

Vergleichende Charakterisierung molekularer Mechanismen und  
biologischer Konsequenzen viraler STAT2-Degradation nach Infektion  
mit Cytomegaloviren

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Mirko Trilling

aus Berlin

November, 2008

Aus dem Institut für Virologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Hartmut Hengel, Institut für Virologie

Koreferent Prof. Dr. Johannes H. Hegemann, Lehrstuhl für Funktionelle Genomforschung  
der Mikroorganismen

Tag der mündlichen Prüfung:

22.04.2009

Vier Stufen der Anerkennung:

- I. Das ist wertloser Nonsens.
- II. Das ist ein interessanter, aber abwegiger Standpunkt.
- III. Das ist wahr, aber ziemlich unwichtig.
- IV. Ich habe es immer gesagt.

J.B.S Haldane (1892-1964), englischer Genetiker

## INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	7
ABKÜRZUNGEN.....	9
ZUSAMMENFASSUNG .....	13
1. EINLEITUNG .....	15
1.1 VIREN .....	15
1.1.1 Herpesviren.....	17
1.1.1.1 Cytomegaloviren (CMV).....	18
1.1.1.2 Klinische Bedeutung von HCMV .....	22
1.1.1.3 Genetik der CMV-Viren.....	24
1.2 INTERFERONE ALS ZYTOKINE DER IMMUNREAKTION AUF PATHOGENE .....	25
1.2.1 Interferone (IFNs).....	27
1.2.2 Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs) .....	28
1.2.3 Erkennung von Herpesviren durch PAMP-Rezeptoren.....	30
1.2.4 IFN-Induktion.....	32
1.2.5 IFN-Signaltransduktion .....	33
1.2.6 Effektorgene .....	37
1.2.6.1 ISG 6-16 resp. GIP3 .....	38
1.2.6.2 dsRNA-abhängige Proteinkinase R (PKR) .....	38
1.2.6.3 2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase (OAS) und RNaseL .....	39
1.2.6.4 Induzierbare NO-Synthetase (iNOS) .....	39
1.2.6.5 ISG54 (IFIT2) und ISG56 (IFIT1).....	39
1.2.6.6 Mx-Proteine .....	39
1.2.6.7 Guanylat-bindende Proteine (GBPs).....	40
1.2.6.8 Indoleamine-2,3-oxygenase (IDO).....	40
1.2.6.9 MHC-Genkomplex .....	40
1.2.7 Wirkung von IFN auf MCMV-Virusreplikation .....	41
1.2.7.1 In vitro (Zellkulturexperimente) .....	41
1.2.7.2 In vivo (Infektionsexperimente im Modellorganismus) .....	42
1.2.8 CMV-Replikation beeinflussende ISGs .....	43
1.3 ADAPTIVES IMMUNSYSTEM, VIREN UND IFN .....	44
1.4 CMV- KODIERTE IFN-ANTAGONISTEN.....	45
1.5 pM27 .....	48
2. ERGEBNISSE.....	51
2.1 pM27 KONTROLLIERT DIE IFN-ABHÄNGIGE SIGNALTRANSDUKTION .....	51
2.1.1 MCMV blockiert die GAS-Signaltransduktion M27-unabhängig.....	53
2.1.2 STAT2 stellt das molekulare Ziel von pM27 dar .....	56
2.1.3 pM27 ist hinreichend für den Verlust von zellulärem STAT2.....	62
2.1.4 pM27 reduziert die Menge von humanem und Maus-STAT2 .....	65
2.1.5 VACV-exprimiertes pM27 beweist, dass unphosphoryliertes STAT2 erkannt und degradiert werden kann .....	66
2.1.6 pM27 degradiert monomeres STAT2.....	68
2.2 pM27 SCHÜTZT MCMV VOR DER WIRKUNG VON TYP I UND TYP II IFN .....	70
2.2.1 pM27 reduziert die STAT2-Proteinmenge auch in IFN- $\gamma$ -behandelten Zellen .....	73
2.2.2 pM27 inhibiert ausschließlich die STAT2-abhängige IFN-Signaltransduktion.....	74
2.2.3 $\Delta$ M27-MCMV-Replikation ist nach IFN- $\gamma$ -Behandlung stark eingeschränkt.....	75
2.2.4 IFN entfaltet seine Wirkung gegenüber MCMV intrazellulär.....	76
2.2.5 Die IFN-Superinduktion erklärt die IFN- $\gamma$ -Sensitivität von $\Delta$ M27-MCMV nicht.....	78
2.3 TYP II IFN INDUZIERT DIE AKTIVIERUNG VON STAT2 .....	81
2.4 MECHANISMUS DER pM27-ABHÄNGIGEN STAT2-REDUKTION .....	86
2.4.1 pM27 reduziert die STAT2-Menge unabhängig vom intrinsischen STAT2-Promotor.....	86

## Inhaltsverzeichnis

2.4.2	pM27 reduziert die STAT2-Halbwertszeit	87
2.4.3	pM27 reduziert die STAT2-Halbwertszeit über das Proteasom	90
2.4.5	pM27 und STAT2 interagieren miteinander	93
2.4.6	pM27 ist selbst auch ubiquitiniert	95
2.5	pM27 BINDET ZELLULÄRE KOFAKTOREN	96
2.6	pM27 KOPRÄZIPITIERT DAS ZELLULÄRE PROTEIN DDB1	101
2.6.1	Charakterisierung der pM27-DDB1-Interaktion	105
2.6.2	IFN- $\gamma$ verändert die Kopräzipitation von pM27 und DDB1 nicht	106
2.6.3	pM27 kopräzipitiert DDB1 auch nach einer Behandlung mit UV-Licht	107
2.6.4	Korrelation zwischen DDB1-Bindung und STAT2-Degradation	109
2.7	HCMV-KODIERTE INHIBITION DER JAK-STAT-SIGNALTRANSDUKTION	110
2.7.1	HCMV-TB40/E reduziert die zelluläre STAT2-Menge	115
2.7.2	HCMV degradiert STAT2	119
2.7.3	Das pM27-homologe Protein pUL27 ist für die Degradation nicht verantwortlich	122
3.	DISKUSSION	126
3.1	pM27 INHIBIERT DIE JAK-STAT-SIGNALTRANSDUKTION, UM EINE EFFIZIENTE REPLIKATION IN ANWESENHEIT VON IFN ZU ERREICHEN	126
3.2	AKTUELLES MODELL DES pM27-MECHANISMUS	127
3.3	WEDER MCMV NOCH HCMV DEGRADIEREN STAT1 ODER STAT3	128
3.4	VORHERSAGE MÖGLICHER INTERAKTIONSTELLEN VON pM27 UND STAT2	130
3.5	KONVERGENTE EVOLUTION DER STAT2-DEGRADATIONSFÄHIGKEIT	133
3.6	EVOLUTIONSMODELLE ZUR ENTWICKLUNG VON MOLEKÜLEN WIE pM27	134
3.6.1	Das STAT2-Binde-Modell	135
3.6.2	Das MHC-Modell	135
3.6.3	Der DDB1-Komplex als selektiver Faktor für Viren in der IFN-Antwort	136
3.7	VORHERSAGE DES UBIQUITINIERTEN LYSINS IM STAT2-PROTEIN	138
3.8	HCMV UND MCMV NUTZEN SOWOHL IDENTISCHE ALS AUCH DIVERGENTE STRATEGIEN ZUR INHIBITION DER IFN-SIGNALTRANSDUKTION	139
3.9	WARUM DEGRADIERT HCMV STAT2?	144
3.10	VERWENDUNG DOMINANT NEGATIVER INHIBITOREN DES DDB1-CUL4A-ROCA UBIQUITINLIGASE-KOMPLEXES ZUR PHÄNOKOPIE DES $\Delta$ M27-PHÄNOTYPS	145
3.10.1	Expression von dominant-negativem Cul4A durch MCMV	145
3.10.2	Expression der cre-Rekombinase durch MCMV in DDB1 <sup>flox/flox</sup> Mäusen	146
3.11	PHARMAKOLOGISCHE INHIBITOREN CYTOMEGALER IFN-ANTAGONISTEN ALS POTENTIELLE ANTIVIRALE THERAPEUTIKA?	147
4.	MATERIAL UND METHODEN	149
4.1	MATERIALIEN	149
4.1.1	Geräte	149
4.1.2	Kits	151
4.1.3	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	151
4.1.4	Interferone	153
4.1.5	Inhibitoren des Proteasoms	154
4.1.6	Na-Vanadat	154
4.1.7	Radioaktive Chemikalien	154
4.1.8	Zellen	155
4.1.8.1	Humane Zelllinien	155
4.1.8.2	Murine Zelllinien	155
4.1.8.3	Primäre Zellen	155
4.1.9	Viren	156
4.1.9.1	MCMV	156
4.1.9.2	HCMV	156

## Inhaltsverzeichnis

4.1.9.3 <i>Vakzinia-Viren</i> .....	156
4.1.10 Antikörper .....	157
5.1.10.1 <i>Ungekoppelte Antikörper</i> .....	157
4.1.10.2 <i>Gekoppelte Antikörper</i> .....	157
4.1.11 Zellkulturgefäße und Plastikwaren .....	157
4.1.12 Zellkulturmedien .....	158
4.1.13 Puffer und Lösungen .....	158
4.1.14 Computer-Programme .....	162
4.2 METHODEN .....	162
4.2.1 Zellkultur .....	162
4.2.1.1 <i>Cryokonservierung</i> .....	162
4.2.1.2 <i>Transfektionen</i> .....	163
4.2.1.3 <i>Inhibition der zellulären RNA resp. Protein-Synthese</i> .....	163
4.2.2 Virologische Methoden .....	163
4.2.2.1 <i>Stock-Präparation</i> .....	163
4.2.2.2 <i>Titrationsen</i> .....	164
4.2.2.3 <i>Infektionen</i> .....	166
4.2.2.4 <i>Inhibition der viralen late-Genexpression</i> .....	166
4.2.2.5 <i>Selektive Expression von viralen IE-Genen</i> .....	166
4.2.2.6 <i>Replikationsanalysen</i> .....	167
4.2.2.7 <i>Neutralisation</i> .....	167
4.2.2.8 <i>Inaktivierung von Viren durch UV-Licht</i> .....	167
4.2.3 Molekularbiologische Methoden .....	167
4.2.3.1 <i>RNA-Methoden</i> .....	168
4.2.4 Proteinbiochemische Methoden .....	170
4.2.4.1 <i>Proteinlysate-Herstellung: Gesamtzell-Lysate</i> .....	170
4.2.4.2 <i>Proteinlysate-Herstellung: Fraktionierte native Lysate</i> .....	170
4.2.4.3 <i>Acetonfällung</i> .....	171
4.2.4.4 <i>Bradford-Bestimmung</i> .....	171
4.2.4.5 <i>SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)</i> .....	171
4.2.4.6 <i>Coomassie-Gelfärbung</i> .....	172
4.2.4.7 <i>Silberfärbung</i> .....	172
4.2.4.8 <i>Westernblot</i> .....	172
4.2.4.9 <i>Immunpräzipitation (IP)</i> .....	173
4.2.4.10 <i>Pulse-Chase-Experimente</i> .....	174
4.2.4.11 <i>Elektromobility Shift Assay (EMSA)</i> .....	175
4.2.4.12 <i>Luziferase-Reporterassay</i> .....	177
4.2.4.13 <i>Immunfluoreszenz-Färbung (IF)</i> .....	177
REFERENZEN .....	178
ANHANG .....	202
PUBLIKATIONEN (MIT EIGENER BETEILIGUNG) .....	202
PRÄSENTATIONEN .....	204
DANKSAGUNG .....	206
ERKLÄRUNG .....	207

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

### Einleitung:

- Abb. E1: Struktur des Herpesvirus-Virions  
Abb. E2: Schematische Übersicht über die Prozesse der CMV-Infektion und der koordinierten viralen Genexpression  
Abb. E3: Übersicht über das MCMV-Genom und die viralen Inhibitoren des Immunsystems  
Abb. E4: Übersicht über die PAMP-abhängige Interferoninduktion  
Abb. E5: Übersicht über die IFN-Signaltransduktion.

### Ergebnisse:

- Abb.1: M27 ist für die MCMV-kodierte Inhibition der Typ I IFN-Signalkaskade essentiell.  
Abb. 2: MCMV inhibiert die IFN- $\gamma$ -abhängige Signaltransduktion pM27-unabhängig.  
Abb. 3: M27 ist essentiell für die MCMV-kodierte Reduktion der STAT2-Menge.  
Abb. 4: Der pM27-abhängige STAT2-Verlust ist Zelltyp-unabhängig.  
Abb. 5: Charakterisierung der STAT2HA:STAT2<sup>-/-</sup> Zelllinie.  
Abb. 6: pM27 ist ein ubiquitär lokalisiertes Protein, das auch im Viruspartikel vorkommt.  
Abb. 7: VACV-exprimierte pM27-Flag Verkürzungsmutanten.  
Abb. 8: STAT2-Reduktion der rVACV-kodierten M27-Verkürzungsmutanten.  
Abb. 9: M27 ist hinreichend für die Degradation von STAT2 in murinen und humanen Zellen.  
Abb. 10: VACV unterbindet STAT2-Phosphorylierung und Aktivierung.  
Abb. 11: pM27 degradiert monomeres STAT2.  
Abb. 12: STAT2-Reduktionsnachweis per Immunfluoreszenzfärbung.  
Abb. 13: Wachstumsdefizit von  $\Delta$ M27-MCMV in murinen Fibroblasten nach Behandlung mit IFN.  
Abb. 14: MCMV-kodiertes pM27 reduziert die STAT2-Proteinmenge auch nach IFN- $\gamma$  Vorbehandlung.  
Abb. 15: pM27 inhibiert ausschließlich die STAT2-abhängige Signaltransduktion.  
Abb. 16: pM27 reduziert STAT2 auch im Laufe einer fortschreitenden Infektion nach initialer Niedrig-MOI-Infektion.  
Abb. 17: M27 ist für *attachment* und *entry* von MCMV (auch nach IFN- $\gamma$ -Behandlung) nicht essentiell.  
Abb. 18: „Superinduktion“ ist nicht für die Wirkung von IFN- $\gamma$  auf  $\Delta$ M27-MCMV verantwortlich.  
Abb. 19: Die Wirkung von IFN- $\gamma$  gegenüber  $\Delta$ M27-MCMV wird durch eine Kombination von IFN- $\gamma$  Vorbehandlung und anhaltender Inkubation erreicht.  
Abb. 20: IFN- $\gamma$  induziert eine IFNAR1-unabhängige STAT2-Phosphorylierung.  
Abb. 21: IFN- $\gamma$  induziert eine IFNAR1-unabhängige STAT2-Aktivierung.  
Abb. 22: pM27 induziert die Reduktion von ektop exprimiertem STAT2HA.  
Abb. 23: pM27 reduziert spezifisch die STAT2-Protein-Halbwertszeit.  
Abb. 24: rVACV-exprimiertes, funktionelles pM27 reduziert die STAT2-Halbwertszeit.  
Abb. 25: Die pM27-vermittelte STAT2-Reduktion ist Proteasom-abhängig.  
Abb. 26: pM27 induziert STAT2-Ubiquitinierung.  
Abb. 27: pM27 und STAT2 interagieren miteinander.  
Abb. 28: pM27 kommt ubiquitiniert in der Zelle vor.  
Abb. 29: pM27 kopräzipitiert ein ~125 kDa Protein.  
Abb. 30: pM27 kopräzipitiert zelluläre Proteine  
Abb. 31: pM27 kopräzipitiert spezifisch mit dem ~125 kDa Protein.

## Abbildungsverzeichnis

- Abb. 32: Das kopräzipitierte Protein ist keine modifizierte Form von pM27 oder STAT2.  
Abb. 33: Identifikation des ~125 kDa Proteins als DDB1.  
Abb. 34: pM27 kopräzipitiert DDB1.  
Abb. 35: Charakterisierung der pM27-DDB1-Interaktion.  
Abb. 36: DDB1 nach IFN-Behandlung.  
Abb. 37: Interaktion von pM27 und DDB1 nach Behandlung mit UV-Licht.  
Abb. 38: STAT2-Degradation und DDB1-Bindungsfähigkeit korrelieren miteinander.  
Abb. 39: HCMV-Towne inhibiert STAT-Phosphorylierung und DNA-Bindung, ohne STAT2 zu degradieren.  
Abb. 40: HCMV unterbindet die Bildung von ISRE-bindenden ISGF3-Komplexen.  
Abb. 41: HCMV-TB40/E reduziert die zelluläre STAT2-Proteinmenge.  
Abb. 42: STAT2-Reduktion in verschiedenen HCMV-Stämmen.  
Abb. 43: HCMV degradiert STAT2 über das Proteasom.  
Abb. 44: HCMV-vermittelte STAT2-Reduktion in einem *Pulse-Chase*-Experiment.  
Abb. 45: Weder pp72-IE1 noch virale *late* Proteine sind für die STAT2 Degradation verantwortlich.  
Abb. 46: Vergleich der Proteine pM27 und pUL27.  
Abb. 47: UL27 ist weder hinreichend noch essentiell für die HCMV-kodierte STAT2-Reduktion  
Abb. 48: pUL27 interagiert (im Gegensatz zu pM27) nicht mit DDB1.
- Diskussion:
- Abb. D1: Aktuelles Modell des Wirkmechanismus von pM27  
Abb. D2: Potentielle Bindestellen von pM27 an STAT2.  
Abb. D3: STAT-Alignments.  
Abb. D4: Vorhersage der Lysine in STAT2, die ubiquitiniert werden.  
Abb. D5: Schematische Übersicht über die CMV-kodierten Typ I IFN Inhibitionsstrategien  
Abb. D6: Flussdiagramm zur Wirkung von MCMV und pM27 auf die IFN-Signaltransduktion.  
Abb. D7: Flussdiagramm der Wirkung von HCMV auf die IFN-Signaltransduktion.

## Abkürzungen

### ABKÜRZUNGEN

A	Ampere
Abb.	Abbildung
Act D	Actinomycin D
AK	Antikörper
As	Aminosäure
ATCC	<i>american type culture collection</i> , amerikanische Stammsammlung
ATF	<i>activating transcription factor</i> , aktivierender Transkriptionsfaktor
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i> , bakterielles Chromosom
bp	Basenpaar(e)
B-Zelle	bursa fabrici (in Vögeln) selektierte IgG sekretierende Zelle
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celcius
CARD	<i>caspase recruitment domain</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i> , Nomenklatur für zell. Oberflächenmarker
cDC	<i>conventional dendritic cell</i> , konventionelle dendritische Zelle
CDP-Star	Chemilumineszenzsubstrat der alkalinen Phosphatase: Disodium 4-chloro-3-(methoxy{1,2 dioxetane-3,2'-(-5'-chloro) tricycle-decan}4-yl)phenyl phosphate
CHX	Cycloheximid
CIF	CMV-induzierter ISRE-bindender Faktor
CPE	Cytopathischer Effekt infizierter Zellen
CpG	hypomethyliertes DNA-Motiv: Cytosin-Phosphat-Guanosin
Cul4A	Cullin 4 Isoform A
d	<i>day(s)</i> , Tage
DC	dendritische Zelle
DDB1/2	<i>DNA-binding DNA damage protein 1 resp. 2</i>
DIG	Digoxigenin
D-MEM	<i>Dulbeccos Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	2-Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	alle vier 2-Desoxy-Nukleotide (A, T, C, G)
ds	Doppelstrang/doppelsträngig
DTT	1,4- Dithiothreitol
E	<i>early</i> , früh
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid (+Na<sub>2</sub>)</i>
EGTA	<i>Ethylene glycol-bis (2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid</i>
EM	Elektronen-Mikroskop
EMSA	<i>electro mobility shift assay</i> , Gelretardationsassay
EMU	N-ethyl-N-Nitroharnstoff, Mutagen
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FKS	Fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
gX	virales Glykoprotein X, Nomenklatur mit Großbuchstaben (z.B. gB)
GAF	(IFN) <i>gamma activated factor</i> , IFN- $\gamma$ -aktivierter Faktor
GAS	(IFN) <i>gamma activated sequence</i> , IFN- $\gamma$ -aktivierte (Promoter-) Sequenz
GBP	Guanylat-bindendes Protein
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
<i>gpt</i>	Gen für Guaninphosphoribosyltransferase

## Abkürzungen

gpX	Glykoprotein mit X kDa (z.B. gp34)
h	<i>hour</i> , Stunde
HA	Hämagglutinin
HC	<i>heavy chain</i> , Schwere Kette von Antikörpern
HCMV	Humanes Cytomegalovirus
HEPES	<i>N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid</i>
HIV	Humanes Immunodefizienz Virus
HMG	<i>high mobility group</i>
hpi	<i>hours post infection</i> , Stunden nach Infektion
HSP	<i>heat shock</i> Protein
HSV	Herpes simplex Virus
ICP	<i>infected cell protein</i> , Nomenklatur zellulärer HSV Proteine
IE	<i>immediatly early</i> , sofort exprimiertes CMV-Gen
IFN	Interferon
IFNAR	IFN $\alpha$ -Rezeptorkette
IFNGR	IFN $\gamma$ -Rezeptorkette
IgG	Immunglobulin
I $\kappa$ B	Inhibitor von NF- $\kappa$ B
IKK	I $\kappa$ B Kinase Komplex
IL	Interleukin
iNOS	Induzierbare NO-Synthetase
IP	Immunopräzipitation
IPC	<i>interferon producing cell</i> , Interferon produzierende Zelle
IRF	<i>interferon regulatory factor</i> , Interferon-regulatorischer Faktor
ISG (X)	Interferon stimuliertes Gen (X kDa)
ISGF3	<i>interferon stimulated gene factor 3</i> , Interferon-stimulierter Gen Faktor 3
ISRE	<i>interferon stimulated response element</i> , Interferon-stimuliertes Promotorlement
IU/ml	<i>international units per ml</i> , internationale Einheiten
Jak	Janus Kinase
k	Kilo (1000)
kDa	Kilo-Dalton
l	Liter
L	<i>late</i> , spät
LC	<i>light chain</i> , Leichte Kette von Antikörpern
LPS	Lipopolysaccharid
<i>Luc</i>	Gen für Luziferase
m	Milli (1/10 <sup>3</sup> )
$\mu$	Mikro (1/10 <sup>6</sup> )
M	Molarität, Teilchenmenge pro Volumen
MCMV	Maus-Cytomegalovirus
MEF	<i>mouse embryonic fibroblast</i> , embryonaler Fibroblast der Maus
MEM	<i>Minimal Essential Medium</i> , minimales ausreichendes Medium
MEN	Puffer mit MOPS, EDTA und Natriumacetat
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> , Haupthistokompatibilitätsfaktor
MIEP	<i>major IE promoter</i> , erster Promotor der Cytomegaloviren
min	Minute
mock	“so tun, als ob”: uninfiziert, aber gleich behandelt
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MOPS	<i>3-(N-Morpholino) propanesulfonic-acid</i>
mRNA	<i>messengerRNA</i>

## Abkürzungen

MS	Massenspektrometrie
n	nano (1/10 <sup>9</sup> )
NaCl	Natriumchlorid
NCS	Serum neugeborener Kälber
NF-κB	Nukleärer Faktor κB
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NLS	<i>nuclear localization sequence</i>
NP-40	Nonidet P-40 Detergenz
OAS	Oligoadenylat-Synthetase
ORF	<i>open reading frame</i> , offener Leserahmen
[ <sup>32</sup> P]	Radioaktives Phosphor mit der Kernzahl 32
PAA	Phosphonoessigsäure
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMP	<i>Pathogen associated molecular pattern</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
pDC	Plasmazytoide Dendritische Zelle
pfu	<i>plaque forming units</i> , Plaque-bildende Einheit
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
PKR	Proteinkinase R
PMSF	<i>Phenylmethan-Sulfonylfluoride</i>
poly(d)IC	(desoxy) Polyinosinic-Polycytidylic-Acid
ppX	Phosphoprotein mit X kDa (z.B. pp89)
PRD	<i>positive regulatory domain</i> , positive regulatorische (Promotor-) Domäne
RCMV	Ratten-Cytomegalovirus
RLRs	<i>RIG-I like receptors</i> , RIG-I-ähnliche Rezeptoren
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
rVACV	rekombinantes Vakzinia-Virus
[ <sup>35</sup> S]	Radioaktives Schwefel mit der Kernzahl 35
SCID	<i>severe combined immunodeficient</i> , schwere kombinierte Immundefizienz
SDS	Sodium(Natrium)dodecylsulfate
sec	Sekunde
SOCS	<i>suppressor of cytokine signaling</i>
ss	Einzelstrang/einzelsträngig
SSC	Puffer mit <i>sodium</i> (Natrium)-Chlorid und <i>-citrat</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
SV5	Simian Virus 5
TAE	Puffer: Tris, Acetat und EDTA in Wasser
TAP	<i>transporter associated with peptide presentation</i>
TBE	Puffer: Tris, Borat und EDTA in Wasser
TBK-1	<i>TANK binding kinase 1</i>
TBST	Puffer: <i>tris buffered saline</i> + Tween-20
TEMED	N,N,N',N',Tetramethylethylendiamin
TK	Thymidin-Kinase
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TMD	Transmembrandomäne
Tn	Transposon

## Abkürzungen

TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)ammoniummethan
TRL/IRL	<i>terminal/internal repeat long</i> , duplizierte Genregionen von HCMV
Tyk	Tyrosin-Kinase
T-Zelle	Thymus-selektierte Immunzelle der adaptiven Immunität
U/ml	<i>units per ml</i> , Einheiten pro ml
Ub	Ubiquitin
UL	<i>unique long</i> , singuläre lange Genregion von HCMV
ÜN	über Nacht
US	<i>unique short</i> , singuläre kurze Genregion von HCMV
UTP	Uridin-Trisphosphat
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
V5	Auf SV5 V-Protein beruhendes Epitop
V5His	Fusionsepitop aus V5 und HIS <sub>6</sub>
VACV	Vakzinia-Virus
VIPERIN	Virus inhibitorisches Protein, ER assoziiert, IFN induziert
v/v	<i>volume per volume</i> , Verdünnungsverhältnis zweier Flüssigkeiten
w/v	<i>weight per volume</i> , Menge pro Volumen Verhältnis bei Lösungen
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

## ZUSAMMENFASSUNG

In der vorgelegten Arbeit wurden Interaktionen zwischen dem humanpathogenen Cytomegalovirus (HCMV) sowie dem Maus-Cytomegalovirus (MCMV) mit dem antiviralen Interferon (IFN)-System vergleichend untersucht. Es zeigte sich, dass beide Viren Mechanismen kodieren, die die IFN-Jak-STAT-Signaltransduktion unterbrechen. HCMV- und MCMV-Infektionen reduzieren die Proteinmenge des für die IFN-Signaltransduktion essentiellen Transkriptionsfaktors *signal transducer and activator of transcription 2* (STAT2).

Das MCMV-kodierte Protein pM27 ist für die Induktion dieses STAT2-Verlustes essentiell und hinreichend. pM27 induziert die Reduktion der STAT2-Proteinmenge in murinen und humanen Zellen, ohne die STAT1- oder STAT3-Menge zu verringern. pM27 kopräzipitiert mit STAT2 und induziert eine STAT2-Modifikation, die als Ubiquitin (Ub)-Konjugation identifiziert werden konnte. Die STAT2-Ubiquitinierung führt zu einer proteolytischen Degradation durch das Proteasom, die die Proteinhalbwertszeit senkt und letztendlich die STAT2-Menge reduziert.

Es konnte ein Interaktionspartner von pM27 nachgewiesen werden, der mittels MS-Spektrometrie als DDB1 identifiziert wurde. DDB1 ist Bestandteil des DDB1-Cul4A-RocA Ubiquitinligase-Komplexes und wurde für paramyxovirale IFN-Antagonisten als essentieller Interaktionspartner für die STAT-Degradation nachgewiesen. Die STAT2-Degradationsfähigkeit von ektop exprimierten pM27-Verkürzungsmutanten korreliert mit der DDB1-Bindungsfähigkeit. Diese Befunde stehen mit einem Modell im Einklang, bei dem pM27 STAT2 an den DDB1-Cul4A-RocA-Komplex rekrutiert und dessen Ub-Ligaseaktivität zuführt.

Eine spezifische Deletion des *M27-ORFs* aus dem MCMV-Genom führt zur Attenuierung der Virusreplikation *in vitro* (nach IFN-Behandlung) und *in vivo*.  $\Delta$ M27-MCMV ist in IFN- $\gamma$ -behandelten Zellen interessanterweise deutlich stärker attenuiert als in IFN- $\alpha/\beta$ -behandelten Zellen. Mittels  $\Delta$ M27-MCMV konnte erstmals eine Beteiligung von STAT2 an der IFN- $\gamma$ -Signaltransduktion nachgewiesen werden und die Bedeutung dieses neuen Signalweges für die Immunkontrolle von MCMV aufgezeigt werden.

Die HCMV-kodierte STAT2-Reduktion weist eine Virusstamm-Spezifität auf und scheint in dem Fibroblasten-adaptierten Laborstamm HCMV-Towne verloren gegangen zu sein. Sie ist außerdem von dem pM27-homologen Gen *UL27* unabhängig: pUL27 ist für die HCMV-kodierte STAT2-Reduktion weder ausreichend noch essentiell. Die Fähigkeit, STAT2 dem Proteasom zuzuführen, wurde also wahrscheinlich von Cytomegaloviren mehrfach unabhängig evolviert, so dass geschlossen werden kann, dass STAT2-abhängig exprimierte Gene einen starken Selektionsdruck auf CMV ausüben.

## SUMMARY

The aim of this thesis was to investigate and compare the interaction of the humanpathogenic cytomegalovirus (HCMV) and the mouse cytomegalovirus (MCMV) with the antiviral interferon (IFN) system. Both viruses encode antagonists which interfere with the IFN-Jak-STAT signal transduction. HCMV and MCMV infections reduce the protein abundance of the *signal transducer and activator of transcription 2* (STAT2), a transcription factor which is essential for type I IFN-signaling.

The MCMV-encoded protein pM27 is essential and sufficient for inducing the loss of STAT2. pM27 affects STAT2 in mouse and human cells but reduces neither STAT1 nor STAT3. pM27 coprecipitates STAT2 and induces a STAT2 modification, which was identified to be ubiquitin (Ub) conjugation. The STAT2 ubiquitination induces proteolytic degradation by the proteasome which reduces the STAT2 half-life and thereby the STAT2 amount.

Co-immunoprecipitations revealed an interaction of pM27 with a cellular protein, which was subsequently identified by mass spectrometry (MS) to be DDB1. DDB1 is part of the cellular DDB1-Cul4A-RocA ubiquitin ligase complex and was previously shown to be an essential interaction partner for STAT degrading paramyxoviral IFN antagonists. The capacity of ectopically encoded pM27 truncation mutants to induce the proteolytic cleavage of STAT2 correlated with DDB1 binding. This implies a mechanism in which pM27 bridges STAT2 and DDB1 to recruit STAT2 to the Ub-ligase activity of the DDB1-Cul4A-RocA complex. Poly-Ub-STAT2 is recognized by the proteasome and subsequently degraded.

The targeted deletion of the *M27* ORF from the MCMV genome leads to attenuation of virus replication *in vitro* (upon IFN treatment) and *in vivo*. Interestingly,  $\Delta$ M27-MCMV is clearly more susceptible towards IFN- $\gamma$  treatment than towards type I IFN treatment. Using the  $\Delta$ M27-MCMV mutant the involvement of STAT2 in the IFN- $\gamma$  signaling cascade and the significance of this particular signal transduction for the immune control of CMV was demonstrated.

The HCMV-encoded reduction of STAT2 shows interstrain variability and is not present in the highly cell culture adapted laboratory strain HCMV-Towne, probably due to secondary gene loss or mutation. The STAT2 reduction is also independent of the coding capacity for *UL27*, the pM27 homologous protein encoded by HCMV. pUL27 is neither sufficient nor essential for the HCMV-encoded reduction of the STAT2 half-life. This implies that the ability to induce STAT2 degradation was evolved two times individually during CMV evolution highlighting the selective pressure elicited by STAT2-dependent genes on CMV.

# 1. EINLEITUNG

## 1.1 VIREN

Viren stellen replizierende Nukleinsäure-Protein-Komplexe mit einem obligat intrazellulärem und einem potentiell-extrazellulären Stadium dar, deren Nukleinsäuregenome alle essentiellen genetischen Informationen kodieren, um eine permissive Wirtszelle so umzuprogrammieren, dass sie eine neue Generation von Viren synthetisiert und assembliert. Im Gegensatz zu motilen, egoistischen genetischen Elementen (wie z.B. Retrotransposons) können Viren eine extrazelluläre Zustandsform annehmen, bei der ihr Genom in ein Virion oder Viruspartikel verpackt wird. Je nach Virusfamilie handelt es sich um einfache oder hochkomplexe Protein und/oder Lipidmembranstrukturen, die die Nukleinsäure schützend umschließen, die Transmission des Virus zu anderen Wirtszellen (und Wirten) erlauben und mit viralen Rezeptoren die nächste Wirtszelle identifizieren, um das virale Genom in die Zelle einzubringen. Das einzige verbindende Alleinstellungsmerkmal aller bekannten Viren ist die Unfähigkeit zur eigenständigen Proteintranslation, die eine Replikation von Viren in infizierten Zellen zwingend erforderlich macht (Raoult und Forterre, 2008). Die Zellen werden durch das Einbringen von viraler (für die Zelle also fremder) Nukleinsäure umprogrammiert, um anschließend große Mengen von Viren zu synthetisieren und assemblieren. Viren stellen demzufolge obligat intrazellulär replizierende Parasiten dar. Die Virus-Replikation nutzt den Stoffwechselapparat der Wirtszelle und schadet der Zelle somit. Außerdem führt eine Virusinfektion in vielen Fällen schlussendlich zum Tod oder zur Lyse der infizierten Zelle.

Grundsätzlich werden Lebewesen (resp. deren Zellen) aller systematischen Reiche von Viren befallen. Viren, die Prokaryonten infizieren, werden als Phagen bezeichnet. Da Viren, wie alle intrazellulären Parasiten, eine Koevolutionsbeziehung mit ihrem Wirt eingehen, kommt es in den meisten Fällen zu einer Adaption an einen spezifischen Wirt oder eine spezifische Wirtsfamilie, die zu einer Spezifikation und damit zu einem eingeschränkten Wirtsspektrum führt. In den meisten Fällen infiziert eine Virusart *in natura* deshalb nur eine oder einige wenige Wirtsspezies. In einigen Fällen ist das Wirtsspektrum so weit eingeschränkt, dass nur wenige Zelltypen einer einzigen Spezies von einem Virus biologisch erfolgreich infiziert werden können (wie z.B. beim humanen Hepatitisvirus C).

Da ursprünglich davon ausgegangen wurde, dass Viren außerhalb der Wirtszellen selbstständig keine Stoffwechselreaktionen katalysieren und nicht zur Rezeption und Verarbeitung von Signalen fähig sind, wurden Viren gemeinhin nicht als Lebewesen bezeichnet. Allerdings zeigen neuere Erkenntnisse, dass einige Viren in der Lage sind, außerhalb der Wirtszelle eigenständig

## Einleitung

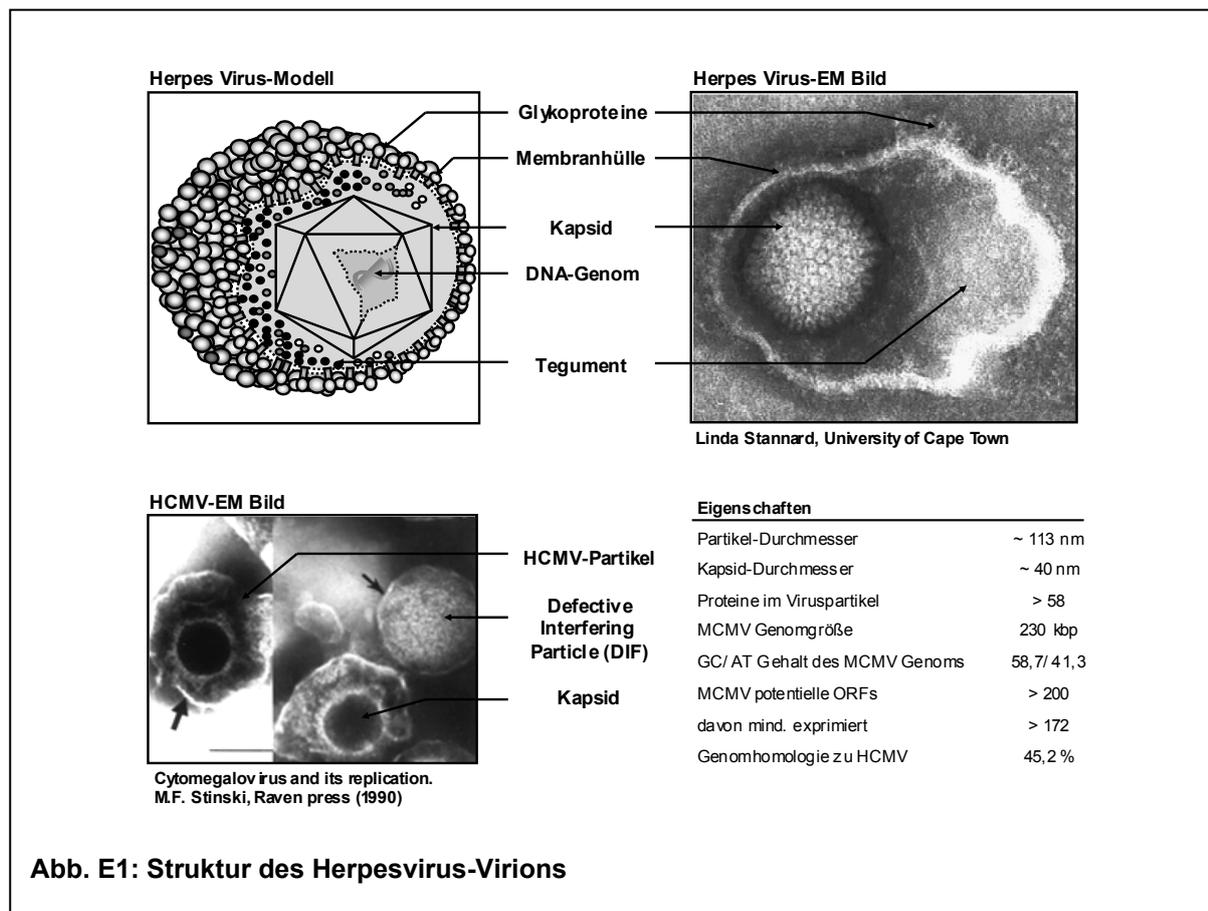
morphologische Entwicklungsprozesse durchzuführen (Haring et al., 2005). Das Auffinden von geeigneten Wirtszellen durch Rezeptor-Ligand-Interaktionen kann als eine Reaktion auf einen Stimulus und somit als Signalperzeption und Signalverarbeitung bewertet werden. Interessanterweise wurde kürzlich gezeigt, dass eine riesige Art (1185 kbp (!) Kodierungskapazität und 500-600 nm Durchmesser) von Acanthamoeba-infizierenden Viren (Mamavirus aus der Familie der Mimiviren) selbst von sog. Virophagen (dem Sputnikvirus) befallen wird (Pearson, 2008; Raoult et al., 2004; Raoult und Forterre, 2008). Diese Infizierbarkeit von Viren mit Virophagen wurde als zusätzliches Kriterium für Leben diskutiert (Pearson, 2008). Außerdem unterliegen Viren den allgemeingültigen Gesetzmäßigkeiten der Evolution: Bei der Replikation werden, bezogen auf das Vorhandensein von potentiellen Wirtszellen, sehr große Überschüsse produziert, so dass es zwangsläufig zu Konkurrenz um die ökologische Nische kommt. Das virale Genom mutiert und diese Veränderungen werden an die folgende Generation vererbt. Viren mit einer erhöhten selektiven Anpassung an die jeweiligen Umweltbedingungen werden ihr Genom mit einer gesteigerten Wahrscheinlichkeit und mit gesteigerter Quantität in die folgende Generation einbringen und aus Mutation und Selektion resultiert eine evolutionäre Anpassung an die gegebenen Umstände. Hierbei muss allerdings in Betracht gezogen werden, dass die ökologische Nische des Virus in erster Instanz die Wirtszelle und in zweiter Instanz die infizierbare Wirtsspezies darstellt. Ob Viren also Lebewesen sind, scheint letztendlich eine Frage der Anschauung zu sein.

Unabhängig von der systematischen Einordnung stellen Viren wichtige und interessante Studienobjekte dar, da sie einerseits durch ihre schädigende Wirkung auf den Wirt aus klinischer Sichtweise unabdingbare Forschungsfragestellungen begründen und andererseits infolge ihrer hochspezifischen, hochgradig selektierten Adaptation an den Wirt eine Art „Innenansicht“ auf den Wirt erlauben, die für Zwecke der Grundlagenforschung hervorragend genutzt werden kann. So wurde zum Beispiel das zentrale Dogma der Molekularbiologie durch Retrovirusforschung überwunden (Baltimore, 1970; Temin und Mizutani, 1970), der Mechanismus des *Splicing* bei Adenoviren identifiziert (Berget et al., 1977) und DNA als Träger der Erbinformation bei Phagen beschrieben (Hershey und Chase, 1952).

Die Frage des Ursprungs von Viren ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Mögliche Modelle stellen einen fortschreitenden Verlust der Komplexität von zellulären Parasiten einem Komplexitätsgewinn von Transposons gegenüber. Da nicht einmal geklärt ist, ob Viren eine monophyletische Gruppe darstellen, wären auch unterschiedliche Szenarien für unterschiedliche Virusfamilien durchaus denkbar.

### 1.1.1 Herpesviren

Herpesviren sind große (80-200 nm), behüllte Viren mit doppelsträngigen, großen, unsegmentierten DNA-Genomen (von bis zu 235,6 kbp (MCMV)). Herpesviren sind somit hochkomplexe Viren mit einer Kodierungskapazität, die nur ca. 2,5- bis 4-fach unterhalb der Kodierungskapazität bekannter prokaryontischer Zellen (z.B. Mycoplasmen) liegt. Herpesviren zeichnen sich durch ihre ausgeprägte Speziespezifität aus. Sie befallen normalerweise nur eine bestimmte Wirtsart. Allerdings finden sich häufig verwandte Viren mit kolinearen Genomen und ähnlichen Lebenszyklen in den verschiedenen Arten.



Die Partikel resp. Virionen der Herpesviren sind hochkomplex. Es handelt sich um behüllte Viren, in deren Membran sowohl viral-kodierte Glykoproteine (oft mehr als 10 verschiedene, manchmal über 20) als auch ehemalige Wirtszellproteine eingelagert sind. Innerhalb dieser Membran findet sich das Kapsid, welches das Genom umschließt. Das Genom liegt im Partikel linear vor, wird in der infizierten Zelle jedoch zirkularisiert, um eine DNA-Replikation über einen sog. *rolling cycle*-Mechanismus zu erlauben (McVoy und Adler, 1994). Zwischen dem Kapsid und der Membran findet sich eine proteinöse Matrix, das sog. Tegument, das im Fall des Humanen Cytomegalovirus (HCMV) u. a. aus Phosphoproteinen (z.B. pp65-UL83 und pp71-

## Einleitung

UL82) besteht. Während der Infektion wird oft eine große Zahl nicht-infektiöser Partikel, sog. *defective interfering particles* gebildet, die in vielen Fällen die Zahl der infektiösen Viruspartikel bis um das 100-fache überschreitet. Ob diese Partikel eine biologische Bedeutung für das Virus haben oder unvermeidliche Fehler darstellen, ist offen. Abbildung E1 zeigt sowohl ein Modell als auch elektronenmikroskopische (EM)-Bilder von Herpesviren und Cytomegaloviren und weist einige physikalische und molekularbiologische Eigenschaften des Maus-Cytomegaloviruses (MCMV) aus.

Nach einer Primärinfektion ist der Wirt, unabhängig von seinem Immunstatus, nicht in der Lage, das Herpesvirus komplett zu eliminieren. Eine sterile Immunität (wie z.B. beim Masernvirus) durch die Wirkung des Immunsystems wird niemals erreicht, obwohl die grundsätzlichen Reaktionen des Immunsystems erfolgreich ablaufen. Es werden sowohl virus-spezifische T-Zellen als auch B-Zellen gefunden, die die Virusreplikation einer zweiten Infektion massiv unterdrücken können, aber keine sterile Immunität erreichen und die Zweitinfektion nicht verhindern können. Das Virus geht in den Zustand der Latenz über und kann je nach aktuellem Immunstatus des Wirtes reaktivieren.

Alle Herpesviren treten in einen Zustand der Latenz ein, bei dem, im Gegensatz zur chronischen Infektion, keine infektiösen Viruspartikel z. B. im Serum nachgewiesen werden können. Die Latenzzeit von Herpesviren wird nur von der Lebensdauer des Wirtes bestimmt, da sie lebenslang anhält. Die Reaktivierungen sind teilweise subklinisch, können allerdings zu ernsthaften Komplikationen in immunkompromitierten Patienten führen. Unterschiedliche Herpesviren zeichnen sich durch ihren unterschiedlichen Zelltropismus aus. Humanpathogene Herpesviren werden in  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Herpesviren unterteilt, wobei Cytomegaloviren prototypische Vertreter der  $\beta$ -Herpesviren darstellen.

### *1.1.1.1 Cytomegaloviren (CMV)*

Cytomegaloviren wurden als übertragbare, spezies-spezifische, ursächliche Erreger der Einschlusskörperchenkrankheit der Speicheldrüse identifiziert (Craig et al., 1957; Rowe et al., 1956; Smith und Vellios, 1950; Smith, 1954; Smith, 1956). Sie (resp. CMV-spezifische Antikörper; siehe unten) werden weltweit in einem Grossteil der erwachsenen Bevölkerung nachgewiesen. Als opportunistische Erreger führen CMV-Infektionen bei hereditären, pharmakologisch-induzierten und Infektions-vermittelten Immundefizienzen zu schweren Krankheitsverläufen mit teils fatalem Ausgang.

## Einleitung

Der Name der Cytomegaloviren leitet sich einerseits von dem charakteristischen cytopathischem Effekt (CPE) infizierter Zellen *in vitro*, andererseits von der histologisch fassbaren Veränderung der betroffenen Zellen während der cytomegalen Einschlusskörperchenkrankheit ab.

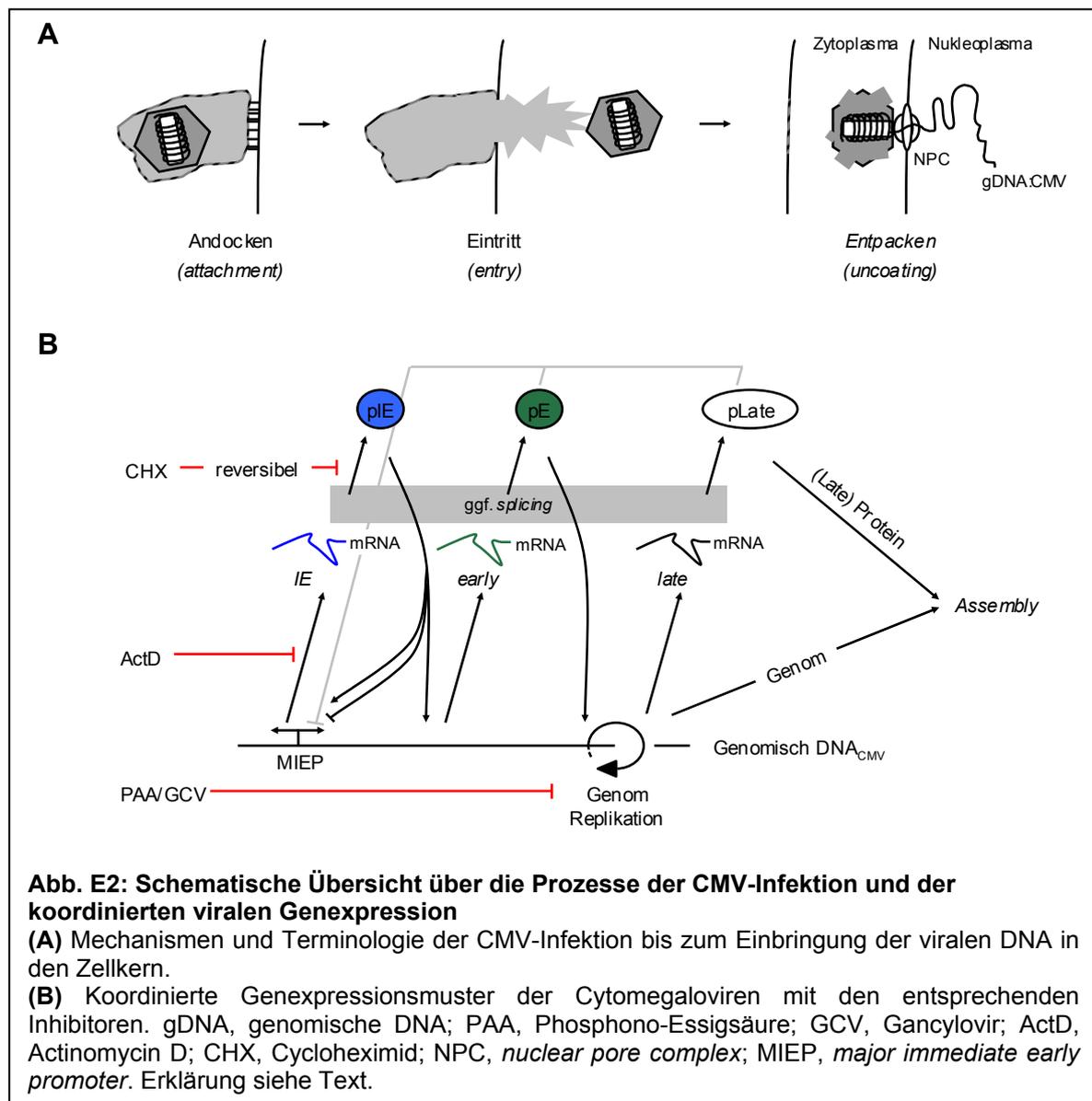
Wie bei allen Herpesviren ist auch bei CMV die Latenz ein charakteristischer Bestandteil des viralen Replikationszykluses. CMV überdauert in einem Stadium der Latenz, das sich von chronischen oder persistenten Infektionen durch die Abwesenheit von infektiösen Viren im infizierten Wirt unterscheidet. So werden (selbst mit modernsten und sensitivsten) Methoden keine infektiösen CMV-Viren im Stadium der Latenz nachgewiesen, obwohl das virale DNA-Genom in den jeweiligen Zellen oder Organen des Wirtes gefunden wird (Pollock und Virgin, 1995).

CMV besitzt ein großes (~230 kbp) doppelsträngiges DNA-Genom. Das Genom liegt im viralen Partikel linear vor und wird vor der DNA-Replikation zirkularisiert, um eine *rolling cycle* Replikation zu erlauben, bei der initial Konkatemerintermediate entstehen, die dann wieder entsprechend getrennt werden (McVoy und Adler, 1994). Beide Stränge kodieren in teilweise entgegengesetzter Orientierung für die Transkription von mRNA. Im zentralen Bereich des Genoms finden sich Gene für Strukturkomponenten des Viruspartikels sowie Komponenten der viralen Genom-Replikation (Brocchieri et al., 2005; Rawlinson et al., 1996). Die meisten dieser Gene sind für die virale Replikation essentiell und können nicht entfernt werden, ohne dass die Replikationsfähigkeit verloren geht. Insbesondere dieser zentrale Bereich des Genoms ist in unterschiedlichen Cytomegalovirus-Spezies und auch anderen Herpesviren konserviert. Der äußere Bereich kodiert häufig für spezifische Funktionen der Immunevasion und des Wirts- und Zelltropismus. In Zellkultur können große Teile dieser Gen-Bereiche entfernt werden ohne die Replikationsfähigkeit in der Zellkultur zu zerstören (Cicin-Sain et al., 2007).

Nach dem Andocken (*attachment*) des viralen Partikels an die Zielzelle über eine Rezeptor-Ligand-Interaktion kommt es zu einer Fusion der viralen Membran mit der Zellmembran, so dass das virale Kapsid in das Zytoplasma gelangt (*entry*). In den letzten Jahren wurden verschiedene zelluläre Oberflächenproteine als Rezeptor für HCMV diskutiert. Als gesichert gilt die Bindung des essentiellen Virusglykoproteins gB (Hobom et al., 2000) an zelluläre Integrine (Feire et al., 2004; Wang et al., 2005). Außerdem wurde der *epithelial growth factor receptor* (EGFR) als (vermeintlicher) Rezeptor für das gB-vermittelte *attachment* und *entry* beschrieben (Wang et al., 2003), später jedoch wieder in Frage gestellt (Isaacson et al., 2007). Jüngste Befunde weisen den *platelet-derived growth factor-alpha receptor* (PDGFR- $\alpha$ ) als Rezeptor nach (Soroceanu et al., 2008). Da PDGF Gene wie *c-fos* und *c-myc* induziert und eine IFN-ähnliche Genexpression auslöst (Zullo et al., 1985; Cochran et al., 1984), die ebenfalls für HCMV (Boldogh et al., 1990)

## Einleitung

resp. für rekombinantes gB (Simmen et al., 2001) beschrieben wurde, scheint es sich hier um einen sehr guten Kandidaten zu handeln. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass HCMV zwei unterschiedliche Rezeptorkomplexe nutzt, um Fibroblasten einerseits und Endothelzellen andererseits zu infizieren (Wang und Shenk, 2005a). *Attachment* und *entry* an/in Fibroblasten wird über gB realisiert, wohingegen für die erfolgreiche Infektion von Endothelzellen ein Komplex aus gH, gL, pUL128 und pUL131 erforderlich ist (Wang und Shenk, 2005b). Das virale Kapsid wird über den Mikrotubuli-Apparat zum Zellkern transportiert, wo das Kapsid dissoziiert wird (*uncoating*) und die virale DNA in den Zellkern gebracht wird. Die anschließende virale Genexpression ist hochgradig koordiniert und wird in sofort exprimierte (*immediately early [IE]*), früh exprimierte (*early*) und spät exprimierte (*late*) Gene unterteilt (Wathen et al., 1981; Wathen und Stinski, 1982).



## Einleitung

Die experimentell bedingte Einteilung bezieht sich nicht auf den Zeitpunkt, wann die Genprodukte nachgewiesen werden können. Die *IE*-Gene weisen Promotoren auf, die in Abwesenheit viraler Proteine, d. h. nur durch zelluläre Transkriptionsfaktoren induziert werden und so die Transkription der entsprechenden Gene auslösen. Der wichtigste CMV-Promotor ist der *major IE promoter* (MIEP), der (im Falle von HCMV) für die Expression des ie-Primärtranskriptes verantwortlich ist, das aufgrund alternativen *splicings* die pp72-IE1 und pp86-IE2 kodierenden mRNAs bereitstellt. Der MIEP ist konstitutiv aktiv und wird in nahezu allen Zelltypen aktiviert, so dass er in einer Vielzahl von eukaryontischen Expressionsvektoren verwendet wird (Boshart et al., 1985). Im Unterschied zum IE-Promoter benötigen die Promotoren von frühen (*early*) Genen jedoch die transaktivierende Wirkung viraler Proteine. Eine Transfektion eines solchen Genabschnittes (mit Promotor) führt nicht zu effizienter Transkriptionsinitiation. Die letzte Phase der Genexpression ist die sog. *late*-Expressionsphase. Für die Expression von *late*-Genen ist die Replikation des viralen Genoms notwendig, so dass *late*-Genexpression durch pharmakologische Inhibitoren der viralen DNA-Polymerase (z.B. Phosphono-Essigsäure) inhibiert werden kann (Hones und Watson, 1977). Die Übersicht E2A zeigt ein sehr vereinfachtes Schema der initialen Schritte der Infektion (Abb. E2A) und der viralen Genexpressionsregulation (Abb. E2B) mit der entsprechenden Terminologie und den jeweiligen Inhibitoren, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Cytomegaloviren weisen *in vivo* eine extreme Wirtsspezifität auf. Jede Säugerspezies „besitzt“ eine eigene Art von Cytomegalovirus. *In vitro* können teilweise Zellen von anderen Spezies produktiv infiziert werden, so dass eine (bedingte) Replikation erfolgt. So repliziert MCMV z. B. in BHK-21 (*baby hamster kidney*) und PRK (*primary rabbit kidney*) Zellen (Kim und Carp, 1971). Modellinfektionen von Labortieren mit dem humanen Cytomegalovirus (HCMV) sind aber nicht möglich. Dies erlaubt einerseits den sicheren Umgang mit nicht-humanen Cytomegaloviren, da sie für Menschen apathogen sind, allerdings stellt dies auf der anderen Seite ein Problem für die Untersuchung von HCMV *in vivo* dar. Deshalb werden für grundsätzliche Fragestellungen zur Pathogenese, deren experimentelle Klärung im Menschen nicht möglich ist, Cytomegaloviren, die Kleintiere infizieren, herangezogen. Das murine oder Mauscytomegalovirus (MCMV) ist ein natürlich vorkommender Erreger in wildlebenden Mäusen (*Mus musculus*). Humanes und murines CMV weisen kolineare, homologe Genome mit einem hohen Grad konservierter Proteine auf und ähneln sich auch in Bezug auf Organ- und Zelltropismus sowie dem assoziierten Krankheitsverlauf, so dass grundsätzliche Strategien des Virus resp. die entsprechenden Reaktionen des Wirtes in diesem Model untersucht werden können. MCMV wird als Modellvirus für die Untersuchung von Zusammenhängen zwischen

## Einleitung

Cytomegalovirus und Wirt insbesondere *in vivo* herangezogen. Deshalb werden die MCMV-Gene in homologe und nicht-homologe Gene, bezogen auf HCMV, unterteilt. Großbuchstaben kennzeichnen Gene, die zumindest ein Positionshomolog mit einer gewissen genetischen Homologie darstellen (z.B. *M27*). Bei dieser Nomenklatur wurde die Funktion der jeweiligen Gene resp. Proteine nicht berücksichtigt. *M27* besitzt demzufolge eine gewisse Homologie mit *UL27* des humanen Cytomegalovirus.

Ein erheblicher Unterschied zwischen MCMV und HCMV stellt die fehlende diaplazentare Übertragung von MCMV von der Mutter auf den Fötus dar. Die diaplazentare Übertragung spielt eine wichtige Rolle für die Pathogenese von HCMV *in natura*.

### *1.1.1.2 Klinische Bedeutung von HCMV*

CMV kann über unterschiedliche Infektionsrouten (Speichel, Muttermilch, Urin, Blut, Genitalsekret und Sperma) von einem Wirt auf den nächsten transmittiert werden. Eine weitere Infektionsroute ist die vertikale Mutter-Kind-Übertragung. Insbesondere Föten und Frühgeborene, die noch keine adaptive Immunität gegen CMV gebildet haben, stellen eine Risikogruppe dar, da ihr Infektionsschutz von der Übertragung von CMV-spezifischen Antikörpern durch die Mutter abhängt. Bei einer Primärinfektion der Mutter während der Schwangerschaft besteht diese Möglichkeit nicht, da Antikörper erst verzögert nach der Primärinfektion gebildet werden können (Fowler et al., 1992). Im Falle einer anschließenden diaplazentaren Infektion des Fötus kommt es vielfach zu gravierenden Krankheitsverläufen. Diese Neugeborenen zeigen häufig massive Einblutungen (Petechien), Taubheit und geistige Retardation und es kann zu fatalen Krankheitsverläufen kommen.

Nach der Primärinfektion können die angeborene und die adaptive Immunität des Wirtes gemeinsam die Primärinfektion des Virus kontrollieren, so dass es bei immunkompetenten Wirten meistens zu inapparenten Krankheitsverläufen kommt, eine sterile Immunität wird jedoch niemals erreicht. Allerdings können auch immunkompetente Patienten an akuten HCMV-Infektionen erkranken: Sie entwickeln eine infektiöse Mononukleose. Es wurde außerdem gezeigt, dass es nach einer CMV-Infektion auch in scheinbar immungesunden Patienten zu schweren oder gar lebensbedrohlichen Infektionsverläufen kommen kann (Rafailidis et al., 2008). Zusätzlich wird eine Wirkung von CMV-Infektionen auf die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen diskutiert (Adam et al., 1987; Bason et al., 2003; Haines et al., 1988).

Auch wenn CMV (MCMV und HCMV) *in vitro* nur in einer sehr begrenzten Zahl von Zelltypen und Zelllinien erfolgreich vermehrt werden kann, repliziert CMV *in vivo* in einer Vielzahl von Zelltypen und Organen (Sinzger und Jahn, 1996; Sinzger et al., 2008a). Der breite Zelltropismus

## Einleitung

führt zu mannigfaltigen Manifestationen einer akuten CMV-Infektion oder Reaktivierung wie Pneumonitis, Retinitis und Hepatitis. *In vivo* repliziert HCMV neben Endothelzellen, Epithelzellen, Fibroblasten und glatten Muskelzellen auch in Zellen hematopoetischen Ursprungs (Goodrum et al., 2002; Hahn et al., 1998; Maciejewski et al., 1992; Movassagh et al., 1996). In diesem Zusammenhang werden auch CD34<sup>+</sup> Blutvorläuferzellen von HCMV infiziert (Goodrum et al., 2002; Hahn et al., 1998). Nach der Primärinfektion etabliert HCMV in diesen Zellen einen Zustand der Latenz (Goodrum et al., 2002; Hahn et al., 1998; Maciejewski et al., 1992).

HCMV stellt die häufigste nicht-genetische Komplikation bei Neugeborenen dar und betrifft zwischen 0,2 und 2,2 % der Neugeborenen (Staras et al., 2006). In den Vereinigten Staaten von Amerika werden jährlich ca. 35.000 Kinder mit einer HCMV-Infektion geboren (Fowler et al., 1992).

Das Virus verbleibt, trotz oder gerade wegen dem Vorhandensein von CMV-spezifischen T-Zellen (insbesondere CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen) und NK-Zellen, in einem latenten Zustand persistent vorhanden und reaktiviert je nach Immunstatus lokal oder systemisch. In Mäuseversuchen konnte gezeigt werden, dass alle Mäuse mit einer latenten MCMV-Infektion, 14 Tage nach einer simultanen Depletion von CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen und NK-Zellen (in  $\mu$ MT-Mäusen mit immens verminderter B-Zellzahl) eine Reaktivierung von MCMV in Speicheldrüse und Lunge aufweisen (Polic et al., 1998). Das Vorhandensein von CMV-reaktiven Antikörpern zeigt also nicht nur eine vorangegangene Infektion (wie z.B. bei Masern), sondern ein rezentes Vorhandensein des Virus an. Eine Beeinträchtigung oder der Verlust des Immunsystems durch Stress, immunsuppressive Medikamente im Rahmen einer Organ- oder Zelltransplantation oder durch Superinfektionen mit anderen Pathogenen, die das Immunsystem negativ beeinflussen (wie z.B. HIV), führt in zahlreichen Patienten zu einer akuten Reaktivierung, die unbehandelt zu schweren Krankheitsverläufen führt. Bei steigenden Zahlen von HIV-infizierten AIDS-Patienten und der fortschreitenden Nutzung von Organ- und Zelltransplantationstechniken mit einer einhergehenden (und erforderlichen) immunsuppressiven Therapie steigt weltweit die Zahl der prädisponierten Patienten.

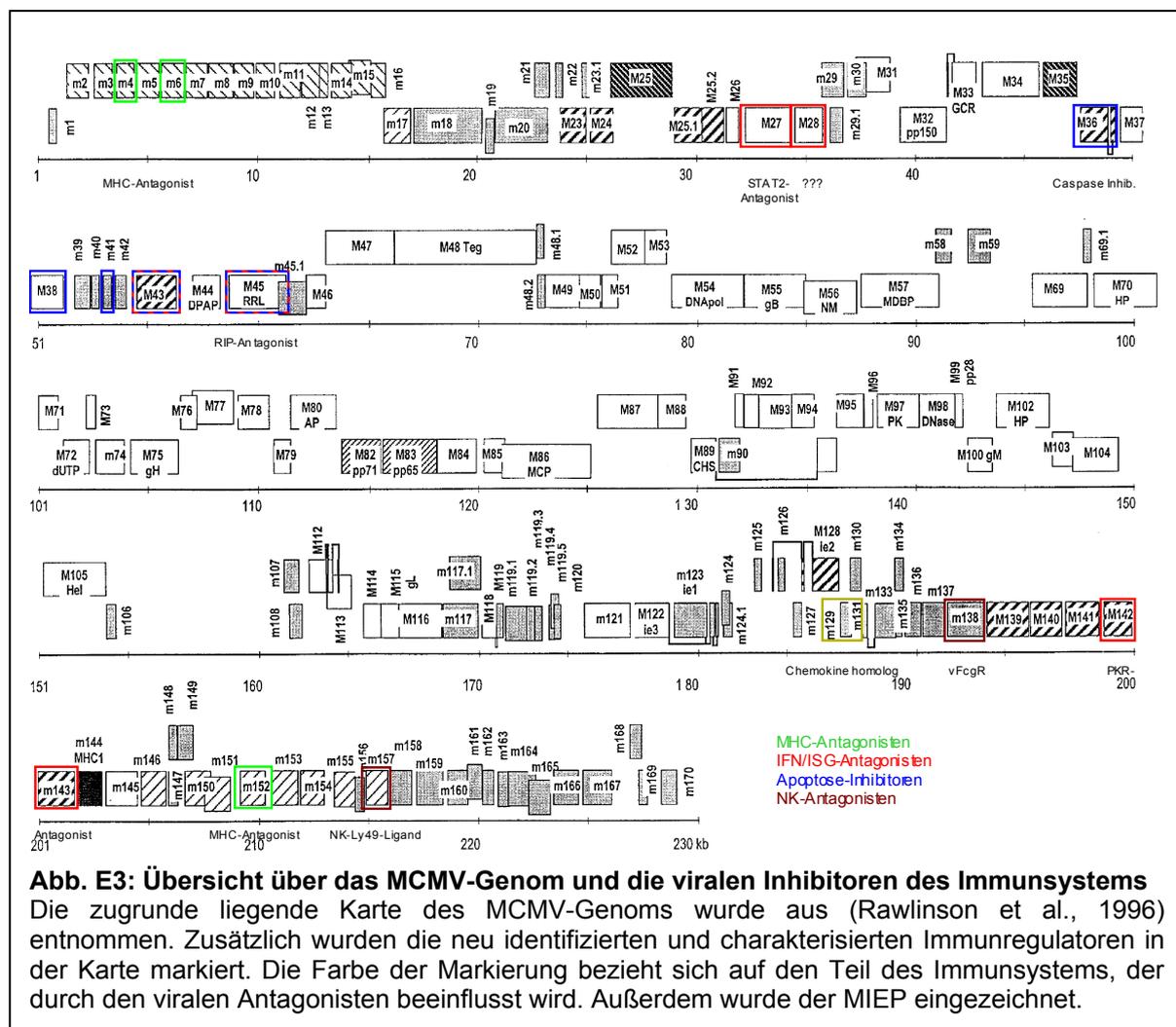
Das humane CMV stellt ein extrem erfolgreiches Virus dar, da es je nach Alter und sozioökonomischen Faktoren zwischen 50% und annähernd 100% der erwachsenen Population infiziert (Seroprävalenz). Die Seroprävalenz für HCMV ist dabei umgekehrt proportional zu dem jeweiligen sozioökonomischen Status (Staras et al., 2006). Die Durchseuchung in den Vereinigten Staaten von Amerika liegt bei 58,9% (Staras et al., 2006) und erreicht in

## Einleitung

Entwicklungsländern annähernd 100%. HCMV kann deshalb als ubiquitäres Herpesvirus betrachtet werden.

### 1.1.1.3 Genetik der CMV-Viren

Die Genome von MCMV und HCMV sind vollständig sequenziert und annotiert (Brocchieri et al., 2005; Rawlinson et al., 1996; Bankier et al., 1991; Chee et al., 1990). Das MCMV-Genom ist für ein Virus sehr groß und kodiert für sehr viele Proteine. In Abbildung E3 ist das MCMV-Genom schematisch dargestellt. Gene/Proteine, für die eine immunevasive Eigenschaft nachgewiesen wurde, sind entsprechend markiert.



Um herpesvirale Genome genetisch manipulieren zu können, wurden früher Resistenzkassetten (z.B. *gpt<sup>r</sup>* oder *amp<sup>r</sup>*) oder Reportergene (*lacZ* oder *gfp*) mit homologen Bereichen (zu dem viralen Genom) flankiert, um nach Transfektion in eukaryotische Zellen und anschließender CMV-Infektion eine homologe Rekombination in den gewünschten Genabschnitt zu erreichen, so dass das entsprechende Zielgen durch den Resistenzmarker ersetzt wird. Mittels der

## Einleitung

Selektionsmarker wurden die gewünschten CMV-Mutanten gewonnen. Diese traditionelle oder klassische Mutagenese ist sehr zeitaufwendig und schwer zu kontrollieren, findet aber trotzdem auch heute noch Verwendung.

Da die initialen viralen Gene unter der Kontrolle des IE-Promotors stehen, ist transfizierte CMV-DNA in Abwesenheit von jeglichen viralen Proteinen infektiös (im Gegensatz zu z. B. der DNA von Pockenviren). Die Transfektion des kompletten CMV-DNA-Genoms in permissive Zellen initiiert einen kompletten Replikationszyklus. Diese Fähigkeit erlaubt die Rekonstitution von modifizierten CMV-Genomen. Die CMV-Mutagenese wurde durch die Klonierung des gesamten CMV-Genoms als bakterielles artifizielles Chromosom (BAC) revolutioniert. Durch die klassische Insertion einer Selektionskassette und einer BAC-Sequenzkassette in nicht-essentielle Gene (wie z.B. *US2-US6* im Fall von HCMV) liegt das Genom des jeweiligen CMVs als BAC vor (Messerle et al., 1997). Dies erlaubt den stabilen Erhalt des Genoms in (*recA*-defizienten) Bakterien. Somit können an dem Genom bereits innerhalb der Bakterien alle molekularbiologischen Veränderungen, die die Bakteriengenetik erlaubt, wie zum Beispiel die Transposon-Mutagenese (Brune et al., 1999b), vorgenommen werden. Diese Methode wurde erstmals für MCMV beschrieben und anschließend erfolgreich für HCMV und andere Herpesviren adaptiert (Borst et al., 1999). Interessanterweise deletieren die BAC-abhängig gebauten MCMV-Mutanten während einiger Passagen in Zellkultur die BAC-Kassette spezifisch über eine homologe Rekombination. Auf diese Weise wird eine vergleichbare Replikation mit dem parenteralen Virus *in vivo* wiederhergestellt (Wagner et al., 1999).

### **1.2 INTERFERONE ALS ZYTOKINE DER IMMUNREAKTION AUF PATHOGENE**

Da Wirte mannigfaltigen Infektionen von verschiedensten Pathogenen ausgesetzt sind, üben Pathogene einen enormen Selektionsdruck auf ihre Wirte aus. Dies hat zu der Entwicklung von vielen wirtseigenen Abwehrmaßnahmen geführt, die es dem Wirt erlauben, auch in der Gegenwart von Pathogenen weiter zu existieren. Grundsätzlich nennt man das gesamte System dieser Abwehrmaßnahmen das Immunsystem. Das Immunsystem wird in zwei grundsätzliche Teilbereiche unterteilt: Die angeborene oder „natürliche“ Immunität (*innate immunity*) und die erworbene oder erlernte Immunität (*adaptive immunity*). Beide Systeme sind eng miteinander verzahnt und bilden nur zusammen einen wirksamen Schutz gegen Pathogene. Nach einer Infektion laufen sofort die Reaktionen der nativen angeborenen Immunität ab. Die erlernte Immunität hingegen basiert auf Antigen-spezifischen Zellen wie T- und B-Zellen. Diese müssen nach der Infektion erst aktiviert werden, anschließend proliferieren und in die Körperbereiche migrieren, in denen die Infektion stattgefunden hat. Deshalb folgt die erlernte Immunreaktion

## Einleitung

erst mit einiger Verzögerung auf die Infektion. Ohne die angeborene Immunität würde diese Zeit dem Pathogen zu einer so immensen Vermehrung ausreichen, dass der Wirt versterben würde. Andererseits zeigen Studien, dass viele Infektionen insbesondere durch Viren nur durch die spezifische Reaktion des adaptiven Immunsystems beendet und kontrolliert werden können.

Die Identifikation von Pathogenen durch das angeborene Immunsystem unterscheidet sich fundamental von der Identifikation durch das erlernte Immunsystem. Die Identifikation durch das adaptive Immunsystem basiert auf spezifischen (klonotypischen) Rezeptoren, die durch zufällige Variabilität auf der einen, und positive und negative Selektion auf der anderen Seite, auf ein bestimmtes Pathogen resp. ein bestimmtes Molekülfragment dieses Pathogens maßgeschneidert werden. Das angeborene Immunsystem erkennt (im Gegensatz zum adaptiven Immunsystem) grundsätzliche Nicht-Selbst, Anders-Als-Selbst, Stress und am allerwichtigsten Pathogen-assoziierte Strukturen (Janeway, Jr. und Medzhitov, 1998). Interessanterweise muss die angeborene Immunität demzufolge mit einem limitierten Repertoire an Rezeptoren (die während der Infektion nicht verändert oder optimiert werden) eine Vielzahl von verschiedenen potentiellen Pathogenen erkennen können. Ein grundlegendes Prinzip scheint hier die Erkennung von molekularen Strukturen zu sein, die nicht in „höheren“ Eukaryonten vorkommen, die aber eine essentielle Rolle in der Biologie der Infektionserreger spielen und nur bedingt variabel sind (Aderem und Ulevitch, 2000). Letztendlich führt die Erkennung solcher Strukturen zur Induktion von Interferonen (IFNs). IFNs stellen die ersten beschriebenen Zytokine dar und wirken als zelluläre Botenmoleküle. Der Name Interferone bezieht sich auf ihre Fähigkeit, Virus-Interferenz auszulösen. IFNs wurden von Isaacs und Lindenmann als das lösliche Prinzip identifiziert, das von bebrüteten, befruchteten Hühnereiern während und nach einer Influenza-Virus Infektion produziert wird und nach einer virusfreien Übertragung auf andere Eier in der Lage ist, die Eier vor einer Infektion mit Influenza-Viren zu schützen (Isaacs und Lindenmann, 1957). IFNs sind Zytokine und selbst nicht direkt antiviral wirksam. IFNs wirken ausschließlich als Botenmoleküle, die Zellen anregen, ein Transkriptionsmuster zu exprimieren, das die Replikation von Pathogenen eindämmt oder verhindert (Pestka et al., 1987; Samuel, 2001). IFNs werden in drei Klassen eingeteilt, Typ I IFN (IFN- $\alpha/\beta$ ), Typ II IFN (IFN- $\gamma$ ) und Typ III IFN.

Heute, ca. 50 Jahre nach ihrer Entdeckung, begründen IFN nicht nur akademische Fragestellungen. IFN-Präparate werden inzwischen laut Roter Liste von verschiedenen Firmen (Essex Pharam, Roche, Biogen Idec, Bayer Vital, Biosyn, Boehringer Ingelheim usw.) unter verschiedensten Präparatnamen (z.B. IntronA, Roferon, Avonex, Betaferon, Fiblaferon, Pegasys, Imukin usw.) vertrieben. Die Anwendungspalette bezieht virale Erkrankungen wie virus-induzierte Hepatitis (Hepatitis B Virus und Hepatitis C Virus), KSHV-induziertes Karposi-

Sarkom, schwer beherrschbare Virusenzephalitis, *Herpes zoster generalisatus* und Varizellen bei immunsupprimierten Patienten ein. Außerdem werden chronische myeloische Leukämien, multiple Myelome, Haarzell-Leukämien, kutane T-Zell-Lymphome und Multiple Sklerose mit IFN-Präparaten behandelt.

Im Folgenden sollen die Pathogenerkennung durch die angeborene Immunität, die ausgelösten Signalkaskaden, die IFN-Induktion, die IFN-abhängige Signaltransduktion und einige IFN-induzierte Gene erläutert werden. Anschließend soll insbesondere auf die Wirkung des IFN-Systems auf die Herpesvirus-Replikation und die bekannten viralen Antagonisten eingegangen werden.

### 1.2.1 Interferone (IFNs)

Interferone sind pH-stabile kleine Proteine, die häufig glykosyliert sind und als Antwort auf eine Infektion gebildet werden. Sie werden in Typ I IFN, dazu gehören alle IFN-alpha (IFN- $\alpha$ ) Subtypen und IFN-beta (IFN- $\beta$ ), Typ II IFN, repräsentiert durch IFN-gamma (IFN- $\gamma$ ) und die relativ neu identifizierten Typ III IFN aufgeteilt. Grundsätzlich unterscheiden sich die IFNs durch die Zellen, die sie sezernieren, die Art der Induktion und funktionell über den Rezeptorkomplex und die Signalkaskade, die durch das entsprechende IFN induziert wird.

IFNs werden nach Infektionen von Zellen produziert und wirken sowohl autokrin als auch parakrin. Sie lösen lokal und systemisch die Induktion von Maßnahmen zur Eindämmung einer Infektion aus und sind insbesondere wichtig für die Immunität gegen intrazelluläre Pathogene wie z. B. Viren. Sie fungieren als Mediatoren der Signalkommunikation, wirken selbst aber nicht antiviral. Durch die Bindung an den entsprechenden Rezeptor wird eine Signalkaskade induziert, die die Genexpression der jeweiligen Zelle verändert und sie anschließend in einen antiviralen Zustand versetzt. Da die meisten Mechanismen der Pathogenabwehr antiproliferative, zellschädigende und teilweise sogar apoptotische Prozesse auslösen, müssen alle diese Mechanismen sehr fein reguliert werden und können nicht ständig aktiv sein. Als Zytokine können IFNs als zelluläres Kommunikationssystem verstanden werden. Da es sich in diesem Fall um die Information einer schädigenden Wirkung durch Pathogene handelt, stellen IFNs eine Art molekularen Hilfe- und Warnruf der Zelle dar. Experimente an Mäusen mit spezifischen Deletionen der Gene für IFNs, IFN-Rezeptoren oder intrazelluläre Signalüberträgermoleküle zeigen, dass dieses System unerlässlich für das Überleben des Wirtes im Fall einer Infektion ist (Muller et al., 1994). Humane Patienten, denen ein funktionelles IFN-System fehlt, leiden dementsprechend an unkontrollierten Virusinfektionserkrankungen (Levin und Hahn, 1985). Zusätzlich spielen IFNs eine Rolle in der Tumorkontrolle.

Patienten mit genetischen Defekten in Komponenten der Pathogenerkennung, IFN-Induktion oder IFN-Signaltransduktion zeigen sehr schwere Krankheitsverläufe durch sonst opportunistische Erreger und sogar durch abgeschwächte Impfstämme und versterben ohne Behandlung oft im frühen Kindesalter (Dupuis et al., 2003; Jouanguy et al., 1996).

### **1.2.2 Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs)**

*Pathogen associated molecular patterns* (PAMPs) stellen direkte oder indirekte Bestandteil eines Pathogens oder einer Pathogenfamilie dar, die nicht im Wirt selbst vorkommen und durch spezifische Rezeptoren erkannt werden können. Diese Rezeptoren leiten anschließend einen molekularen Hilferuf ein, indem sie über eine Signaltransduktion letztendlich die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen auslösen und die angeborene Immunität aktivieren (eine vereinfachte Übersicht findet sich in Abb. E4). Einige wichtige PAMPs sind das LPS der Gram-negativen Bakterien, die Lipoteichonsäuren von Gram-positiven Bakterien, das Zymosan von Hefen und Pilzen, doppelsträngige RNA von Viren oder hypomethylierte CpG-Motive innerhalb der DNA. Neben diesen Pathogenen-Bestandteilen induzieren oder verstärken auch tote oder nekrotische Zellen resp. deren Bestandteile wie *heat-shock* Proteine (HSPs) oder freies ATP die Reaktionen des angeborenen Immunsystems. Dies ist ein offensichtlicher Schutzmechanismus, da es im Zuge einer fortschreitenden Infektion sehr häufig zum Tod oder zur Lyse von Zellen durch das Pathogen selbst oder die Reaktion des Immunsystems kommt.

Die bekannten Rezeptoren für diese PAMPs lassen sich in zwei Familien einteilen: Die *Toll-like* Rezeptoren (TLRs) und die Nicht-TLR-Rezeptoren oder *RIG-like* Rezeptoren (RLRs). TLRs sind Transmembranproteine, die Homologien zu den Toll-Rezeptoren, die erstmals bei *Drosophila* identifiziert und charakterisiert wurden (Lemaitre et al., 1996), aufweisen. Die Erstbeschreibung des Toll-Genproduktes zeigte eine Rolle in der Determination der dorso-ventralen Polarität von *Drosophila* Embryonen (Anderson et al., 1985). Später wurden homologe Gene in Säugern gefunden und ihre Bedeutung für die Induktion der angeborenen Immunität herausgearbeitet (Medzhitov et al., 1997). Interessanterweise kommen Proteine mit Ähnlichkeiten zu TLRs auch in Pflanzen vor. So ist das pflanzliche Tobacco-Virus-Resistenzgen-kodierte N-Protein den TLRs ähnlich, so dass das TLR-System eine sehr frühe Entwicklung der Immunität zu sein scheint.

TLRs werden nach ihrer zellulären Lokalisation und dem Signaltransduktionsweg, den sie auslösen, weiter klassifiziert. TLR 3, 7 und 9 weisen eine endosomale Lokalisation auf, während die anderen TLRs hauptsächlich auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Neuere Untersuchungen legen jedoch die Vermutung nahe, dass für die TLR-abhängige Induktion von

## Einleitung

Typ I IFN immer eine (Dynamin- und TRAM-abhängige) Rekrutierung des TLRs zum Endosom erforderlich ist, da nur hier das essentielle Adapterprotein TRAF3 lokalisiert ist, welches für die weitere Signaltransduktion essentiell ist (Kagan et al., 2008).

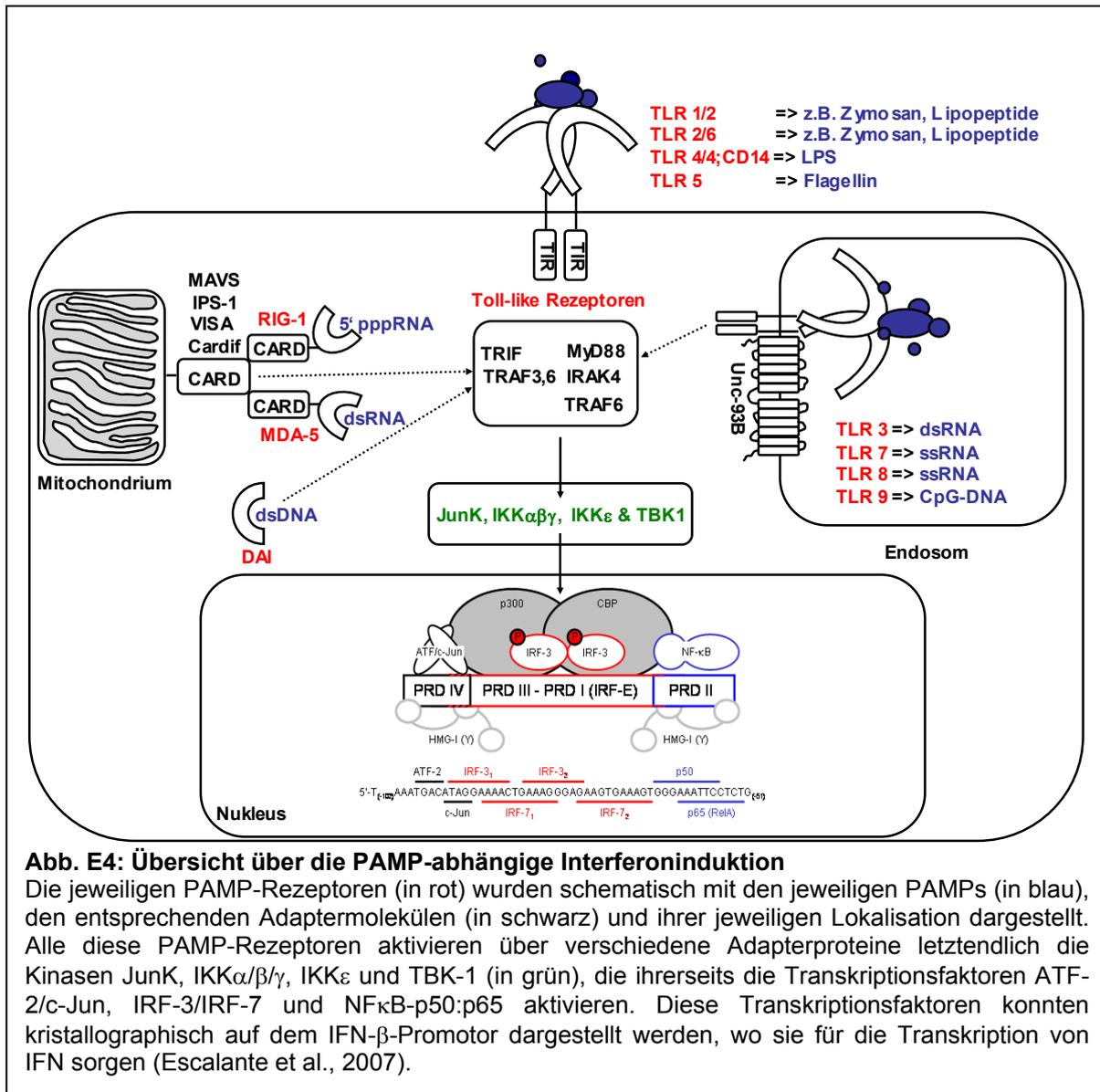
Bei den Signalwegen wird nach den rekrutierten Signaladapterproteinen unterschieden. Die meisten TLRs aktivieren die entsprechenden Signalkaskaden über eine initiale Aktivierung von MyD88, die durch eine anschließende Aktivierung von IRAK und TRAF-Proteinen weiter abläuft, so dass es letztendlich zu einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B kommt (Medzhitov et al., 1998). Neben MyD88-abhängiger Signaltransduktion existieren jedoch auch MyD88-unabhängige, dafür aber TRIF-abhängige Signalwege, die insbesondere für die IFN-Induktion von Bedeutung sind. TRIF aktiviert sowohl TRAF6 als auch TBK-1, die dann letztendlich IRF-3 und NF- $\kappa$ B aktivieren (Yamamoto et al., 2002; Yamamoto et al., 2003). TLR4 ist ein klassisches Beispiel für einen MyD88-abhängigen TLR, wohingegen insbesondere TLR3 strikt MyD88-unabhängig, aber TRIF-abhängig ist.

