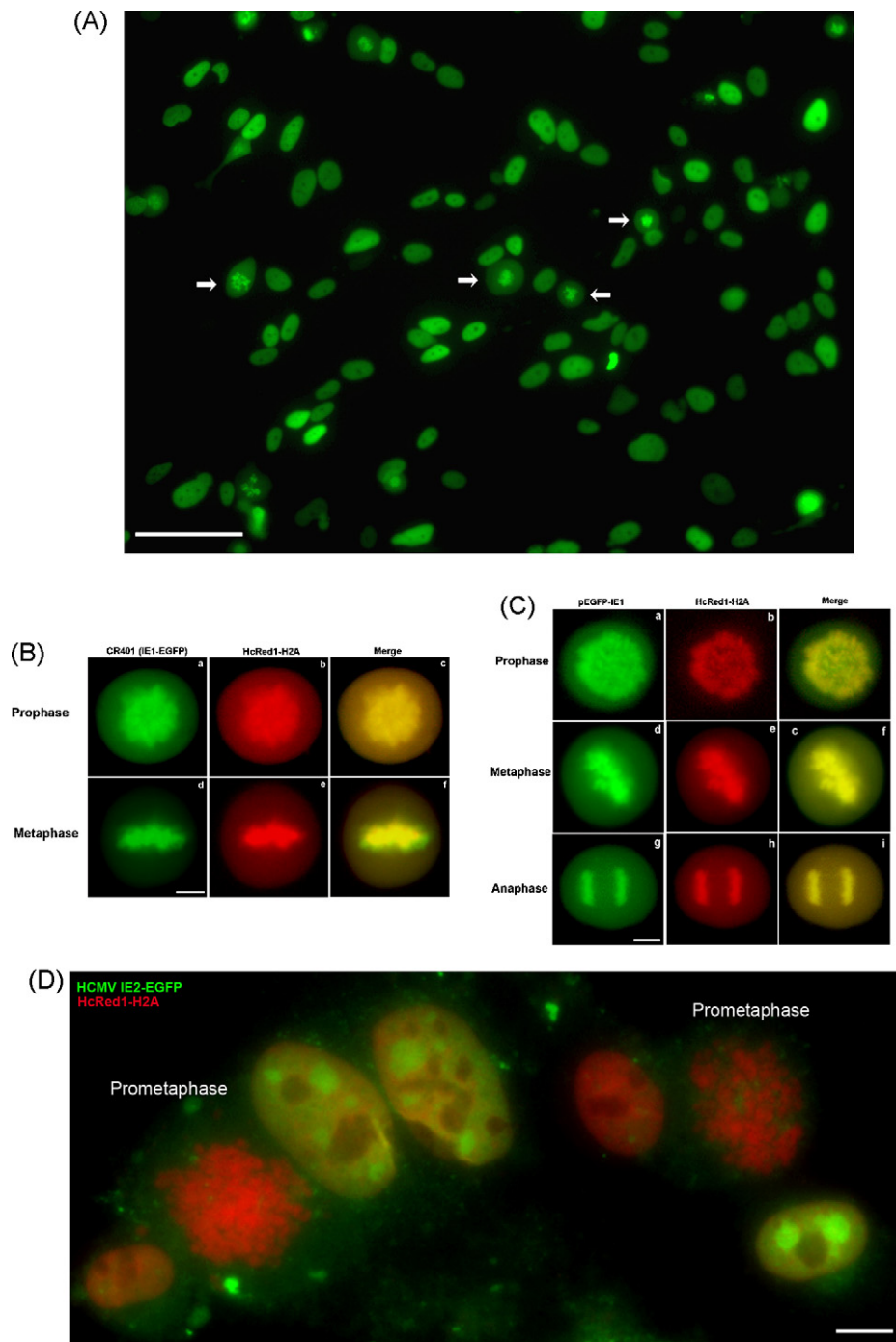
IE1-72K and IE2-86K act together as the central regulators of the viral transcriptional cascade and to modulate cellular gene expression. Immediately following infection IE1-72K co-localizes with ND10, IE2-86K traffics to ND10 but is found in juxtaposition rather than precisely co-localized. In HCMV CR401-infected cells, this juxtaposition was readily apparent when IE2-86K expression was detected by immunofluorescence (Fig. 5B). The relationship between ND10 and IE2-86K is dynamic (Sourvinos et al., 2007). We sought to image IE1-72K and IE2-86K simultaneously in productive infection. HFFs were first transfected with a plasmid encoding mRFP1-IE1 and subsequently infected with HCMV AD169/IE2-EGFP (M.O.I. = 1). Cells were followed from when IE2-86K was first detected (2 h p.i.; Fig. 3C). A majority of IE1 and IE2 foci were distinguishable, yet in close association. Interestingly, during the course of the infection, the punctate foci of the two proteins constantly changed relative positions. Detailed analysis at high magnification revealed a dynamic relationship, with IE1-72K and IE2-86K in juxtaposition for most of the infection but some of them rapidly fused to precise co-localizations for a limited period, followed by their segregation. These data are consistent with IE1-72K co-localizing with ND10 while IE2-86K molecules form distinct foci, corresponding to separate discrete structures that frequently associate with ND10-IE1 accumulations early after infection.

#### Recruitment of IE1-72K onto metaphase chromatin in live cells

In fixed cells, HCMV IE1-72K protein can be detected tethered to mitotic chromosomes either when expressed in isolation or by HCMV infection (Ahn et al., 1998; Lafemina et al., 1989; Wilkinson et al., 1998). When HCMV CR401-infected cultures were examined, IE1-EGFP labelled condensed chromatin of all infected cells in mitosis (Fig. 4A) and was observed to co-localize with histone H2A (Fig. 4B), beginning at about 12 h p.i. However, when followed by live-cell imaging, these cells failed to progress out of metaphase through cell division, not allowing HCMV to spread in infected cells by cell division with continued expression of the major transactivating viral proteins. Therefore, the blockade of these cells on mitosis renders them non-productive, in contrast to MCMV, when despite the presence of IE1/IE3-GFP, the infected cells can progress through several cell cycles (Maul and Negorev, 2008).