Von den löslichen, intrazellulären RLRs (die nicht zur TLR-Familie gehören) sind gegenwärtig nur MDA-5, RIG-1 und DAI bekannt. MDA-5 und RIG-1 binden intrazelluläre doppelsträngige (ds) RNA (Kato et al., 2006; Yoneyama et al., 2005; Yoneyama et al., 2004), wobei für RIG-I gezeigt wurde, dass insbesondere das terminale 5' Trisphosphat der dsRNA als Signal erkannt wird (Hornung et al., 2006; Nallagatla et al., 2007). Beide Moleküle weisen zwei charakteristische Domänen auf: Eine Helikase-Domäne, die für die dsRNA-Erkennung zuständig ist, und eine CARD-Domäne (Yoneyama et al., 2005). RIG-I und MDA-5 binden mit der *caspase recruitment domain* (CARD)-Domäne ein zelluläres Adaptermolekül, das zeitgleich von vier Arbeitsgruppen identifiziert und benannt wurde und deshalb vier verschiedener Namen hat: IPS-1, CARDIF, MAVS und VISA (Kawai et al., 2005; Meylan et al., 2005; Seth et al., 2005; Xu et al., 2005).

Kürzlich wurde gezeigt, dass zytoplasmatische dsDNA durch das Molekül DAI erkannt werden kann (Takaoka et al., 2007; Wang et al., 2008). Die genaue Signaltransduktion ist jedoch noch nicht aufgeklärt. Außerdem zeichnet sich ab, dass noch weitere intrazelluläre Rezeptoren für dsDNA existieren (Wang et al., 2008). Im Folgenden wird eine vereinfachte Übersicht über die Rezeptoren und die Signalwege, die durch PAMPs ausgelöst werden, schematisch dargestellt.

Nach der erfolgreichen Erkennung der PAMPs durch die Rezeptoren der angeborenen Immunität kommt es letztendlich zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren ATF/cJun, IRF-3 (resp. IRF-7) und NF- $\kappa$ B. Diese lösen anschließend die Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie Typ I IFN ( $\alpha/\beta$ ) aus.

## Einleitung



### 1.2.3 Erkennung von Herpesviren durch PAMP-Rezeptoren

Im Folgenden werden die bekannten Mechanismen und Signaltransduktionen beschrieben, die für die Erkennung von Herpesviren sorgen. Die Befunde verbinden Erkenntnisse, die auf Krankheitsbildern von Patienten mit genetischen Defekten in Komponenten der PAMP-abhängigen Signalperzeption und Signaltransduktion beruhen, mit Erkenntnissen aus Modellinfektionen in der Maus (*Mus musculus*). Solche Patienten fielen teilweise durch herpesvirale Erkrankungen auf, wobei vergleichbare Phänotypen nach MCMV-Infektionen in der Maus gefunden wurden. CMV wird durch das System der angeborenen Immunität erfolgreich erkannt: Nach einer CMV-Infektion von Zellen kommt es zu einer PAMP-abhängigen Erkennung und zu einer Aktivierung der proinflammatorischen Signalkaskaden wie

## Einleitung

IRF-3 (Gravel und Servant, 2005; Preston et al., 2001), MAP/ERK-Kinasen (Boyle et al., 1999), NF- $\kappa$ B (Gravel und Servant, 2005) und ATF-2/c-Jun.

Schon das Andocken des viralen Partikels und die anschließende Penetration durch die Zellmembran scheinen von der Zelle in eine IFN-artige Antwort umgesetzt zu werden. Die Inkubation mit löslichem, korrekt gefaltetem, rekombinant-exprimiertem Glycoprotein B (gB) (Boyle et al., 1999) und/oder gH (Yurochko et al., 1997) von HCMV löst die rezeptorabhängige Induktion von proinflammatorischen Signalkaskaden (Yurochko et al., 1997) und die entsprechende Gen-Induktion von ISGs, wie ISG54 oder OAS aus (Boyle et al., 1999; Simmen et al., 2001). Außerdem wurde gezeigt, dass TLR2 (und TLR1, aber nicht TLR6) mit den viralen Glykoproteinen gB und gH assoziiert, um zusammen mit seinem Korezeptor CD14 in Fibroblasten die Aktivierung von NF- $\kappa$ B zu induzieren und anschließend die Sekretion von IL-6 und IL-8 auszulösen (Boehme et al., 2004). TLR2-defiziente Zellen reagieren im Gegensatz zu wt-Zellen nicht mit IL-6-Produktion nach HCMV-Infektion (Compton et al., 2003). Mit diesen Befunden übereinstimmend zeigen TLR2-defiziente Mäuse nach einer MCMV-Infektion *in vivo* reduzierte NK-Zellzahlen und höhere Virustiter in Leber und Milz (Szomolanyi-Tsuda et al., 2006).

Außerdem wird das dsDNA-Genom von Herpesviren von dem TLR9 für unmethylierte CpG-dsDNA (TLR9) erkannt. IFN-produzierende, dendritischen Zellen (IPCs resp. pDCs) sind die Hauptproduzenten von Typ I IFN während der MCMV-Replikation (Asselin-Paturel et al., 2001). pDCs produzieren in Anwesenheit von MCMV MyD88- und TLR9-abhängig IL-6, IL-12, MIP-1 $\alpha$  und IFN- $\alpha$  (Krug et al., 2004). Deshalb repliziert MCMV in MyD88- und in TLR9-defizienten Mäusen zu höheren Titern als in den entsprechenden Kontrollmäusen (Delale et al., 2005; Krug et al., 2004). Mutationen im TLR9-Gen (L499P) führen zu einer erhöhten Mortalität nach MCMV-Infektion in der Maus (Tabeta et al., 2004). Allerdings erfolgt die MCMV-Erkennung in konventionellen CD11b<sup>+</sup> Zellen, einer Subpopulation von DCs, die durch die Sekretion von IL-12, IL-18 und IFN- $\alpha$  für die Aktivierung von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) gegenüber MCMV *in vitro* und *in vivo* entscheidend sind, MyD88-abhängig, aber TLR9-unabhängig (Andoniou et al., 2005). Übereinstimmend mit diesen Befunden konnte gezeigt werden, dass der Verlust von MyD88 gegenüber dem Verlust von TLR9 zu einer deutlich verstärkten Einschränkung der MCMV-Immunkontrolle führt (Delale et al., 2005).

Während des viralen Replikationszykluses werden beide Stränge des viralen Genoms abgelesen, so dass teilweise überlappende Transkripte generiert werden, die zur Bildung von dsRNA führen. Diese dsRNA wird vom TLR für endosomale dsRNA (TLR3) wahrgenommen. Die Bedeutung dieses Systems zeigt sich für HSV-1 im Falle des mutationsbedingten Ausfalls von

Teilen des TLR-Systems. In Patienten führt die dominant-negative Mutation von TLR3 (Nukleotidmutation C1660T führt zum Aminosäureaustausch P554S) zum partiellen Ausfall der dsRNA-induzierten Aktivierung der Transkriptionsfaktoren IRF-3 und NF- $\kappa$ B, so dass signifikant weniger IFN- $\lambda$ , IFN- $\beta$  und IL-6 gebildet werden. Dies führt zu einer deutlich erhöhten Zellmortalität nach HSV-1 Infektion *in vitro*. Die Allelträger wurden klinisch durch eine herpesvirale Enzephalitis auffällig (Zhang et al., 2007). MCMV-induzierte dsRNA wird ebenfalls von TLR3 detektiert (Tabeta et al., 2004). Demzufolge erfolgt eine endosomale Erkennung von viraler dsRNA und CpG-DNA, da TLR3 und TLR9 strikt endosomal lokalisiert sind. Wie CpG-DNA und/oder dsRNA in das Endosom gelangen, ist nicht geklärt. Ein mögliches Szenario könnte spezifische Transporter vorsehen.

Der mutationsbedingte Ausfall (1034del4) der UNC-93B Funktion, einem ER-residenten 12-Transmembrandomänen (TMD) Protein mit Ähnlichkeiten zu Transporterproteinen, das für die Funktion von TLR3, TLR7 und TLR9 notwendig ist, führte ebenfalls zu einer reduzierten IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  Sekretion nach HSV-1-Infektion. Die Patienten wurden ebenfalls durch eine herpesvirale Enzephalitis auffällig (Casrouge et al., 2006). Entsprechend führen UNC-93B Mutationen (H412R) in der Maus ebenfalls zu einer gesteigerten Mortalität nach MCMV-Infektion (Tabeta et al., 2006).

Mutationen des TIR-Adapterproteins TRIF (auch TICAM genannt), das für die MyD88-unabhängige TLR-Signaltransduktion entscheidend ist, führen zu massiv reduzierter IFN- $\alpha$  Serumkonzentration während einer MCMV-Infektion und erlauben deshalb MCMV-Replikation zu signifikant höheren Titern (Hoebe et al., 2003).

### 1.2.4 IFN-Induktion

Sowohl MyD88- als auch TRIF- und IPS-1/MAVS/VISA/CARDIF-abhängige Rezeptoren aktivieren TBK-1 und IKK $\epsilon$ . Diese beiden Kinasen phosphorylieren und aktivieren den *interferon regulatory factor* IRF-3. Nach der Phosphorylierung dimerisiert IRF-3 und transloziert in den Kern. Dort bindet IRF-3 an Promotoren von IFN-Genen. Die ersten IFN-Subtypen, die gebildet werden, sind IFN- $\beta$  und im murinem System zusätzlich IFN- $\alpha$ 4 (Marie et al., 1998). Die anderen IFN- $\alpha$ -Subtypen werden erst sekundär IFN- $\beta$ -abhängig gebildet (Erlandsson et al., 1998) und sind Teil der positiven Rückkopplung. Die Induktion von IFN- $\beta$  kann deshalb als eine Art Kontrollpunkt der IFN-Induktion betrachtet werden.

Der induzierbare Teil des IFN- $\beta$ -Promotors liegt 125 bp vor dem Transkriptionsstart und wird in vier positive regulatorische Domänen (PRDs) unterteilt (Goodbourn und Maniatis, 1988; Maniatis et al., 1998). IRF-3 bindet an PRDIII und PRDI (Escalante et al., 2007). Beide PRDs

können auch von anderen IRFs gebunden werden. Insbesondere IRF-7 spielt für die positive Rückkopplung (*feed-back-loop*) eine entscheidende Rolle (Sato et al., 1998).

Die anderen PRDs werden durch die Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B (PRDII) (Garoufalidis et al., 1994) und ATF2/c-Jun (PRDIV) (Du und Maniatis, 1992; Du et al., 1993) gebunden und aktiviert (Maniatis et al., 1998). MyD88-, TRIF und IPS-1/MAVS/VISA/CARDIF lösen direkt oder indirekt die Aktivierung des NF- $\kappa$ B Kinasekomplexes, bestehend aus NEMO (alias IKK $\gamma$ ), IKK $\alpha$  und IKK $\beta$ , aus. Dieser Komplex führt zur Phosphorylierung von I $\kappa$ B-Proteinen, inhibitorischer Bestandteile des latent im Zytoplasma vorhandenen NF- $\kappa$ B-Komplexes. Der wichtigste Vertreter der I $\kappa$ B-Familie ist I $\kappa$ B $\alpha$ . Die I $\kappa$ B $\alpha$ -Phosphorylierung führt zur Ubiquitinierung von I $\kappa$ B $\alpha$  und zu dessen proteasomaler Degradation. Durch den Verlust von I $\kappa$ B $\alpha$  wird im kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalweg ein Heterodimer aus p50 und p65 freigesetzt. Dieser transloziert in den Zellkern und aktiviert, neben vielen anderen Genen, den PRDII-Promotorbereich im IFN- $\beta$  Gen (Garoufalidis et al., 1994). Kürzlich wurde gezeigt, dass NF- $\kappa$ B nach einer Virusinfektion eine Veränderung der Chromosomenanordnung im Zellkern induziert, die letztendlich darüber entscheidet, welches Allel IFN- $\beta$ -mRNA transkribiert (Apostolou und Thanos, 2008). Andererseits wurde beschrieben, dass der Beitrag von NF- $\kappa$ B an der IFN-Induktion nach Infektionen mit Sendai- oder Newcastle Disease Virus sehr gering ist (Wang et al., 2007). Ein Befund, der mit Ergebnissen bezüglich der MCMV-induzierten IFN-Induktion aus unserer Arbeitsgruppe übereinstimmt (Dr. Vu Thuy Khanh Le, persönliche Kommunikation).

Für die IFN- $\beta$  Transkriptionsinitiation ist eine synergistische Aktivierung durch IRF-3, NF- $\kappa$ B und ATF2/c-Jun beschrieben (Kim und Maniatis, 1997). Die Aktivierung von ATF-2/c-Jun erfolgt durch MAPK, die genaue Aktivierung durch PAMPs ist jedoch nicht schlussendlich geklärt. Neben den drei Transkriptionsfaktoren ATF2/c-Jun, IRF-3 und NF- $\kappa$ B scheint auch die Regulation der DNA-Struktur von Bedeutung zu sein, da für die Expression von IFN- $\beta$  zusätzlich die Funktion des DNA-strukturierenden *high mobility group* Proteins HMG-1(Y) nötig ist (Du et al., 1993). Alle drei Transkriptionsfaktoreinheiten rekrutieren die Transkriptionsmaschinerie, insbesondere p300 und CBP, und induzieren die Expression von IFN- $\beta$  (Wathelet et al., 1998). Dieses wird synthetisiert und sezerniert. Eine Übersicht über den IFN- $\beta$ -Promoter mit den entsprechenden Transkriptionsfaktoren findet sich in Abbildung E4.

### 1.2.5 IFN-Signaltransduktion

Die IFN-induzierte Signalkaskade ist als Jak-STAT-Signalweg bekannt. Nach der Bindung des IFNs an den entsprechenden Rezeptorkomplex werden sog. Januskinasen aktiviert, benannt nach

## Einleitung

dem römischen Gott der zwei Gesichter Janus, da sie eine Kinase-Domäne und eine Pseudokinase-Domäne aufweisen und so der ursprüngliche Name *just another kinase* beibehalten werden konnte (Prof. Dr. M. Müller, persönliche Mitteilung). Diese Nicht-Rezeptor-Kinasen sind mit den IFN-Rezeptorketten nicht-kovalent assoziiert und phosphorylieren und aktivieren letztendlich sog. *signal transducer and activator of transcription* (STATs). Diese latent zytoplasmatischen Moleküle formen Homo- resp. Heterodimere durch eine intermolekulare Interaktion einer src-Homologiedomäne 2 (SH2) des einen STAT-Moleküls mit dem phosphorylierten Tyrosin des jeweils anderen STAT-Moleküls. Durch diese Dimerisierung wird eine geteilte *nuclear localisation site* (NLS) zusammengesetzt und das Dimer transloziert in den Zellkern. Dort bindet es an spezifische DNA-Elemente von induzierbaren Promotoren und rekrutiert mittels der N-Terminalen *coiled-coil* Domäne die Transkriptionsmaschinerie, um die jeweiligen Gene zu exprimieren. Eine schematische Übersicht des Jak-STAT-Signalwegs findet sich in Abb. 5E.

Im Falle von Typ I IFN besteht der Rezeptor aus zwei unterschiedlichen Ketten, der IFN- $\alpha$ -Rezeptorkette I (IFNARI) und der IFN- $\alpha$ -Rezeptorkette II (IFNAR2). Vom IFNAR2 existieren zwei verschiedenen Spleiß-Isoformen: IFNAR $\beta_S$  und IFNAR $\beta_L$ , wobei letztere nur bei der Bindung von IFN- $\beta$ , aber nicht bei der Bindung von IFN- $\alpha$  beteiligt ist (Croze et al., 1996; Plataniias et al., 1996). Diese Ketten sind Transmembranproteine und mit den Januskinasen Tyrosinkinase II (Tyk2) und Januskinase I (Jak1) präassoziiert. Nach der Bindung des IFNs kommt es zu einer Konformationsänderung, die zu inter- und intramolekularen Phosphorylierungen durch die Januskinasen führt. STAT2, STAT1 und Jak1 sind IFN-unabhängig mit der IFNAR2-Kette assoziiert, wobei STAT2 für die Bindung von STAT1 notwendig ist (Li et al., 1997). Tyk2 ist an die IFNAR1-Kette gebunden (Colamonici et al., 1994b; Colamonici et al., 1994a). Nach der Bindung an den Liganden assoziieren die beiden Ketten des IFNAR. Nach der Bindung von Typ I IFN an den IFNAR kommt es initial zu einer Phosphorylierung der IFNAR1-Kette durch die präassoziierte Kinase Tyk2 (Uddin et al., 1995). Tyk2 phosphoryliert das Tyrosin Y466 des IFNAR1 und bildet somit eine Bindestelle für STAT2, das mit seiner SH2-Domäne das phosphorylierte Tyrosin bindet (Yan et al., 1996b; Yan et al., 1996a). STAT2 wechselt also von IFNAR2 an den IFNAR1, wo es phosphoryliert und aktiviert werden kann. Die Anwesenheit von STAT2 ist Voraussetzung für die folgende Aktivierung von STAT1 durch Typ I IFN (Li et al., 1997). STAT2 wird anschließend durch Tyk2 an einem Tyrosin (Y690) phosphoryliert (Qureshi et al., 1996). Eine Mutation dieses Tyrosin-Restes (Y690F) führt zu einem Verlust der Aktivierbarkeit von STAT1 und des ISGF3-Komplexes und somit letztendlich zu einem dominant-negativen STAT2 (Clifford et al., 2003; Leung et al., 1995). Allerdings werden durch

## Einleitung

Typ I IFN auch zu einem geringeren Teil STAT3 (Pfeffer et al., 1997; Yang et al., 1996), STAT4 (Farrar et al., 2000a; Farrar et al., 2000b) und STAT6 aktiviert (Gupta et al., 1999; Wan et al., 2008). Phosphoryliertes STAT2 und STAT1 heterodimerisieren über eine Interaktion des einen phosphorylierten Tyrosinrestes mit der SH2-Domäne des jeweils anderen Moleküls. Zusätzlich wird IRF-9 (alias ISGF3 $\gamma$  oder p48) rekrutiert (Veals et al., 1992). Das STAT1:STAT2:p48 Heterotrimer wird *interferon stimulated gene factor 3* (ISGF3) genannt. ISGF3 transloziert in den Nukleus (Kessler et al., 1990; Levy et al., 1989). IRF-9 scheint für die nukleäre Translokation entscheidend zu sein. Die Translokation in den Nukleus erfolgt über Importin- $\alpha$ 3, Importin- $\alpha$ 4 und zu einem geringeren Teil über Importin- $\alpha$ 7. Der nukleäre Export nach dem Signal lässt sich über Leptomycin B blockieren und scheint somit CRM1-abhängig zu sein (Banninger und Reich, 2004). Das Heterotrimer aus STAT1 $\alpha$  oder STAT1 $\beta$ , STAT2 und IRF-9 bindet mittels der DNA-Bindemotive von IRF-9 und STAT1 an sog. *interferon stimulated response elements* (ISRE) mit dem DNA-Konsensus-Motiv AGTTTN<sub>3</sub>TTTC und aktiviert die promotorabhängigen Gene, sog. IFN-stimulierte Gene (ISGs) (Qureshi et al., 1995). In dem Komplex scheint IRF-9 für die DNA-Bindung maßgeblich verantwortlich zu sein, während STAT1 die Aufgabe hat, die Selektivität der DNA-Bindung an die ISRE-Elemente zu steigern. STAT2 stellt die Transaktivator-domäne zur Verfügung und induziert die Transkription der entsprechenden Gene (Bluyssen und Levy, 1997).

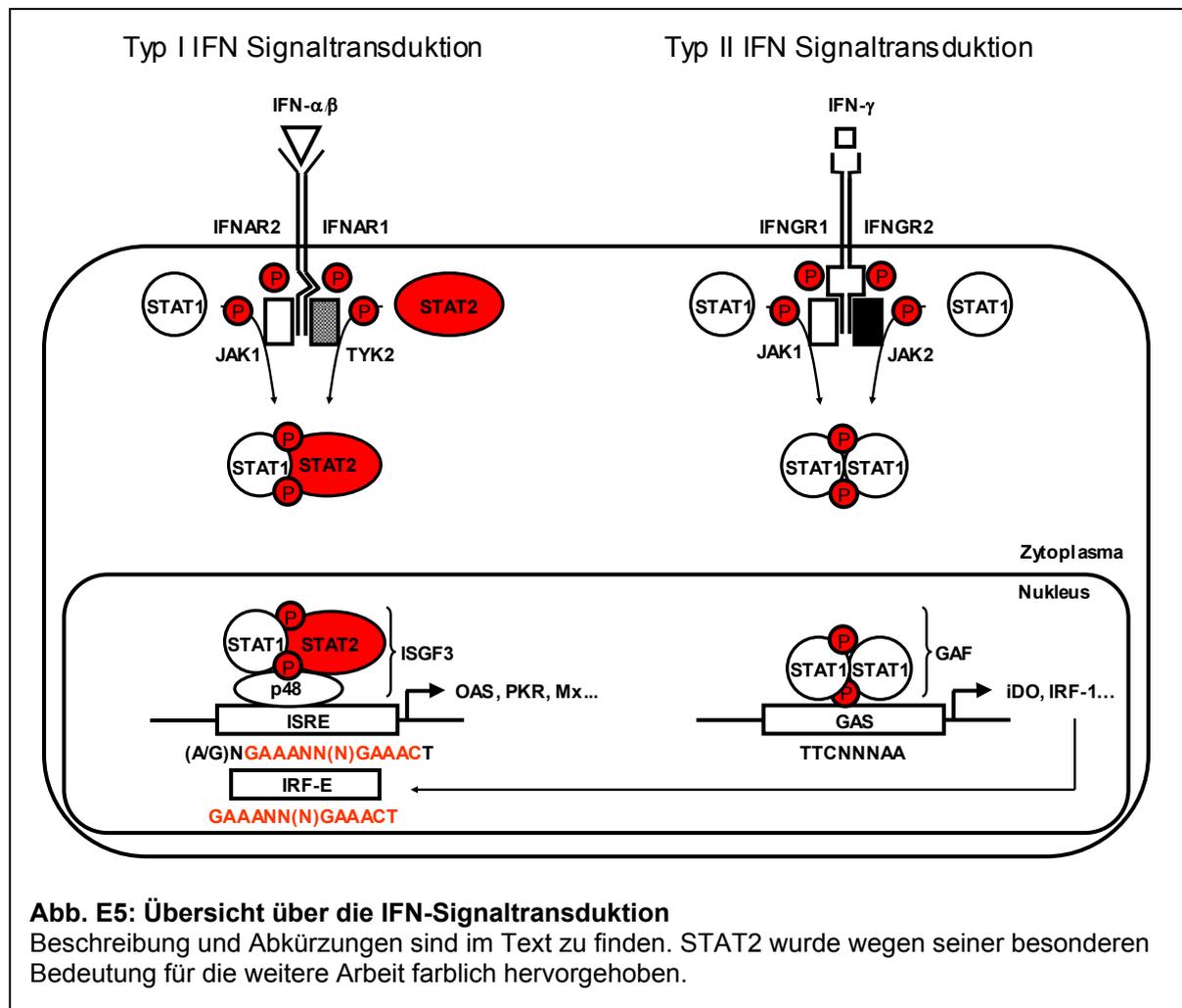
Neben ISGF3 induziert Typ I IFN zusätzlich die zeitverzögerte Bindung eines weiteren DNA-bindenden Faktors: ISGF2 (Kessler et al., 1988). Dieser Faktor ist mit dem IFN-induzierten Protein IRF-1 identisch (Pine et al., 1990).

Im Gegensatz dazu induziert Typ II IFN die Aktivierung und Homodimerisierung von STAT1 (Shuai et al., 1992). IFN- $\gamma$  binden an einen Komplex aus den beiden IFN- $\gamma$ -Rezeptorketten IFNGR1 und IFNGR2 (Aguet et al., 1988; Hemmi et al., 1994; Munro und Maniatis, 1989). Diese sind mit den Januskinasen Jak1 (Muller et al., 1993; Shuai et al., 1993; Silvennoinen et al., 1993) und Jak2 (Watling et al., 1993) assoziiert, wobei Jak1 mit der IFNGR1 Kette verbunden ist und Jak2 mit IFNGR2 (Sakatsume et al., 1995). Nach der Bindung kommt es zu einer Phosphorylierung der beiden Kinasen, die dann ihrerseits STAT1 phosphorylieren und aktivieren (Igarashi et al., 1994). Aktivierte STAT1-Moleküle homodimerisieren anschließend und bilden den sog. *gamma activated factor* (GAF) (Decker et al., 1991; Shuai et al., 1993). Dieser transloziert in den Kern und bindet an Promotorelemente mit dem *gamma activated sequence* (GAS) Konsensusmotiv, um die entsprechenden Gene zu transaktivieren. Die Bindung an die DNA schützt aktives STAT1 vor dem CRM-1 abhängigen Export (Begitt et al., 2000) ins

## Einleitung

Zytoplasma (Meyer et al., 2003). Über die Mechanismen des Imports herrscht keine einheitliche Meinung.

Interessanterweise sind Mäuse mit einer Deletion des Gens für den IFN- $\gamma$  Rezeptor signifikant anfälliger gegenüber HSV-1 und VACV als Mäuse mit dem selben genetischen Hintergrund, aber einer Deletion des Gens für das Zytokin IFN- $\gamma$  (Cantin et al., 1999). Dies legt die Vermutung nahe, dass auch andere Zytokine diesen Rezeptor aktivieren können oder dass der Rezeptor zusätzliche Funktionen in anderen immunrelevanten Signaltransduktionen für die Lokalisation und/oder Oberflächendisposition anderer Rezeptorkomplexe aufweist.



**Abb. E5: Übersicht über die IFN-Signaltransduktion**

Beschreibung und Abkürzungen sind im Text zu finden. STAT2 wurde wegen seiner besonderen Bedeutung für die weitere Arbeit farblich hervorgehoben.

Vor kurzem konnte von uns und anderen gezeigt werden, dass IFN- $\gamma$  in der Lage ist den ISGF3 Transkriptionskomplex (STAT2:STAT1:IRF-9) zu induzieren (Matsumoto et al., 1999; Zimmermann et al., 2005). Diese IFN- $\gamma$ -abhängige STAT2-Phosphorylierung/-Aktivierung wurde auch in anderen Arbeiten nachgewiesen ((Karaghiosoff et al., 2000), zu sehen in Fig. 2D). Die Aktivierung von STAT2 erfolgte IFNAR1-unabhängig aber IFNGR1-abhängig und ist für die antivirale Wirkung gegenüber Cytomegaloviren von entscheidender Bedeutung

(Zimmermann et al., 2005). Außerdem wurde gezeigt, dass IFN- $\gamma$  den Transkriptionsfaktor AP-1 STAT1-unabhängig aktiviert und somit auch STAT-unabhängige Genregulation beeinflussen kann. Dieser neue IFN- $\gamma$ -abhängige Signalweg scheint insbesondere für einige Gene wie iNOS von entscheidender Bedeutung zu sein (Gough et al., 2007). Die Untersuchung, ob dieser Weg zur Pathogenabwehr entscheidend beiträgt, steht noch aus.

Die Signalkaskaden, die durch Typ I und Typ II IFN aktiviert werden, induzieren sowohl überlappende Transkriptionsmuster als auch nicht überlappende. Beide Kaskaden sind durch die verschiedenen Signalwege eindeutig von einander getrennt. Sie werden jedoch auf verschiedenen Ebenen mit einander quervernetzt. Eines der wichtigsten Gene in diesem Zusammenhang, das durch IFN- $\gamma$  massiv und sehr schnell induziert wird, ist IRF-1. IRF-1 ist selbst ein Transkriptionsfaktor, der an eine verkürzte Version der ISRE-Sequenz bindet und damit seinerseits viele Gene, die durch Typ I IFN induziert werden können, aktiviert. Eine grundsätzliche Übersicht über IFN-abhängige Jak-STAT Signaltransduktion findet sich im Übersichtsartikel (Darnell, 1997).

Die Bedeutung dieses Signalweges für die Pathogenabwehr lässt sich sowohl an den Phänotypen der spezifischen Knock-Out-Mäuse als auch an den Krankheitsbildern von humanen Patienten mit Mutationen in einzelnen Komponenten ablesen. STAT2-defiziente Mäuse können definitionsgemäß keinen ISGF3-Komplex mehr bilden und induzieren demzufolge nach Typ I IFN-Behandlung keine Expression von ISGs, so dass *in vivo* nach Infektion mit VSV 10<sup>4</sup>-fach höhere Titer in der Milz und 10<sup>7</sup>-fach (!) höhere Titer in der Leber gefunden werden (Park et al., 2000). Ein ähnlicher Phänotyp findet sich in STAT1-defizienten Mäusen (Park et al., 2000). 100% der STAT1-defiziente Mäuse versterben 5 Tage nach einer normalerweise sublethalen Infektion mit VSV oder *Listeria monocytogenes*, da sie nach Typ I und Typ II IFN Induktion keine ISGs mehr induzieren können (Durbin et al., 1996; Meraz et al., 1996). In Mäusen, denen sowohl der IFNAR1 als auch der IFNGR1 fehlen, kann für MCMV keine LD<sub>50</sub> mehr bestimmt werden, da bereits eine Infektion mit 1 pfu je Tier 100% der Mäuse tötet (Gil et al., 2001). In Menschen mit einer *loss-of-function* Mutation im STAT1 Gen kommt es zu ähnlichen Phänotypen, die dazu führten, dass die Patienten an viralen Infektionen verstarben (Dupuis et al., 2003).

### 1.2.6 Effektorgene

Wie oben beschrieben üben IFNs selbst keine antivirale Wirkung aus. Sie induzieren ISGs, die anschließend die Wirkung der IFNs exekutieren. Die Anzahl der ISGs, deren Transkription nach IFN-Behandlung signifikant herauf oder herabreguliert werden, variiert je nach Typ der IFN-

## Einleitung

Behandlung, der Länge der Behandlung, des untersuchten Zelltyps, der Zelllinie und der Signifikanzkriterien und schwankten zwischen ca. 200 und 1500. Die genaue funktionelle Charakterisierung hat gerade erst begonnen. Bis jetzt sind nur einige wenige Gene resp. deren Funktion letztendlich aufgeklärt. Schon aus der schier Zahl folgt, dass eine vollständige Beschreibung in diesem Rahmen nicht zu leisten ist. Einige wichtige Vertreter, die für die folgende Arbeit von Bedeutung sind und/oder für die eine antivirale Wirkung nachgewiesen ist, werden im Folgenden kurz beschrieben.

### *1.2.6.1 ISG 6-16 resp. GIP3*

ISG 6-16 ist ein 13-14 kDa Protein, das mitochondrial lokalisiert ist und aus historischer Sicht eines der wichtigsten ISGs darstellt. Mit Hilfe des 6-16 Promotors wurden die Komponenten des Jak-STAT-Signalweges identifiziert. Hierfür wurde eine Zelllinie stabil mit einem Konstrukt transfiziert, das unter Kontrolle von 1,8 kbp des 6-16 Promotors ein Guaninphosphoribosyltransferase (*gpt*) -Gen exprimiert. In der Gegenwart von 6-Thioguanin löst die Expression dieses Gens den Tod der Zelle aus. Anschließend wurden Zellen selektiert, die in Anwesenheit von IFN und 6-Thioguanin nicht starben. Die Zellen trugen Mutationen in essentiellen Komponenten des IFN-Jak-STAT-Signalwegs. Durch Komplementation dieser Zellen mit verschiedenen cDNAs konnten die Komponenten eindeutig identifiziert werden (Pellegrini et al., 1989). Neuere Daten zeigen, dass 6-16 in der Lage ist, den TRAIL-abhängigen Potentialverlust von Mitochondrien zu inhibieren und somit durch TRAIL ausgelöste Apoptose zu verhindern. Die stark apoptotische Wirkung von TRAIL kann deshalb durch Transfektion von 6-16 oder IFN-Behandlung aufgehoben werden (Cheriyath et al., 2007).

### *1.2.6.2 dsRNA-abhängige Proteinkinase R (PKR)*

Diese Serin/Threonin-Kinase liegt im inaktiven Zustand bereits in der Zelle vor und wird durch dsRNA aktiviert (Wu und Kaufman, 1996). PKR phosphoryliert die  $\alpha$ -Untereinheit des limitierend vorhandenen eukaryontischen Translations-Initiations-Faktors eIF2 und unterbindet das Recycling dieses Faktors. Auf diese Weise stoppt PKR dsRNA-abhängig die Translation (Clemens et al., 1994; Wu und Kaufman, 1996). Die Beendigung der Translationsinitiation beeinflusst sowohl virale als auch zelluläre Transkripte.

## Einleitung

### *1.2.6.3 2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase (OAS) und RNaseL*

OAS wird hauptsächlich durch Typ I IFN induziert und katalysiert die Bildung von Oligoadenylaten mit 2'-5'-Verknüpfung (Kerr und Brown, 1978). Monomere Endoribonuklease L (RNase L) erkennt und bindet diese 2'-5'-Oligoadenylate. Die Bindung induziert die Dimerisierung von RNaseL (Jacobs und Langland, 1996) und aktiviert sie damit. Aktive RNase L spaltet zytoplasmatische ssRNA und vernichtet sowohl mRNA als auch rRNA und inhibiert schlussendlich Translation und Proteinsynthese (Player et al., 1998). 2'-5'-Nukleinsäuren sind sehr instabil, so dass die Aktivierung von RNase L von der lokalen Anwesenheit von OAS-abhängigen Oligoadenylaten abhängt.

### *1.2.6.4 Induzierbare NO-Synthetase (iNOS)*

iNOS ist ein dimeres, Hämgruppe-tragendes Enzym, das die Synthese von reaktiven Nitrit- (NO) Radikalen katalysiert. NO-Radikale scheinen eine Vielzahl von Bakterien und Viren in ihrer Replikation massiv zu beeinflussen. Diese Wirkung konnte insbesondere für VACV nachgewiesen werden (Karupiah et al., 1993).

### *1.2.6.5 ISG54 (IFIT2) und ISG56 (IFIT1)*

Diese beiden IFN-induzierten Proteine weisen eine Reihe von Tetratricopeptid-Motiven auf und inhibieren die Translation. Humanes ISG56 bindet eIF3e und arretiert den ternären Komplex aus eIF2, GTP und Met-t-RNA, während das murine ISG56 eIF3c bindet und die Formation des 48S-Präinitiationskomplexes blockiert. ISG54 bindet sowohl eIF3e als auch eIF3c und verbindet die Funktionen von murinem und humanem ISG56 (Terenzi et al., 2006).

### *1.2.6.6 Mx-Proteine*

Mx-Proteine gehören wie die GBPs zur Familie der GTPasen der Dynamin-Superfamilie. Mx-Proteine haben eine stark antivirale Wirkung auf eine bestimmte Gruppe von Virusfamilien und sind hauptsächlich gegen RNA-Viren, insbesondere gegen Bunya- und Orthomyxoviren, wirksam (Staelheli et al., 1986). Der Mechanismus scheint auf Erkennung und Transportinhibition der viralen Nukleokapsidproteine zu beruhen (Haller und Kochs, 2002). So verhindert MxA den Transport viraler Nukleokapside von Bunyaviren in den Golgi-Apparat, wo normalerweise die Assemblierung von Viren stattfinden würde (Kochs et al., 2002). Die Influenza-Virus Replikation wird ebenfalls durch Mx-Proteine eingeschränkt, indem virale Proteine in intrazellulären Aggregaten komplexiert werden (Kochs et al., 2005).

### *1.2.6.7 Guanylat-bindende Proteine (GBPs)*

IFN induziert die Expression von mehreren Familien von GTP-hydrolysierenden Proteinen, die Ähnlichkeiten mit Dynamin aufweisen (Boehm et al., 1998; Degrandi et al., 2007; Staeheli et al., 1986; Macmicking, 2004). Die Familien werden ihrer Größe nach in die 47 kDa- und die 65 kDa-Familie eingeteilt, von denen nur die die 65 kDa-Familie im Menschen konserviert ist (Bekpen et al., 2005), auch wenn für die 47 kDa GTPasen Gene ein Gen mit einer gewissen Homologie vorliegt. Für TGTP, einen Vertreter der 47-kDa-Familie, und für GPB-2, einen Vertreter der 67 kDa-Klasse, sind antivirale Wirkungen beschrieben worden (Carlow et al., 1998).

### *1.2.6.8 Indoleamine-2,3-oxygenase (IDO)*

Dieses Enzym katalysiert den limitierenden Schritt in der Umsetzung der essentiellen Aminosäure Tryptophan zu L-Kynurenine. Damit wird in der Zelle die verfügbare Menge dieser essentiellen Aminosäure für die Neusynthese von Tryptophan-haltigen Proteinen begrenzt. Es konnte gezeigt werden, dass IDO die Replikation von HCMV (Bodaghi et al., 1999; Suh et al., 2007), HIV (Suh et al., 2007), VACV (Terajima und Leporati, 2005), HSV-1 und HSV-2 (Adams et al., 2004a; Adams et al., 2004b) eindämmen kann. Die Stärke dieser Wirkung ist speziesabhängig, da IDO im murinen System nur eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint und außerdem in seiner Expression Zelltyp-abhängig variiert.

### *1.2.6.9 MHC-Genkomplex*

Eine der entscheidenden Fähigkeiten von IFNs ist es, die adaptive Immunität zu induzieren, zu stimulieren und zu rekrutieren. IFNs, insbesondere IFN- $\gamma$ , induzieren, direkt oder indirekt über die Stimulation des Transaktivators CIITA die Expression der Proteinkomponenten für die MHC-I und die MHC-II Präsentation. So werden die schwere Kette des MHC-I, das  $\beta_2$ -Microglobulin, beide Proteinbestandteile des TAP-Peptidtransporters, das Chaperon Tapasin, die Peptid-trimmenden Peptidasen ERAAP1 und 2 sowie die Komponenten des Immunproteasoms durch IFN induziert. Die Wichtigkeit dieses Systems für die Viruskontrolle durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen lässt sich an der Vielzahl der gut charakterisierten viralen, insbesondere herpesviralen Inhibitoren ablesen (Hengel und Koszinowski, 1997).

### 1.2.7 Wirkung von IFN auf MCMV-Virusreplikation

IFNs spielen, wie oben bereits erwähnt, sowohl für die angeborene als auch für die adaptive Immunität eine entscheidende Rolle. Nach einer MCMV-Infektion werden Typ I IFN (Heise et al., 1998b; Strobl et al., 2005) und IFN- $\gamma$  gebildet (Heise und Virgin, 1995). Während der Infektion werden durch IFN- $\gamma$  (und TNF- $\alpha$ ) Lymphozyten, Makrophagen und Neutrophile zum Infektionsort rekrutiert. Außerdem induziert IFN- $\gamma$  sowohl eine T- und B-Zell-unabhängige Makrophagenproliferation als auch eine Hochregulation von MHC-I und MHC-II während einer MCMV-Infektion *in vivo* (Heise und Virgin, 1995). Durch diese Effekte trägt IFN- $\gamma$  zur Immunkontrolle von MCMV *in vivo* bei, da eine Depletion mittels IFN- $\gamma$ -neutralisierender Antikörper die Effekte aufhebt und es zu einer signifikant verstärkten MCMV-Replikation kommt (Heise und Virgin, 1995). In Mäusen, deren IFNAR1-, IFNGR1-Gen oder beide deletiert wurden, die also keine funktionelle IFN-Signalkaskade für Typ I IFN, Typ II IFN oder für beide IFN-Systeme aufweisen, liegt die LD<sub>50</sub> im ersten Fall 800-fach, im zweiten Fall 4- bis 5-fach reduziert. Im dritten Szenario kann sogar keine LD<sub>50</sub> mehr errechnet werden, da bereits weniger als 10 infektiöse Viren für alle Tiere tödlich sind (Presti et al., 1998). In anderen Studien führte sogar 1 infektiöses Virus zu fatalen Krankheitsverläufen in der gesamten Mäusekohorte (Gil et al., 2001). Mäuse mit einer Deletion von Tyk2, eine der Kinasen, die STAT2 phosphorylieren und damit aktivieren kann, sind ebenfalls besonders anfällig gegenüber einer MCMV-Infektion (Strobl et al., 2005).

Interessanterweise zeigen Experimente mit MCMV in STAT1-defizienten Mäusen, dass ein Teil der IFN-abhängigen Kontrolle von MCMV STAT1-unabhängig abläuft (Gil et al., 2001). Mögliche Erklärungen wären hier die STAT1-unabhängige, IFN- $\gamma$ -abhängige Gen-Induktion (Ramana et al., 2001) durch den AP-1 Transkriptionsfaktor, der seinerseits ISGs induzieren kann (Gough et al., 2007), und die Induktion von STAT3-Aktivierung durch IFN- $\gamma$  in Abwesenheit von STAT1 (Qing und Stark, 2004).

#### 1.2.7.1 *In vitro* (Zellkulturexperimente)

Für MCMV konnte gezeigt werden, dass IFNs, insbesondere IFN- $\gamma$ , die Replikation auch *in vitro* in Abwesenheit von Immunzellen signifikant unterdrücken können (Lucin et al., 1994; Presti et al., 1998; Presti et al., 2001). Die Stärke der antiviralen Antwort nach IFN-Behandlung ist jedoch vom untersuchten Zelltyp abhängig. Fibroblasten reduzieren die Virusreplikation nach IFN- $\gamma$  Vorbehandlung um das 5- bis 10-fache, während eine identische Behandlung in Knochenmarks-Makrophagen zu einer Inhibition der viralen Genexpression und zu einer >100-

## Einleitung

fachen Inhibition der MCMV Replikation führt (Presti et al., 2001). Der Grad der Inhibition der Virusreplikation unterscheidet sich ebenfalls in unterschiedlichen Zellen. IFN- $\gamma$  inhibiert in Fibroblasten die virale *late*-Gen Expression, während IE- und *early*-Genexpression nicht signifikant beeinflusst werden (Lucin et al., 1994; Presti et al., 2001). In Makrophagen erfolgt die Kontrolle von MCMV dagegen schon während der IE-Genexpression (Lucin et al., 1994; Presti et al., 2001). Da die Replikation in Makrophagen allerdings auch deutlich langsamer abläuft, könnte es sich um ein zeitliches Phänomen handeln und die Inhibition einfach eine gewisse Zeitspanne während der Virusreplikation benötigen, um zu wirken.

Interessanterweise ist der Verlust der IFN- $\gamma$  Signalkaskade *in vivo* deutlich weniger dramatisch für den Wirt als der Verlust der Typ I IFN Kaskade (Gil et al., 2001; Presti et al., 1998), während die direkte Wirkung von IFN- $\gamma$  auf die Virusreplikation *in vitro* deutlich stärker ist als der Effekt von IFN $\alpha/\beta$  (Presti et al., 1998; Zimmermann et al., 2005). Dies liegt wahrscheinlich an den Immundefekten in der adaptiven Immunität, die mit dem Verlust des IFNAR1-Gens einhergehen.

### 1.2.7.2 *In vivo* (Infektionsexperimente im Modellorganismus)

Die Wichtigkeit des Jak-STAT-Signalweges für die Inhibition der MCMV-Replikation *in vivo* konnten Crozat und Kollegen (Crozat et al., 2006) in einem sehr eleganten Experiment mit zufälligen Mutationen im Wirtsgenom feststellen. Mittels N-ethyl-N-Nitroharnstoff (ENU) wurde eine Kohorte von 3000 stabilen Mäuselinien mit destinkten Einzelmutationen im Genom hergestellt und gezüchtet. Mittels dieser Kohorte konnte die Zahl der nichtredundanten Gene, die im C57BL/6 Hintergrund für die hohe Resistenz gegenüber MCMV verantwortlich sind, das sog. MCMV-Resistom, auf mindestens 25 (aber errechnete 280) festgelegt werden. Eine Mutation (genannt *Domino*) induzierte einen Verlust der Kontrolle von MCMV-Replikation *in vivo*. Die Mutation führte zu einer A zu T Transversion innerhalb des STAT1-Gens, so dass es im STAT1 Protein zu einer V319E Mutation kam. Diese Mutation führte zu einem Verlust der Phosphorylierbarkeit und somit zum Verlust der Aktivierbarkeit von STAT1. Es wurden deshalb keine STAT1-abhängigen Gene induziert, die normalerweise für die initiale Inhibition der Virusreplikation verantwortlich sind (Crozat et al., 2006). Da STAT1 der Mediator der IFN- $\gamma$  Antwort ist, zeigt sich an diesem unvoreingenommenen (*unbiased*) Befund die Bedeutung der IFN-Signaltransduktion für die Kontrolle von MCMV *in vivo*.

In Menschen sind ebenfalls Fälle einer erblichen Störung der Jak-STAT-Signalkaskade beschrieben. So wurden zwei Patienten mit homozygoten *loss-of-function* Mutationen im STAT1 Gen (L600P und L706S) beschrieben. Einer der beiden Patienten ist an einer HSV-1 Infektion

verstorben, für den anderen konnte nur eine virale Todesursache vermutet werden, aber keine entsprechende Serologie durchgeführt werden (Dupuis et al., 2003). Grundsätzlich scheint es allerdings zu bestätigen, dass der Jak-STAT-Signalweg auch in Menschen für die Kontrolle von Herpesviren von eminenter Bedeutung ist.

### 1.2.8 CMV-Replikation beeinflussende ISGs

Viele Gene, die sonst die IFN-induzierte zelluläre angeborene Immunität umsetzen und Viren an der Replikation hindern oder diese Replikation zumindest negativ beeinflussen (wie RNaseL, PKR, IDO oder iNOS), scheinen für CMV keine entscheidende Rolle zu spielen. Die gezielte Deletion oder Inhibition dieser Gene führt nicht zu einer gesteigerten MCMV-Replikation in Knochenmarksmakrophagen in Anwesenheit von IFN- $\gamma$  (Presti et al., 2001). Allerdings ist es fraglich, ob die Ineffektivität dieser Proteine auf grundsätzliches Unvermögen oder auf eine effiziente virale Inhibition (der Induktion oder der Funktion) der Proteine zurückgeht. Für PKR konnten die MCMV-Gene *m142* und *m143* als Inhibitoren identifiziert werden (Valchanova et al., 2006), die Deletion von PKR scheint jedoch die Replikation von wt-MCMV nicht signifikant zu beeinflussen (Presti et al., 2001). Die Untersuchung der  $\Delta m142$  und/oder der  $\Delta m143$ -MCMV Mutante *in vivo* ist nicht möglich, da die Gene essentiell sind und somit die Deletion zum völligen Verlust der Replikationsfähigkeit außerhalb von komplementierenden Zelllinien führt (Valchanova et al., 2006). Es muss daher davon ausgegangen werden, dass viele antivirale Systeme durch die entsprechenden viralen Antagonisten so effizient kontrolliert werden, dass der spezielle Beitrag gegenüber wt-MCMV nicht mehr nachzuweisen ist.

Ein Mechanismus, für den eine signifikante Inhibition der CMV-Replikation beobachtet werden konnte, stellt VIPERIN (Virus inhibitorisches Protein, ER assoziiert, Interferon induziert; auch als *cig5* bekannt) dar. VIPERIN wird stärker durch Typ I IFN induziert als durch Typ II IFN. Da HCMV und lösliches gB in „infizierten“ Zellen zur Sekretion von Typ I IFN führen, lösen sowohl lösliches gB als auch HCMV die Induktion von VIPERIN aus. VIPERIN seinerseits blockiert die Expression von viralen *early-late* und *late* Genen, IE-Gene werden in ihrer Expression nicht beeinflusst. Durch diese Blockade kontrollieren Zellen mit einer retroviralen Expression von VIPERIN die HCMV Replikation und reduzieren die Virustiter um max. eine  $\log_{10}$ -Stufe (Chin und Cresswell, 2001). Der Mechanismus von VIPERIN ist bis jetzt nicht genau bekannt.

Ein weiterer sehr wichtiger Mechanismus der zellintrinsischen antiviralen Abwehr stellt das Molekül Daxx dar. Daxx wird durch IFN und IFN-ähnliche Zytokine (z.B. Limitin) STAT1-unabhängig, aber Tyk2-abhängig induziert (Aoki et al., 2003; Gongora et al., 2001; Shimoda et

al., 2002; Zimmerer et al., 2007). Daxx interagiert mit vielen verschiedenen nukleären Proteinen, wie z.B. Histondeacetylasen (HDACs) und PML-Proteinen, und scheint Zellen für Apoptose zu sensibilisieren. Interessanterweise unterdrückt Daxx die virale Genexpression von verschiedenen Viren wie dem Avian Sarcoma Virus (Greger et al., 2005), HCMV (Saffert und Kalejta, 2006; Saffert und Kalejta, 2007) und Adenoviren (Ullman und Hearing, 2008). Um die Daxx-abhängige Expressionsinhibition zu umgehen, haben verschiedene Virusfamilien Wege gefunden, diesen Mechanismus zu antagonisieren. HCMV enthält im Virion das Protein pp71, das Daxx proteasomal degradiert (Hwang und Kalejta, 2007). Das MCMV-kodierte IE1-Protein hingegen scheint die Funktion von Daxx durch Bindung aufzuheben (Tang und Maul, 2003). Die Induktion durch Tyk2-abhängige, STAT1-unabhängige Signaltransduktion legt eine rein STAT2-abhängige Induktion nahe, die im Lichte der folgenden Befunde zu pM27 und STAT2 Daxx als sehr interessantes Effektorgen erscheinen lässt, insbesondere da Daxx mit STAT-Molekülen (STAT3) interagiert und kolokalisiert (Muromoto et al., 2006).

### 1.3 ADAPTIVES IMMUNSYSTEM, VIREN UND IFN

CMV wird durch eine koordinierte Reaktion aller Komponenten (CD8<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup>-Zellen, Antikörper, NK-Zellen und IFN) des Immunsystems des Wirtes in Schach gehalten (Polic et al., 1998).

Die wichtigste Komponente der zellulären Immunantwort gegenüber CMV stellen die CD8<sup>+</sup> T-Zellen dar. Durch einen adoptiven Transfer von diesen Zellen werden Mäuse sehr effizient vor MCMV geschützt (Reddehase et al., 1987). Die Wirkung von CD8<sup>+</sup>-Zellen kann jedoch nur ausgeübt werden, wenn IFN- $\gamma$  zugegen ist, da es der viralen Inhibition der MHC-Präsentation durch massive Expressionssteigerung der Komponenten des MHC-Systems entgegenwirkt (Hengel et al., 1994).

Neben T-Zellen spielen auch NK-Zellen insbesondere in der Anfangsphase der Infektion eine sehr entscheidende Rolle für die Kontrolle von MCMV-Infektionen. Neugeborene Mäuse weisen sehr geringe NK-Zellzahlen auf und sind deshalb besonders anfällig für MCMV-Infektionen. Der Transfer von NK-Zellen (wie der NK-Zelllinie NK1B6B10) in neugeborene Mäuse hebt die Anfälligkeit und Mortalität auf (Bukowski et al., 1985). Die Depletion von NK-Zellen durch Antikörper steigert im umgekehrten Fall die Anfälligkeit von Mäusen für MCMV (Bukowski et al., 1984). *Beige*-Mäuse weisen einen Verlust von NK-Zellen auf und zeigen nach einer MCMV-Infektion eine erhöhte Sterblichkeit und höhere Virustiter *in vivo*, aber nicht in Nicht-Immunzellen *in vitro*. Die hohen MCMV-Titer können durch einen adoptiven Transfer von Knochenmarkszellen aus wt-Mäusen wieder reduziert werden. Interessanterweise zeigen die

## Einleitung

*beige*-Mäuse unabhängig von der Infektionsdosis in Leber, Milz und im Plasma erhöhte IFN-Konzentrationen (leider wurde der IFN-Subtyp nicht genauer spezifiziert – wahrscheinlich handelt es sich um Typ I IFN), so dass NK-Zellen als essentielle Produzenten des Typ I IFN ausgeschlossen werden müssen (Shellam et al., 1981). Dagegen konnte gezeigt werden, dass der Verlust von NK-Zellen zu signifikant reduzierten Konzentrationen von IFN- $\gamma$  nach einer MCMV-Infektion führt (Orange et al., 1995), da sie die Hauptproduzenten von Typ II IFN während der MCMV-Primärinfektion darstellen. Die Zytotoxizität der NK-Zellen wird über die IFN- $\alpha$  Produktion MCMV-infizierter konventioneller DCs (cDCs) aktiviert, wohingegen die Produktion von IL-18 durch infizierte cDCs zur Produktion von IFN- $\gamma$  führt (Andoniou et al., 2005).

Antikörper spielen für die primäre MCMV-Replikation keine Rolle, sind aber für die Kontrolle des Virus während der Latenz und Rekurrenz von Bedeutung. In  $\mu$ MT-Mäusen, die nur eine minimalste Antikörperantwort bilden können, liegen die MCMV-Titer nach einer Reaktivierung 100- bis 1000-fach höher als in Kontrolltieren (Jonjic et al., 1994). Außerdem führt der Transfer von antikörperproduzierenden MCMV-spezifischen B-Gedächtniszellen zu therapeutischer oder prophylaktischer Protektion in immundefizienten Mäusen gegenüber MCMV (Klenovsek et al., 2007).

Der Wirt kann die Reaktivierungen von MCMV nur verhindern, wenn die koordinierte Funktion des gesamten Immunsystems zur Verfügung steht. Die Depletion von CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> und NK-Zellen in  $\mu$ MT-Mäusen führt in 100% der Mäuse zu einer Reaktivierung (Polic et al., 1998). Interessanterweise spielt IFN- $\gamma$  eine synergistische Rolle in der Kontrolle der MCMV-Reaktivierung. Die Depletion von CD4<sup>+</sup>- oder CD8<sup>+</sup>-Zellen führt nur sehr selten zu einer Reaktivierung (in 11,8% resp 4,3% der Tiere), wie auch nach einer IFN- $\gamma$  Depletion keine Reaktivierungen auftreten. Die kombinierte Depletion von IFN- $\gamma$  und einer T-Zell Subpopulation (CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup>) führt dagegen zu Reaktivierung in über 70% der Tiere (Polic et al., 1998).

### 1.4 CMV- KODIERTE IFN-ANTAGONISTEN

Im Folgenden werden sowohl CMV kodierte Gene resp. Proteine beschrieben, die mit der Induktion oder der Signaltransduktion von IFN interferieren. Wie oben beschrieben löst CMV über verschiedenen PAMPs die Induktion von proinflammatorischen Signaltransduktionskaskaden aus. Diese induzieren in infizierten Zellen die Sekretion von IFN und anderen ebenfalls proinflammatorischen Zytokinen, die die angeborene und adaptive Immunität aktivieren und rekrutieren (Heise und Virgin, 1995). Deshalb üben diese Mechanismen einen starken

## Einleitung

Selektionsdruck auf Viren aus, der letztendlich zur Entwicklung von viruskodierten Evasionsstrategien geführt hat.

Die Induktion von IFN durch PAMP-Rezeptoren wird bereits von den ersten viralen Transkripten negativ beeinflusst. Das pp86-IE2 Protein von HCMV inhibiert die Induktion von IFN- $\beta$  und RANTES (Taylor und Bresnahan, 2005), indem es die DNA-Bindung des p50:p65-NF- $\kappa$ B-Komplexes unterdrückt und somit verschiedene Gene mit einer  $\kappa$ B-Bindestelle im Promotor, wie TRAIL und IL-6, negativ beeinflusst (Taylor und Bresnahan, 2006a; Taylor und Bresnahan, 2006b). Eine Bindung von pp86-IE2 an p50 oder p65 konnte nicht nachgewiesen werden, allerdings wird eine Überlappung der Bindungspartner (wie CBP und Jun) von NF- $\kappa$ B und pp86-IE2 diskutiert. Die Phosphorylierung und Dimerisierung von IRF-3 wird nicht durch pp86-IE2 beeinträchtigt (Taylor und Bresnahan, 2006a). Der genaue Mechanismus dieser Inhibition ist derzeit nicht bekannt. Interessanterweise wurde die Inhibition von NF- $\kappa$ B Aktivierung und DNA-Bindung von einer anderen Arbeitsgruppe dem viralen Protein pp65-UL83 zugeschrieben (Browne und Shenk, 2003). Die *UL83*-Deletionsmutante zeigt für eine Vielzahl von ISGs eine massiv verstärkte Expression. Als Mechanismus wurde die Inhibition der nukleären Translokation und anschließenden DNA-Bindung von NF- $\kappa$ B vorgeschlagen. Allerdings weist die pp65-Deletionsmutante (RVAd65) nach neueren Erkenntnissen zusätzliche Genexpressionsveränderungen *in trans* in anderen Genen, unter anderem in IE86, auf (Taylor und Bresnahan, 2006b). Ob dem pp65-UL83-Effekt ein Epiphänomen infolge einer veränderten pp86-IE2-Expression oder ein eigenständiger Inhibitionsmechanismus zugrunde liegt, muss noch geklärt werden. Dieselbe RVAd65-Mutante wurde in ähnlichen Studien verwendet. Auch hier zeigte sich die massiv gesteigerte Expression von ISGs, diese wurde jedoch in diesem Fall auf eine veränderte Translokation von IRF-3 zurückgeführt. Veränderungen in der NF- $\kappa$ B Signaltransduktion konnten nicht bestätigt werden (Abate et al., 2004). Interessanterweise wurden in dieser Studie bereits zwei unabhängige pp86-IE2-Deletionsmutanten verwendet, ein gesteigertes ISG-Induktionslevel vorgefunden, allerdings (irrtümlich?) auf eine reduzierte pp65-UL83-Expression zurückgeführt (Abate et al., 2004). Da beide Studien (Abate et al., 2004; Browne und Shenk, 2003) neben den *loss-of-function* Experimenten auch *gain-of-function* Experimente zeigen, ist auch eine Vermischung von direkten UL83-pp65-abhängigen Effekten mit *trans* Effekten durch eine veränderte pp86-IE2 Expressionsänderung denkbar. Die Frage, ob pp65-UL83 selbst ein IFN-Antagonist ist, kann zu diesem Zeitpunkt leider nicht abschließend geklärt werden. Im MCMV-Kontext sind die beiden *UL83*-homologen Gene *M83* und *M84* für die Inhibition der IFN- $\beta$ -Induktion jedoch interessanterweise nicht essentiell (Le et al., 2008b).

## Einleitung

Neben pp86-IE2 wurde auch für pp72-IE1 eine IFN-antagonistische Wirkung beschrieben. IE1-pp72 scheint nach diesen Studien mit STAT1 und STAT2 zu assoziieren und den ISGF3-Komplex (STAT1:STAT2:IRF-9) daran zu hindern, nach der erfolgreichen Translokation in den Zellkern an ISRE-Promotorelemente zu binden (Paulus et al., 2006). Einige wichtige Experimente dieser Arbeit wurden in einer immortalen Zelllinie durchgeführt, die durch eine retrovirale, LTR-abhängige Expression die papillomviralen Gene E6 und E7 unter der Kontrolle eines M-MuLV LTRs exprimiert (Greaves und Mocarski, 1998). Beide Proteine sind selbst hochpotente IFN-Antagonisten (Barnard und McMillan, 1999; Barnard et al., 2000; Li et al., 1999). Zusätzlich konnte gezeigt werden dass pp72-IE1 in der Lage ist, retrovirale LTRs zu transaktivieren (Walker et al., 1992).

Interessanterweise scheinen min. zwei der *ie*-Gene in die Inhibition des IFN-Systems involviert zu sein. Es ist einerseits durchaus einleuchtend, dass die initial exprimierten viralen Gene sich mit der Inhibition der intrinsischen Wirtsschutzmechanismen befassen. Andererseits weist der *major immediate early promoter/enhancer* (MIEP), der Promotor, der die Expression der beiden IE Gene pp86-IE2 und pp72-IE1 antreibt, funktionelle ISRE- und GAS-Konsensusmotive auf (Yang et al., 2005) und ist deshalb als intrinsisch IFN-responsiv einzustufen. IFN-Behandlung führt so zu einer verstärkten Induktion und Expression von pp72-IE1 und pp86-IE2 (Netterwald et al., 2005). Außerdem ist für die MCMV-Replikation die Expression des HMG-Proteins T160 notwendig, das selbst ein ISRE-bindendes Protein darstellt (Gariglio et al., 1997). Es scheint deshalb, dass CMV zumindest zwei seiner IFN-Antagonisten IFN-induziert exprimiert: IFN führt zu gesteigerter Induktion der entsprechenden Inhibitoren. Eine experimentell eingefügte Mutation in diesem Promotorelement verhindert die IFN-induzierte Expression der *IE*-Gene und attenuiert das CMV-Wachstum (Netterwald et al., 2005). Leider wurde die Virusmutante nicht auf IFN unresponsiven Zellen untersucht, um zu klären, welche IFN-unabhängigen Effekte die Mutationen auslösen. Da gezeigt werden konnte, dass HCMV einen ISRE-bindenden, NEM-sensitiven Proteinkomplex induziert, der IRF-3 und CBP (aber keine STAT-Proteine) enthält (Navarro et al., 1998), stellt sich die Frage, ob dieser neue *CMV-induced ISRE-binding factor* (CIF) genannte Faktor an diese HCMV Enhancer-/ Promotor-Elemente bindet.

Neben diesen definierten Genfunktionen konnte die Existenz von weiteren IFN-Antagonisten deskriptiv vorhergesagt werden, für die die entsprechenden Gene zurzeit jedoch noch nicht gefunden sind. So blockiert CMV die IFN- $\gamma$ -abhängige Induktion von MHC relevanten Genen (wie HLA-DR $\alpha$ , CIITA und IRF-1), indem es die Phosphorylierung von Jak2, IFNGR1 und STAT1 unterbindet und eine posttranskriptionelle, proteasomale Degradation von Jak1 induziert (Miller et al., 1998; Miller et al., 2000). Außerdem induziert HCMV einen Verlust von IRF-9,

der dritten Komponente des ISGF3-Komplexes (Miller et al., 1999). Sowohl die Jak1-Degradation als auch die Reduktion von IRF-9 sind unabhängig von viraler Genomreplikation und werden somit von *IE*- oder *early*-Genen induziert. Da IRF-Proteine generell eine sehr kurze Halbwertszeit aufweisen und IRF-9 sehr stark IFN-induziert ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Verlust von IRF-9 indirekt erfolgt und nicht direkt von einem viralen Protein ausgeübt wird.

Im Falle der IFN-Inhibition unterscheiden sich MCMV und HCMV. Während HCMV durch eine Degradation von Jak1, die STAT1-Phosphorylierung unterbindet, blockiert MCMV die Phosphorylierung von STAT1 und rezeptorproximale Ereignisse nicht (Heise et al., 1998a; Popkin et al., 2003). Allerdings inhibiert MCMV die Rekrutierung der Transkriptionsfaktoren IRF-1 und CIITA zu entsprechenden IFN-abhängigen Promotoren und blockiert so die IFN- $\gamma$ , IRF-1 und CIITA-abhängige Genexpression, so dass trotz funktionellem, phosphorylierten STAT1 keine Expression von STAT1-abhängigen Genen erfolgt (Heise et al., 1998a; Popkin et al., 2003).

### 1.5 pM27

Eine Bedeutung des Gens *M27* für die MCMV-Replikation *in vivo* wurde erstmals von Abenes und Kollegen aufgezeigt (Abenes et al., 2001). Eine (auch nach *in vivo* Passage) stabile Insertion eines *gpt*-Gen-tragenden Transposons in das *M27*-Gen (Insertion in Position nt 32 863 resp. hinter As 477 des 687 As langen pM27) zerstört zumindest die funktionelle Expression des kompletten *M27*-Gens. Im wt-MCMV wird nur ein Transkript mit der Größe von ca. 3 kbp gebildet, das für das vorhergesagte Protein (Rawlinson et al., 1996) kodiert. Die Transposon-Insertionsmutante wächst in Zellkultur in NIH3T3-Zellen vergleichbar mit wt-MCMV, zeigt aber *in vivo* in BALB/c-Mäusen in Leber, Lunge, Milz, Niere und Speicheldrüse eine signifikant reduzierte Replikation mit bis zu 500-fach reduzierten Titern. Selbst in SCID-Mäusen zeigt sich eine massive Inhibition des viralen Wachstums der Tn-*M27*-MCMV Mutante im Vergleich zum wt-MCMV (Abenes et al., 2001).

Außerdem wurde in einer attenuierten MCMV-Mutante, die mehrere Mutationen in verschiedenen Genen hat und deshalb im Gegensatz zu wt-MCMV nicht mehr bei höheren Temperaturen (43°C) wächst, eine Protein-verändernde Mutation im *M27*-Gen gefunden. (Sweet et al., 2007).

In eigenen Vorarbeiten konnte gemeinsam mit Dr. Albert Zimmermann gezeigt werden, dass MCMV einen sehr potenten Inhibitor der IFN-induzierten Jak-STAT-Signalkaskade kodiert. Mittels eines *forward genetic screening approach*, bei dem eine stabile, klonale, MCMV-

## Einleitung

permissive Reporter-Zelllinie (NIH3T3-Hintergrund) mit einem Luziferasereporter gen unter Kontrolle eines fünffach wiederholten ISRE-Promotorelementes ausgestattet wurde (3T3-ISRE-luc), wurde eine Sammlung von MCMV-Transposoninsertionsmutanten getestet. Im Gegensatz zu wt-MCMV hatten drei unabhängige Mutanten (IIC7, IF4 und IIB12) die Fähigkeit verloren, den IFN-abhängigen Jak-STAT-Signalweg zu unterbrechen. Die Insertionsstelle konnte mittels Sequenzierung aus dem Transposon heraus festgestellt werden. Es zeigte sich, dass alle drei Mutanten eine Insertion in dem Gen *M27* aufwiesen. Eine vollständige, gezielte *M27*-Deletion ( $\Delta$ M27-MCMV) führt zu einem identischen Phänotyp. Demzufolge ist das Gen *M27* für die MCMV-kodierte Inhibition der Jak-STAT-ISRE Signaltransduktion verantwortlich.

$\Delta$ M27-MCMV repliziert in Anwesenheit von IFN- $\alpha$ , verglichen mit wt-MCMV, ca. 20-fach schlechter. Interessanterweise erfolgt in Anwesenheit von IFN- $\gamma$  fast keine Replikation mehr, die Replikation ist 1000- bis 10 000-fach reduziert. Die Reinsertion des *M27*-Gens in das MCMV Genom (M27Rev-MCMV) stellt den Phänotyp des wt-MCMV wieder her. *In vivo* ist  $\Delta$ M27-MCMV hochgradig attenuiert. 10 Tage nach Infektion ist in wt-Mäusen (C57BL/6) kein  $\Delta$ M27-MCMV mehr nachweisbar, wohingegen das M27Rev-MCMV je nach Organ, Titer zwischen  $3 \cdot 10^4$  (Leber) und  $10^3$  (Speicheldrüse) erreicht. Interessanterweise ist  $\Delta$ M27-MCMV in Mäusen, die entweder IFNAR1- (keine IFN- $\alpha/\beta$ -Responsivität) oder IFNGR1- (keine IFN- $\gamma$ -Responsivität) defizient sind, besser replikationsfähig als in wt-Mäusen, ist aber trotzdem gegenüber dem wt-MCMV noch deutlich attenuiert (Zimmermann et al., 2005).

MCMV stellt aus klinischer Sicht ein Modellsystem für grundsätzliche Fragestellungen der CMV-Pathogenese dar, die für HCMV nicht experimentell untersucht werden können. Im HCMV-Genom findet sich am entsprechenden Ort im Genom das *M27*-homologe Gen *UL27*. Die Funktion von *UL27* ist nicht bekannt. Die einzigen Beschreibungen zu *UL27* zeigen, dass die Deletion des Gens zu keiner Reduktion der Replikationskapazität in Zellkultur (Dunn et al., 2003) oder humanen Geweben, die in SCID-Mäuse implantiert wurden, zeigt (Prichard et al., 2006). Für *UL27* wurde eine Rolle in der viralen Sensitivität gegenüber dem antiviralen Wirkstoff 1263W64 (Maribarvir, Glaxo) beschrieben. Unter der selektierenden Wirkung von Maribavir tauchen Mutanten mit reduzierter Sensitivität gegenüber Maribavir auf. Die meisten Mutationen beeinflussen das Gen *UL97* (im Codon 397), dem Gen das für die virale Nukleotidkinase kodiert. Zusätzlich wurden jedoch HCMV-Mutanten mit Mutationen in *UL27* (Mutation 1: A406V zusammen mit 415Stop; Mutation 2: W362R) gefunden, die eine verminderte Sensitivität gegenüber Maribarvir aufweisen (Chou et al., 2004; Komazin et al., 2003).

## Einleitung

Zielsetzungen der vorliegenden Arbeit waren 1.) die Charakterisierung der Signaltransduktionswege, die von pM27 direkt oder indirekt beeinflusst werden, 2.) die zellulären Mechanismen, die letztendlich die antivirale Wirkung exekutieren und 3.) der molekulare Mechanismus, der von pM27 genutzt wird, um die Jak-STAT-Signalkaskade zu blockieren. Außerdem sollte untersucht werden, ob HCMV vergleichbare Mechanismen kodiert und die Funktionen von pM27 und pUL27 konserviert sind.

## 2. ERGEBNISSE

### 2.1 PM27 KONTROLLIERT DIE IFN-ABHÄNGIGE SIGNALTRANSDUKTION

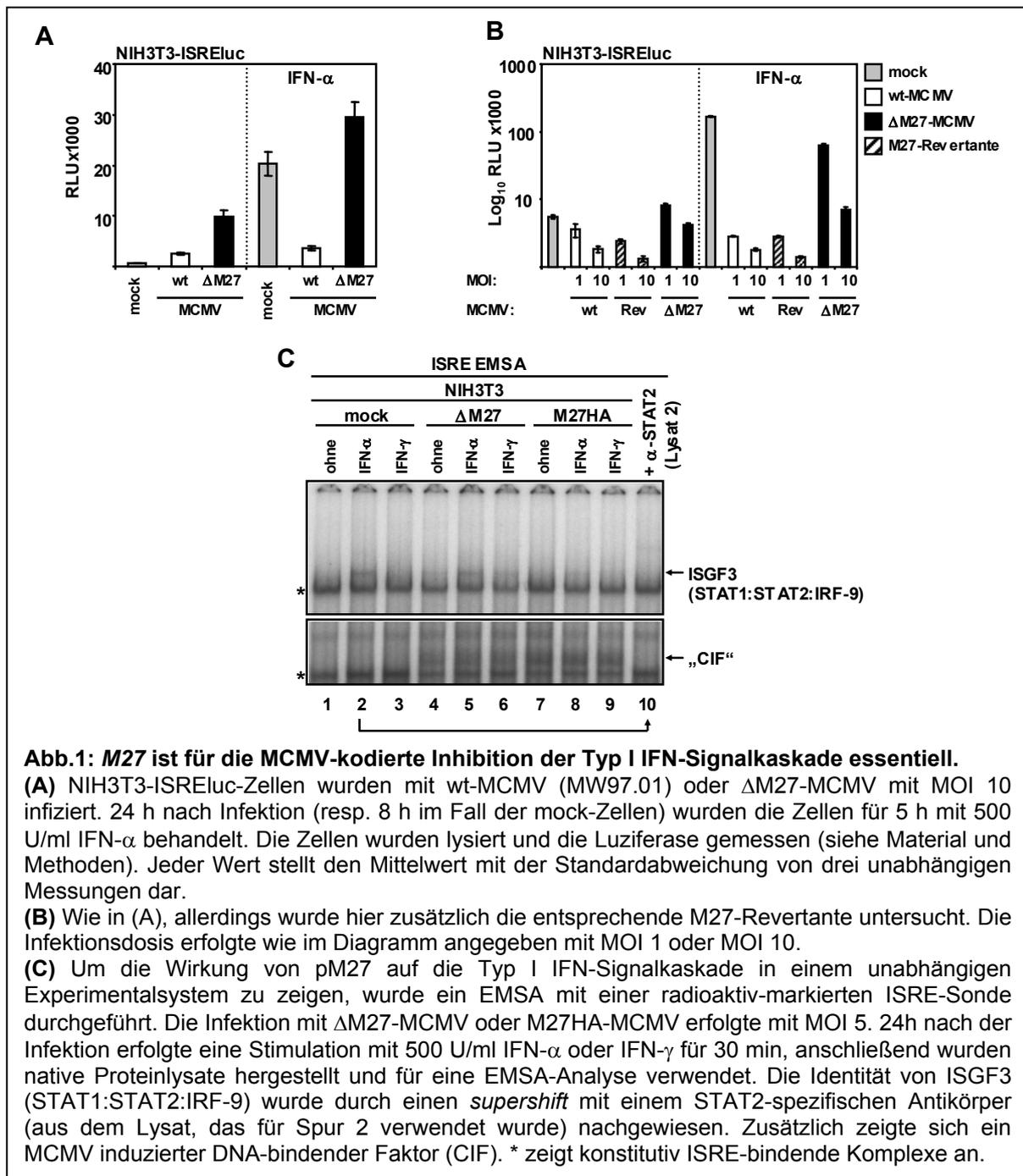
Als Antwort auf eine Infektion induziert IFN unter anderem die Expression von Komponenten der MHC-Präsentation. Um der Kontrolle durch T-Zellen zu entgehen, kodieren HCMV und MCMV für Proteine, die die MHC-Präsentation antagonisieren. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe hatten gezeigt, dass eine IFN-Behandlung vor einer CMV-Infektion die Gen-Expression der Komponenten der MHC-Präsentation so stark induziert, dass die CMV-kodierten MHC-Antagonisten (wie US2-6 und US11 im Falle von HCMV und m04, m06 und m152 im Falle von MCMV) nicht mehr in der Lage sind, die MHC-Präsentation zu verhindern. Wird jedoch eine identische IFN-Behandlung nach der CMV-Infektion durchgeführt, kann diese gesteigerte Induktion nicht mehr erfolgen (Hengel et al., 1994). Dies legte den Schluss nahe, dass eine CMV-Infektion die IFN-abhängige Induktion der Komponenten der MHC-Präsentation blockiert.

Um das/die verantwortliche(n) Gen(e) zu finden, war als Vorarbeit in der Arbeitsgruppe eine MCMV-permissive NIH3T3-Zelllinie mit einem IFN-responsiven Reporter-Konstrukt (pISRE-luc) stabil transfiziert und eine klonale Zelllinie etabliert (NIH3T3-ISREluc) worden. Die Zelllinie reagiert auf IFN-Behandlung mit der Expression von Luziferase, die quantitativ erfasst werden kann. Mit diesem Experimentalsystem konnte gezeigt werden, dass MCMV-infizierte Zellen keine Luziferaseinduktion nach IFN-Behandlung zeigen, da MCMV offenbar die IFN-abhängige Signaltransduktion unterbricht (Abb. 1A). Um das ursächliche MCMV-Gen zu identifizieren, war diese Zelllinie mit einer Kollektion von MCMV-Transposoninsertions-Mutanten (Brune et al., 1999b) infiziert worden und die Fähigkeit der jeweiligen Virus-Mutante gemessen, die IFN-abhängige Induktion des Reportergens zu blockieren. Es hatte sich gezeigt, dass drei unabhängige Tn-Mutanten (IIC7, IIB12 und IF4) die Fähigkeit verloren hatten, die IFN-Signalkaskade zu blockieren. Alle drei Mutanten wiesen eine Transposoninsertion im Gen *M27* auf, was darauf hindeutete, dass pM27 ein Interferonantagonist sein könnte. Daraufhin war eine gezielte Deletionsmutante von *M27* ( $\Delta$ M27-MCMV), eine entsprechende Gen-Revertante und eine MCMV-Mutante, die in ihrem natürlichen Gen-Locus ein HA-Epitop-markiertes pM27 exprimiert (M27HA-MCMV), hergestellt worden, um die direkte Wirkung von pM27 analysieren zu können (Zimmermann et al., 2005).

Die Deletion des *M27*-Gens aus dem MCMV-Genom reduziert die Fähigkeit von MCMV, mit der IFN-abhängigen ISRE-Signalkaskade zu interferieren.  $\Delta$ M27-MCMV-infizierte Zellen reagieren auf IFN- $\alpha$ -Behandlung mit der Expression von Luziferase, während wt-MCMV diese

## Ergebnisse

Reaktion unterbindet (Abb. 1A). Der Verlust der Inhibitionsfähigkeit basiert nicht auf einer zweiten Mutation, die während der Klonierung und/oder der Rekonstitution der  $\Delta$ M27-Mutante stattgefunden hat, da die Revertante sich wie wt-MCMV verhält und die Luziferaseinduktion blockiert (Abb. 1B). Der Verlust der Inhibitionsfähigkeit der IFN-abhängigen Luziferaseinduktion basiert nicht auf einer verschlechterten Infektionsfähigkeit von  $\Delta$ M27-MCMV: Der Unterschied zwischen wt-MCMV und  $\Delta$ M27-MCMV zeigte sich unabhängig davon, ob die Zellen mit einem oder zehn *plaque forming units* (pfu) je Zelle (entspricht *multiplicity of infection* [MOI] 1 resp. 10) infiziert wurden (Abb. 1B).



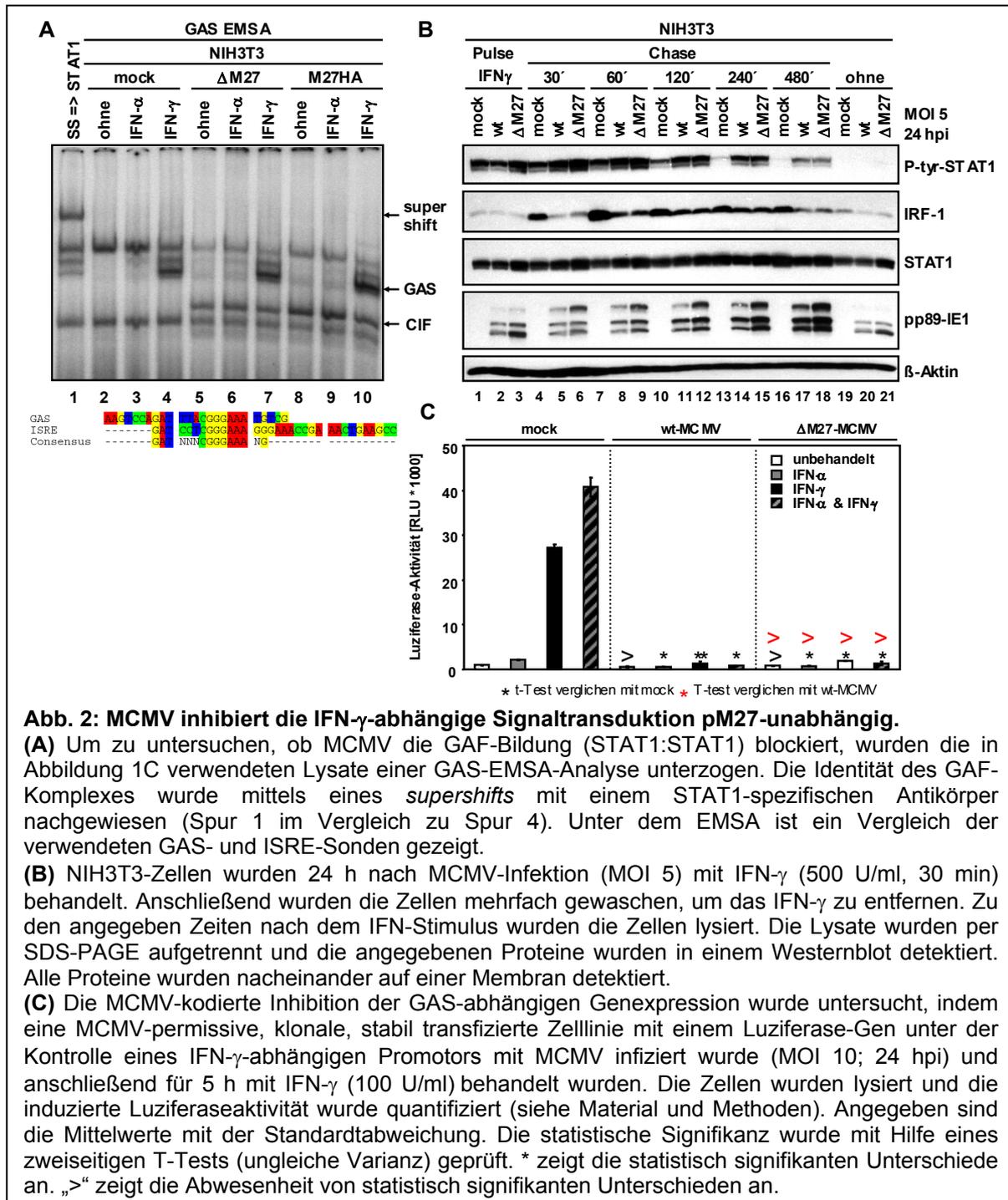
Mit den Reporterassay-Befunden konsistent zeigte sich in einem ISRE-*electromobility shift assay* (EMSA) ein Unterschied zwischen  $\Delta$ M27-MCMV und M27HA-MCMV (Abb. 1C, Vergleich der Spuren 5 und 8). Nach einer Infektion mit  $\Delta$ M27-MCMV konnten IFN-induzierte ISGF3-Komplex deutlich stärker nachgewiesen werden als nach einer Infektion mit M27HA-MCMV. Der Nachweis des ISGF3-Komplexes wurde durch den *Supershift* mit einem STAT2-Antikörper kontrolliert.

Interessanterweise zeigte sich, dass MCMV einen M27-unabhängigen, ISRE-bindenden Faktor kodiert oder induziert (Abb. 1C, Spuren 4 bis 9). Möglicherweise handelt es sich hierbei um einen analogen Faktor zu dem bereits für HCMV beschriebenen Faktor CIF (CMV-induzierter ISRE-bindender Faktor) (Navarro et al., 1998). Dieser Faktor kann in ISRE-EMSA-Experimenten als „Marker“ für die erfolgte CMV-Infektion verwendet werden. Da der CIF-analoge Faktor nach einer Infektion mit  $\Delta$ M27-MCMV unverändert nachgewiesen werden konnte (Abb. 1C), kann geschlussfolgert werden, dass pM27 selber kein Bestandteil von diesem ISRE-bindenden Komplex ist oder diesen signifikant beeinflusst.

Diese Ergebnisse zeigen, dass das Gen *M27* für die MCMV-kodierte Inhibition der IFN-ISRE-Signalkaskade essentiell ist.

### **2.1.1 MCMV blockiert die GAS-Signaltransduktion M27-unabhängig**

Um zu untersuchen, ob pM27 ebenfalls für die Inhibition der IFN- $\gamma$ -vermittelten Genexpression verantwortlich ist, wurden GAS-EMSA-Experimente durchgeführt. Es zeigte sich, dass eine MCMV-Infektion die Bindung von GAF-Komplexen (STAT1:STAT1) an GAS-DNA-Sequenzen nicht beeinträchtigt (Abb. 2A). Die IFN- $\gamma$ -induzierte STAT1-Phosphorylierung, Dimerisierung und DNA-Bindung muss in infizierten und nicht-infizierten Zellen also mit gleicher Effizienz erfolgen, so dass Rezeptor-proximale Inhibitoren wie virale IFN- $\gamma$ -*decoy*-Rezeptoren, Januskinase-Inhibitoren und virale STAT-Phosphatasen (alles Mechanismen, die für andere Viren beschrieben wurden (Hengel et al., 2005; Randall und Goodbourn, 2008)) ausgeschlossen werden können. Dass MCMV die Induktion von GAF-Komplexen nicht beeinflusst, wurde übereinstimmend auch von der Arbeitsgruppe von H. W. Virgin gefunden (Heise et al., 1998a). Interessanterweise zeigte sich die Anwesenheit eines MCMV-kodierten/induzierten DNA-bindenden Faktors auch in einem GAS-EMSA. Wenn es sich um den oben beschriebenen CIF handelt, kann über einen Vergleich der beiden SONDENSEQUENZEN eine Konsensussequenz für diesen Faktor bestimmt werden (Abb. 2A – unterer Abschnitt). Wenn dieser Komplex nicht mit CIF identisch ist, induziert oder kodiert MCMV zusätzlich einen CMV-induzierten GAS-bindenden Komplex.



Um zu untersuchen, ob die STAT1-Phosphorylierung in MCMV-infizierten Zellen mit normaler Kinetik erfolgt, wurden Zellen mit einem kurzen IFN- $\gamma$ -Stimulus aktiviert, dann intensiv gewaschen und so das IFN entfernt. Anschließend wurde die Kinetik der STAT1-Dephosphorylierung untersucht. Es zeigte sich, dass die IFN- $\gamma$ -induzierte STAT1-Phosphorylierung in MCMV-infizierten Zellen länger anhält als in uninfizierten Zellen. Nach acht Stunden (480 min) IFN-Abwesenheit (IFN-chase) war eine STAT1-Phosphorylierung nur noch in infizierten Zellen nachweisbar (Abb. 2B, p-tyr-STAT1 in Spuren 16,17 und 18). Diese

## Ergebnisse

Verlängerung der STAT1-Phosphorylierung erfolgte unabhängig von *M27*, da sich  $\Delta$ M27-MCMV und wt-MCMV nicht unterschieden. Trotz dieser verlängerten STAT1-Phosphorylierung kam es allerdings nicht zu einer verstärkten IRF-1-Expression: Die GAF-abhängige (STAT1:STAT1) Induktion des IFN-abhängigen Proteins IRF-1 war zu allen Zeitpunkten in infizierten Zellen ineffizienter als in uninfizierten Zellen (Abb. 2B). Obwohl der entsprechende Transkriptionsfaktorkomplex also erfolgreich gebildet wurde (Abb. 2A), konnte keine effiziente Induktion des ISGs IRF-1 erfolgen (Abb. 2B, z.B. Vergleich Spur 5 mit Spuren 6 und 7). Die Induktion von GAF-abhängiger Genexpression in einer stabil-transfizierten, klonalen NIH3T3-Zelllinie mit einem GAS-Luziferase-Reporterkonstrukt wurde nachhaltig durch MCMV blockiert. Auch dieser Effekt war *M27*-unabhängig (Abb. 2C). Demzufolge kann geschlussfolgert werden, dass MCMV neben *pM27* einen weiteren IFN-Antagonisten exprimiert, der die Transkription IFN- $\gamma$ -induzierter Gene unterbindet. Die Existenz eines MCMV-kodierten IFN- $\gamma$ -Signaltransduktionsinhibitors, der die IFN-abhängige Induktion von Genen wie IRF-1 inhibiert, wurde ebenfalls von einer anderen Arbeitsgruppe nachgewiesen (Popkin et al., 2003). Hier kann jedoch die Unabhängigkeit dieses Antagonisten von *pM27* gezeigt werden und somit die multifaktorielle Inhibition der IFN-Signaltransduktion durch MCMV bewiesen werden. Das verantwortliche Gen ist noch nicht bekannt.

Die Inhibition der IFN- $\gamma$ -induzierten Genexpression erklärt bei genauerer Betrachtung ebenfalls die verlängerte STAT1-Phosphorylierung. Die negative Rückkopplung der Signalkaskade, die die Dephosphorylierung einleitet und zur Abschaltung des Signalweges durch Moleküle wie SOCS1 führt (Starr und Hilton, 1998), erfolgt IFN-induziert. Da STAT1 während der MCMV-Infektion phosphoryliert werden kann, das phosphorylierte STAT1 (trotz erfolgreicher DNA-Bindung) aber nicht mehr in der Lage ist, die entsprechende Transkriptionsinduktion einzuleiten, kann auch die Rückkopplung nicht erfolgreich eingeleitet werden. Letztendlich erfolgt eine zeitlich verlängerte STAT1-Phosphorylierung durch die fehlende zelluläre Rückkopplung. Die verstärkte STAT1-Phosphorylierung ist jedoch nicht in der Lage, entsprechende Genexpression auszulösen.

Ein erwähnenswerter Nebenbefund ist die Induktion einer zusätzlichen höhermolekularen Form des MCMV-Proteins pp89-IE1, die während der IFN- $\gamma$ -Behandlung auftritt (Abb. 2B). Außerdem scheint die IFN- $\gamma$ -Inkubation die Expression von pp89-IE1 zu verstärken. Dieser Befund wirft die Frage auf, ob es sich um eine Veränderung des *ie*-Gen-*Splicings* oder um eine IFN-induzierte Modifikation von pp89-IE1 handelt. Da HCMV ein IFN- $\gamma$ -reguliertes Promotorelement in seinem MIEP aufweist (Netterwald et al., 2005), wäre ein solches Element für MCMV ebenfalls denkbar.

Zusammenfassend zeigen diese Experimente, dass MCMV die GAF-abhängige Genexpression *M27*-unabhängig unterbricht. Obwohl die STAT1-Moleküle phosphoryliert werden und die GAF-Komplexe (STAT1:STAT1) an GAS-Promotorsequenzen binden, erfolgt keine effiziente Transkription von ISGs wie IRF-1.

### **2.1.2 STAT2 stellt das molekulare Ziel von pM27 dar**

Da sich die Wirkung von pM27 in der IFN- $\alpha$ -, aber nicht in der konventionellen (*canonical*) IFN- $\gamma$ -Signalkaskade manifestiert, lag die Vermutung nahe, dass das Ziel von pM27 ein Teil des ISGF3-Komplexes (STAT1:STAT2:IRF-9), aber nicht des GAF-Komplexes (STAT1:STAT1) sein könnte. Deshalb wurde die Menge der Komponenten der IFN-Jak-STAT-Signalkaskade per Westernblot untersucht.

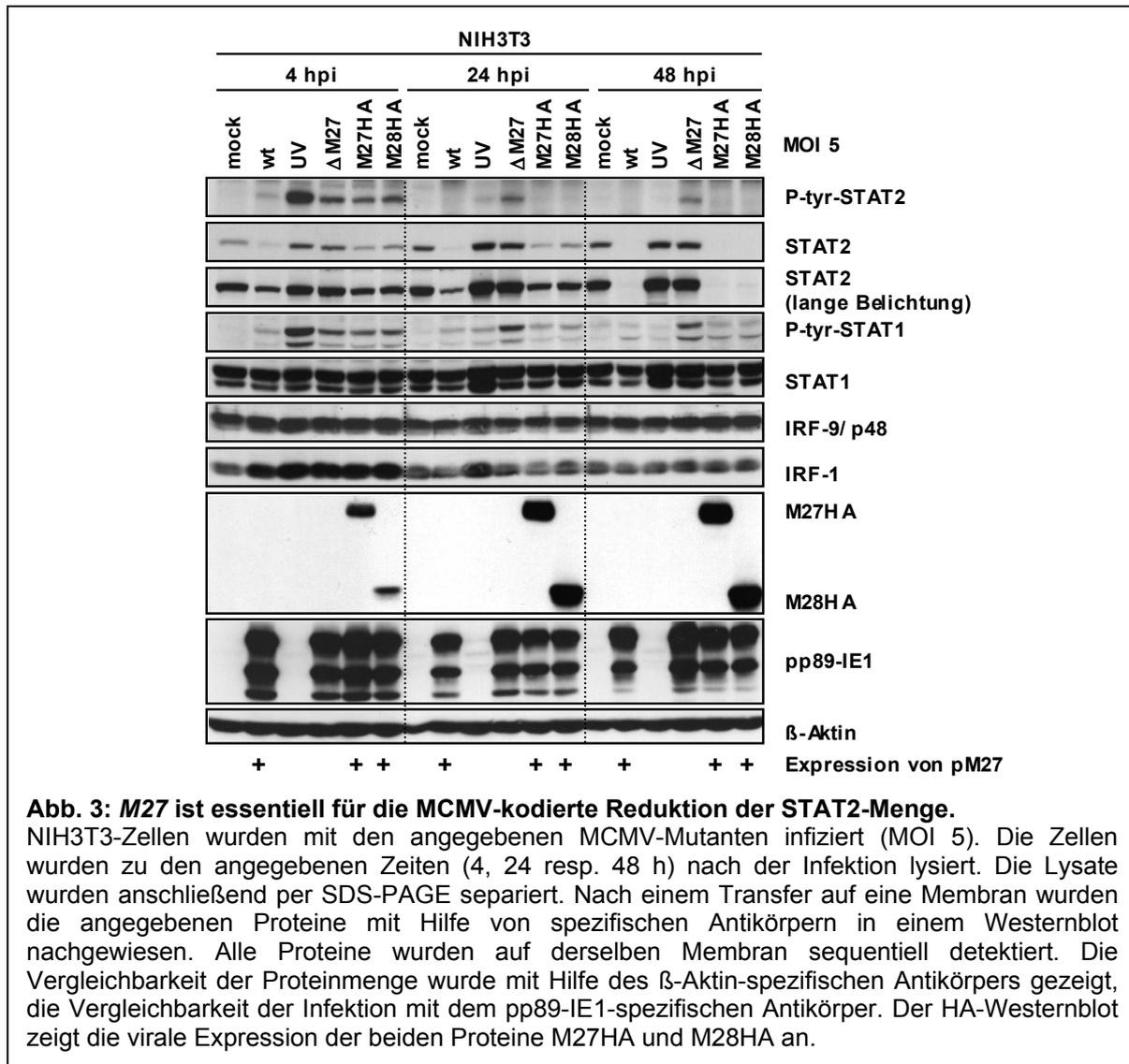
In Zellen, die mit wt-MCMV infiziert wurden, kommt es zu einer starken Reduktion der zellulären STAT2-Proteinmenge. Die STAT2-Reduktion war im Westernblot bereits 4 hpi sichtbar. 24 hpi war die zelluläre STAT2-Menge schon sehr deutlich reduziert und 48 hpi war STAT2 kaum noch nachweisbar (Abb. 3). Der Verlust von STAT2 zeigte sich für wt-MCMV und für die beiden MCMV-Mutanten M27HA und M28HA, in denen die beiden Gene *M27* bzw. *M28* in ihrem nativen Locus mit einem HA-Epitop versehen wurden, um die entsprechenden Proteine einfacher nachweisen zu können.  $\Delta$ M27-MCMV hat die Fähigkeit, die STAT2-Menge zu reduzieren, verloren (Abb. 3). Daraus wurde geschlossen, dass *M27* für die Reduktion der zellulären STAT2-Menge essentiell ist. Die Proteinmenge des homologen Proteins STAT1 wurde von pM27 nicht beeinflusst. Auch die beiden Proteine IRF-1 und IRF-9, die eine entscheidende Rolle in der IFN-Signaltransduktion spielen (Veals et al., 1992; Watanabe et al., 1991), wurden von MCMV auf Proteinebene nicht direkt negativ beeinflusst (Abb. 3).

Da viele virale Proteine nicht erst in der Zelle exprimiert, sondern schon mit dem viralen Partikel in die Zelle gebracht werden (das MCMV-Partikel enthält mindestens 58 verschiedene virale Proteine (Kattenhorn et al., 2004)), wurde untersucht, ob für den Verlust von STAT2 virale Genexpression notwendig ist. Es zeigte sich, dass UV-inaktivierte Viren nicht in der Lage waren, STAT2 zu reduzieren, während durch replikationskompetente Viren die STAT2-Menge signifikant reduziert wurde (Abb. 3). In Zellen, die mit UV-inaktiviertem Virus „infiziert“ wurden, stieg die STAT2-Menge über die Zeit an. Dies lässt sich mit der IFN-Abhängigkeit der STAT2-Expression (Lehtonen et al., 1997) und der Induktion von IFN durch UV-inaktiviertes CMV (Le et al., 2008b; Taylor und Bresnahan, 2005) erklären.

Die Wirkung des Genproduktes von *M27* ist sehr spezifisch, da die Proteinmenge von STAT1 und STAT3 nicht reduziert wurde (Abb. 3). Andere STAT-Moleküle wurden bisher nicht

## Ergebnisse

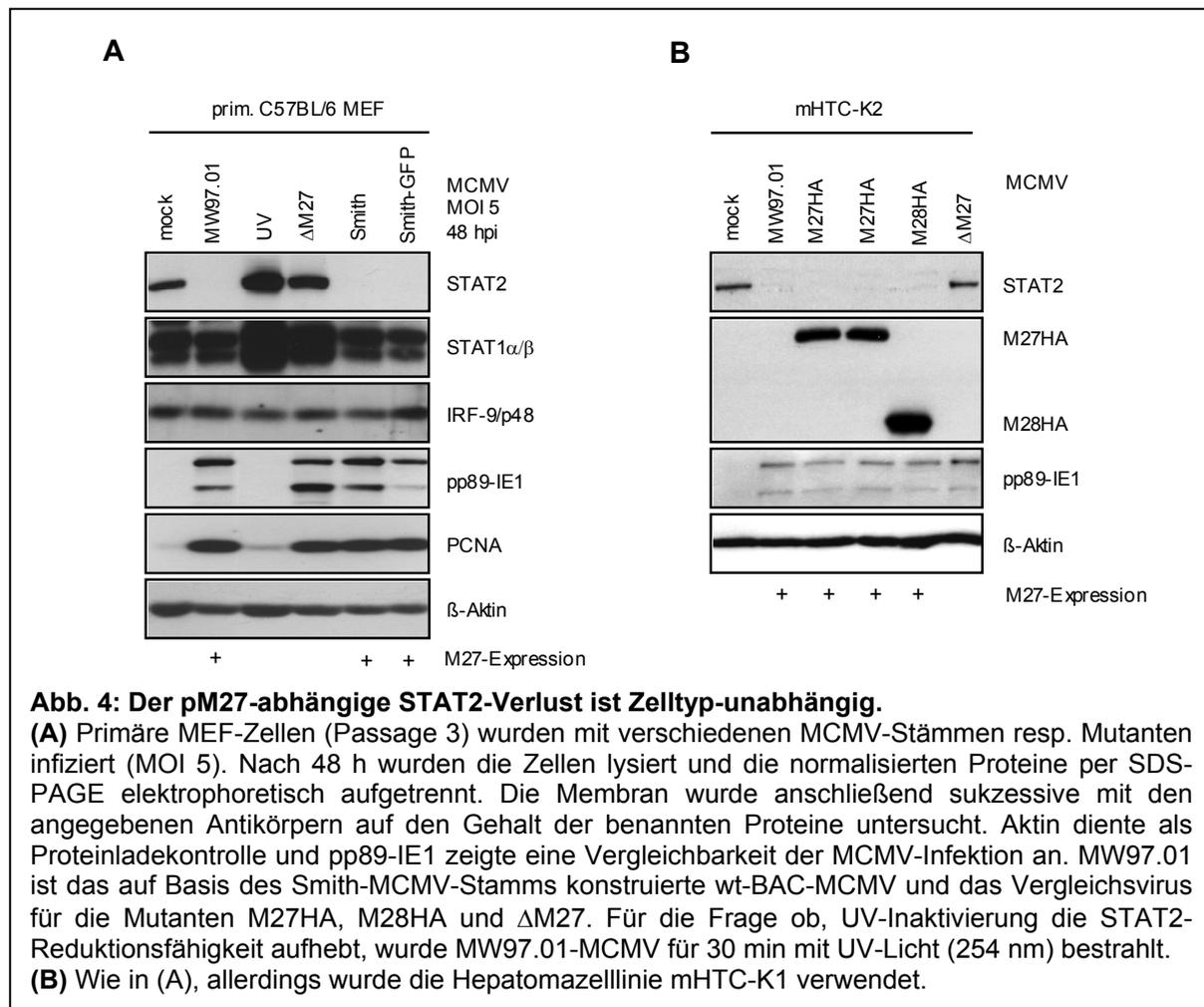
untersucht, da sie in Fibroblasten nur eine untergeordnete Rolle spielen oder gar nicht exprimiert werden. Da MCMV jedoch auch Zellen wie Makrophagen, Monozyten und Granulozyten infizieren kann, wäre eine Untersuchung von STAT4, STAT5 und STAT6 in diesen Zellen interessant, insbesondere da diese STAT-Moleküle STAT2 auf Ebene der Proteinprimärsequenz ähnlicher sind als STAT1 und STAT3.



Der Verlust von STAT2 in MCMV-infizierten Zellen beschränkte sich nicht auf NIH3T3-Zellen, sondern fand auch in anderen Zelltypen wie primären MEF-Zellen (Abb. 4A), der Leberzelllinie mHTC-K2 (Abb. 4B) oder der Stroma-Zelllinie M2-10B4 (Abb. 9) statt. Außerdem zeigten die Befunde, dass das Epitop-markierte pM27HA bezüglich des STAT2-Abbaus funktional ist. Als Kontrolle diente das M28HA-Virus. Auch dieses Virus exprimiert ein virales Protein (pM28) mit einem HA-Epitop und ist durch die funktionelle (aber unmarkierte) Expression von pM27 in der Lage, die STAT2-Menge zu reduzieren (Abb. 3 und 4B). Der MCMV-Stamm Smith und eine

abgeleitete Mutante, die über klassische Mutagenese hergestellt wurde, reduziert die STAT2-Menge ebenfalls (Abb. 4A). Die STAT2-Reduktion scheint also ein konserviertes Prinzip von MCMV zu sein, das bei MCMV-Viren, die pM27 exprimieren, in allen getesteten permissiven Zellen beobachtet wurde.

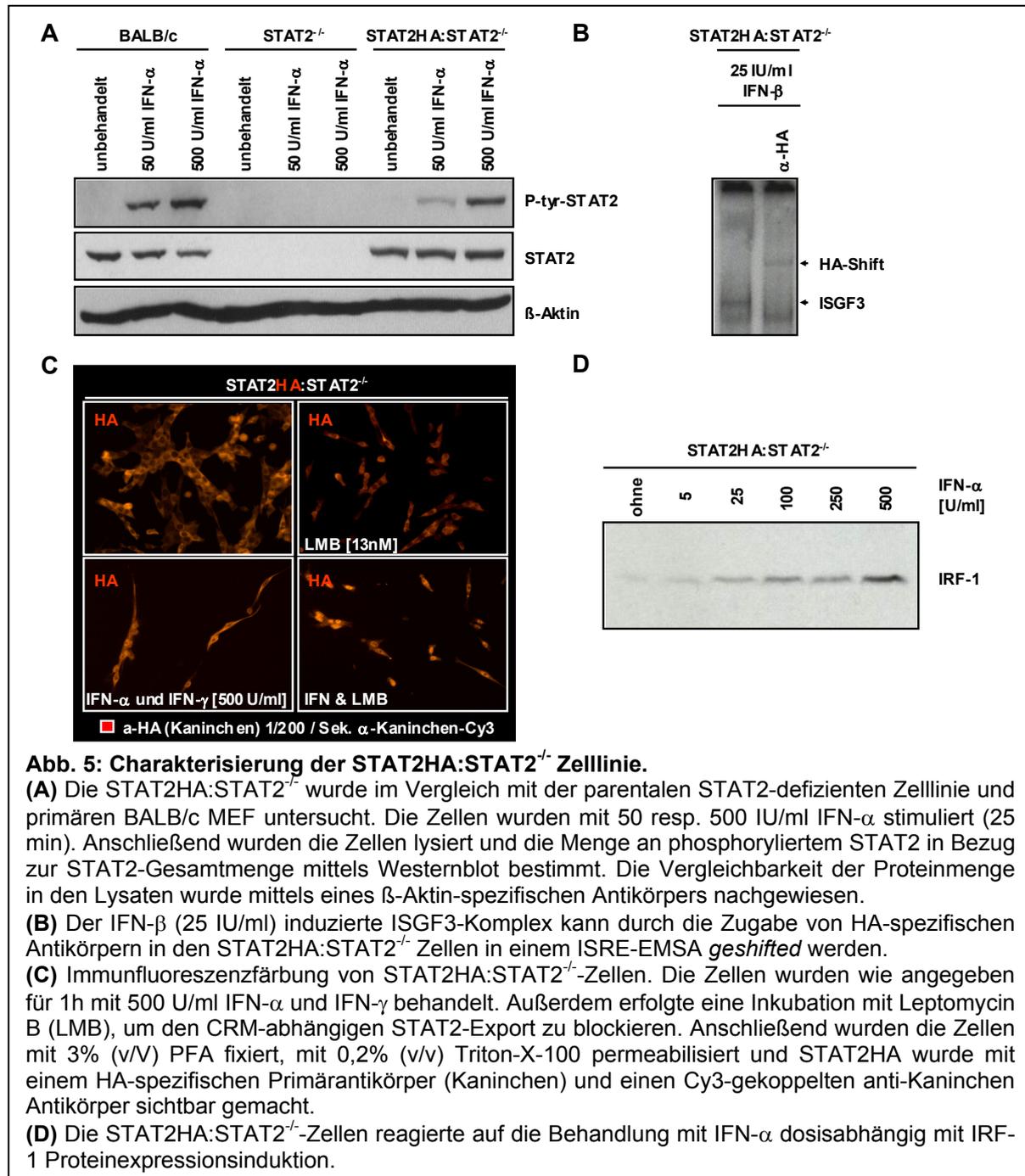
Interessanterweise zeigte sich, dass replikationskompetentes MCMV die zelluläre Menge des E2F-abhängig regulierten Gens PCNA deutlich steigert, UV-inaktiviertes MCMV jedoch nicht. Es handelt sich also scheinbar um einen aktiven, M27-unabhängigen und MCMV-abhängigen Prozess.



Um zu untersuchen, ob der intrinsische STAT2-Promotor eine entscheidende Rolle bei der pM27-abhängigen Reduktion der STAT2-Menge spielt und um die Kosten des STAT2-Nachweises zu senken, wurde eine MCMV-permissive klonale Zelllinie generiert, die eine HA-Epitop markierte STAT2-cDNA unter der Kontrolle eines CMV-MIE-Promotors exprimiert. Bei diesem Konstrukt wurde das STAT2-Protein C-terminal mit einem HA-Epitop markiert. Die von dem Konstrukt transkribierte STAT2-mRNA enthält die ursprüngliche 3' untranslatierte Region (3' UTR) nicht. Die Zelllinie wurde auf dem Hintergrund von STAT2-defizienten Zellen

## Ergebnisse

(STAT2<sup>-/-</sup>) hergestellt, um ausschließen zu können, dass zwei verschiedene STAT2-Spezies vorhanden sind. Diese STAT2-rekonstituierte Zelllinie (STAT2HA:STAT2<sup>-/-</sup>) exprimiert STAT2-Moleküle, die durch IFN- $\alpha$  phosphoryliert werden konnten (Abb. 5A).



Das HA-Epitop erlaubt sowohl den spezifischen STAT2-Nachweis im Westernblot und in der Immunfluoreszenzfärbung (Abb. 5C) als auch die STAT2-Immünpräzipitation mittels HA-spezifischer Antikörper (siehe folgende Abbildungen, z.B. Abb. 23). STAT2HA verhielt sich neben seiner Phosphorylierbarkeit auch in Bezug auf seine DNA-Bindungsfähigkeit normal:

## Ergebnisse

IFN- $\beta$  (ein anderes Typ I IFN) induzierte in STAT2HA:STAT2<sup>-/-</sup> Zellen die Bildung eines ISGF3-Komplexes (STAT2HA:STAT1:IRF-9), der mittels HA-spezifischer Antikörper in einem EMSA-Experiment nachgewiesen werden konnte (Abb. 5B). STAT2HA translozierte nach IFN-Behandlung in den Zellkern, wo es durch eine Inkubation mit Leptomycin B durch die Inhibition des CRM1-abhängigen Exports akkumulierte (Abb. 5C). Außerdem sind die Zellen, gemessen an der dosisabhängigen IRF-1-Induzierbarkeit durch IFN- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ -responsiv (Abb. 5D). Zusammengenommen zeigen diese Experimente, dass die STAT2HA:STAT2<sup>-/-</sup>-Zelllinie ein funktionales STAT2 exprimiert, so dass sie ein geeignetes Experimentalsystem darstellt und für weitere Analysen des pM27-vermittelten STAT2-Abbaus herangezogen werden konnte.

pM27 ist ein 682 Aminosäuren langes und ca. 79 kDa großes MCMV-kodiertes Protein (siehe Übersicht in Abb. 7). Es wird mit *early/late* Kinetik exprimiert (eigene Vorarbeiten, publiziert in (Zimmermann et al., 2005)). Mittels M27HA-MCMV wurde die Expression und subzelluläre Lokalisation untersucht. Eine Immunfluoreszenzfärbung wies M27HA in der Stroma-Zelllinie M2-10B4 (Abb. 6A) und in NIH3T3-Zellen sowohl im Zytoplasma als auch im Kern nach. Je nach Permeabilisierungsprotokoll war die pM27HA-spezifische Färbung unterschiedlich. Nach einer Permeabilisierung mit Saponin (0,5% [v/v]) erschien pM27-HA hauptsächlich zytoplasmatisch (Abb. 6A). Im Gegensatz dazu erfolgte der Nachweis nach einer Permeabilisierung mit Triton-X 100 (0,2% [v/v]) partiell zytoplasmatisch, aber präferentiell nukleär (Abb. 6A). Dieser Umstand beruht wahrscheinlich auf der weniger effizienten Permeabilisierung der Kernmembran durch Saponin. Der Immunfluoreszenz-Nachweis war spezifisch, da in mock-infizierten Zellen keine Färbung mit dem HA-spezifischen Antikörper sichtbar war (Abb. 6A und 6C), mit einem Isotyp-Antikörper keine Färbung in M27HA-MCMV-infizierten Zellen erfolgte (Abb. 6C) und die Zugabe von einem Überschuss an HA-Peptiden die HA-spezifische Färbung kompetitieren konnte (Abb. 6C). Für den Nachweis wurde ein HA-spezifischer Antikörper gewählt, der aus dem Kaninchen stammt, um auszuschließen, dass es zu einer unspezifischen Färbung durch den viruskodierte IgG-Fc-Rezeptor m138/FcR-1 kommt, der Maus-IgG mit hoher Affinität bindet (Thale et al., 1994). Die Lokalisation änderte sich durch IFN-Behandlung (IFN- $\alpha$  bzw. IFN- $\gamma$ ), UV-Bestrahlung (200 J/m<sup>2</sup>) oder Inkubation mit Leptomycin B (LMB [13 nM] für eine h) nicht auffällig (Abb. 6C).



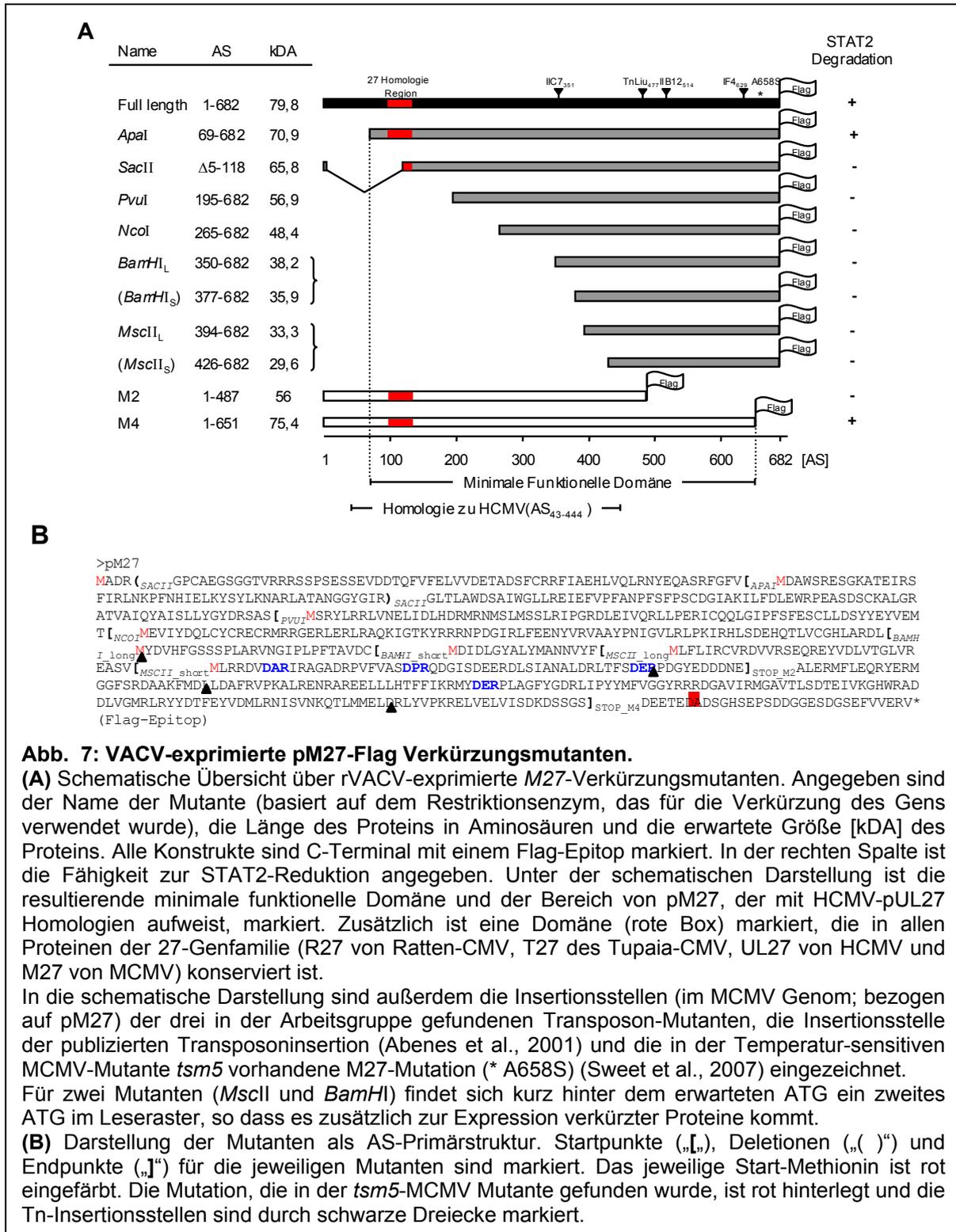
pM27 schien, obwohl es bei einer systematischen Suche nach MCMV-Partikel-Proteinen nicht gefunden wurde (Kattenhorn et al., 2004), im Virion vorzukommen, da es in gereinigten Überstands-MCMV-Partikelpräparationen (Ultrazentrifugation durch ein Sucrosekissen) nachgewiesen werden konnte (Abb. 6B). Zelluläre „Kontaminationen“ der Viruspräparation konnten durch das Ausbleiben eines Nachweises des zellulären Proteins RelA/p65 und des nicht im Partikel enthaltenen viralen Proteins pp89-IE1 ausgeschlossen werden. Es kann jedoch formal nicht ausgeschlossen werden, dass das HA-Epitop die Assemblierung in das Viruspartikel verändert.

Interessanterweise kommt das zelluläre Protein DDB1 (das im folgenden Verlauf dieser Arbeit als pM27-Kofaktor identifiziert und charakterisiert wird) auch im Viruspartikel vor.

Auch wenn pM27HA anscheinend im viralen Partikel enthalten ist, konnte mit UV-inaktivierten und somit mutmaßlich Genexpressions-freien Viren keine STAT2-Reduktion nachgewiesen werden (siehe z.B. Abb. 3 und 4). Da die UV-Behandlung die Fähigkeit der STAT2-Degradation durch pM27 beeinträchtigen könnte (z.B. durch ein UV-Licht-vermittelte Quervernetzung von Proteinen untereinander), wurde untersucht, ob replikationskompetente Viren in Zellen, die nicht zur Genexpression fähig sind (durch Cycloheximid- oder Actinomycin D-Behandlung), STAT2 reduzieren können. Auch hier wurde jedoch keine STAT2-Reduktion festgestellt, die schneller abläuft als der normale STAT2-Verlust durch das Fehlen der Genexpression (Daten nicht gezeigt), so dass geschlussfolgert werden kann, dass das partikuläre pM27 wahrscheinlich bei „normalen“ Infektionsdosen (getestet bis MOI 20) für die Reduktion von STAT2 in Fibroblasten nicht hinreichend ist. Es könnte jedoch zu einer Reduktion der zellulären STAT2-Menge in professionellen phagozytierenden Zellen führen, wenn diese sehr große Mengen viraler Partikel aufnehmen.

### **2.1.3 pM27 ist hinreichend für den Verlust von zellulärem STAT2**

Da die Befunde zeigten, dass *M27* für die MCMV-kodierte STAT2-Reduktion essentiell ist, wurde untersucht, ob *M27* für den STAT2-Verlust bereits hinreichend ist. Dafür wurden pM27-exprimierende, rekombinante Vakziniaviren (VACV) verwendet. Ein Flag-Epitop markiertes pM27 wurde von Dr. Albert Zimmermann kloniert und von Diplom-Biologin Henrike Reinhard über homologe Rekombination in das VACV-Genom eingebracht. Diplom-Ingenieurin Manuela Fiedler hat während ihrer Diplomarbeit VACV-exprimierte Flag-Epitop-markierte *M27*-Verkürzungsmutanten hergestellt. Die folgende Übersicht gibt einen Überblick über die klonierten *M27*-Konstrukte und die Struktur und Homologien von pM27 (Abb. 7).



**Abb. 7: VACV-exprimierte pM27-Flag Verkürzungsmutanten.**

(A) Schematische Übersicht über rVACV-exprimierte M27-Verkürzungsmutanten. Angegeben sind der Name der Mutante (basiert auf dem Restriktionsenzym, das für die Verkürzung des Gens verwendet wurde), die Länge des Proteins in Aminosäuren und die erwartete Größe [kDA] des Proteins. Alle Konstrukte sind C-Terminal mit einem Flag-Epitop markiert. In der rechten Spalte ist die Fähigkeit zur STAT2-Reduktion angegeben. Unter der schematischen Darstellung ist die resultierende minimale funktionelle Domäne und der Bereich von pM27, der mit HCMV-pUL27 Homologien aufweist, markiert. Zusätzlich ist eine Domäne (rote Box) markiert, die in allen Proteinen der 27-Genfamilie (R27 von Ratten-CMV, T27 des Tupaia-CMV, UL27 von HCMV und M27 von MCMV) konserviert ist.

In die schematische Darstellung sind außerdem die Insertionsstellen (im MCMV Genom; bezogen auf pM27) der drei in der Arbeitsgruppe gefundenen Transposon-Mutanten, die Insertionsstelle der publizierten Transposoninsertion (Abenes et al., 2001) und die in der Temperatur-sensitiven MCMV-Mutante *tsm5* vorhandene M27-Mutation (\* A658S) (Sweet et al., 2007) eingezeichnet.

Für zwei Mutanten (*MscII* und *BamHI*) findet sich kurz hinter dem erwarteten ATG ein zweites ATG im Leseraster, so dass es zusätzlich zur Expression verkürzter Proteine kommt.

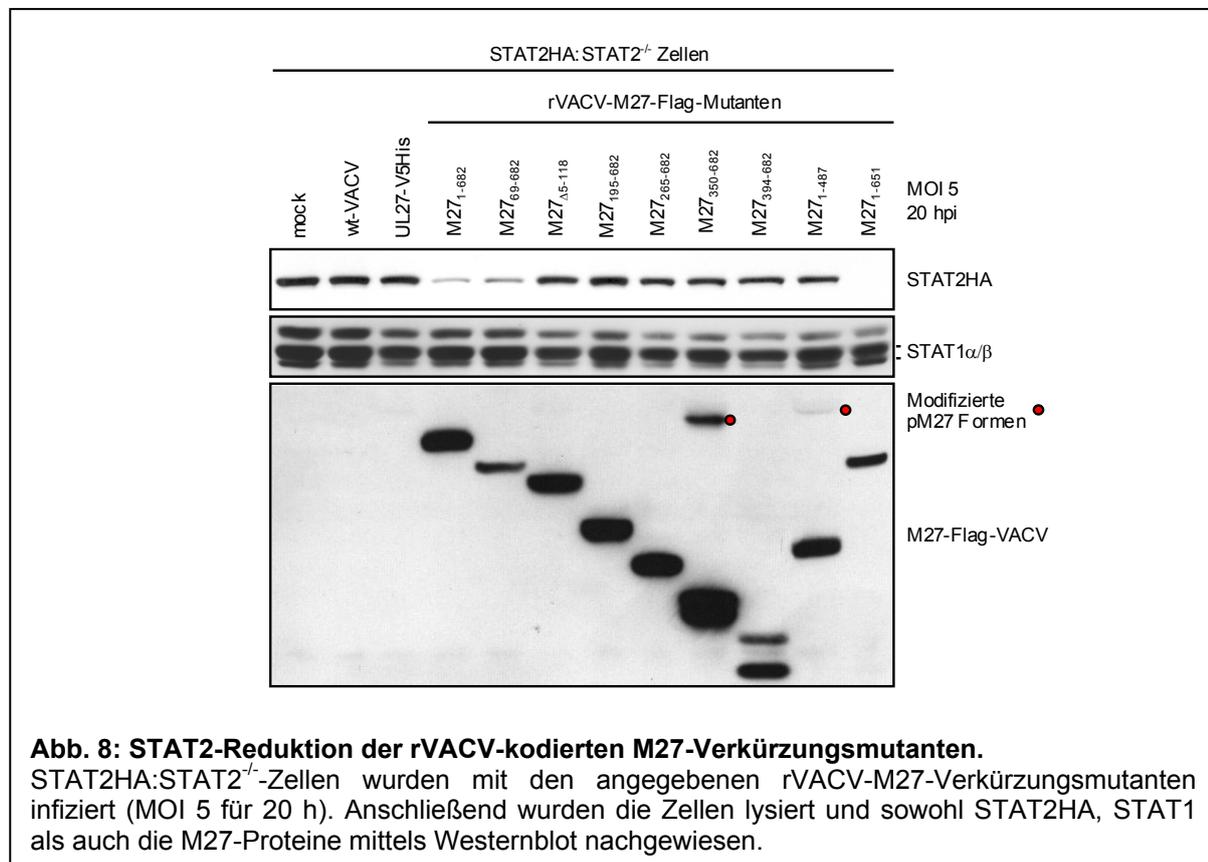
(B) Darstellung der Mutanten als AS-Primärstruktur. Startpunkte („[“), Deletionen („( )“) und Endpunkte („]“) für die jeweiligen Mutanten sind markiert. Das jeweilige Start-Methionin ist rot eingefärbt. Die Mutation, die in der *tsm5*-MCMV Mutante gefunden wurde, ist rot hinterlegt und die Tn-Insertionsstellen sind durch schwarze Dreiecke markiert.

Das Flag-Immunepitop-gekoppelte pM27 wurde nach der VACV-Infektion mit der erwarteten Größe (~80 kDa) nachgewiesen (Abb. 8). Die Expression von pM27 durch pM27Flag-VACV führte zu einem Verlust des STAT2-Proteins in infizierten Zellen, ein Effekt, der mit wt-VACV

## Ergebnisse

oder anderen VACV-Mutanten nicht zu beobachten war. Demzufolge ist pM27 für den Verlust von STAT2 sowohl essentiell als auch hinreichend.

Nur die äußersten Verkürzungen am N- und am C-Terminus führten nicht zum Verlust der Fähigkeit zur STAT2-Reduktion (Abb. 8), so dass eine minimale funktionelle Domäne zwischen den Aminosäuren 69 und 651 geschlussfolgert wurde. Interessanterweise fallen alle vier beschriebenen Transposoninsertionen in diese minimale Domäne. Eine Mutation, die in einer attenuierten, temperatur-sensitiven MCMV-Mutante (*tsm5*) in *M27* gefunden wurde und (aufgrund eigener Befunde (Zimmermann et al., 2005)) als mögliche Ursache für die Attenuierung *in vivo* diskutiert wurde (Sweet et al., 2007), liegt außerhalb der essentiellen AS-Sequenz und ist deshalb wahrscheinlich nicht für die beobachtete Attenuierung verantwortlich.

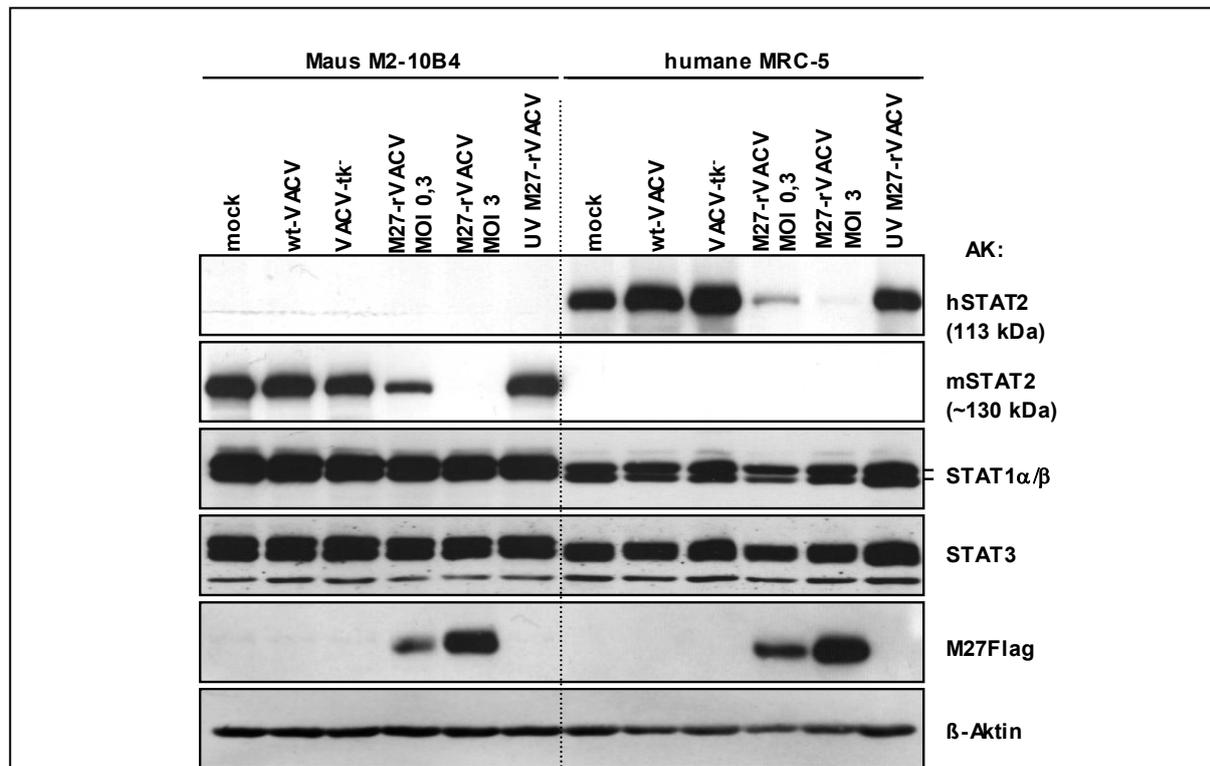


Interessanterweise zeigten die zwei Mutanten pM27<sub>350-682</sub> und pM27<sub>1-487</sub> zusätzliche, größere Formen (mit einem roten Punkt in Abb. 8 markiert), die im ersten Fall zu groß und im letzteren Fall zu klein für eine Dimerisierung sind. Da die Genexpression über VACV erfolgte und somit im Zytoplasma ablief, kann ein verändertes Splicing ausgeschlossen werden. Es scheint sich demzufolge um eine Modifikation zu handeln, die in diesen Mutanten besonders ausgeprägt ist. Da die Experimente unter reduzierenden Westernblot-Bedingungen durchgeführt wurden, werden nicht-kovalente Cys-Cys-Brücken-vermittelte Interaktionen ausgeschlossen. Es wurde

geschlussfolgert, dass diese Modifikation insbesondere in dem Bereich zwischen AS<sub>350</sub> bis AS<sub>487</sub> stattfindet resp. beeinflusst wird.

### 2.1.4 pM27 reduziert die Menge von humanem und Maus-STAT2

Der breite Wirtstropismus von VACV erlaubte die Untersuchung, ob pM27 in der Lage ist, humanes STAT2 (hSTAT2) zu beeinflussen. Auch in humanen Zellen, die mit pM27-exprimierenden VACV infiziert wurden, konnte ein spezifischer Verlust von STAT2 beobachtet werden (Abb. 9). wt-VACV und eine unabhängige Mutante (VACV-tk<sup>-</sup>) induzieren jedoch keinen Verlust von STAT2. Der Verlust war bei einer Infektion mit einer hohen Infektionsdosis M27-rVACV (MOI 3) stärker ausgeprägt als bei einer niedrigen Infektionsdosis (MOI 0,3), so dass eine Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen pM27-Menge und dem STAT2-Verlust zu bestehen scheint (Abb. 9).



**Abb. 9: M27 ist hinreichend für die Degradation von STAT2 in murinen und humanen Zellen.**

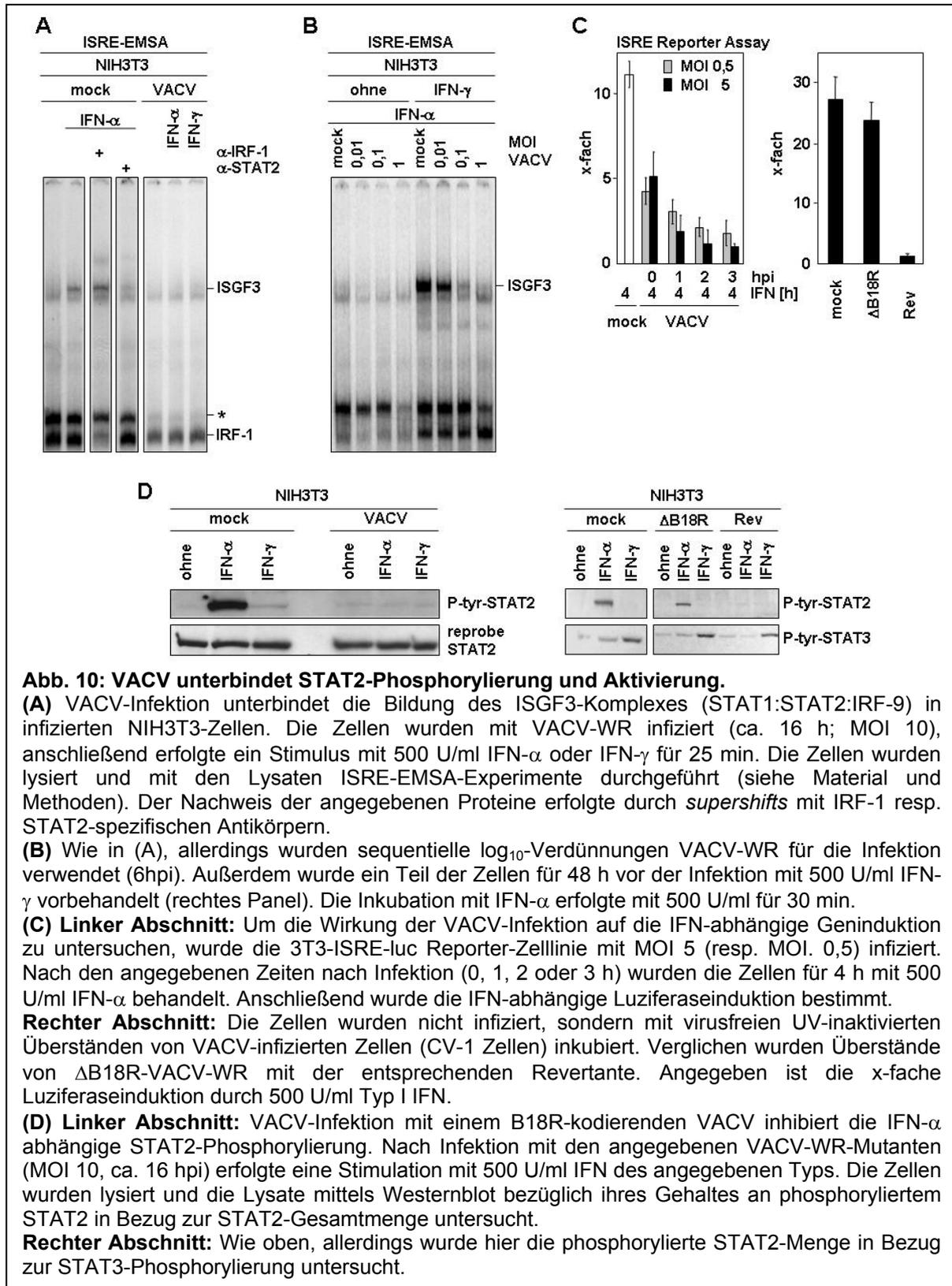
M2-10B4 Mausstromazellen und humane MRC-5-Zellen wurden parallel mit den angegebenen rVACV-Mutanten infiziert (MOI 0,3 bzw. 3). 16 hpi. wurden die Zellen lysiert, die Proteinmengen der jeweiligen Lysate gemessen, normalisiert und anschließend per Westernblot mit den jeweiligen Antikörpern auf das Vorhandensein der angegebenen Proteine untersucht. Der Antikörper für hSTAT2 (Upstate) bindet mSTAT2 nicht, so dass das mSTAT2 mit einem anderen STAT2-spezifischen Antikörper (Santa Cruz-C-20) detektiert werden musste. Alle Proteine wurden sequentiell auf der gleichen Membran nachgewiesen. Für die UV-Behandlung wurden die Viren 20 Minuten mit UV-Licht (256 nm) bestrahlt. Die erfolgreiche Inaktivierung zeigte sich durch das Ausbleiben von pM27Flag.

Die Inaktivierung von M27-rVACV durch UV-Licht führte zu einem Verlust der pM27-Expression und die Reduktion von STAT2 blieb aus. Der Befund, dass pM27 auch humanes STAT2 degradiert, gab einen ersten Hinweis auf die mögliche Interaktionsstelle zwischen pM27 und STAT2, da hSTAT2 und STAT2 der Maus (mSTAT2) sich am C-Terminus maßgeblich durch eine Mikroinsertion im *mSTAT2*-Gen unterscheiden (Park et al., 1999). Da pM27 sowohl hSTAT2 als auch mSTAT2 erkennt, ist es unwahrscheinlich, dass die Bindestelle in diesem C-terminalen Bereich lokalisiert ist.

### **2.1.5 VACV-exprimiertes pM27 beweist, dass unphosphoryliertes STAT2 erkannt und degradiert werden kann**

Der Befund, dass VACV-exprimiertes pM27 in der Lage ist, die STAT2-Menge signifikant zu reduzieren, ist bei näherer Betrachtung erstaunlich, da VACV selbst ein Virus ist, das das IFN-System sehr effizient kontrolliert (Haga und Bowie, 2005). wt-VACV interferiert auf verschiedenen Ebenen mit dem IFN-System, ist aber im Gegensatz zu CMV nicht in der Lage, STAT2 zu degradieren (Abb. 9). VACV-kodiertes pM27Flag ist jedoch in der Lage, STAT2 zu reduzieren. Dies zeigt einerseits, dass pM27 hinreichend für einen STAT2-Verlust ist, andererseits lässt es vermuten, dass pM27 in der Lage ist, STAT2 zu degradieren, obwohl die IFN-Signalkaskade inhibiert ist. Deshalb wurde die VACV-kodierte Inhibition des IFN-Systems, bezogen auf die STAT2-abhängige Signaltransduktion, untersucht. Es zeigte sich, dass VACV die IFN-abhängige Aktivierung von STAT2 unterbindet. VACV verhinderte die IFN- $\alpha$ -abhängige Induktion von DNA-bindenden ISGF3 (STAT2:STAT1:IRF-9)-Komplexen in EMSA-Experimenten (Abb. 10A), selbst nach einer zusätzlichen langen IFN- $\gamma$ -Vorbehandlung, einem sog. Superstimulus (Abb. 10B). Dementsprechend war die IFN- $\alpha$ -abhängige Reporter-gen-Induktion stark beeinträchtigt (Abb. 10C, linker Abschnitt). Diese Inhibition der IFN-Signaltransduktion war von dem VACV-kodierten IFN-*decoy* Rezeptor B18R abhängig (Colamonici et al., 1995; Symons et al., 1995). Überstände von Zellen, die mit B18R-kodierenden VACV infiziert wurden, konnten die Induktion des Reportergens inhibieren, während Überstände von Zellen, die mit dem  $\Delta$ B18R-VACV infiziert wurden, diese Inhibition nicht mehr zeigten (Abb. 10C, rechter Abschnitt). Konsistent mit dieser Inhibition der Bildung des DNA-bindenden ISGF3-Komplexes und der Inhibition der ISRE-abhängigen Genexpression wurde die IFN-abhängige STAT2-Phosphorylierung durch VACV inhibiert (Abb. 10 D). Auch diese Fähigkeit hing von der Kodierungskapazität für das VACV-Protein B18R ab (Abb. 10 D, rechtes Panel). Die B18R-kodierte Inhibition der IFN- $\alpha$ -abhängigen STAT2-Phosphorylierung

ist in dem pM27-exprimierenden VACV ebenfalls kodiert, so dass geschlussfolgert werden muss, dass pM27 unphosphoryliertes, inaktives STAT2 erkennen und degradieren kann.



### 2.1.6 pM27 degradiert monomeres STAT2

Die Verbindung der Befunde der STAT2-Reduktion nach M27Flag-Expression durch rVACV (Abb. 8 und 9) und der VACV-kodierten Inhibition der STAT2-Phosphorylierung (Abb. 10) legten die Vermutung nahe, dass pM27 unphosphoryliertes und damit monomeres STAT2 erkennen und reduzieren kann. Allerdings kommen in Zellen STAT1:STAT2-Dimere unabhängig von der Inkubation mit IFN vor ((Stancato et al., 1996) und Abb. 34B). Um die Fragestellung der Erkennung von monomerem STAT2 direkt experimentell untersuchen zu können, wurden Zellen mit spezifischen Deletionen für STAT1, STAT2, STAT3 oder IFNAR1 hinsichtlich der pM27-abhängigen STAT2-Reduktion untersucht.

STAT1-defiziente Zellen können keinen ISGF3-Komplex (STAT2:STAT1:IRF-9) bilden. Zellen mit einer gezielten Deletion von STAT2 dienten als Spezifitätskontrolle des STAT2-Nachweises. Es zeigte sich, dass pM27 die STAT2-Menge in STAT1-defizienten Zellen, also unabhängig von einem ISGF3-Komplex, degradieren kann (Abb. 11).

Da auch STAT2:STAT3-Heterodimere durchaus denkbar sind und für paramyxovirale IFN-Antagonisten degradierende Eigenschaften für STAT2 und STAT3 beschrieben wurden (Ulane et al., 2003), wurden auch STAT3-defiziente Zellen verwendet. Es zeigte sich, dass pM27-Flag auch in diesen Zellen in der Lage war, die STAT2-Menge zu reduzieren (Abb. 11).

Um den pM27-abhängigen STAT2-Verlust in Abwesenheit von der Typ I IFN-Signaltransduktion zu untersuchen, wurden zusätzlich IFNAR1-defiziente Zellen verwendet. Auch hier war eine pM27-abhängige STAT2-Reduktion zu beobachten (Abb. 11).

Zusätzlich erlaubten die Zellen mit definierten Deletionen der Gene für bestimmte Komponenten der IFN-Jak-STAT-Signaltransduktion die Beantwortung der Frage, ob pM27 in Abwesenheit von STAT2 andere STAT-Moleküle als Substrate erkennt. Solch eine alternative Erkennung, in diesem Fall Phosphorylierung, eines anderen STAT-Moleküls in Abwesenheit des primären Substrates wurden für den IFNGR und den IL-6-Rezeptor beschrieben (Qing und Stark, 2004; Costa-Pereira et al., 2002). Es zeigte sich jedoch, dass pM27 selbst in Abwesenheit von STAT2 die Menge von STAT1 und STAT3 nicht reduziert (Abb. 11).

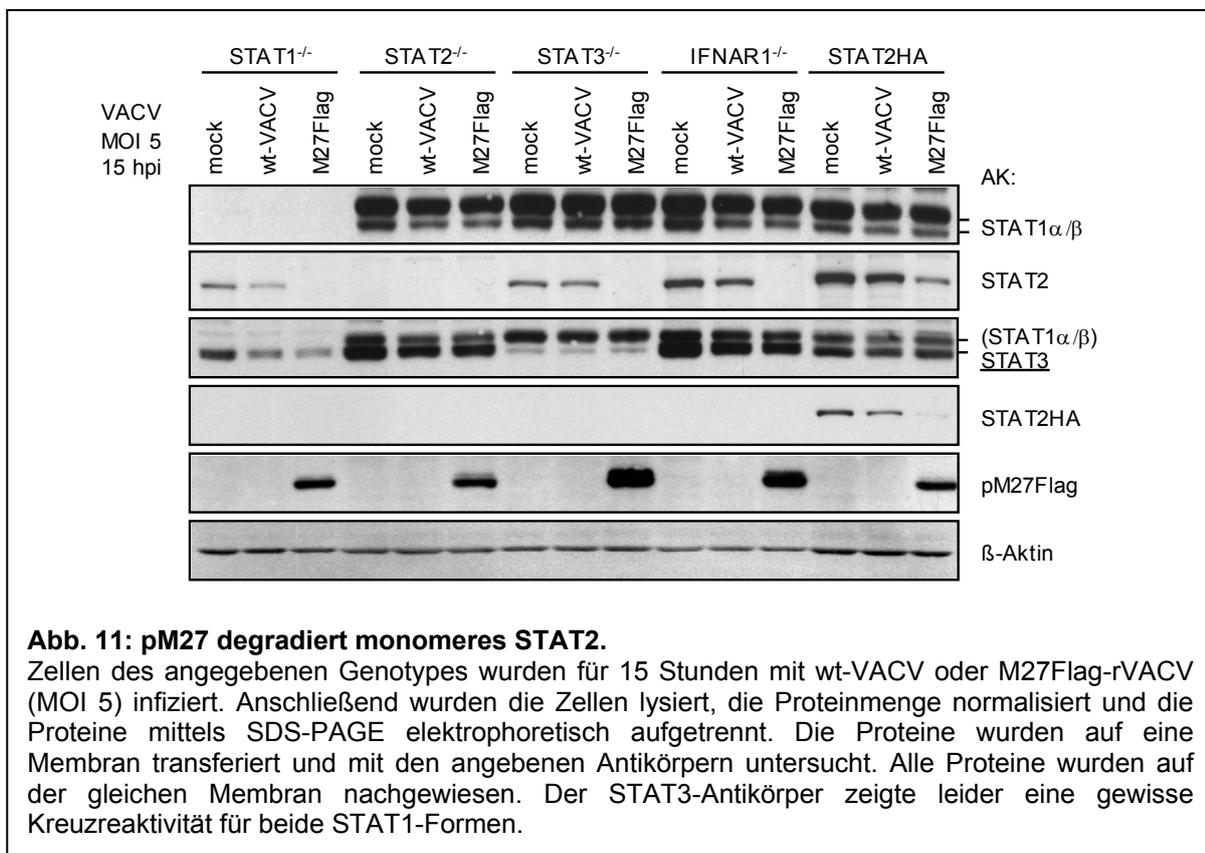
Die Unabhängigkeit der pM27-abhängigen STAT2-Reduktion von dem intrinsischen STAT2-Promotor zeigte sich in der STAT2HA:STAT2<sup>-/-</sup>-Zelllinie, die STAT2 von einem konstitutiven und IFN-unabhängigen Promoter exprimiert. In dieser Zelle war der Nachweis von STAT2 zusätzlich über das HA-Epitop möglich. Es zeigte sich erneut der STAT2-Verlust in Anwesenheit von pM27 (Abb. 11).

Bei genauer Betrachtung fiel über pM27Flag eine zweite etwas größere Form auf (Abb. 11). Diese Modifikation wies auf eine mögliche Ubiquitinmodifikation von pM27HA hin.

## Ergebnisse

pM27 erkennt STAT2 also unabhängig von IFN- $\alpha$ -abhängiger Signaltransduktion (siehe IFNAR1<sup>-/-</sup> Zellen), von ISGF3-Komplexbildung (siehe STAT1<sup>-/-</sup>-Zellen) oder STAT3-Komplexbildung (siehe STAT3<sup>-/-</sup>-Zellen). Außerdem bewiesen die STAT2-defizienten Zellen den korrekten STAT2-Nachweis in den verglichenen Zellen. In Abwesenheit von STAT2 wurden weder STAT1 noch STAT3 von pM27 beeinflusst.

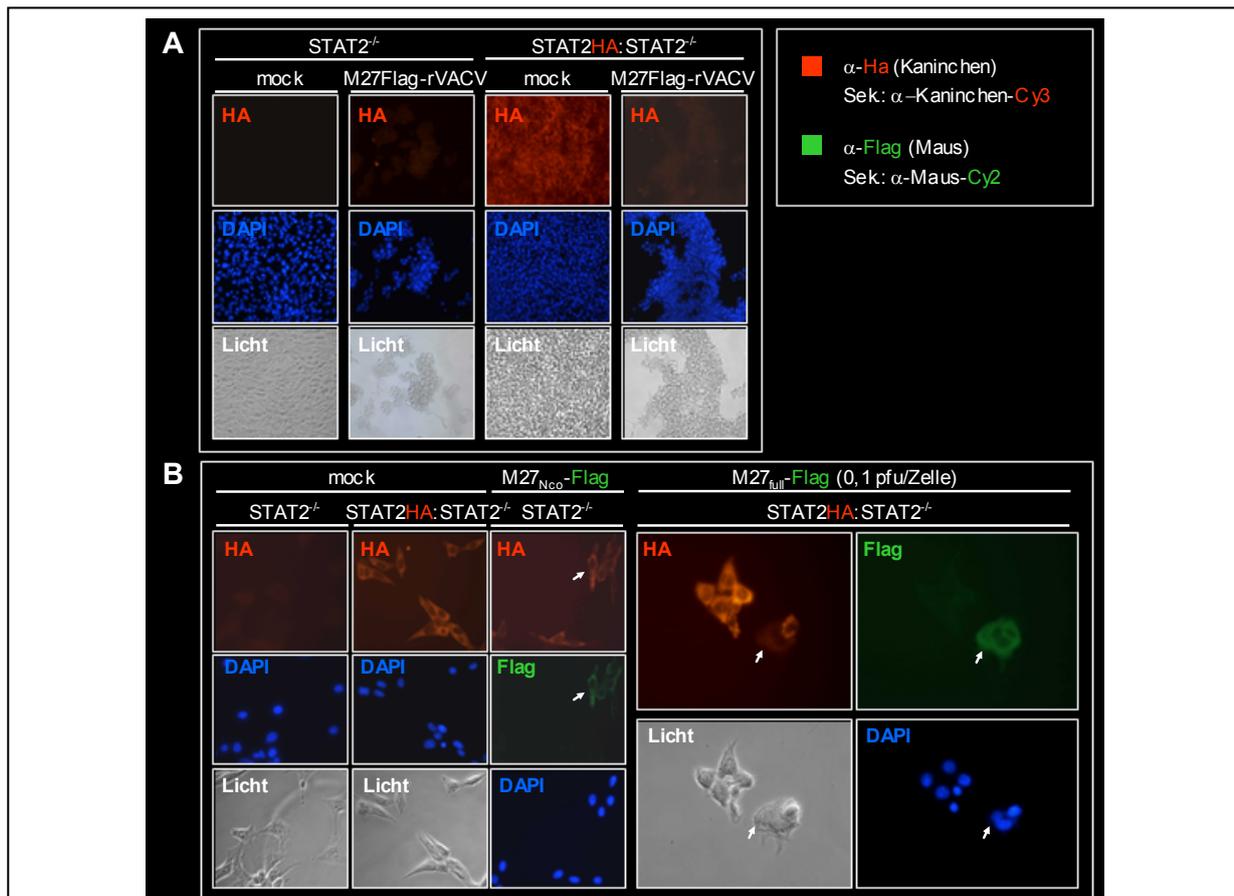
Die Erkennung von monomerem STAT2 (außerhalb des ISGF3-Komplexes) passt gut zu dem Befund der teilweise zytoplasmatischen, teilweise nukleären Lokalisation von pM27HA (Abb. 5), da unphosphoryliertes STAT2 einen CRM1- und Importin- $\alpha$ -abhängigen Translokationszyklus („*nuclear shuttling*“) durchläuft (Banninger und Reich, 2004).



Grundsätzlich kann bei der Präparation von Zelllysaten und beim Einsatz von Westernblot-Nachweisverfahren nicht ausgeschlossen werden, dass ein Protein unter bestimmten Bedingungen in die unlösliche Phase übergeht und während der Präparation der Lysate verloren geht, obwohl es in der Zelle noch vorhanden war. Auch wenn Experimente, bei denen Zellen direkt in SDS-Probenpuffer aufgekocht wurden oder in denaturierendem Lysepuffer lysiert wurden, kein STAT2 in pM27-positiven Zellen aufwiesen (Daten nicht gezeigt), wurden Immunfluoreszenzfärbungen von STAT2HA:STAT2<sup>-/-</sup>-Zellen durchgeführt, die mit funktionellen oder nicht funktionellen pM27Flag-exprimierenden rVACV infiziert worden

## Ergebnisse

waren. Es zeigte sich auch hier eine STAT2-Reduktion in Zellen, die mit M27Flag-rVACV infiziert worden waren (Abb. 12), so dass geschlussfolgert wurde, dass pM27Flag die Menge von STAT2 tatsächlich reduziert. Die STAT2-Reduktion zeigte sich sowohl nach einer Infektion mit einer hohen MOI für einen kompletten Zellrasen (Abb. 12A) als auch für individuelle pM27Flag exprimierende Zellen (Abb. 12B). Eine Reduktion von STAT2HA konnte ebenfalls nach einer Transfektion von pM27-Flag-Expressionsvektoren per Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 12: STAT2-Reduktionsnachweis per Immunfluoreszenzfärbung.**

(A) STAT2HA:STAT2<sup>-/-</sup> oder STAT2-defiziente Zellen wurden entweder mit M27Flag-rVACV oder mock infiziert. STAT2HA wurde per Immunfluoreszenzfärbung (siehe Material und Methoden) nachgewiesen („HA“).

(B) Wie in (A), allerdings wurde eine niedrige Infektionsdosis verwendet (MOI 0,1; 14 hpi). Als Vergleich wurde zusätzlich ein rVACV verwendet, das ein nicht-funktionelles pM27 exprimiert: M27<sub>Nco</sub>Flag-rVACV. Es wurden sowohl STAT2HA („HA“) als auch pM27-Flag („Flag“) angefärbt.

In beiden Fällen erfolgte eine Färbung der nukleären DNA durch DAPI (Roche). Zusätzlich wurde eine lichtmikroskopische Aufnahme im Phasenkontrast aufgenommen („Licht“).

## 2.2 PM27 SCHÜTZT MCMV VOR DER WIRKUNG VON TYP I UND TYP II IFN

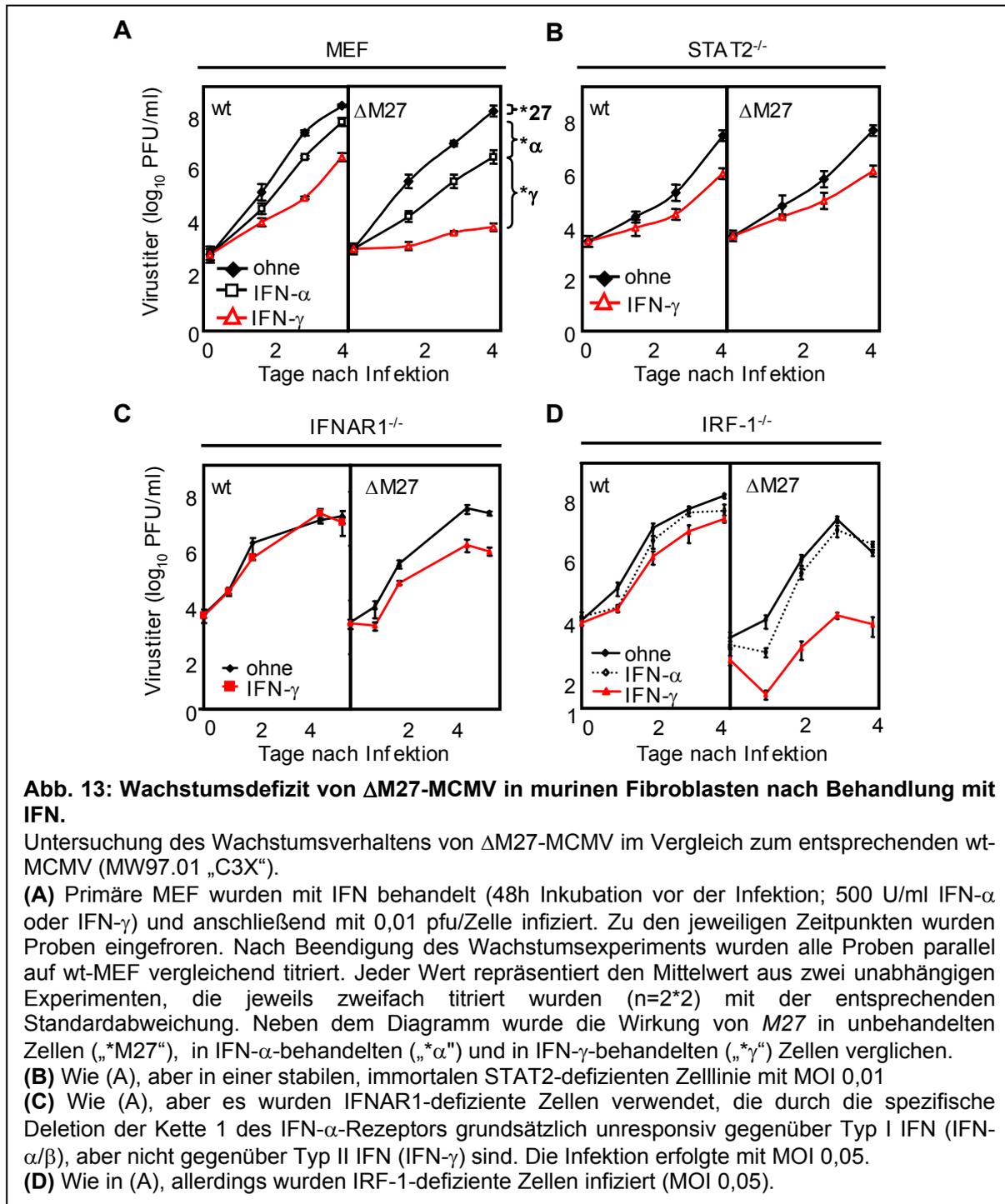
Nachdem festgestellt wurde, dass *M27* für die MCMV-kodierte Inhibition der IFN-abhängigen ISRE-Signaltransduktion verantwortlich ist, wurden Wachstumskurven angefertigt, um zu untersuchen, welchen Stellenwert das Gen *M27* für die Replikation von MCMV hat. Nach den

## Ergebnisse

angegebenen Zeiten wurden Proben eingefroren und anschließend zeitgleich per Plaque-Titration ausgewertet, um die Anzahl der gebildeten Viren zu bestimmen. Es zeigte sich, dass  $\Delta$ M27-MCMV verglichen mit wt-MCMV nur einen sehr geringen Wachstumsnachteil in unbehandelten Zellen aufweist (Abb. 13). Dieses Ergebnis bestätigt Befunden von anderen Arbeitsgruppen, die für eine *loss-of-function* Tn-Insertionsmutante im *M27*-Gen ebenfalls keinen Replikationsnachteil in Zellkultur nachweisen konnten (Abenes et al., 2001; Zhan et al., 2000). Da die oberen Befunde eine Beteiligung von pM27 an der MCMV-kodierten Inhibition der IFN-Signaltransduktion nahe legten, wurde untersucht, ob  $\Delta$ M27-MCMV in IFN-behandelten Zellen einen Wachstumsnachteil gegenüber wt-MCMV hat. Für die Untersuchung wurden Zellen für 48 h mit 500 U/ml IFN vorbehandelt und anschließend mit 0,05 pfu/Zelle infiziert. Die Behandlung mit IFN- $\alpha$  führte zu einem 20- bis 50-fach reduziertem Wachstum verglichen mit wt-MCMV (Abb. 13). Dieser Befund zeigte, dass Typ I IFN eine deutlich stärkere Replikations-inhibierende Wirkung auf  $\Delta$ M27-MCMV als auf wt-MCMV hat.  $\Delta$ M27-MCMV induziert zwar die gleiche mRNA-Menge an Typ I IFN (Le et al., 2008b), die induzierte Menge an Typ I IFN kann im Fall von  $\Delta$ M27-MCMV allerdings den Jak-STAT-Signalweg und die entsprechende Genexpression erfolgreich induzieren. Dies ist in wt-MCMV-infizierten Zellen nicht möglich, da pM27 den Transkriptionsfaktor STAT2 massiv reduziert, so dass eine antivirale Wirkung durch IFN nicht induziert wird.

Unerwarteter Weise zeigte sich die stärkste Replikationsinhibition des  $\Delta$ M27-MCMV nach einer Behandlung der Zellen mit IFN- $\gamma$ . Unter diesen Bedingungen war nahezu kein Wachstum von  $\Delta$ M27-MCMV mehr festzustellen. Verglichen mit dem wt-Virus lag der Wachstumsnachteil hier über drei  $\log_{10}$ -Stufen (Abb. 13A). Dies ist sehr erstaunlich, da STAT2 ausschließlich als Teil der Typ I IFN-Signalkaskade und nicht als Teil der IFN- $\gamma$ -Signaltransduktion angesehen wird. Um zu untersuchen, ob dieser Effekt STAT2-abhängig ist, wurde das Experiment in STAT2-defizienten Zellen ((Park et al., 2000) freundlicherweise von Prof. C. Schindler zur Verfügung gestellt) wiederholt. Die Wachstumskurven von  $\Delta$ M27- und wt-MCMV in STAT2-defizienten Zellen sind deckungsgleich (Abb. 13B), so dass geschlossen wurde, dass der beobachtete Phänotyp vollständig STAT2-abhängig ist. Dies definiert STAT2 als prinzipielles Ziel von pM27 und ließ eine Verbindung von STAT2 und IFN- $\gamma$  vermuten.

Durch diese Befunde ist jedoch nicht auszuschließen, dass STAT2-unabhängige Effekte von pM27 existieren, die in diesem Experimentalsystem keine Rolle spielen. Der letztendliche Beweis, dass pM27 keine weitere Funktion außer der STAT2-Reduktion hat, ließe sich nur in STAT2-defizienten Mäusen in *in vivo*-Experimenten erbringen.



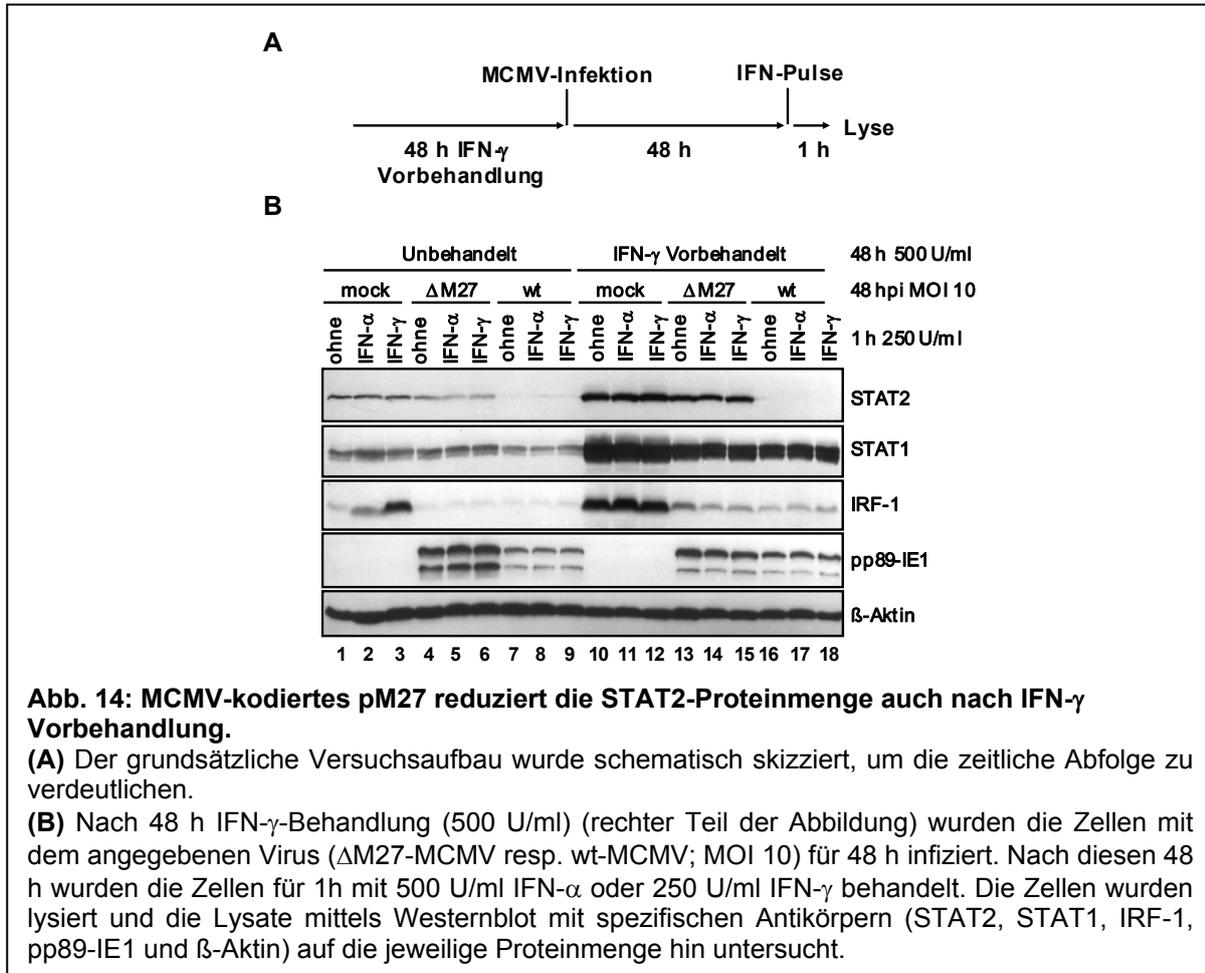
Da STAT2 eigentlich nicht an der klassischen IFN- $\gamma$ -Signaltransduktion beteiligt ist, IFN- $\gamma$  aber die Expression von Typ I IFN verändern kann (Marziali et al., 1991), das dann über einen STAT2-abhängigen Signalweg wirkt, wurde die Beteiligung von Typ I IFN an der antiviralen Wirkung von IFN- $\gamma$  gegen  $\Delta$ M27-MCMV untersucht. Hierfür wurden IFNAR1-defiziente Zellen verwendet, die durch den Verlust einer der beiden IFN- $\alpha$ -Rezeptorketten kein Typ I IFN perzeptieren und somit auch keine antivirale IFN-Antwort auslösen können. In IFNAR1-defizienten Zellen ist, verglichen mit wt-Zellen, die Wirkung von IFN- $\gamma$  gegen  $\Delta$ M27-MCMV

deutlich reduziert (Vergleich Abb. 13A und 13C), so dass geschlussfolgert wurde, dass Typ I IFN einen wesentlichen Beitrag an der IFN- $\gamma$ -induzierten Kontrolle von  $\Delta$ M27-MCMV hat. Allerdings zeigte IFN- $\gamma$  in IFNAR1-defizienten Zellen wiederum eine verstärkte Wirkung gegenüber der  $\Delta$ M27-Mutante verglichen zum wt-Virus (Abb. 13C). Demzufolge existiert ein STAT2-abhängiger, aber IFNAR1-unabhängiger Effekt von IFN- $\gamma$  gegenüber MCMV. Dieser Befund zeigte erstmals eine Verbindung zwischen IFN- $\gamma$  und STAT2 in der antiviralen Antwort gegen CMV auf (Zimmermann et al., 2005).

Um zu untersuchen, inwieweit der IFN- $\gamma$ -induzierte Transkriptionsfaktor IRF-1 für diesen Effekt als sekundärer Mediator von Bedeutung ist, wurde ein Wachstumsexperiment in primären IRF-1-defizienten Fibroblasten durchgeführt. Interessanterweise blieb hier der Wachstumsnachteil der  $\Delta$ M27-Mutante erhalten (Abb. 13D). Die IFN- $\gamma$ -abhängigen Effektorgene, die das Wachstum der Mutante blockieren, werden also IRF-1-unabhängig induziert. Da die IFN- $\gamma$ -abhängige IRF-1-Induktion direkt GAF (STAT1:STAT1)-abhängig ist (Rein et al., 1994), unterstreicht dieser Befund wiederum die STAT2-Abhängigkeit des IFN- $\gamma$ -abhängigen Effektes auf  $\Delta$ M27-MCMV.

### **2.2.1 pM27 reduziert die STAT2-Proteinmenge auch in IFN- $\gamma$ -behandelten Zellen**

Wegen der Befunde der IFN- $\gamma$ -abhängigen Wachstumsinhibition von  $\Delta$ M27-MCMV stellte sich die Frage, ob pM27 die STAT2-Menge in Zellen, die mit IFN- $\gamma$  vorbehandelt waren worden, reduziert. Auch nach einer Präinkubation mit IFN- $\gamma$  (48 h mit 500 U/ml) war wt-MCMV in der Lage, den zellulären STAT2-Gehalt zu senken, so dass STAT2 kaum mehr nachweisbar war (Abb. 14, Spuren 16-18), obwohl die Ausgangs-STAT2-Menge durch die IFN-Behandlung signifikant gesteigert worden war (Abb. 14, Vergleich Spuren 1-9 mit Spuren 10-18). Diese Fähigkeit ist im  $\Delta$ M27-MCMV wie erwartet nicht kodiert (Abb. 14, Spuren 14-16). Auch in diesem Experiment zeigte sich erneut die M27-unabhängige MCMV-kodierte Inhibition der IRF-1-Induktion (Abb. 14, Vergleich Spuren 4-9 mit 1-3 resp. 13-18 mit 10-12). Außerdem zeigte sich auch in diesem Experiment, dass die Proteinmenge von STAT1 nicht durch pM27 beeinflusst wird (Abb. 14). Der Nachweis von pp89-IE1 zeigte, dass eine  $\Delta$ M27-MCMV Infektion nach einer vorangegangenen IFN- $\gamma$ -Behandlung eine genauso starke virale IE-Genexpression induzierte wie die vergleichbare wt-MCMV-Infektion (Abb. 14., Vergleich Spuren 13-15 mit 16-18). Die initialen Schritte der  $\Delta$ M27-MCMV-Infektion wie *attachment*, *entry* und *ie*-Genexpression werden scheinbar nicht signifikant durch IFN- $\gamma$  beeinflusst.

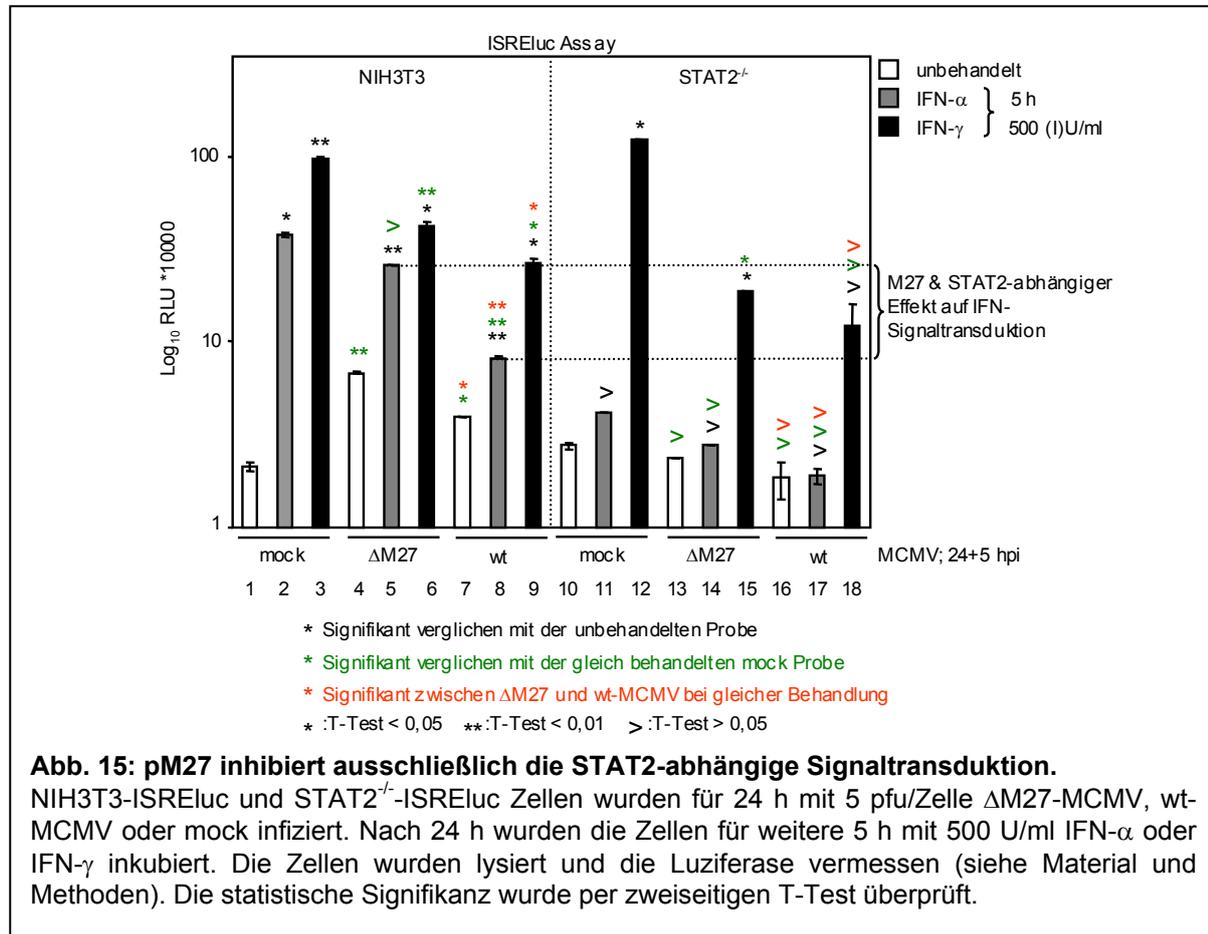


### 2.2.2 pM27 inhibiert ausschließlich die STAT2-abhängige IFN-Signaltransduktion

Um die Fragestellung zu untersuchen, ob pM27 strikt STAT2-abhängig wirkt, wurden NIH3T3-Zellen und STAT2-defiziente Zellen bezüglich der MCMV-abhängigen Inhibition der IFN-Signaltransduktion getestet. Es wurden stabil-transfizierte, klonale Reporterzellen, die ISRE-Promotor-abhängig Luziferase exprimieren, verwendet. Die beiden Zelltypen wurden parallel mit ΔM27-MCMV, wt-MCMV oder mock infiziert. 24 hpi wurden die Zellen für 5 h mit IFN behandelt und anschließend die induzierte Luziferase gemessen. Es zeigte sich, dass pM27 für die Inhibition der STAT2-abhängigen IFN-Signaltransduktion verantwortlich ist (Abb. 15, Vergleich Balken 2, 5 und 8). Die Luziferaseinduktion nach ΔM27-MCMV-Infektion unterschied sich, im Gegensatz zu der Infektion mit wt-MCMV, nicht mehr von den mock-infizierten Zellen, da der entscheidende Antagonist deletiert ist (Abb. 15, Vergleich Balken 2 und 5). Die Infektion mit wt-MCMV führte zu einer statistisch hoch signifikanten Inhibition der IFN-α-abhängigen Luziferaseinduktion (Abb. 15, Vergleich Balken 2 und 8). Der Vergleich zwischen ΔM27-MCMV und wt-MCMV zeigt in NIH3T3 unter allen Bedingungen einen statistisch signifikanten Unterschied bezüglich der IFN-Signaltransduktion. In STAT2-

## Ergebnisse

defizienten Zellen unterscheiden sich  $\Delta$ M27-MCMV und wt-MCMV jedoch nicht signifikant voneinander (Abb. 15, Vergleich Balken 13-15 mit 16-18), so dass erneut die spezifische Wirkung von pM27 auf STAT2 nachgewiesen wurde.