**Fig. 3.** Differential localization of IE1 with HCMV parental genomes and IE2 during the immediate early phase of infection. (A) Combined *in situ* hybridization of HCMV DNA and immunostaining of IE1 of CR401-infected HFFs, either at M.O.I. = 0.1 (row A) or M.O.I. = 1 (row B), demonstrated an association between the foci at 2.5 h p.i., analogous to association of viral DNA to ND10 (row C). (B) HFFs were infected with CR401 and stained for IE1 and IE2 at early times post infection. All IE2 foci were either associated or partially co-localized with IE1 domains. The infection in row A has been terminated slightly later (4 h p.i.) than that in row B (3 h p.i.) and thus IE1 appears as punctate foci interspersed with diffuse staining. (C) *In vivo* dynamics of IE1 in relation to that of IE2. HFFs transfected with plasmid mRFP1-IE1 were subsequently superinfected with HCMV AD169/IE2-EGFP at M.O.I. = 1 and monitored at early times. Selected images are presented, illustrating a dynamic pattern of association where, within minutes, IE1 and IE2 foci constantly change relative positions, interplaying between co-localization and juxtaposition. The inset images show regions of cells at higher magnification (bars, 10  $\mu$ m). In all cases, images shown are representative of the population of cells observed in experiments.

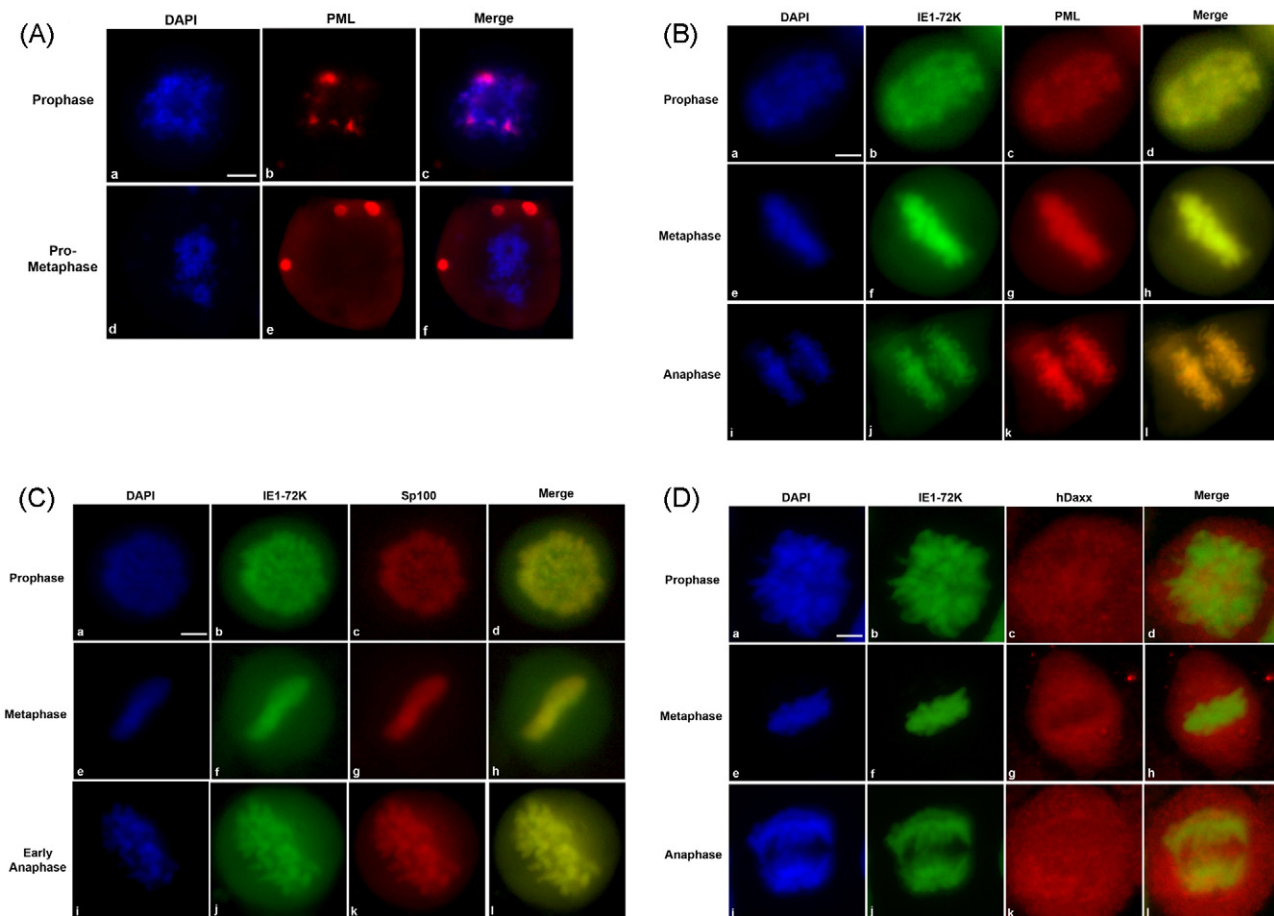


**Fig. 4.** Live-cell visualization of IE1 recruited onto metaphase chromatin. (A) Unsyncronized HFFs were infected with HCMV CR401 at M.O.I. = 1 and images were captured in live cells 72 h p.i. Arrows indicate the chromatin-associated localization of IE1 (bar, 10  $\mu$ m). (B) IE1-EGFP fluorescence exhibits a labelling pattern identical to that of H2A throughout mitosis in CR401-infected fibroblasts expressing HcRed1-H2A. (C) HeLa cells were transiently co-transfected with pEGFP-IE1 and pHcRed1-H2A and monitored through mitosis. Live-cell imaging revealed that IE1 was clearly associated with condensed chromatin at various stages of cell division. (D) Localization of HCMV IE2 protein during mitosis. Normal fibroblasts were infected with HCMV AD169/IE2-EGFP at MOI = 1 and transfected with pHcRed1-H2A. In cells entering mitosis (second and sixth, left to right), IE2 was mainly diffuse in the nucleoplasm and not associated with metaphase chromatin. Note the well-formed viral replication compartments (third, fourth, seventh cell, left to right) as indicated by the recruitment of IE2 (72 h p.i.).

Since HCMV arrests cell cycle progression, the association of IE1-72K with metaphase chromatin is more readily followed in transfected cells (Nevels et al., 2004; Reinhardt et al., 2005). At the beginning of chromatin condensation, in prophase, H2A became associated with condensing chromosomes (Fig. 4C, b) while at the same mitotic phase, IE1-72K changed its initial diffuse nuclear localization to a condensed pattern which was identical to the H2A pattern (Fig. 4C, a). The intensive fluorescence of both IE1-

72K and H2A associated with chromosomes became more evident in prometaphase and later on in metaphase (Fig. 4C, d-f). Remarkably, IE1-72K and H2A continued to co-migrate, being associated with mitotic chromosomes until the later stages of cell division (Fig. 4C, g-i). EGFP alone failed to bind to metaphase chromatin (not shown).