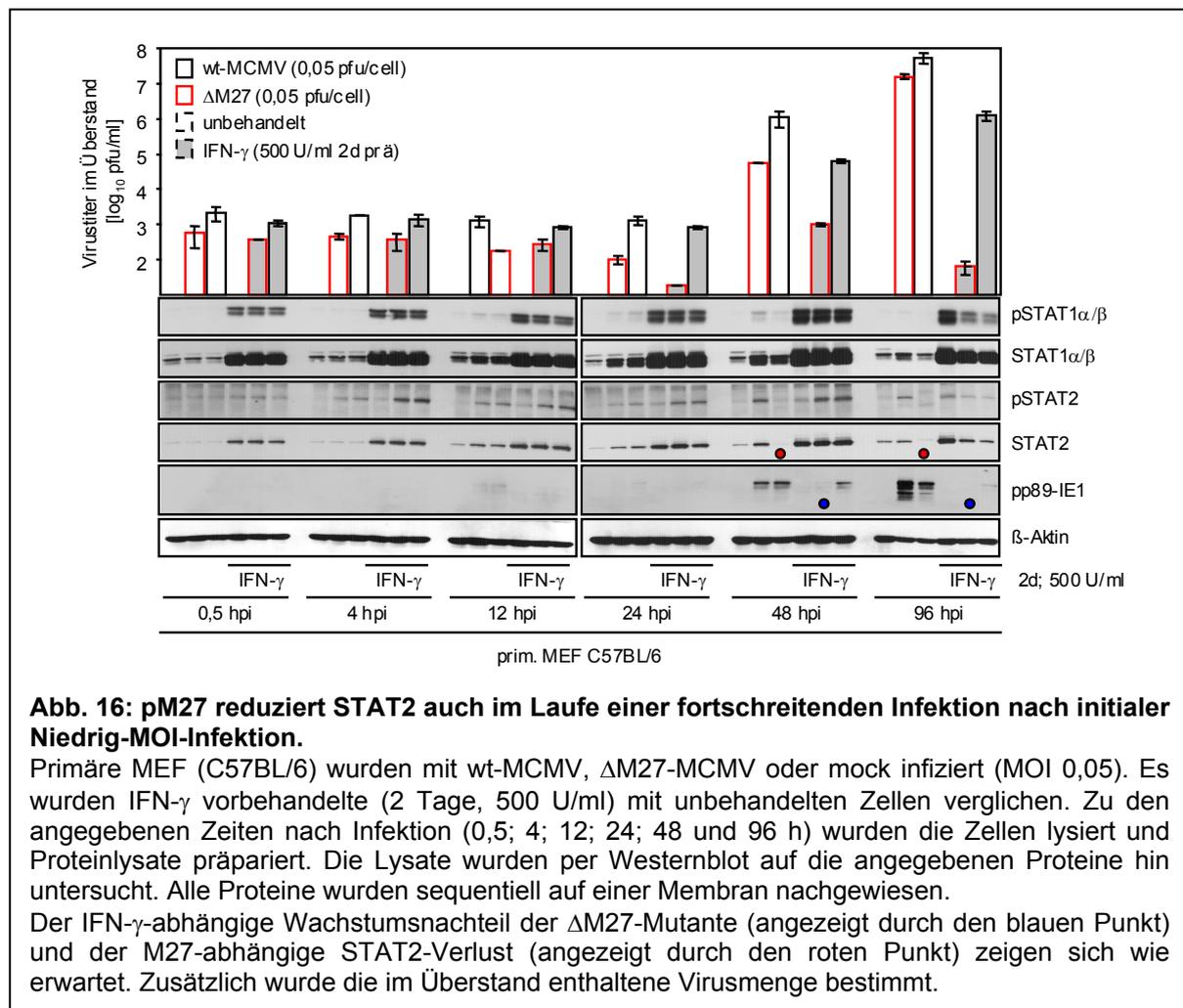


### 2.2.3 $\Delta$ M27-MCMV-Replikation ist nach IFN- $\gamma$ -Behandlung stark eingeschränkt

Die Wirkung des pM27-Verlustes auf die Replikationsfähigkeit in Anwesenheit von IFN- $\gamma$  zeigte sich auch in Infektionsexperimenten, bei denen die Virusreplikation per Nachweis viraler Proteine mittels Westernblot untersucht wurde (Abb. 16). In diesem Versuch wurden Zellen, die entweder für zwei Tage mit 500 U/ml IFN- $\gamma$  vorbehandelt oder unbehandelt verblieben waren, vergleichend mit wt-MCMV bzw.  $\Delta$ M27-MCMV infiziert. Zu den angegebenen Zeiten wurden sowohl Zellüberstände gesammelt, um das enthaltene Überstandsvirus per Plaque-Titration bestimmen zu können, als auch Westernblot-Lysate aus den entsprechenden Zellen hergestellt, in denen Phosphorylierung und Menge von STAT1, STAT2 und dem viralen Protein pp89-IE1 bestimmt wurde. pp89-IE1 konnte initial auf Grund der niedrigen Zahl der infizierten Zellen nicht nachgewiesen werden und wurde erst detektiert (48 hpi), wenn der erste Replikationszyklus abgelaufen war (Abb. 16, markiert durch die blauen Punkte). Bei einer initialen Infektionsdosis

## Ergebnisse

von 0,05 pfu/Zelle benötigt MCMV 48 h, um die Mehrheit der Zellen zu infizieren. Im Falle des wt-MCMV, aber nicht im Falle des  $\Delta$ M27-MCMV, geht diese Infektion mit einem Verlust des STAT2-Proteins einher, der damit also auch im Verlaufe einer fortschreitenden Infektion zu beobachten ist (Abb. 16, markiert durch die roten Punkte). Zusätzlich zeigte sich, gemessen an dem Überstandstitern und der Zunahme des viralen Proteins pp89-IE1, dass  $\Delta$ M27-MCMV in unbehandelten Zellen dem wt-Virus vergleichbar wächst, nach einer IFN- $\gamma$ -Vorbehandlung allerdings (wie erwartet) nachhaltig in seiner Replikationsfähigkeit beeinträchtigt ist (Abb. 16).

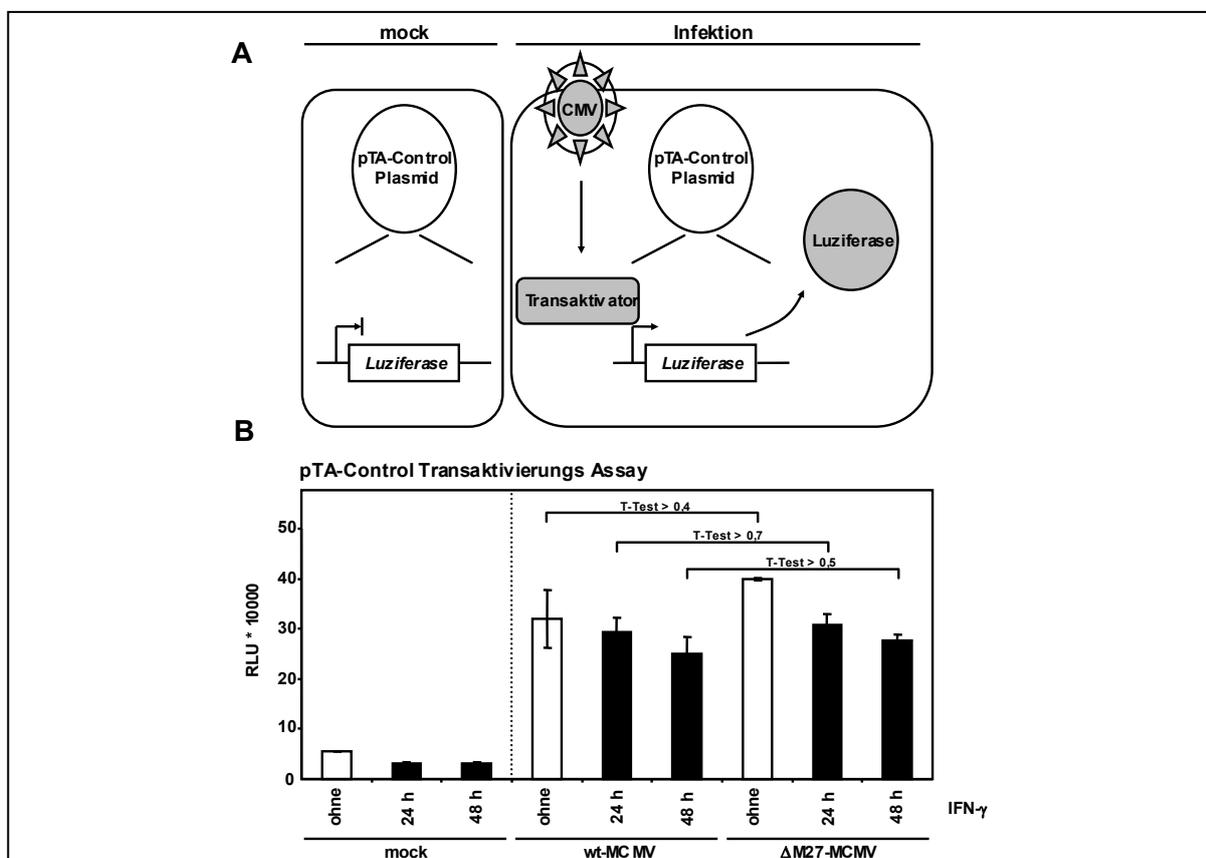


### 2.2.4 IFN entfaltet seine Wirkung gegenüber MCMV intrazellulär

Um zu untersuchen, ob der beobachtete antivirale Effekt von IFN- $\gamma$  auf die  $\Delta$ M27-Mutante vor dem *entry* in die Wirtszelle wirksam wird, wurde ein Transaktivierungsassay verwendet. In Vorversuchen wurde festgestellt, dass der minimale Promotor im pTA-Control Plasmid (Clontech) spezifisch durch Herpesvirus-Infektionen transaktiviert wird (schematisch dargestellt in Abb. 17A). Der Promotor enthält einen Sequenzbereich, der aus dem Herpesvirus

## Ergebnisse

Thymidinkinase (TK)-Promotor stammt. Dieser Teil überlappt mit einem Bereich, für den gezeigt werden konnte, dass er durch herpesvirale Proteine transaktiviert wird. In nicht-infizierten Zellen ist der Promotor nicht aktiv und wird durch IFN-Behandlung nicht transaktiviert (Abb. 17B, mock). Die Transaktivierung durch Herpesviren lässt sich durch die Inkubation mit neutralisierenden Antikörpern aufheben und ist somit vom *attachment* und *entry* des Virus abhängig. Eine Transaktivierung erfolgt ebenfalls nicht durch UV-inaktivierte Herpesviren (Daten nicht gezeigt – Publikation in Vorbereitung). Die Aktivierung des Promotors führt zu einem Anstieg der Luziferaseexpression, so dass die Luziferase ein indirektes Maß für die Transaktivierung und damit für das erfolgreiche *Virusentry* darstellt.



**Abb. 17: M27 ist für *attachment* und *entry* von MCMV (auch nach IFN- $\gamma$ -Behandlung) nicht essentiell.**

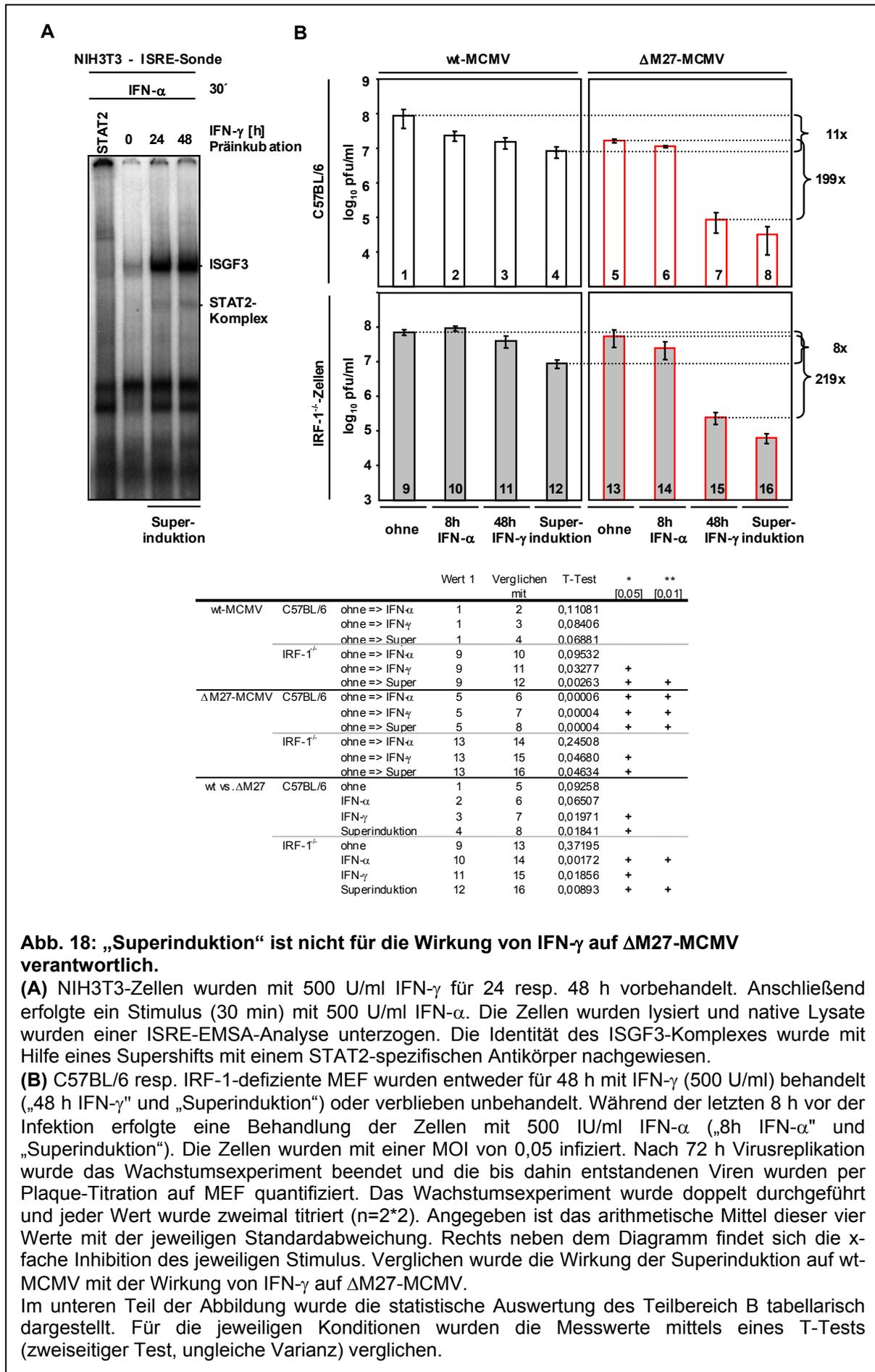
(A) Schematische Darstellung des Transaktivierungs-Assays. Durch die Herpesvirus-Infektion wird ein Transaktivator exprimiert, der in der Lage ist, den (sonst inaktiven) Promotor zu aktivieren und so die Expression von Luziferase zu induzieren.

(B) Permissive NIH3T3-Fibroblasten wurden transient mit 2,5  $\mu$ g pro  $5 \cdot 10^5$  Zellen pTA-Control Vektor (Clontech) transfiziert (Lipofectamin 2000 CD). Die Zellen aus einer Transfektion wurden aufgeteilt und je nach Ansatz für 24 h oder 48 h mit 500 U/ml IFN- $\gamma$  behandelt. Anschließend erfolgte die Infektion mit MCMV (wt-MCMV resp.  $\Delta$ M27-MCMV; MOI 5 für 24h). Die Zellen wurden lysiert und die induzierte Luziferasemenge quantifiziert (siehe Material und Methoden). Als Kriterium für statistische (In-)Signifikanz wurde ein zweiseitiger T-Test (zwei Stichproben mit ungleicher Varianz) durchgeführt.

Mit Hilfe dieses neuen Experimentalsystems konnte gezeigt werden, dass die Wirkung von IFN- $\gamma$  bezüglich der viralen Transaktivierung des Promotors gegenüber  $\Delta$ M27-MCMV genauso groß war wie gegenüber wt-MCMV. Es kam also nicht zu einer Inhibition des viralen *attachment* oder *entry*. Die außerordentlich starke Wirkung von IFN- $\gamma$  gegenüber der  $\Delta$ M27-MCMV-Replikation findet also intrazellulär nach der Transaktivierung statt (Abb. 17B, vgl. wt-MCMV mit  $\Delta$ M27-MCMV). Dieses Ergebnis korreliert mit Befunden, die zeigen, dass IFN- $\gamma$  gegenüber dem wt-MCMV auf die späte Phase der Replikation nach *attachment*, *entry* und früher Genexpression wirkt (Lucin et al., 1994).

### **2.2.5 Die IFN-Superinduktion erklärt die IFN- $\gamma$ -Sensitivität von $\Delta$ M27-MCMV nicht**

MCMV induziert Typ I IFN-Expression in infizierten Zellen (Le et al., 2008b). Durch pM27 wird die STAT2-Menge gesenkt und die IFN- $\alpha$ -Signaltransduktion blockiert. Dieser Effekt ist in der  $\Delta$ M27-MCMV-Mutante nicht vorhanden und Typ I IFN kann seine Wirkung entfalten. Nach einer langfristigen IFN- $\gamma$ -Behandlung führt ein kurzer Stimulus mit Typ I IFN zu einer massiven Induktion von ISGF3-Komplexen (Fu et al., 1990; Levy et al., 1990), die eine  $\sim$ 10-fach höhere Signalstärke erreicht als Typ I IFN alleine. Diese sog. Superinduktion beruht auf der IFN- $\gamma$ -vermittelten Expressionssteigerung der Komponenten der Typ I IFN-Signalkaskade wie STAT1 und STAT2 ((Levy et al., 1990) und Abb. 14) und konnte auch in den hier untersuchten murinen Zellen beobachtet werden (Abb. 18A). Um zu untersuchen, ob eine solche Superinduktion für die starke Wirkung von IFN- $\gamma$  auf  $\Delta$ M27-MCMV verantwortlich ist, wurde ein Superinduktions-Stimulus (Virus-unabhängig und damit pM27-unveränderlich) auf das wt-Virus ausgeübt. Die Zellen wurden für 48 h mit IFN- $\gamma$  und 8 h mit IFN- $\alpha$  inkubiert und anschließend mit wt-MCMV infiziert, so dass die Superinduktion nicht durch die Virus-vermittelte IFN-Sekretion ausgelöst wurde, sondern durch exogenes IFN- $\alpha$ . MCMV-kodierte Proteine konnten in diesem Experiment die Expression von ISGs durch die Superinduktion nicht verändern, da die Expression zeitlich versetzt vor der Infektion erfolgte. Die Dosis exogenen IFNs überschritt die Menge an endogen produziertem um mindestens das 50-fache. Das Experiment wurde parallel auf wt-Zellen und IRF-1-defizienten Zellen, die einen großen Teil der GAF-abhängigen Gene nicht induzieren können, durchgeführt. In beiden Zelltypen zeigte sich, dass die Superinduktion nicht in der Lage war, wt-MCMV genauso erfolgreich an der Replikation zu hindern wie IFN- $\gamma$  allein  $\Delta$ M27-MCMV (Abb. 18B).



**Abb. 18: „Superinduktion“ ist nicht für die Wirkung von IFN- $\gamma$  auf  $\Delta$ M27-MCMV verantwortlich.**

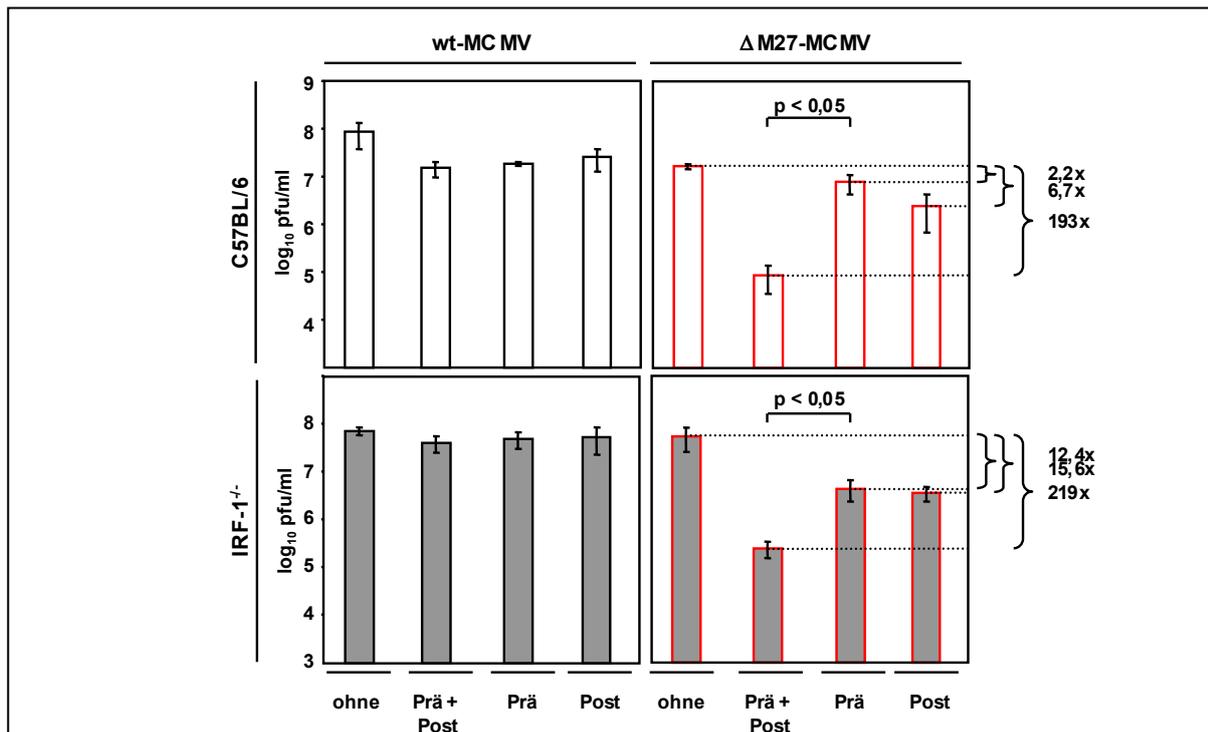
(A) NIH3T3-Zellen wurden mit 500 U/ml IFN- $\gamma$  für 24 resp. 48 h vorbehandelt. Anschließend erfolgte ein Stimulus (30 min) mit 500 U/ml IFN- $\alpha$ . Die Zellen wurden lysiert und native Lysate wurden einer ISRE-EMSA-Analyse unterzogen. Die Identität des ISGF3-Komplexes wurde mit Hilfe eines Supershifts mit einem STAT2-spezifischen Antikörper nachgewiesen.

(B) C57BL/6 resp. IRF-1-defiziente MEF wurden entweder für 48 h mit IFN- $\gamma$  (500 U/ml) behandelt („48 h IFN- $\gamma$ “ und „Superinduktion“) oder verblieben unbehandelt. Während der letzten 8 h vor der Infektion erfolgte eine Behandlung der Zellen mit 500 IU/ml IFN- $\alpha$  („8h IFN- $\alpha$ “ und „Superinduktion“). Die Zellen wurden mit einer MOI von 0,05 infiziert. Nach 72 h Virusreplikation wurde das Wachstumsexperiment beendet und die bis dahin entstandenen Viren wurden per Plaque-Titration auf MEF quantifiziert. Das Wachstumsexperiment wurde doppelt durchgeführt und jeder Wert wurde zweimal titriert (n=2\*2). Angegeben ist das arithmetische Mittel dieser vier Werte mit der jeweiligen Standardabweichung. Rechts neben dem Diagramm findet sich die x-fache Inhibition des jeweiligen Stimulus. Verglichen wurde die Wirkung der Superinduktion auf wt-MCMV mit der Wirkung von IFN- $\gamma$  auf  $\Delta$ M27-MCMV.

Im unteren Teil der Abbildung wurde die statistische Auswertung des Teilbereich B tabellarisch dargestellt. Für die jeweiligen Konditionen wurden die Messwerte mittels eines T-Tests (zweiseitiger Test, ungleiche Varianz) verglichen.

## Ergebnisse

Da ein Superinduktions-Stimulus nicht in der Lage ist, wt-MCMV an der Replikation zu hindern, muss geschlussfolgert werden, dass die Superinduktion durch Virus-induziertes Typ I IFN auch nicht ausreicht, um MCMV an der Replikation zu hindern, und somit nicht der hinreichende kausale Grund für die IFN- $\gamma$ -Sensitivität von  $\Delta$ M27-MCMV sein kann. Diese Ergebnisse sind mit den Daten der Virusreplikation in IFNAR1-defizienten Zellen, die keine Superinduktion erzielen können, konsistent. Sie zeigen, dass IFN- $\gamma$  einen STAT2-abhängigen Effekt (wt-MCMV und  $\Delta$ M27-MCMV unterscheiden sich) in Abwesenheit von Typ I IFN-Signaltransduktion ausübt (Abb. 13C). Um zu klären, wann die antiviralen Proteine durch IFN- $\gamma$  induziert werden, wurde untersucht, ob die IFN- $\gamma$ -Präinkubation allein ausreicht, oder ob eine anhaltende IFN-Stimulation für die Wirkung gegenüber  $\Delta$ M27-MCMV notwendig ist. Es zeigte sich, dass sowohl Vorbehandlung als auch anhaltende Inkubation nach der Infektion zusammen für den antiviralen Effekt von IFN- $\gamma$  gegenüber  $\Delta$ M27-MCMV notwendig sind. Das Wegwaschen von IFN- $\gamma$  kurz vor Infektion reduzierte die Wirkung ca. 100-fach (Abb. 19).



**Abb. 19: Die Wirkung von IFN- $\gamma$  gegenüber  $\Delta$ M27-MCMV wird durch eine Kombination von IFN- $\gamma$  Vorbehandlung und anhaltender Inkubation erreicht.**

Die Daten bilden zusammen mit den Daten aus Abb. 18 ein gemeinsames Experiment. C57BL/6 resp. IRF-1-defiziente Zellen wurden mit  $\Delta$ M27-MCMV resp. wt-MCMV infiziert (MOI 0,05). Nach 72 h wurden die entstandenen Viren bestimmt. Verglichen wurden unbehandelte Zellen („ohne“), Zellen, die 48h mit 500 U/ml IFN- $\gamma$  vorbehandelt wurden und vor der Infektion nachhaltig gewaschen wurden, um das IFN- $\gamma$  wegzuwaschen („Prä“), Zellen bei denen synchron zur Infektion 500 U/ml IFN- $\gamma$  gegeben wurden („Post“) und Zellen, die 48 h vorbehandelt wurden und nach der Infektion auch weiter mit IFN inkubiert wurden („Prä + Post“). Rechts neben der Grafik wurde die x-fache Wirkung der Behandlung aufgetragen. Die Statistische Signifikanz des Befundes wurde mit Hilfe eines T-Test (zweiseitig, ungleiche Varianz) geprüft.

Da pM27 STAT2 selbstverständlich erst nach der MCMV-Infektion beeinflussen kann, ist dieser Befund gut mit dem molekularen Ziel STAT2 vereinbar: Das antivirale Prinzip, das MCMV mittels pM27 unterdrückt, erfordert ein anhaltendes, STAT2-abhängiges IFN- $\gamma$ -Signal. pM27 unterdrückt dieses Signal durch die Reduktion von STAT2 und schafft somit eine Replikationsoption für MCMV. Ohne die Voramplifikation durch Präinkubation war die Wirkung von IFN- $\gamma$  jedoch auch ca. 50-fach reduziert (Abb. 19), so dass pM27 anscheinend eine besondere Bedeutung bei sekundären und tertiären Infektionen („Horizontale Transmission“ im Gewebe) von ehemaligen *bystander*-Zellen zukommt, die durch die Anwesenheit von IFN bereits konditioniert sind.

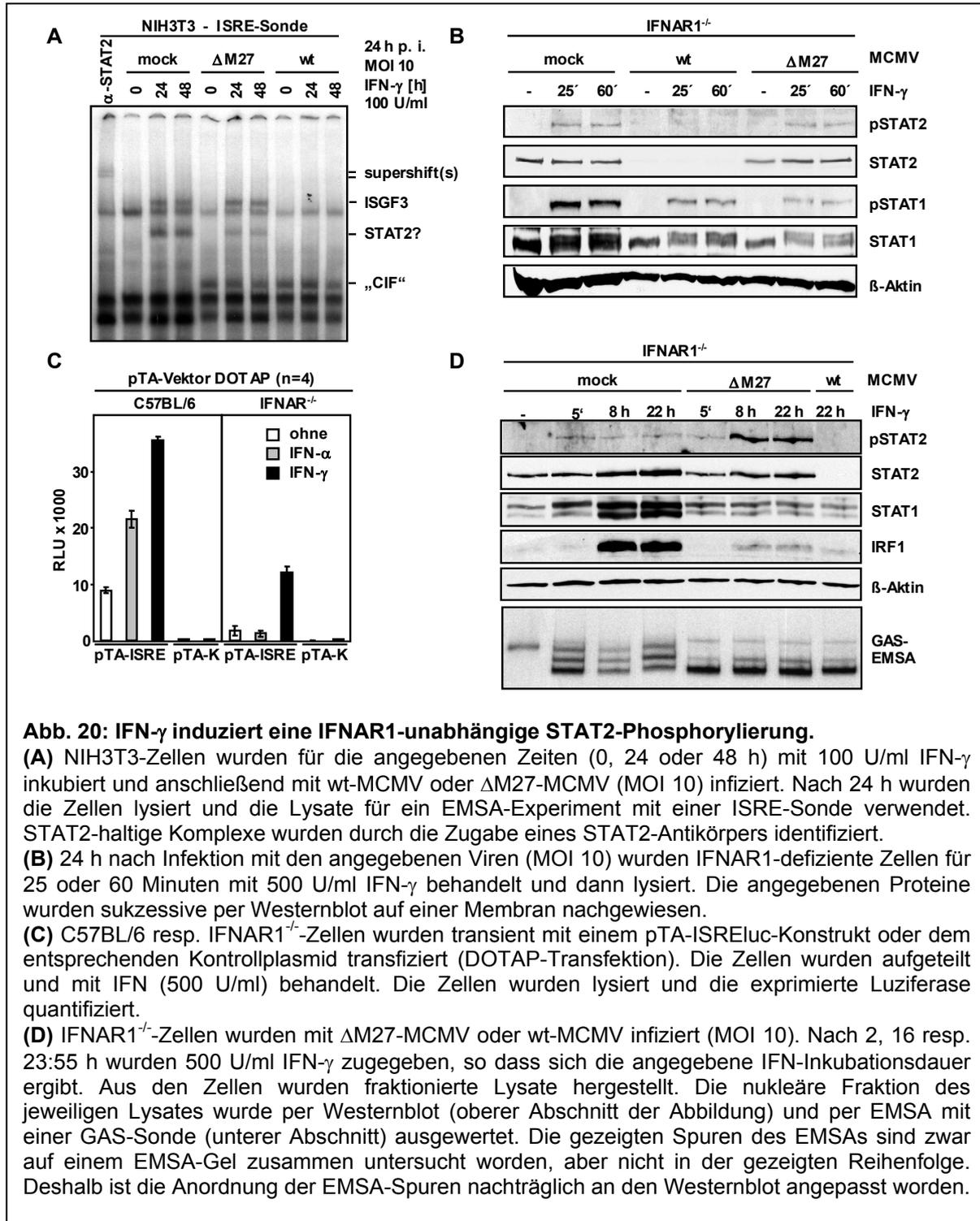
Diese Ergebnisse zeigen, dass die Wirkung von IFN- $\gamma$  auf  $\Delta$ M27-MCMV vollständig STAT2-abhängig (Abb. 13B und Abb. 15), teilweise IFNAR1-unabhängig (Abb. 13C) und komplett IRF-1-unabhängig (Abb. 13D) ist. Sie erfordert sowohl IFN- $\gamma$ -Präinkubation als auch anhaltende Anwesenheit von IFN- $\gamma$  (Abb. 19) und wirkt nach dem Eintritt des Virus in die Zelle, höchstwahrscheinlich auf Ebene der *late*-Gen Expression (Abb. 17).

### 2.3 TYP II IFN INDUZIERT DIE AKTIVIERUNG VON STAT2

Die Ergebnisse der Wachstumskurven legten den Schluss nahe, dass STAT2 in Folge einer IFN- $\gamma$  Zugabe phosphoryliert und damit aktiviert werden kann: Eine Aktivierung, die nicht der aktuellen Lehrbuchmeinung entspricht, nach der STAT2 nur durch Typ 1 (und Typ III) IFN phosphoryliert und aktiviert wird. Transkriptionell aktive STAT-Moleküle bilden antiparallele Dimere. Die Dimerisierung wird durch eine intramolekulare Interaktion zwischen der SH2-Domäne eines STAT-Moleküls mit einem Phospho-Tyrosin eines anderen STAT-Moleküls induziert, so dass zwei phosphorylierte STAT-Moleküle sich gegenseitig über Phospho-Tyrosin-SH2-Interaktionen binden. Die Phosphorylierung an diesem spezifischen Tyrosin wird somit als Indikator für die Aktivierung angesehen. Die Dimerisierung führt zu einer Kerntranslokation und zur DNA-Bindung. Es wurde deshalb per EMSA-Analyse untersucht, ob Zellen nach IFN- $\gamma$ -Behandlung STAT2-haltige, DNA-bindende Komplexe bilden.

Bei den folgenden zwei Abbildungen (Abb. 20, 21) handelt es sich um Daten, die als eigene Vorarbeiten während der Diplomarbeit erhoben wurden und bereits Teil dieser Diplomarbeit sind. Sie werden zum Verständnis hier gezeigt, da sie für die Interpretation und die Modellbildung im Folgenden unerlässlich sind.

Wie in Abbildung 20A gezeigt ist, führt die IFN- $\gamma$ -Behandlung zur DNA-Bindung von STAT2-haltigen Komplexen. Die Beteiligung von STAT2 wurde sowohl durch einen *supershift* mit einem STAT2-spezifischen Antikörper als auch durch den pM27-abhängigen Verlust nachgewiesen. Interessanterweise kommt neben dem klassischen ISGF3-Komplex noch ein zweiter kleinerer STAT2-haltiger Komplex vor.



Eine mögliche Ursache für diese zweite Bande wären STAT2-haltige Komplexe neben ISGF3, bei denen STAT2 Interaktionen mit anderen STAT-Molekülen eingeht (Farrar et al., 2000a; Farrar et al., 2000b; Gupta et al., 1999). Eine zweite *splice*-Isoform von STAT2 (Sugiyama et al., 1996) wäre eine weitere Möglichkeit. Allerdings wurden beide Möglichkeiten bis jetzt nicht im Zusammenhang von IFN- $\gamma$ -induzierter STAT2-Aktivierung diskutiert und könnten durchaus weitere Betätigungsfelder für die Aufklärung IFN- $\gamma$ - und STAT2-abhängiger antiviraler Signaltransduktion darstellen.

Zu diesem Zeitpunkt konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass IFN- $\gamma$  zu einer veränderten Expression oder Sekretion von Typ I IFN führt (Marziali et al., 1991), welches dann über den klassischen IFNAR-vermittelten Signalweg STAT2 aktiviert. Um diese Möglichkeit für die weiteren Experimente ausschließen zu können, wurden IFNAR1-defiziente Zellen verwendet, die wegen des Verlustes der essentiellen IFN-Rezeptorkette IFNAR1 nicht auf Typ I IFN reagieren können. In  $\Delta$ M27-MCMV infizierten IFNAR1<sup>-/-</sup>-Zellen führte IFN- $\gamma$  ebenfalls zu einer Induktion von STAT2-Phosphorylierung, in wt-MCMV infizierten Zellen jedoch nicht, da das STAT2-Protein nicht mehr vorhanden ist (Abb. 20B). Die Aktivierung erfolgte bereits nach 25 min, so dass eine substantielle Sekretion löslicher Zytokine unwahrscheinlich erscheint. Um zu beweisen, dass diese STAT2-Aktivierung zu einer Induktion von ISRE-Promotoraktivierung führt, wurden IFNAR1-defiziente Zellen und als Kontrolle wt-Zellen mit einem ISRE-Luziferase-Reporterkonstrukt transfiziert und die IFN- $\gamma$ -induzierte Geninduktion gemessen. Es zeigte sich, dass IFN- $\gamma$  ISRE-Promotoren IFNAR1 unabhängig aktivieren kann, IFN- $\alpha$  jedoch nicht (Abb. 20C). Da die Typ II IFN-abhängige STAT2-Aktivierung jedoch im Verhältnis zur Typ I IFN-abhängigen Aktivierung deutlich schwächer ausfällt, stellte sich die Frage, warum  $\Delta$ M27-MCMV stärker unter dem Einfluss von IFN- $\gamma$  als unter IFN- $\alpha$  leidet. Deshalb wurde die STAT2-Aktivierung nach längerer IFN- $\gamma$ -Behandlung während einer MCMV-Infektion untersucht. Es zeigte sich, dass die STAT2-Phosphorylierung in infizierten Zellen über die Dauer der Behandlung akkumuliert, in uninfizierten Zellen jedoch nicht (Abb. 20D). Es wurden demnach signifikante Mengen an STAT2-Aktivierung in MCMV-infizierten Zellen erreicht. Ob die Akkumulation der STAT2-Phosphorylierung (während der MCMV-Infektion) auf reduzierter Dephosphorylierung oder gesteigerter Phosphorylierung beruht, konnte bisher noch nicht geklärt werden.

## Ergebnisse

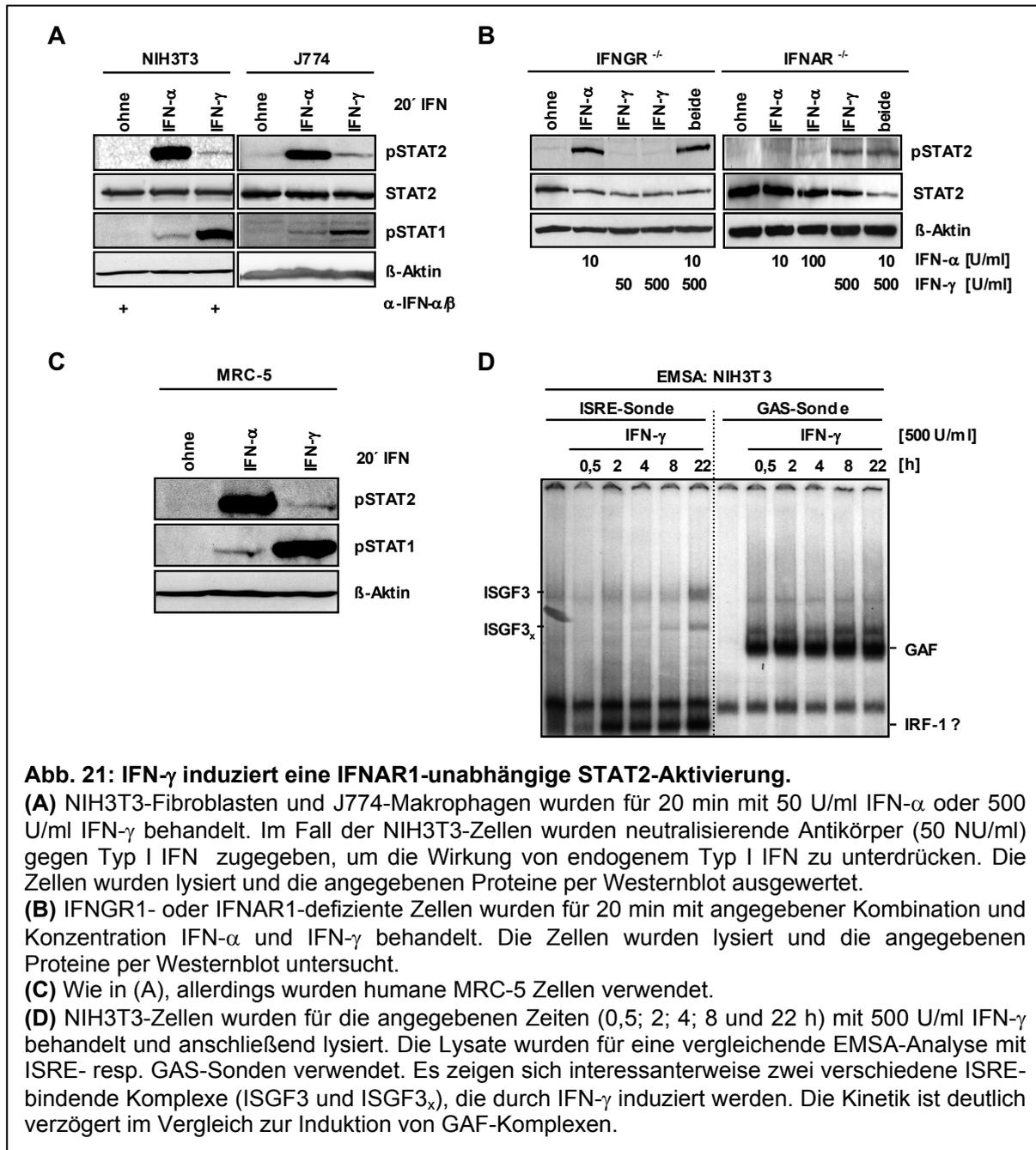
Die Befunde in Abbildung 20D weisen erneut auf die Existenz eines zweiten MCMV-kodierten IFN-Antagonisten hin: MCMV unterbricht die GAS-Genexpression unabhängig von pM27. Obwohl Phosphorylierung und DNA-Bindung von STAT1-Molekülen unverändert waren (Abb. 2A, 2B), kam es zu einer Blockade der Induktion von IFN-induzierten Genen wie STAT1 oder IRF-1 (Abb. 20D). Interessanterweise scheint sich nach der MCMV-Infektion M27-unabhängig das Bandenmuster der IFN- $\gamma$ -induzierten, GAS-Sequenz-bindenden Komplexe zu ändern (Abb. 20D).

Die hier beschriebene STAT2-Phosphorylierung durch IFN- $\gamma$  kam in verschiedenen Zelltypen (Fibroblasten und Makrophagen) vor (Abb. 21A). Die Aktivierung war IFNAR1-unabhängig (Abb. 20B, 20C, 20D und 21B), aber wie erwartet IFN- $\gamma$  und IFNGR1-abhängig (Abb. 21B).

Außerdem war die STAT2-Aktivierung durch IFN- $\gamma$  auch in humanen MRC-5-Zellen nachweisbar (Abb. 21C).

Abbildung 21B zeigt, dass die IFNAR1-defizienten Zellen nicht auf Typ I IFN und die verwendeten IFNGR1-defizienten Zellen nicht auf IFN- $\gamma$  reagieren.

Es bleibt jedoch zu erwähnen, dass die Stärke der STAT2-Aktivierung durch IFN- $\gamma$  weit hinter der Aktivierung durch IFN- $\alpha$  zurücklieb (Abb. 21A und 21B). Außerdem unterscheidet sich die Kinetik der unterschiedlichen IFN- $\gamma$ -induzierten Komplexe. Während GAS-bindende GAF-Komplexe nahezu sofort nach IFN- $\gamma$ -Behandlung nachweisbar sind (Abb. 21D), erfolgt die IFN- $\gamma$ -abhängige Induktion von ISRE-bindenden ISGF3-Komplexen deutlich verzögert und akkumuliert über die Zeit der Inkubation (Abb. 21D). Da neben ISGF3 weitere STAT2-haltige Komplexe nach einer langen IFN- $\gamma$ -Behandlung induziert wurden (Abb. 20A und 21D), die nach IFN- $\alpha$ -Behandlung nicht vorhanden waren, stellt sich weiterhin die Frage, ob IFN- $\gamma$  in der Lage ist, STAT2-haltige Komplexe zu induzieren, die sich qualitativ von den Typ I IFN-induzierten Komplexen unterscheiden und einen Teil der antiviralen Antwort gegenüber MCMV induzieren.



Interessanterweise wurde eine Klasse von ISGs beschrieben, die über GAS-Elemente in ihrem Promotor verfügen und damit wahrscheinlich IFN- $\gamma$ -responsiv sind. Sie werden STAT2-abhängig, aber ISGF3-unabhängig exprimiert (Brierley et al., 2006). Außerdem wurde kürzlich eine Genfamilie definiert, die IFN- $\gamma$ -abhängig induziert wird und deren Expression IKK $\beta$ -abhängig ist. Diese Gene weisen interessanterweise in ihren Promotoren sowohl  $\kappa$ B als auch ISRE-Motive auf, also potentielle STAT2/IRF-9-Bindestellen (Shultz et al., 2007). Beide Befunde scheinen die Existenz STAT2- und IFN- $\gamma$ -abhängiger Genfamilien zu implizieren. Dies

ist mit den oben gezeigten Befunden konsistent und macht die angesprochene Genfamilie zu interessanten Kandidaten ISGs für die antivirale Wirkung von IFN- $\gamma$  gegenüber  $\Delta$ M27-MCMV.

### **2.4 MECHANISMUS DER pM27-ABHÄNGIGEN STAT2-REDUKTION**

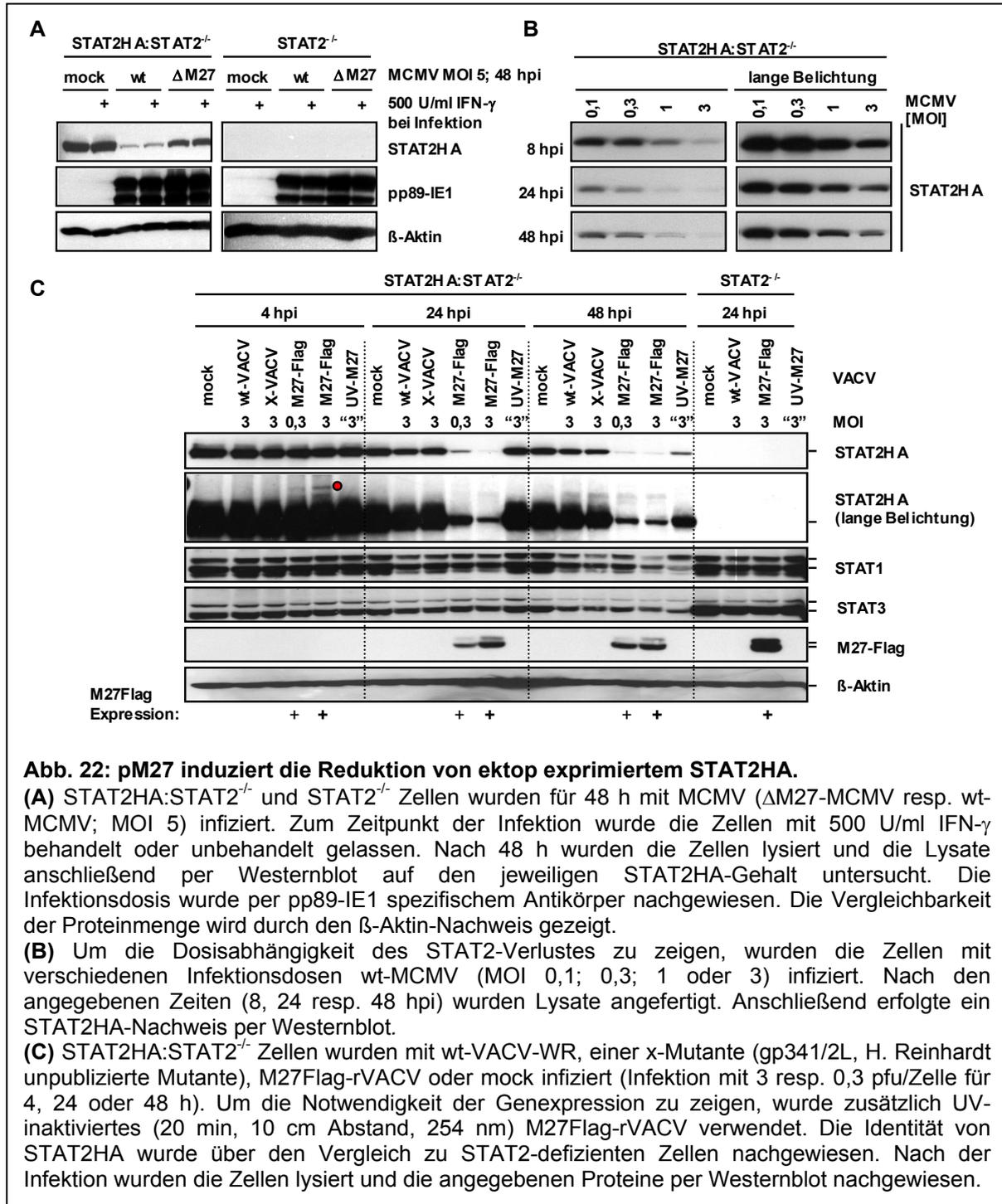
Die molekularen Befunde zur pM27-abhängigen Reduktion von STAT2 und die biologische Bedeutung dieser Reduktion warfen die Frage auf, welchen Mechanismus pM27 nutzt, um die STAT2-Menge zu beeinflussen.

#### **2.4.1 pM27 reduziert die STAT2-Menge unabhängig vom intrinsischen STAT2-Promotor**

Wie in Abbildung 22 gezeigt ist, reduzierte wt-MCMV die STAT2HA-Menge in den STAT2HA:STAT2<sup>-/-</sup> Zellen,  $\Delta$ M27-MCMV aber nicht, obwohl die Zellen (gemessen an der pp89-IE1-Expression) von beiden Viren gleich stark infiziert worden waren. Der STAT2-Verlust hing sowohl von der Infektionsdosis und der Infektionsdauer ab (Abb. 22B). Da der Promotor, der die STAT2-Expression in dieser Zelllinie kontrolliert, nicht auf IFN- $\gamma$  reagiert, induzierte IFN- $\gamma$  auch keinen Anstieg der STAT2-Menge (Abb. 22A), der in anderen Zellen beobachtet wird (Abb. 14). pM27 reduzierte die STAT2HA-Menge also unabhängig von dem intrinsischen STAT2-Promotor, ein Befund, der auf einen Transkriptions-unabhängigen Effekt hindeutete. Da in der Transfektante eine STAT2-cDNA exprimiert wurde, die keine 3' untranslatierten Bereiche (3'UTR) enthält, ist die Beteiligung von viralen oder zellulären miRNAs, die auf diese 3'UTRs abzielen, höchst unwahrscheinlich.

Um die hinreichende Wirkung von pM27 für diesen Promotor-unabhängigen STAT2-Verlust zu demonstrieren, wurde untersucht, ob pM27 nach VACV-Expression in der Lage ist, STAT2HA (exprimiert von einem starken konstitutiven Promotor) zu reduzieren. Wie in Abbildung 22C gezeigt ist, reduzierte nur die Infektion mit M27Flag-rVACV die zelluläre STAT2-Menge. Der STAT2-Verlust wurde nicht in mock-infizierten, wt-VACV-infizierten oder Zellen, die mit einer unabhängigen VACV-Mutante („x-Virus“) infiziert worden waren, beobachtet. Die STAT2-Reduktion war zumindest initial von der M27Flag-rVACV-Infektionsdosis abhängig. Später verwischten diese Unterschiede, da VACV durch seine Replikation letztendlich alle Zellen infizierte. Endogenes STAT1 und STAT3 wurden nicht von pM27 beeinflusst. Es kam jedoch nach 48 h zu einer geringfügigen M27-unabhängigen Reduktion der STAT1- und STAT3-Menge durch alle VACV-Infektionen, die wahrscheinlich auf den *host-shut-off* von VACV zurückzuführen ist. Interessanterweise zeigten sich über der STAT2-Bande nach einer kurzen Infektion mit M27Flag-rVACV noch zusätzliche (möglicherweise modifizierte) STAT2-Formen (in Abb. 22C durch einen roten Punkt markiert), die aber später verschwanden und somit wahrscheinlich eine sehr kurze Halbwertszeit aufweisen.

Außerdem zeigte sich in diesem Experiment über der eigentlichen 79kDa-Bande von pM27Flag eine weitere, anscheinend modifizierte Bande, die etwas (ca. 5-10 kDa) größer zu sein schien (Abb. 22C).



### 2.4.2 pM27 reduziert die STAT2-Halbwertszeit

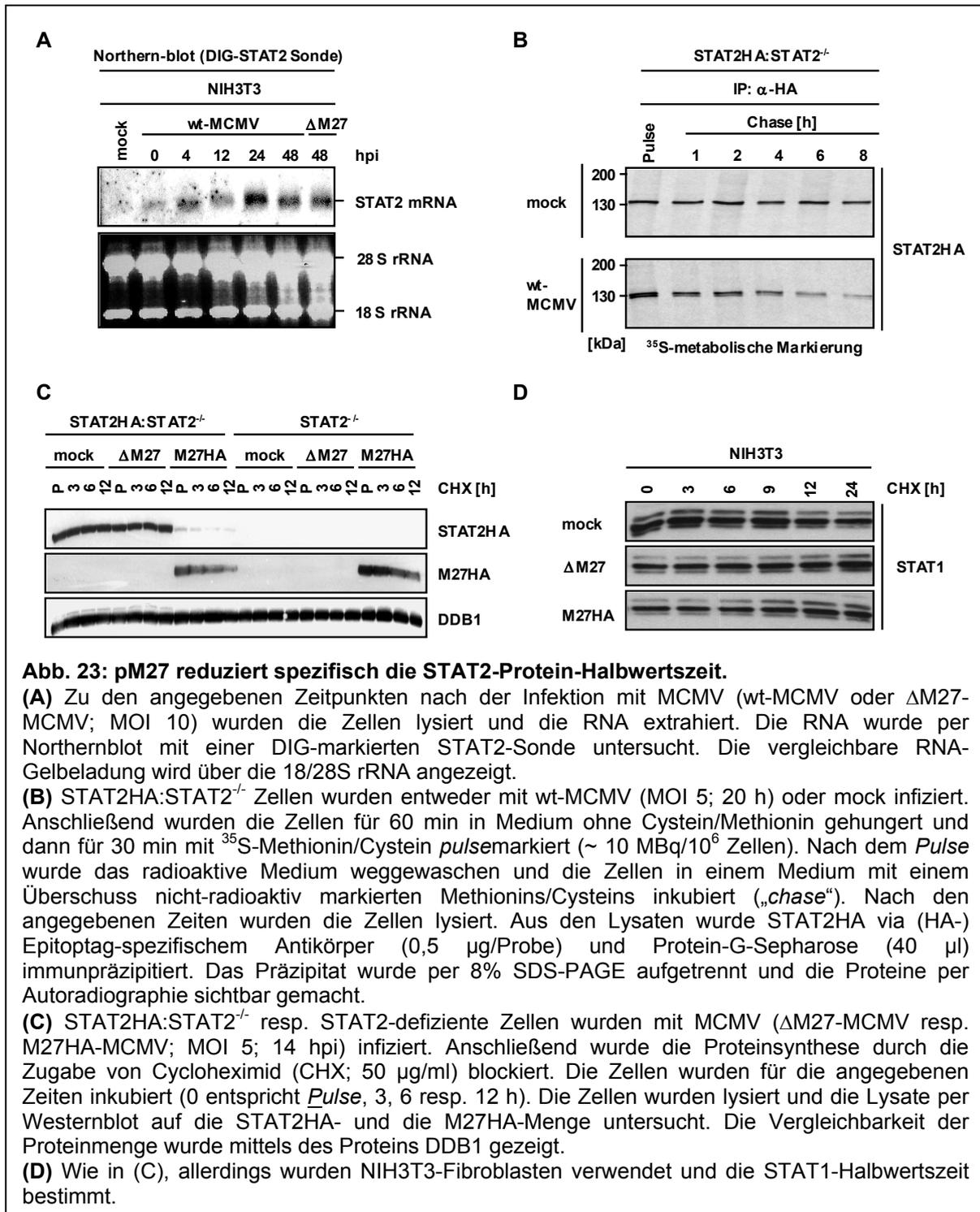
Aufgrund der Befunde mit der STAT2HA:STAT2<sup>-/-</sup>-Zelllinie konnte eine Wirkung von pM27 auf den STAT2-Promotor vernachlässigt werden. Um zu untersuchen, ob der Effekt auf die

## Ergebnisse

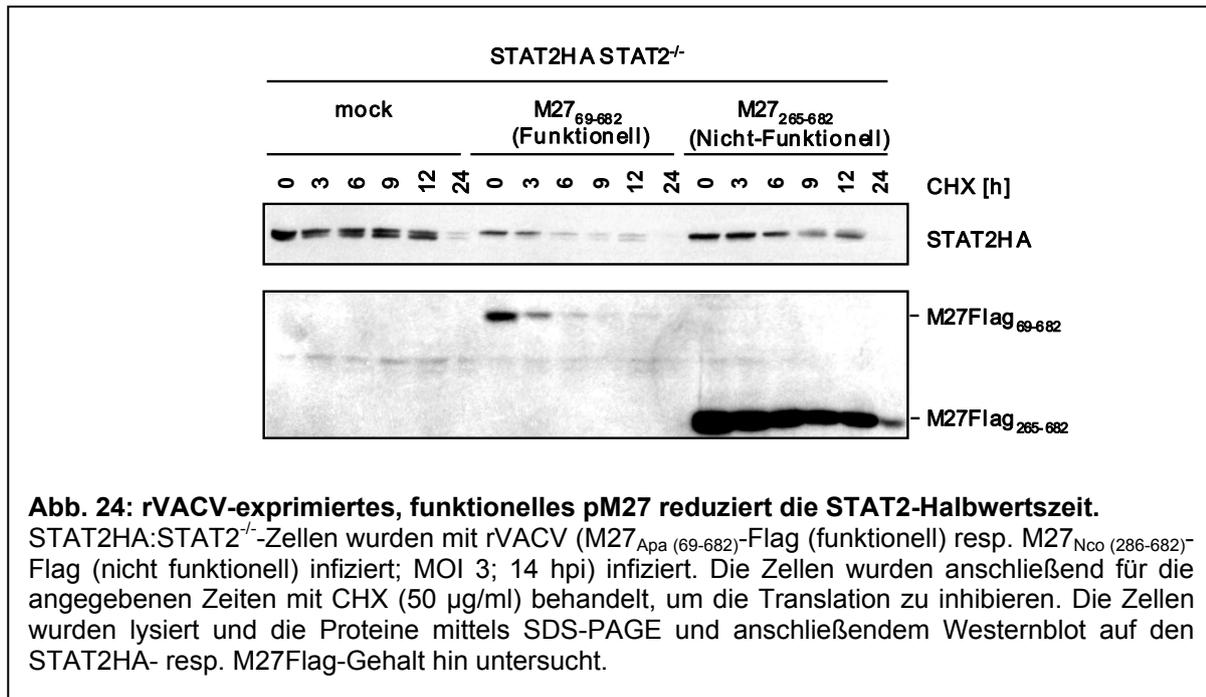
STAT2-mRNA oder auf das STAT2-Protein ausgeübt wird, wurden die STAT2-Transkripte nach einer MCMV-Infektion untersucht. Es zeigte sich, dass die STAT2-Transkripte nach MCMV-Infektion nicht reduziert wurden (Abb. 23A), während die Proteinmenge abnimmt (siehe obere Abb.). pM27 wirkt daher posttranskriptionell. Da die Menge an STAT2-mRNA nicht abnimmt, konnten erneut Effekte auf den Promotor und die mRNA-Stabilität ausgeschlossen werden. Deshalb muss entweder die Translation der mRNA oder die Proteinstabilität von STAT2 durch pM27 beeinträchtigt werden. Allerdings beträgt die intrinsische Proteinhalbwertszeit über 24 h (Lee et al., 1997), so dass eine Blockade der Transkription oder der Translation den beobachteten Phänotyp nicht hinreichend erklären könnte, da STAT2 schon 4 hpi signifikant reduziert war (Abb. 3). Deshalb wurde die Möglichkeit geprüft, ob pM27 die Halbwertszeit des STAT2-Proteins reduziert. Dafür wurden die Zellen für kurze Zeit mit <sup>35</sup>S-Isotop-markiertem Methionin und Cystein inkubiert, um eine sehr kurze Phase der metabolischen Isotopen-Inkorporation in die *de novo* synthetisierten Proteine zu gewährleisten („*pulse labeling*“). Danach wurden Zellen für die angegebenen Zeiten in einem Medium, das einen Überschuss an nicht-radioaktiv markiertem Methionin und Cystein enthält, inkubiert („*chase*“). Durch dieses Verfahren lässt sich die Stabilität der (während des Pulses markierten) Proteine ermitteln. STAT2HA wurde mittels eines HA-spezifischen Antikörpers in einer Immunpräzipitation (IP) nachgewiesen. Es zeigte sich, dass die Halbwertszeit von STAT2HA in wt-MCMV infizierten Zellen im Vergleich zu mock-infizierten Zellen reduziert ist (Abb. 23B).

Eine weitere Methode zur Bestimmung der Proteinstabilität nutzt Cycloheximid (CHX), um die *de novo* Proteinbiosynthese zu blockieren. Anschließend untersucht man das noch vorhandene Protein zu den entsprechenden Zeiten nach dem Beginn der CHX-Behandlung. Mittels dieses Verfahrens konnte gezeigt werden, dass die STAT2HA-Halbwertszeit in  $\Delta$ M27-MCMV infizierten Zellen der Halbwertszeit in uninfizierten Zellen gleicht. In Zellen, die mit einem pM27-kodierenden MCMV infiziert wurden, war die STAT2-Halbwertszeit reduziert (Abb. 23C). Allerdings war auch schon ein Teil des zellulären STAT2-Proteins bereits vor der CHX-Zugabe durch die Wirkung von pM27 nicht mehr nachweisbar.

In einem ähnlichen Experiment zeigte sich eine unveränderte Halbwertszeit für STAT1 in nicht-infizierten,  $\Delta$ M27-MCMV und wt-MCMV infizierten Zellen. pM27 reduziert also selektiv die STAT2-Halbwertszeit und senkt dadurch die vorhandene STAT2-Menge. MCMV beeinflusst die Halbwertszeit von STAT1 jedoch nicht (Abb. 23D).



Um diesen Effekt direkt zeigen zu können, wurden Zellen mit pM27Flag-exprimierenden rVACV infiziert. rVACV kodierte entweder für eine funktionelle (M27<sub>Apa</sub>) oder eine nicht-funktionelle (M27<sub>Nco</sub>) Mutante von M27 (siehe Abb. 7 und 8). Wie in Abbildung 24 zu sehen ist, reduzierte nur die funktionelle M27-Mutante die STAT2-Halbwertszeit. Auch hier war zu beobachten, dass eine signifikante STAT2-Menge bereits vor der Zugabe des CHX durch die Wirkung von pM27 abgebaut worden war.



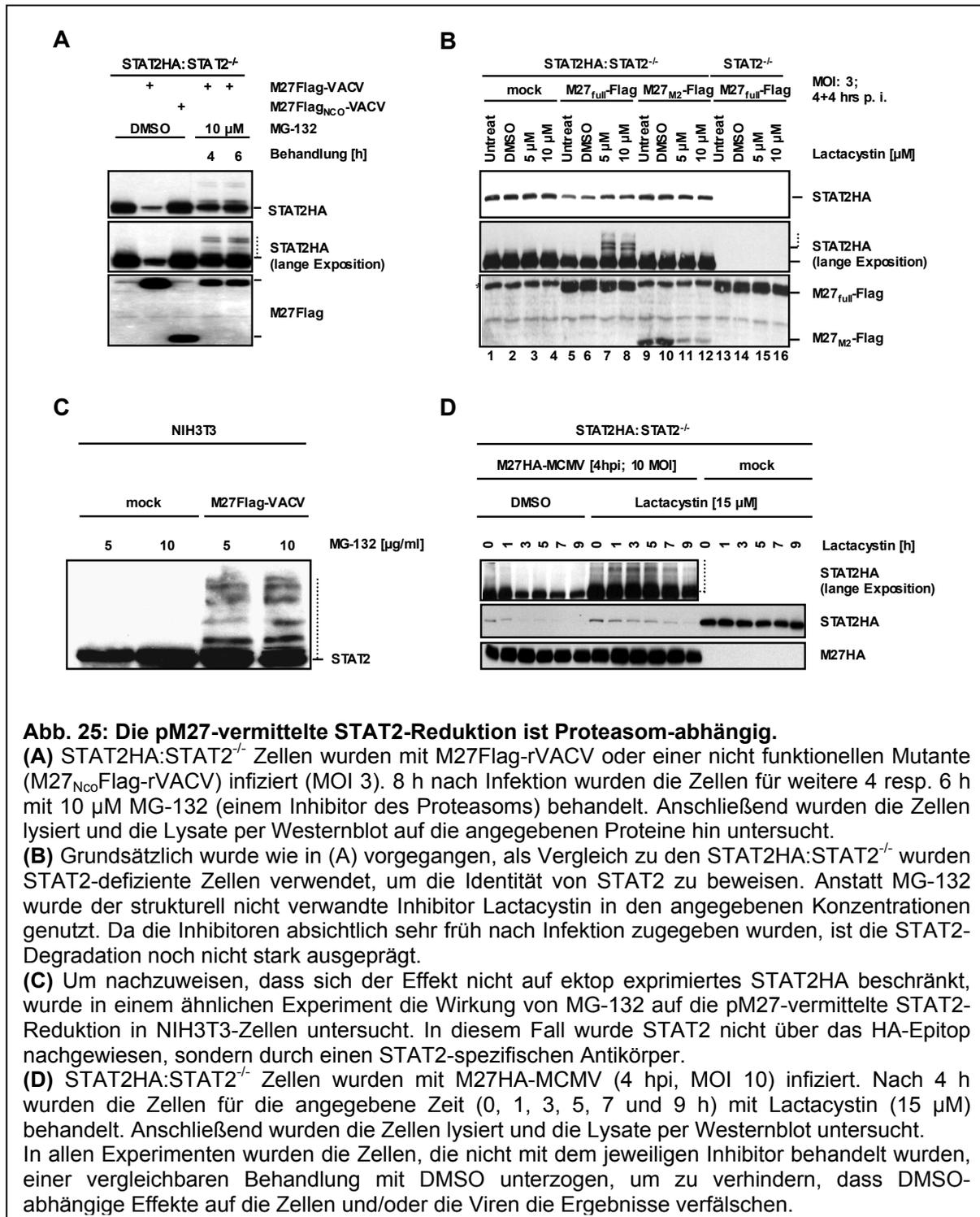
### 2.4.3 pM27 reduziert die STAT2-Halbwertszeit über das Proteasom

pM27 reduziert die STAT2-Halbwertszeit und destabilisiert STAT2-Moleküle (Abb. 23 und 24). Eine offensichtliche Fragestellung war somit die Klärung des zu Grunde liegenden Mechanismus. pM27 weist keinerlei Ähnlichkeiten zu Proteasen auf. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass pM27 STAT2 über die Rekrutierung zellulärer Proteasen degradiert. Deshalb wurde untersucht, ob pM27 STAT2 über das Proteasom abbaut. Für das Proteasom existieren spezifische Inhibitoren wie MG-132 und Lactacystin. Es wurde untersucht, ob der pM27-abhängige STAT2-Verlust durch die Inkubation mit MG-132 (teilweise) revertiert bzw. aufgehoben werden kann. Wie in Abbildung 25A zu sehen ist, wurde der pM27-abhängige STAT2-Verlust (nicht zu beobachten nach Expression einer funktionslosen pM27-Verkürzungsmutante) durch MG-132 aufgehoben, aber nicht durch das Lösungsmittel DMSO. In Anwesenheit von sowohl MG-132 als auch pM27 zeigten sich höhermolekulare Komplexe, die von dem HA-Antikörper erkannt wurden. Um diese modifizierten STAT2-Moleküle weiter untersuchen zu können, wurden erneut Zellen mit M27Flag-rVACV infiziert, allerdings wurde die Infektionszeit so weit reduziert, dass keine vollständige STAT2-Degradation erreicht wurde. In diesem Fall führte die Inkubation mit Lactacystin (aber nicht mit DMSO oder mit Medium) ebenfalls zu dieser pM27-abhängigen STAT2-Modifikation. Die Modifikation wurde nicht nach Expression einer funktionslosen pM27-Mutante erreicht und die Banden waren in STAT2-defizienten Zellen nicht zu beobachten (Abb. 25B), so dass ausgeschlossen werden kann, dass es sich um M27-unabhängige Effekte oder andere Proteine als STAT2 handelte. Die Sensitivität des

## Ergebnisse

STAT2-Abbaus gegenüber den Proteasom-Inhibitoren zeigte sich sowohl in STAT2HA-exprimierenden Zellen nach einem STAT2HA-Nachweis mittels HA-spezifischen Antikörpern (Abb. 25A, 25B und 25D) als auch für endogenes STAT2 in NIH3T3 Zellen, nachgewiesen mittels STAT2-spezifischen Antikörpern (Abb. 25C). Um auszuschließen, dass der beschriebene Effekt sich nur nach einer rVACV-vermittelten M27-Expression manifestierte, wurde ein ähnliches Experiment nach MCMV-Infektion durchgeführt. Auch hier fanden sich nach Behandlung mit dem Proteasom-Inhibitor Lactacystin sowohl die gesteigerte STAT2-Menge als auch die zusätzlichen STAT2-Formen (Abb. 25D).

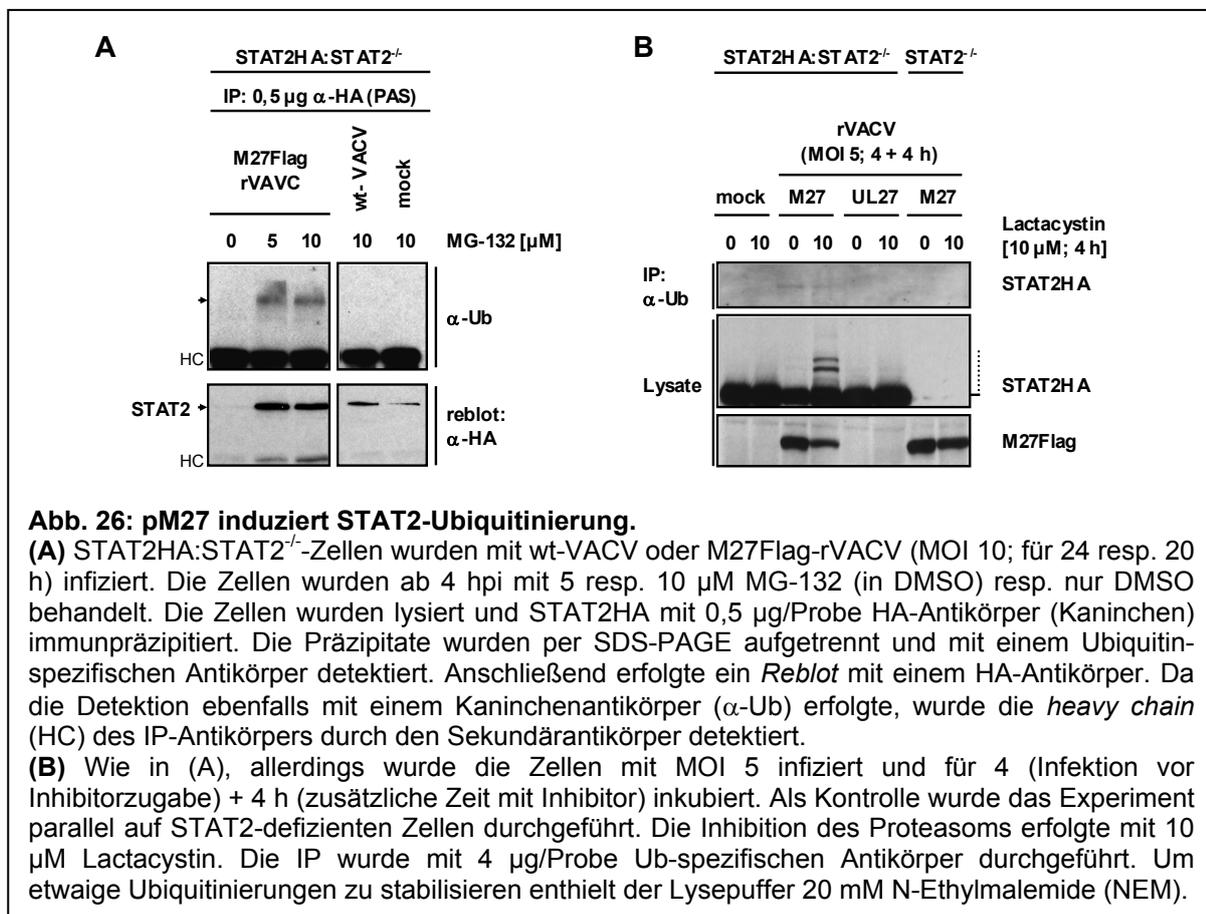
Somit zeigten sich in Anwesenheit von pM27 und einem Inhibitor des Proteasoms (MG-132 oder Lactacystin) diese größeren STAT2-Formen, die sowohl mit STAT2-spezifischen Antikörpern (Abb. 25C) als auch mit HA-spezifischen Antikörpern (Abb. 25A und 25B) nachgewiesen werden konnten.



Wenn zelluläre Proteine für den Abbau durch das Proteasom markiert werden, wird ihnen durch Ubiquitinligase-Komplexe eine Ubiquitinstruktur kovalent angehängt. Ubiquitin ist ein ca. 8 kDa großes Protein. Das Ubiquitinprotein kann und wird selbst auch ubiquitiniert, so dass Multi-Ubiquitinstrukturen (Poly-Ub) entstehen, die eine Erkennungsmarkierung für das Proteasom darstellen. Deshalb wurde untersucht, ob die STAT2-Modifikation Ubiquitin darstellt. Dafür wurde STAT2HA nach Infektion mit M27Flag-rVACV in Anwesenheit von MG-132 oder

## Ergebnisse

Lactacystin mittels HA-Epitop präzipitiert. Im anschließenden Westernblot wurden die Proteine auf der Membran mit einem Ubiquitin-spezifischen Antikörper detektiert. Es zeigte sich wiederum der pM27-abhängige STAT2-Verlust, der durch den Einsatz von MG-132 aufgehoben wurde. Außerdem konnten modifizierte STAT2-Formen in Anwesenheit von pM27 und MG-132 mit einem Ubiquitin-spezifischen Antikörper detektiert werden (Abb. 26A). pM27 induziert also die Ubiquitinierung von STAT2, die (ohne die Inhibitoren) zur Erkennung durch den Proteasom-Proteasekomplex führt. In einem reversen Experiment konnte STAT2 spezifisch nach einer IP mit Ubiquitin-spezifischen Antikörpern nur in Anwesenheit von pM27 nachgewiesen werden (Abb. 26B).

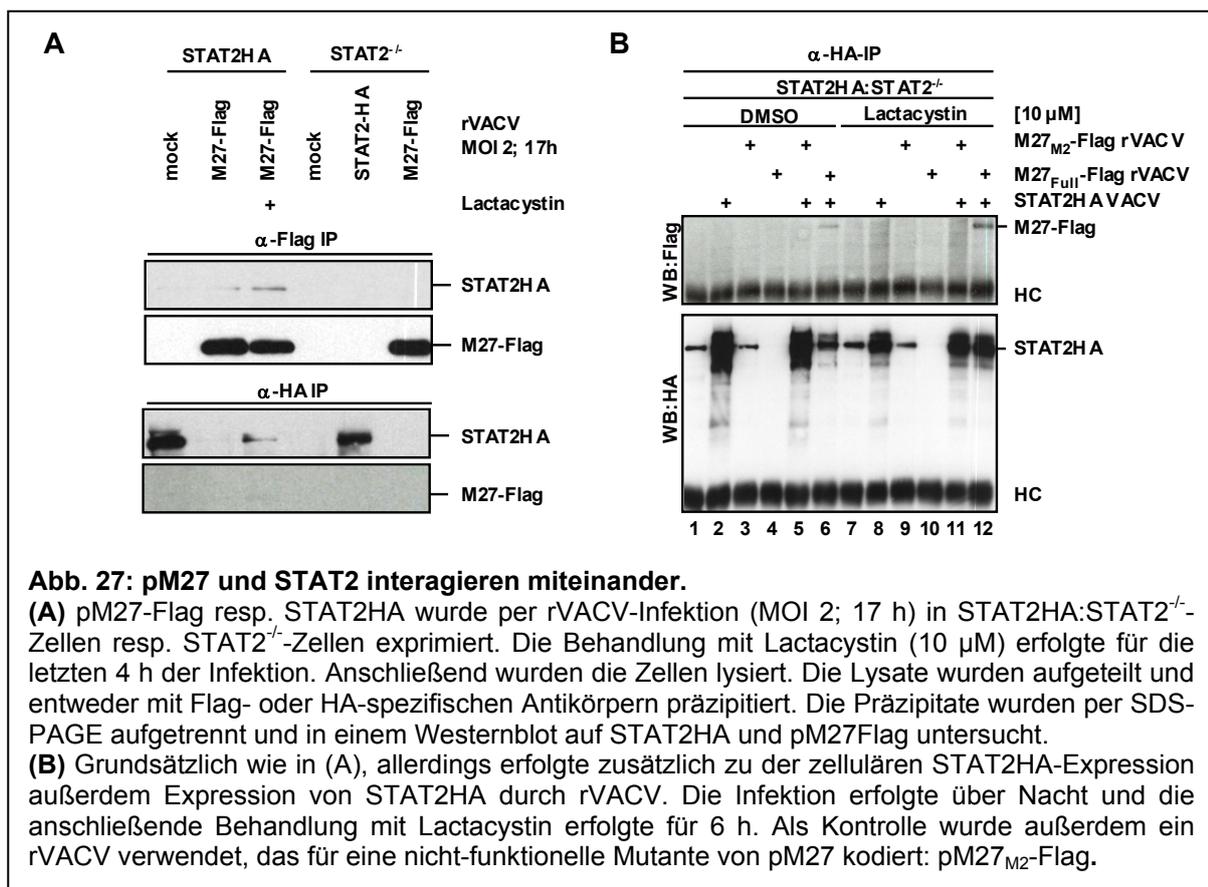


### 2.4.5 pM27 und STAT2 interagieren miteinander

Der hier vorgeschlagene Mechanismus, bei dem pM27 eine Ubiquitinkonjugation von STAT2 induziert, setzt eine Interaktion von STAT2 und pM27 voraus, um eine substratspezifische Ubiquitinierung zu erreichen. Deshalb wurde untersucht, ob STAT2 und pM27 direkt miteinander interagieren oder zumindest Teile eines Komplexes sind. Da jedoch diese Interaktion zu einer Ubiquitinierung von STAT2 und somit zu einer sofortigen Degradation führt, wurde davon ausgegangen, dass die Interaktion *in vivo* in Zellen schwer nachweisbar ist.

## Ergebnisse

In einem ersten Ansatz wurden STAT2HA:STAT2<sup>-/-</sup> resp. die entsprechende parentale STAT2-defiziente Zelllinie mit rVACV infiziert, die für pM27Flag oder STAT2HA kodieren. Um den mutmaßlichen pM27-STAT2-Komplex anzureichern, wurden die Zellen in einem Teil der Ansätze mit Lactacystin behandelt. Die Lysate wurden aufgeteilt und entweder mit einem HA-spezifischen oder mit einem Flag-spezifischen Antikörper immunpräzipitiert. Wie in Abbildung 27A (unterer Teil) gezeigt ist, reduzierte die Expression von pM27 in STAT2HA:STAT2<sup>-/-</sup> Zellen die STAT2HA-Menge. Diese Reduktion konnte partiell durch die Zugabe von Lactacystin blockiert werden. Es zeigte sich, dass STAT2HA mit einer IP gegen M27-Flag kopräzipitiert werden konnte. Die Präzipitation wurde durch die Zugabe von Lactacystin verstärkt (Abb. 27A, oberer Teil). Die Identität von STAT2HA wurde durch den Vergleich zu STAT2-defizienten Zellen kontrolliert. Die Kopräzipitation von pM27-Flag nach einer HA-IP gegen STAT2HA war jedoch sehr schwach. Allerdings war, durch die Wirkung von pM27, die Menge an STAT2HA für die Primär-IP auch sehr gering.



massiven Steigerung der STAT2-Menge (Abb. 27B, Spur 2 und 5). Die Expression eines funktionellen pM27Flag reduzierte die intrinsische STAT2HA-Menge (Spur 4), die Expression einer funktionslosen Mutante von pM27 reduzierte die Menge von STAT2 nicht (Spur 3). Die Doppelinfektion mit rVACV, die für STAT2HA resp. pM27Flag kodieren, zeigte, dass pM27 selbst die überexprimierte STAT2-Menge signifikant reduzieren konnte, aber wie erhofft nicht komplett (Vergleich zwischen Spur 2 und 6). Auch dieser Effekt war mit einer funktionslosen pM27-Mutante nicht zu beobachten (Vergleich Spur 2 und 6 resp. 5 und 6). Lactacystin konnte die intrinsische STAT2-Menge nicht vor der Wirkung von pM27 schützen, da STAT2 schon vor der Zugabe von Lactacystin komplett degradiert worden war und durch den VACV-kodierten *host-shut-off* eine Neusynthese ausbleibt. Im Fall der zusätzlichen STAT2-Expression durch rVACV wurde die Wirkung von pM27 jedoch durch die Zugabe von Lactacystin aufgehoben (Vergleich Spur 8 mit 12 resp 6 und 12). Unter Bedingungen der gesteigerten STAT2HA-Expression durch rVACV konnte pM27-Flag mit einer IP mit HA-spezifischen Antikörpern gegen STAT2HA kopräzipitiert werden (Spur 6 und 12). Auch in diesem Fall wurde die Ko-IP durch die Behandlung mit Lactacystin verstärkt (Spur 12). Zusammenfassend zeigen diese Befunde, dass pM27 mit STAT2 in Zellen einen Komplex bildet. Ob es sich um eine direkte physische Interaktion handelt, kann durch die gezeigten Befunde nicht schlussendlich bewiesen werden, ist aber wahrscheinlich, da pM27 ausreichend für die STAT2-Reduktion ist. Es kann jedoch nicht formal ausgeschlossen werden, dass ein zelluläres Protein die Interaktion von pM27 mit STAT2 vermittelt.

### **2.4.6 pM27 ist selbst auch ubiquitiniert**

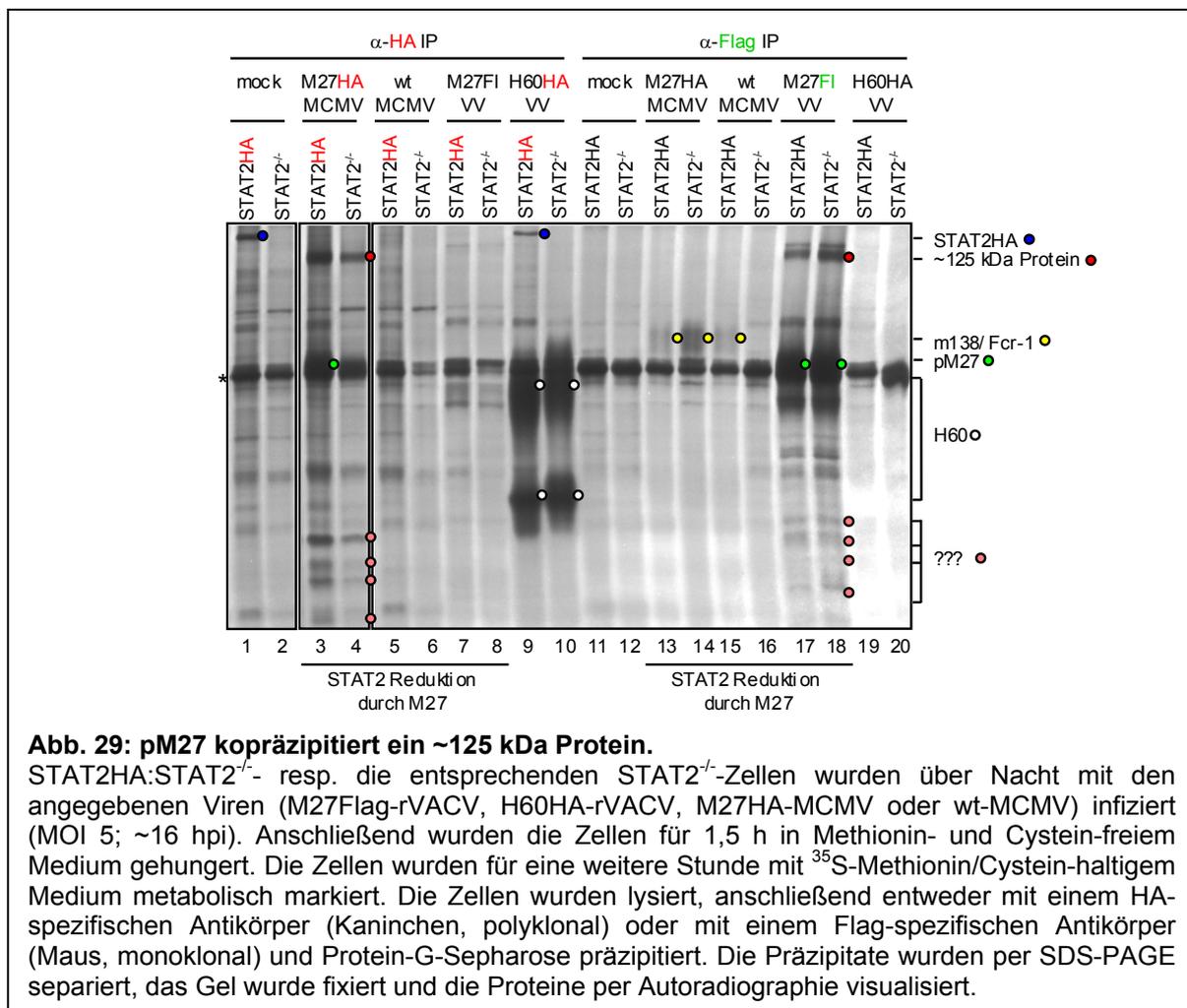
In einigen Versuchen wurde über der erwarteten pM27-Bande eine zusätzliche, etwas größere pM27-Form detektiert (z.B. Abb. 11 und 22). Deshalb wurde untersucht, ob pM27 ebenfalls mit Ubiquitin konjugiert wird. Dafür wurden Zellen mit M27Flag-rVACV infiziert und mit MG-132 inkubiert. Anschließend wurde pM27Flag mittels des Flag-Epitops immunpräzipitiert. Es zeigte sich eine Zunahme der pM27Flag-Menge in Anwesenheit von MG-132 (Abb. 28A; Vergleich von Spur 9 mit Spur 12). Eine Präzipitation erfolgte nur mit dem (Flag-) spezifischen Antikörper und nur nach einer Infektion mit pM27Flag-rVACV. Außerdem wurden in Anwesenheit von MG-132 modifizierte Formen von pM27Flag sichtbar (Abb. 28A Spur 12), die auf eine Modifikation schließen ließen.