IE1 and IE2 share exons 1-3 (Fig. 1A), their encoded proteins both traffic to ND10 and exhibit a diffuse nuclear distribution



**Fig. 5.** IE1 recruits PML and Sp100 but not hDaxx onto condensed chromatin during mitosis in HCMV-infected cells. HFF cells were either mock infected (A) or infected with wild-type AD169 (B–D) and fixed 72 h p.i. The cells were immunostained for IE1-72K, PML, Sp100 and Daxx, followed by incubation with a mouse-specific Alexa Fluor 488 conjugate, a rabbit-specific Cy3 conjugate, and DAPI. (A) PML forms irregular accumulations in mitotic mock-infected cells. (B) The expression of IE1-72K drastically changes the localization of PML during mitosis, which becomes associated with condensed chromatin. (C). Sp100 is recruited onto metaphase chromatin when IE1-72K is expressed. (D). hDaxx remains diffuse during mitosis despite the presence of IE1-72K. Note the exclusion pattern of hDaxx, particularly during metaphase (g), from the space occupied by the condensed chromosomes (bars, 10  $\mu\text{m}$ ).

through the early/late phases of infection. However, IE2-GFP clearly does not bind to metaphase chromatin (Fig. 4D). Even during interphase, the IE2-86K and histone H2A staining patterns were distinct.

The above experiments demonstrate that there is an apparent differentiation regarding mitotic progression, depending on the mode of IE1-72K expression. Although IE1-transfected cells can readily be followed through mitosis, this is not the case in HCMV-infected cell cultures, where cells tend to persist in extended prophase or metaphase and infected cells are yet to be detected in anaphase.

#### IE1-72K recruits PML, Sp100 but not hDaxx to mitotic chromatin

We sought to investigate the association of ND10-associated proteins with metaphase chromatin in live cells and during productive virus infection. In uninfected cells lacking IE1-72K, PML foci persist through in mitosis with PML persisting as irregular accumulations that were excluded from condensed chromatin (Fig. 5A). In prophase, the number of such foci per cell was generally fewer than ND10 during interphase, and decreased even further in prometaphase; PML domains must either fuse or disassemble during this process. In metaphase and anaphase, brighter PML aggregates tended to be located adjacent to the metaphase plate (Fig. 5A, d–f). These distributions of PML were maintained throughout mitosis until the earliest stages of G1 (data not shown).

In wild-type HCMV-infected cells, IE1-72K and endogenous PML associated with mitotic chromatin (Fig. 5B). When cells entered prophase, the localization patterns of IE1-72K (Fig. 5B, b) and PML were identical (Fig. 5B, c); this indicates that a significant proportion of IE1-72K remained chromosome-bound as cells entered mitosis. Chromatin association of IE1-72K and PML endured throughout mitosis (Fig. 5B, f–l). Similar tethering of IE-72K and PML onto metaphase chromosomes was also observed in transient co-expression assays of EGFP-IE1 and ECFP-PML in live transfected cells (see Supplementary Fig. S4, B), confirming that this association is specific and not due to the presence of the fluorophore tags. Our observations demonstrate that expression of IE1-72K alone is sufficient to drive PML association with mitotic chromatin.

Sp100 was also found to associate with chromatin during cell division, either in wild-type HCMV-infected cells (Fig. 5C) or after co-expression of its fluorescent version mCherry-Sp100 with EGFP-IE1 by DNA transfection (see Supplementary Fig. S4, C). Both proteins labelled condensing chromosomes in prophase and remaining associated throughout mitosis. In contrast, endogenous hDaxx was excluded from the space occupied by the mitotic chromosomes in wild-type HCMV-infected cells (Fig. 5D, c, g, k). Similarly, diffuse localization of hDaxx was also observed in transient co-expression assays of either EGFP-IE1 and mCherry-hDaxx (see Supplementary Fig. S4, D) or even after the additional over-expression of ECFP-PML (data not shown). These results indicate



IE1-72K may act to suppress the **recognized** interaction between PML and hDaxx so that during mitosis hDaxx fails to interact with PML or chromatin.

#### Spatial localization between HCMV IE1-72K, STAT1 and STAT2

IE1-72K inhibits the induction of type-1 interferon by formation of a physical complex with STAT1 and STAT2; furthermore STAT2 was shown by immunofluorescence to associate with mitotic chromatin in an IE1-expressing cell line (Krauss et al., 2009; Paulus et al., 2006). We therefore sought to investigate the spatial organization of STAT1 and STAT2 during productive infection by HCMV CR401. At early times of infection, both proteins translocated to the nucleus. While STAT1 migrated to foci in the nucleus, only a fraction **co-localized** with IE1-72K (Fig. 6A, a–c). In contrast, STAT2 **co-localization** with punctate forms of IE1-72K was comprehensive (Fig. 6A, g–i). Similar results were obtained with fixed and by **live-cell** imaging (Fig. 6A, d–f, j–i).

The function of IE1-72K was further tested in a human fibroblasts with a stable siRNA knockdown of PML, termed PML-kd cells (Tavalai et al., 2006). In PML-kd cells infected with CR401, both IE1-72K and STAT1 or STAT2 were displaced into **nuclear-diffuse** forms (Fig. 6B), consistent with PML being required for the punctate distribution of IE1-72K and STAT2 at early times of infection. Virus infection or interferon induction was required to relocalize STAT-1 and STAT-2 from the cytoplasm to the nucleus; EGFP-IE1 expression alone was not sufficient. In transient expression studies, EGFP-IE1 trafficked to the nucleus while both mCherry-STAT1 or mCherry-STAT2 remained cytoplasmic (Fig. 6C).

STAT2 associates with condensed chromatin in fixed cells continuously expressing IE1-72K and treated with interferon (Paulus et al., 2006). We tracked mCherry-STAT2 in living cells following infection with HCMV CR401, where IE1-EGFP and mCherry-STAT2 clearly co-localized at ND10. Strikingly, in the small proportion of cells undergoing mitosis, both IE1-72K and STAT2 both labelled condensed chromosomes (Fig. 6D). The predominant targeting of IE1-72K and STAT2 to metaphase chromosomes was evident from the early stages of mitosis (through to metaphase (Fig. 6D). Identical association between IE1-72K expressed by the wild-type HCMV and the endogenous STAT2 was also observed in fixed cells, confirming that the localization of the unlabelled proteins is not affected by the tags (see **Supplementary Fig. S5**). In contrast, STAT1 was excluded from mitotic chromatin even in the presence of IE1-72K (data not shown). These observations are consistent with a model in which HCMV infection induces activation of STAT2, but following transport of STAT2 to the nucleus it is sequestered by IE1-72K.