Da pM27-Flag mit Ubiquitin-spezifischen Antikörpern präzipitiert werden konnte (Abb. 28B), wurde geschlussfolgert, dass pM27-Flag einen physischen Komplex mit einem ubiquitinierten Protein eingeht oder selbst ubiquitiniert ist.



## Ergebnisse

pM27HA-MCMV in STAT2HA-exprimierenden Zellen durchgeführt, so dass sowohl pM27HA als auch STAT2HA simultan in einer HA-IP untersucht werden konnten. Durch den Vergleich mit den STAT2-defizienten Zellen konnte auf die Identität von STAT2HA geschlossen werden (Abb. 29, Spur 1 und Spur 2). In diesem Experiment zeigte sich erneut der pM27-abhängige STAT2-Verlust in Zellen, die mit pM27Flag-rVACV, pM27HA-MCMV oder wt-MCMV infiziert wurden (Abb. 29, Spuren 3, 5 und 7), aber nicht in Zellen, die mit dem Kontroll-Virus H60HA-rVACV infiziert wurden (Abb. 29, Spur 9). Die Präzipitation erfolgte spezifisch, da in der HA-IP die HA-Epitop-markierten Proteine und in der Flag-IP die Flag-Epitop tragenden Proteine präzipitiert wurden und nicht umgekehrt. Allerdings wurde nach einer IP mit einem Maus-Antikörper ( $\alpha$ -Flag) der MCMV-kodierte IgG-Fc-Rezeptor m138/Fcr-1 (Thale et al., 1994) präzipitiert.



Es zeigte sich, dass sowohl mit pM27-Flag als auch pM27-HA ein Protein von ca. ~125 kDa kopräzipitiert wurde (Abb. 29, Spur 3, 4, 17 und 18). Dieses Protein wurde nicht nach Infektion mit wt-MCMV präzipitiert, wo pM27 zwar vorhanden, aber nicht mit einem Epitop versehen war

## Ergebnisse

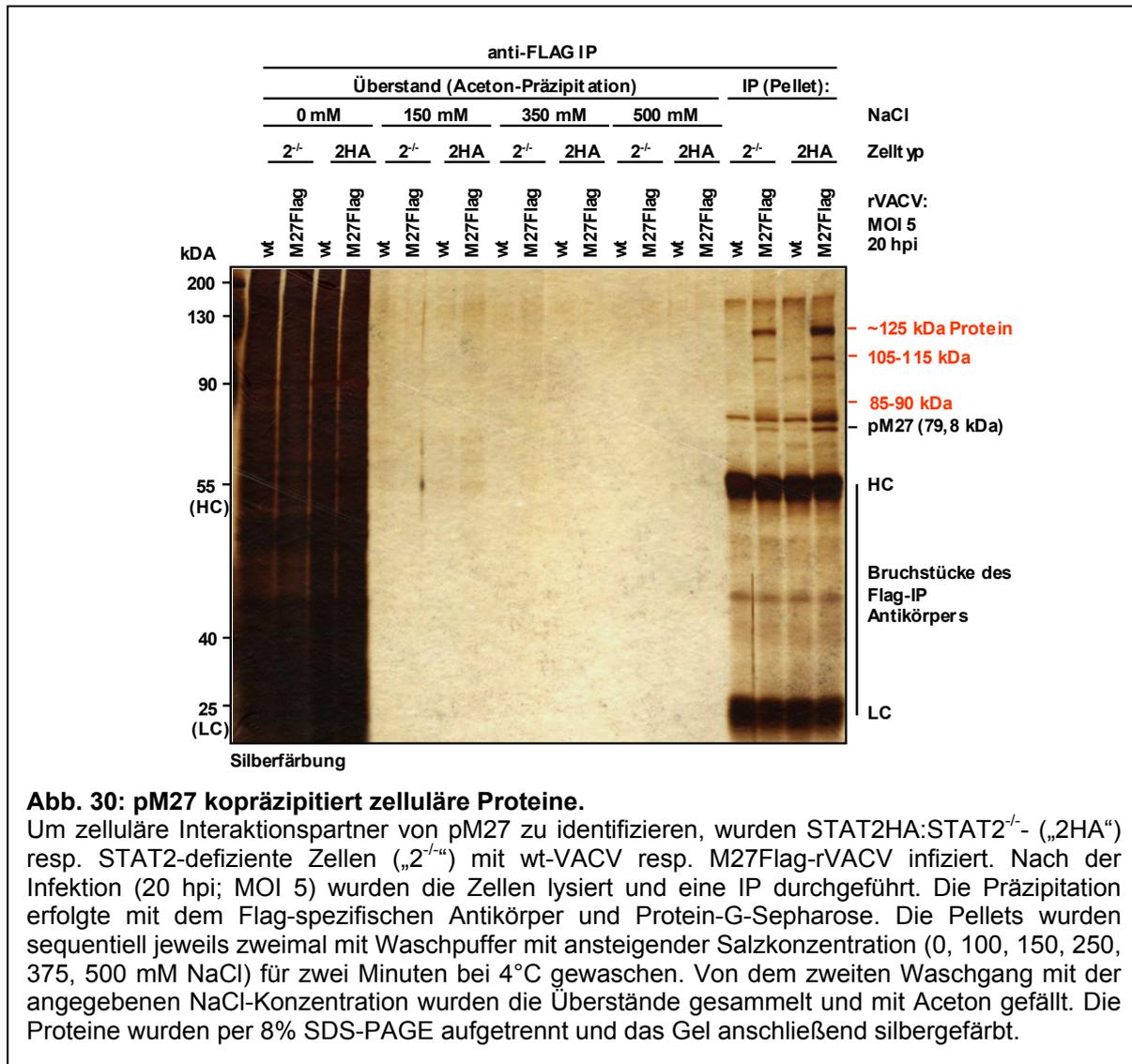
(Abb. 29, Spur 5 und 6). Die Präzipitation erfolgte also über das HA-Epitop, da sich die beiden Viren sonst nicht unterscheiden. Außerdem erfolgte die Präzipitation nur in Anwesenheit von pM27 und nur, wenn der zum Epitop-spezifische Antikörper verwendet wurde. Eine Kontroll-Präzipitation des H60HA-Proteins führte ebenfalls nicht zur Präzipitation des ~125 kDa-Proteins. Die Präzipitation wurde deshalb als pM27-spezifisch eingestuft. STAT2 scheint für diese Interaktion nicht notwendig zu sein, da die Präzipitation auch in STAT2-defizienten Zellen erfolgte (Abb. 29, Spur 4 und 18). Neben dem ~125 kDa Protein wurden vier weitere Proteine zwischen 15 und 35 kDa kopräzipitiert.

Leider konnte in diesem Experiment pM27HA nicht überzeugend nachgewiesen werden, da auf der entsprechenden Höhe ein unspezifisch-präzipitiertes Protein komigriert.

Obwohl das oben gezeigte Experiment erstmals die Existenz von zellulären Bindungspartnern von pM27 nachweisen konnte, ist die endgültige Beschreibung der Kofaktoren durch die Anwesenheit von unspezifischen Hintergrundbanden beeinträchtigt. Deshalb wurde das IP-Protokoll optimiert, um die Identifikation der pM27-bindenden Proteine in einem silbergefärbten Gel nachweisen zu können. Der Nachteil der Silberfärbung gegenüber der metabolischen <sup>35</sup>S-Markierung ist der Nachweis des IP-Antikörpers, der in der Silberfärbung detektiert wird, durch seine fehlende Markierung in der Autoradiographie jedoch unsichtbar bleibt. Leider enthalten die meisten Antikörperpräparate neben dem Antikörper noch zusätzliche Abbauprodukte, so dass im Bereich zwischen 25 und 55 kDa nur sehr schwer präzipitierte Proteine nachgewiesen werden können. Gleichzeitig besteht der Vorteil, dass auch langlebige Proteine, die in einer metabolischen Markierung nur sehr langsam markiert würden, gut detektierbar sind.

Es wäre möglich, dass es sich bei den kopräzipitierten Proteinen um abundante nicht-beteiligte Proteine handelte, die durch ihre schiere Menge die IP- und die Waschprozedur überstehen. Daher wurden die Waschüberstände mit Aceton ausgefällt und ebenfalls untersucht. Wenn es sich um unspezifisch gebundene abundante Proteine handeln würde, müsste man erwarten, dass sie in den Überständen ebenfalls nachzuweisen wären. Es zeigte sich erneut, dass pM27 zelluläre Proteine spezifisch kopräzipitiert. Insbesondere das ~ 125 kDa große Protein war wieder als prominente Bande nachzuweisen. Außerdem zeigten sich zusätzliche Proteine von ca. 85-90 kDa und 105-115 kDa, die jedoch schwächer vertreten waren (Abb. 30). In den Aceton gefällten Überständen waren diese Proteine nicht nachweisbar.

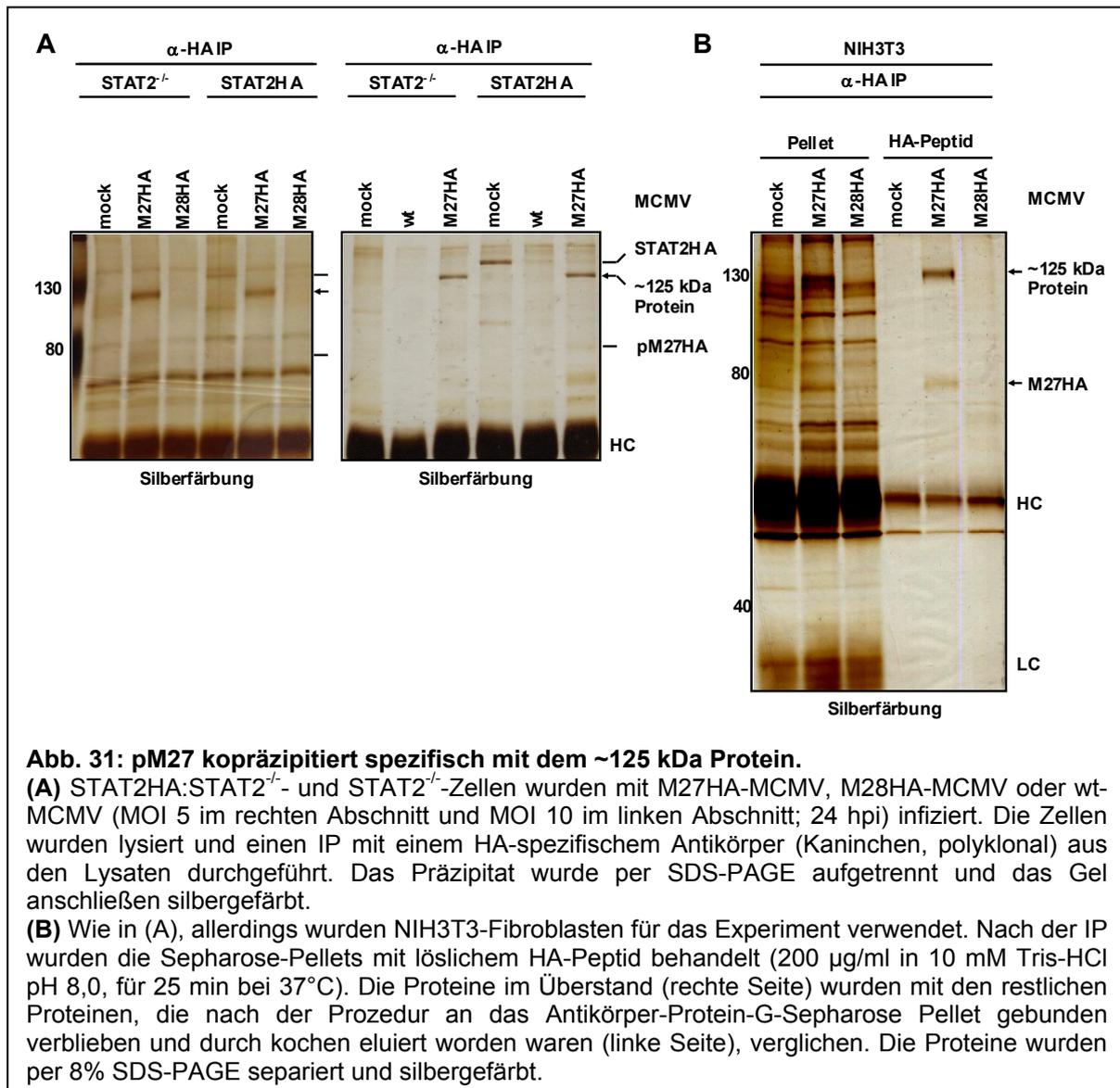
## Ergebnisse



Um zu untersuchen, ob die Interaktion mit dem ~125 kDa-Protein reproduzierbar M27HA-abhängig erfolgte, wurde ein vergleichbares Experiment durchgeführt, bei dem mock-, M27HA- und M28HA-MCMV verglichen wurden. Es zeigte sich erneut die pM27-HA-spezifische Präzipitation des ~125 kDa Proteins (Abb. 31A - linker Teil). Sie erfolgte nicht, wenn das Nachbar-Gen (*M28*) ein HA-Epitop versehenes Protein exprimierte und die Kopräzipitation untersucht wurde. Erneut erfolgte die Präzipitation STAT2-unabhängig. Um auszuschließen, dass es sich um eine pM27-abhängige Veränderung oder Expression eines unspezifisch-präzipitierten Proteins handelt und nicht um eine antikörperabhängige, spezifische Präzipitation, wurden wt-MCMV- und M27HA-MCMV parallel verglichen. Es zeigte sich, dass die Präzipitation nur mit M27HA erfolgte und nicht in Anwesenheit eines unmarkierten pM27-Proteins (das durch das wt-MCMV exprimiert wurde) (Abb. 31A – rechter Teil). Die Interaktion war also spezifisch, da sie nur bei entsprechender Antikörper-Epitop-Kombination auftrat.

## Ergebnisse

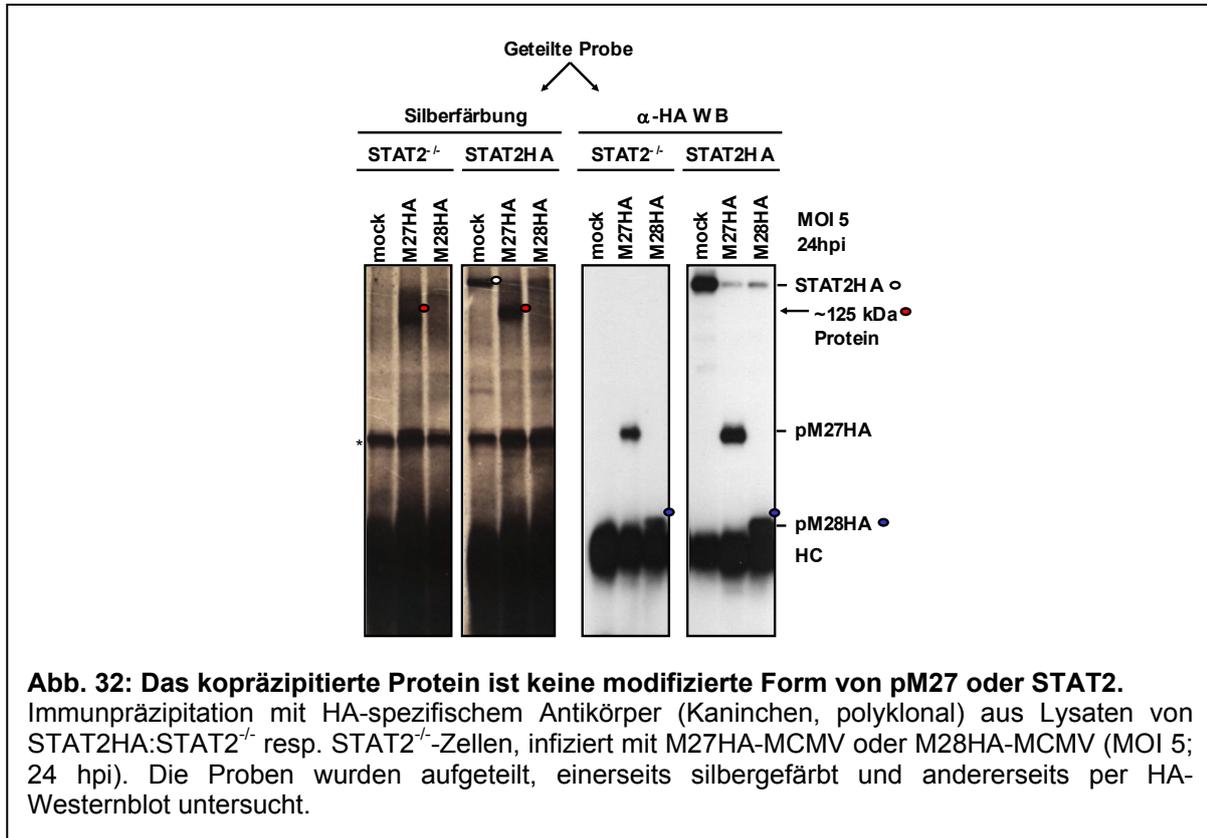
Der experimentelle Nachweis, dass das ~125 kDa Protein über pM27HA an den HA-Antikörper gebunden wurde, erfolgte durch die Zugabe eines Überschusses an HA-Peptiden, mit denen sowohl pM27 als auch das ~125 kDa Protein von dem immobilisierten HA-Antikörper befreit werden konnten. Es zeigte sich, dass diese Methode einerseits den Hintergrund reduzierte und dass das ~125 kDa Protein durch HA-Peptide kompetitiv von dem Antikörper freigesetzt wurde (Abb. 31B). Dieses Experiment wurde in NIH3T3-Zellen durchgeführt, um die Interaktion auch außerhalb der STAT2HA:STAT2<sup>-/-</sup> Zelllinie nachzuweisen.



Das ~125 kDa Protein könnte sowohl eine Modifikation oder Dimerisierung von pM27 oder einen echten Kofaktor darstellen können. Um zwischen diesen Möglichkeiten differenzieren zu können, wurde ein Ko-IP-Experiment parallel silbergefärbt und auf einem Westernblot mit einem HA-Antikörper detektiert. Das ~125 kDa Protein war im Silbergel gut sichtbar, konnte

## Ergebnisse

aber nicht mit einem HA-Antikörper im Westernblot nachgewiesen werden, pM27HA jedoch schon (Abb. 32). Es wurde deshalb geschlossen: Das ~125 kDa Protein weist selbst kein HA-Epitop auf und stellt somit keine modifizierte Form von pM27HA dar. Das ~125 kDa Protein kann auch keine modifizierte Form von STAT2 sein, da es auch in STAT2-defizienten Zellen kopräzipitiert wurde.



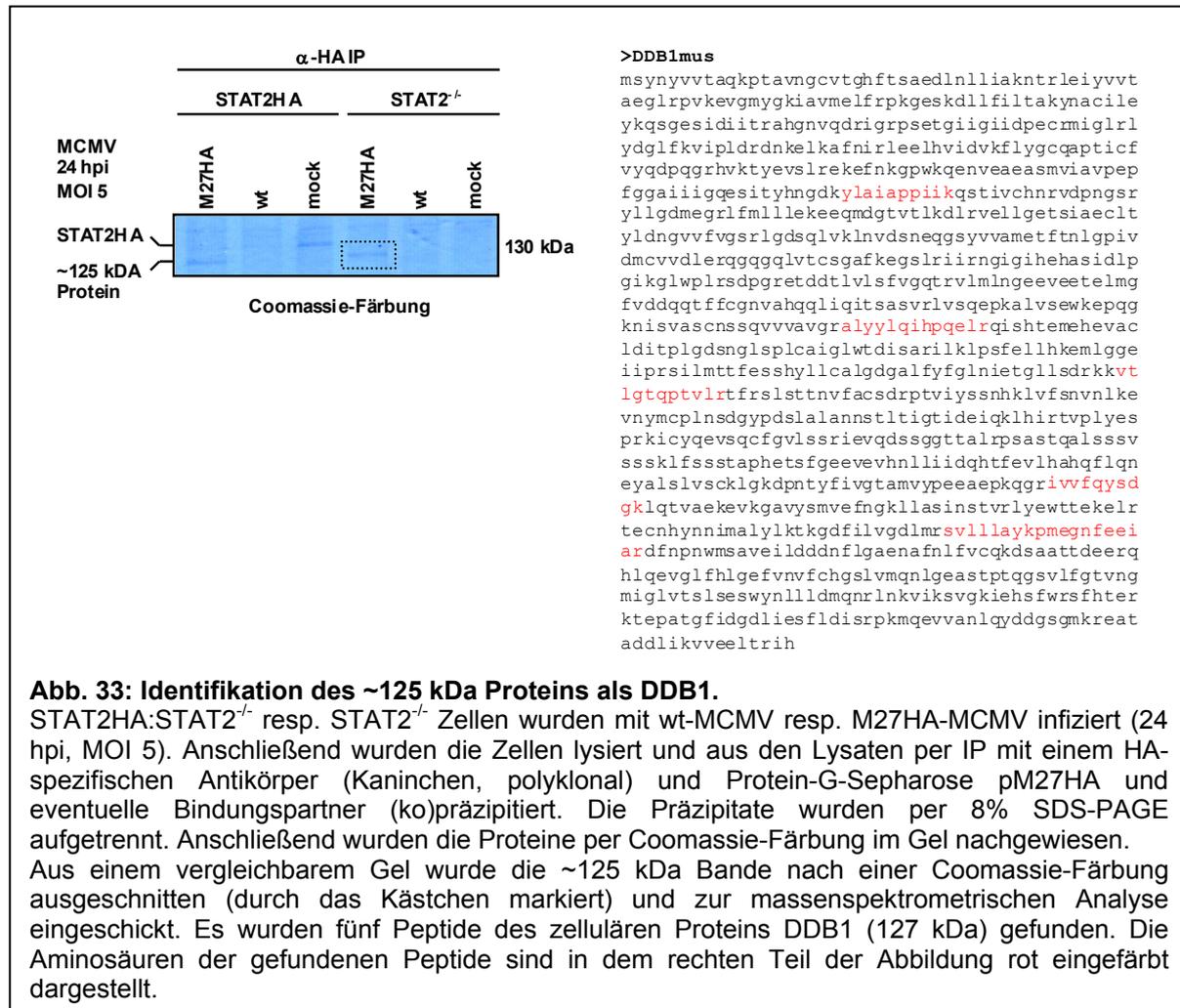
In allen Experimenten zeigte sich wie erwartet die pM27-vermittelte Reduktion der STAT2-Menge, so dass dieser Befund nicht nur in einem Westernblot mit unterschiedlichen Antikörpern gezeigt werden konnte, sondern auch nach metabolischer Markierung und in Silberfärbungsexperimenten. Außerdem wurde in allen untersuchten Fällen ein ~125 kDa Protein spezifisch mit pM27 kopräzipitiert. Die offensichtliche Frage war deshalb die Identität dieses ~125 kDa Proteins.

### 2.6 pM27 KOPRÄZIPITIERT DAS ZELLULÄRE PROTEIN DDB1

Um die Identität des 125 kDa-Proteins festzustellen, wurden die IP-Bedingungen und FärbeprozEDUREN weiter optimiert. Es wurden erneut Ko-IP-Experimente durchgeführt, die anschließend mittels Coomassie-Färbungen detektiert wurden. Es war möglich, sowohl die STAT2HA- als auch die ~125 kDa Proteinbande in der Coomassie-Färbung zu identifizieren. Die ~125 kDa Bande wurde ausgeschnitten und zur massenspektrometrischen Analyse

## Ergebnisse

eingeschickt. Es wurden fünf unabhängige Peptide eines 127 kDa großen Proteins gefunden, deren Sequenzen mit der Sequenz von dem *DNA-damage DNA-binding protein 1* (DDB1; NP 001914.3 resp. NM 001923.3) übereinstimmt (Abb. 33).



DDB1 ist ein zellulärer Adapter des Cul4A-RocA-Ubiquitinligase-Komplexes und hat eine Größe von 127 kDa. Es wurde bereits als zellulärer Adapter für virale Proteine von RNA-Viren beschrieben, die ebenfalls STAT-Moleküle über das Proteasom degradieren (Andrejeva et al., 2002; Precious et al., 2005; Ulane und Horvath, 2002).

Durch seine Größe, seine Beteiligung an einem zellulären Ubiquitin-Ligase-Komplex und seine beschriebene Wirkung als Kofaktor paramyxoviraler IFN-Antagonisten war DDB1 ein hervorragender Kandidat für das von pM27 gebundene ~125 kDa Protein.

Der MS-Befund wurde deshalb anschließend mit Hilfe von DDB1-spezifischen Antikörpern validiert. Es zeigte sich, dass schon 6 h nach M27HA-MCMV-Infektion, DDB1 mit pM27HA kopräzipitiert werden konnte (Abb. 34A). Zu diesem Zeitpunkt war die STAT2-Degradation noch nicht abgeschlossen, so dass die DDB1-Bindung in Anwesenheit von STAT2 erfolgte, was

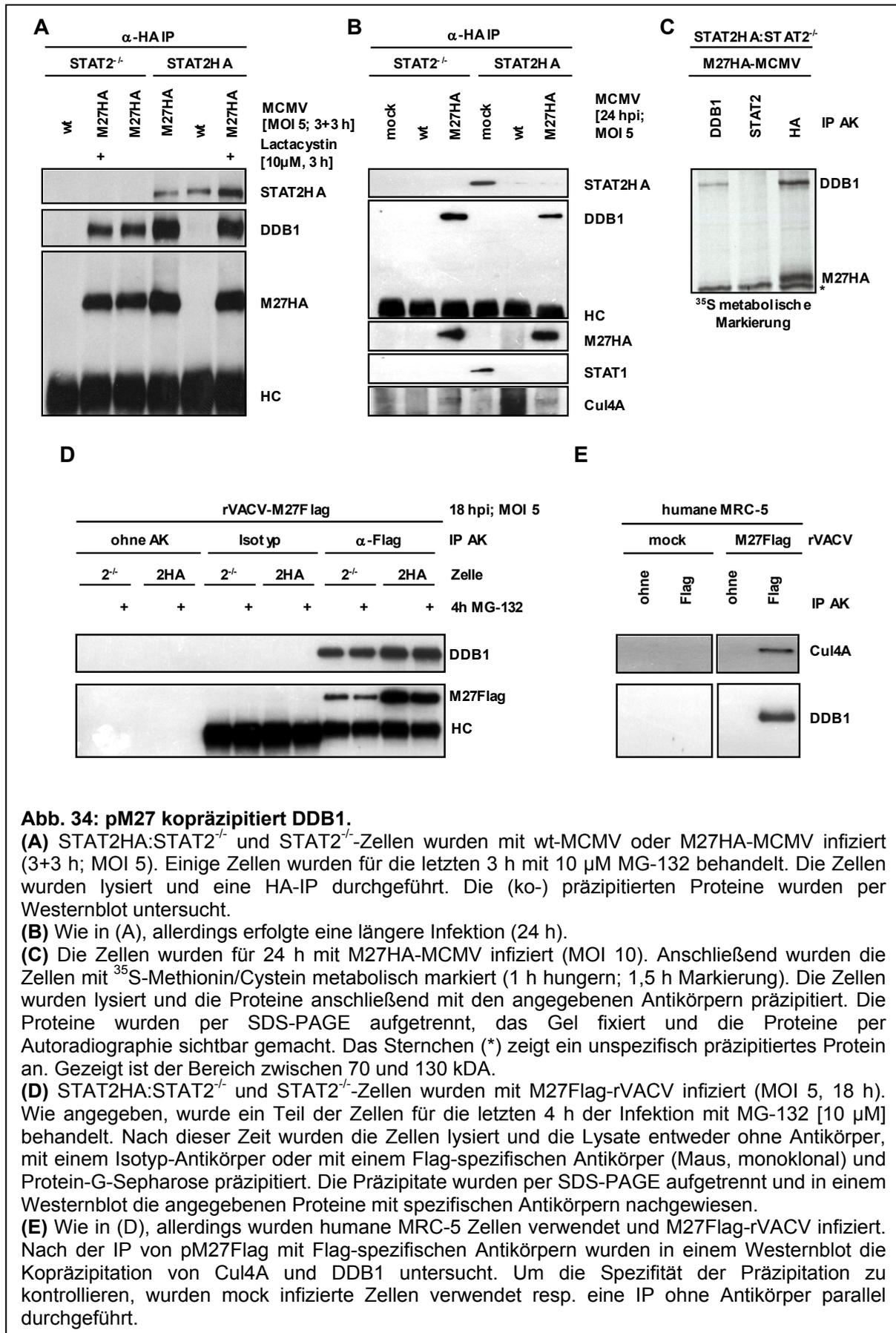
## Ergebnisse

impliziert, dass pM27 sowohl DDB1 als auch STAT2 binden kann. Die Zugabe von MG-132 revertiert wie erwartet die proteasomale STAT2-Degradation (Abb. 34A). 24 h nach M27HA-MCMV Infektion konnte DDB1 ebenfalls mit pM27HA kopräzipitiert werden (Abb. 34B). Eine Präzipitation erfolgt weder nach Infektion mit wt-MCMV noch in mock-infizierten Zellen (Abb. 34B).

In beiden Fällen war die Interaktion STAT2-unabhängig, da sie auch in STAT2-defizienten Zellen nachzuweisen war. STAT1 wurde wie erwartet nicht durch pM27HA präzipitiert (Abb. 34B), aber STAT2 und STAT1 waren wie bereits beschrieben (Stancato et al., 1996) auch ohne externen Stimulus assoziiert (Abb. 34B).

Nach metabolischer <sup>35</sup>S-Markierung wurde das kopräzipitierte ~125 kDa Protein mit DDB1, welches durch einen spezifischen Antikörper immunpräzipitiert worden war, verglichen. Es stellte sich heraus, dass beide Proteine exakt die gleiche Größe besitzen (Abb. 34C), so dass geschlossen werden konnte, dass das kopräzipitierte Protein mit DDB1 identisch ist. Eine STAT2-IP fand in diesem Experiment nicht statt, da M27HA STAT2 bereits degradiert hatte.

Da bereits gezeigt wurde, dass rVACV exprimiertes pM27Flag funktional ist, wurde untersucht, ob rVACV-exprimiertes pM27 in der Lage ist, DDB1 zu binden. Wie in Abbildung 34D zu sehen ist, wurde DDB1 spezifisch mit pM27Flag kopräzipitiert. Eine Kopräzipitation erfolgte weder in einer „IP“ ohne Antikörper noch nach einer IP mit einem Isotyp-Kontrollantikörper (Abb. 34D).



Da pM27 auch in humanen Zellen funktionell ist (Abb. 9) und die weiteren Komponenten des Cul4a-RocA Komplexes nur bedingt im murinen System auf Grund der Speziespezifität der käuflich erwerblichen Antikörper untersucht werden konnten (Abb. 34B), wurde die Ko-IP in humanen MRC-5-Zellen untersucht. Es zeigte sich, dass die pM27-DDB1-Interaktion auch hier stattfindet und die Komponente Cul4A hier ebenfalls präzipitiert wurde (Abb. 34E).

Die Inhibition des Proteasoms beeinflusst die Interaktion zwischen pM27 mit DDB1 nicht (Abb. 34A und 34D).

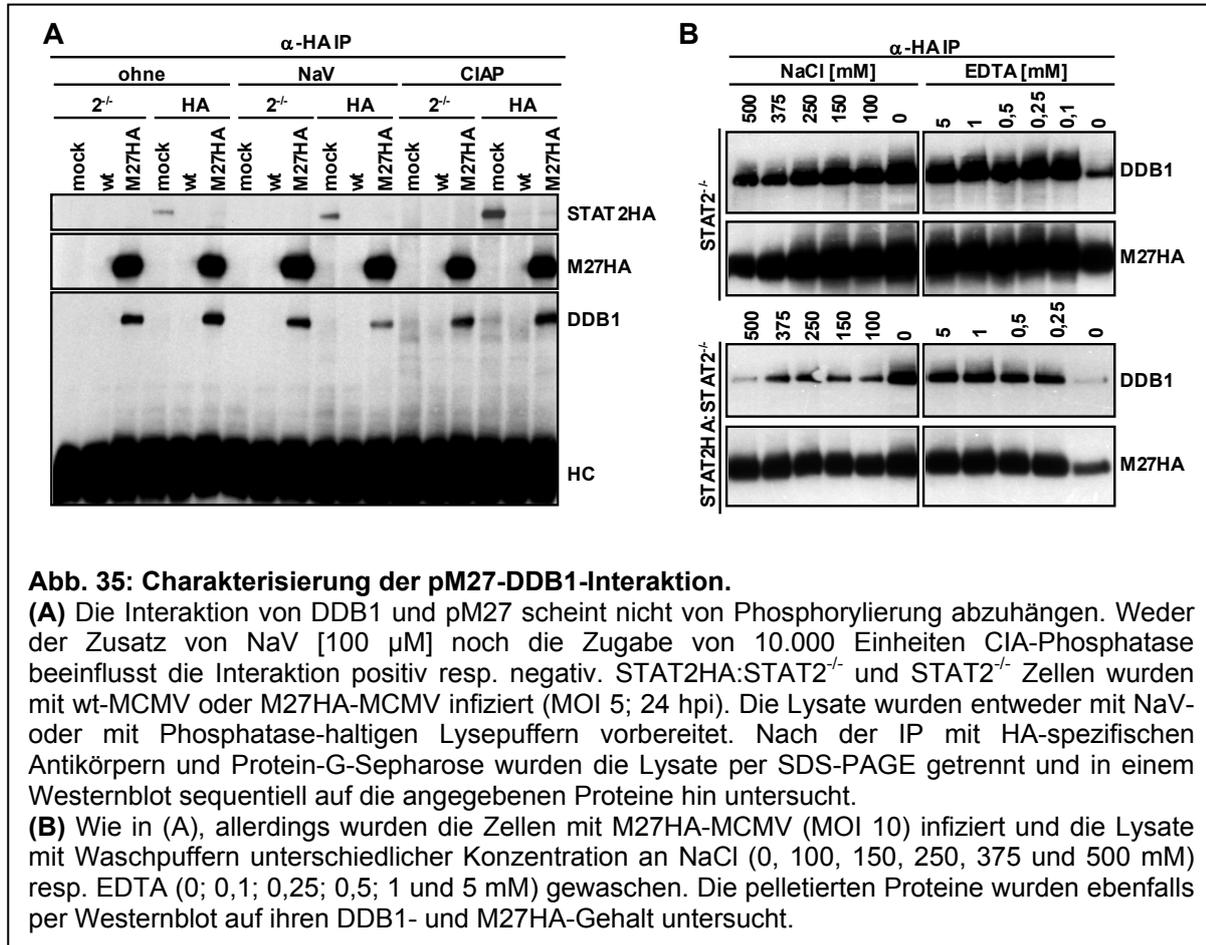
Zusammenfassend zeigten diese Befunde, dass pM27 unabhängig von der verwendeten Epitop-Markierung (Flag oder HA), des Zelltypes (NIH3T3, STAT2-defizient, STAT2HA oder MRC-5), der Zellspezies (Mensch oder Maus), des Expressionssystems (rVACV oder MCMV), des verwendeten Antikörpers (HA [rabbit polyklonal] oder Flag [Maus monoklonal]) und der Sepharose (Protein-A-Sepharose oder Protein-G-Sepharose) spezifisch mit DDB1 kopräzipitiert werden konnte. Die Interaktion war nicht von der Bindung von pM27 an STAT2 abhängig, da die Interaktion auch in STAT2-defizienten Zellen nachzuweisen war. Demzufolge ist DDB1 ein zellulärer Interaktionspartner von pM27.

### **2.6.1 Charakterisierung der pM27-DDB1-Interaktion**

Die Kopräzipitation von DDB1 mit pM27 in einer IP erlaubte eine initiale Beschreibung der Charakteristika dieser Interaktion. Da der DDB-Komplex über c-Abl Tyrosin-phosphoryliert wird (Chen et al., 2006; Cong et al., 2002) und die Phosphorylierung die Funktion moduliert, wurde untersucht, ob diese Phosphorylierung für die Bindung durch pM27 eine Rolle spielt. Es zeigte sich, dass pM27HA mit DDB1 unabhängig von der Anwesenheit des Phosphataseinhibitors Na-Vanadat interagiert und die Zugabe von 10.000 Einheiten Phosphatase (CIAP) die Interaktion ebenfalls nicht beeinflusste (Abb. 35). Daraus wurde geschlussfolgert, dass die pM27HA-DDB1-Interaktion wahrscheinlich von der DDB1- und pM27-Phosphorylierung unabhängig ist.

Durch eine Titration der NaCl-Konzentration in dem IP-Waschpuffer wurde untersucht, wie stringent die DDB1-pM27 Interaktion ist. Es stellte sich heraus, dass die Interaktion selbst durch hohe NaCl-Konzentration nur minimal kompetitiert werden konnte und eine offensichtliche Korrelation zwischen präzipitierter pM27HA-Menge und kopräzipitiertem DDB1 existierte. Die Interaktion ließ sich jedoch am besten in Anwesenheit von 250-300 mM NaCl darstellen, da unter diesen Bedingungen das Verhältnis von spezifischer Präzipitation zum unspezifischen Hintergrund am besten war (Abb. 35B). Außerdem konnte die Zugabe von bis zu 1% (v/v) NP-40/IGEPAL oder die Zugabe von RNase oder DNase die DDB1-pM27-Interaktion nicht aufheben (Daten nicht gezeigt). Die Interaktion scheint außerdem keine bivalenten Kationen zu

benötigen, da der Einsatz von EDTA mit einer Konzentration von bis zu 5 mM die Interaktion kaum merklich beeinflusste (Abb. 35B). Allerdings schien die gänzliche Abwesenheit von EDTA die Primär-IP von M27HA mit dem HA-Antikörper negativ zu beeinflussen.

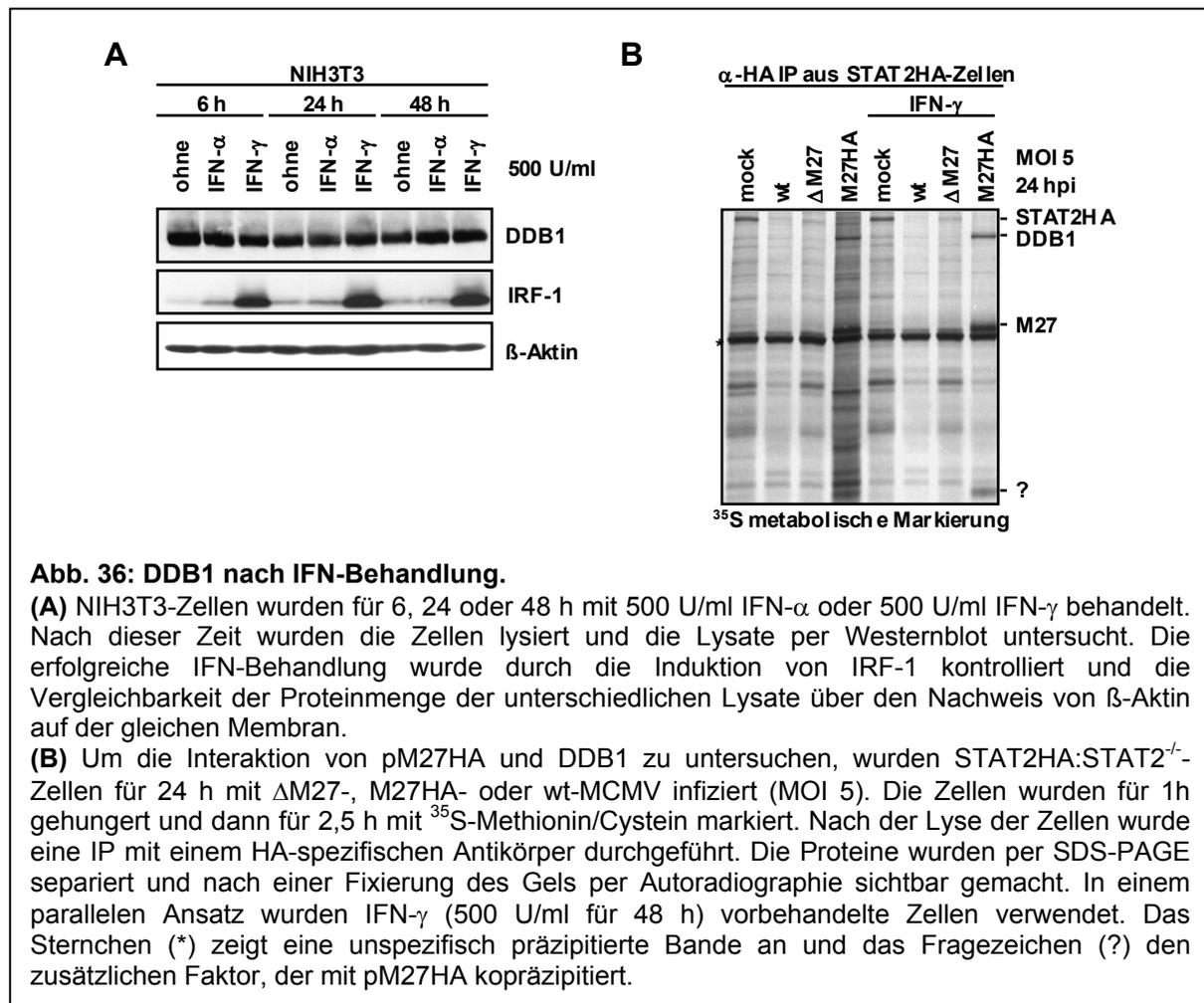


### 2.6.2 IFN- $\gamma$ verändert die Kopräzipitation von pM27 und DDB1 nicht

Da sich der Phänotyp der  $\Delta$ M27-Mutante am massivsten nach IFN- $\gamma$ -Vorbehandlung manifestiert (Abb. 13), scheint die Wirkung von pM27 nach einer Inkubation der Zellen mit IFN- $\gamma$  besonders entscheidend zu sein. Die STAT2-Degradation durch pM27 erfolgt auch nach IFN- $\gamma$ -Inkubation (Abb. 14). Allerdings wurde gezeigt, dass die DDB1-mRNA-Menge nach IFN- $\gamma$ -Behandlung STAT1-unabhängig reduziert ist ((Gil et al., 2001); siehe Tabelle 1: *XPE UV-damaged DNA binding factor*). Deshalb wurde untersucht, ob DDB1 nach Inkubation mit IFN- $\gamma$  überhaupt als Bindungspartner für pM27 zur Verfügung steht. Es konnte jedoch keine Veränderung im Vergleich zu unbehandelten Zellen festgestellt werden (Abb. 36A). Eine mögliche Ursache für das Ausbleiben einer IFN- $\gamma$ -abhängigen DDB1-Reduktion, ist die Halbwertszeit von DDB1 (Abb. 23C).

## Ergebnisse

Außerdem wurde untersucht, ob sich das Präzipitationsmuster der pM27-DDB1 Kopräzipitation signifikant verändert, wenn die Zellen mit IFN- $\gamma$  behandelt wurden. Wie erwartet reduzierte wt-MCMV und M27HA-MCMV die zelluläre STAT2-Menge,  $\Delta$ M27-MCMV jedoch nicht. Unabhängig von der IFN-Behandlung präzipitierte pM27HA das zelluläre Protein DDB1 (Abb. 36B). Außerdem zeigte sich ein weiterer Faktor, der ebenfalls spezifisch mit pM27HA kopräzipitierte. Dieser Interaktionspartner ist noch nicht identifiziert. Es wurde jedoch keine spezifische Veränderung des Präzipitationsmusters von pM27, die durch IFN- $\gamma$  induziert wurde, gefunden (Abb. 36B).



### 2.6.3 pM27 kopräzipitiert DDB1 auch nach einer Behandlung mit UV-Licht

DDB1 wurde ursprünglich als zentrale Komponente der zellulären Antwort auf UV-Licht-induzierte DNA-Schädigung beschrieben (Hwang et al., 1996; Hwang und Chu, 1993). Außerdem wurde gezeigt, dass UV-Licht die IFN-abhängige Aktivierung von STAT1 inhibieren kann (STAT1-pY-Phosphorylierung, GAF-DNA-Bindung an GAS-Sequenzen und

## Ergebnisse

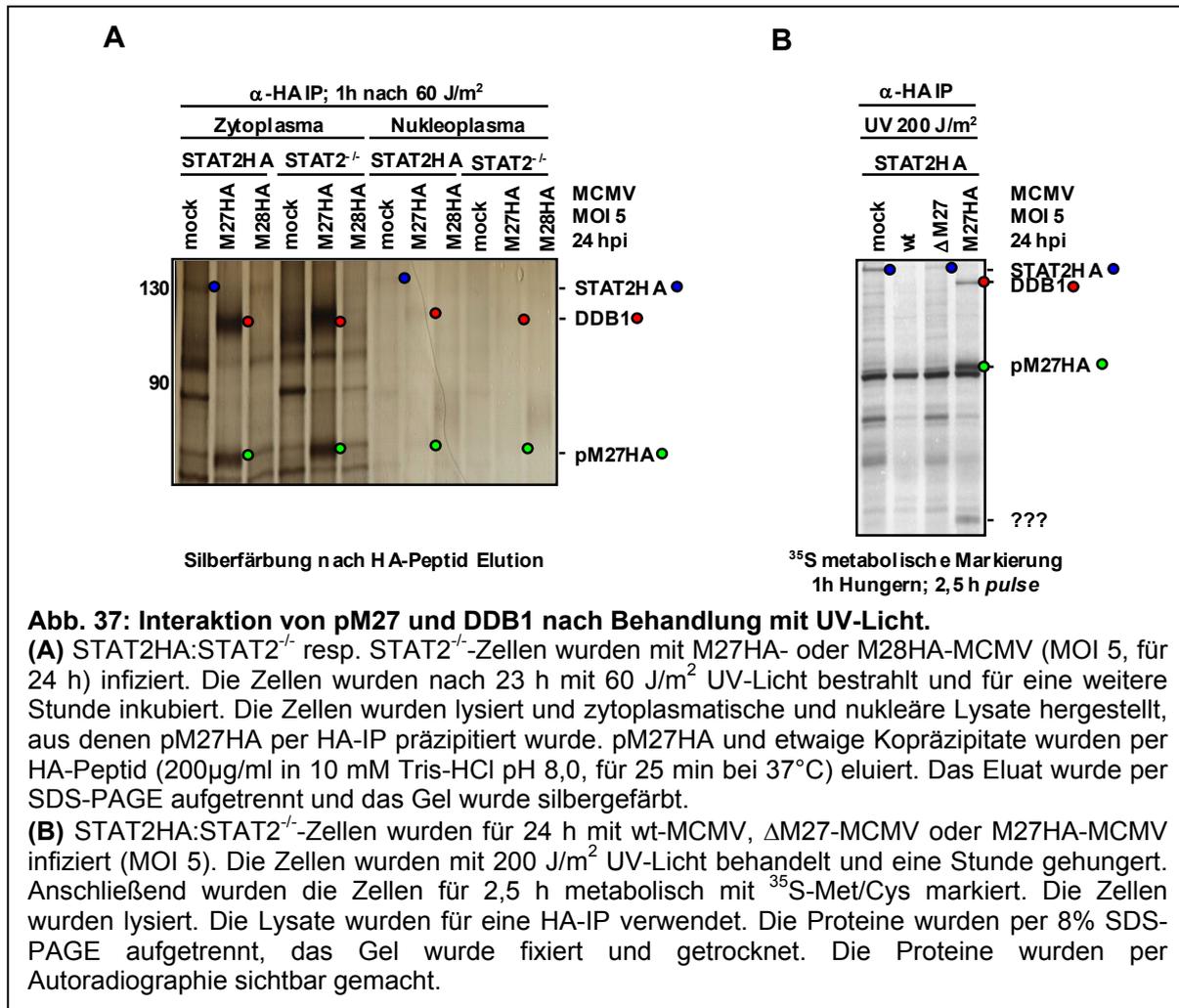
entsprechende Gen-Expression) (Aragane et al., 1997). Allerdings konnte in den hier untersuchten Zellen (NIH3T3) keine signifikante Veränderung der IFN-abhängigen (IFN- $\alpha$  oder IFN- $\gamma$ ) Induktion des Luziferase-Reportergens unter Kontrolle eines ISRE-Promotors nach einer Behandlung mit 200 J/m<sup>2</sup> UV-Licht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), die durch ein Ausbleiben der STAT1-Aktivierung zu erwarten gewesen wäre.

Außerdem konnte in Abwesenheit von IFN kein Wachstumsnachteil von  $\Delta$ M27-MCMV in UV-Licht-behandelten Zellen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Es scheint demzufolge keinen auffälligen Selektionsdruck von UV-Licht auf MCMV zu geben, der durch die Interaktion von pM27 mit DDB1 antagonisiert wird.

Eine Wirkung von pM27 auf UV-abhängige Mechanismen kann jedoch nicht formal ausgeschlossen werden, da dafür ein breiteres Spektrum von UV-Lichtbehandlungen und MCMV-Infektionsdosen untersucht werden müsste.

Da sich der DDB-Komplex nach UV-Behandlung in seiner Lokalisation und Zusammensetzung verändert (DDB1 transloziert DDB2-abhängig in den Kern (Liu et al., 2000)) wurde untersucht, ob sich die Interaktion von DDB1 und pM27 auch nach UV-Behandlung darstellen lässt. Es zeigte sich, dass pM27 und DDB1 auch in UV-behandelten Zellen komplexieren (Abb. 37A). Erneut wurde der Komplex STAT2-unabhängig gebildet. Der Komplex wurde vorwiegend im Zytoplasma nachgewiesen, war aber auch (schwach) im Kern nachzuweisen.

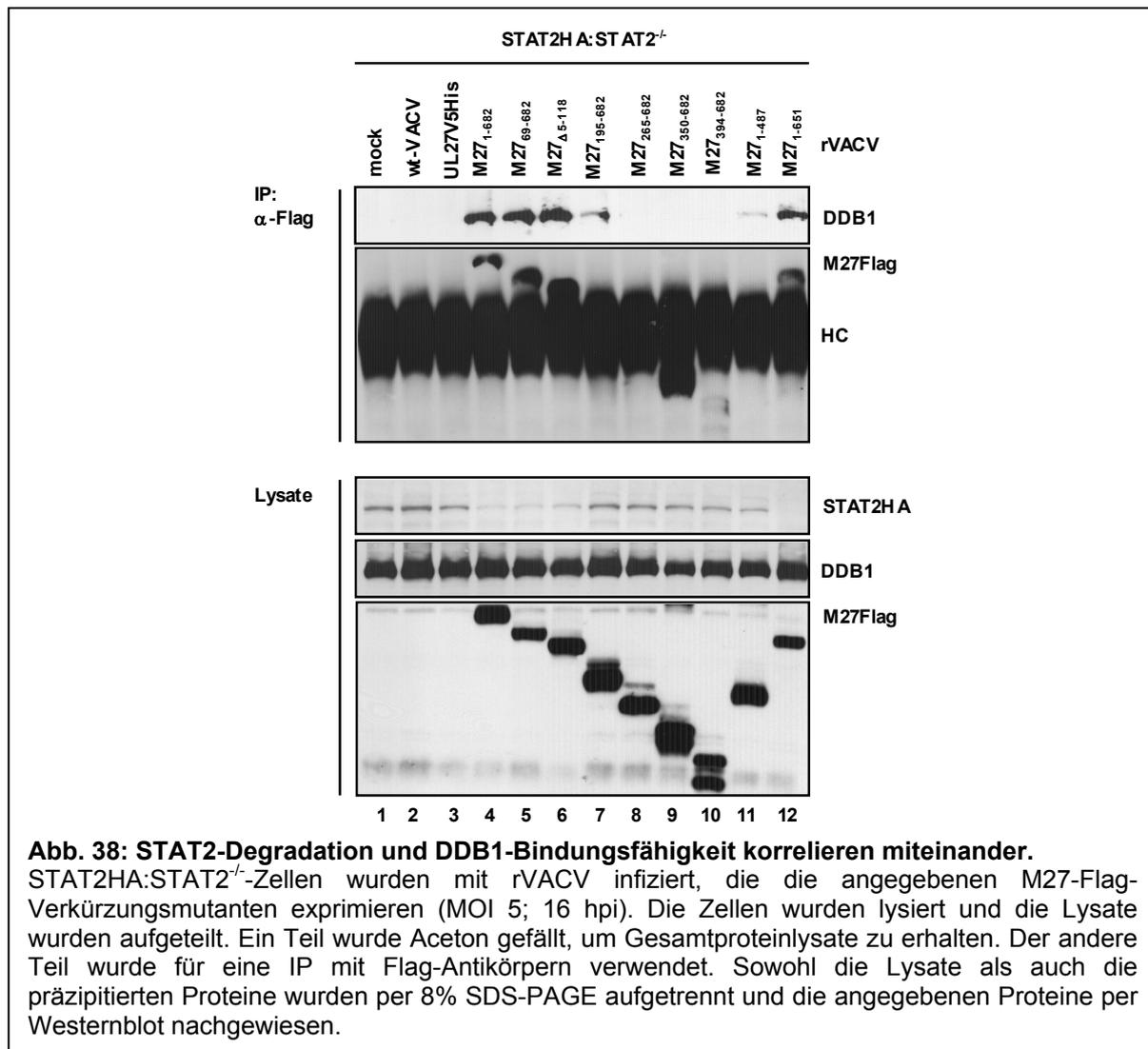
Der pM27-DDB1-Komplex transloziert nach UV-Licht-Behandlung nicht in den Kern, wie es für DDB1 alleine gezeigt worden war (Liu et al., 2000). Die Zusammensetzung des pM27-DDB1-Komplexes änderte sich nach UV-Behandlung auch nicht (Vergleich von Abb. 36B mit 37B). Interessanterweise zeigte sich erneut die Existenz eines grundsätzlichen weiteren Ko-Faktors (ca. 40-45 kDa), der mit pM27 präzipitiert wurde (Abb. 37B).



#### 2.6.4 Korrelation zwischen DDB1-Bindung und STAT2-Degradation

Um die DDB1-Bindungsfähigkeit mit der STAT2-Degradationsfähigkeit in Verbindung zu bringen, wurden die beschriebenen VACV-exprimierten M27-Mutanten (Abb. 6 und 7) auf ihre Fähigkeit hin untersucht, DDB1 zu binden. Es zeigte sich, dass alle STAT2-degradierenden Mutanten auch DDB1 binden können. Mutanten, die DDB1 nicht binden können, waren auch nicht in der Lage, STAT2 zu degradieren (Abb. 38). Es existiert also eine direkte Korrelation zwischen DDB1-Bindungsfähigkeit und STAT2-Degradation, die einen kausalen Zusammenhang impliziert.

Zwei der nicht-funktionalen Mutanten wiesen eine reduzierte DDB1-Bindungsfähigkeit auf, waren aber prinzipiell noch zur Interaktion in der Lage. Anhand der Analyse der Mutanten lässt sich schlussfolgern, dass die molekulare Grundlage der DDB1-Bindungsfähigkeit in dem Bereich zwischen AS196 und AS487 in pM27 angelegt zu sein scheint.



## 2.7 HCMV-KODIERTE INHIBITION DER JAK-STAT-SIGNALTRANSDUKTION

Die oben gezeigten Befunde bezüglich der MCMV-kodierten pM27-abhängigen Degradation von STAT2 und der Bedeutung dieses Mechanismus für die Replikation von MCMV in Anwesenheit von IFN warfen die Frage auf, ob die STAT2-Degradation eine konservierte Fähigkeit von Cytomegaloviren ist. MCMV stellt aus klinischer Sicht ein Modell für das humanpathogene HCMV dar. Es stellte sich deshalb die Frage, ob und wie HCMV mit der IFN-induzierten Jak-STAT-Signalkaskade interferiert und ob HCMV ebenfalls STAT2 für den proteasomalen Abbau markiert. Allerdings war bereits gezeigt worden, dass der Laborstamm HCMV-Towne die STAT2-Proteinmenge nicht verändert, die IRF-9/p48-Proteinmenge jedoch posttranskriptionell senkt (Miller et al., 1999) und Jak1 degradiert (Miller et al., 1998), um die Phosphorylierung und somit Aktivierung von STAT-Molekülen zu verhindern (Le Roy et al., 1999; Miller et al., 1998).

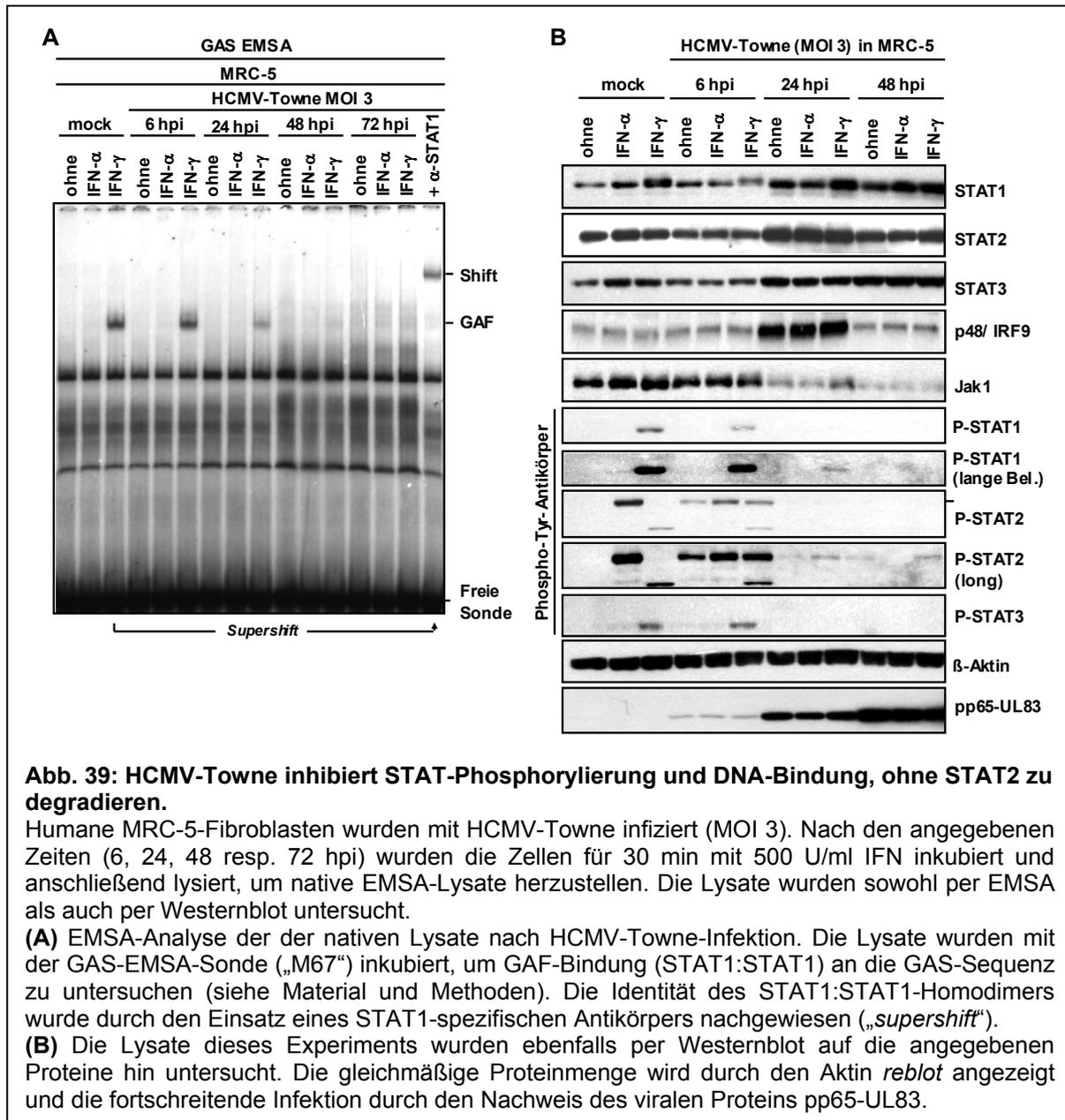
## Ergebnisse

Da MCMV diese Fähigkeit nicht besitzt (Abb. 2), wurden die publizierten Befunde zu Phosphorylierung, Proteinmenge und Aktivierung der Komponenten der IFN-abhängigen Jak-STAT-Signaltransduktion nach HCMV-Towne-Infektion reproduziert. Es zeigte sich, dass HCMV-Towne wie erwartet mit der Initiation des DNA-bindenden GAF-Komplexes (STAT1:STAT1) interferierte (Abb. 39A). Die Proteinmengen von STAT1, STAT2 und STAT3 blieben nach HCMV-Towne-Infektion konstant und schienen eher im Verlauf der HCMV-Replikation anzusteigen. HCMV-Towne scheint also nicht die Fähigkeit zu besitzen, die STAT2-Menge aktiv zu reduzieren.

Die Menge von Jak1 und p48 sank zu späteren Zeitpunkten nach HCMV-Towne-Infektion (Abb. 39B), so dass die oben zitierten Publikationen bestätigt werden konnten. Allerdings schien der p48/IRF-9-Verlust nur im Vergleich zu der vorherigen HCMV-abhängigen Induktion zu erfolgen. Da p48/IRF-9 höchstwahrscheinlich genau wie IRF-1 eine kurze Halbwertszeit aufweist (Nakagawa und Yokosawa, 2000; Watanabe et al., 1991), stellt sich die Frage, ob es sich wirklich um einen posttranskriptionellen Effekt oder um ein Fehlen der Induktion durch die Inhibition der Jak-STAT-Signalkaskade handelt.

Nach einer initialen Aktivierung aller STAT-Moleküle (6 hpi), die wahrscheinlich auf Infektions-abhängiger Sekretion von Typ I IFN beruht, wurde die Phosphorylierung aller drei STAT-Moleküle (STAT1, STAT2 und STAT3) nach IFN- $\alpha$ - und IFN- $\gamma$ -Behandlung inhibiert (Abb. 39). Ein Effekt, der auf die reduzierte Jak1-Proteinmenge zurückgeführt werden kann, auch wenn 24 hpi keine Phosphorylierung mehr nachweisbar war, obwohl Jak1 noch teilweise vorhanden war (Abb. 39B).

Zusammenfassend zeigten die Befunde (mit publizierten Daten konsistent), dass HCMV-Towne STAT2 nicht degradiert und im Gegensatz zu MCMV die Phosphorylierung, DNA-Bindung und Aktivierung von STAT1, STAT2 und STAT3 (wahrscheinlich durch den Verlust von Jak1) inhibiert.



Um die beschriebenen Befunde für die HCMV-kodierte Inhibition der Typ I IFN Signaltransduktion (Miller et al., 1999) zu reproduzieren, wurde die DNA-bindung des IFN-induzierten ISGF3-Komplex nach einer HCMV-Infektion analysiert. HCMV-Towne blockiert die IFN- $\alpha$ -abhängige Induktion des DNA-bindenden Faktors ISGF3 (STAT1:STAT2:IRF-9): Sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleoplasma wurden nach IFN-Behandlung in HCMV-Towne infizierten Zellen keine DNA-bindenden ISGF3-Komplexe nachgewiesen (Abb. 40A, Vergleich Spur 3 und 5). Dieser Effekt wurde bei zwei unterschiedlichen HCMV-Towne-Varianten (dem HCMV-Towne Virus aus dem Hengel-Labor und einem HCMV-Towne Virus, das ursprünglich aus dem Mocarski Labor stammt und von Dr. M. Nevels zur Verfügung gestellt

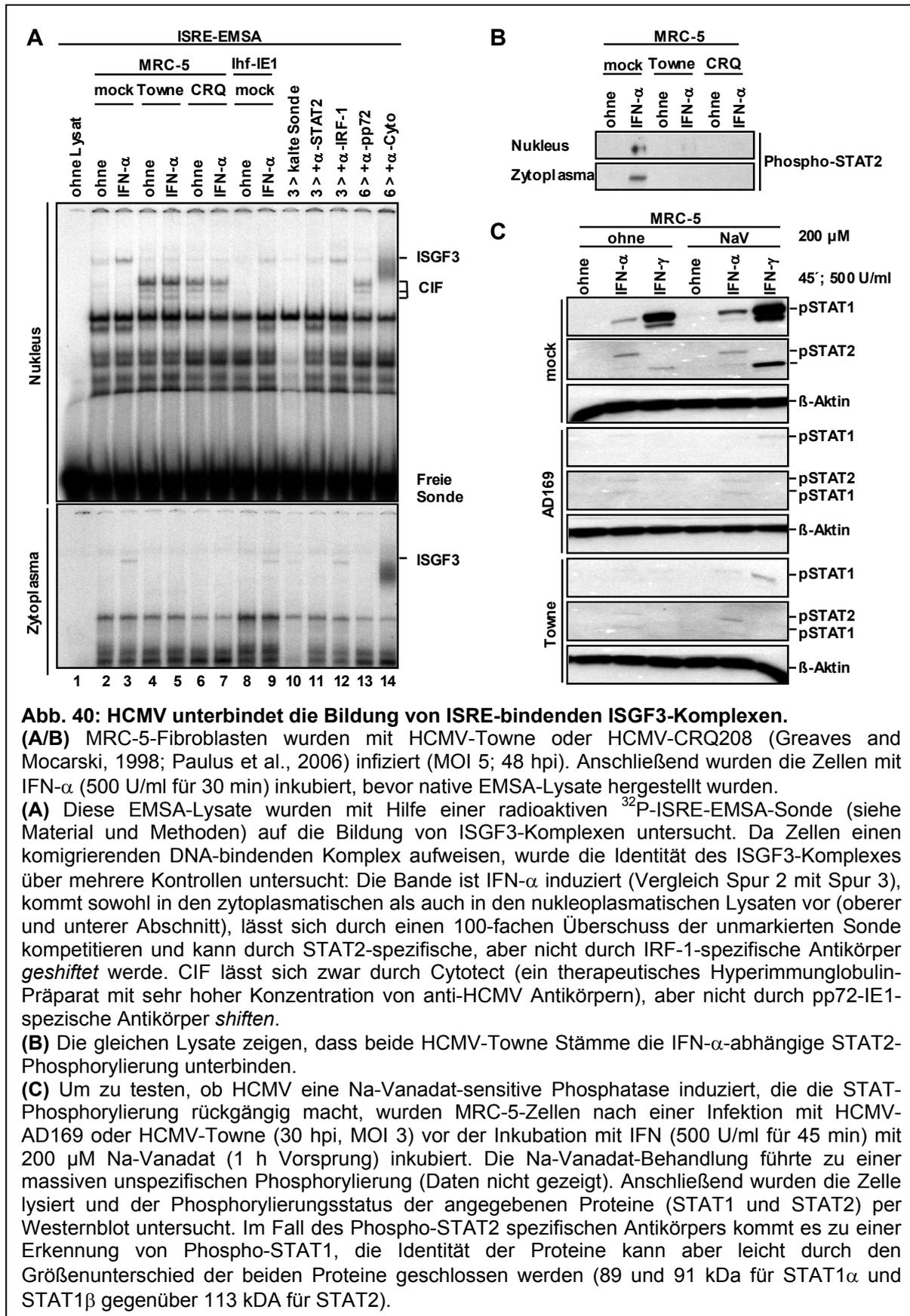
## Ergebnisse

wurde (Greaves und Mocarski, 1998; Paulus et al., 2006) beobachtet (Abb. 40A, Spuren 5 und 7).

Da gezeigt wurde, dass HCMV-kodiertes pp72-IE1 STAT2-bindet, aber nicht degradiert und den ISGF3-Komplex nicht zerstört (Paulus et al., 2006), wurde untersucht, ob pp72-IE1-positive Zellen die DNA-Bindung von ISGF3 (STAT2:STAT1:IRF-9) unterbinden. Es stellte sich jedoch heraus, dass pp72-IE1-positive Zellen (ihf-IE1) die Bildung von ISGF3 nach IFN-Behandlung erlauben (Abb. 40, Spur 9). Der ISGF3-Komplex wurde durch Konkurrenz mit nicht-markierter Sonde (Abb. 40A, Spur 10) und durch einen *supershift* mit einem STAT2-Antikörper (Abb. 40A, Spur 11) identifiziert.

Erneut zeigte sich der/die ISRE-bindende(n), HCMV-induzierten Faktor(en) CIF. Dieser Faktor wird nur in den nukleären Lysaten nachgewiesen und findet sich nicht im Zytoplasma (Abb. 40A). Da in pp72-IE1-positiven Zellen kein CIF nachweisbar war, und CIF in HCMV-Towne-infizierten Zellen nicht durch pp72-IE1-spezifische Antikörper, aber durch ein HCMV-reaktives Hyperimmunglobulin-Präparat *geshifted* wurde (Abb. 40A, Spur 13 resp. Spur 14), wurde außerdem geschlossen, dass IE1-pp72 nicht mit CIF identisch ist. Es scheint also neben dem STAT2-bindenden Protein in HCMV-Towne zusätzlich ein ISRE-Promotor-bindendes Protein zu existieren. In den Lysaten ließ sich parallel auch kein phosphoryliertes STAT2 nachweisen (Abb. 40B), so dass der Verlust von ISGF3 nicht verwunderlich ist, da die Phosphorylierung eine Voraussetzung für die DNA-Bindung ist.

Da auf einer wissenschaftlichen Konferenz vorgeschlagen wurde, dass der Verlust der Phosphorylierung auf der Induktion der STAT-reaktiven Phosphatase SHP-2 beruhen könnte und somit für den Phosphataseinhibitor Na-Vanadat sensitiv sein könnte, wurde untersucht, ob sich STAT1 und STAT2-Phosphorylierung durch Na-Vanadat wiederherstellen lassen. Allerdings konnte selbst bei einem „Vorsprung“ des Na-Vanadats von 1 h bei einer noch vertretbaren Konzentration von 200  $\mu$ M keine Wiederherstellung der STAT-Phosphorylierung beobachtet werden (Abb. 40C). Die Diskrepanz zu den fremden Daten liegt wahrscheinlich an dem Zeitpunkt der Inhibitorzugabe. In den (fremden) Experimenten wurde Na-Vanadat früher nach der Infektion zugegeben (16-18 h). Die STAT-Phosphorylierungsinhibition scheint zu späteren Zeitpunkten (>30 h) demnach eher auf dem Verlust der Kinase Jak1 als auf der Induktion einer Na-Vanadat-sensitiven Phosphatase zu beruhen.



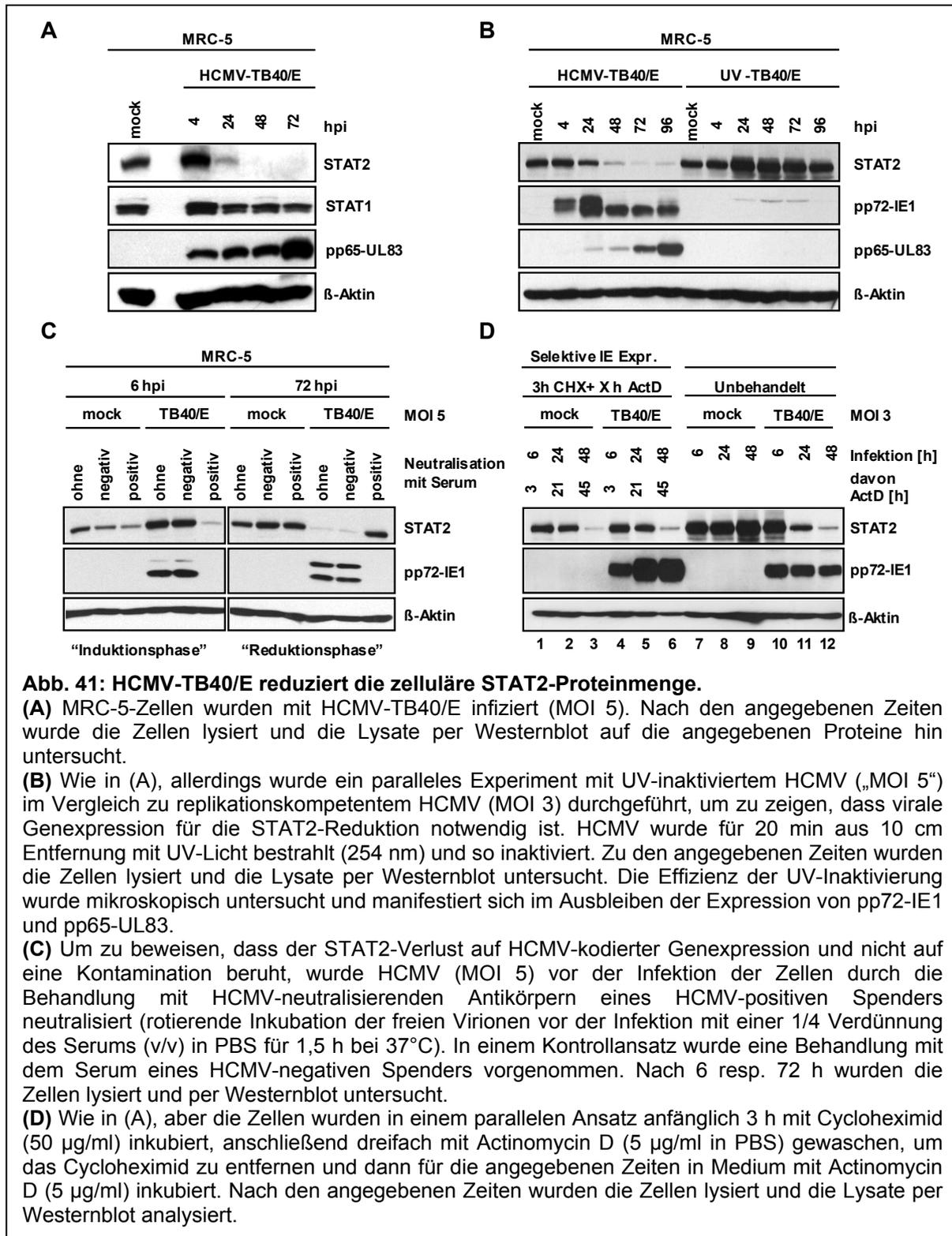
### 2.7.1 HCMV-TB40/E reduziert die zelluläre STAT2-Menge

In den letzten Jahren wurde nachgewiesen, dass sich unterschiedliche HCMV-Laborstämme und -Isolate bezüglich definierter immunespezifischer Eigenschaften unterscheiden können (z.B. Vergleich zwischen (Abate et al., 2004) und (Browne und Shenk, 2003)). Es wurde deshalb untersucht, ob andere HCMV-Isolate als HCMV-Towne STAT2 degradieren können. Interessanterweise zeigte sich, dass der endotheliotrope HCMV-Stamm TB40/E (Sinzger et al., 2008b) in der Lage war, die zelluläre STAT2-Menge zu senken (Abb. 41A). Der Verlust von STAT2 erfolgte nicht, wenn die Zellen mit UV-inaktiviertem HCMV „infiziert“ wurden (Abb. 41B), so dass geschlossen wurde, dass virale Genexpression für diesen Verlust von STAT2 verantwortlich ist. Zellen, die mit UV-inaktiviertem HCMV- TB40/E infiziert worden waren, zeigten eine zusätzliche STAT2-Induktion (Abb. 41B). Diese beruhte wahrscheinlich auf IFN-abhängiger STAT2-Expressionsinduktion (Lehtonen et al., 1997), die durch die initiale IFN-Induktion durch die HCMV-Infektion erfolgt. Demzufolge unterschätzt der Vergleich von mock-infizierten Zellen mit HCMV-TB40/E-infizierten Zellen die reale STAT2-Reduktion sogar, da der gesteigerten STAT2-Transkription trotzdem eine Reduktion der Proteinmenge gegenübersteht. Der Vergleich mit UV-inaktiviertem Virus zeigte, dass es sich um ein „lebendes“ Prinzip in der Viruspräparation handelt und nicht nur eine Reaktion der Zelle auf Viruspartikel ist. Um zu beweisen, dass die Reaktion durch replikationskompetentes HCMV ausgelöst wurde und nicht durch eine Kontamination mit anderen Pathogenen oder Viren wie z.B. SV-5 (die in einigen Zelllinien scheinbar vorhanden sind und teilweise sogar das STAT-Proteinlevel beeinflussen (Young et al., 2007)), wurde ein Serum eines HCMV-seropositiven Donors mit einem hohen Titer an HCMV-neutralisierenden Antikörpern verwendet. Diese Antikörper verhinderten die Infektion der Zellen durch HCMV und blockierten dadurch sowohl die frühe STAT2-Induktion und später auch die STAT2-Reduktion (Abb. 41C). Die Neutralisation des STAT2-Verlustes wurde nicht durch ein Serum eines HCMV-negativen Donors ausgelöst. Ohne den Zusatz von Antikörpern wurde wie erwartet erst STAT2 induziert und später Virus-abhängig reduziert (Abb. 41C). Die STAT2-Reduktion beruht also auf viraler Genexpression durch HCMV.

Die HCMV-Genexpression wird in *IE*, *early* und *late* Gene unterteilt. Definitionsgemäß wird die Transkription von *IE*-Genen ohne virale Transaktivatorproteine autark durch zelluläre Transkriptionsfaktoren induziert. Experimentell werden solche Gene nach einer reversiblen Behandlung mit Cycloheximid (CHX) (virale *IE*-Gene werden transkribiert, aber nicht translatiert) exprimiert. Um diese Transkripte in Proteine zu übersetzen, wird das CHX gegen Actinomycin D ausgetauscht, so dass *IE*-mRNAs translatiert werden, die *IE*-Proteine aber durch

## Ergebnisse

die Blockade der Transkription keine *early*-Gene induzieren können. Um zu untersuchen, ob IE-Proteine für die Wirkung von HCMV auf STAT2 ausreichend sind, wurde eine selektive IE-Genexpression (3h CHX) durchgeführt und anschließend die Zellen in Anwesenheit von Actinomycin D für verschiedene Zeiten inkubiert. Bei diesem Versuch ist zu beachten, dass auch die zelluläre Transkription zum Erliegen kommt und die Proteine deshalb ihrer Halbwertszeit folgend verschwinden, so dass die STAT2-Proteinmenge über die Zeit zurückgeht. Wenn aber IE-Genprodukte für die Reduktion von STAT2 verantwortlich wären, würde man eine beschleunigte STAT2-Reduktion in infizierten Zellen erwarten. Zu einer beschleunigten STAT2-Reduktion kam es jedoch nicht (Abb. 41C). STAT2 war in Zellen, die IE-Proteine exprimierten, genauso stabil wie in uninfizierten. In einem parallelen Experiment wurde die grundsätzliche STAT2-Reduktion nach der HCMV-Infektion kontrolliert. Aus diesem Experiment lässt sich schließen, dass virale *early*-Expression für die STAT2-Reduktion nötig ist. Außerdem unterstreicht dieses Experiment erneut die Abhängigkeit von viraler Genexpression. Interessanterweise ist der STAT2-Verlust in Zellen, die mit HCMV infiziert wurden, schneller als in mock-infizierten Zellen, in denen die Proteinneusynthese durch CHX und ActD inhibiert wurde (Abb. 41D – Vergleich des Verhältnisses von Spur 1 zu 2 mit dem Verhältnis der Bandenstärken von Spur 10 und 11). Daraus wurde geschlossen, dass der HCMV-vermittelte STAT2-Verlust schneller als eine Blockade der Protein *de novo*-Synthese ist und somit höchstwahrscheinlich posttranskriptional erfolgt.



**Abb. 41: HCMV-TB40/E reduziert die zelluläre STAT2-Proteinmenge.**

(A) MRC-5-Zellen wurden mit HCMV-TB40/E infiziert (MOI 5). Nach den angegebenen Zeiten wurde die Zellen lysiert und die Lysate per Westernblot auf die angegebenen Proteine hin untersucht.

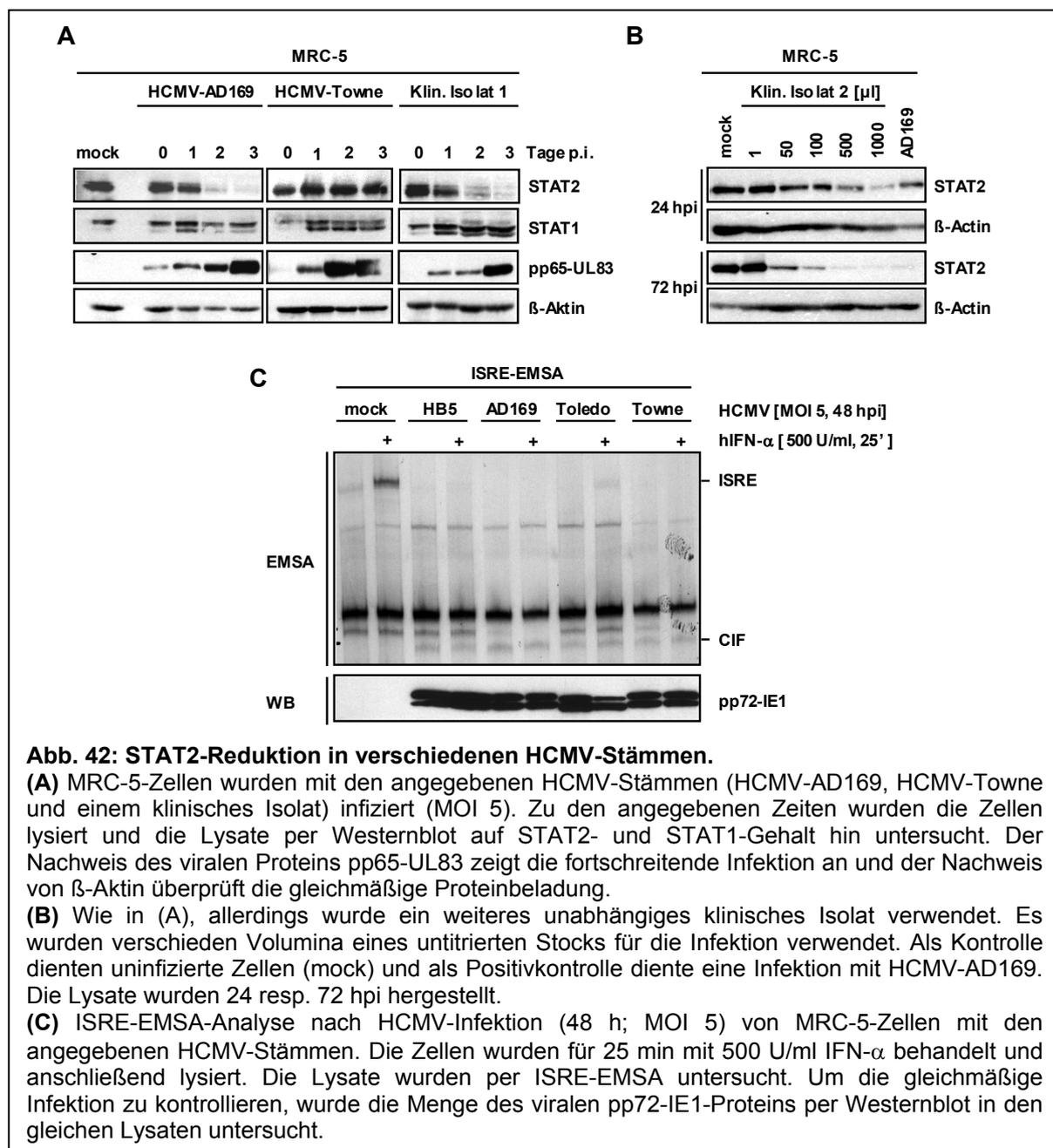
(B) Wie in (A), allerdings wurde ein paralleles Experiment mit UV-inaktiviertem HCMV („MOI 5“) im Vergleich zu replikationskompetentem HCMV (MOI 3) durchgeführt, um zu zeigen, dass virale Genexpression für die STAT2-Reduktion notwendig ist. HCMV wurde für 20 min aus 10 cm Entfernung mit UV-Licht bestrahlt (254 nm) und so inaktiviert. Zu den angegebenen Zeiten wurden die Zellen lysiert und die Lysate per Westernblot untersucht. Die Effizienz der UV-Inaktivierung wurde mikroskopisch untersucht und manifestiert sich im Ausbleiben der Expression von pp72-IE1 und pp65-UL83.

(C) Um zu beweisen, dass der STAT2-Verlust auf HCMV-kodierter Genexpression und nicht auf eine Kontamination beruht, wurde HCMV (MOI 5) vor der Infektion der Zellen durch die Behandlung mit HCMV-neutralisierenden Antikörpern eines HCMV-positiven Spenders neutralisiert (rotierende Inkubation der freien Virionen vor der Infektion mit einer 1/4 Verdünnung des Serums (v/v) in PBS für 1,5 h bei 37°C). In einem Kontrollansatz wurde eine Behandlung mit dem Serum eines HCMV-negativen Spenders vorgenommen. Nach 6 resp. 72 h wurden die Zellen lysiert und per Westernblot untersucht.

(D) Wie in (A), aber die Zellen wurden in einem parallelen Ansatz anfänglich 3 h mit Cycloheximid (50  $\mu$ g/ml) inkubiert, anschließend dreifach mit Actinomycin D (5  $\mu$ g/ml in PBS) gewaschen, um das Cycloheximid zu entfernen und dann für die angegebenen Zeiten in Medium mit Actinomycin D (5  $\mu$ g/ml) inkubiert. Nach den angegebenen Zeiten wurden die Zellen lysiert und die Lysate per Westernblot analysiert.