#### Discussion

The generation of recombinant viruses encoding both IE1-72K and IE2-86K EGFP fusion proteins now provides a robust technology to track expression from the HCMV major gene locus in real time. These viruses have widespread application in experimental models of virus latency/reactivation and evaluating antiviral compounds. In this study, we focussed primarily on IE1-72K interactions with ND10 component both during the very earliest stage (6 h) of HCMV productive infection, and in cells undergoing mitosis. **Live-cell** imaging avoids potential artefacts induced by cell fixation, **while** enabling gene expression, protein–protein interactions to be followed in time and space.

The growth properties of HCMV CR401 were characterized in detail prior to initiating imaging studies. While both the abundance and kinetics of IE1-72K-EGFP and IE2-86K expression were comparable with the parental virus strain, a modest reproducible growth

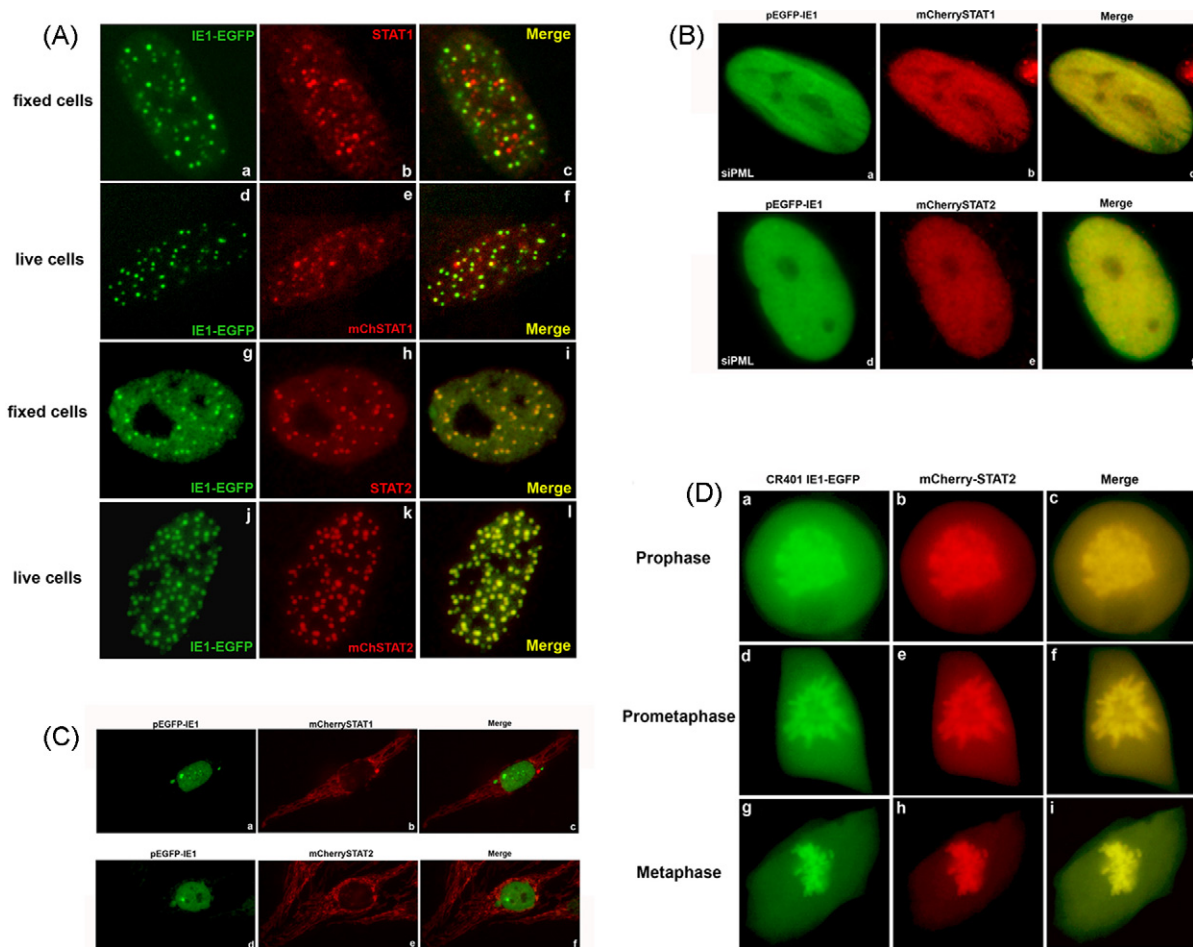
defect was detected but only when infection was performed at an **M.O.I. less than 1 PFU/cell**. The structure and regulation of the major IE transcriptional unit is complex with multiple splice variants and early/late transcripts also being derived from this region (Meier and Stinski, 1996). Insertion of a substantial sequence element (EGFP) in this complex may be expected to have some impact on RNA processing (White and Spector, 2005). Fusion of EGFP to the C-terminus of *ie1* could potentially impact on an IE1-72K function required for efficient replication.

Live-cell microscopy of HCMV CR401-infected cells imaged IE1-72K trafficking to ND10 by 2 h p.i. followed by the gradual yet comprehensive destruction of their integrity through to 6 h p.i.; during this process PML became desumoylated with similar kinetics compared to wild-type HCMV. The spatial organization of the parental genomes within the nucleus is a key element for the outcome of a viral infection. Our studies implicate IE1-72K in the formation of this nucleoprotein complex at very early times after infection (Fig. 3A). IE1 foci were positioned adjacent or partially **co-localized** with parental viral genomes in a mode reminiscent to the juxtaposition between HCMV parental genomes and ND10 (Ahn and Hayward, 1997; Ahn et al., 1999; Ishov et al., 1997; Sourvinos et al., 2007). The IE2-86K protein was also part of this viral nucleoprotein complex at early times of infection, although there were subtle differences between IE1-72K and IE2-86K localization. While these proteins are thought to act synergistically in the activation of transcription, our data indicates they are physically separated during infection, without any evidence of direct interaction, although both localize in the nucleus. Thus, from its earliest stages, virus infection must involve a structured assembly of viral proteins and DNA with respect to the cellular architecture, which is likely to be crucial for the progress of viral infection, common to the alpha- and beta-herpesviruses (Everett et al., 2003).