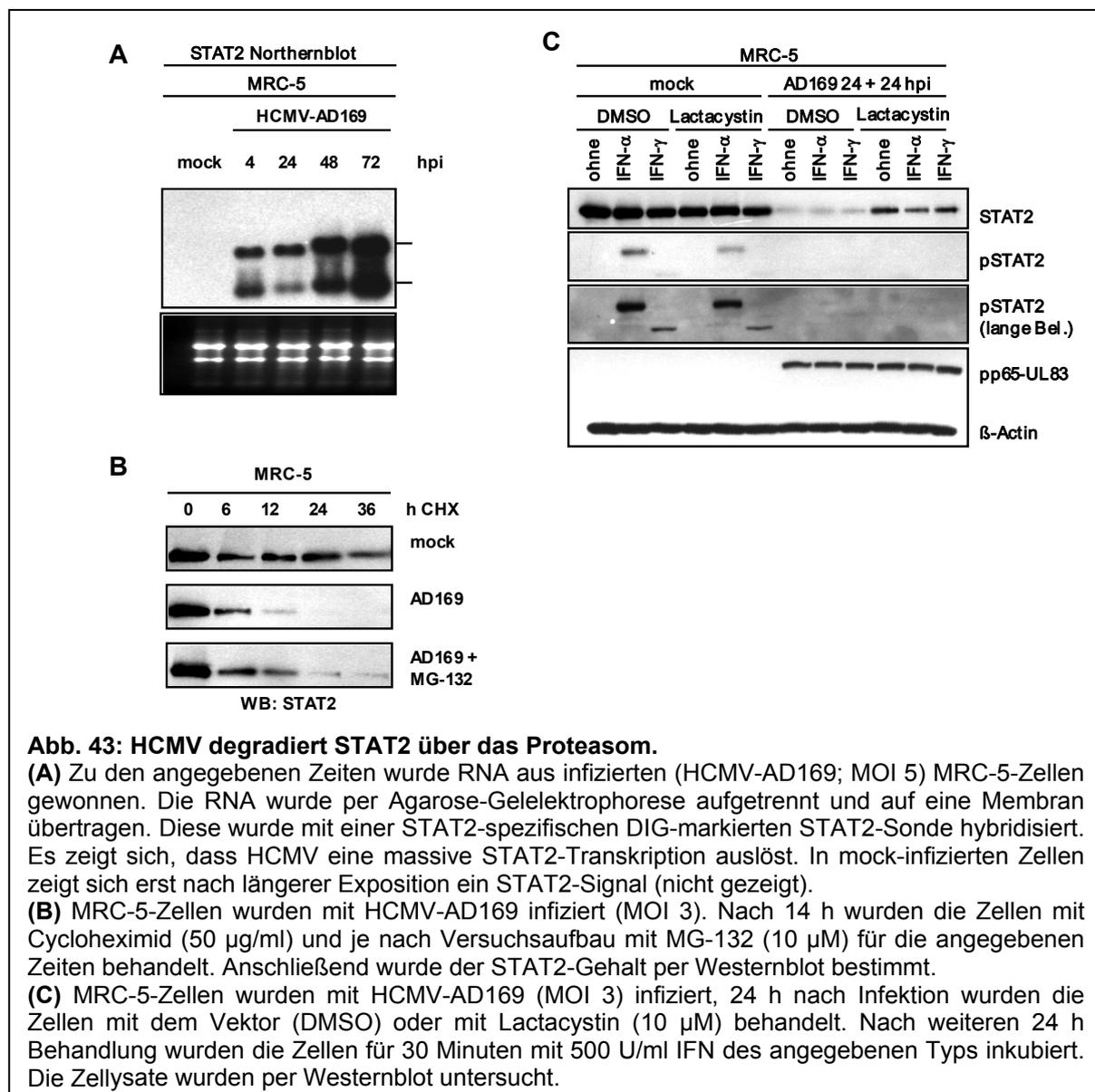
Da eindeutig gezeigt werden konnte, dass HCMV-TB40/E in der Lage ist, die STAT2-Proteinmenge zu senken (Abb. 41), HCMV-Towne jedoch nicht (Abb. 39 und 40), scheint es also Unterschiede zwischen den HCMV-Isolaten in Bezug auf STAT2-Reduktion zu geben, die zu der Annahme führten, dass HCMV STAT2 nicht degradiert (Miller et al., 1999). Um den generell gültigen Phänotyp zu untersuchen, wurden weitere HCMV-Stämme und ein klinisches

Isolat, das nur durch ca. 3-5 Zellkultur-Passagen expandiert worden war, analysiert. Es zeigte sich, dass dieses Isolat, genauso wie der HCMV-Stamm AD169, ebenfalls in der Lage war, die STAT2-Menge zu reduzieren (Abb. 42A). Ein weiteres klinisches Isolat reduzierte die STAT2-Menge ebenfalls Virusdosis-abhängig (Abb. 42B). Der natürliche Phänotyp von HCMV scheint also der STAT2-Abbau zu sein, und HCMV-Towne scheint diese Fähigkeit sekundär verloren zu haben. Obwohl HCMV-Towne die STAT2-Menge nicht senken kann (Abb. 39B und 42A), wird die IFN- $\alpha$ -induzierte ISGF3-Komplexbildung (STAT2:STAT1:p48) durch HCMV-Towne, gemessen per ISRE-EMSA, genauso effizient blockiert wie von den Stämmen HCMV-HB5, HCMV-AD169 und HCMV-Toledo (Abb. 42C).



### 2.7.2 HCMV degradiert STAT2

HCMV senkt das STAT2-Protein, genau wie MCMV, ausschließlich über einen posttranskriptionellen Mechanismus, da die mRNA-Menge von STAT2 unter Infektion ansteigt (Abb. 43A), während die Proteinmenge im vergleichbaren Zeitraum absinkt (siehe obere Abb.). Um den Effekt von viraler Genexpression auf bereits bestehendes STAT2-Protein zu untersuchen, wurde die Halbwertszeit nach einer Behandlung mit Cycloheximid analysiert. Es zeigte sich, dass die Halbwertszeit von STAT2 durch eine HCMV-AD169 Infektion deutlich gesenkt wurde. Dieser Abbau konnte zumindest partiell durch MG-132, einem Inhibitor des Proteasoms, aufgehoben werden (Abb. 43B).

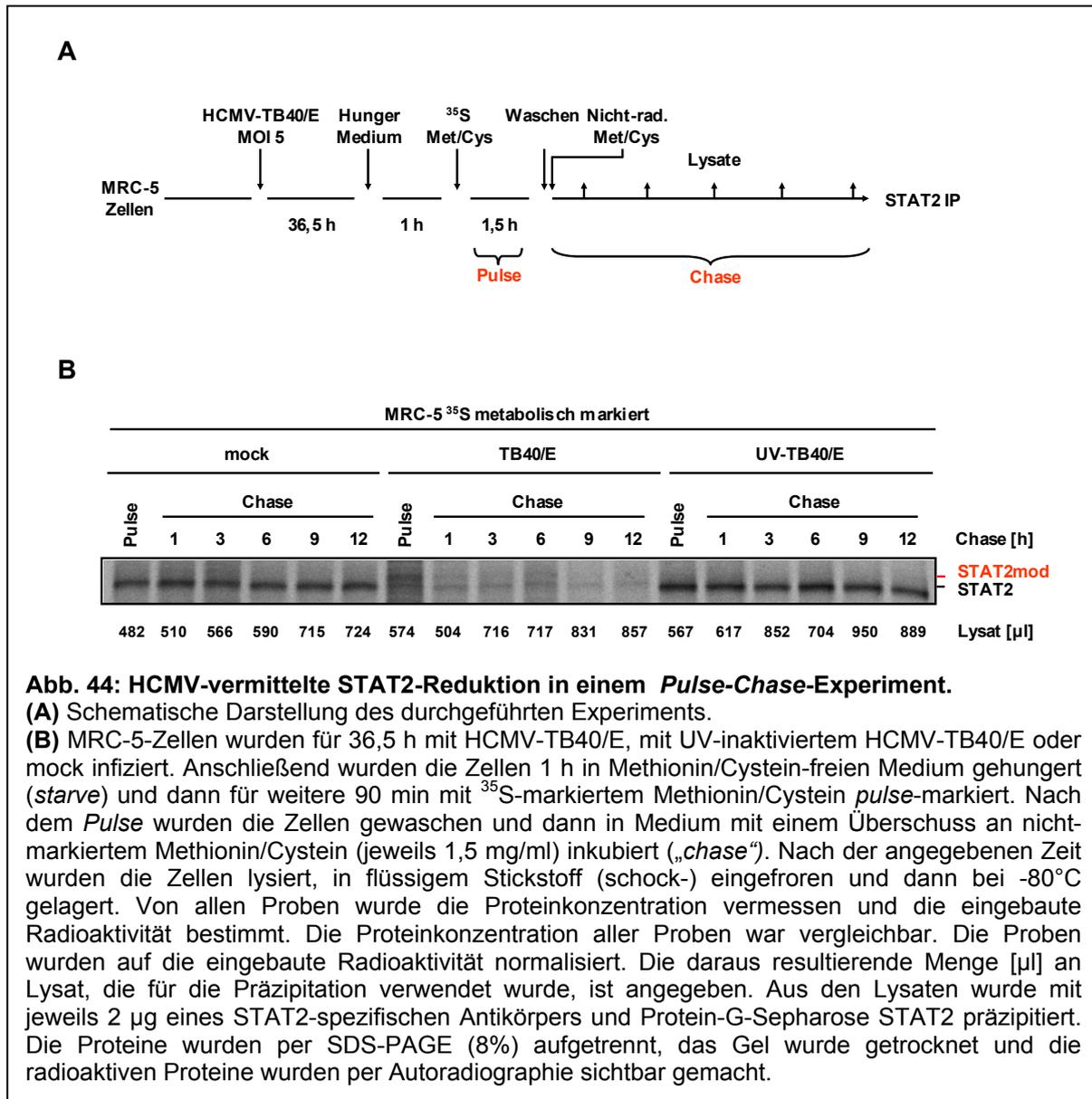


Die HCMV-vermittelte STAT2-Reduktion scheint also (wie im Falle von MCMV) über das Proteasom abzulaufen. Interessanterweise konnte auch die Behandlung mit Lactacystin, einem

## Ergebnisse

anderen Inhibitor des Proteasoms, die STAT2-Menge teilweise wiederherstellen (Abb. 43C), die Phosphorylierung der STAT-Moleküle durch IFN- $\alpha$  oder IFN- $\gamma$  wurde aber nicht wiederhergestellt. Deshalb muss geschlossen werden, dass HCMV-kodierte IFN-Antagonisten der STAT-Phosphorylierung existieren, die das Proteasom nicht benötigen.

Um die Degradation über ein Experimentalsystem, das ohne pharmakologische Inhibitoren des Proteasoms oder der Translation auskommt, nachweisen zu können, wurde der STAT2-Abbau in einem *Pulse-Chase*-Experiment analysiert. Zellen wurden nach Infektion für 90 min (*pulse*) mit radioaktivem  $^{35}\text{S}$ -Methionin/Cystein markiert. Nach dieser Phase des Einbaus einer metabolischen Markierung mit Radioisotopen in die Proteine wurden die Zellen mehrfach gewaschen und mit einem Überschuss von nicht-markiertem Methionin/Cystein inkubiert (*chase*), um die Zeit zu bestimmen, die die im *pulse* synthetisierten Proteine in der Zelle nachweisbar sind. Nach dem *chase* wurden die Zellen lysiert und STAT2 per Immunpräzipitation aus den Zellen gereinigt. Es zeigte sich, dass in Zellen, die mit HCMV-TB40/E infiziert worden waren, deutlich weniger STAT2 präzipitiert werden konnte als in Zellen, die mock-infiziert oder mit UV-inaktiviertem HCMV infiziert wurden (Abb. 44). Die Halbwertszeit von STAT2 scheint in HCMV-infizierten Zellen also verkürzt zu sein. Allerdings zeigte sich, dass im Lysat nach dem *pulse* auch schon weniger STAT2 nachweisbar war. Dies kann unterschiedlich interpretiert werden. Einerseits kann es als Hinweis gewertet werden, dass bereits während des *pulses* STAT2 dem Proteasom zugeführt und reduziert wird. Da höhermolekulare STAT2-Formen („STAT2mod“) spezifisch in HCMV-infizierten Zellen nachgewiesen werden konnten, die eine sehr kurze Halbwertszeit aufwiesen, scheint diese Interpretation einleuchtend. Andererseits kann nicht ausgeschlossen werden, dass HCMV in der Lage ist, die posttranskriptionelle Proteinsynthese (z.B. auf Ebene der Translation durch Mechanismen wie MikroRNAs) zu blockieren (die mRNA ist vorhanden, so dass die Transkription nicht negativ beeinflusst wird [Abb. 43A]).



**Abb. 44: HCMV-vermittelte STAT2-Reduktion in einem *Pulse-Chase*-Experiment.**

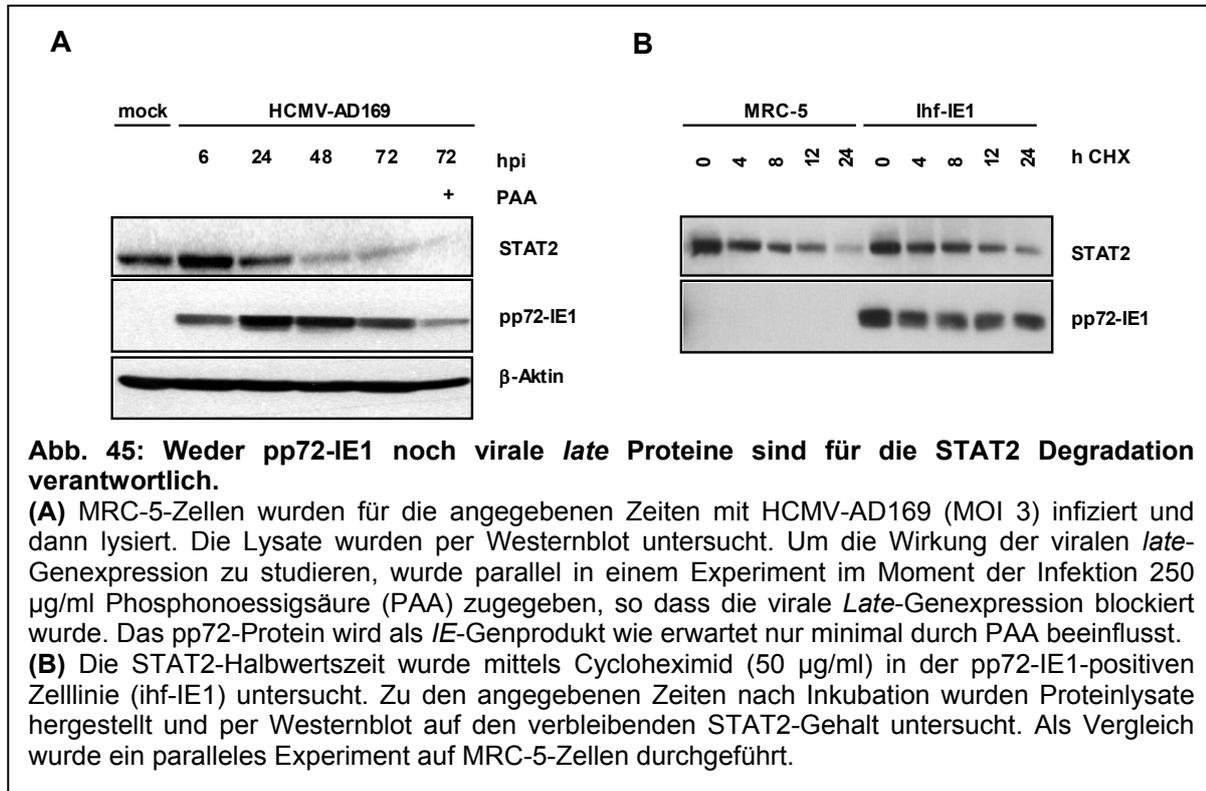
(A) Schematische Darstellung des durchgeführten Experiments.

(B) MRC-5-Zellen wurden für 36,5 h mit HCMV-TB40/E, mit UV-inaktiviertem HCMV-TB40/E oder mock infiziert. Anschließend wurden die Zellen 1 h in Methionin/Cystein-freien Medium gehungert (*starve*) und dann für weitere 90 min mit <sup>35</sup>S-markiertem Methionin/Cystein *pulse*-markiert. Nach dem *Pulse* wurden die Zellen gewaschen und dann in Medium mit einem Überschuss an nicht-markiertem Methionin/Cystein (jeweils 1,5 mg/ml) inkubiert („*chase*“). Nach der angegebenen Zeit wurden die Zellen lysiert, in flüssigem Stickstoff (schock-) eingefroren und dann bei -80°C gelagert. Von allen Proben wurde die Proteinkonzentration vermessen und die eingebaute Radioaktivität bestimmt. Die Proteinkonzentration aller Proben war vergleichbar. Die Proben wurden auf die eingebaute Radioaktivität normalisiert. Die daraus resultierende Menge [μl] an Lysat, die für die Präzipitation verwendet wurde, ist angegeben. Aus den Lysaten wurde mit jeweils 2 μg eines STAT2-spezifischen Antikörpers und Protein-G-Sepharose STAT2 präzipitiert. Die Proteine wurden per SDS-PAGE (8%) aufgetrennt, das Gel wurde getrocknet und die radioaktiven Proteine wurden per Autoradiographie sichtbar gemacht.

Für den Verlust von STAT2 in infizierten Zellen ist die Expression von späten viralen Transkripten nicht notwendig, da die Inkubation mit Phosphonoessigsäure (PAA), die die virale DNA-Polymerase inhibiert und dadurch auch die Expression von späten viralen Transkripten blockiert (Honess und Watson, 1977), die STAT2-Proteinmenge nicht wieder herstellt (Abb. 45A).

Da für pp72-IE1 von HCMV-Towne gezeigt wurde, dass es STAT2 bindet (Paulus et al., 2006), wurde untersucht, ob sich die STAT2-Halbwertszeit in pp72-IE1 positiven Zellen von der Halbwertszeit in „normalen“ Zellen unterscheidet. Da die Δpp72-HCMV Mutante im HCMV-Towne Hintergrund hergestellt wurde, kann der STAT2-Abbau hier nicht sinnvoll untersucht werden. Diese Mutante weist einen massiven Wachstumsnachteil in wt-Zellen auf, der sich durch den Einsatz der pp72-IE1-positiven Zelllinie komplementieren lässt ((Greaves und

Mocarski, 1998) und eigene Beobachtung), so dass das exprimierte pp72-IE1 in dieser Zelllinie als funktionell angesehen werden kann. In den pp72-IE1-positiven Zellen fand sich eine STAT2-Halbwertszeit wie in MRC-5-Zellen (Abb. 45B), so dass ein funktionelles pp72-IE1 anscheinend nicht in der Lage ist, die STAT2-Halbwertszeit zu reduzieren.



Zusammenfassend zeigen die Befunde, dass HCMV für ein frühes (*early*) Gen kodiert, welches für den STAT2-Abbau verantwortlich ist, da weder die *IE*-Gen-Expression alleine hinreichend für den Abbau ist (Abb. 41D), noch virale *late*-Genprodukte für den STAT2-Abbau essentiell sind (Abb. 45B).

### 2.7.3 Das pM27-homologe Protein pUL27 ist für die Degradation nicht verantwortlich

HCMV und MCMV besitzen kolinieare Genome, die für homologe Proteine kodieren. Im HCMV-Genom findet sich an vergleichbarer Position ein homologes Gen zu *M27*: *UL27*. Die beiden Genprodukte sind über einen zentralen Teilbereich homolog. Bezogen auf pM27 finden sich homologe Strukturen zwischen den As 43 und As 444, während danach (bis zur letzten Aminosäure) keine weiteren Homologien gefunden werden. Abbildung 43 zeigt einen Vergleich der beiden Proteine.

## Ergebnisse

```

pM27 43 D SFCR RFIA EHLVQLRN YEQA SRFG FVMD AWSR ESGKATEI RSFI RLNK PFNH - IEL KYS
+ FC +F+ +L +RN ++A R G + + + + E + + + S
pUL27 49 E EFCH QFLRAYLT P IRN RQEA VRAG LLCR TPED LAAA GGQK HKTP APKH PKHA MVYI RRS

pM27 102 Y LKNA RLAT ANGG YGIR GLTLAWDS AING LLRE IEFV PFAN PFSF PSCD GIAK ILFD LEW
L ++ AT A + G Y IR GL TL D A + W LR + P F + + + + + + +
pUL27 109 C LVHS ACAT AHGK VDIR GLTL ESDL AVWA ALRG VPLP PDPQ HFRW LNAG AFRR LVHE AQY

pM27 162 R PEAS DSCK ALGRATVA IQYA ISLL YGYD RSAS MSRY LRRL VNEL IDLH DRMR NMSL MSS
PE S + K + A QY + L Y + + YLR+L + +L+ R+
pUL27 169 L PEIS RAAK RIAL AVAT GQV VCTL LDYK TFGT RTHY LRQL CSMT EELY LRLD G--- TLC

pM27 222 L R I P G R D L E I V Q R L L P E R I C Q Q L G I P F S F E S C L L --- D S Y Y E V V E M T M E V I Y D Q L C Y C R E
L + + E + + R L P + C + L + + + + + E + + + Y C
pUL27 226 L F L E P E E R E L I G R C L P A A L C R G L P V K Y R T H R A A V F F H A T F M A R A E A A L K D L Y A A F C - - -

pM27 279 C R M R R G E R L E R L R A Q K I G T K Y R R R N P D G I - - - - R L F E E N Y V R V A A Y P N I G V L R L P K I R H L
+ G + + P + E + R + + + G L P I R H L
pUL27 282 E C G D G R D N G G N H D G N D H G N D H S S L S P S A V A S H H S R L E H A E L R L E R N R H L G A F H L P A I R H L

pM27 335 S D E H Q T L V C G H L A R D L M Y D V H F G S S S P L A R V N G I P L P F T A V D C M D I D L G Y A L Y M A N N V Y F
+ V + + R D L F S + L P C + G Y A + Y + A + N
pUL27 342 T A G D V A R V Q D S V S R D L - - - - G F A D W S Q T L I D D Y F L L P - - A G W A C A N F R R G Y A M Y L A S N A V L

pM27 395 M L F L I R C V R D V V R S E Q R E Y V D L V T G L V R E A S V M L R R D V D A R I R A G - A D R F V 444
L + I R + R + R E + + + G V + + L + A + R G A P V
pUL27 397 A L R I I R L L R A S I R H E Y T A C I R M L S G D V Q R L - I R L F K G E A A L L R K G L A Q N F V 446

```

Maribavir induzierte Resistenzmutationen in UL27:

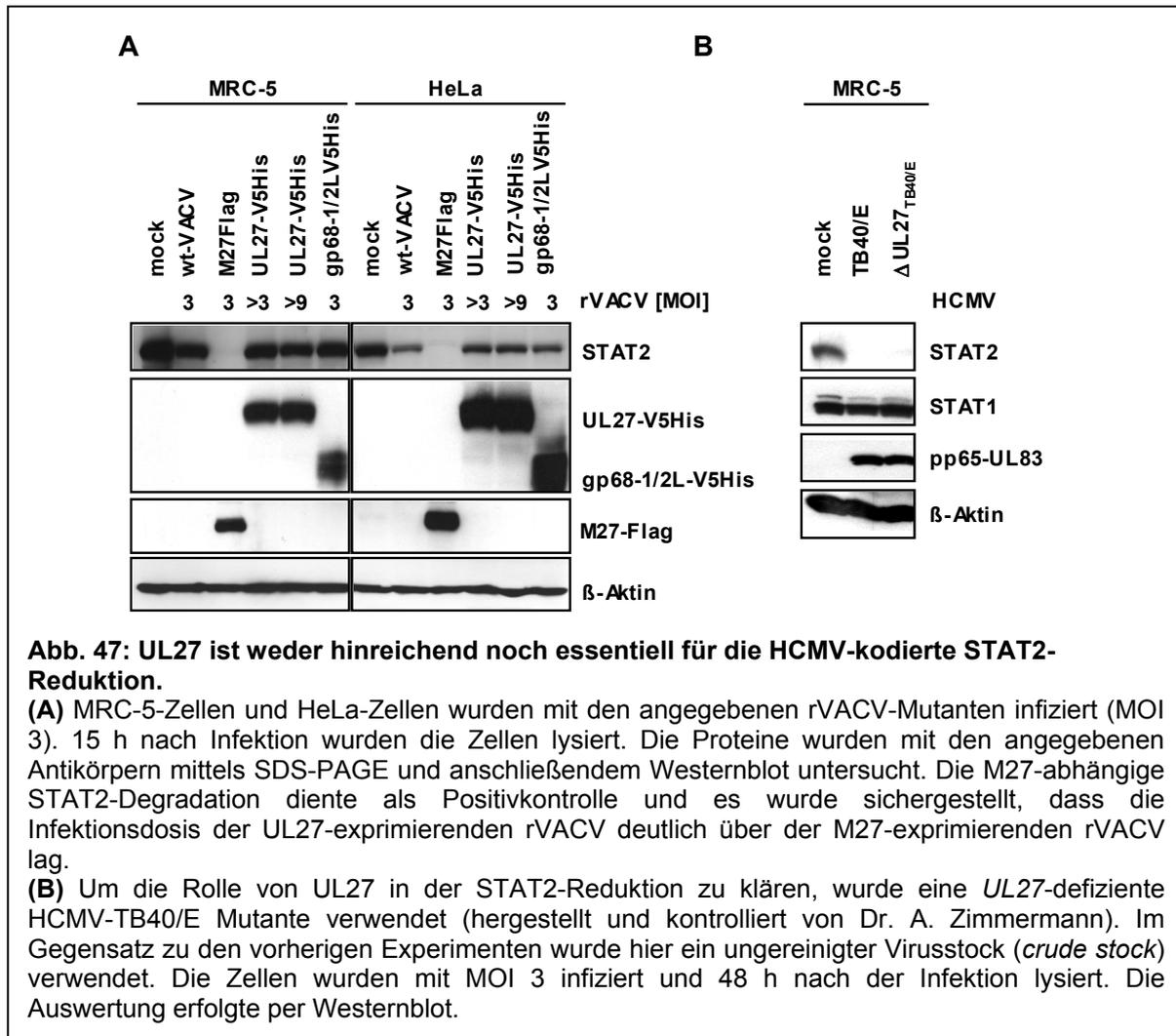
R233S  
A406V & C415stop  
W362R  
L335P

(Mutationen beschrieben in Komazin et al. J Virol 2003 und Chou et al. J Virol. 2004)

### Abb. 46: Vergleich der Proteine pM27 und pUL27.

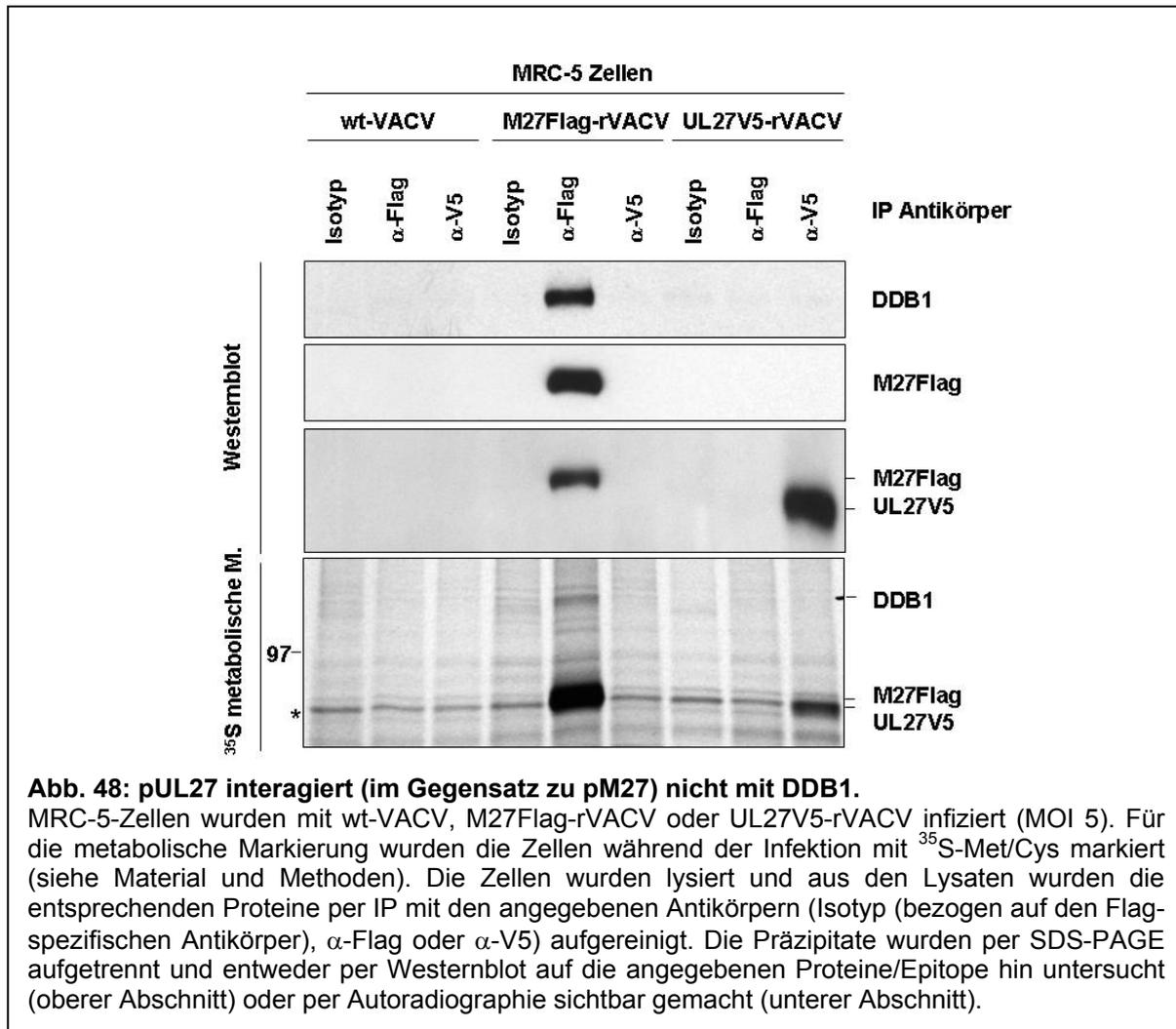
Ein Proteinalignment der viralen Proteine pUL27 (HCMV) und pM27 (MCMV) zeigt eine gewisse Homologie im Bereich zwischen As 43 und As 444 (bezogen auf pM27). Einige Resistenzmutationen, die zu einer Resistenz gegenüber dem antiviralen Therapeutikum Maribavir führen, wurden im *UL27*-Gen gefunden. Die entsprechenden Mutationen finden sich alle im homologen Bereich von pM27, betreffen allerdings nicht-konservierte Aminosäuren. Die jeweiligen Aminosäuren sind rot markiert und die entsprechenden Mutationen unter dem *Alignment* ausgewiesen. Eine Proteindomäne, die in den homologen „27“ Proteinen von HCMV, MCMV, Ratten-CMV und Tupaia-CMV stark konserviert ist, ist rot unterstrichen.

Auf Grund der MCMV-pM27-Befunde wurde untersucht, ob pUL27 für den HCMV-kodierten STAT2-Verlust verantwortlich ist. VACV exprimiertes pUL27 konnte jedoch die zelluläre STAT2-Menge weder in MRC-5-Zellen noch in HeLa-Zellen senken (Abb. 47A). Daraus wurde geschlussfolgert, dass pUL27, im Gegensatz zu pM27, nicht hinreichend für eine Reduktion von STAT2 ist. Um eine Beteiligung an der HCMV-abhängigen STAT2-Reduktion gänzlich auszuschließen, wurde *UL27* von Dr. Albert Zimmermann über BAC-Mutagenese aus dem HCMV-Genom entfernt und ein entsprechendes  $\Delta UL27$ -HCMV<sub>TB40/E</sub> rekonstituiert. Diese Virus-Mutante hat die Fähigkeit, STAT2 abzubauen, jedoch nicht verloren (Abb. 47B). pUL27 ist demnach nicht für den Abbau essentiell.



Obwohl *UL27* anscheinend nicht für die Reduktion der zellulären Menge an STAT2 kodiert, wurde untersucht, ob die andere hier aufgezeigte Eigenschaft von pM27, die DDB1-Bindung, eine konservierte Eigenschaft darstellt. Deshalb wurde getestet, ob pUL27-V5His mit DDB1 kopräzipitiert werden kann. Als Kontrolle diente die IP von pM27 mit DDB1. Die Interaktion wurde in humanen MRC-5-Zellen untersucht.

Es zeigte sich, dass wie erwartet DDB1 mit pM27-Flag in MRC-5-Zellen mit einem Flag-spezifischen Antikörper kopräzipitiert werden kann (Abb. 48). Die IP ist spezifisch, da sie mit einem V5-spezifischen Antikörper oder einem Isotyp-Kontroll-Antikörper nicht erfolgte und nur in Zellen erfolgte, die mit M27Flag-rVACV infiziert wurden. pUL27-V5His wurde mit einem V5-spezifischen Antikörper präzipitiert. Eine DDB1-Koimmunpräzipitation mit pUL27 erfolgte jedoch nicht (Abb. 48).



*UL27* liegt zwar, verglichen mit *M27*, an der entsprechenden Position im HCMV-Genom und weist eine gewisse Aminosäurehomologie auf (Abb. 46), die Funktion der DDB1-Bindung und der STAT2-Degradation ist allerdings nicht konserviert. Sowohl MCMV als auch HCMV degradieren STAT2 über das Proteasom, haben diese Fähigkeit jedoch wahrscheinlich unabhängig realisiert.

### 3. DISKUSSION

#### 3.1 pM27 INHIBIERT DIE JAK-STAT-SIGNALTRANSDUKTION, UM EINE EFFIZIENTE REPLIKATION IN ANWESENHEIT VON IFN ZU ERREICHEN

Wie in der vorgelegten Arbeit gezeigt wurde, induziert MCMV die Degradation von STAT2 mittels des viralen Proteins pM27. Durch den Verlust von STAT2 wird einerseits die kanonische Typ I IFN (IFN- $\alpha/\beta$ ) Signaltransduktion unterbunden, da STAT2 für diesen Signalweg essentiell ist. STAT2 ist (wie oben gezeigt) andererseits für einen Teil der IFN- $\gamma$ -abhängigen Signaltransduktion notwendig, so dass auch dieser Teil der IFN-abhängigen Signaltransduktion und damit der Induktion von antiviralen Effektorprogrammen durch pM27 verhindert wird. Außerdem wird die konstitutive Proteinmenge von STAT1 durch STAT2- und IFNAR1-abhängige Signalwege reguliert, so dass STAT2- resp. IFNAR1-defiziente Zellen signifikant reduzierte STAT1-Proteinmengen aufweisen (Park et al., 2000; Stockinger et al., 2002). Dieser sekundäre STAT1-Verlust ist für die antivirale Wirkung gegenüber dem in murinen Zellen hochgradig IFN- $\gamma$  sensitiven VACV nachteilig (Trilling et al., zur Publikation eingereicht). Da MCMV mittels pM27 in der Lage ist, STAT2 zu degradieren, ist es nicht verwunderlich, dass zu späten Zeitpunkten im viralen Replikationszyklus, nachdem STAT2 bereits nicht mehr nachweisbar ist, die STAT1-Proteinmengen sekundär absinken. Allerdings ist fraglich, ob dieser sekundäre Effekt, der in STAT2- und IFNAR1-defizienten Zellen eine Rolle spielt, wirklich von Bedeutung für die Wirkung von IFN auf die Virusreplikation ist. Wie oben bereits gezeigt wurde, ist  $\Delta M27$ -MCMV trotz des Verlustes der *M27*-Kodierungskapazität in der Lage, frühzeitig nach der Infektion die GAF-abhängige Transkription zu verhindern, obgleich der GAF-Komplex selbst nicht beeinträchtigt wird (Abb. 2C). Deshalb muss geschlossen werden, dass der noch nicht identifizierte Inhibitor des IFN- $\gamma$ -Signalweges selbst effizient genug ist, die Signalkaskade erfolgreich abzuschalten und weitere sekundäre Effekte, die erst spät innerhalb des viralen Replikationszykluses auftreten, die Wirkung von IFN- $\gamma$  wahrscheinlich nur geringfügig beeinflussen.

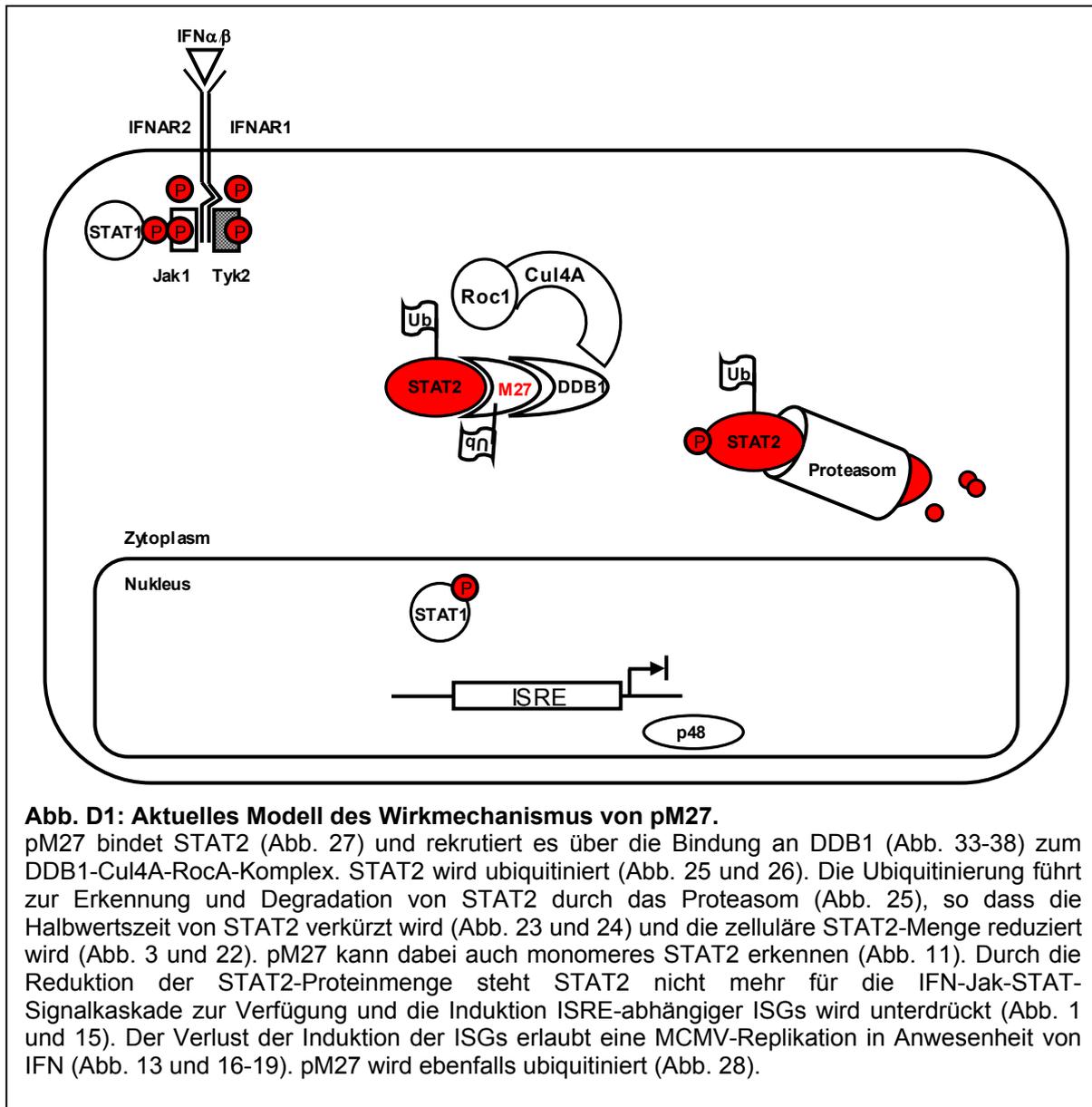
Der Verlust der *M27*-Kodierungskapazität führt zu einer signifikant reduzierten Replikationsfähigkeit in Typ I IFN-behandelten Zellen und zu einem massiv reduzierten Wachstumsvermögen in Typ II IFN-behandelten Zellen (Abb. 13). Beide Wachstumsnachteile des  $\Delta M27$ -MCMV gehen mit einem völligen Wachstumsverlust *in vivo* einher (Zimmermann et al., 2005), der jeweils anteilig in Mäusen, deren Typ I IFN oder Typ II IFN-Signalkaskade genetisch durch den Verlust von entweder IFNAR1 oder IFNGR1 unterbunden ist, wieder

aufgehoben werden kann (Zimmermann et al., 2005). Obwohl die IFN-Signaltransduktion zu einer positiven Selbstverstärkung führt („*positive feed-back-loop*“) (Marie et al., 1998), beeinflusst die Abwesenheit von *M27*-Kodierungskapazität die IFN-Induktion nicht, da die IFN-Induktion separat über andere virale Antagonisten bereits auf der Ebene der initialen IFN-Transkription vor Initiation der positiven autokrinen Verstärkung inhibiert wird (Le et al., 2008b).

HCMV kodiert ebenfalls für einen Antagonisten der STAT2-Funktion, der die STAT2-Menge ebenfalls posttranskriptionell, wahrscheinlich über das Proteasom, reduziert (Le et al., 2008a). Dieser Antagonist ist nicht mit *UL27*, dem homologen Gen zu *M27*, identisch (Le et al., 2008a).

### 3.2 AKTUELLES MODELL DES pM27-MECHANISMUS

Es konnte gezeigt werden, dass pM27 ein STAT2-spezifischer Antagonist der IFN-abhängigen Signaltransduktion ist. Durch die Bindung von sowohl STAT2 (Abb. 27), einem essentiellen Transkriptionsfaktor der Typ I IFN Signalkaskade, als auch DDB1 (Abb. 29-38 und 48), einem zellulären Adapterprotein des DDB1-Cul4A-RocA-Ubiquitinligase-Komplexes, wird STAT2 wahrscheinlich der Ubiquitinligase-Aktivität zugeführt. STAT2 wird polyubiquitiniert (Abb. 25 und 26). Diese Polyubiquitinierung führt zu einer Erkennung durch das Proteasom, die letztendlich zur proteolytischen Degradation von STAT2 führt (Abb. 25). Deshalb ist die Halbwertszeit von STAT2 in Anwesenheit von pM27 signifikant reduziert (Abb. 23 und 24) und die Verfügbarkeit von STAT2 nimmt ab (Abb. 3 und 22). STAT2 kann als monomeres Molekül unabhängig vom ISGF3-Komplex durch pM27 erkannt werden (Abb. 11). Durch den Verlust von STAT2 kann die Typ I IFN (IFN- $\alpha/\beta$ ) Signalkaskade nicht mehr erfolgreich ablaufen (Abb. 1 und 15). Deshalb kann IFN in pM27-positiven Zellen nicht mehr für eine Induktion von ISGs sorgen, die sonst die virale Replikation inhibieren. Das Ausbleiben der Expression dieser ISGs eröffnet MCMV eine Replikationsoption in Anwesenheit von IFN *in vitro* (Abb. 13, 16, 18, 19) und *in vivo* (Abenes et al., 2001; Zimmermann et al., 2005). Es ergibt sich deshalb für die Wirkung von pM27 das folgende molekulare Modell:



### 3.3 WEDER MCMV NOCH HCMV DEGRADIEREN STAT1 ODER STAT3

Obwohl MCMV als auch HCMV STAT2 der Degradation durch das Proteasom zuführen können, werden weder STAT1 noch STAT3 in gleichem Maße beeinflusst (z.B. Abb. 3, 9, 11, 14 und 41A). Es stellt sich die offensichtliche Frage, warum CMV nicht in der Lage ist, STAT1 oder STAT3 zu degradieren, bzw. keinen Vorteil aus der STAT1- oder STAT3-Degradation zieht. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, realisiert MCMV die STAT2-Degradation über pM27, welches sowohl mSTAT2 als auch hSTAT2, aber nicht STAT1 oder STAT3 degradieren kann (Abb. 9 und 11). Die Degradation von STAT1 würde den völligen Verlust der IFN-Signaltransduktion auslösen, da STAT1 sowohl für die Typ I IFN als auch für die Typ II IFN Signalverarbeitung essentiell ist (Durbin et al., 1996; Meraz et al., 1996). Die grundsätzliche Möglichkeit, STAT1 dem proteasomalen Abbau zuzuführen, wird von anderen Virus-Familien

(wie Paramyxoviren, z.B. SV-5 (Precious et al., 2005)) aufgezeigt, auch wenn die Degradation hier ebenfalls durch eine primäre STAT2-Bindung und eine Rekrutierung des kompletten ISGF3 zum Proteasom realisiert wird. Im Folgenden werden einige mögliche Erklärungen für die Frage, warum weder STAT1 noch STAT3 degradiert werden, diskutiert:

Die einfachste (aber unzutreffende) Erklärung wäre, dass der Verlust von STAT1 für das Virus oder die Zelle lethal ist. Diese Erklärung kann für STAT1 jedoch nicht zutreffen, da der Verlust von STAT1 weder die Lebensfähigkeit von einzelnen Zellen noch des gesamten Tiers beeinträchtigt (Durbin et al., 1996; Meraz et al., 1996) und MCMV in STAT1-defizienten Zellen repliziert. Eigentlich sollte es für CMV also grundsätzlich möglich sein, ein pM27-ähnliches Molekül zu evolvieren, das STAT1 degradiert.

Die komplette Deletion von STAT3 dagegen ist nicht möglich, da STAT3 für Mäuse essentiell ist (Takeda et al., 1997). Zwar kann jede der beiden STAT3-Splice-Isoformen isoliert deletiert werden, der völlige Verlust ist jedoch embryonal lethal (Maritano et al., 2004). Der Verlust von STAT3 ist für individuelle (Fibroblasten-) Zellen nicht lethal, da STAT3-defiziente Zellen verfügbar sind und in auch in dieser Arbeit verwendet wurden (Abb. 11). Es stellt sich jedoch die Frage, ob STAT3 für Zellen, in denen CMV *in vivo* repliziert, essentiell ist. Eigene Experimente zeigen interessanterweise, dass MCMV anscheinend in (krisen-) immortalisierten STAT3- $\beta$ -defizienten Zellen massiv attenuiert ist (Jassin Rashidi und Mirko Trilling, unpublizierter Befund). Es stellt sich somit die Frage, ob die Degradation von STAT1 und STAT3 gegenselektiert wird, da die beiden STAT-Moleküle (STAT1 und STAT3) sich untereinander so ähnlich sind. Unter Umständen ist eine selektive Degradation von einem dieser STAT-Moleküle (mit der Ausnahme von STAT2) spezifisch nicht möglich, ohne die anderen essentiellen STAT-Moleküle (STAT3) auch der Degradation zuzuführen. Möglicherweise schützt also die Ähnlichkeit zwischen immunrelevanten STAT-Molekülen (STAT1) und essentiellen STAT-Molekülen (STAT3) die ersteren vor der spezifischen Erkennung durch Antagonisten von Pathogenen.

Dies würde insbesondere im Lichte der Replikationsdaten auf STAT3 $\beta$ -defizienten Zellen und dem Wissen um die zentrale Rolle von STAT3 für die anti-inflammatorische Wirkung von IL-10, die von MCMV nachweislich zum eigenen Vorteil genutzt wird (Humphreys et al., 2007; Redpath et al., 1999), eine Erklärung für die fehlende Evolution von STAT1- und STAT3-Degradation sein.

Eine weitere mögliche biologische Erklärung wäre, dass die Evolution von MCMV nicht unter *in vitro* Bedingungen oder in SPF-Mäusen stattfand, sondern in wilden Mäusepopulationen (*Mus musculus*) in Gegenwart von einer Vielzahl von anderen Pathogenen und Parasiten. Der STAT1-

Verlust könnte den Wirt so massiv immunologisch beeinträchtigen, dass langfristig persistierende CMV-Viren einen selektiven Nachteil durch das Auftreten von sekundären Infektionen hätten, die die Wirtszelle und letztendlich den Wirt schwer schädigen würden.

### 3.4 VORHERSAGE MÖGLICHER INTERAKTIONSTELLEN VON pM27 UND STAT2

In der vorgelegten Arbeit konnte gezeigt werden, dass das MCMV-kodierte Protein pM27 ausreichend ist, um den Verlust von STAT2 zu induzieren. Zellen, die mit MCMV infiziert wurden, verlieren in einem Zeitfenster von wenigen Stunden nahezu die gesamte Menge an STAT2. Die Proteinmenge von STAT1 und STAT3 werden jedoch weder durch singuläre pM27-Expression mittels rVACV noch durch MCMV- oder HCMV-Infektion direkt negativ beeinflusst. Der Unterschied zwischen STAT2, STAT1 und STAT3 erlaubt somit eine Vorhersage möglicher Bindestellen zwischen pM27 und STAT2. Da pM27 für den Verlust ausreichend ist (Abb. 22) und pM27 und STAT2 kopräzipitiert werden können (Abb. 27), ist davon auszugehen, dass es sich um eine direkte Bindung handelt, auch wenn eine Interaktion über einen weiteren, unbekanntem Faktor formal nicht völlig ausgeschlossen werden kann. Eine solche direkte Interaktion ließe sich zum Beispiel über einen *yeast-two-hybrid* Ansatz oder über einen Far-Westernblot experimentell beweisen. Im Folgenden wird von einer direkten physischen Interaktion zwischen STAT2 und pM27 ausgegangen.

Die Bindung von pM27 an STAT2 scheint an einem konserviertem Bereich stattzufinden, da sowohl humanes STAT2 (hSTAT2) als auch STAT2 der Maus (mSTAT2) durch pM27 erkannt werden und STAT2 sowohl in humanen als auch in Maus-Zellen degradiert wird (Abb. 9). hSTAT2 und mSTAT2 unterscheiden sich in ihrem C-Terminus deutlich, da es im Genom der Maus zu einer Mikroinsertion in den Bereich, der für den C-Terminus von STAT2 kodiert, gekommen ist (Park et al., 1999). Der Vergleich mit dem STAT2-Protein der Ratte zeigt, dass es sich eigentlich nicht um eine Insertion handelt, sondern um eine 12- bis 13-fache Duplikation der in der Ratte nahezu komplett konservierten Sequenz, die für die Aminosäuren EPAPQVLL kodiert (eigener Befund). hSTAT2 und mSTAT2 weisen zwar über die ersten 712 Aminosäuren eine Identität von 76% auf, die restlichen 213 Aminosäuren weisen aber keinerlei Homologie auf und mSTAT2 ist 75 Aminosäuren länger als hSTAT2 (Park et al., 1999). Da sowohl mSTAT2 als auch hSTAT2 von pM27 degradiert werden (Abb. 9), ist anzunehmen, dass die Interaktion in einem konservierten Bereich stattfindet. Der heterologe C-Terminus scheint deshalb als Bindestelle ausgeschlossen. Da weder h/mSTAT1 noch h/mSTAT3 degradiert werden (Abb. 9, 11 und 22), liegt die Vermutung nahe, dass die Bindestelle für pM27 in h/mSTAT1 und h/mSTAT3 nicht vorhanden ist. STAT1 wurde dementsprechend auch nicht mit pM27, aber mit STAT2HA, kopräzipitiert (Abb. 34B). Aus diesen Axiomen ergibt sich eine Bindestelle, die

## Diskussion

zwar in hSTAT2 und mSTAT2 ähnlich oder identisch ist, in m/hSTAT1 und h/mSTAT3 allerdings verändert ist. Da die beiden STAT2-Moleküle über die ersten ca. 700 Aminosäuren hochgradig ähnlich sind, ergibt sich aus dem ersten Axiom nur eine bedingte Vorhersage für die Bindestelle. Da aber STAT1, STAT2 und STAT3 gleichfalls hoch homolog sind, können hier große Bereiche ausgeschlossen werden. Als mögliche Bindestellen für pM27 an STAT2 sind die folgenden STAT2-Bereiche, unter der Annahme, dass die beiden Axiome zutreffen und dass es sich um ein lineares Bindemotiv handelt, wahrscheinlich: AS<sub>88</sub>-AS<sub>112</sub>, AS<sub>138</sub>-AS<sub>167</sub>, AS<sub>214</sub>-AS<sub>228</sub>, AS<sub>291</sub>-AS<sub>315</sub>, AS<sub>379</sub>-AS<sub>402</sub> und AS<sub>523</sub>-AS<sub>500</sub>. Alle Bereiche sind zwischen hSTAT2 und mSTAT2 konserviert (siehe folgendes Schema), kommen aber weder in h/mSTAT1 oder h/mSTAT3 vor.

```
>protSTAT2mus
As:1-   maqwemlnqldslfldqlhqvysqsilpmdvrqhlatawiedqnwreaalg
As:51-   sddakanmlyfslfdqlnqwdhyssdsnhfllqhnrlrkfsrdiqtfpngp  Identität zu hSTAT2: 79%
As:101-  tqlaemifnllleeqrilnqraqaveqpppapeavvesqgleienriqg  Identität zu hSTAT2: 63%
As:151-  lhvdiefivrslrqikdeqdvfsfrytvfslkktsssdphqsqqaqlvqa
As:201-  tankvdrmrkevldiskglvqrlttlvdlllpkldekwvqqkscigapp  Identität zu hSTAT2: 66%
As:251-  pelqleqleqwltagakflfhlrqllkqlkemshmlrykgdmfgggvdlq  Identität zu hSTAT2: 84%
As:301-  naqvmelqrlqrsvfvetqpcmpqtlhrplliktgnkftvrtrllvrl
As:351-  qegseslkaevsvdrnsdlpgfrkfniltsnqklttpeeqgrqqliwdfg  Identität zu hSTAT2: 84%
As:401-  fltlveqravgagkngkplavteelhvisfvveyvyqglkmlqttdtlp
As:451-  vviiismnqlsiawasilwfnmlspnpknqgffcqapkapwslgplvsw
As:501-  qfssyvgrgldseqlgmlrklfgksckmedallswvdfckresppgkip  Identität zu hSTAT2: 71%
As:551-  fwtwldkilelvhdhldkldwkgrimgfvsrnqerrllkmlsgtflrlf
As:601-  setseggitcswvehqdddkeiysvqpytkevlqslplteii rhyqvla
As:651-  eenipenplrflypripdeaefgcyyqekvnfeeqrkylkhklivisnrq
As:701-  vdelqqplelkqdseslevnaelllahdqelpmnnqgtglvlgtelkvdpi
As:751-  lstapqvlllepapqvlllepapqvplepapqvlllepapqvlllepapqvll
As:800-  papqvlllepapqvlllepapqvlllepapqvlllepapqvlllepapqvlepa
As:851-  hllqqpsedlpedlqqisvedlkklsnpsteyittnenpmlagessgde
As:901-  tsipyhshfdadgllgwtldtf
```

### Abb. D2: Potentielle Bindestellen von pM27 an STAT2.

Durch den Vergleich der Aminosäuresequenz des degradierten hSTAT2 und mSTAT2 einerseits und der nicht degradierten Moleküle STAT1 und STAT3 andererseits, ergeben sich (unter der Annahme eines linearen Erkennungsmotivs) die oben markierten potentiellen Bindestellen für pM27 an STAT2. Die unterstrichenen Sequenzen ähneln sich in hSTAT2 und mSTAT2 (mit der angegebenen Übereinstimmung), weisen aber keine homologen Bereiche in STAT1 oder STAT3 (Maus und Mensch) auf.

Diese Bereiche könnten sehr einfach über gerichtete Mutationen untersucht werden. Um die STAT-Molekülintegrität zu erhalten, wäre ein Austausch der Bereiche durch die entsprechenden Sequenzen aus STAT1 oder STAT3 sinnvoll. Die chimären Moleküle würden anschließend in humane Zellen transfiziert werden. Durch den STAT2-Größenunterschied könnten hier endogenes hSTAT2 (~113 kDa) und chimäres mSTAT2 (~130 kDa) unterschieden werden. Dieser Versuchsaufbau erlaubt die intrinsische Kontrolle, ob pM27 grundsätzlich funktionell gewesen ist (durch den Verlust des endogenen „kleinen“ hSTAT2). Gleichzeitig kann untersucht werden, ob das chimäre STAT2 erkannt wurde (Verlust des transfizierten „großen“ mSTAT2-

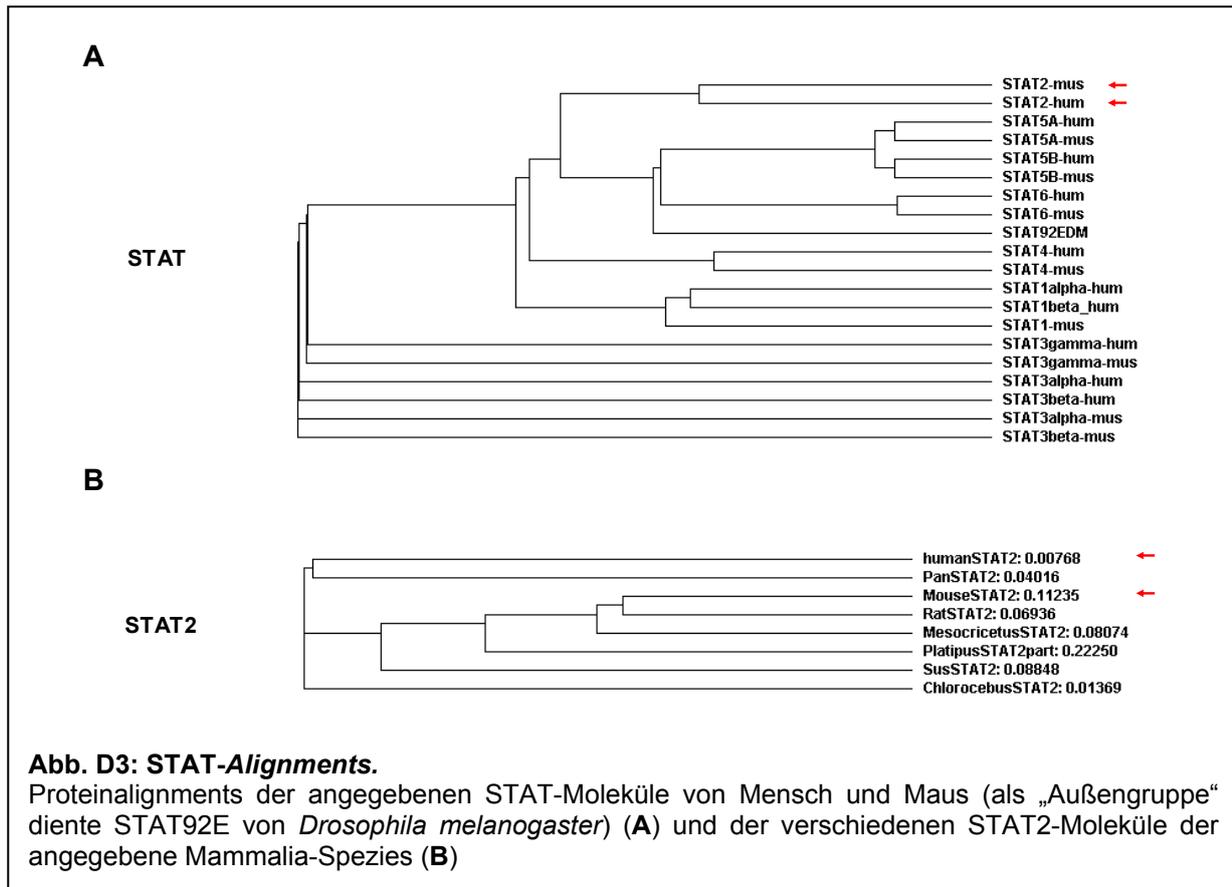
Moleküls). Wenn ein interessanter Bereich in diesem Verlust-der-Funktion (*loss of function*)-Ansatz gefunden würde, müsste das Experiment nur umgedreht werden und die betreffende Sequenz in STAT1 oder STAT3 (beide ~90 kDa) eingeführt werden, um anschließend eine Degradation dieser Moleküle zu untersuchen und durch einen Gewinn-der-Funktion (*gain of function*)-Ansatz zu beweisen, dass es sich wirklich um die/eine Bindestelle für pM27 handelt. In diesem Fall würden sich STAT1- resp. STAT3-defiziente Maus-Zellen als Expressionssystem anbieten, da hier kein „störendes“ intrinsisches Protein vorliegt und das deutlich größere, endogen vorhandene mSTAT2 erneut als Funktionsnachweis für pM27 dienen würde.

Die Definition der Bindestelle würde die Untersuchung erlauben, ob andere Wirtsproteine gleiche oder ähnliche Proteinsequenzen aufweisen und weitere potentielle Ziele für pM27 darstellen, indem die vorher definierte Bindestelle anschließend *in silico* mit Protein-Datenbanken verglichen würde.

Außerdem würde die Definition dieses Bereiches, für den Fall dass es sich um ein lineares Proteinepitop handelt, die Entwicklung eines „Proteinschalters“ erlauben. Man könnte Proteine mit einem pM27-Erkennungsmotiv markieren und unter gewünschten Bedingungen durch induzierte pM27-Expression deren spezifische Degradation induzieren. Eine weitere noch interessantere Option wäre, ein so „markiertes“ Protein nach einer Infektion mit wt-MCMV spezifisch durch pM27 dem Proteasom zuzuführen und zu degradieren. Dies würde durch den vergleichenden Einsatz von  $\Delta$ M27-MCMV mit wt-MCMV die experimentelle Möglichkeit eröffnen, die Wirkung resp. die Rolle von verschiedenen Proteinen gegenüber MCMV zu evaluieren.

Proteinvergleiche (*alignments*) zeigen, dass die Aminosäuresequenz-Ähnlichkeit von STAT1 und STAT3 im Vergleich zu STAT2 eher weit entfernt ist. STAT4, STAT5 und STAT6 sind STAT2 auf Proteinebene ähnlicher (Abb. D3). Es wäre deshalb sehr interessant zu untersuchen, ob diese STAT-Moleküle durch pM27 gebunden und zum Proteasom rekrutiert werden können.

Da mSTAT2 und hSTAT2, im Vergleich zu STAT2-Molekülen anderer Mammalia-Spezies, sehr divergent sind, ist davon auszugehen, dass die näher verwandten STAT2-Homologa ebenfalls erkannt und degradiert werden. Durch eine Untersuchung dieser STAT-Moleküle könnte letztendlich unabhängig von dem Ausgang der Experimente die Vorhersage der pM27-Bindestelle weiter verbessert werden.



### 3.5 KONVERGENTE EVOLUTION DER STAT2-DEGRADATIONSFÄHIGKEIT

Wie oben gezeigt wurde, degradieren sowohl MCMV (über pM27) als auch HCMV den zellulären Transkriptionsfaktor STAT2, um die Induktion von ISGs durch den Jak-STAT-Signalweg zu unterbinden und so der Replikationsrestriktion durch IFN-induzierte Effektorgene zu entgehen.

Das homologe Genprodukt zu pM27 im HCMV-Genom ist pUL27 (Abb. 46). Eine (Über-)Expression von pUL27-V5His durch rVACV reduziert die Menge von STAT2 weder in humanen noch in Maus-Zellen (Abb. 47A). Außerdem führt die Deletion des *UL27*-Gens aus dem HCMV-Genom nicht zum Verlust der Fähigkeit, STAT2 zu degradieren (Abb. 47B), so dass eine Beteiligung von *UL27* an der STAT2-Reduktion durch HCMV ausgeschlossen werden muss. Außerdem bindet pUL27 unter vergleichbaren Bedingungen im Gegensatz zu pM27 nicht an DDB1 (Abb. 48).

Es existieren im MCMV-Genom keine weiteren homologen Gene zu *M27*, die mittels einer Blast-Alignment-Suche gefunden werden. Neben *UL27* existieren auch keine weiteren homologen Gene/Genprodukte zu pM27 im HCMV-Genom. Die STAT2-Degradation wird somit nicht über homologe Genomabschnitte oder Gene realisiert, sondern über nicht-konservierte Gene. Die Fähigkeit wurde deshalb vermutlich von MCMV und HCMV

unabhängig voneinander entwickelt. Da das STAT2-degradierende Protein noch nicht identifiziert werden konnte, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass es einen kurzen konservierten Bereich in diesem (noch unbekanntem) HCMV-kodierten Protein und pM27 gibt, der sich erst bei einem direkten Vergleich der essentiellen und hinreichenden Aminosäuresequenz erschließt und sich den bisherigen *Alignment*-Versuchen entzogen hat.

Diese wahrscheinlich unabhängige Evolution der Fähigkeit, STAT2 zu degradieren, unterstreicht einerseits die Bedeutung von STAT2 für die CMV-Biologie und die STAT2-abhängige Kontrolle von CMV durch die angeborene Immunität, andererseits führt diese Erkenntnis zu der grundsätzlichen Frage, warum beide Viren eine STAT2-spezifische Bindestelle entwickelt haben und keinen hoch-konservierten Bereich innerhalb der STAT-Moleküle binden, der zusätzlich die Degradation von z.B. STAT1 erlauben würde.

### **3.6 EVOLUTIONSMODELLE ZUR ENTWICKLUNG VON MOLEKÜLEN WIE PM27**

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, degradieren MCMV und HCMV STAT2 über einen Ubiquitin-Proteasom-abhängigen Mechanismus (Abb. 25 und 43). In diesem Prozess wird STAT2 einem zellulären Ubiquitinligasekomplex zugeführt, der die Ubiquitin-Konjugation katalysiert. Die angehängten Ubiquitin-Reste determinieren anschließend das STAT-Molekül für die Erkennung durch das zelluläre Proteasom, einem zellulären, hochmolekularen Proteasekomplex. Der Prozess ist im Fall von MCMV von dem viralen Protein pM27 abhängig. pM27 bindet STAT2 und erfüllt damit anscheinend eine Adapterprotein-Rolle, da es auch das zelluläre Protein DDB1 bindet. Ein ähnlicher Mechanismus ist für HCMV anzunehmen. In dieser Adapterproteinhypothese gibt es einen weiteren interessanten Punkt. pM27 scheint zwei Funktionen gleichzeitig erfüllen zu müssen: STAT2-Bindung und DDB1-Bindung. Aus evolutionärer Sicht ist es äußerst unwahrscheinlich, dass zwei unterschiedliche Funktionen *gleichzeitig* in einem Molekül neu auftauchen. Deshalb ist anzunehmen, dass es zu einer sequentiellen Entwicklung der beiden Funktionen gekommen ist. Erst wurde eine Funktion durch Mutation(en) zufällig angelegt und später durch weitere Mutationen und die Wirkung der positiven Selektion optimiert. Erst sekundär ist es zu der sequentiellen Evolution der zweiten Funktion kommen. Deshalb muss zumindest eine der beiden Funktionen allein für das Virus bereits einen evolutionären Vorteil darstellen, um positiv selektiert zu werden. Im Folgenden werden drei mögliche Modelle, die daraus resultierenden Implikationen und mögliche experimentelle Zugänge diskutiert.

### 3.6.1 Das STAT2-Binde-Modell

Da in einer immortalen STAT2-defizienten Zelllinie der Wachstumsnachteil von  $\Delta$ M27-MCMV nach IFN- $\gamma$ -Behandlung zumindest in Zellkultur aufgehoben ist, würde man den initialen Selektionsvorteil der STAT2-Bindung zuordnen. Der pM27-Urahn hätte in diesem Szenario die STAT2-Funktion durch seine STAT2-Bindeaktivität beeinträchtigt und so einen Selektionsvorteil für das Virus geschaffen. Da STAT2 ein Transkriptionsfaktor ist, der einerseits an der Zellmembran durch den Rezeptorkomplex und die assoziierten Kinasen gebunden und phosphoryliert werden muss, um aktiviert zu werden, andererseits aber in den Zellkern transloziert und dort an spezifische DNA-Promotorabschnitte bindet, um die Transkription der entsprechenden Gene zu induzieren, könnte die reine Bindung eines pM27-Urahns diese Translokation blockiert oder inhibiert haben. Es wäre deshalb spannend zu untersuchen, ob pM27 in der Lage ist, die STAT2-Translokation zu blockieren, während das Proteasom gleichzeitig ausgeschaltet wurde. Die Rekrutierung zum Ubiquitinligasekomplex wäre dann eine sekundäre Weiterentwicklung, die eine finale STAT2-Degradation erlaubt.

Da pharmakologische Inhibitoren wie MG-132 und Lactacystin oft nur eine partielle Inhibition des Proteasoms erzielen können (eigene Beobachtung), wäre eine genetische Ausschaltung des Proteasoms wünschenswert und würde einen sauberen Versuchsaufbau erlauben. Da die zentralen Komponenten des Ub-Proteasom-Systems für Zellen essentiell sind, muss ein solcher Verlust konditional erfolgen. Eine aussichtsreiche Experimentalstrategie für diese Untersuchungen wäre die Nutzung einer beschriebenen Maus-Zelllinie („ts85“) mit einer mutationsbedingten Thermolabilität der E1-Ubiquitinligase (Ciechanover et al., 1984; Finley et al., 1984), die einen Verlust der Ubiquitinierung bei 39,5°C auslöst. In diesen Zellen könnte die Wirkung von pM27 auf die STAT2-Translokation bei ausgeschalteten Ub-Konjugationsbedingungen (bei 39,5°C) vergleichend mit einem funktionellen Ub-System (bei niedrigerer Temperatur) untersucht werden.

### 3.6.2 Das MHC-Modell

Das Proteasom degradiert zelluläre Proteine proteolytisch. Die entstandenen Peptide werden anschließend über den TAP-Transporter in das Lumen des ERs eingeschleust, um dort nach einem proteolytischen *trimming* über den *peptide loading*-Komplex auf MHC-Moleküle geladen zu werden. Diese MHC-Beladung erlaubt eine Präsentation der zellulären Proteine auf der Zelloberfläche, die wiederum durch die patrollierenden zytotoxischen CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten inspiziert werden, um etwaige intrazelluläre Infektionserreger aufspüren und vernichten zu können. Cytomegaloviren verbleiben lebenslang in dem Wirt und sind somit der ständigen

Kontrolle durch CD8-T-Zellen ausgesetzt. Dieser stetige Selektionsdruck hat zu der Entwicklung von mannigfaltigen, viralen Inhibitionsmechanismen der MHC-Präsentation geführt (Hengel und Koszinowski, 1997).

Ein weiteres mögliches Szenario für die Entwicklung von pM27 wäre, dass MCMV initial über pM27, das an DDB1 bindet, eine Vielzahl von verschiedensten Wirtsproteinen unspezifisch der Ubiquitinierung durch den Cul4A-RocA-Komplex zugeführt hat. Diese ubiquitinierten Proteine wären durch das Proteasom zu Peptiden degradiert worden, die letztendlich zu einer verstärkten Selbstpeptid-MHC-Präsentation geführt hätten. In diesem Szenario wäre die DDB1-Bindung die initiale pM27-Funktion und es wären Wirtsproteine ohne spezielle Präferenz dem Proteasom zugeführt worden. Später hätte sich über Mutation und Selektion eine Präferenz für STAT2 herausgebildet. Da der Verlust von STAT2 einen deutlich höheren Evolutionsvorteil einbringt als ein ungerichteter Degradationsprozess für die Selbst-MHC-Präsentation, wäre diese zweite Funktion sehr schnell selektiert worden. In diesem Modell wäre die STAT2-Bindung die sekundäre Adaptation. Experimentell ist dieses Modell schwer zu überprüfen; allenfalls könnte untersucht werden, ob pM27 trotz seiner heutigen STAT2-Spezifität in STAT2-defizienten Zellen noch das Peptid-Repertoire, das auf/in den MHC-Molekülen präsentiert wird, in Richtung Wirtspeptide verschieben kann.

### **3.6.3 Der DDB1-Komplex als selektiver Faktor für Viren in der IFN-Antwort**

Ein sehr spannendes Szenario wäre die Hypothese, dass DDB1 selbst einen Selektionsdruck auf Viren ausübt, den diese mit Hilfe spezifischer Inhibitoren umgehen. Viele verschiedene Virusfamilien binden und nutzen DDB1. Parainfluenzaviren rekrutieren STAT1, STAT2 und/oder STAT3 zum DDB1-Komplex (Andrejeva et al., 2002; Ulane und Horvath, 2002; Ulane et al., 2003), das HBx-Protein von Hepatitis B Virus (HBV) bindet DDB1 und kompetitiert so mit der Bindung an DDB2 (Bontron et al., 2002) und das Vpr-Protein des Humanen-Immunodefizienz-Virus (HIV) bindet ebenfalls DDB1 (Schrofelbauer et al., 2007). Es könnte zwar sein, dass DDB1 als zellulärer Adapter für den Cul4A-RocA-Komplex ein bevorzugtes Ziel für die Interaktion mit Virusproteinen darstellt, die wirtseigene Proteine der proteasomalen Degradation zuführen. Es wäre jedoch auch denkbar, dass DDB1 selbst ein Bestandteil der intrinsischen Kontrolle von Virusreplikation ist und DDB1-Bindung daher allein schon einen evolutionären Vorteil darstellt. Die Rekrutierung verschiedener Proteine zum Proteasom wäre in diesem Modell die sekundäre Weiterentwicklung.

Patienten mit Mutationen in DDB1 kommen auf Grund der essentiellen Natur von DDB1 nicht vor. Patienten mit Mutationen im DDB2-Gen weisen *Xenoderma pigmentosum* (XP) (eine

Unverträglichkeit für Sonnenlicht) auf, da ihre DNA-Reparaturenzyme nicht in der Lage sind, die UV-Licht-induzierten DNA-Schäden effizient zu beheben (Hwang et al., 1996). DDB2 ist einer der wichtigsten Bindungspartner für DDB1. DDB1 und DDB2 bilden zusammen den namensgebenden *UV-damage DNA-binding* Komplex. UV-Licht aktiviert die DNA-Bindung von DDB1 und DDB2 (Hwang et al., 1996; Hwang und Chu, 1993). Interessanterweise zeigen Zellen von XP-Patienten eine signifikante Reduktion von IFN- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  Produktion nach Stimulation mit TLR-Stimuli wie dem dsRNA-Polymer poly[rI:rC] (Gaspari et al., 1993). Außerdem ist UV-Licht in der Lage, die IFN- $\gamma$ -induzierte STAT1-Phosphorylierung, DNA-Bindung und Promotoraktivierung sehr stark zu inhibieren (Aragane et al., 1997), so dass erneut eine Verbindung zwischen UV-DNA-Schäden und dem antiviralen IFN-System auffällt.

Zusätzlich wurde gezeigt, dass DDB1 spezifisch an ein sog. KCS PKR-Promotorelement bindet, das sowohl die konstitutive als auch die IFN-abhängige PKR-Induktion reguliert (Das et al., 2004). Die Proteinkinase PKR ist in der Lage, nach ihrer Aktivierung die Proteintranslation zu unterbinden und stellt ein zentrales Element der IFN-abhängigen Pathogenabwehr dar. Wenn DDB1 die konstitutive oder/und IFN-induzierte Expression von PKR beeinflussen würde, wäre ein evolutionärer Vorteil durch DDB1-Bindung durchaus nachzuvollziehen. Dieses KCS-Element wurde ebenfalls in dem STAT2-abhängig, aber STAT1-unabhängig exprimierten Gen *Adar1* gefunden (George et al., 2008).

Eine weitere auffällige Verbindung zwischen dem IFN-System und DDB1 ist die Bedeutung des DDB-Komplexes (DDB1:DDB2) für die Transkriptionsinduktion des Transkriptionsfaktors E2F. E2F1 und DDB bilden einen physischen Komplex, der die Wirkung von E2F1 deutlich potenziert (Hayes et al., 1998). Interessanterweise interagiert das IFN-induzierte Protein p202 ebenfalls mit E2F und inhibiert so die Wirkung von E2F (Choubey et al., 1996). Für das HCMV-kodierte pp72-IE1 Protein, welches STAT2 bindet, aber nicht degradiert (Paulus et al., 2006), konnte eine Bindung an E2F nachgewiesen werden, die die E2F-Aktivität positiv beeinflusst (Margolis et al., 1995). E2F-abhängige Expressionsänderungen scheinen die virale Replikation zu unterstützen. Eine Vielzahl von Komponenten für die Nukleotidsynthese, DNA-Polymerasen und DNA-Topoisomerasen werden induziert, während klassische IFN-induzierte Gene (wie GBP-2, p202, STAT3) reprimiert werden (Ma et al., 2002). Demzufolge zieht zumindest HCMV aktiv einen Vorteil aus der E2F-Aktivität. Für MCMV ist dieser positive Effekt von E2F-Aktivität für die Virusreplikation noch nicht gezeigt worden, aber anzunehmen. Wenn also IFN die E2F-Aktivität über p202 negativ beeinflusst, DDB aber die E2F-Aktivität deutlich verstärken kann, könnte eine Interaktion eines viralen Proteins, das die DDB-Aktivität für E2F bereitstellt, einen möglichen Selektionsvorteil darstellen. Denkbar wäre, dass IFN-Präinkubation zur

Expression von Proteinen wie p202 führt, die die Aktivität von E2F negativ beeinflussen, möglicherweise durch die Konkurrenz von p202 mit DDB um E2F. Durch die Expression von Proteinen wie pM27, die DDB1 binden, könnten DDB und E2F wieder komplexiert werden, die Transkription E2F-abhängiger Gene würde gesteigert werden und dies hätte einen positiven Effekt auf die CMV-Replikation. Ob die Bindung von pM27 an DDB1 einen eigenständigen (STAT2-unabhängigen) selektiven Vorteil hat, kann nur in primären STAT2-defizienten Zellen und/oder Mäusen untersucht werden. Allerdings wäre ein einfaches initiales Experiment die Untersuchung, ob sich die Expression von E2F-abhängigen Genen (wie z.B. DHFR) nach der Infektion mit  $\Delta$ M27-MCMV im Vergleich zu wt-MCMV unterscheidet.

### 3.7 VORHERSAGE DES UBIQUITINIERTEN LYSINS IM STAT2-PROTEIN

Durch pM27 wird STAT2 für den proteasomalen Abbau markiert. Dieser Abbau setzt die kovalente Modifikation von STAT2 durch Ubiquitin voraus. Ubiquitin wird im Falle einer Polyubiquitinierung (Poly-Ub) kovalent über eine Peptidbindung des C-terminalen Glycins (von Ub) mit der freien Aminofunktion (NH<sub>2</sub>-ε) eines Lysinrestes (K-Ub) des Zielproteins gebunden. Das murine STAT2 hat mit 46 Lysinresten eine hohe Anzahl an potentiell ubiquitinierbaren Aminosäuren, so dass eine gerichtete Mutagenese sehr aufwendig wäre, insbesondere da es bei vielen Proteinen (z.B. IκBα) zu mehreren und teilweise redundanten Ubiquitinierungen kommt. Da in den Experimenten, in denen die Ubiquitinierung untersucht wurde, distinkte Bandenmuster gefunden wurden, liegt die Vermutung nahe, dass nur ein Lysin ubiquitiniert wird, da sonst eine Überlagerung der verschiedenen Formen zu erwarten gewesen wäre.

Die Lysinreste, die für die Ubiquitinierung in Frage kommen, erfüllen oft folgende Kriterien (Catic et al., 2004): Die Lysine liegen immer auf der „Außenseite“ des Proteins. Die Lysine finden sich häufig in *loop*-Strukturen, denen eine α-Helix folgt. In der direkten Nachbarschaft von den Lysinen (-2 bis +2 As) finden sich nie Cysteine. In der Umgebung (-4 bis +4 As) von dem K-Ub finden sich häufig potentiell phosphorylierbare Aminosäuren (S, T, Y) und saure Aminosäuren (D, E). Die Kristallstruktur von STAT2 ist bis dato nicht verfügbar, so dass einige Kriterien nicht direkt analysiert werden können. Allerdings sind die Kristallstrukturen der aminoterminalen Domäne von STAT4 und die Kristallstruktur von STAT1 bekannt (Chen et al., 1998; Vinkemeier et al., 1998), so dass zumindest im Analogieschluss bestimmte Strukturen vorausgesagt werden können. Da der Mechanismus sowohl für hSTAT2 als auch für mSTAT2 ähnlich abläuft, wird davon ausgegangen, dass das Lysin in beiden Spezies konserviert vorliegt.

## Diskussion

Unter diesen Bedingungen ergeben sich einige „Kandidaten-Lysine“ für die Ubiquitinierung, die in dem folgenden Schema markiert sind.

```
>protSTAT2mus
As:1-   magwemlqnldslfldqlhgvysqsilpmdvrqhlatwiedqnwreaalg
As:51-   sddakanmlyfsildqlngwhyssdsnhfllqhnlrkfsrdiqtfpngp
As:101-  tqlaemifnllleeqrilnqaqraqevqpppapeavvesqqleienriqq
As:151-  lhvdieflvrsirglkdeqdvfsfrytvfslktssdphqsqqaqlvga
As:201-  tankvdrmrkevldiskqlvgrlttlvdlllpkldewkvqqqkscigapp
As:251-  pelqleqleqwltagakflfhlrqllkqlkemshmlrykgdmfgqvdlq
As:301-  naqvmellqrllqrsfvvetqpcmpqtlhrplilktgnkftvrtrllvrl
As:351-  qegseslkaevsvdrnsdlpgfrkfniltsnqktltpeegqrqgliwdfg
As:401-  fltlvegravgagkgnkgplavteelhvisfvveyvyqglkmklqtdtlp
As:451-  vvisnmglsiawasilwfnmlspnpknqqfcqapkapwsllgpvlsw
As:501-  qfssyvqrgldeglqmlrtklfgksckmedallswvdfckresppgkip
As:551-  fwtwldkielvhdhlkdlwkdgrimgfvsrngerrllkkmlsgtfllrf
As:601-  setseggitcswvehqddkveiysvqpytkevlqslplteiirhyvla
As:651-  eenipenplrflypriprdeafgcyyqekvnfeeqrklkhklivisnrq
As:701-  vdelqqplelkqdseslevnaelllahdqelplmmqtglvlgtelkvdpi
As:751-  lstapqvllepapqvllepapqvllepapqvllepapqvllepapqvlle
As:800-  papqvllepapqvllepapqvllelapqvllepapqvllelapqvllepa
As:851-  hllqpsesdlpedlqqisvedlkklsn

st



ey



it



t



n



n



m



l



a



g



e



s



g



d



e



As:901-  tsi

y



h



s



h



f



d



a



d



g



l



l



g



w



t



l



d



t



f

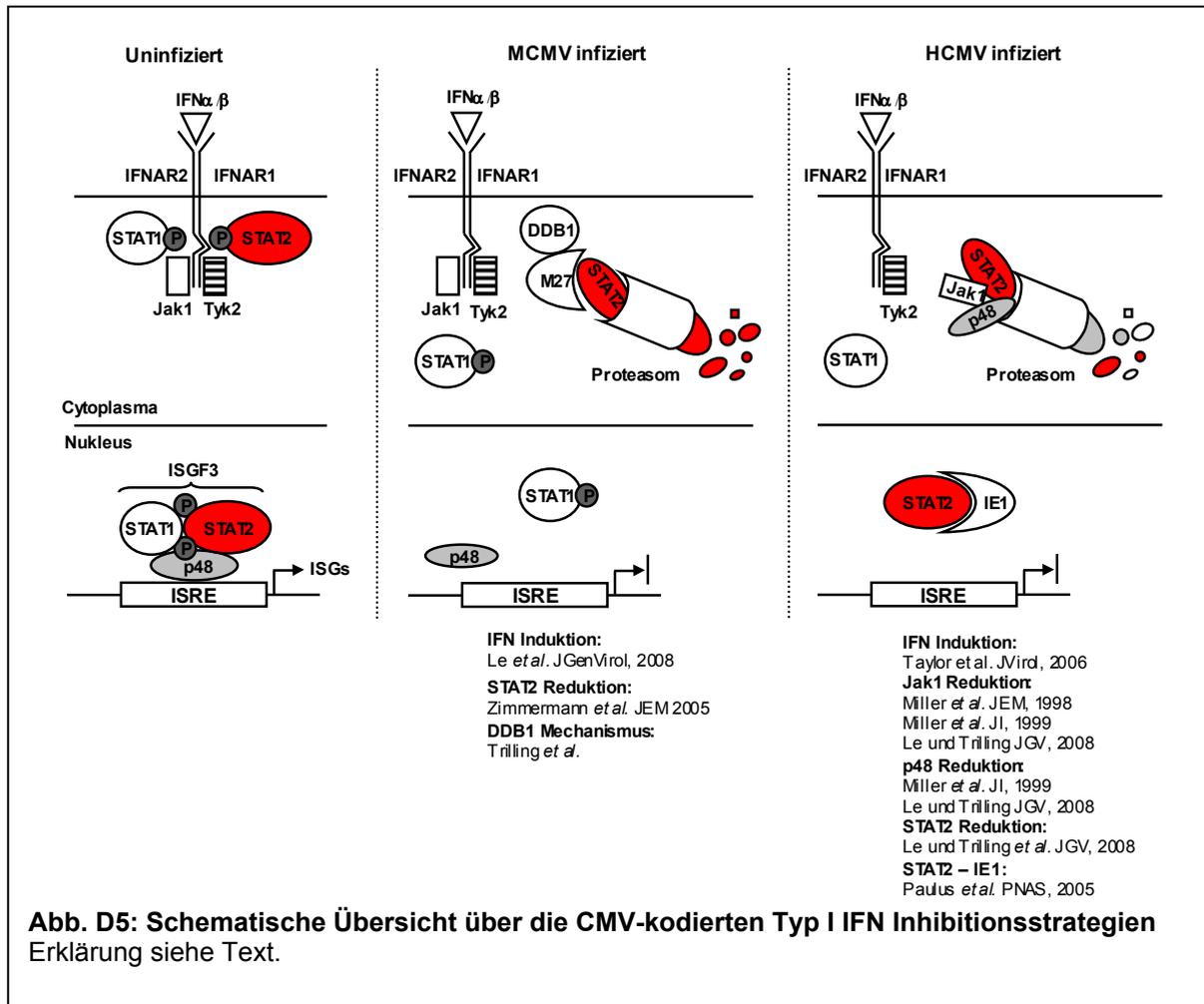

```

### Abb. D4: Vorhersage der Lysine in STAT2, die ubiquitiniert werden.

Für die Vorhersage des ubiquitinierten Lysinrestes in STAT2 wurde basierend auf den Kristalldaten von STAT1 und STAT4 die Struktur von STAT2 analog geschlossen. Die  $\alpha$ -Helices sind unterstrichen, die  $\beta$ -Faltblattstrukturen sind kursiv gestellt. Die Lysine, die die im Text genannten Kriterien erfüllen, sind rot eingefärbt und besonders interessante Lysine sind außerdem fett dargestellt. Diese markierten Lysine erfüllen eine hohe Zahl von den im Text angesprochenen Kriterien bezüglich Lage im Molekül, Aminosäuren in der Nachbarschaft und Konservierung zwischen mSTAT2 und hSTAT2. Die Aminosäuren, die in der Nachbarschaft von ubiquitinierten Lysinen häufig anzutreffen sind (t,y,s,d und e), sind grün gefärbt. Das Tyrosin, das im Zuge der STAT2-Aktivierung phosphoryliert wird, ist eingerahmt.