While PML persists in the nucleus after the ND10 disruption, Sp100 follows a distinct fate. When expressed in transient assays IE1-72K abrogates the covalent linkage of SUMO-1 to Sp100 and lower molecular-weight forms of Sp100 are retained (Muller and Dejean, 1999). The difficulties in visualizing the endogenous Sp100 preclude direct analysis of its spatial organization during an actual HCMV infection. The dispersal of Sp100, as observed by time-lapse microscopy, coupled with the loss of **sumoylated-Sp100** revealed by the biochemical analysis at early times of HCMV infection, further corroborates the previously described destruction of ND10-like Sp100 accumulations which are transiently formed early after infection in the apparent absence of PML, in an IE1-72K-dependent manner (Tavalai et al., 2006). During mitosis, Sp100 is not physically associated with condensed chromatin but rapidly diffuses into the mitotic nucleoplasm (Dellaire et al., 2006). IE1-72K expression proves to be a strong mediator which dramatically alters the trafficking of Sp100 and results in the establishment of novel interactions with metaphase chromatin, favouring or inhibiting functions of Sp100.

**Live-cell** imaging using the CR401 virus reproduced the observation (in fixed cells) that IE1-72K associates strongly with STAT2 during productive infection, and weakly with STAT1 (Huh et al., 2008; Krauss et al., 2009; Paulus et al., 2006). HCMV binding and infection is **recognized** to induce a strong interferon response that is moderated by virus-encoded immune evasion functions (Browne and Shenk, 2003; Browne et al., 2001). Nuclear transport of STAT2 was IE1-72K-independent, and thus IE1-72K acts to sequester STAT2 post-activation. The IE1-72K/STAT2/PML/Sp100 complex appears stable, as it is manifested by their co-association with mitotic chromatin. Stable interactions with IE1-72K would appear to correlate with sequestration and loss of function.

The functional significance of the differential accumulation of ND10 components onto metaphase chromatin during mitosis upon IE1-72K expression remains to be addressed. Unlike an **HCMV-**



**Fig. 6.** IE1, STAT1 and STAT2 localization upon HCMV infection. (A) HFFs were infected with CR401 virus at M.O.I. = 1 and immunostained for STAT1 (a–c) and STAT2 (g–i) at 2–3 h p.i. Images from live cells were also captured after transfection of HFFs with mCherry-STAT1 (d–f) and mCherry-STAT2 (j–i) and subsequent superinfection with CR401 at M.O.I. = 1 for 2.5 h p.i. (B) Diffuse localization of IE1 and STAT1 (a–c) or STAT2 (d–f) in transiently transfected PML-kd cells. (C) STAT1/2 proteins are localized in separate cellular compartments in the absence of viral infection. HeLa cells were co-transfected with pEGFP-IE1 and either mCherry-STAT1 (a–c) or mCherry-STAT2 (d–f). (D) Images from live mitotic CR401-infected HFFs, expressing mCherry-STAT2, show the recruitment of IE1 and STAT2 onto condensed chromosomes at different stages of cell division (a–i).

infected, an IE1-72K-expressing cell line will go through mitosis. Thus, an association of IE1-72K, PML and/or Sp100 with chromatin is not causing the mitotic block, rather a unique and efficient biomarker that reveals IE1-72K sequesters these functions en bloc. We believe an independent HCMV gene to be responsible, but its identification it is not trivial. We propose that IE1-72K takes PML, Sp100 and STAT-2 to cellular chromatin to sequester their function. We consider this an important event however, the reason for the association with chromatin is not clear. The association with chromatin *per se* is not 'crucial' as an HCMV IE1 mutant with a deletion in the chromatin-binding domain has no overt growth defect in fibroblasts *in vitro* (Reinhardt et al., 2005; Wilkinson et al., 1998). However, the effect may manifest in different cell type or *in vivo*. As regards STAT-2, the study in the context of a productive HCMV infection is particularly informative, as we have shown that HCMV both induces and sequesters the STAT-2 function. STAT1 acts in combination with STAT-2, thus their physical dissociation is clearly important. Although HCMV can replicate in the absence of IE1-72K, so the effect is not essential for virus propagation *in vitro* however, the situation is likely to be different *in vivo*.

hDaxx was identified through its cytoplasmic interaction with Fas, and is pro-apoptotic following stimulation. hDaxx is also constitutively present in the nucleus where it associates with ND10, and acts to suppress HCMV IE gene expression (Cantrell and Bresnahan, 2006; Preston and Nicholl, 2006; Saffert and

Kalejta, 2006; Woodhall et al., 2006). The HCMV tegument protein pp71 promotes proteasome-mediated degradation of hDaxx, and thereby relieves hDaxx-mediated repression of IE gene expression (Saffert and Kalejta, 2006). hDaxx naturally accumulates at the condensed heterochromatic areas in late S phase (Ishov et al., 1999), but not with metaphase chromatin (Pluta et al., 1998). The recognized interaction between hDaxx and PML is dependent on sumoylation (Ishov et al., 1999; Li et al., 2000), thus IE1-mediated desumoylation of PML can be expected to dissociate this complex during HCMV infection. The fact that PML, and not hDaxx is tethered by IE1-72K to metaphase chromatin, is consistent with the hDaxx-PML being dissociated during infection. The release of hDaxx to the cytoplasm, suggests that it is sufficient to break the association with PML/ND10 to relieve hDaxx-mediated suppression of HCMV infection. While the association of hDaxx with PML is pro-apoptotic, there is evidence that hDaxx may be anti-apoptotic properties when is free of PML (Chen and Chen, 2003). By releasing hDaxx to the nucleoplasm free from its complex with PML, IE1 may selectively modulate the function of hDaxx.

The C-terminus of IE1-72K is required for the interaction with chromatin, but for neither ND10 disruption (Wilkinson et al., 1998) nor productive virus replication *in vitro* (Reinhardt et al., 2005). Thus, the significance of this interaction with higher-order structures of the host cell nucleus remains uncertain. It remains to be determined if there is any functional significance in the differential

accumulation of ND10 components on to metaphase chromatin by IE1-72K expression. IE1-72K tethering to condensed chromatin was readily detectable in transiently transfected cells, where IE expression is fully compatible with cell cycle progression. While HCMV is recognized to promote cell cycle arrest, this is thought to occur under conditions approximating to late G1/S phase (Bresnahan et al., 1996; Jault et al., 1995). Nevertheless, mitotic cells were readily detected by IE1-EGFP chromatin staining in a population of HCMV CR401-infected cells. This observation is consistent with data from FACS analysis, showing that a very small population of the cells that are infected while the cells are actively replicating their DNA are able to express the IE proteins in the G2/M phase of the cell cycle (Fortunato et al., 2002). However, when followed by live-cell imaging, these cells failed to progress out of metaphase through cell division. An HCMV gene function(s), which is not IE1-72K, appears to impose a blockade on cell mitosis.

## Acknowledgments

We thank Drs. B. Plachter (Mainz, Germany) and N. Kretsovali (Crete, Greece) for providing reagents. This work was supported by a Marie Curie Reintegration Grant of the European Commission Framework 6 Programme (contract no. MERG-CT-2004-513448). Jonathan Gawn, Emma Sherratt, Carole Rickards and Marian Denson contributed to preliminary studies characterizing the HCMV IE1-EGFP recombinant. GW, RC and BMCs were supported by funding from the Wellcome Trust, BBSRC, and Medical Research Council (UK). PD received funding from Erasmus.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.ejcb.2010.05.006.

## References

- Ahn, J.H., Brignole 3rd, E.J., Hayward, G.S., 1998. 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.* 18, 4899–4913.
- Ahn, J.H., Hayward, G.S., 1997. The major immediate-early proteins IE1 and IE2 of human cytomegalovirus colocalize with and disrupt PML-associated nuclear bodies at very early times in infected permissive cells. *J. Virol.* 71, 4599–4613.
- Ahn, J.H., Jang, W.J., Hayward, G.S., 1999. 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.* 73, 10458–10471.
- Ahn, K., Angulo, A., Gonzalez, P., Peterson, P.A., Yang, Y., Fruh, K., 1996. Human cytomegalovirus inhibits antigen presentation by a sequential multistep process. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 10990–10995.
- Andreoni, M., Faircloth, M., Vugler, L., Britt, W.J., 1989. A rapid microneutralization assay for the measurement of neutralizing antibody reactive with human cytomegalovirus. *J. Virol. Methods* 23, 157–167.
- Bernardi, R., Pandolfi, P.P., 2003. Role of PML and the PML-nuclear body in the control of programmed cell death. *Oncogene* 22, 9048–9057.
- Borst, E.M., Hahn, G., Koszinowski, U.H., Messler, M., 1999. Cloning of the human cytomegalovirus (HCMV) genome as an infectious bacterial artificial chromosome in *Escherichia coli*: a new approach for construction of HCMV mutants. *J. Virol.* 73, 8320–8329.
- Boyle, K.A., Pietropaolo, R.L., Compton, T., 1999. Engagement of the cellular receptor for glycoprotein B of human cytomegalovirus activates the interferon-responsive pathway. *Mol. Cell. Biol.* 19, 3607–3613.
- Bresnahan, W.A., Boldogh, I., Thompson, E.A., Albrecht, T., 1996. Human cytomegalovirus inhibits cellular DNA synthesis and arrests productively infected cells in late G1. *Virology* 224, 150–160.
- Browne, E.P., Shenk, T., 2003. Human cytomegalovirus UL83-coded pp65 virion protein inhibits antiviral gene expression in infected cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 11439–11444.
- Browne, E.P., Wing, B., Coleman, D., Shenk, T., 2001. Altered cellular mRNA levels in human cytomegalovirus-infected fibroblasts: viral block to the accumulation of antiviral mRNAs. *J. Virol.* 75, 12319–12330.
- Cantrell, S.R., Bresnahan, W.A., 2006. Human cytomegalovirus (HCMV) UL82 gene product (pp71) relieves hDaxx-mediated repression of HCMV replication. *J. Virol.* 80, 6188–6191.