## 3.8 HCMV UND MCMV NUTZEN SOWOHL IDENTISCHE ALS AUCH DIVERGENTE STRATEGIEN ZUR INHIBITION DER IFN-SIGNALTRANSDUKTION

HCMV und MCMV ähneln sich in einigen Aspekten der Inhibition der IFN-Signaltransduktion, während andere Inhibitionsmechanismen diametral unterschiedlich sind. Grundsätzlich weisen beide Viren mehrere Inhibitionsmechanismen für Induktion und Signaltransduktion von IFN auf. Die Mechanismen der Inhibition werden von mehreren viralen Genen realisiert, die teilweise redundante Funktionen zu erfüllen scheinen, andererseits aber auch eine hierarchische und temporale Differenz aufweisen. In Abbildung D5 sind die bekannten CMV-kodierten Inhibitoren der IFN-Signalkaskade mit den entsprechenden Publikationen schematisch zusammengefasst.



MCMV belässt die Phosphorylierung von STAT-Molekülen und alle Rezeptor-proximalen Aktivierungen von den entsprechenden Kinasen der Janusfamilie unverändert. STAT1, STAT2 (wenn es nicht durch pM27 degradiert wird) und STAT3 können in MCMV infizierten Zellen durch verschiedene Stimuli (IL-6, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  und IFN- $\gamma$  oder die Infektion selbst) aktiviert und phosphoryliert werden. Es scheint sogar zu MCMV-abhängiger Induktion von wirtseigenen STAT-aktivierenden Zytokinen wie IL-6 (Ruzek et al., 1997) und IL-10 (Redpath et al., 1999) zu kommen (beide erreichen ihre biologische Wirkung letztendlich durch die rezeptorabhängige STAT3-Phosphorylierung). Da insbesondere IL-10 ein anti-inflammatorisches Zytokin darstellt und die MCMV-induzierte IL-10 Expression zu einer verminderten MHC-Oberflächenpräsentation führt, wäre zu vermuten, dass MCMV aus der Möglichkeit, die STAT-Signaltransduktion nicht komplett abzuschalten, einen evolutionären Vorteil zieht, indem es diejenigen Äste der STAT-Signaltransduktion zulässt, deren summerisches Genexpressionsprofil dem Virus in die Hände spielt.

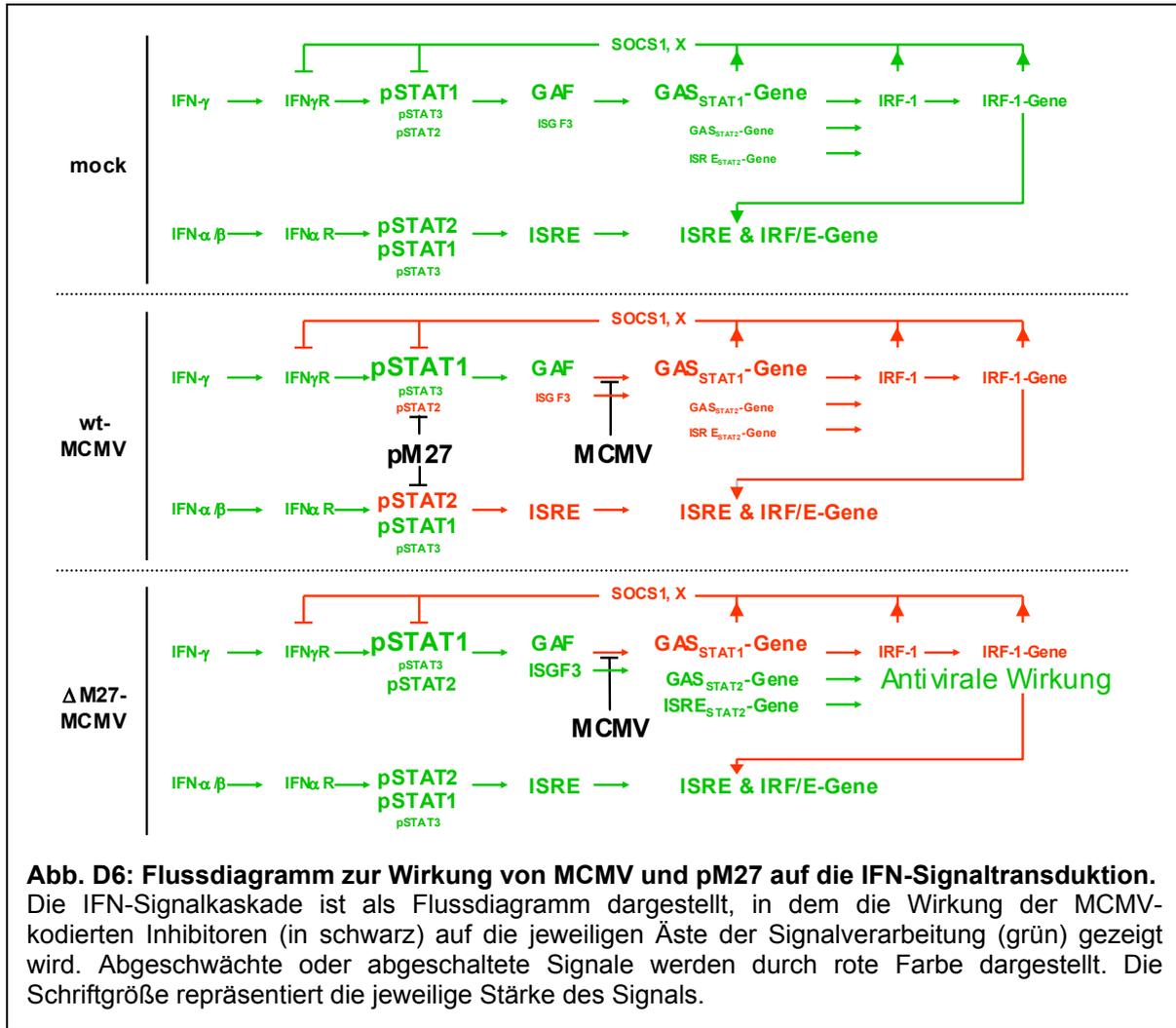
Auch wenn in MCMV-infizierten Zellen eine erfolgreiche rezeptorvermittelte Phosphorylierung mit anschließender DNA-Bindung von STAT1 stattfindet, lässt MCMV trotzdem keine

Genexpression von IFN- $\gamma$ -induzierten Genen zu (Abb. 2). Diese Inhibition scheint hauptsächlich auf der Inhibition von Transkriptionskomplexen auf/an IFN-induzierten Promotoren und dem synchronen Chromatin *remodeling* zu beruhen (Popkin et al., 2003).

HCMV unterbindet die IFN-Signaltransduktion bereits vor der STAT-Phosphorylierung, wahrscheinlich auf Ebene der Januskinasen. Keines der oben genannten Zytokine kann in HCMV-infizierten Zellen STAT-Phosphorylierung auslösen. Diese Inresponsivität beruht wahrscheinlich auf der HCMV-kodierten Fähigkeit, die Jak1-Kinase proteasomal zu degradieren, so dass alle Jak1-abhängigen Signalwege zum Erliegen kommen (diese Arbeit und (Miller et al., 1998)). Interessanterweise kodiert HCMV selbst (aber nicht MCMV) für mindestens zwei IL-10 Struktur- und Funktionshomologa, sog. vIL-10 (Jenkins et al., 2004; Kotenko et al., 2000). Für die Signaltransduktion von IL-10 ist Jak1 jedoch notwendig (Riley et al., 1999; Rodig et al., 1998). Zumindest in produktiv-infizierten Zellen können diese Zytokine (IL-10 und vIL-10) also nicht in der Lage sein, die klassische, zelluläre IL-10-Signaltransduktion auszulösen, da STAT3 in HCMV infizierten Zellen ohne Jak1 nicht phosphoryliert werden kann. Die Expression dieser IL-10 Homologa müssten ihre Wirkung somit entweder auf benachbarte (sog. *bystander*) Zellen ausüben oder die Signalkaskade muss einen Weg an der Inhibition vorbei gefunden haben. Studien, bei denen rekombinantes vIL-10 auf uninfizierte Zellen gegeben wurde, sind somit wahrscheinlich für (produktiv-) infizierte Zellen nur bedingt aussagekräftig.

Beide Viren degradieren STAT2. Sowohl MCMV als auch HCMV nutzen das Proteasom, um eine Ubiquitin-abhängige, proteolytische Degradation zu induzieren und somit STAT2-abhängige Prozesse komplett abzuschalten. Die Degradation erfolgt im Fall von MCMV jedoch schneller. Ein kompletter Verlust wird hier (je nach Infektionsdosis) nach ca. 24 Stunden erreicht, während der Verlust von humanem STAT2 in humanen Zellen durch HCMV eher die doppelte Zeit benötigt. Allerdings replizieren beide Viren auch mit unterschiedlichen Kinetiken, wobei der komplette Replikationszyklus von HCMV deutlich länger ist als der von MCMV. Beide Mechanismen benötigen virales *entry* und anschließende Genexpression. Die im Partikel enthaltenen Proteine sind, im Gegensatz zu den STAT-Antagonisten der Paramyxoviren, nicht in der Lage, STAT2 abzubauen.

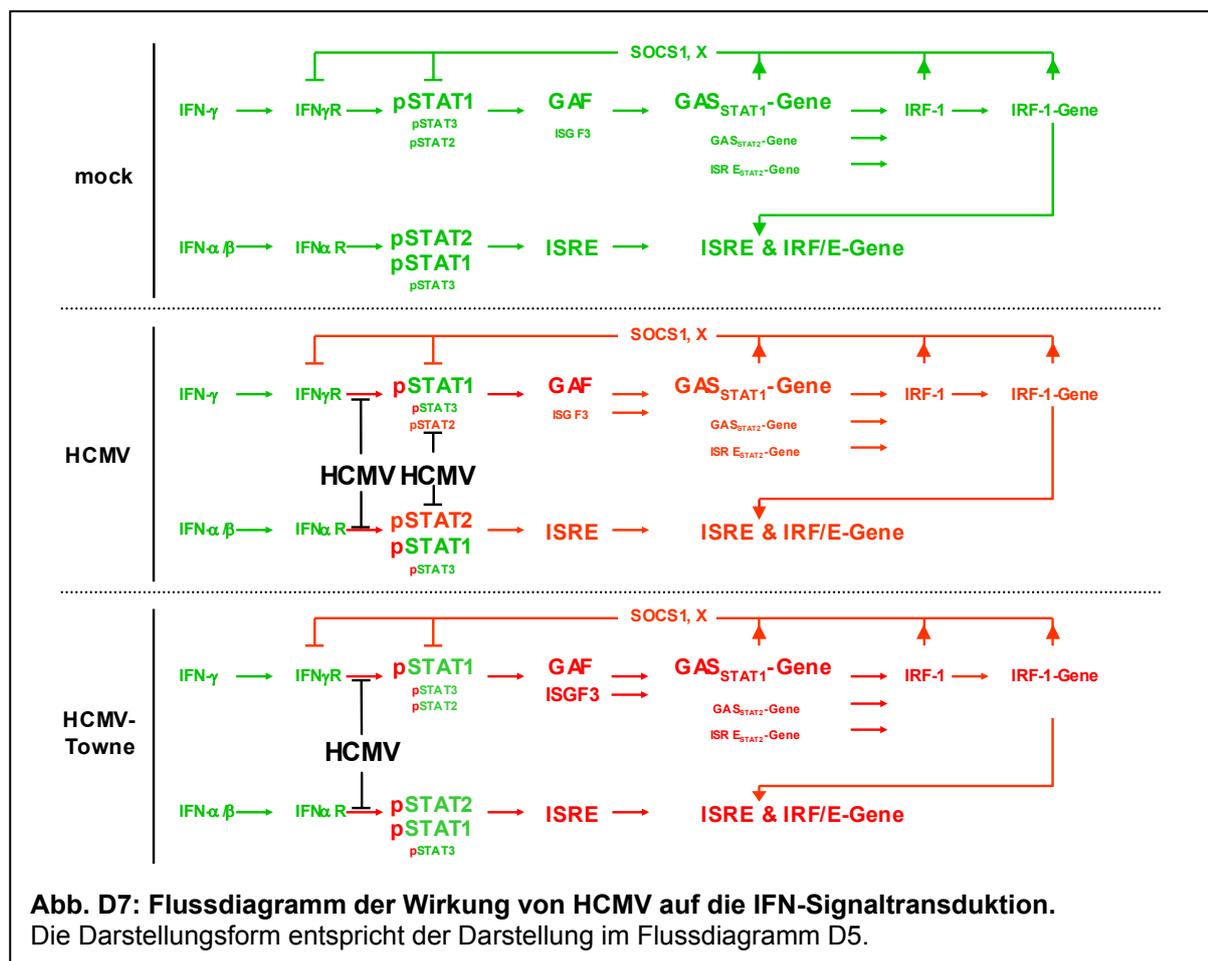
Um die unterschiedlichen hierarchischen Ebenen der IFN-Inhibition zu verdeutlichen, wurden die entsprechenden Ereignisse der IFN-Signaltransduktion mit den jeweiligen Inhibitoren in Form eines Flussdiagramms (Abb. D6 und D7) zusammengefasst.



In wt-MCMV-infizierten Zellen wird STAT2 degradiert (z.B. Abb. 3, 4, 9 und 11), so dass STAT2-abhängige Signalwege zum Erliegen kommen (Abb. 1). Außerdem kodiert MCMV einen zweiten Inhibitor (Abb. 2 und 20), der die Genexpression nach der erfolgreichen STAT1-Phosphorylierung und DNA-Bindung inhibiert (Abb. 2), so dass keine GAF-abhängige Genexpression erfolgt (Abb. 2 und (Popkin et al., 2003)). Da diese Gene auch die negative Rückkopplung für die STAT1-Phosphorylierung kodieren, kommt es zu einer verstärkten/verlängerten STAT1-Phosphorylierung, die aber nicht zur Genexpression führt (Abb. 2). Nach einer Infektion mit ΔM27-MCMV kann die Degradation von STAT2 nicht erfolgen, so dass alle STAT2-abhängigen Äste der Signalverarbeitung wieder ablaufen (Abb. 1 und 3). Zusätzlich akkumuliert die IFN-γ-abhängige STAT2-Phosphorylierung (Abb. 20 und 21). Da die STAT1-Phosphorylierung durch den zweiten Inhibitor, der die negative Rückkopplung blockiert, weiterhin verlängert/verstärkt ist, kommen nun zu der zusätzlichen STAT2-Anwesenheit (verglichen zu wt-MCMV-infizierten Zellen) noch eine erhöhte STAT1-Phosphorylierung hinzu (verglichen zu mock Zellen). Da IFN-α zwar eine gesteigerte Wirkung gegen ΔM27-MCMV

(verglichen zu wt-MCMV) hat, aber nicht annähernd so effizient antiviral wirksam ist wie IFN- $\gamma$  (Abb. 13, 16, 18 und 19), wird eine antivirale Wirkung gegenüber  $\Delta$ M27-MCMV durch IFN- $\gamma$ -STAT2-induzierbare Gene geschlussfolgert, also durch Gene, die sich bezüglich ihrer Promotoren qualitativ von den IFN- $\alpha$ -abhängigen ISRE-STAT2-Genen unterscheiden.

Im Falle der HCMV-Infektion erfolgt eine Inhibition, die auf einer höheren hierarchischen Ebene stattfindet. Dieser hierarchische Unterschied erklärt schlussendlich auch den Unterschied der STAT2-Degradation für die antivirale Wirkung von IFN gegenüber CMV, der im Falle von  $\Delta$ M27-MCMV stark ausgeprägt ist (Abb. 13 und 16-18) und im Falle von (dem STAT2 nicht degradierenden) HCMV-Towne nur sehr gering ausgeprägt ist (Le et al., 2008a).



Im Falle von HCMV wird die Proteinmenge von STAT2 proteasomal reduziert, so dass es nicht mehr für die Signaltransduktion zur Verfügung steht (Abb. 41, 42 und 43). Dieser Effekt ist in HCMV-Towne offenbar während der extensiven (Fibroblasten-) Zellkulturpassagen sekundär verloren gegangen (Abb. 42). Zusätzlich blockiert HCMV jedoch (Stamm-unabhängig) die Jak1-abhängige STAT-Phosphorylierung (Abb. 39). Durch diesen vorgeschalteten Inhibitor, der kein entsprechendes Korrelat in MCMV hat, wird die Aktivierung und Phosphorylierung aller STAT-

Moleküle unterbunden. Deshalb ist die Wirkung von IFN auf HCMV-Towne nicht signifikant größer als auf STAT2-degradierenden Isolate (Le et al., 2008a). Die Befunde wurden in dem Flussdiagramm D6 zusammengefasst.

### 3.9 WARUM DEGRADIERT HCMV STAT2?

Wie in der vorgelegten Arbeit gezeigt werden konnte, induziert HCMV die spezifische, proteasomale Degradation von STAT2 (Abb. 41-43) und inhibiert die STAT-Phosphorylierung (wahrscheinlich durch den Verlust von Jak1 [Abb. 39 und (Miller et al., 1998)]. Ohne Jak1 kann keines der entsprechenden STAT-Moleküle phosphoryliert werden (Rodig et al., 1998). Es stellt sich die Frage, warum HCMV ein STAT-Molekül degradiert, das durch seine fehlende Phosphorylierung sowieso bereits inaktiviert ist, insbesondere da die Inhibition der Phosphorylierung zeitlich vor der Degradation erfolgt. Es könnte sich um eine ursprüngliche oder redundante Inhibition handeln, die durch die neu erworbene Fähigkeit zur Jak1-Degradation und Inhibition der STAT-Phosphorylierung überflüssig geworden ist. Da die Fähigkeit von dem HCMV-Stamm Towne anscheinend sekundär verloren worden ist (Abb. 39 und 42), wäre dies ein mögliches Szenario. Warum verlieren klinische HCMV-Isolate diesen scheinbar unnötigen Antagonisten aber nicht *in vivo* - in einer Situation, in der die Viren durch den deutlich höheren Selektionsdruck eigentlich nicht-selektierte Gene viel schneller verlieren sollten? Dies lässt eher vermuten, dass ein STAT2-abhängiger Selektionsdruck auf HCMV *in vivo* ausgeübt wird, der in (Fibroblasten-) Zellkultur nicht vorhanden ist.

Interessanterweise wurde gezeigt, dass STAT2 in humanen (aber nicht in Maus-) Zellen für die IFN- $\alpha$ -abhängige Aktivierung von STAT4 nötig ist. Dieser Effekt von STAT2 ist sowohl von STAT1 als auch von der tyr-690-Phosphorylierung von STAT2 selbst unabhängig (Farrar et al., 2000a; Farrar et al., 2000b). STAT4 wird in Fibroblasten nicht (oder nur so schwach, dass es auf Proteinebene nicht nachweisbar ist) exprimiert, spielt aber *in vivo* eine entscheidende Rolle in der IL-12-abhängigen IFN- $\gamma$ -Induktion und NK-Zell-Funktion, auch während Virusinfektionen (Kaplan et al., 1996; Nguyen et al., 2002).

Deshalb wird hier die Hypothese aufgestellt, dass die STAT2-Degradation einen adaptiven Wert hat, der höchstwahrscheinlich in STAT2-abhängigen, aber STAT1-unabhängigen Mechanismen zu finden ist. Eine STAT1-unabhängige Wirkung von IFN für die Immunkontrolle wurde für HCMV *in vivo* bereits nachgewiesen (Gil et al., 2001; Ramana et al., 2001).

Die Untersuchung einer möglichen STAT2-Abhängigkeit der STAT4-Aktivierung durch IFN- $\alpha$  wäre in HCMV-TB40/E infizierten HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*) möglich, da HUVEC STAT4 exprimieren und (voll) permissiv für HCMV-TB40/E sind.

### **3.10 VERWENDUNG DOMINANT NEGATIVER INHIBITOREN DES DDB1-CUL4A-ROCA UBIQUITINLIGASE-KOMPLEXES ZUR PHÄNOKOPIE DES $\Delta$ M27-PHÄNOTYPS**

In dieser Arbeit konnte erstmals der molekulare Interaktionspartner von pM27 nachgewiesen werden: DDB1. DDB1 kopräzipitiert mit pM27 (Abb. 29-38) und ist für die Wirkung von pM27 wahrscheinlich von Bedeutung. Die Untersuchung der Wirkung von pM27 basiert letztendlich auf Replikationsdaten von  $\Delta$ M27-MCMV. Die molekulare Analyse von pM27 jedoch basiert auf proteinbiochemischen Untersuchungen. Eine noch offene Frage ist, ob diese unterschiedlichen experimentellen Befunde, die sehr gut theoretisch vereinbar sind, wirklich kausal verknüpft sind. Ist die Interaktion von pM27 mit dem DDB1-Cul4A-Komplex einerseits und STAT2 andererseits für die CMV-Replikation wirklich entscheidend? Die Daten der MCMV-Replikation in STAT2-defizienten Zellen zeigen, dass die Replikationsfähigkeit von  $\Delta$ M27-MCMV nach IFN- $\gamma$  Behandlung in STAT2-defizienten Zellen wieder hergestellt wird. Allerdings handelt es sich um eine immortalisierte, stabile Zelllinie, die wie oben bereits beschrieben außerdem reduzierte STAT1-Mengen aufweist und eine reduzierte Wirkung von IFN- $\gamma$  gegenüber VACV zeigt (Trilling et al., zur Publikation eingereicht). Grundsätzlich weisen Zellen, die für den Transkriptionsfaktor STAT2 defizient sind, natürlich nicht nur einen Verlust von STAT2 für die unmittelbare Signaltransduktion auf, sondern auch eine Veränderung aller STAT2-abhängigen Proteine. Um zu untersuchen, ob es einen echten kausalen Zusammenhang zwischen der DDB1-Cul4A-Bindung und der IFN-Sensitivität gibt, wäre es wünschenswert, Mäuse *in vivo* zu untersuchen, die diese Faktoren nicht mehr aufweisen. Allerdings sind die Komponenten des DDB1-Cul4A-Komplexes essentiell und der Verlust einer dieser Komponenten ist embryonal lethal (Cang et al., 2006; Li et al., 2002), so dass hier die Mausgenetik nicht hilfreich sein kann. Zwei mögliche Strategien, um dieses Problem zu umgehen oder zu lösen, wären jedoch durchaus denkbar und durchführbar und werden im Folgenden diskutiert.

#### **3.10.1 Expression von dominant-negativem Cul4A durch MCMV**

Durch die Expression einer bereits beschriebenen dominant-negativen Cul4A-Form (Wen et al., 2007) durch MCMV könnte der DDB1-Cul4A-Komplex in infizierten Zellen hochspezifisch inaktiviert werden. Die Expression müsste mittels eines sehr starken, sehr frühen Promotors erfolgen und anstatt eines viralen Gens in das Genom eingesetzt werden, dessen Verlust für MCMV *in vitro* und *in vivo* nicht nachteilig ist. Da in der Arbeitsgruppe bereits ein solches Deletionsvirus ( $\Delta$ m157-MCMV) vorhanden ist (Dr. A. Zimmermann und Prof. Dr. H. Hengel,

unpublizierte Befunde), in dem sogar eine *frt*-Rekombinationsstelle vorhanden ist, würde sich die Klonierung eines *frt-site* flankierten, MIEP-Promotor exprimierten, dominant-negativen Cul4A anbieten. Die Untersuchung eines solchen Virus könnte auch Auskunft über mögliche weitere virale Interaktionspartner des DDB1-Cul4A-Komplexes geben, wenn ein entsprechendes  $\Delta$ M27-MCMV mit einem dominant-negativen Cul4A ausgestattet würde, um zu untersuchen, ob dieses Virus einen Replikationsnachteil aufweist. Die Rekonstitution dieser Viren würde idealerweise initial auf Typ I IFN (IFNAR1-, p48- oder STAT2-) defizienten Zellen erfolgen, um die Selektion vorteiliger Mutationen außerhalb der zielgerichtet-mutierten Gene durch den ausgeübten Selektionsdruck zu verhindern. Ein entsprechendes Konstrukt wurde bereits von mir hergestellt (Daten nicht gezeigt) und muss nur noch in das MCMV-Genom rekombiniert werden.

### 3.10.2 Expression der *cre*-Rekombinase durch MCMV in DDB1<sup>flox/flox</sup> Mäusen

Eine weitere elegante Möglichkeit der Untersuchung von MCMV in Abwesenheit von funktionstüchtigen DDB1-Cul4A-Komplexen wäre die Klonierung der *cre*-Rekombinase in das MCMV-Genom. Es konnte gezeigt werden, dass MCMV (mit einer eGFP-Kassette, die durch eine *cre*-abhängige Rekombination aktiviert wird) in Mäusen, die die *cre*-Rekombinase mittels organspezifischer Promotoren exprimieren, in CRE-exprimierenden Organen resp. Zellen repliziert (Prof. Dr. U. Koszinowski, persönliche Kommunikation). Demzufolge ist die *cre*-Rekombinase nicht „schädlich“ für die MCMV-Replikation. Die Expression der *cre*-Rekombinase durch MCMV (eine effiziente und frühe Expression würde ebenfalls durch die Verwendung des MIEP-Promotors in dem *m157*-Locus erreicht) würde infizierte Zellen sofort nach der Infektion *cre*-Rekombinase exprimieren lassen. Wenn nun Zellen oder Mäuse infiziert würden, die ausgewählte Gene als *gefloxt* Allele aufweisen, würde die *cre*-Rekombinase diese Gene spezifisch in den infizierten Zellen aus dem Genom entfernen und die Expression damit unmöglich machen. Diese Strategie wäre universell für nahezu alle bereits *gefloxt* Allele möglich und erlaubt die spezifische Deletion von gewünschten Genen ausschließlich in MCMV-infizierten Zellen. Optimale Zielgenprodukte sollten möglichst kurzlebig sein. Allerdings wäre der größte Vorteil sicherlich die Untersuchung von embryonal lethalen Genen wie z.B. STAT3. Die Verwendung der bereits beschriebenen DDB1-flox Maus (Cang et al., 2006) würde hier die *cre*- und MCMV-abhängige Deletion von DDB1 aus dem Mausgenom in infizierten Zellen induzieren. Experimentell könnte die STAT2-Degradation durch ein solches *cre*-MCMV in flox-DDB1-Zellen resp. Mäusen untersucht werden. Anschließend würde untersucht, ob ein *cre*-MCMV in DDB1<sup>flox/flox</sup>-Mäusen ein  $\Delta$ M27-MCMV phänokopiert. Auch hier würde ein *cre*<sup>+</sup>

$\Delta$ M27-MCMV einerseits als Kontrolle fungieren und andererseits eventuell Auskunft über das Vorhandensein von anderen DDB1-rekrutierenden viralen Proteinen geben.

### **3.11 PHARMAKOLOGISCHE INHIBITOREN CYTOMEGALER IFN-ANTAGONISTEN ALS POTENTIELLE ANTIVIRALE THERAPEUTIKA?**

Die Befunde der Replikationseffizienz von  $\Delta$ M27-MCMV *in vitro* (Abb. 13, 16, 18 und 19) und *in vivo* (Zimmermann et al., 2005) zeigen, dass die viralen IFN-Antagonisten für die virale Replikation unerlässlich sind. In Abwesenheit von pM27 kann MCMV nicht effizient in IFN-behandelten Zellen replizieren und *in vivo* ist das M27-defiziente Virus innerhalb kürzester Zeit nicht mehr nachweisbar. Diese Befunde belegen, dass MCMV nicht ohne seine IFN-Antagonisten „überleben“ kann. Die molekulare Analyse dieser IFN-Antagonisten eröffnet langfristig die Möglichkeit, pharmakologische Inhibitoren gegen solche Proteine zu entwerfen resp. zu suchen, um spezifisch dem Wirt zu erlauben, sein ursprüngliches Arsenal antiviraler Maßnahmen zu exprimieren und somit „Hilfe zur Selbsthilfe“ zu leisten. Ein möglicher Vorteil einer solchen Strategie wäre die Ausgewogenheit der wirtseigenen antiviralen Mechanismen. IFN-induzierte Proteine würden hauptsächlich lokal exprimiert werden und wirken somit nicht systemisch auf die Mehrheit der uninfizierten Wirtszellen. IFN induziert außerdem selbst die entsprechende negativ-rückgekoppelte Auto-Regulation, um so über die Dauer der Induktion fein reguliert zu werden. Die entsprechenden Gegenmaßnahmen sind ebenfalls genetisch angelegt, um das System wieder in den Ausgangszustand zurück zu bringen.

Solche Inhibitoren könnten konzeptionell sowohl gegen die viralen Proteine selbst oder auch gegen die zellulären Adapter und Interaktionspartner gerichtet sein. Die Inhibition zellulärer Faktoren hat grundsätzlich gegenüber viralen Zielen den Vorteil, dass Pathogene nicht direkt mit Resistenzmutationen, die während einer effektiven Therapie hochgradig positiv selektiert werden, reagieren können. Allerdings verbietet sich der zelluläre Interaktionspartner im Fall von pM27 auf Grund seiner Essentialität als Zielmolekül. Da DDB1 essentiell für das Überleben des Wirtes (Cang et al., 2006) als auch für das Überleben einzelner Zellen in Zellkultur ist (Wakasugi et al., 2007), verbietet sich jegliche Strategie, bei der DDB1 pharmakologisch in seiner Aktivität beeinträchtigt wird. Da das zelluläre Pendant zu DDB1 für den HCMV-kodierten STAT2 Antagonisten noch nicht bekannt ist, besteht die Möglichkeit, dass es sich um ein nicht-essentielles Protein handelt.

Da  $\Delta$ M27-MCMV-Infektionen von der Maus *in vivo* erfolgreich kontrolliert werden, wäre der Einsatz von CMV-Mutanten, die die Fähigkeit, die IFN-Signalkaskade zu inhibieren, verloren

## Diskussion

haben, als sichere Lebendvakzine ebenfalls durchaus denkbar. Vorexperimente in der Maus könnten klären, ob die Infektion mit  $\Delta$ M27-MCMV in der Lage ist, im Wirt eine protektive Immunität gegenüber einer sekundären Belastungsinfektion mit wt-MCMV zu induzieren.

## 4. MATERIAL UND METHODEN

### 4.1 MATERIALIEN

#### 4.1.1 Geräte

Die folgenden Geräte wurden verwendet:

-80°C Schrank	Revco Ultima II über Welabo, Düsseldorf, Deutschland
-80°C Truhe	Hettich Freezer, Andreas Hettich GmbH & Co KG
Blotter ( <i>semi-dry</i> )	Fastblot B33/B34 (klein), Biometra, Göttingen, Deutschland
	Fastblot B64 (groß), Biometra, Göttingen, Deutschland
Crosslinker (UV-)	CL-1000, UVP, Upland, Kanada
Elektrophorese	Kammer für Proteingele (klein): Minigel-Twin, Biometra, Göttingen, Deutschland
	Kammer für Proteingele (mittel): MAXI-Vertikal, Roth, Karlsruhe, Deutschland
	Kammern für DNA-/RNA-Agarosegele: DNA/RNA-Gele: Agagel mini, Biometra, Göttingen, Deutschland
	DNA/RNA-Gele: Agagel maxi, Biometra, Göttingen, Deutschland
Entwickler(Foto-)	Curix 60, Agfa, Mortsel, Belgien
Geltrockner	Gel dryer 583, Biorad, München, Deutschland
Heizblöcke	Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	Thermostat plus, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Hybridisierungsöfen	OV5, Biometra, Göttingen, Deutschland
Inkubatoren	Heraeus BBD 6220, Heraeus, Hanau, Deutschland
	Unbegaster Bakterien-Inkubator, New Brunswick Scientific
	G25 Incubator Shaker, New Brunswick Scientific
Luminometer	MicroLumat LB96P (Berthold)
Mikroskope	Axiovert 25, Zeiss, Göttingen, Deutschland
	TS100, Nikon, Düsseldorf, Deutschland
	Axiovert 40 CFL, Zeiss, Göttingen, Deutschland

## Material und Methoden

Mikrowelle	Sharp
Netzteil	Power Pack P25 T, Biometra, Göttingen, Deutschland Consort EV202, Turnhout, Belgien
Rotationsinkubator	Rotator SB3, Stuart Barloworld Scientific
Scintillationszähler	Trilux Liquid Scintillation & Luminescence Counter, Wallace, Turku, Finnland
Spektralphotometer	UV-VIS Spectrophotometer UVmini 1240, Shimadzu, Duisburg, Deutschland
Sterile Arbeitsbank	Hera Safe, Heraeus, Hanau, Deutschland
Stickstoff-Tank	Cryotherm Biosafe MD mit ApolloLIN Versorgungsbehälter
Thermocycler	T1 und T3000, Biometra, Göttingen, Deutschland
TurboBlotter	Schleicher und Schuell #EO4770,
Überkopf-Taumler	Heidolph Reax 2, Kehlheim, Deutschland
Ultraschall-Gerät	Branson Sonifer II 450 mit Kühlgerät und Becherresonator „High Intensity“, G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd, Deutschland
UV-Handlampe	Benda Laborgeräte (Ser. Nr. 7841200), Wieloch, Deutschland
UV-Transilluminator	Lumi-Imager F1, Roche, Mannheim, Deutschland
Vortex	Labinco L46, Labinco, Breda, Niederlande
Wasserbad	GFL 1092, GFL, Burgwedel, Deutschland
Wiegeschüttler	GFL 3011, GFL, Burgwedel, Deutschland GFL 3013, GFL, Burgwedel, Deutschland GFL 3017, GFL, Burgwedel, Deutschland
Zentrifugen	3K30 Sigma, Sartorius, Göttingen, Deutschland Centrifuge 5415 (ungekühlt), Eppendorf, Hamburg, Deutschland Centrifuge 5417R (gekühlt), Eppendorf, Hamburg, Deutschland Centrifuge 5810R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland J2-21, Beckman-Coulter, Krefeld, Deutschland OptimaL-70K, Beckman-Coulter, Krefeld, Deutschland

### 4.1.2 Kits

Bei der Verwendung der folgenden Kits wurde nach den Anweisungen und Hinweisen der Hersteller vorgegangen:

ABI Prism Big Dye 3.1 Sequenzier-Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA)

BCA Protein Assay Kit, Pierce # 23225

DIG High Prime (Roche, Mannheim, Deutschland)

ECL und ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare München, Deutschland)

Expand High Fidelity PCR System (Roche, Mannheim, Deutschland)

Lipofectamine 2000 und Lipofectamine 2000 CD (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)

Luciferase Reporter Gene Assay, high sensitivity (Roche, Mannheim, Deutschland)

Nucleobond AX100 (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland)

OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)

Plasmid Mini und Midi Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)

QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)

QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)

QIAshredder (Qiagen, Hilden, Deutschland)

RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)

Superfect Transfection Reagent (Qiagen, Hilden, Deutschland)

### 4.1.3 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Aceton	Merck #1.00014.2511
Agarose (LE)	Biozym #840004
Ammoniumacetat	Roth #7869.2
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth #9592.2
Ampicillin	Roth #K029.2
Anti-Digoxigenin-AP Fab	Roche #1093274
Arabinose	Sigma #3256
$\beta$ -Glycerophosphat	Sigma #G-9891
$\beta$ -Mercaptoethanol	Roth #4227.2
Bacitracin	Fluka #11702
Bacto-Agar	Oxoid #LP0028
Borsäure	Merck #1.00165.100
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma #A9418-59
Bromphenolblau	Merck #1.08122.0005
<sup>14</sup> C-Protein-Marker High Range Rainbow	Amersham #RPN759
Calciumchlorid	Roth #A119.1
CDP-Star	Roche #11685627001
Ciprofloxacin Hydrochlorid	ICN Biochemicals
Complete Protease Inhibitors	Roche #16974498

## Material und Methoden

Cycloheximid	Sigma #C7698
DAPI	Roche
DIG-11-dUTP	Roche #11573179910
DIG-Blocking-Reagenz	Roche # 1096176
DIG-Easy Hyb	Roche #11796895001
Digitonin	Calbiochem #300410
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth #A994.2
Dithiothreitol (DTT)	Serva #20710
DNA-Größenstandard Hyperladder I	Bioline #Bio-33025
DNase I	Roche # 10104159001
DNase I, RNase-frei	Roche #776785
dNTPs (Set)	Roche # 11969064001
EDTA	Serva #11280
EGTA	Sigma #E4378
Essigsäure (96%)	Roth #X895.2
Essigsäure (100%), Eisessig	Merck #1.00063.2500
Ethanol	Merck #1.00983.2511
Ethidiumbromid 10mg/ml Lsg.	Roth #2218.1
Ficoll Mr ca. 400 000	Serva #21373
Filme	
24x30 BioMax MR	Kodak #8912560
35x43 BioMax MR	Kodak #8715187
Amersham Hyperfilme ECL	GE Healthcare # 90260
Formaldehyd 37%	Merck #1.04003
Geneticin, G418	Gibco #11811-064
Gelatine (steril)	Sigma #G-7765
Glycerol	Merck #1.04093.1000
Glycin	Roth #3908.5
HEPES	Roth #9105.4
Iodacetamid	Calbiochem #407710
Isopropanol	Merck #1.09634.2511
Kaleidoscope Prestained Protein-Standard	Biorad #161-0324
Kaliumchlorid	Merck #1.04936.1000
Kanamycin	Sigma #K4000
L-Cystein	Fluka #30089
L-Methionin	Fluka #64320
Leupeptin	Sigma #L8884
Magermilchpulver	Sucofin, Comet, Düsseldorf
Maleinsäure	Merck #8.00380
Methanol	Merck #1.06009.2500
Methocel MC	Fluka #64630
Minimal Essential Medium (MEM) 10x	Sigma #M0275
MOPS	Roth # 6979.2
Natriumacetat	Roth #6779.1
Natriumchlorid	Roth #3952.2
Natriumcarbonat	Merck #1.06392.1000
Natriumcitrat (tri-, dihydrat)	Roth #3580.1
Natriumdesoxycholat	Merck #1.06504
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva #20763
Natriumfluorid (NaF)	Alexis #400-031-G025
Natriumhydrogencarbonat	Merck #K12610129

## Material und Methoden

Natriumhydroxid	Merck # 6498.1000
NP40/Igepal	Sigma #I3021-100ml
Ocadaic Acid	Calbiochem #459616
OptiMEM	Invitrogen #31985
Paraformaldehyd (PFA)	Roth #0335.2
Pepstatin-A	Sigma #P4265
Phosphonoessigsäure	Sigma #P-6909
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Roth #A156.2
Poly[d(I-C)]	Roche #1219847
PMSF	Roth #6367.3
Protein A-Sepharose CL-4S	GE Healthcare #17-0780-01
Protein G-Sepharose 4 Fast Flow	GE Healthcare #17-0618-02
Proteinase K	Roche, #03115879001
Reblot Plus Stripping Solution	Chemicon #2509
RNA-Probenpuffer	Fermentas #R0641
Rotiphorese-30-Acrylamid	Roth #3029.1
Rotiphorese-40-Acrylamid	Roth #A515.1
RPMI 1640 ohne L-Cystein, L-Methionin	BioWhittaker #BE12735F
Saccharose	Roth #4621.1
Salzsäure	Roth #4625.1
Saran Folie	Dow
Sorbitol	Roth # 6213.1
Superscript II	Invitrogen #10928-034
T4-DNA-Ligase	Roche #10716359001
T4-Polynukleotid-Kinase	Roche # 10709557001
Taq-Polymerase (AmpliTaq)	Roche #58002040-01
TEMED	Roth # 2367.1
Tris-Base	Roth #AF15.3
Triton-X-100	Serva #37240
Tween-20	Sigma #P1379
Whatman 3MM Chr Papier	Whatman #3030917
Whatman Protran Nitrocellulose Memb.	Whatman #7067994
Ziegenserum	

### 4.1.4 Interferone

IFNs (Maus IFN- $\alpha$  (#12100-1), Maus IFN- $\beta$  (#12400-1), Maus IFN- $\gamma$  (#12500-1), humanes IFN- $\alpha$  (#11100-1) und humanes IFN- $\gamma$  (#11500-2)) wurden von PBL Biomedical Laboratories, New Jersey, USA erworben. Alle Interferone wurden regelmäßig auf ihre antivirale Potenz kontrolliert und grundsätzlich aliquotiert bei -80°C aufbewahrt. Die Interferone wurden entgegen der Herstellerangaben nicht in BSA-haltigen Puffern, sondern in sterilem PBS mit 0,1% FKS (mit denen die Zellen sowieso behandelt wurden) aufgenommen, um zusätzliche Effekte (wie LPS-Kontamination) auszuschließen.

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Zellen mit 500 U/ml IFN behandelt. In Wachstumsversuchen erfolgte, wenn nicht anders angegeben, eine Vorbehandlung für 2 Tage

(~48h). Bei Experimenten, die die Signaltransduktion betreffen, wurde, wenn nicht anders angegeben, für 25-30 min mit IFN behandelt.

Da IFN- $\alpha$  für die Behandlung von Patienten verwendet wird, ist die Menge, die ein Unit ausmacht, international definiert. Im Text wurde darauf verzichtet, die Units pro ml (U/ml) als internationale Units pro ml (IU/ml) kenntlich zu machen, da eine solche internationale Definition für IFN- $\gamma$  nicht existiert.

### **4.1.5 Inhibitoren des Proteasoms**

Sowohl Lactacystin (#I-115) als auch MG-132 (#I-130) sind potente und spezifische Inhibitoren des Proteasoms und wurden von der Firma Boston Biochem (über die Plattform Axxora) bezogen. Wenn nicht anders angegeben, wurden beide Chemikalien mit einer Endkonzentration von 10  $\mu$ M eingesetzt. Da beide Verbindungen in DMSO gelöst werden müssen, wurde in den Vergleichsproben immer eine gleiche Endkonzentration an DMSO eingesetzt.

Alle anderen Proteasom-bezogenen Chemikalien wie Ubiquitin-Aldehyd (ein spezifischer Inhibitor deubiquitinierender Enzyme) und His<sub>6</sub>-Ub wurden ebenfalls über die Firma Boston Biochem bezogen.

### **4.1.6 Na-Vanadat**

Na-Vanadat inhibiert Phosphotyrosyl-Phosphatasen. Um eine maximale Inhibition zu gewährleisten, muss Na-Vanadat depolymerisiert werden. Das entsprechende Protokoll wurde von der Firma Upstate (jetzt Millipore) übernommen: Es wurde eine 200 mM Lösung hergestellt. Der pH-Wert der Lösung wurde, je nach pH-Wert, entweder mit NaOH oder mit HCl auf 10 eingestellt. Die Lösung verfärbte sich dabei gelblich. Die Lösung wird solange aufgeköcht (ca. 10 min), bis sie wieder farblos geworden ist. Die Lösung wurde auf RT abgekühlt und der pH-Wert wurde erneut auf 10 eingestellt. Dieser Prozess wurde solange wiederholt, bis die Lösung farblos bleibt und der pH-Wert sich final bei 10 einpegelt.

### **4.1.7 Radioaktive Chemikalien**

Für die Durchführung von EMSA-Analysen wurden  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-markierte Desoxy-Nukleotide verwendet. Die Nukleotide dCTP (#AA0004), dGTP (#AA0005), dATP (#AA0006) und dTTP (#AA0007) wurden von GE Healthcare, München, Deutschland bezogen.

Für die metabolische Markierung von Proteinen in Zellen wurden die Zellen mit EasyTag Express <sup>35</sup>S *protein labeling mix* (#NEG772007MC) von PerkinElmer, Waltham, USA inkubiert.

### 4.1.8 Zellen

#### 4.1.8.1 Humane Zelllinien

Humane MRC-5 Fibroblasten (*American Type Culture Collection* (ATCC) CCL-171), HeLa Zellen (ATCC CCL-2) und immortalisierte ihf-1 Zellen (Greaves und Mocarski, 1998) wurden in *Dulbecco's modified Eagle medium* (D-MEM) mit 10% (v/v) fötalem Kälberserum (FKS) mit Streptomycin (100 µg/ml), Penicillin (100 Einheiten/ml) und 2 mM Glutamin gehalten.

#### 4.1.8.2 Murine Zelllinien

Murine M2-10B4 Zellen (ATCC CRL-1972), mHTC-K2 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Wolfram Brune, Robert Koch-Institut Berlin, Deutschland – vorgestellt in (Brune et al., 2001)), immortalisierte STAT3- (Maritano et al., 2004) STAT2- (Park et al., 2000) und STAT1-defiziente Maus-Fibroblasten (Durbin et al., 1996), krisen-immortalisierte IFNAR1-defiziente Zellen (von IFNAR1-defizienten, primären MEF (Zimmermann et al., 2005) generiert) und Jak2-defiziente MEF (Neubauer et al., 1998) wurden in D-MEM mit 10% (v/v) FKS, Streptomycin (100 µg/ml), Penicillin (100 Einheiten/ml) und 2 mM Glutamin gehalten.

Alle murinen NIH3T3 (ATCC CRL-1658) abgeleiteten Zelllinien wurden in D-MEM mit 10% (v/v) neugeborenen Kälberserum (NKS), Streptomycin (100 µg/ml), Penicillin (100 Einheiten/ml) und 2 mM Glutamin propagiert. Die stabil transfizierten und klonalen NIH3T3-Zelllinien mit einem ISREluc Reporter gen (ISREluc:NIH3T3) (Zimmermann et al., 2005) wurden unter Geneticin-Selektion (G-418 Sulfat, Gibco, Katalognummer 11811-031) gehalten (500 µg/ml). Eine vergleichbare Zelllinie wurde mit einem GASluc-Reporter gen (pGeneGASluc) hergestellt. Die Zellen wurden unter Zeocin-Selektion (#45-0439, Invitrogen, Karlsruhe) hergestellt und gehalten (200 µg/ml).

Die STAT2HA:STAT2<sup>-/-</sup> Zelllinie wurde auf dem Hintergrund einer stabilen STAT2-defizienten Zelllinie (Park et al., 2000) hergestellt (freundlicherweise von Prof. Dr. C. Schindler zur Verfügung gestellt). Hierfür wurden die Zellen mit einem STAT2-Expressionsplasmid (pCDNA3.1zeo-mSTAT2HA) transfiziert und unter Zeocin (200 µg/ml) stabile Einzelklone in Hybridomschalen selektiert und propagiert

#### 4.1.8.3 Primäre Zellen

Primäre MEF hergestellt nach (Brune et al., 1999a) von IFN-β<sup>-/-</sup> (Erlandsson et al., 1998), IRF-1<sup>-/-</sup> (Matsuyama et al., 1993), IFNGR1<sup>-/-</sup> (Muller et al., 1994), C57BL/6- und BALB/c-

Mäuseembryonen wurden verwendet. Die Zellen wurden in D-MEM mit 10% (v/v) FKS, Streptomycin (100 µg/ml), Penicillin (100 Einheiten/ml) und 2 mM Glutamin gehalten.

### 4.1.9 Viren

#### 4.1.9.1 MCMV

- ΔM27 Generiert von Dr. Markus Wagner. Beschrieben in (Zimmermann et al., 2005).
- M27Rev Beschrieben in (Zimmermann et al., 2005).
- M27HA Beschrieben in (Zimmermann et al., 2005).
- M28HA Generiert von Dr. Albert Zimmermann
- MW97.01 Ein pSM3fr BAC-abgeleitetes MCMV, basierend auf dem Smith-MCMV-Stamm (Messerle et al., 1997) mit wt-Phänotyp *in vivo* nach Zellkulturpassage und damit einhergehender Deletion der BAC-Sequenz (Wagner et al., 1999).
- Smith MCMV-Isolat, erstmals beschrieben in (Smith, 1954)
- Smith-GFP Beschrieben in (Henry et al., 2000)

#### 4.1.9.2 HCMV

- TB40/E Ein BAC-abgeleitetes HCMV, beschrieben in (Sinzger et al., 2008b).
- ΔUL27 Deletionsmutante des *UL27*-Gens auf TB40/E Hintergrund. Hergestellt und kontrolliert durch Dr. A. Zimmermann. Vorgestellt in (Le et al., 2008a).
- Towne ATCC VR-977<sup>TM</sup>
- AD169 Beschrieben in (Hengel et al., 1995).

#### 4.1.9.3 *Vakzinia-Viren*

- 1.) wt-VACV Vakziniavirus Western Reserve (WR)
- 2.) ΔB18R, ΔB8R und die entsprechenden Revertanten (Symons et al., 1995; Symons et al., 2002) wurden verwendet. Die Viren wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Geoffrey L. Smith (Department of Virology, Faculty of Medicine, Imperial College London, London, UK) zur Verfügung gestellt.
- 3.) pM27Flag-VACV wurde beschrieben in (Zimmermann et al., 2005).

Die VACV M27-Flag-Expressionsviren wurden von Dipl. Ing. Manuela Fiedler während ihrer Diplom-Arbeit hergestellt.

4.) STAT2HA-VACV wurde beschrieben in (Zimmermann et al., 2005).

#### 4.1.10 Antikörper

Alle in dieser Arbeit verwendeten Antikörper werden im Folgenden tabellarisch aufgeführt:

##### 5.1.10.1 Ungekoppelte Antikörper

Antikörper/ Epitop	Spezies	Verdünnung [1/x]	Reaktiv gegen	Applikation	Katalog- Nummer	Hersteller
β-Aktin	M	2-10 *10 <sup>4</sup>	M,H	WB	AC-74	Sigma
Cullin4A	R	500	H	WB	A300-739A	Bethyl
DDB1	R	2-10 *10 <sup>4</sup>	M,H	WB, (IP)	A300-462A	Bethyl
DDB2	R	<500	(M,H)	(WB)	H127 sc25368	SantaCruz
Flag	M	2500		WB, IF, IP	M2 F3165	Sigma
HA	R	2500-5000	Tag (FluA)	WB, IF, IP	H6908	Sigma
HA	M	5000-10000	Tag (FluA)	WB, IP	HA-7 H-3663	Sigma
IRF-1	R	1000	M	WB	M-20 sc640	SantaCruz
IRF-1	M	500	H	WB	#4966	CellSignaling
IRF-9/p48	R	1000	M,H	WB	H173 sc10793	SantaCruz
Jak1	R	1000	H	WB	HR-785 sc-277	SantaCruz
p65/RelA	R	1000	M,H	WB, IP	F-6 sc8008	SantaCruz
pp65-UL83	M	2-10 *10 <sup>4</sup>	HCMV	WB, IP	3A12	Abcam
pp72-IE1 (HCMV)	M	2-10 *10 <sup>4</sup>	HCMV	WB, IP	MA B810R	Chemicon
pp89-IE1 (MCMV)	M	500	MCMV	WB, IP	CHROMA 101	S. Jonjic
PCNA	R	1000	M	WB	FL-261 sc7907	SantaCruz
STAT1	R	2000-4000	M,H	WB, IP	E23 sc346	SantaCruz
STAT1(phosphoY)	R	2000	M,H	WB, E	A-2 sc8394	SantaCruz
STAT1(phosphoY)	R	2000	M,H	WB, E	#9171L	CellSignaling
STAT2	R	500-1000	M	WB, IP, E	L-20 sc950	SantaCruz
STAT2	R	1000-2000	H	WB, IP	06-502	Upstate
STAT2(phosphoY)	R	1000	M,H	WB	07-224	Upstate
STAT3	R	1000	M,H	WB	C-20 sc482	SantaCruz
STAT3(phosphoY)	R	1000	M,H	WB	B7 sc8059	SantaCruz
Ubiquitin	R	1000	M,H	WB, IP	Z0 458	Dako
V5His	M	5000	Tag (SV5)	WB, IP	#283360	Invitrogen

**E:** EMSA-Shift; **H:** Mensch; **IF:** Immunfluoreszenzfärbung; **IP:** Immunpräzipitation; **M:** Maus; **R:** Kaninchen und **WB:** Westernblot

##### 4.1.10.2 Gekoppelte Antikörper

Antikörper/ Epitop	Kopplung	Verdünnung [1/x]	Applikation	Katalog- Nummer	Hersteller
α-Maus	POD	10 000	WB	115-035-003	Jackson ImmunoResearch
α-Kaninchen	POD	5000	WB	A-6154	Sigma
α-Kaninchen	Cy3	200-500	IF	111-165-144	Jackson ImmunoResearch
α-Maus	Cy2	200-500	IF	115-226-062	Jackson ImmunoResearch

**POD:** Peroxidase; weitere Abkürzungen wie in oberer Tabelle

#### 4.1.11 Zellkulturgefäße und Plastikwaren

Sterile Einmalpipetten der Firma Costar wurden verwendet (25ml #4489, 10ml #4488 und 5ml #4487). Von der Firma Greiner wurden 15 ml Falcons (#188271), 50 ml Falcons (#227261),

## Material und Methoden

Hybridom-Schalen (#633160) und 48-Lochplatten (#677180) bezogen. Von der Firma TPP wurden Zellschaber (#99003), 25cm<sup>2</sup> Flaschen (#90025), 75cm<sup>2</sup> Flaschen (#90075), 6-Loch-Platten (#92406), 12-Loch-Platten (#92412), 24-Loch-Platten (#92424) und 96-Loch-Platten (#92696) bezogen. Von der Firma Nunc wurden 175cm<sup>2</sup> Flaschen (#159910) verwendet.

### 4.1.12 Zellkulturmedien

Alle zellkulturrelevanten Lösungen und Medien wurden von der Firma GIBCO (jetzt Teil von Invitrogen) bezogen. Die folgenden Lösungen und Medien wurden verwendet:

D-MEM Medium (mit 4,5 g/l Glukose, L-Glutamin und Pyruvat) [#41966-029]; PBS (mit CaCl<sub>2</sub> und MgCl<sub>2</sub>) [#14190-094], FKS (30 Minuten bei 56°C inaktiviert) [#10270-106], NKS (30 Minuten bei 56°C inaktiviert) [#16010-159], Trypsin (von 2,5% auf 0,5 % mit PBS verdünnt) [#15090] und Penicillin/Streptomycin (Endkonzentration auf den Zellen 100 U/ml) [#15140].

### 4.1.13 Puffer und Lösungen

#### AP-Puffer

100 mM TrisHCl; pH 9,5

100 mM NaCl

#### 1x Blot-Puffer (semi dry blotting)

48 mM Tris

28 mM Glycin

20% (v/v) Methanol

#### Bradford-Lösung

8,5 % ( v/v) Phosphorsäure

4,75 % (v/v) Ethanol

100 mg/l Coomassie Blue G-250

filtriert

#### Coomassie-Gelfärbelösung

0,02 % (w/v) Coomassie 250G

0,2 % (v/v) Phosphorsäure

10% (v/v) Ethanol

5% (w/v) Aluminiumsulfat

(=> nicht filtriert)

#### Cytoplasmatischer Lysepuffer; pH 7,4

10 mM KCl

20 mM HEPES

0,2% (v/v) IGEPAL

1 mM EDTA

10% (v/v) Glycerol

0,1 mM Na-Vanadat (aktiviert)

0,1 mM PMSF

1 mM DTT

Complete Protease Inhibitors (Roche)

#### EMSA-Shift-Puffer

100 mM HEPES

20% (w/v) Ficoll 400

5 mM Mg Cl<sub>2</sub>

200 mM KCl

0,5 mM EGTA

2,5 mM EDTA

**EMSA-Sonden-Hybridisierungspuffer**

10 mM MgCl<sub>2</sub>  
50 mM KCl  
20 mM Tris-HCl ; pH 7,5

**Fixier-Lsg. IP**

10% (v/v) Essigsäure  
40% (v/v) Methanol

**Fixier-Lösung für Silberfärbung**

50% (v/v) Methanol  
12% (v/v) Essigsäure  
0,05% (v/v) Formaldehyd

**HCMV-Sorbitol-Kissen**

20% (w/v) Sorbitol  
50 mM Tris; pH 7,4  
1 mM MgCl<sub>2</sub>  
100 µg/ml Bacitracin

**IP-Lysepuffer (Puffer A)**

140 mM NaCl  
5 mM MgCl<sub>2</sub>  
20 mM Tris; pH 7,6  
1% Digitonin (w/v) bzw. IGEPAL (v/v)  
0,5-1 mM PMSF (frisch zugeben)

**1x IP-Probenpuffer**

80 mM Tris/HCl; pH 6,8  
5 mM EDTA  
34% (w/v) Saccharose  
Eine Spitze Bromphenolblau  
3,2% (w/v) SDS (frisch zugeben)  
40 mM DTT (frisch zugeben)  
0,1 M Iodacetamid (frisch zugeben)

**IP-Waschpuffer B**

150 mM NaCl  
10 mM Tris; pH 7,6  
2 mM EDTA  
0,2% Digitonin (w/v) bzw. IGEPAL (v/v)

**IP-Waschpuffer C**

0,5 mM NaCl  
10 mM Tris; pH 7,6  
2 mM EDTA  
0,2% Digitonin (w/v) bzw. IGEPAL (v/v)

**IP-Waschpuffer D**

10 mM Tris; pH 8

**10x Laemmli-SDS-PAGE-Laufpuffer**

252 mM Tris  
1,92 mM Glycin  
1% (w/v) SDS

**LB (Luria-Bertani)-Medium**

1% (w/v) Bacto-Trypton  
5,5% (w/v) Bacto-Yeast-Extrakt  
1% (w/v) NaCl

**Maleinsäurepuffer**

100 mM Maleinsäure; pH 7,5  
150 mM NaCl

**MCMV-Saccharose-VSB-Kissen**

15% Saccharose  
50 mM Tris /HCl; pH 7,8  
12 mM KCl  
5 mM EDTA

## Material und Methoden

### **10x MEN; pH 7,0**

200 mM MOPS

50 mM Natriumacetat

10 mM EDTA

dunkel und bei 4°C lagern

### **Methylcellulose**

8,8 g Methylcellulose in 360 ml H<sub>2</sub>O

mit Rührfisch autoklaviert

bei 4°C ÜN rühren lassen

vor Gebrauch zufügen:

40 ml 10x MEM

20 ml FCS

5 ml Penicillin (10.000U/ml)/Streptomycin;  
(10.000 µg/ml)

5 ml L-Glutamin (200 mM)

20 ml NaHCO<sub>3</sub> (55g/l)

### **Nativer IP-Lyse/Waschpuffer**

(0,1 mM EDTA)

150-500 mM NaCl (meist 200 mM)

10 mM KCl

10 mM MgCl<sub>2</sub>

10% (v/v) Glycerol

20 mM HEPES; pH7,4 (mit KOH einstellen)

0,5 % (v/v) IGEPAL

0,1 mM PMSF

1 mM DTT

1 µg/ml Leupeptin

1 µg/ml Pepstatin

0,1 mM Na-Vanadat (aktiviert)

Complete Protease Inhibitors (Roche)

### **Nukleoplasmatischer Lysepuffer**

420 mM KCl

20 mM HEPES; pH 7,6

1 mM EDTA

20% (v/v) Glycerol

0,1 mM Na-Vanadat (aktiviert)

0,1 mM PMSF

1 mM DTT

Complete Protease Inhibitors (Roche)

### **10x PBS; pH 7,4**

136 mM NaCl

2,6 mM KCl

1,8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O

1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

### **4x Proteinase K-Puffer; pH 8,0**

2% (w/v) SDS

40 mM Tris

20 mM EDTA

### **RIPA<sup>+</sup> Puffer**

50 mM TrisHCl; pH 7,5

150 mM NaCl

1% (v/v) IGEPAL

1% (w/v) Na-Deoxycholate

0,1 % (w/v) SDS

1 mM DTT

0,2 mM PMSF

1 µg/ml Leupeptin

1 µg/ml Pepstatin

50 mM NaF

0,1 mM Na-Vanadat (aktiviert)

Complete Protease Inhibitors (Roche)

## Material und Methoden

### **20x SSC**

3 M NaCl

0,3 M NaCitrat

### **5x SDS-Probenpuffer**

0,25 M Tris/HCl; pH 6,8

25% ( v/v) Glycerol

20% (w/v) SDS

0,5% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol

Eine Spitze Bromphenolblau

### **10x TBST**

0,1 M Tris/HCl; pH 8,0

1,5 M NaCl

5% (v/v) Tween-20

### **Silberfärbungslösung A**

1/1000 einer 2%  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung

in Wasser

### **Silberfärbungslösung B**

1,6 g/l  $\text{AgNO}_3$

0,072% (v/v) Formaldehyd

in Wasser

### **Silberfärbungslösung C**

40 g/l  $\text{Na}_2\text{CO}_3$

0,04 % (v/v) Formaldehyd

1/4000 einer 2%  $\text{NaS}_2\text{O}_3$

in Wasser

### **10x TBE**

900 mM Tris

900 mM Borat

20 mM EDTA; pH 8,0

### **6x TBE-Probenpuffer**

10% (v/v) Glycerol

6x TBE

Eine Spitze Bromphenolblau

### 4.1.14 Computer-Programme

Alle Grafiken wurden entweder mit Photoshop CS (Adobe) oder mit Powerpoint (Microsoft) zusammengestellt und bearbeitet. Alle Berechnungen und statistischen Tests wurden mit Excel (Microsoft) durchgeführt. Die Alignments wurden mittels der online verfügbaren ([www.ebi.ac.uk/Tools/muscle/index.html](http://www.ebi.ac.uk/Tools/muscle/index.html)) Software MUSCLE (Edgar, 2004) oder der online ([www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html](http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html)) verfügbaren ClustalW Software (Larkin et al., 2007) durchgeführt.

## 4.2 METHODEN

### 4.2.1 Zellkultur

Grundsätzlich wurde eine räumliche Trennung in infizierte und uninfizierte Zellkultur im gesamten Institut eingehalten. Die Zellen wurden regelmäßig auf Kontaminationen mit Mycoplasmen (per PCR) kontrolliert und im Zweifelsfall verworfen oder wenn notwendig mit Ciprofloxacin (10 µg/ml Endkonzentration von ICN, Aurora, USA) behandelt. Die Zellen wurden bei 37°C, 80% Luftfeuchtigkeit und bei 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Die Zellen wurden in dem entsprechenden Zellkulturmedium (siehe Beschreibung der verwendeten Zellen) kultiviert. Zum Umsetzen adhärenter Zellen wurde das Kulturmedium abgenommen und die Zellen mit vorgewärmten (37°C) PBS gespült, um verbliebenes Medium zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen mit einer Trypsin-Lösung (0,5 % in PBS; beide Invitrogen) von den Zellkulturgefäßen gelöst. Die Zellen wurden (dem Umsetzschema folgend – meist 1/5 bis 1/8, bezogen auf die jeweilige Fläche) in frischem, vorgewärmten (37°C) Medium resuspendiert und in neue Zellkulturgefäße transferiert.

#### 4.2.1.1 Cryokonservierung

Für die Konservierung von Zellen wurden diese bei einer Konfluenz von ca. 80% wie oben beschrieben von den Zellkulturgefäßen gelöst. Die Zellen wurden je nach Zelltyp mit 90-300 g zentrifugiert und das überstehende Medium entfernt. Die Zellen wurden in einem Einfriermedium (10% DMSO, 50% FKS in D-MEM) aufgenommen und in Einfrier Röhrchen (Nunc über Renner) überführt. Diese Röhrchen wurden in Cryo-Einfrierbehältern (Qualifreeze, Qualilab) langsam (-1°C/min) bei -80°C eingefroren, bevor sie in flüssigem Stickstoff gelagert wurden.

### 4.2.1.2 Transfektionen

Je nach Zelltyp wurden verschiedene Transfektionsreagenzien verwendet. Grundsätzlich wurden Transfektionen mit Superfect Reagenz (Qiagen) oder Lipofectamine 2000 CD (Invitrogen) durchgeführt, wobei nach dem jeweiligen Protokoll des Herstellers vorgegangen wurde.

### 4.2.1.3 Inhibition der zellulären RNA resp. Protein-Synthese

Für Halbwertszeitexperimente wurde die *de novo*-Synthese der Proteine oder der RNA blockiert. Für die Inhibition der Proteinsynthese wurden die Zellen mit Cycloheximid (50 µg/ml) und für die Inhibition der RNA-PolymeraseII-abhängigen Transkription mit Actinomycin D (5 µg/ml) inkubiert. Um eine gleichmäßige Inhibition zu gewährleisten, wurden die Zellen einmal mit Inhibitor-haltigem Medium gewaschen und anschließend in neuem Inhibitor-haltigen Medium inkubiert. Da Actinomycin D in DMSO gelöst wird, wurden die Vergleichsproben der entsprechenden DMSO-Konzentration ausgesetzt.

## 4.2.2 Virologische Methoden

### 4.2.2.1 Stock-Präparation

Maus-Cytomegalovirus (MCMV)

Für die Herstellung von gereinigten MCMV-Stocks wurden 20-30 175cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen (~20-60\*10<sup>7</sup> Zellen) MEF-Zellen (Passage 3) mit MCMV infiziert (~ MOI 0,05). Nach 6-9 Tagen wurde die gesamte Suspension (bestehend aus Zellen und Medium) für zehn Minuten bei 5000 g (J2-21 Zentrifuge; 6000 rpm) und 10°C zentrifugiert. Das Pellet beinhaltet Zellreste und Zelltrümmer und kann entweder verworfen werden (so dass ein reiner und sauberer Überstandsvirusstock entsteht) oder mit einem *douncer* (steril, eiskalt) aufgeschlossen werden. Der Überstand wurde anschließend für weitere 3h mit 20000 g (J2-21 Zentrifuge; 13000 rpm) und 10°C zentrifugiert, um die MCMV-Virionen zu pelletieren. Der Überstand wurde, bis auf 1 ml (der über dem Pellet verbleibt), verworfen und das Pellet auf Eis über Nacht bei 4°C gelagert. Am nächsten Tag wurde das Viren-Pellet mit einem gekühlten und sterilen *douncer* (Wheaton) homogenisiert und das Homogenat vorsichtig in einem Zentrifugenröhrchen auf ein 15%-Saccharose/VSB-Kissen geschichtet. Es folgte eine Zentrifugation für 1 h bei 60000 g (OptimaL-K70 Beckman Ultrazentrifuge; 27000 rpm) bei 10°C. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde mit 2-4 ml 15%-Saccharose/VSB überschichtet und erneut für eine Nacht auf Eis bei 4°C inkubiert. Das Pellet wurde mit Hilfe eines *douncers* (eiskalt, steril) homogenisiert, die Viren anschließend aliquotiert (jeweils 20-50µl) und bei -80°C gelagert. Je nach Virusmutante lagen die Virustiter zwischen 10<sup>8</sup> und 10<sup>10</sup> infektiösen Viren pro ml.

### Humanes Cytomegalovirus (HCMV)

Die Stockpräparation stellt eine Modifikation (beschrieben in (Le et al., 2008a)) des ursprünglichen Protokolls von Stinski dar (Stinski, 1976).

Die grundsätzlichen Schritte ähneln dem Protokoll für MCMV-Stocks. Es wurden jedoch MRC-5 Zellen verwendet und die Ernte erfolgte nach ca. 9 Tagen, wenn die Zellen beginnen, sich von den Zellkulturgefäßen zu lösen. Die ersten zwei Zentrifugationschritte erfolgten wie bei MCMV, jedoch bei 15°C. Anschließend wurde das Viruspellet nach der dreistündigen Zentrifugation in 10 ml D-MEM Medium resuspendiert, „gedounced“ und in einem Ultrazentrifugenröhrchen auf ein 20%iges Sorbitolkissen geschichtet. Es folgte eine Zentrifugation für 1 h mit 60000 g (OptimaL-K70 Beckman Ultrazentrifuge; 20 000 rpm) bei 10°C. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 2-4 ml min. 2 h bei 4°C inkubiert. Letztendlich wurde der Stock homogenisiert und in Aliquots (20-100µl) bei -80°C gelagert.

### Vakzinia-Viren (VACV)

Für die Herstellung von VACV-Stocks wurde eine 175cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche, die sehr dicht mit CV-1 Zellen bewachsen war, mit dem gewünschten VACV infiziert (MOI ca. 0,01-0,05). Nach einem Tag wurde das Zellkultur-Medium ausgetauscht, da VACV zu deutlich schlechteren Titern heranwächst, wenn der pH-Wert des Mediums nicht optimal ist. Nach einem weiteren Tag wurden die Zellen von der Flasche gelöst (entweder mit einem Zellschaber oder durch das vorsichtige Klopfen gegen die Flasche) und für 10 min bei 3200 g (Eppendorffzentrifuge 58105; 4000 rpm) bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 1-1,5 ml sterilem PBS resuspendiert. Die Zellsuspensionen wurden dreimal für jeweils 10 sec mit Ultraschall behandelt (Branson Sonifer 450; *output control*: 6 und *duty cycle*: constant), um die Zellen aufzuschließen und die Viren freizusetzen. Diese Suspension wurde erneut für 1 min bei 960 g (Eppendorffzentrifuge; 3000 rpm) bei 4°C abzentrifugiert, um größere Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet verworfen. Die Lagerung erfolgte bei 4°C. Die Titer lagen zwischen  $1 \cdot 10^8$  und  $2 \cdot 10^{10}$ .

#### 4.2.2.2 Titrationsen

Grundsätzlich wurden alle zu titrierenden Viruspräparationen oder Zellsuspensionen bei -80 °C eingefroren und gelagert und erst kurz vor der Titration bei 4°C oder auf Eis aufgetaut.

### MCMV

Für Titrationsen wurden die MCMV-enhaltenen Medien, Überstände oder Zellsuspensionen sequentiell in 1/10 Schritten verdünnt und diese verdünnten Suspensionen anschließend auf primäre MEF-Zellen (Passage 3) gegeben. Die Infektion erfolgte per *centrifugal enhancement* (siehe unten). Ca. 2 h nach der Infektion wurde der Überstand entfernt und gegen steriles, viskoses Methylzellulose-haltiges Medium ausgetauscht, um eine Infektion über den Überstand zu verhindern und so die ursprüngliche Zahl der Viren per Zellkulturgefäß ermitteln zu können. Nach 4 oder 5 Tagen wurde die Anzahl der Plaques mikroskopisch ausgewertet und auf die pfu/ml zurückgerechnet. Die Titrationsexperimente wurden jeweils doppelt durchgeführt und jeder dieser beiden Ansätze wurde doppelt titriert ( $n=2*2$ ). Angegeben wurde der Mittelwert dieser Bestimmungen mit der Standardabweichung.

### Vakzinia-Viren (VACV)

Die Titration von VACV erfolgte auf permissiven CV-1 Zellen über sequentielle Verdünnungsreihen. Die zu titrierenden Zellsuspensionen wurden vor der Titration zweimal für jeweils 10 sec mit Ultraschall behandelt (Branson Sonifer 450; *output control: 6* und *duty cycle: constant*), um die Zellen aufzuschließen und die Viren freizusetzen. Da VACV nicht in den Überstand geht, sondern in/an den infizierten Zellen verbleibt, ist ein Übersichten mit Methylzellulose nicht erforderlich. Die Plaques wurden nach 30-36 h mikroskopisch ausgewertet. Auswertung und Darstellung erfolgte wie bei der MCMV-Titration.

### HCMV

Die HCMV-Titrationsen erfolgten auf MRC-5 Zellen im 96-Lochplatten-Format durch sequentielle 1/10-Verdünnungen (20 µl Virussuspension auf 180 µl Medium in 96-Lochplatte). Die Infektion wurde durch *centrifugal enhancement* optimiert (siehe 4.2.2.2 - Infektionen). Nach drei Tagen wurden die HCMV-Plaques angefärbt. Dafür wurde das Medium entfernt und die Zellen durch die Zugabe von 100 µl kalten Methanol (-20°C) pro Kammer (*well*) fixiert und permeabilisiert. Die Zellen wurden für mind. 2 h in Methanol bei -20°C inkubiert. Anschließend wurde das Methanol entfernt und die Platten unter der Sterilbank trocknen gelassen. Nachdem die Zellen einmal mit PBS gewaschen wurden, wurden 50 µl 1/200 (v/v) verdünnter Primärantikörper (Klon CCH2, Dako, gerichtet gegen p52 HCMV-Antigen) in 1% (w/v) Milchpulver-TBST auf die Zellen gegeben und 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Kammern zweimal mit PBS gewaschen und der sekundäre, Peroxidase-gekoppelte, anti-Maus Detektionsantikörper (1/200 (v/v) in 1% (w/v) Milchpulver-TBST) zugegeben und 30 min

bei RT inkubiert. Die Kammern wurden anschließend erneut zweimal mit PBS gewaschen. Die Peroxidaseaktivität wurde mittels 3-Amino-Ethylcarbazol (AEC, Sigma), das einen rötlichen Niederschlag bildet, sichtbar gemacht. Dafür wurden 50 µl Substratlösung (1/4 AEC-Tablette in 1 ml N,N-Dimethylformamid lösen, 4 ml 0,1 M Na-Acetatlösung (pH 5,5) zugeben und kurz vor der Verwendung mit 10 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (v/v) versetzen ) je Kammer auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden in der Substratlösung 15-30 min inkubiert und die Reaktion durch Waschen mit PBS beendet. Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch.

### 4.2.2.3 Infektionen

Alle Infektionen mit CMV wurden durch sog. *centrifugal enhancement* verstärkt. Durch das Zentrifugieren (zweimal, jeweils für 15 min bei 25-28 °C und 2000 rpm [800 g]) der gerade infizierten Zellkulturgefäße in einer Plattenzentrifuge (in diesem Fall Eppendorf 5810R) verstärkt sich die Infektiosität um das 10- bis 100-fache (Osborn und Walker, 1968). Auch bei den Titrationen wurde der Stock-Titer mit *centrifugal enhancement* bestimmt.

### 4.2.2.4 Inhibition der viralen late-Genexpression

Phosphonoessigsäure (engl. *phosphonoacetic acid*) [PAA] blockiert die herpesvirale DNA-Polymerase und verhindert so die Synthese von viraler genomischer DNA. Da dieser Schritt für die Expression von viralen *late*-Genen definitionsgemäß erforderlich ist, wird die *late*-Genexpression durch PAA auf unter 10% reduziert (Hones und Watson, 1977). Zur Inhibition der *late*-Genexpression wurden die Zellen zum Zeitpunkt der Infektion mit 250 µg/ml PAA (Sigma, Steinheim, Germany #P-6909) behandelt (Hengel et al., 1994).

### 4.2.2.5 Selektive Expression von viralen IE-Genen

Für diese Experimente wurde nach einem beschriebenen Protokoll vorgegangen (Hengel et al., 1994). Die Zellen wurden in Gegenwart von 50 µg/ml des reversiblen Translationsinhibitors Cycloheximid (CHX) infiziert, so dass zwar virale *IE*-Transkripte gebildet werden, diese aber nicht translatiert werden und somit keine *IE*-Proteine für die Transaktivierung von *early*-Genen zur Verfügung stehen. Nach 4 h wurden die Zellen dreimal mit 5 µg/ml Actinomycin D (ActD)-haltigem PBS gewaschen, um das CHX zu entfernen und unter Blockierung der Transkription die akkumulierten *IE*-Transkripte in Proteine umzuschreiben. ActD (#A-1410) und CHX (# C-7698) wurde von Sigma, Steinheim, Deutschland bezogen.

### *4.2.2.6 Replikationsanalysen*

Für Wachstumskurven wurden die Zellen einen Tag vor der Infektion ausgelegt. Die Infektion erfolgte, wenn nicht anders angegeben, mit einer initialen Infektionsdosis von 0,05 pfu pro Zelle. Die Replikationsanalysen wurden in 12- oder 6-Lochplatten mit adhären Zellen durchgeführt. Zu den angegebenen Zeiten wurde jeweils ein komplettes Zellkulturgefäß (Zellen mit Überstand) bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Nach Ablauf des Experimentes wurden die Suspensionen gemeinsam bei  $4^{\circ}\text{C}$  aufgetaut und titriert. Für jedes Experiment wurden für jeden Zeitpunkt mindestens zwei unabhängige Suspensionen jeweils zweimal titriert ( $n=2*2$ ). Angegeben ist der Mittelwert dieser Bestimmungen mit der Standardabweichung.

### *4.2.2.7 Neutralisation*

Für die Neutralisation von HCMV-Viren durch neutralisierende Antikörper wurden die Viren in D-MEM mit einer  $\frac{1}{4}$  Verdünnung des jeweiligen humanen Serums für 1,5 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  rotierend inkubiert. Anschließend erfolgte eine normale Infektion wie oben beschrieben.

Das Serum eines Donors mit einem sehr hohen Titer CMV-spezifischer neutralisierender Antikörper wurde mit dem Serum eines CMV-negativen Donors verglichen. Die vollständige Neutralisation wurde mikroskopisch über das Ausbleiben von Plaquebildung kontrolliert und zeigte sich in den entsprechenden Experimenten an der fehlenden Expression von viralen Proteinen.

### *4.2.2.8 Inaktivierung von Viren durch UV-Licht*

Um virale DNA durch UV-Licht zu zerstören und so die virale Genexpression zu unterbinden, wurden die Viren für 25 min aus 10 cm Entfernung mit sowohl kurzwelligem (254 nm) als auch langwelligem (366 nm) UV-Licht bestrahlt. Die erfolgreiche Inaktivierung wurde durch das Ausbleiben von Plaque-Bildung (bei niedriger MOI) oder CPE-Bildung (bei hoher MOI) und fehlender viraler Genexpression kontrolliert.

## **4.2.3 Molekularbiologische Methoden**

Alle in dieser Arbeit nicht näher erläuterten allgemeinen molekularbiologischen Methoden, wie z.B. Restriktionsverdau, DNA-Ligationen und Ethidiumbromidfärbung von Agarose-Gelen, wurden nach Sambrook et al. (1989), Sambrook und Russel (2001) bzw. nach den Angaben der Hersteller durchgeführt.

Plasmid-Präparationen wurden, den Anweisungen des Herstellers folgend, mit den entsprechenden Kits von Qiagen durchgeführt.

### 4.2.3.1 RNA-Methoden

Grundsätzlich wurden für alle RNA-Methoden nur DEPC-behandelte, RNase-freie Lösungen verwendet, um zu verhindern, dass die RNA durch RNasen degradiert wird.

#### Präparation von (Gesamtzell-) RNA

Die zelluläre RNA wurden (den Hinweisen und Protokollen des Herstellers folgend) mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) präpariert. Die Zellen wurden mit QIASHredder-Säulen (Qiagen, Hilden) aufgeschlossen. Für eine RNA-Präparation wurden je experimenteller Kondition jeweils  $5 \cdot 10^6$  Zellen (eine gesamte 6-Lochplatte) verwendet.

#### Northern Blot

Die RNA wurden in einem MEN-Formaldehyd-Gel aufgetrennt. Das Gel wurde kurz mit H<sub>2</sub>O gewaschen und dann mittels der Turbo-Blot-Apparatur (Schleicher & Schuell) nach den Angaben des Herstellers per Kapillarblot mit 20x SSC auf eine Nylonmembran (Hybond NX, Amersham) überführt. Anschließend wurde die RNA mit UV-Licht kovalent mit der Membran vernetzt (UV-Crosslinker CL-1000, UVP).

Die DIG-markierten DNA-Sonden wurden per PCR mit STAT2-spezifischen Primern durchgeführt. Dafür wurde eine PCR mit DIG-dUTP im dNTP-Mix (3,5 mM DIG-dUTP, 6,5 mM dTTP und jeweils 10 mM dATP, dCTP und dGTP) durchgeführt. Als *template* diente der pCDNA3.1zeo-mSTAT2HA. Die PCR erfolgte mit einer *annealing* Temperatur von 53 °C und einer *processing* Zeit von 150 sec. Die folgenden Primer wurden für die PCR verwendet: AZ-STAT2-1 (5'-TTCCTCTATCCCCGAATCCCTC-3') und AZ-STAT2-HA (5'-CGGGGTACCTCACGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTACGCAGCGTCCTTAGAAGGTATCAAGAG-3'). Der erfolgreiche Einbau von DIG-UTP zeigte sich durch einen Größenunterschied gegenüber einem Amplifikat, dass durch eine herkömmliche PCR-Reaktion hergestellt worden war (Daten nicht gezeigt). Für den Nachweis humaner STAT2 Transkripte im Northern blot (Abb. 43) wurde eine STAT2-spezifische Sonde mit folgenden PCR-Primern in Anwesenheit von DIG-markierten Nukleotiden amplifiziert: STAT2forw 5'-GCTCATACTAGGGACGGGAAGTCG-3' und STAT2rev 5'-GGCTGAATGTCCCGGC-3'.

Die Prähybridisierung erfolgte in DIG-Easy Hyb-Puffer (Roche) bei 55°C für 1 h. Die Hybridisierung wurde mit der denaturierten PCR-Sonde (in DIG-Easy Hyb) bei 55°C über Nacht

## Material und Methoden

durchgeführt. Vor der Detektion wurde die Membran zweimal kurz mit 2x SSC, 0,1% SDS gespült und anschließend zweimal für jeweils 15 min bei 68°C mit 0,1x SSC, 0,1% SDS gewaschen.

Die Detektion der Hybridisierung der zellulären RNA mit der PCR-Sonde erfolgte mit dem Digoxigenin-System (Roche). Die Membran wurde in 1 % Blocking-Reagenz (Roche, in Maleinsäurepuffer verdünnt) für 30 min bei RT blockiert. Es folgte eine Inkubation (30 min bei RT) mit Alkalische Phosphatase (AP)-gekoppeltem DIG-spezifischen Antikörpern (Roche). Die Membran wurde dreimal für 10 min mit Maleinsäurepuffer gewaschen, anschließend 5 min mit AP-Puffer behandelt und dann 5 min in einer CDP-Star-Lösung (Roche) inkubiert, um die Alkalische Phosphatase (gebunden an die entsprechende Sonde) sichtbar zu machen. Die Reaktion der Substratdephosphorylierung erfolgt unter Lichtabgabe. Das entsprechende Signal wurde durch Auflegen von BioMax MR Filmen (Kodak) festgehalten.

Die folgenden Bakterienstämme wurden verwendet:

XL1-Blue [ $F'::Tn10$  *proA*·*B* *lacI*<sup>s</sup>  $\Delta(lacZ)M15/recA1$  *endA1* *gyrA96* (Nal) *thi* *hsdR17* ( $r_{\kappa}$   $m_{\kappa}$ ) *glnV44* *relA1* *lac*]

DH10B [ $F^-$  *mcrA*  $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$  80dlacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ lacX74 *deoR* *recA1* *endA1* *araD139*  $\Delta(ara, leu)7697$  *galU* *galK* $\lambda^-$  *rpsL* *nupG*]

Plasmide:

pCDNA3.1 (Invitrogen)

pCDNA3.1zeo-mSTAT2HA

pGene-GASluc

pISRE (ist ko-transfiziert mit pCDNA1-neo (Invitrogen)) in den ISREluc-NIH3T3 Zellen stabil enthalten.

pTA-ISREluc, pTA-GASluc und pTA-Control sind Teil des Mercury Pathway Profiling Luciferase Systems 5 (Katalognummer K2057-1, lot# 2060828, Clontech, Mountain View, USA).

### 4.2.4 Proteinbiochemische Methoden

#### 4.2.4.1 Proteinlysat-Herstellung: Gesamtzell-Lysate

Für die Herstellung von Proteinlysaten aus adhärennten Säugerzellen wurden diese mit Zellschabern (*cell scraper*, Renner) von dem jeweiligen Zellkulturgefäß gelöst. Für eine Probe wurden je nach Zelltyp zwischen  $2 \cdot 10^5$  und  $2 \cdot 10^6$  Zellen lysiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (100-300 g) und mindestens dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in eiskaltem RIPA<sup>+</sup>-Puffer resuspendiert, um die Zellen zu lysieren. Das Lysat wurde bei -20°C eingefroren. Nach dem Auftauen wurde das Lysat für 25 min bei 4°C und 16000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde als Gesamtproteinlysat verwendet. Durch den Einsatz von Phosphatase-Inhibitoren (NaF und Na-Vanadat) können in diesen Lysaten Proteinphosphorylierungen nachgewiesen werden.

#### 4.2.4.2 Proteinlysat-Herstellung: Fraktionierte native Lysate

Diese nativen, fraktionierten Lysate wurden für die Untersuchung von Proteinphosphorylierung, DNA-Bindung (EMSA-Analysen) und Protein-Protein-Interaktionen in nativer Gel-Elektrophorese herangezogen. Das Prinzip basiert sowohl auf differenzieller Zentrifugation als auch anschließender osmotischer Kernlyse durch Hochsalzpuffer-Inkubation.

Die Zellen wurden hierfür mit Hilfe eines Zellschabers von dem Kulturgefäß gelöst und dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde im zytoplasmatischen Lysepuffer resuspendiert und lysiert. Es erfolgte eine Inkubation für 5 min auf Eis. Die Suspension wurde anschließend in einer gekühlten Eppizentrifuge 16 sec zentrifugiert. Der Überstand (Ü1) wurde zum zytoplasmatischen Lysat weiter prozessiert, während aus dem Pellet (P1) das nukleäre Lysat gewonnen wurde. Ü1 wurde für 10 min bei 4°C und 13500 rpm (16700 g) zentrifugiert. Der Überstand aus dieser Zentrifugation (Ü2; zytoplasmatisches Lysat) wurde aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte anschließend bei -80°C. Das Pellet (P2) wurde verworfen.

P1 wurde in nukleärem Lysepuffer resuspendiert und 25-30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Lysat für 25 min bei 16700 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde als nukleäres Lysat verwendet, aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte ebenfalls bei -80°C.

Die fraktionierten Lysate wurde per Westernblot mit LaminA/C-spezifischen (CellSignaling #2032) und GAPDH-spezifischen Antikörpern (HyTest Ltd. #5G4 Klon 6C5) auf ihre Sauberkeit

geprüft. Die Lysate wurden nicht aufgetaut und wieder eingefroren, sondern nur einmal verwendet.