- Castillo, J.P., Yurochko, A.D., Kowalik, T.F., 2000. Role of human cytomegalovirus immediate-early proteins in cell growth control. *J. Virol.* 74, 8028–8037.
- Caswell, R., Hagemeyer, C., Chiou, C.J., Hayward, G., Kouzarides, T., Sinclair, J., 1993. 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 TFIIB via regions of IE2 required for transcriptional regulation. *J. Gen. Virol.* 74 (Pt 12), 2691–2698.
- Chen, L.Y., Chen, J.D., 2003. Daxx silencing sensitizes cells to multiple apoptotic pathways. *Mol. Cell. Biol.* 23, 7108–7121.
- Cherrington, J.M., Mocarski, E.S., 1989. Human cytomegalovirus ie1 transactivates the alpha promoter-enhancer via an 18-base-pair repeat element. *J. Virol.* 63, 1435–1440.
- Child, S.J., Hakki, M., De Niro, K.L., Geballe, A.P., 2004. Evasion of cellular antiviral responses by human cytomegalovirus TRS1 and IRS1. *J. Virol.* 78, 197–205.
- Choi, Y.H., Bernardi, R., Pandolfi, P.P., Benveniste, E.N., 2006. The promyelocytic leukemia protein functions as a negative regulator of IFN-gamma signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 18715–18720.
- Dellaire, G., Bazett-Jones, D.P., 2004. PML nuclear bodies: dynamic sensors of DNA damage and cellular stress. *Bioessays* 26, 963–977.
- Dellaire, G., Eskiw, C.H., Dehghani, H., Ching, R.W., Bazett-Jones, D.P., 2006. Mitotic accumulations of PML protein contribute to the re-establishment of PML nuclear bodies in G1. *J. Cell Sci.* 119, 1034–1042.
- Everett, R.D., 2006. Interactions between DNA viruses, ND10 and the DNA damage response. *Cell. Microbiol.* 8, 365–374.
- Everett, R.D., Murray, J., 2005. ND10 components relocate to sites associated with herpes simplex virus type 1 nucleoprotein complexes during virus infection. *J. Virol.* 79, 5078–5089.
- Everett, R.D., Sourvinos, G., Orr, A., 2003. Recruitment of herpes simplex virus type 1 transcriptional regulatory protein ICP4 into foci juxtaposed to ND10 in live, infected cells. *J. Virol.* 77, 3680–3689.
- Fortunato, E.A., Sanchez, V., Yen, J.Y., Spector, D.H., 2002. Infection of cells with human cytomegalovirus during S phase results in a blockade to immediate-early gene expression that can be overcome by inhibition of the proteasome. *J. Virol.* 76, 5369–5379.
- Gawn, J.M., Greaves, R.F., 2002. 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.* 76, 4441–4455.
- Goldmacher, V.S., Bartle, L.M., Skaletskaya, A., Dionne, C.A., Kedersha, N.L., Vater, C.A., Han, J.W., Lutz, R.J., Watanabe, S., Cahir McFarland, E.D., Kieff, E.D., Mocarski, E.S., Chittenden, T., 1999. A cytomegalovirus-encoded mitochondria-localized inhibitor of apoptosis structurally unrelated to Bcl-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 12536–12541.
- Greaves, R.F., Mocarski, E.S., 1998. Defective growth correlates with reduced accumulation of a viral DNA replication protein after low-multiplicity infection by a human cytomegalovirus ie1 mutant. *J. Virol.* 72, 366–379.
- Huh, Y.H., Kim, Y.E., Kim, E.T., Park, J.J., Song, M.J., Zhu, H., Hayward, G.S., Ahn, J.H., 2008. Binding STAT2 by the acidic domain of human cytomegalovirus IE1 promotes viral growth and is negatively regulated by SUMO. *J. Virol.* 82, 10444–10454.
- Ishov, A.M., Maul, G.G., 1996. The periphery of nuclear domain 10 (ND10) as site of DNA virus deposition. *J. Cell Biol.* 134, 815–826.
- Ishov, A.M., Sotnikov, A.G., Negorev, O.V., Neff, N., Kamitani, T., Yeh, E.T., Strauss 3rd, J.F., Maul, G.G., 1999. PML is critical for ND10 formation and recruits the PML-interacting protein daxx to this nuclear structure when modified by SUMO-1. *J. Cell Biol.* 147, 221–234.
- Ishov, A.M., Stenberg, R.M., Maul, G.G., 1997. Human cytomegalovirus immediate early interaction with host nuclear structures: definition of an immediate transcript environment. *J. Cell Biol.* 138, 5–16.
- Ishov, A.M., Vladimirova, O.V., Maul, G.G., 2004. Heterochromatin and ND10 are cell-cycle regulated and phosphorylation-dependent alternate nuclear sites of the transcription repressor Daxx and SWI/SNF protein ATRX. *J. Cell Sci.* 117, 3807–3820.
- Jault, F.M., Jault, J.M., Ruchti, F., Fortunato, E.A., Clark, C., Corbeil, J., Richman, D.D., Spector, D.H., 1995. Cytomegalovirus infection induces high levels of cyclins, phosphorylated Rb, and p53, leading to cell cycle arrest. *J. Virol.* 69, 6697–6704.
- Kelly, C., Van Driel, R., Wilkinson, G.W., 1995. Disruption of PML-associated nuclear bodies during human cytomegalovirus infection. *J. Gen. Virol.* 76 (Pt 11), 2887–2893.
- Korioth, F., Maul, G.G., Plachter, B., Stamminger, T., Frey, J., 1996. The nuclear domain 10 (ND10) is disrupted by the human cytomegalovirus gene product IE1. *Exp. Cell Res.* 229, 155–158.
- Krauss, S., Kaps, J., Czech, N., Paulus, C., Nevels, M., 2009. Physical requirements and functional consequences of complex formation between the cytomegalovirus IE1 protein and human STAT2. *J. Virol.* 83, 12854–12870.
- Lafemina, R.L., Pizzorno, M.C., Mosca, J.D., Hayward, G.S., 1989. Expression of the acidic nuclear immediate-early protein (IE1) of human cytomegalovirus in stable cell lines and its preferential association with metaphase chromosomes. *Virology* 172, 584–600.
- Lalioti, M., Heath, J., 2001. A new method for generating point mutations in bacterial artificial chromosomes by homologous recombination in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 29, pE14.
- Lee, H.R., Kim, D.J., Lee, J.M., Choi, C.Y., Ahn, B.Y., Hayward, G.S., Ahn, J.H., 2004. Ability of the human cytomegalovirus IE1 protein to modulate sumoylation of PML correlates with its functional activities in transcriptional regulation and infectivity in cultured fibroblast cells. *J. Virol.* 78, 6527–6542.

- Li, H., Leo, C., Zhu, J., Wu, X., O'Neil, J., Park, E.J., Chen, J.D., 2000. Sequestration and inhibition of Daxx-mediated transcriptional repression by PML. *Mol. Cell. Biol.* 20, 1784–1796.
- Lukashchuk, V., McFarlane, S., Everett, R.D., Preston, C.M., 2008. Human cytomegalovirus protein pp71 displaces the chromatin-associated factor ATRX from nuclear domain 10 at early stages of infection. *J. Virol.* 82, 12543–12554.
- Malone, C.L., Vesole, D.H., Stinski, M.F., 1990. 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.* 64, 1498–1506.
- Marchini, A., Liu, H., Zhu, H., 2001. Human cytomegalovirus with IE-2 (UL122) deleted fails to express early lytic genes. *J. Virol.* 75, 1870–1878.
- Maul, G.G., Ishov, A.M., Everett, R.D., 1996. Nuclear domain 10 as preexisting potential replication start sites of herpes simplex virus type-1. *Virology* 217, 67–75.
- Maul, G.G., Negorev, D., 2008. Differences between mouse and human cytomegalovirus interactions with their respective hosts at immediate early times of the replication cycle. *Med. Microbiol. Immunol.* 197, 241–249.
- Meier, J.L., Stinski, M.F., 1996. Regulation of human cytomegalovirus immediate-early gene expression. *Intervirology* 39, 331–342.
- Milovic-Holm, K., Kriehoff, E., Jensen, K., Will, H., Hofmann, T.G., 2007. FLASH links the CD95 signaling pathway to the cell nucleus and nuclear bodies. *EMBO J* 26, 391–401.
- Mocarski, E.S., Kemble, G.W., Lyle, J.M., Greaves, R.F., 1996. 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.* 93, 11321–11326.
- Muller, S., Dejean, A., 1999. Viral immediate-early proteins abrogate the modification by SUMO-1 of PML and Sp100 proteins, correlating with nuclear body disruption. *J. Virol.* 73, 5137–5143.
- Navarro, L., Mowen, K., Rodems, S., Weaver, B., Reich, N., Spector, D., David, M., 1998. Cytomegalovirus activates interferon immediate-early response gene expression and an interferon regulatory factor 3-containing interferon-stimulated response element-binding complex. *Mol. Cell. Biol.* 18, 3796–3802.
- Negorev, D., Maul, G.G., 2001. Cellular proteins localized at and interacting within ND10/PML nuclear bodies/PODs suggest functions of a nuclear depot. *Oncogene* 20, 7234–7242.
- Negorev, D.G., Vladimirova, O.V., Ivanov, A., Rauscher 3rd, F., Maul, G.G., 2006. Differential role of Sp100 isoforms in interferon-mediated repression of herpes simplex virus type 1 immediate-early protein expression. *J. Virol.* 80, 8019–8029.
- Nevels, M., Brune, W., Shenk, T., 2004. SUMOylation of the human cytomegalovirus 72-kilodalton IE1 protein facilitates expression of the 86-kilodalton IE2 protein and promotes viral replication. *J. Virol.* 78, 7803–7812.
- Pajovic, S., Wong, E.L., Black, A.R., Azizkhan, J.C., 1997. Identification of a viral kinase that phosphorylates specific E2Fs and pocket proteins. *Mol. Cell. Biol.* 17, 6459–6464.
- Paulus, C., Krauss, S., Nevels, M., 2006. A human cytomegalovirus antagonist of type I IFN-dependent signal transducer and activator of transcription signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 3840–3845.
- Pizzorno, M.C., O'Hare, P., Sha, L., LaFemina, R.L., Hayward, G.S., 1988. Transactivation and autoregulation of gene expression by the immediate-early region 2 gene products of human cytomegalovirus. *J. Virol.* 62, 1167–1179.
- Plachter, B., Britt, W., Vornhagen, R., Stamminger, T., Jahn, G., 1993. Analysis of proteins encoded by IE regions 1 and 2 of human cytomegalovirus using monoclonal antibodies generated against recombinant antigens. *Virology* 193, 642–652.
- Pluta, A.F., Earnshaw, W.C., Goldberg, I.G., 1998. Interphase-specific association of intrinsic centromere protein CENP-C with HDaxx, a death domain-binding protein implicated in Fas-mediated cell death. *J. Cell Sci.* 111 (Pt 14), 2029–2041.
- Preston, C.M., Nicholl, M.J., 2006. Role of the cellular protein hDaxx in human cytomegalovirus immediate-early gene expression. *J. Gen. Virol.* 87, 1113–1121.
- Reboredo, M., Greaves, R.F., Hahn, G., 2004. Human cytomegalovirus proteins encoded by UL37 exon 1 protect infected fibroblasts against virus-induced apoptosis and are required for efficient virus replication. *J. Gen. Virol.* 85, 3555–3567.
- Reeves, M., Murphy, J., Greaves, R., Fairley, J., Brehm, A., Sinclair, J., 2006. Autorepression of the human cytomegalovirus major immediate-early promoter/enhancer at late times of infection is mediated by the recruitment of chromatin remodeling enzymes by IE86. *J. Virol.* 80, 9998–10009.
- Reinhardt, J., Smith, G.B., Himmelheber, C.T., Azizkhan-Clifford, J., Mocarski, E.S., 2005. The carboxyl-terminal region of human cytomegalovirus IE1491aa contains an acidic domain that plays a regulatory role and a chromatin-tethering domain that is dispensable during viral replication. *J. Virol.* 79, 225–233.
- Saffert, R.T., Kalejta, R.F., 2006. Inactivating a cellular intrinsic immune defense mediated by Daxx is the mechanism through which the human cytomegalovirus pp71 protein stimulates viral immediate-early gene expression. *J. Virol.* 80, 3863–3871.
- Simmen, K.A., Singh, J., Luukkonen, B.G., Lopper, M., Bittner, A., Miller, N.E., Jackson, M.R., Compton, T., Fruh, K., 2001. Global modulation of cellular transcription by human cytomegalovirus is initiated by viral glycoprotein B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 7140–7145.
- Sinzger, C., Grefte, A., Plachter, B., Gouw, A.S., The, T.H., Jahn, G., 1995. Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues. *J. Gen. Virol.* 76 (Pt 4), 741–750.
- Skaletskaya, A., Bartle, L.M., Chittenden, T., McCormick, A.L., Mocarski, E.S., Goldmacher, V.S., 2001. A cytomegalovirus-encoded inhibitor of apoptosis that suppresses caspase-8 activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 7829–7834.
- Sourvinos, G., Everett, R.D., 2002. Visualization of parental HSV-1 genomes and replication compartments in association with ND10 in live infected cells. *EMBO J* 21, 4989–4997.
- Sourvinos, G., Tavalai, N., Berndt, A., Spandidos, D.A., Stamminger, T., 2007. Recruitment of human cytomegalovirus immediate-early 2 protein onto parental viral genomes in association with ND10 in live-infected cells. *J. Virol.* 81, 10123–10136.
- Stanton, R.J., McSharry, B.P., Armstrong, M., Tomasec, P., Wilkinson, G.W., 2008. Re-engineering adenovirus vector systems to enable high-throughput analyses of gene function. *Biotechniques* 45, 659–662, 664–668.
- Tang, J., Wu, S., Liu, H., Strat, R., Barak, O.G., Shiekhhattar, R., Picketts, D.J., Yang, X., 2004. A novel transcription regulatory complex containing death domain-associated protein and the ATR-X syndrome protein. *J. Biol. Chem.* 279, 20369–20377.
- Tavalai, N., Papior, P., Rechter, S., Leis, M., Stamminger, T., 2006. Evidence for a role of the cellular ND10 protein PML in mediating intrinsic immunity against human cytomegalovirus infections. *J. Virol.* 80, 8006–8018.
- Tavalai, N., Papior, P., Rechter, S., Stamminger, T., 2008. Nuclear domain 10 components promyelocytic leukemia protein and hDaxx independently contribute to an intrinsic antiviral defense against human cytomegalovirus infection. *J. Virol.* 82, 126–137.
- White, E.A., Spector, D.H., 2005. Exon 3 of the human cytomegalovirus major immediate-early region is required for efficient viral gene expression and for cellular cyclin modulation. *J. Virol.* 79, 7438–7452.
- Wilkinson, G.W., Kelly, C., Sinclair, J.H., Rickards, C., 1998. Disruption of PML-associated nuclear bodies mediated by the human cytomegalovirus major immediate early gene product. *J. Gen. Virol.* 79 (Pt 5), 1233–1245.
- Woodhall, D.L., Groves, I.J., Reeves, M.B., Wilkinson, G., Sinclair, J.H., 2006. Human Daxx-mediated repression of human cytomegalovirus gene expression correlates with a repressive chromatin structure around the major immediate early promoter. *J. Biol. Chem.* 281, 37652–37660.
- Zhu, H., Cong, J.P., Shenk, T., 1997. Use of differential display analysis to assess the effect of human cytomegalovirus infection on the accumulation of cellular RNAs: induction of interferon-responsive RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 13985–13990.