#### 4.2.4.3 Acetonfällung

Die Proteinlösung wurde mit zwei Teilen kaltem Aceton (100%; -20°C) versetzt und anschließend für 90 min bei 4°C und 16000 rpm (23500 g) zentrifugiert (Sigma Sartorius Zentrifuge). Anschließend wurde der Überstand entfernt und das restliche Aceton im Abzug abgedampft. Dieser Schritt wurde optional durch eine sehr kurze Zentrifugation bei geöffneten Eppideckeln beschleunigt. Das Pellet wurde in SDS-Probenpuffer aufgenommen und durch 5- bis 10-minütige Inkubation bei 95°C und vorsichtiges Auf-und-Ab-Pipettieren gelöst.

#### 4.2.4.4 Bradford-Bestimmung

Zur Gewährleistung von vergleichbaren Proteinmengen in den Westernblot-Analysen wurden die Proteinlysate per Bradford-Proteinmessung normalisiert. Dafür wurden 2-5 µl des jeweiligen Lysates mit 995-998 µl der Bradfordlösung gemischt (das Volumen wurde so gewählt, dass sich alle Proben innerhalb des linearen Messbereiches befanden [0,1-0,7 OD]). Anschließend wurde die optische Dichte (OD) bei 595 nm Wellenlänge in einem Spektralphotometer bestimmt. Die Proteinlysate, die verglichen werden sollten, wurden daraufhin bei Bedarf (bezogen auf das niedrigst konzentrierteste Lysat) mit dem entsprechenden Lysepuffer verdünnt. Das erfolgreiche Normalisieren wurde durch eine Ponceau-Färbung der geblotteten Membran und einen β-Aktin Reblot kontrolliert.

Bei Lösungen mit niedrigen Proteinkonzentration oder wenn absolute Proteinmengen bestimmt werden sollten, wurde die Proteinkonzentration mit dem BCA-Protein Assay Kit (Pierce) nach den Angaben des Herstellers quantifiziert.

#### 4.2.4.5 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese basiert auf der von Laemmli entwickelten Methode der Auftrennung von Proteinen in einem Tris-Glycin-Polyacrylamid-Gel-„Sieb“, wobei die Ladung des Proteins durch (die Ladungen von) SDS maskiert wird (Laemmli, 1970). Es wurden diskontinuierliche Gele, bestehend aus einem Sammel- und einem Trenngel verwendet. Die Gele wurden nach dem folgenden Pipettierschema angesetzt:

Gute Auftrennung bei	Einheit [kDa]	Trenngel [8%] ~ 50-150	Trenngel [10%] ~30-130	Trenngel [12%] ~15-90	Sammelgel
Polyacrylamid 30% (PAA)	[ml]	3,2 (19,2)	4 (24)	4,8(28,8)	1,5 (6)
TrisHCl 0,5 M pH 6,8	[ml]				1,2 (4,8)
TrisHCl 2 M pH 8,0	[ml]	2,5 (15,2)	2,5 (15,2)	2,5 (15,2)	
SDS 20% (w/v)	[µl]	60 (360)	60 (360)	60 (360)	45(180)

## Material und Methoden

Saccharose 60% (w/v)	[ml]				2,1 (8,4)
Wasser	[ml]	6,1 (36,6)	5,3 (31,8)	4,5 (27)	4,2 (16,8)
TEMED	[ $\mu$ l]	24 (144)	24 (144)	24 (144)	12(48)
APS 10% (w/v)	[ $\mu$ l]	144 (800)	144 (800)	144 (800)	120 (200)

Die Zahlen geben das jeweilige Volumen für 2 kleine Gele an. Die Zahlen in Klammern für zwei mittelgroße Gele.

Die normalisierten Proben wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. Anschließend wurden (je nach Typ des Gels) zwischen 10-45  $\mu$ l Probe aufgetragen. Die Auftrennung in kleinen Gelen erfolgte bei 20 mA je Gel für 60 bis 90 min. Die mittleren Gele wurden über Nacht (17 h) bei 4°C und angelegten 120 mA bei 12 V gefahren.

### 4.2.4.6 Coomassie-Gelfärbung

Für die Coomassie-Gelfärbung wurde das Gel für ca. 16 h (über Nacht) in der Coomassie-Gelfärbelösung inkubiert, bis es die gewünschte Blaufärbung erreicht hatte. Abschließend wurde die unspezifische Färbung durch Inkubation in destilliertem Wasser ausgewaschen. Die Gele wurden nicht vorher fixiert.

### 4.2.4.7 Silberfärbung

Die Proteinsilberfärbung beruht auf dem Prinzip der Bindung von Silberionen durch Proteine (Merril et al., 1981).

Das SDS-Gel wurde für 20 (45) min in Silberfärbungs-Fixierlösung inkubiert. Anschließend wurde das Gel erst dreimal für jeweils ca. 5 min in 50% (v/v) Ethanol und dann für 1 (3) min in Silberfärbungslösung A gewaschen. Diese Lösung wurde durch dreimaliges kurzes Spülen mit Wasser entfernt. Dann wurde das Gel für 10-15 (45-60) min in Silberfärbungslösung B inkubiert, um anschließend erneut zweimal mit Wasser gespült zu werden. Die Entwicklung erfolgte durch Inkubation mit Silberfärbungslösung C nach Sicht. Die Färbung wurde durch das Waschen mit Wasser und erneute Inkubation in Fixierlösung beendet. Das Gel wurde auf ein Whatman-Papier gelegt, mit Hilfe eines Gel-Trockners getrocknet und auf dem Whatman-Papier fixiert. (Die Zahlen in Klammern gelten für mittlere Gele). Wichtige Tipps und Hinweise zur Silberfärbung finden sich in der Publikation (Chevallet et al., 2006).

### 4.2.4.8 Westernblot

Für die Übertragung der im SDS-Gel aufgetrennten Proteine auf eine Membran wurden die Proteine mittels *semi-dry* Blotverfahren in einem Elektrobloetter (Biometra) auf Nitrocellulose-Membranen (Protran, Schleicher und Schuell) überführt. Dafür wurde die Membran auf drei mit Blotpuffer getränkte Whatman-Papiere (3MM, Whatman) auf die Anode gelegt. Das Gel wurde auf die Membran gelegt und durch weitere drei mit Blotpuffer durchtränkte Whatman-Papiere

von der oben gelegene Kathode getrennt. Das Blotting erfolgte bei 1000 mA und 16 V für 90 min. Das Blotting und die Vergleichbarkeit der Proteinbeladung wurden durch eine Färbung der Membran mit Ponceau-Lösung kontrolliert. Die Färbung wurde durch Waschen mit TBST-Lösung entfernt.

Blots, bei denen anschließend Protein-Phosphorylierungen untersucht werden sollte, wurden nicht mit Ponceau-Lösung gefärbt (da die Lösung Essigsäure enthält und somit sehr sauer ist), um zu verhindern, dass die Ponceau-Färbung die Stabilität der Phosphorylierung beeinträchtigt.

Die Membran wurde anschließend für mind. 40 min in 5% (w/v) Magermilchpulver (Sucofin) in TBST blockiert. Nach der Blockierung wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper (in 1% (w/v) Milchpulver/TBST) inkubiert. Nichtgebundener Antikörper wurde durch zwei- bis dreifaches Waschen (jeweils ca. 5 min) mit TBST entfernt. Es folgte eine Inkubation für mind. 45 min bei RT mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (ebenfalls in 1% (w/v) Magermilchpulver/TBST). Überschüssiger Sekundärantikörper wurde durch 4-6 Waschschriffe mit TBST (jeder ca. 5-10 Minuten bei RT) entfernt. Die Proteine wurden mit Hilfe des ECL-Kits (GE Healthcare) und den entsprechenden Filmen (GE Healthcare) sichtbar gemacht.

#### 4.2.4.9 Immunpräzipitation (IP)

Immunpräzipitation (nativ, nicht-radioaktiv)

Für die native nicht-radioaktive Immunpräzipitation wurden je nach untersuchtem Zelltyp pro Ansatz zwischen  $2,5 \cdot 10^6$  und  $10^7$  Zellen verwendet. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber von dem Zellkulturgefäß gelöst und in ein gekühltes 15ml-Falcon überführt. Die Zellen wurden mindestens dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in 1 ml eiskaltem PBS aufgenommen und in ein gekühltes Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Suspension wurde zentrifugiert (3 min; 4°C bei 2150 g) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in nativem-IP-Lysepuffer aufgenommen, vorsichtig resuspendiert und anschließend für 30 min bei 4°C in einem Überkopftaumler rotierend inkubiert. Um die unlösliche Fraktion zu entfernen, wurde die Suspension für 25 min bei 4°C und 16700 g zentrifugiert. Der Überstand wurde als Proteinlysat weiter verwendet und das Pellet verworfen. Um unspezifische Proteinbindungen an die Protein-A- oder Protein-G-Sepharose zu minimieren, wurden die Lysate optional für 30-60 min bei 4°C rotierend mit 25 µl Sepharose (prä-) absorbiert. Nach dieser Zeit wurde durch eine 30-sekündige Zentrifugation bei 4°C mit 9168 g die Sepharose pelletiert und der Überstand weiter verwendet. Für die IP wurden je nach dem zu untersuchenden Protein zwischen 2 und 5 µg Antikörper (1 µg α-mSTAT2-; 2 µg α-hSTAT2-; 2,5 µg α-HA-; 2,45 µg α-

Flag-; 2,5 µg α-V5- und 5 µg α-DDB1-Antikörper) zugegeben und der Ansatz für 1-16 h rotierend bei 4°C inkubiert. Die Immunkomplexe wurden durch Zugabe von 35 µl Protein-A- (für Antikörper aus dem Kaninchen) oder Protein-G-Sepharose (beide GE Healthcare [je nach Subtyp für Antikörper aus der Maus, insbesondere wichtig bei mIgG1 und mIgG3]) und Inkubation für 45-90 min bei 4°C gebunden. Das Pellet wurde im Standard-Protokoll mindestens sechsmal mit dem nativen IP-Waschpuffer (mit einer NaCl-Konzentration von 250 mM) gewaschen. Für die Kontrolle der Proteine im Gesamtlisat wurde das Lysat von dem ersten Waschgang nicht verworfen, sondern die enthaltenen Proteine per Acetonfällung präzipitiert und als Vergleich in dem finalen Westernblot verwendet. Für schonende Aufreinigungen von Proteinkomplexen wurden die Zellen mit einer sukzessiv ansteigenden Salzrampe (0, 50, 100, 150, 200, 250, 350 und 500 mM NaCl) jeweils zweimal für jeweils 2 min bei 4°C langsam rotierend in einem Überkopftaumler inkubiert und gewaschen. Der gesamte Prozess wurde komplett im 4°C Raum durchgeführt. Anschließend wurde das Pellet in 2,5-fach SDS-Probenpuffer für 5 min bei 95°C aufgekocht, per SDS-PAGE aufgetrennt und die gewünschten Proteine anschließend in einem Westernblot untersucht.

### Immunopräzipitation (nativ, radioaktiv)

Die radioaktive Immunpräzipitation wurde im Prinzip wie die nicht-radioaktive IP durchgeführt, allerdings wurden nur ca.  $0,5-1 \cdot 10^6$  Zellen verwendet. Die Zellen wurden je nach Versuchsaufbau für 30-90 min in L-Methionin-/L-Cystein-freiem Medium gehungert. Anschließend wurden sie je nach Versuchsaufbau für 45-240 min mit 10 µl (~10 MBq/~ $10^6$  Zellen) EasyTag Express  $^{35}\text{S}$  *protein labeling mix* (PerkinElmer) in Hungermedium markiert. Die weitere IP-Prozedur wurde wie für die oben beschriebene nicht-radioaktive IP durchgeführt. Nach der SDS-PAGE wurde das Gel jedoch in IP-Fixierpuffer fixiert und entwässert, in einem Gelrockner getrocknet und die Proteine durch Autoradiographie sichtbar gemacht, indem Filme (Kodak) aufgelegt wurden. Als Größenvergleich diente ein  $^{14}\text{C}$ -markierter Proteingrößenstandard (GE Healthcare).

### 4.2.4.10 Pulse-Chase-Experimente

Die Zellen wurden mit dem angegebenen Virus infiziert. Zu der angegebenen Zeit nach Infektion wurden die Zellen in L-Methionin-/L-Cystein-freiem Medium für 1 h gehungert. Anschließend wurden die Zellen für 90 min mit 10 µl (~10 MBq/~ $10^6$  Zellen) EasyTag Express  $^{35}\text{S}$  *protein labeling mix* (PerkinElmer) in Hungermedium *pulse*-markiert. Nach der Markierung wurden die Zellen dreimal mit *chase*-Medium (steriles 10% [v/v] FKS D-MEM mit 1,5 mg/ml L-Methionin

und L-Cystein supplementiert) gewaschen und dann für die angegebene Zeit in *chase*-Medium inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden die entsprechenden Proben mit einem Zellschaber abgekratzt, pelletiert und dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Die Zellen wurden durch eine 30-minütige Inkubation auf Eis in 1 ml nativem IP-Lysepuffer lysiert. Die Lysate wurden für 25 min bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert [20800 g]. Der Überstand wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren, bis die IP aller Lysate synchron durchgeführt werden konnte. Die Lysate wurden vor der IP bezüglich der inkorporierten cpm <sup>35</sup>S normalisiert.

Die Präzipitation erfolgte mit 2 µg anti-STAT2-Antikörper (Upstate) pro Probe über Nacht bei 4°C. Immunkomplexe wurden mit Protein-G-Sepharose (GE Healthcare) für 2 h bei 4°C gebildet. Das Pellet wurde fünfmal mit Lysepuffer gewaschen.

Letztendlich wurden die Proteine auf einem 8% SDS-PAGE-Gel separiert. Das Gel wurde in IP-Fixierpuffer fixiert, auf einem Gelrockner getrocknet und die Proteine durch Autoradiographie durch auflegen von Filmen (Kodak) sichtbar gemacht.

#### 4.2.4.11 Elektromobility Shift Assay (EMSA)

Bei diesem Verfahren wird die Bindungsfähigkeit von Proteinen oder Proteinkomplexen an definierte dsDNA-Sequenzen untersucht. Die EMSA-Analysen erfolgten grundsätzlich nach dem Protokoll der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Uwe Finkemeier (FMP, FU Berlin, Deutschland). Die Herstellung der Lysate findet sich weiter oben und ist beschrieben in (Meyer et al., 2003). Das Verfahren des EMSAs wurde beschrieben in (Begitt et al., 2000).

Für die Herstellung der Sonde wurde ein Doppelstrang aus zwei teilweise überlappenden Primern hybridisiert. Für die ISRE-Sonde wurden 100 pmol/µl der folgenden Primer über Nacht in Hybridisierungspuffer (10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl bei pH 7,5) hybridisiert: 5'-gacCTCGGGAAAGGGAAACCGAAACTGAAAGCC-3' und 5'-gacGGCTTCAGTTTTCGGTTTCCCTTTCCCGAG-3' (die hybridisierenden jeweils revers-komplementären Basen sind als Großbuchstaben dargestellt, die aufzufüllenden Überhänge sind kleingeschrieben und die ISRE-Konsensus-Sequenz ist unterstrichen). Für den GAS-EMSA wurden parallel die folgenden beiden Primer verwendet und hybridisiert: 5'-aagtcCGACATTTCCCGTAAATCTG-3' und 5'-aagtcCAGATTTACGGGAAATGTCG-3'. Die ISRE-Sonde entspricht dem IFN-responsiven Konsensusmotiv aus dem *ISG15*-Gen. Die GAS-Sonde ist die sog. M67/SIE-Sonde und stellt eine artifizielle Änderung der ursprünglichen c-Sis Bindesequenz aus dem *c-fos* Promotor dar (Wagner et al., 1990), die später als optimale STAT-Proteinbindestelle beschrieben wurde (Eilers et al., 1994; Yuan et al., 1994).

## Material und Methoden

Da in vergleichenden Experimenten festgestellt wurde, dass weder der ISRE- bzw. GAS-Nachweis durch eine endmarkierte Sonde (nach  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -Phosphat-Übertragung durch eine T4-Polynukleotidkinase), noch eine Cy5-Fluorophor-Kopplung der entsprechenden Sonden den experimentellen Anforderungen genügt (Daten nicht gezeigt), wurden die Sonden über den Einbau von acht radioaktiven Nukleotiden in einer Auffüllreaktion markiert. Die Sonden wurden auf 1 pmol/ $\mu\text{l}$  verdünnt und über folgende Klenow-Auffüllreaktion markiert:

Komponente	Volumen [ $\mu\text{l}$ ]
Hyb. dsDNA (~1 pmol/ $\mu\text{l}$ )	1
$^{32}\alpha$ -dCTP	8
$^{32}\alpha$ -dGTP	8
$^{32}\alpha$ -dTTP	8
$^{32}\alpha$ -dATP	8
Klenow-Puffer („EcoPol“)	5
Klenow-Fragment (Exonuklease)	1
Wasser	11

Die Markierung erfolgte für 25 min bei RT. Durch Zugabe von 1  $\mu\text{l}$  unmarkierten „PCR“-Nukleotiden (jeweils 10 mM der desoxy-Nukleotide) wurde ein finales Endauffüllen gewährleistet. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1  $\mu\text{l}$  EDTA (0,5 M) abgestoppt. Die Sonde wurde durch eine Zentrifugation durch eine Microspin-Sephadex-G25-Säule (GE Healthcare, München) von nicht-inkorporierten Nukleotiden befreit.

Die Bindereaktion erfolgte durch eine Inkubation der nativen Proteinlysate mit der radioaktiv-markierten Sonde unter folgenden Bedingungen:

Komponente	Volumen [ $\mu\text{l}$ ]
DTT (100mM)	1,3
Wasser	2,5
poly[d(I-C)] 1mg/ml	2
EMSA Shift Puffer	2,5
Sonde (~ 200 000 cpm/ $\mu\text{l}$ )	0,2
Proteinlysat (nativ)	4,5

Die Reaktion erfolgte für 15-20 min bei RT

Für den Fall, dass ein sog. *supershift* durchgeführt werden sollte, wurde anschließend 0,02-0,2  $\mu\text{g}$  (je nach Qualität des Antikörpers) des jeweiligen Antikörpers zu dem Reaktionsgemisch gegeben und die Reaktion erneut für 15 min bei RT inkubiert.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte auf einem 4,7% Tris-Borat-Polyacrylamidgel, das vorher mind. 1 h in 0,25-fachem TBE-Laufpuffer bei 4 °C (vor-) gelaufen war. Das Gel wurde in Fixierpuffer fixiert, in einem Gelrockner getrocknet und auf ein Whatmann-Papier gezogen. Die DNA-Protein-Komplexe wurden durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

### 4.2.4.12 *Luciferase-Reporterassay*

Die Bestimmung der Luciferaseaktivität wurde dem Protokoll des Herstellers folgend durchgeführt (Roche, Mannheim, Deutschland) und in einem Mikroplatten-Luminometer (Model LB 96V; Berthold) gemessen. In jedem Experiment wurden jeweils die Zellen eines 24-Lochplattengefäßes (2 cm<sup>2</sup> konfluenter Zellrasen mit ca. 10<sup>5</sup> Zellen) lysiert und gemessen. Die Messungen erfolgten immer mindestens als Doppelbestimmungen (meist als Dreifachbestimmungen), angegeben ist der Mittelwert dieser Werte und die Standardabweichung.

### 4.2.4.13 *Immunfluoreszenz-Färbung (IF)*

Die entsprechenden Zellen wurden entweder auf sterilen Deckgläschen, die mit 0,04 % (v/v) Gelatine in PBS vorbehandelt worden waren, oder direkt in der Zellkulturplastikware ausgelegt und gefärbt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, bevor sie mit einer 3% (v/v) Paraformaldehyd (PFA)-Lösung fixiert wurden. Das PFA wurde durch einmaliges Waschen mit PBS entfernt und die Zellen anschließend entweder durch eine Inkubation für 15 min bei RT mit einer 0,05% (w/v) Saponinlösung (in PBS) oder mit 0,2 % (v/v) Triton-X-100 permeabilisiert. Die Zellen wurden dann durch eine Inkubation für 20 min bei RT in Blockierungslösung (2% (v/v) Ziegen Serum, 0,005% Saponin (w/v) in PBS) inkubiert, um anschließend für 1 h bei RT mit dem Primärantikörper ( $\alpha$ -HA- [1/250 verdünnt; 20  $\mu$ g/ml] oder  $\alpha$ -Flag [1/250 verdünnt; 19,6  $\mu$ g/ml]) in 10% Blockierungslösung angefärbt zu werden. Der nicht gebundene Primärantikörper wurde durch dreifaches Waschen mit 10% Permeabilisierungslösung ausgewaschen. Der Primärantikörper wurde durch eine anschließende Färbung (45 min bei RT) mit einem Fluorophor-gekoppelten (Cy2 oder Cy3) Sekundärantikörper (Jackson ImmunoResearch) (1/200 verdünnt; 1,5  $\mu$ g/ml) sichtbar gemacht. Überschüssiger Sekundärantikörper wurde durch wiederholtes Waschen (3-5-mal) mit PBS entfernt. Zum Schluss wurde die nukleäre DNA (resp. die sie umschließenden Kerne) durch eine DAPI-Färbung (5 min bei RT; 1  $\mu$ g/ml [v/w] in PBS) sichtbar gemacht. Falls Objektträger verwendet wurden, wurden diese in/mit Mowiol eingebettet. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Nikon TE2000 Mikroskops und der entsprechenden LUCIA 4.60 Software.

## REFERENZEN

### Reference List

- Abate,D.A., Watanabe,S., and Mocarski,E.S. (2004). Major human cytomegalovirus structural protein pp65 (ppUL83) prevents interferon response factor 3 activation in the interferon response. *J. Virol.* 78, 10995-11006.
- Abenes,G., Lee,M., Haghjoo,E., Tong,T., Zhan,X., and Liu,F. (2001). Murine cytomegalovirus open reading frame M27 plays an important role in growth and virulence in mice. *J. Virol.* 75, 1697-1707.
- Adam,E., Melnick,J.L., Probstfield,J.L., Petrie,B.L., Burek,J., Bailey,K.R., McCollum,C.H., and DeBakey,M.E. (1987). High levels of cytomegalovirus antibody in patients requiring vascular surgery for atherosclerosis. *Lancet* 2, 291-293.
- Adams,O., Besken,K., Oberdorfer,C., MacKenzie,C.R., Russing,D., and Daubener,W. (2004a). Inhibition of human herpes simplex virus type 2 by interferon gamma and tumor necrosis factor alpha is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Microbes Infect.* 6, 806-812.
- Adams,O., Besken,K., Oberdorfer,C., MacKenzie,C.R., Takikawa,O., and Daubener,W. (2004b). Role of indoleamine-2,3-dioxygenase in alpha/beta and gamma interferon-mediated antiviral effects against herpes simplex virus infections. *J. Virol.* 78, 2632-2636.
- Aderem,A. and Ulevitch,R.J. (2000). Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406, 782-787.
- Aguet,M., Dembic,Z., and Merlin,G. (1988). Molecular cloning and expression of the human interferon-gamma receptor. *Cell* 55, 273-280.
- Anderson,K.V., Jurgens,G., and Nusslein-Volhard,C. (1985). Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell* 42, 779-789.
- Andoniou,C.E., van Dommelen,S.L., Voigt,V., Andrews,D.M., Brizard,G., Asselin-Paturel,C., Delale,T., Stacey,K.J., Trinchieri,G., and Degli-Esposti,M.A. (2005). Interaction between conventional dendritic cells and natural killer cells is integral to the activation of effective antiviral immunity. *Nat. Immunol.* 6, 1011-1019.
- Andrejeva,J., Poole,E., Young,D.F., Goodbourn,S., and Randall,R.E. (2002). The p127 subunit (DDB1) of the UV-DNA damage repair binding protein is essential for the targeted degradation of STAT1 by the V protein of the paramyxovirus simian virus 5. *J. Virol.* 76, 11379-11386.
- Aoki,K., Shimoda,K., Oritani,K., Matsuda,T., Kamezaki,K., Muromoto,R., Numata,A., Tamiya,S., Haro,T., Ishikawa,F., Takase,K., Yamamoto,T., Yumioka,T., Miyamoto,T., Nagafuji,K., Gondo,H., Nagafuchi,S., Nakayama,K., and Harada,M. (2003). Limitin, an interferon-like cytokine, transduces inhibitory signals on B-cell growth through activation of Tyk2, but not Stat1, followed by induction and nuclear translocation of Daxx. *Exp. Hematol.* 31, 1317-1322.

- Apostolou,E. and Thanos,D. (2008). Virus Infection Induces NF-kappaB-dependent interchromosomal associations mediating monoallelic IFN-beta gene expression. *Cell* 134, 85-96.
- Aragane,Y., Kulms,D., Luger,T.A., and Schwarz,T. (1997). Down-regulation of interferon gamma-activated STAT1 by UV light. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 11490-11495.
- Asselin-Paturel,C., Boonstra,A., Dalod,M., Durand,I., Yessaad,N., Dezutter-Dambuyant,C., Vicari,A., O'Garra,A., Biron,C., Briere,F., and Trinchieri,G. (2001). Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat. Immunol.* 2, 1144-1150.
- Baltimore,D. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* 226, 1209-1211.
- Bankier,A.T., Beck,S., Bohni,R., Brown,C.M., Cerny,R., Chee,M.S., Hutchison,C.A., III, Kouzarides,T., Martignetti,J.A., Preddie,E., and . (1991). The DNA sequence of the human cytomegalovirus genome. *DNA Seq.* 2, 1-12.
- Banninger,G. and Reich,N.C. (2004). STAT2 nuclear trafficking. *J. Biol. Chem.* 279, 39199-39206.
- Barnard,P. and McMillan,N.A. (1999). The human papillomavirus E7 oncoprotein abrogates signaling mediated by interferon-alpha. *Virology* 259, 305-313.
- Barnard,P., Payne,E., and McMillan,N.A. (2000). The human papillomavirus E7 protein is able to inhibit the antiviral and anti-growth functions of interferon-alpha. *Virology* 277, 411-419.
- Bason,C., Corrocher,R., Lunardi,C., Puccetti,P., Olivieri,O., Girelli,D., Navone,R., Beri,R., Millo,E., Margonato,A., Martinelli,N., and Puccetti,A. (2003). Interaction of antibodies against cytomegalovirus with heat-shock protein 60 in pathogenesis of atherosclerosis. *Lancet* 362, 1971-1977.
- Begitt,A., Meyer,T., van Rossum,M., and Vinkemeier,U. (2000). Nucleocytoplasmic translocation of Stat1 is regulated by a leucine-rich export signal in the coiled-coil domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 10418-10423.
- Bekpen,C., Hunn,J.P., Rohde,C., Parvanova,I., Guethlein,L., Dunn,D.M., Glowalla,E., Leptin,M., and Howard,J.C. (2005). The interferon-inducible p47 (IRG) GTPases in vertebrates: loss of the cell autonomous resistance mechanism in the human lineage. *Genome Biology* 6.
- Berget,S.M., Moore,C., and Sharp,P.A. (1977). Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 74, 3171-3175.
- Bluyssen,H.A. and Levy,D.E. (1997). Stat2 is a transcriptional activator that requires sequence-specific contacts provided by stat1 and p48 for stable interaction with DNA. *J. Biol. Chem.* 272, 4600-4605.
- Bodaghi,B., Slobbe-van Drunen,M.E., Topilko,A., Perret,E., Vossen,R.C., Dam-Mieras,M.C., Zipeto,D., Virelizier,J.L., LeHoang,P., Bruggeman,C.A., and Michelson,S. (1999). Entry of human cytomegalovirus into retinal pigment epithelial and endothelial cells by endocytosis. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 40, 2598-2607.

## Referenzen und Zitate

- Boehm,U., Guethlein,L., Klamp,T., Ozbek,K., Schaub,A., Futterer,A., Pfeffer,K., and Howard,J.C. (1998). Two families of GTPases dominate the complex cellular response to IFN-gamma. *J. Immunol.* *161*, 6715-6723.
- Boehme,K.W., Singh,J., Perry,S.T., and Compton,T. (2004). Human cytomegalovirus elicits a coordinated cellular antiviral response via envelope glycoprotein B. *J. Virol.* *78*, 1202-1211.
- Boldogh,I., AbuBakar,S., and Albrecht,T. (1990). Activation of proto-oncogenes: an immediate early event in human cytomegalovirus infection. *Science* *247*, 561-564.
- Bontron,S., Lin-Marq,N., and Strubin,M. (2002). Hepatitis B virus X protein associated with UV-DDB1 induces cell death in the nucleus and is functionally antagonized by UV-DDB2. *J. Biol. Chem.* *277*, 38847-38854.
- 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*, 8320-8329.
- Boshart,M., Weber,F., Jahn,G., Dorsch-Hasler,K., Fleckenstein,B., and Schaffner,W. (1985). A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell* *41*, 521-530.
- 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*, 3607-3613.
- Brierley,M.M., Marchington,K.L., Jurisica,I., and Fish,E.N. (2006). Identification of GAS-dependent interferon-sensitive target genes whose transcription is STAT2-dependent but ISGF3-independent. *FEBS J.* *273*, 1569-1581.
- Brochieri,L., Kledal,T.N., Karlin,S., and Mocarski,E.S. (2005). Predicting coding potential from genome sequence: application to betaherpesviruses infecting rats and mice. *J. Virol.* *79*, 7570-7596.
- 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*, 11439-11444.
- Brune,W., Hengel,H., and Koszinowski,U.H. (1999a). A mouse model for cytomegalovirus infection. *Current Protocols in Immunology*. John Wiley & Sons, New York 19.7.1-19.7.3.
- Brune,W., Menard,C., Heesemann,J., and Koszinowski,U.H. (2001). A ribonucleotide reductase homolog of cytomegalovirus and endothelial cell tropism. *Science* *291*, 303-305.
- Brune,W., Menard,C., Hobom,U., Odenbreit,S., Messerle,M., and Koszinowski,U.H. (1999b). Rapid identification of essential and nonessential herpesvirus genes by direct transposon mutagenesis. *Nat. Biotechnol.* *17*, 360-364.
- Bukowski,J.F., Warner,J.F., Dennert,G., and Welsh,R.M. (1985). Adoptive transfer studies demonstrating the antiviral effect of natural killer cells in vivo. *J. Exp. Med.* *161*, 40-52.
- Bukowski,J.F., Woda,B.A., and Welsh,R.M. (1984). Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection in natural killer cell-depleted mice. *J. Virol.* *52*, 119-128.

## Referenzen und Zitate

- Cang, Y., Zhang, J., Nicholas, S.A., Bastien, J., Li, B., Zhou, P., and Goff, S.P. (2006). Deletion of DDB1 in mouse brain and lens leads to p53-dependent elimination of proliferating cells. *Cell* 127, 929-940.
- Cantin, E., Tanamachi, B., Openshaw, H., Mann, J., and Clarke, K. (1999). Gamma interferon (IFN-gamma) receptor null-mutant mice are more susceptible to herpes simplex virus type 1 infection than IFN-gamma ligand null-mutant mice. *J. Virol.* 73, 5196-5200.
- Carlow, D.A., Teh, S.J., and Teh, H.S. (1998). Specific antiviral activity demonstrated by TGTP, a member of a new family of interferon-induced GTPases. *Journal of Immunology* 161, 2348-2355.
- Casrouge, A., Zhang, S.Y., Eidenschenk, C., Jouanguy, E., Puel, A., Yang, K., Alcais, A., Picard, C., Mahfoufi, N., Nicolas, N., Lorenzo, L., Plancoulaine, S., Senechal, B., Geissmann, F., Tabeta, K., Hoebe, K., Du, X., Miller, R.L., Heron, B., Mignot, C., de Villemeur, T.B., Lebon, P., Dulac, O., Rozenberg, F., Beutler, B., Tardieu, M., Abel, L., and Casanova, J.L. (2006). Herpes simplex virus encephalitis in human UNC-93B deficiency. *Science* 314, 308-312.
- Catic, A., Collins, C., Church, G.M., and Ploegh, H.L. (2004). Preferred in vivo ubiquitination sites. *Bioinformatics.* 20, 3302-3307.
- Chee, M.S., Bankier, A.T., Beck, S., Bohni, R., Brown, C.M., Cerny, R., Horsnell, T., Hutchison, C.A., III, Kouzarides, T., Martignetti, J.A., and . (1990). Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 154, 125-169.
- Chen, X., Vinkemeier, U., Zhao, Y., Jeruzalmi, D., Darnell, J.E., Jr., and Kuriyan, J. (1998). Crystal structure of a tyrosine phosphorylated STAT-1 dimer bound to DNA. *Cell* 93, 827-839.
- Chen, X., Zhang, J., Lee, J., Lin, P.S., Ford, J.M., Zheng, N., and Zhou, P. (2006). A kinase-independent function of c-Abl in promoting proteolytic destruction of damaged DNA binding proteins. *Mol. Cell* 22, 489-499.
- Cheriyath, V., Glaser, K.B., Waring, J.F., Baz, R., Hussein, M.A., and Borden, E.C. (2007). G1P3, an IFN-induced survival factor, antagonizes TRAIL-induced apoptosis in human myeloma cells. *J. Clin. Invest* 117, 3107-3117.
- Chevallet, M., Luche, S., and Rabilloud, T. (2006). Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nat. Protoc.* 1, 1852-1858.
- Chin, K.C. and Cresswell, P. (2001). Viperin (cig5), an IFN-inducible antiviral protein directly induced by human cytomegalovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 15125-15130.
- Chou, S., Marousek, G.I., Sinters, A.E., Davis, M.G., and Biron, K.K. (2004). Mutations in the human cytomegalovirus UL27 gene that confer resistance to maribavir. *J. Virol.* 78, 7124-7130.
- Choubey, D., Li, S.J., Datta, B., Gutterman, J.U., and Lengyel, P. (1996). Inhibition of E2F-mediated transcription by p202. *EMBO J.* 15, 5668-5678.
- Cicin-Sain, L., Bubic, I., Schnee, M., Ruzsics, Z., Mohr, C., Jonjic, S., and Koszinowski, U.H. (2007). Targeted deletion of regions rich in immune-evasive genes from the cytomegalovirus genome as a novel vaccine strategy. *J. Virol.* 81, 13825-13834.

## Referenzen und Zitate

- Ciechanover,A., Finley,D., and Varshavsky,A. (1984). Ubiquitin dependence of selective protein degradation demonstrated in the mammalian cell cycle mutant ts85. *Cell* 37, 57-66.
- Clemens,M.J., Laing,K.G., Jeffrey,I.W., Schofield,A., Sharp,T.V., Elia,A., Matys,V., James,M.C., and Tilleray,V.J. (1994). Regulation of the interferon-inducible eIF-2 alpha protein kinase by small RNAs. *Biochimie* 76, 770-778.
- Clifford,J.L., Yang,X., Walch,E., Wang,M., and Lippman,S.M. (2003). Dominant negative signal transducer and activator of transcription 2 (STAT2) protein: stable expression blocks interferon alpha action in skin squamous cell carcinoma cells. *Mol. Cancer Ther.* 2, 453-459.
- Cochran,B.H., Zullo,J., Verma,I.M., and Stiles,C.D. (1984). Expression of the c-fos gene and of an fos-related gene is stimulated by platelet-derived growth factor. *Science* 226, 1080-1082.
- Colamonici,O., Yan,H., Domanski,P., Handa,R., Smalley,D., Mullersman,J., Witte,M., Krishnan,K., and Krolewski,J. (1994a). Direct binding to and tyrosine phosphorylation of the alpha subunit of the type I interferon receptor by p135tyk2 tyrosine kinase. *Mol. Cell Biol.* 14, 8133-8142.
- Colamonici,O.R., Domanski,P., Sweitzer,S.M., Lerner,A., and Buller,R.M.L. (1995). Vaccinia Virus B18R Gene Encodes A Type-I Interferon-Binding Protein That Blocks Interferon-Alpha Transmembrane Signaling. *Journal of Biological Chemistry* 270, 15974-15978.
- Colamonici,O.R., Uyttendaele,H., Domanski,P., Yan,H., and Krolewski,J.J. (1994b). p135tyk2, an interferon-alpha-activated tyrosine kinase, is physically associated with an interferon-alpha receptor. *J. Biol. Chem.* 269, 3518-3522.
- Compton,T., Kurt-Jones,E.A., Boehme,K.W., Belko,J., Latz,E., Golenbock,D.T., and Finberg,R.W. (2003). Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. *J. Virol.* 77, 4588-4596.
- Cong,F., Tang,J., Hwang,B.J., Vuong,B.Q., Chu,G., and Goff,S.P. (2002). Interaction between UV-damaged DNA binding activity proteins and the c-Abl tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 277, 34870-34878.
- Costa-Pereira,A.P., Tininini,S., Strobl,B., Alonzi,T., Schlaak,J.F., Is'harc,H., Gesualdo,I., Newman,S.J., Kerr,I.M., and Poli,V. (2002). Mutational switch of an IL-6 response to an interferon-gamma-like response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 8043-8047.
- CRAIG,J.M., MACAULEY,J.C., WELLER,T.H., and WIRTH,P. (1957). Isolation of intranuclear inclusion producing agents from infants with illnesses resembling cytomegalic inclusion disease. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 94, 4-12.
- Crozat,K., Georgel,P., Rutschmann,S., Mann,N., Du,X., Hoebe,K., and Beutler,B. (2006). Analysis of the MCMV resistome by ENU mutagenesis. *Mamm. Genome* 17, 398-406.
- Croze,E., Russell-Harde,D., Wagner,T.C., Pu,H., Pfeffer,L.M., and Perez,H.D. (1996). The human type I interferon receptor. Identification of the interferon beta-specific receptor-associated phosphoprotein. *J. Biol. Chem.* 271, 33165-33168.
- Darnell,J.E. (1997). STATs and gene regulation. *Science* 277, 1630-1635.

## Referenzen und Zitate

- Das,S., Ward,S.V., Markle,D., and Samuel,C.E. (2004). DNA damage-binding proteins and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 function as constitutive KCS element components of the interferon-inducible RNA-dependent protein kinase promoter. *J. Biol. Chem.* *279*, 7313-7321.
- Decker,T., Lew,D.J., Mirkovitch,J., and Darnell,J.E., Jr. (1991). Cytoplasmic activation of GAF, an IFN-gamma-regulated DNA-binding factor. *EMBO J.* *10*, 927-932.
- Degrandi,D., Konermann,C., Beuter-Gunia,C., Kresse,A., Wurthner,J., Kurig,S., Beer,S., and Pfeffer,K. (2007). Extensive characterization of IFN-induced GTPases mGBP1 to mGBP10 involved in host defense. *J. Immunol.* *179*, 7729-7740.
- Delale,T., Paquin,A., Asselin-Paturel,C., Dalod,M., Brizard,G., Bates,E.E., Kastner,P., Chan,S., Akira,S., Vicari,A., Biron,C.A., Trinchieri,G., and Briere,F. (2005). MyD88-dependent and -independent murine cytomegalovirus sensing for IFN-alpha release and initiation of immune responses in vivo. *J. Immunol.* *175*, 6723-6732.
- Du,W. and Maniatis,T. (1992). An ATF/CREB binding site is required for virus induction of the human interferon beta gene [corrected]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *89*, 2150-2154.
- Du,W., Thanos,D., and Maniatis,T. (1993). Mechanisms of transcriptional synergism between distinct virus-inducible enhancer elements. *Cell* *74*, 887-898.
- Dunn,W., Chou,C., Li,H., Hai,R., Patterson,D., Stolc,V., Zhu,H., and Liu,F. (2003). Functional profiling of a human cytomegalovirus genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *100*, 14223-14228.
- Dupuis,S., Jouanguy,E., Al Hajjar,S., Fieschi,C., Al Mohsen,I.Z., Al Jumaah,S., Yang,K., Chapgier,A., Eidenschenk,C., Eid,P., Al Ghonaium,A., Tufenkeji,H., Frayha,H., Al Gazlan,S., Al Rayes,H., Schreiber,R.D., Gresser,I., and Casanova,J.L. (2003). Impaired response to interferon-alpha/beta and lethal viral disease in human STAT1 deficiency. *Nat. Genet.* *33*, 388-391.
- Durbin,J.E., Hackenmiller,R., Simon,M.C., and Levy,D.E. (1996). Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease. *Cell* *84*, 443-450.
- Edgar,R.C. (2004). MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC. Bioinformatics.* *5*, 113.
- Eilers,A., Baccarini,M., Horn,F., Hipskind,R.A., Schindler,C., and Decker,T. (1994). A factor induced by differentiation signals in cells of the macrophage lineage binds to the gamma interferon activation site. *Mol. Cell Biol.* *14*, 1364-1373.
- Erlandsson,L., Blumenthal,R., Eloranta,M.L., Engel,H., Alm,G., Weiss,S., and Leanderson,T. (1998). Interferon-beta is required for interferon-alpha production in mouse fibroblasts. *Current Biology* *8*, 223-226.
- Escalante,C.R., Nistal-Villan,E., Shen,L., Garcia-Sastre,A., and Aggarwal,A.K. (2007). Structure of IRF-3 bound to the PRDIII-I regulatory element of the human interferon-beta enhancer. *Mol. Cell* *26*, 703-716.
- Farrar,J.D., Smith,J.D., Murphy,T.L., Leung,S., Stark,G.R., and Murphy,K.M. (2000a). Selective loss of type I interferon-induced STAT4 activation caused by a minisatellite insertion in mouse Stat2. *Nat. Immunol.* *1*, 65-69.

## Referenzen und Zitate

- Farrar, J.D., Smith, J.D., Murphy, T.L., and Murphy, K.M. (2000b). Recruitment of Stat4 to the human interferon-alpha/beta receptor requires activated Stat2. *J. Biol. Chem.* 275, 2693-2697.
- Feire, A.L., Koss, H., and Compton, T. (2004). Cellular integrins function as entry receptors for human cytomegalovirus via a highly conserved disintegrin-like domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 15470-15475.
- Finley, D., Ciechanover, A., and Varshavsky, A. (1984). Thermolability of ubiquitin-activating enzyme from the mammalian cell cycle mutant ts85. *Cell* 37, 43-55.
- Fowler, K.B., Stagno, S., Pass, R.F., Britt, W.J., Boll, T.J., and Alford, C.A. (1992). The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status. *N. Engl. J. Med.* 326, 663-667.
- Fu, X.Y., Kessler, D.S., Veals, S.A., Levy, D.E., and Darnell, J.E., Jr. (1990). ISGF3, the transcriptional activator induced by interferon alpha, consists of multiple interacting polypeptide chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87, 8555-8559.
- Gariglio, M., Foresta, P., Sacchi, C., Lembo, M., Hertel, L., and Landolfo, S. (1997). Suppression of high mobility group protein T160 expression impairs mouse cytomegalovirus replication. *J. Gen. Virol.* 78 (Pt 3), 665-670.
- Garoufalidis, E., Kwan, I., Lin, R., Mustafa, A., Pepin, N., Roulston, A., Lacoste, J., and Hiscott, J. (1994). Viral induction of the human beta interferon promoter: modulation of transcription by NF-kappa B/rel proteins and interferon regulatory factors. *J. Virol.* 68, 4707-4715.
- Gaspari, A.A., Fleisher, T.A., and Kraemer, K.H. (1993). Impaired interferon production and natural killer cell activation in patients with the skin cancer-prone disorder, xeroderma pigmentosum. *J. Clin. Invest* 92, 1135-1142.
- George, C.X., Das, S., and Samuel, C.E. (2008). Organization of the mouse RNA-specific adenosine deaminase Adar1 gene 5'-region and demonstration of STAT1-independent, STAT2-dependent transcriptional activation by interferon. *Virology*.
- Gil, M.P., Bohn, E., O'Guin, A.K., Ramana, C.V., Levine, B., Stark, G.R., Virgin, H.W., and Schreiber, R.D. (2001). Biologic consequences of Stat1-independent IFN signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 6680-6685.
- Gongora, R., Stephan, R.P., Zhang, Z., and Cooper, M.D. (2001). An essential role for Daxx in the inhibition of B lymphopoiesis by type I interferons. *Immunity* 14, 727-737.
- Goodbourn, S. and Maniatis, T. (1988). Overlapping Positive and Negative Regulatory Domains of the Human Beta-Interferon Gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 1447-1451.
- Goodrum, F.D., Jordan, C.T., High, K., and Shenk, T. (2002). Human cytomegalovirus gene expression during infection of primary hematopoietic progenitor cells: a model for latency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 16255-16260.
- Gough, D.J., Sabapathy, K., Ko, E.Y., Arthur, H.A., Schreiber, R.D., Trapani, J.A., Clarke, C.J., and Johnstone, R.W. (2007). A novel c-Jun-dependent signal transduction pathway necessary for the transcriptional activation of interferon gamma response genes. *J. Biol. Chem.* 282, 938-946.

## Referenzen und Zitate

- Gravel,S.P. and Servant,M.J. (2005). Roles of an IkappaB kinase-related pathway in human cytomegalovirus-infected vascular smooth muscle cells: a molecular link in pathogen-induced proatherosclerotic conditions. *J. Biol. Chem.* *280*, 7477-7486.
- 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*, 366-379.
- Greger,J.G., Katz,R.A., Ishov,A.M., Maul,G.G., and Skalka,A.M. (2005). The cellular protein daxx interacts with avian sarcoma virus integrase and viral DNA to repress viral transcription. *J. Virol.* *79*, 4610-4618.
- Gupta,S., Jiang,M., and Pernis,A.B. (1999). IFN-alpha activates Stat6 and leads to the formation of Stat2:Stat6 complexes in B cells. *J. Immunol.* *163*, 3834-3841.
- Haga,I.R. and Bowie,A.G. (2005). Evasion of innate immunity by vaccinia virus. *Parasitology* *130*, S11-S25.
- 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*, 3937-3942.
- Haines,A., Peckham,C., Imeson,J., and Singh,M. (1988). Cytomegalovirus and atherosclerosis. *Lancet* *I*, 990-991.
- Haller,O. and Kochs,G. (2002). Interferon-induced mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity. *Traffic.* *3*, 710-717.
- Haring,M., Vestergaard,G., Rachel,R., Chen,L., Garrett,R.A., and Prangishvili,D. (2005). Virology: independent virus development outside a host. *Nature* *436*, 1101-1102.
- Hayes,S., Shiyonov,P., Chen,X., and Raychaudhuri,P. (1998). DDB, a putative DNA repair protein, can function as a transcriptional partner of E2F1. *Mol. Cell Biol.* *18*, 240-249.
- Heise,M.T., Connick,M., and Virgin,H.W. (1998a). Murine cytomegalovirus inhibits interferon gamma-induced antigen presentation to CD4 T cells by macrophages via regulation of expression of major histocompatibility complex class II-associated genes. *J. Exp. Med.* *187*, 1037-1046.
- Heise,M.T., Pollock,J.L., O'Guin,A., Barkon,M.L., Bormley,S., and Virgin,H.W. (1998b). Murine cytomegalovirus infection inhibits IFN gamma-induced MHC class II expression on macrophages: the role of type I interferon. *Virology* *241*, 331-344.
- Heise,M.T. and Virgin,H.W. (1995). The T-cell-independent role of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha in macrophage activation during murine cytomegalovirus and herpes simplex virus infections. *J. Virol.* *69*, 904-909.
- Hemmi,S., Bohni,R., Stark,G., Di Marco,F., and Aguet,M. (1994). A novel member of the interferon receptor family complements functionality of the murine interferon gamma receptor in human cells. *Cell* *76*, 803-810.
- Hengel,H., Esslinger,C., Pool,J., Goulmy,E., and Koszinowski,U.H. (1995). Cytokines restore MHC class I complex formation and control antigen presentation in human cytomegalovirus-infected cells. *J. Gen. Virol.* *76 ( Pt 12)*, 2987-2997.

## Referenzen und Zitate

- Hengel,H. and Koszinowski,U.H. (1997). Interference with antigen processing by viruses. *Curr. Opin. Immunol.* *9*, 470-476.
- Hengel,H., Koszinowski,U.H., and Conzelmann,K.K. (2005). Viruses know it all: new insights into IFN networks. *Trends in Immunology* *26*, 396-401.
- Hengel,H., Lucin,P., Jonjic,S., Ruppert,T., and Koszinowski,U.H. (1994). Restoration of cytomegalovirus antigen presentation by gamma interferon combats viral escape. *J. Virol.* *68*, 289-297.
- Henry,S.C., Schmader,K., Brown,T.T., Miller,S.E., Howell,D.N., Daley,G.G., and Hamilton,J.D. (2000). Enhanced green fluorescent protein as a marker for localizing murine cytomegalovirus in acute and latent infection. *J. Virol. Methods* *89*, 61-73.
- HERSHEY,A.D. and CHASE,M. (1952). Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *J. Gen. Physiol* *36*, 39-56.
- Hobom,U., Brune,W., Messerle,M., Hahn,G., and Koszinowski,U.H. (2000). Fast screening procedures for random transposon libraries of cloned herpesvirus genomes: mutational analysis of human cytomegalovirus envelope glycoprotein genes. *J. Virol.* *74*, 7720-7729.
- Hoebe,K., Du,X., Georgel,P., Janssen,E., Tabeta,K., Kim,S.O., Goode,J., Lin,P., Mann,N., Mudd,S., Crozat,K., Sovath,S., Han,J., and Beutler,B. (2003). Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature* *424*, 743-748.
- Honess,R.W. and Watson,D.H. (1977). Herpes simplex virus resistance and sensitivity to phosphonoacetic acid. *J. Virol.* *21*, 584-600.
- Hornung,V., Ellegast,J., Kim,S., Brzozka,K., Jung,A., Kato,H., Poeck,H., Akira,S., Conzelmann,K.K., Schlee,M., Endres,S., and Hartmann,G. (2006). 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* *314*, 994-997.
- Humphreys,I.R., de Trez,C., Kinkade,A., Benedict,C.A., Croft,M., and Ware,C.F. (2007). Cytomegalovirus exploits IL-10-mediated immune regulation in the salivary glands. *J. Exp. Med.* *204*, 1217-1225.
- Hwang,B.J. and Chu,G. (1993). Purification and characterization of a human protein that binds to damaged DNA. *Biochemistry* *32*, 1657-1666.
- Hwang,B.J., Liao,J.C., and Chu,G. (1996). Isolation of a cDNA encoding a UV-damaged DNA binding factor defective in xeroderma pigmentosum group E cells. *Mutat. Res.* *362*, 105-117.
- Hwang,J. and Kalejta,R.F. (2007). Proteasome-dependent, ubiquitin-independent degradation of Daxx by the viral pp71 protein in human cytomegalovirus-infected cells. *Virology* *367*, 334-338.
- Igarashi,K., Garotta,G., Ozmen,L., Ziemiecki,A., Wilks,A.F., Harpur,A.G., Lerner,A.C., and Finbloom,D.S. (1994). Interferon-gamma induces tyrosine phosphorylation of interferon-gamma receptor and regulated association of protein tyrosine kinases, Jak1 and Jak2, with its receptor. *J. Biol. Chem.* *269*, 14333-14336.
- Isaacs,A. and Lindenmann,J. (1957). Virus interference. I. The interferon. *Proc. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* *147*, 258-267.

## Referenzen und Zitate

Isaacson, M.K., Feire, A.L., and Compton, T. (2007). Epidermal growth factor receptor is not required for human cytomegalovirus entry or signaling. *J. Virol.* 81, 6241-6247.

Jacobs, B.L. and Langland, J.O. (1996). When two strands are better than one: the mediators and modulators of the cellular responses to double-stranded RNA. *Virology* 219, 339-349.

Janeway, C.A., Jr. and Medzhitov, R. (1998). Introduction: the role of innate immunity in the adaptive immune response. *Semin. Immunol.* 10, 349-350.

Jenkins, C., Abendroth, A., and Slobedman, B. (2004). A novel viral transcript with homology to human interleukin-10 is expressed during latent human cytomegalovirus infection. *J. Virol.* 78, 1440-1447.

Jonjic, S., Pavic, I., Polic, B., Crnkovic, I., Lucin, P., and Koszinowski, U.H. (1994). Antibodies are not essential for the resolution of primary cytomegalovirus infection but limit dissemination of recurrent virus. *J. Exp. Med.* 179, 1713-1717.

Jouanguy, E., Altare, F., Lamhamedi, S., Revy, P., Emile, J.F., Newport, M., Levin, M., Blanche, S., Seboun, E., Fischer, A., and Casanova, J.L. (1996). Interferon-gamma-receptor deficiency in an infant with fatal bacille Calmette-Guerin infection. *N. Engl. J. Med.* 335, 1956-1961.

Kagan, J.C., Su, T., Horng, T., Chow, A., Akira, S., and Medzhitov, R. (2008). TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nat. Immunol.* 9, 361-368.

Kaplan, M.H., Sun, Y.L., Hoey, T., and Grusby, M.J. (1996). Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature* 382, 174-177.

Karaghiosoff, M., Neubauer, H., Lassnig, C., Kovarik, P., Schindler, H., Pircher, H., McCoy, B., Bogdan, C., Decker, T., Brem, G., Pfeffer, K., and Muller, M. (2000). Partial impairment of cytokine responses in Tyk2-deficient mice. *Immunity* 13, 549-560.

Karupiah, G., Xie, Q.W., Buller, R.M.L., Nathan, C., Duarte, C., and Macmicking, J.D. (1993). Inhibition of Viral Replication by Interferon-Gamma-Induced Nitric-Oxide Synthase. *Science* 261, 1445-1448.

Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., Uematsu, S., Jung, A., Kawai, T., Ishii, K.J., Yamaguchi, O., Otsu, K., Tsujimura, T., Koh, C.S., Reis e Sousa, Matsuura, Y., Fujita, T., and Akira, S. (2006). Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* 441, 101-105.

Kattenhorn, L.M., Mills, R., Wagner, M., Lomsadze, A., Makeev, V., Borodovsky, M., Ploegh, H.L., and Kessler, B.M. (2004). Identification of proteins associated with murine cytomegalovirus virions. *J. Virol.* 78, 11187-11197.

Kawai, T., Takahashi, K., Sato, S., Coban, C., Kumar, H., Kato, H., Ishii, K.J., Takeuchi, O., and Akira, S. (2005). IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat. Immunol.* 6, 981-988.

Kerr, I.M. and Brown, R.E. (1978). pppA2'p5'A2'p5'A: an inhibitor of protein synthesis synthesized with an enzyme fraction from interferon-treated cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 75, 256-260.

## Referenzen und Zitate

Kessler,D.S., Levy,D.E., and Darnell,J.E., Jr. (1988). Two interferon-induced nuclear factors bind a single promoter element in interferon-stimulated genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 85, 8521-8525.

Kessler,D.S., Veals,S.A., Fu,X.Y., and Levy,D.E. (1990). Interferon-alpha regulates nuclear translocation and DNA-binding affinity of ISGF3, a multimeric transcriptional activator. *Genes Dev.* 4, 1753-1765.

Kim,K.S. and Carp,R.I. (1971). Growth of murine cytomegalovirus in various cell lines. *J. Virol.* 7, 720-725.

Kim,T.K. and Maniatis,T. (1997). The mechanism of transcriptional synergy of an in vitro assembled interferon-beta enhanceosome. *Mol. Cell* 1, 119-129.

Klenovsek,K., Weisel,F., Schneider,A., Appelt,U., Jonjic,S., Messerle,M., Bradel-Tretheway,B., Winkler,T.H., and Mach,M. (2007). Protection from CMV infection in immunodeficient hosts by adoptive transfer of memory B cells. *Blood* 110, 3472-3479.

Kochs,G., Janzen,C., Hohenberg,H., and Haller,O. (2002). Antivirally active MxA protein sequesters La Crosse virus nucleocapsid protein into perinuclear complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 3153-3158.

Kochs,G., Reichelt,M., Danino,D., Hinshaw,J.E., and Haller,O. (2005). Assay and functional analysis of dynamin-like Mx proteins. *Methods Enzymol.* 404, 632-643.

Komazin,G., Ptak,R.G., Emmer,B.T., Townsend,L.B., and Drach,J.C. (2003). Resistance of human cytomegalovirus to the benzimidazole L-ribonucleoside maribavir maps to UL27. *J. Virol.* 77, 11499-11506.

Kotenko,S.V., Sacconi,S., Izotova,L.S., Mirochnitchenko,O.V., and Pestka,S. (2000). Human cytomegalovirus harbors its own unique IL-10 homolog (cmvIL-10). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 1695-1700.

Krug,A., French,A.R., Barchet,W., Fischer,J.A., Dzionek,A., Pingel,J.T., Orihuela,M.M., Akira,S., Yokoyama,W.M., and Colonna,M. (2004). TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. *Immunity* 21, 107-119.

Laemmli,U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Larkin,M.A., Blackshields,G., Brown,N.P., Chenna,R., McGettigan,P.A., McWilliam,H., Valentin,F., Wallace,I.M., Wilm,A., Lopez,R., Thompson,J.D., Gibson,T.J., and Higgins,D.G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics.* 23, 2947-2948.

Le Roy,E., Muhlethaler-Mottet,A., Davrinche,C., Mach,B., and Davignon,J.L. (1999). Escape of human cytomegalovirus from HLA-DR-restricted CD4(+) T-cell response is mediated by repression of gamma interferon-induced class II transactivator expression. *J. Virol.* 73, 6582-6589.

Le,V.T., Trilling,M., Wilborn,M., Hengel,H., and Zimmermann,A. (2008a). Human cytomegalovirus interferes with signal transducer and activator of transcription (STAT) 2 protein stability and tyrosine phosphorylation. *J. Gen. Virol.* 89, 2416-2426.

- Le, V.T., Trilling, M., Zimmermann, A., and Hengel, H. (2008b). Mouse cytomegalovirus inhibits beta interferon (IFN-beta) gene expression and controls activation pathways of the IFN-beta enhanceosome. *J. Gen. Virol.* *89*, 1131-1141.
- Lee, C.K., Bluysen, H.A., and Levy, D.E. (1997). Regulation of interferon-alpha responsiveness by the duration of Janus kinase activity. *J. Biol. Chem.* *272*, 21872-21877.
- Lehtonen, A., Matikainen, S., and Julkunen, I. (1997). Interferons up-regulate STAT1, STAT2, and IRF family transcription factor gene expression in human peripheral blood mononuclear cells and macrophages. *J. Immunol.* *159*, 794-803.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., and Hoffmann, J.A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* *86*, 973-983.
- Leung, S., Qureshi, S.A., Kerr, I.M., Darnell, J.E., Jr., and Stark, G.R. (1995). Role of STAT2 in the alpha interferon signaling pathway. *Mol. Cell Biol.* *15*, 1312-1317.
- Levin, S. and Hahn, T. (1985). Interferon deficiency syndrome. *Clin. Exp. Immunol.* *60*, 267-273.
- Levy, D.E., Kessler, D.S., Pine, R., and Darnell, J.E., Jr. (1989). Cytoplasmic activation of ISGF3, the positive regulator of interferon-alpha-stimulated transcription, reconstituted in vitro. *Genes Dev.* *3*, 1362-1371.
- Levy, D.E., Lew, D.J., Decker, T., Kessler, D.S., and Darnell, J.E., Jr. (1990). Synergistic interaction between interferon-alpha and interferon-gamma through induced synthesis of one subunit of the transcription factor ISGF3. *EMBO J.* *9*, 1105-1111.
- Li, B., Ruiz, J.C., and Chun, K.T. (2002). CUL-4A is critical for early embryonic development. *Mol. Cell Biol.* *22*, 4997-5005.
- Li, S., Labrecque, S., Gauzzi, M.C., Cuddihy, A.R., Wong, A.H., Pellegrini, S., Matlashewski, G.J., and Koromilas, A.E. (1999). The human papilloma virus (HPV)-18 E6 oncoprotein physically associates with Tyk2 and impairs Jak-STAT activation by interferon-alpha. *Oncogene* *18*, 5727-5737.
- Li, X., Leung, S., Kerr, I.M., and Stark, G.R. (1997). Functional subdomains of STAT2 required for preassociation with the alpha interferon receptor and for signaling. *Mol. Cell Biol.* *17*, 2048-2056.
- Liu, W., Nichols, A.F., Graham, J.A., Dualan, R., Abbas, A., and Linn, S. (2000). Nuclear transport of human DDB protein induced by ultraviolet light. *J. Biol. Chem.* *275*, 21429-21434.
- Lucin, P., Jonjic, S., Messerle, M., Polic, B., Hengel, H., and Koszinowski, U.H. (1994). Late phase inhibition of murine cytomegalovirus replication by synergistic action of interferon-gamma and tumour necrosis factor. *J. Gen. Virol.* *75 (Pt 1)*, 101-110.
- Ma, Y., Croxton, R., Moorer, R.L., Jr., and Cress, W.D. (2002). Identification of novel E2F1-regulated genes by microarray. *Arch. Biochem. Biophys.* *399*, 212-224.
- Maciejewski, J.P., Bruening, E.E., Donahue, R.E., Mocarski, E.S., Young, N.S., and St Jeor, S.C. (1992). Infection of hematopoietic progenitor cells by human cytomegalovirus. *Blood* *80*, 170-178.

## Referenzen und Zitate

- Macmicking,J.D. (2004). IFN-inducible GTPases and immunity to intracellular pathogens. *Trends in Immunology* 25, 601-609.
- Maniatis,T., Falvo,J.V., Kim,T.H., Kim,T.K., Lin,C.H., Parekh,B.S., and Wathélet,M.G. (1998). Structure and function of the interferon-beta enhanceosome. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 63, 609-620.
- Margolis,M.J., Pajovic,S., Wong,E.L., Wade,M., Jupp,R., Nelson,J.A., and Azizkhan,J.C. (1995). Interaction of the 72-kilodalton human cytomegalovirus IE1 gene product with E2F1 coincides with E2F-dependent activation of dihydrofolate reductase transcription. *J. Virol.* 69, 7759-7767.
- Marie,I., Durbin,J.E., and Levy,D.E. (1998). Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7. *Embo Journal* 17, 6660-6669.
- Maritano,D., Sugrue,M.L., Tininini,S., Dewilde,S., Strobl,B., Fu,X., Murray-Tait,V., Chiarle,R., and Poli,V. (2004). The STAT3 isoforms alpha and beta have unique and specific functions. *Nat. Immunol.* 5, 401-409.
- Marziali,G., Fiorucci,G., Coccia,E.M., Percario,Z., Raber,J., Battistini,A., Rossi,G.B., Affabris,E., and Romeo,G. (1991). Posttranscriptional regulation of beta interferon expression in erythroid Friend cells treated with gamma interferon. *J. Virol.* 65, 4130-4136.
- Matsumoto,M., Tanaka,N., Harada,H., Kimura,T., Yokochi,T., Kitagawa,M., Schindler,C., and Taniguchi,T. (1999). Activation of the transcription factor ISGF3 by interferon-gamma. *Biol. Chem.* 380, 699-703.
- Matsuyama,T., Kimura,T., Kitagawa,M., Pfeffer,K., Kawakami,T., Watanabe,N., Kundig,T.M., Amakawa,R., Kishihara,K., Wakeham,A., Potter,J., Furlonger,C.L., Narendran,A., Suzuki,H., Ohashi,P.S., Paige,C.J., Taniguchi,T., and Mak,T.W. (1993). Targeted Disruption of Irf-1 Or Irf-2 Results in Abnormal Type-I Ifn Gene Induction and Aberrant Lymphocyte Development. *Cell* 75, 83-97.
- McVoy,M.A. and Adler,S.P. (1994). Human cytomegalovirus DNA replicates after early circularization by concatemer formation, and inversion occurs within the concatemer. *J. Virol.* 68, 1040-1051.
- Medzhitov,R., Preston-Hurlburt,P., and Janeway,C.A., Jr. (1997). A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394-397.
- Medzhitov,R., Preston-Hurlburt,P., Kopp,E., Stadlen,A., Chen,C., Ghosh,S., and Janeway,C.A., Jr. (1998). MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol. Cell* 2, 253-258.
- Meraz,M.A., White,J.M., Sheehan,K.C.F., Bach,E.A., Rodig,S.J., Dighe,A.S., Kaplan,D.H., Riley,J.K., Greenlund,A.C., Campbell,D., CarverMoore,K., Dubois,R.N., Clark,R., Aguet,M., and Schreiber,R.D. (1996). Targeted disruption of the STAT1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell* 84, 431-442.
- Merril,C.R., Goldman,D., Sedman,S.A., and Ebert,M.H. (1981). Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science* 211, 1437-1438.

## Referenzen und Zitate

- 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*, 14759-14763.
- Meyer, T., Marg, A., Lemke, P., Wiesner, B., and Vinkemeier, U. (2003). DNA binding controls inactivation and nuclear accumulation of the transcription factor Stat1. *Genes Dev.* *17*, 1992-2005.
- Meylan, E., Curran, J., Hofmann, K., Moradpour, D., Binder, M., Bartenschlager, R., and Tschopp, J. (2005). Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* *437*, 1167-1172.
- Miller, D.M., Rahill, B.M., Boss, J.M., Lairmore, M.D., Durbin, J.E., Waldman, J.W., and Sedmak, D.D. (1998). Human cytomegalovirus inhibits major histocompatibility complex class II expression by disruption of the Jak/Stat pathway. *J. Exp. Med.* *187*, 675-683.
- Miller, D.M., Zhang, Y., Rahill, B.M., Kazor, K., Rofagha, S., Eckel, J.J., and Sedmak, D.D. (2000). Human cytomegalovirus blocks interferon-gamma stimulated up-regulation of major histocompatibility complex class I expression and the class I antigen processing machinery. *Transplantation* *69*, 687-690.
- Miller, D.M., Zhang, Y., Rahill, B.M., Waldman, W.J., and Sedmak, D.D. (1999). Human cytomegalovirus inhibits IFN-alpha-stimulated antiviral and immunoregulatory responses by blocking multiple levels of IFN-alpha signal transduction. *J. Immunol.* *162*, 6107-6113.
- Movassagh, M., Gozlan, J., Senechal, B., Baillou, C., Petit, J.C., and Lemoine, F.M. (1996). Direct infection of CD34+ progenitor cells by human cytomegalovirus: evidence for inhibition of hematopoiesis and viral replication. *Blood* *88*, 1277-1283.
- Muller, M., Briscoe, J., Laxton, C., Guschin, D., Ziemiecki, A., Silvennoinen, O., Harpur, A.G., Barbieri, G., Witthuhn, B.A., Schindler, C., and . (1993). The protein tyrosine kinase JAK1 complements defects in interferon-alpha/beta and -gamma signal transduction. *Nature* *366*, 129-135.
- Muller, U., Steinhoff, U., Reis, L.F., Hemmi, S., Pavlovic, J., Zinkernagel, R.M., and Aguet, M. (1994). Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* *264*, 1918-1921.
- Munro, S. and Maniatis, T. (1989). Expression cloning of the murine interferon gamma receptor cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *86*, 9248-9252.
- Muromoto, R., Nakao, K., Watanabe, T., Sato, N., Sekine, Y., Sugiyama, K., Oritani, K., Shimoda, K., and Matsuda, T. (2006). Physical and functional interactions between Daxx and STAT3. *Oncogene* *25*, 2131-2136.
- Nakagawa, K. and Yokosawa, H. (2000). Degradation of transcription factor IRF-1 by the ubiquitin-proteasome pathway. The C-terminal region governs the protein stability. *Eur. J. Biochem.* *267*, 1680-1686.
- Nallagatla, S.R., Hwang, J., Toroney, R., Zheng, X., Cameron, C.E., and Bevilacqua, P.C. (2007). 5'-triphosphate-dependent activation of PKR by RNAs with short stem-loops. *Science* *318*, 1455-1458.

## Referenzen und Zitate

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, 3796-3802.

Netterwald,J., Yang,S., Wang,W., Ghanny,S., Cody,M., Soteropoulos,P., Tian,B., Dunn,W., Liu,F., and Zhu,H. (2005). Two gamma interferon-activated site-like elements in the human cytomegalovirus major immediate-early promoter/enhancer are important for viral replication. *J. Virol.* 79, 5035-5046.

Neubauer,H., Cumano,A., Muller,M., Wu,H., Huffstadt,U., and Pfeffer,K. (1998). Jak2 deficiency defines an essential developmental checkpoint in definitive hematopoiesis. *Cell* 93, 397-409.

Nguyen,K.B., Watford,W.T., Salomon,R., Hofmann,S.R., Pien,G.C., Morinobu,A., Gadina,M., O'Shea,J.J., and Biron,C.A. (2002). Critical role for STAT4 activation by type 1 interferons in the interferon-gamma response to viral infection. *Science* 297, 2063-2066.

Orange,J.S., Wang,B., Terhorst,C., and Biron,C.A. (1995). Requirement for natural killer cell-produced interferon gamma in defense against murine cytomegalovirus infection and enhancement of this defense pathway by interleukin 12 administration. *J. Exp. Med.* 182, 1045-1056.

Osborn,J.E. and Walker,D.L. (1968). Enhancement of infectivity of murine cytomegalovirus in vitro by centrifugal inoculation. *J. Virol.* 2, 853-858.

Park,C., Lecomte,M.J., and Schindler,C. (1999). Murine Stat2 is uncharacteristically divergent. *Nucleic Acids Res.* 27, 4191-4199.

Park,C., Li,S., Cha,E., and Schindler,C. (2000). Immune response in Stat2 knockout mice. *Immunity* 13, 795-804.

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, 3840-3845.

Pearson,H. (2008). 'Virophage' suggests viruses are alive. *Nature* 454, 677.

Pellegrini,S., John,J., Shearer,M., Kerr,I.M., and Stark,G.R. (1989). Use of a selectable marker regulated by alpha interferon to obtain mutations in the signaling pathway. *Mol. Cell Biol.* 9, 4605-4612.

Pestka,S., Langer,J.A., Zoon,K.C., and Samuel,C.E. (1987). Interferons and their actions. *Annu. Rev. Biochem.* 56, 727-777.

Pfeffer,L.M., Mullersman,J.E., Pfeffer,S.R., Murti,A., Shi,W., and Yang,C.H. (1997). STAT3 as an adapter to couple phosphatidylinositol 3-kinase to the IFNAR1 chain of the type I interferon receptor. *Science* 276, 1418-1420.

Pine,R., Decker,T., Kessler,D.S., Levy,D.E., and Darnell,J.E., Jr. (1990). Purification and cloning of interferon-stimulated gene factor 2 (ISGF2): ISGF2 (IRF-1) can bind to the promoters of both beta interferon- and interferon-stimulated genes but is not a primary transcriptional activator of either. *Mol. Cell Biol.* 10, 2448-2457.

## Referenzen und Zitate

- Platanias,L.C., Uddin,S., Domanski,P., and Colamonici,O.R. (1996). Differences in interferon alpha and beta signaling. Interferon beta selectively induces the interaction of the alpha and betaL subunits of the type I interferon receptor. *J. Biol. Chem.* *271*, 23630-23633.
- Player,M.R., Barnard,D.L., and Torrence,P.F. (1998). Potent inhibition of respiratory syncytial virus replication using a 2-5A-antisense chimera targeted to signals within the virus genomic RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *95*, 8874-8879.
- Polic,B., Hengel,H., Krmpotic,A., Trgovcich,J., Pavic,I., Luccaronin,P., Jonjic,S., and Koszinowski,U.H. (1998). Hierarchical and redundant lymphocyte subset control precludes cytomegalovirus replication during latent infection. *J. Exp. Med.* *188*, 1047-1054.
- Pollock,J.L. and Virgin,H.W. (1995). Latency, without persistence, of murine cytomegalovirus in the spleen and kidney. *J. Virol.* *69*, 1762-1768.
- Popkin,D.L., Watson,M.A., Karaskov,E., Dunn,G.P., Bremner,R., and Virgin,H.W. (2003). Murine cytomegalovirus paralyzes macrophages by blocking IFN gamma-induced promoter assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *100*, 14309-14314.
- Precious,B., Childs,K., Fitzpatrick-Swallow,V., Goodbourn,S., and Randall,R.E. (2005). Simian virus 5 V protein acts as an adaptor, linking DDB1 to STAT2, to facilitate the ubiquitination of STAT1. *J. Virol.* *79*, 13434-13441.
- Presti,R.M., Pollock,J.L., Dal Canto,A.J., O'Guin,A.K., and Virgin,H.W. (1998). Interferon gamma regulates acute and latent murine cytomegalovirus infection and chronic disease of the great vessels. *J. Exp. Med.* *188*, 577-588.
- Presti,R.M., Popkin,D.L., Connick,M., Paetzold,S., and Virgin,H.W. (2001). Novel cell type-specific antiviral mechanism of interferon gamma action in macrophages. *J. Exp. Med.* *193*, 483-496.
- Preston,C.M., Harman,A.N., and Nicholl,M.J. (2001). Activation of interferon response factor-3 in human cells infected with herpes simplex virus type 1 or human cytomegalovirus. *J. Virol.* *75*, 8909-8916.
- Prichard,M.N., Quenelle,D.C., Bidanset,D.J., Komazin,G., Chou,S., Drach,J.C., and Kern,E.R. (2006). Human cytomegalovirus UL27 is not required for viral replication in human tissue implanted in SCID mice. *Virol. J.* *3*, 18.
- Qing,Y. and Stark,G.R. (2004). Alternative activation of STAT1 and STAT3 in response to interferon-gamma. *J. Biol. Chem.* *279*, 41679-41685.
- Qureshi,S.A., Leung,S., Kerr,I.M., Stark,G.R., and Darnell,J.E., Jr. (1996). Function of Stat2 protein in transcriptional activation by alpha interferon. *Mol. Cell Biol.* *16*, 288-293.
- Qureshi,S.A., Salditt-Georgieff,M., and Darnell,J.E., Jr. (1995). Tyrosine-phosphorylated Stat1 and Stat2 plus a 48-kDa protein all contact DNA in forming interferon-stimulated-gene factor 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *92*, 3829-3833.
- Rafailidis,P.I., Mourtzoukou,E.G., Varbobitis,I.C., and Falagas,M.E. (2008). Severe cytomegalovirus infection in apparently immunocompetent patients: a systematic review. *Virol. J.* *5*, 47.

## Referenzen und Zitate

- Ramana,C.V., Gil,M.P., Han,Y., Ransohoff,R.M., Schreiber,R.D., and Stark,G.R. (2001). Stat1-independent regulation of gene expression in response to IFN-gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 6674-6679.
- Randall,R.E. and Goodbourn,S. (2008). Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J. Gen. Virol.* 89, 1-47.
- Raoult,D., Audic,S., Robert,C., Abergel,C., Renesto,P., Ogata,H., La Scola,B., Suzan,M., and Claverie,J.M. (2004). The 1.2-megabase genome sequence of Mimivirus. *Science* 306, 1344-1350.
- Raoult,D. and Forterre,P. (2008). Redefining viruses: lessons from Mimivirus. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 315-319.
- Rawlinson,W.D., Farrell,H.E., and Barrell,B.G. (1996). Analysis of the complete DNA sequence of murine cytomegalovirus. *J. Virol.* 70, 8833-8849.
- Reddehase,M.J., Mutter,W., Munch,K., Buhning,H.J., and Koszinowski,U.H. (1987). CD8-positive T lymphocytes specific for murine cytomegalovirus immediate-early antigens mediate protective immunity. *J. Virol.* 61, 3102-3108.
- Redpath,S., Angulo,A., Gascoigne,N.R., and Ghazal,P. (1999). Murine cytomegalovirus infection down-regulates MHC class II expression on macrophages by induction of IL-10. *J. Immunol.* 162, 6701-6707.
- Rein,T., Muller,M., and Zorbas,H. (1994). In vivo footprinting of the IRF-1 promoter: inducible occupation of a GAS element next to a persistent structural alteration of the DNA. *Nucleic Acids Res.* 22, 3033-3037.
- Riley,J.K., Takeda,K., Akira,S., and Schreiber,R.D. (1999). Interleukin-10 receptor signaling through the JAK-STAT pathway. Requirement for two distinct receptor-derived signals for anti-inflammatory action. *J. Biol. Chem.* 274, 16513-16521.
- Rodig,S.J., Meraz,M.A., White,J.M., Lampe,P.A., Riley,J.K., Arthur,C.D., King,K.L., Sheehan,K.C., Yin,L., Pennica,D., Johnson,E.M., Jr., and Schreiber,R.D. (1998). Disruption of the Jak1 gene demonstrates obligatory and nonredundant roles of the Jaks in cytokine-induced biologic responses. *Cell* 93, 373-383.
- ROWE,W.P., HARTLEY,J.W., WATERMAN,S., TURNER,H.C., and HUEBNER,R.J. (1956). Cytopathogenic agent resembling human salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 92, 418-424.
- Ruzek,M.C., Miller,A.H., Opal,S.M., Pearce,B.D., and Biron,C.A. (1997). Characterization of early cytokine responses and an interleukin (IL)-6-dependent pathway of endogenous glucocorticoid induction during murine cytomegalovirus infection. *J. Exp. Med.* 185, 1185-1192.
- 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, 3863-3871.
- 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, 9109-9120.

## Referenzen und Zitate

Sakatsume,M., Igarashi,K., Winestock,K.D., Garotta,G., Lerner,A.C., and Finbloom,D.S. (1995). The Jak kinases differentially associate with the alpha and beta (accessory factor) chains of the interferon gamma receptor to form a functional receptor unit capable of activating STAT transcription factors. *J. Biol. Chem.* *270*, 17528-17534.

Samuel,C.E. (2001). Antiviral actions of interferons. *Clinical Microbiology Reviews* *14*, 778-809.

Sato,M., Hata,N., Asagiri,M., Nakaya,T., Taniguchi,T., and Tanaka,N. (1998). Positive feedback regulation of type I IFN genes by the IFN-inducible transcription factor IRF-7. *Febs Letters* *441*, 106-110.

Schrofelbauer,B., Hakata,Y., and Landau,N.R. (2007). HIV-1 Vpr function is mediated by interaction with the damage-specific DNA-binding protein DDB1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *104*, 4130-4135.

Seth,R.B., Sun,L., Ea,C.K., and Chen,Z.J. (2005). Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* *122*, 669-682.

Shellam,G.R., Allan,J.E., Papadimitriou,J.M., and Bancroft,G.J. (1981). Increased susceptibility to cytomegalovirus infection in beige mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *78*, 5104-5108.

Shimoda,K., Kamesaki,K., Numata,A., Aoki,K., Matsuda,T., Oritani,K., Tamiya,S., Kato,K., Takase,K., Imamura,R., Yamamoto,T., Miyamoto,T., Nagafuji,K., Gondo,H., Nagafuchi,S., Nakayama,K., and Harada,M. (2002). Cutting edge: tyk2 is required for the induction and nuclear translocation of Daxx which regulates IFN-alpha-induced suppression of B lymphocyte formation. *J. Immunol.* *169*, 4707-4711.

Shuai,K., Schindler,C., Prezioso,V.R., and Darnell,J.E., Jr. (1992). Activation of transcription by IFN-gamma: tyrosine phosphorylation of a 91-kD DNA binding protein. *Science* *258*, 1808-1812.

Shuai,K., Ziemiecki,A., Wilks,A.F., Harpur,A.G., Sadowski,H.B., Gilman,M.Z., and Darnell,J.E. (1993). Polypeptide signalling to the nucleus through tyrosine phosphorylation of Jak and Stat proteins. *Nature* *366*, 580-583.

Shultz,D.B., Fuller,J.D., Yang,Y., Sizemore,N., Rani,M.R., and Stark,G.R. (2007). Activation of a subset of genes by IFN-gamma requires IKKbeta but not interferon-dependent activation of NF-kappaB. *J. Interferon Cytokine Res.* *27*, 875-884.

Silvennoinen,O., Ihle,J.N., Schlessinger,J., and Levy,D.E. (1993). Interferon-induced nuclear signalling by Jak protein tyrosine kinases. *Nature* *366*, 583-585.

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*, 7140-7145.

Sinzger,C., Digel,M., and Jahn,G. (2008a). Cytomegalovirus cell tropism. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *325*, 63-83.

## Referenzen und Zitate

- Sinzger,C., Hahn,G., Digel,M., Katona,R., Sampaio,K.L., Messerle,M., Hengel,H., Koszinowski,U., Brune,W., and Adler,B. (2008b). Cloning and sequencing of a highly productive, endotheliotropic virus strain derived from human cytomegalovirus TB40/E. *J. Gen. Virol.* *89*, 359-368.
- Sinzger,C. and Jahn,G. (1996). Human cytomegalovirus cell tropism and pathogenesis. *Intervirolgy* *39*, 302-319.
- Smith,M.G. (1954). Propagation of salivary gland virus of the mouse in tissue cultures. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* *86*, 435-440.
- Smith,M.G. (1956). Propagation in tissue cultures of a cytopathogenic virus from human salivary gland virus (SGV) disease. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* *92*, 424-430.
- Smith,M.G. and VELLIOS,F. (1950). Inclusion disease or generalized salivary gland virus infection. *AMA. Arch. Pathol.* *50*, 862-884.
- Soroceanu,L., Akhavan,A., and Cobbs,C.S. (2008). Platelet-derived growth factor-alpha receptor activation is required for human cytomegalovirus infection. *Nature*.
- Staheli,P., Haller,O., Boll,W., Lindenmann,J., and Weissmann,C. (1986). Mx protein: constitutive expression in 3T3 cells transformed with cloned Mx cDNA confers selective resistance to influenza virus. *Cell* *44*, 147-158.
- Stancato,L.F., David,M., Carter-Su,C., Larner,A.C., and Pratt,W.B. (1996). Preassociation of STAT1 with STAT2 and STAT3 in separate signalling complexes prior to cytokine stimulation. *J. Biol. Chem.* *271*, 4134-4137.
- Staras,S.A., Dollard,S.C., Radford,K.W., Flanders,W.D., Pass,R.F., and Cannon,M.J. (2006). Seroprevalence of cytomegalovirus infection in the United States, 1988-1994. *Clin. Infect. Dis.* *43*, 1143-1151.
- Starr,R. and Hilton,D.J. (1998). SOCS: suppressors of cytokine signalling. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *30*, 1081-1085.
- Stinski,M.F. (1976). Human cytomegalovirus: glycoproteins associated with virions and dense bodies. *J. Virol.* *19*, 594-609.
- Stockinger,S., Materna,T., Stoiber,D., Bayr,L., Steinborn,R., Kolbe,T., Unger,H., Chakraborty,T., Levy,D.E., Muller,M., and Decker,T. (2002). Production of type IIFN sensitizes macrophages to cell death induced by *Listeria monocytogenes*. *Journal of Immunology* *169*, 6522-6529.
- Strobl,B., Bubic,I., Bruns,U., Steinborn,R., Lajko,R., Kolbe,T., Karaghiosoff,M., Kalinke,U., Jonjic,S., and Muller,M. (2005). Novel functions of tyrosine kinase 2 in the antiviral defense against murine cytomegalovirus. *J. Immunol.* *175*, 4000-4008.
- Sugiyama,T., Nishio,Y., Kishimoto,T., and Akira,S. (1996). Identification of alternative splicing form of Stat2. *FEBS Lett.* *381*, 191-194.
- Suh,H.S., Zhao,M.L., Riviaccio,M., Choi,S., Connolly,E., Zhao,Y., Takikawa,O., Brosnan,C.F., and Lee,S.C. (2007). Astrocyte indoleamine 2,3-dioxygenase is induced by the TLR3 ligand poly(I:C): mechanism of induction and role in antiviral response. *J. Virol.* *81*, 9838-9850.

## Referenzen und Zitate

Sweet,C., Ball,K., Morley,P.J., Guilfoyle,K., and Kirby,M. (2007). Mutations in the temperature-sensitive murine cytomegalovirus (MCMV) mutants tsm5 and tsm30: a study of genes involved in immune evasion, DNA packaging and processing, and DNA replication. *J. Med. Virol.* *79*, 285-299.

Symons,J.A., Alcamì,A., and Smith,G.L. (1995). Vaccinia Virus Encodes A Soluble Type-I Interferon Receptor of Novel Structure and Broad Species-Specificity. *Cell* *81*, 551-560.

Symons,J.A., Tschärke,D.C., Price,N., and Smith,G.L. (2002). A study of the vaccinia virus interferon-gamma receptor and its contribution to virus virulence. *Journal of General Virology* *83*, 1953-1964.

Szomolanyi-Tsuda,E., Liang,X., Welsh,R.M., Kurt-Jones,E.A., and Finberg,R.W. (2006). Role for TLR2 in NK cell-mediated control of murine cytomegalovirus in vivo. *J. Virol.* *80*, 4286-4291.

Tabeta,K., Georgel,P., Janssen,E., Du,X., Hoebe,K., Crozat,K., Mudd,S., Shamel,L., Sovath,S., Goode,J., Alexopoulou,L., Flavell,R.A., and Beutler,B. (2004). Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *101*, 3516-3521.

Tabeta,K., Hoebe,K., Janssen,E.M., Du,X., Georgel,P., Crozat,K., Mudd,S., Mann,N., Sovath,S., Goode,J., Shamel,L., Herskovits,A.A., Portnoy,D.A., Cooke,M., Tarantino,L.M., Wiltshire,T., Steinberg,B.E., Grinstein,S., and Beutler,B. (2006). The Unc93b1 mutation 3d disrupts exogenous antigen presentation and signaling via Toll-like receptors 3, 7 and 9. *Nat. Immunol.* *7*, 156-164.

Takaoka,A., Wang,Z., Choi,M.K., Yanai,H., Negishi,H., Ban,T., Lu,Y., Miyagishi,M., Kodama,T., Honda,K., Ohba,Y., and Taniguchi,T. (2007). DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature* *448*, 501-505.

Takeda,K., Noguchi,K., Shi,W., Tanaka,T., Matsumoto,M., Yoshida,N., Kishimoto,T., and Akira,S. (1997). Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *94*, 3801-3804.

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*, 1357-1367.

Taylor,R.T. and Bresnahan,W.A. (2005). Human cytomegalovirus immediate-early 2 gene expression blocks virus-induced beta interferon production. *J. Virol.* *79*, 3873-3877.

Taylor,R.T. and Bresnahan,W.A. (2006a). Human cytomegalovirus IE86 attenuates virus- and tumor necrosis factor alpha-induced NFkappaB-dependent gene expression. *J. Virol.* *80*, 10763-10771.

Taylor,R.T. and Bresnahan,W.A. (2006b). Human cytomegalovirus immediate-early 2 protein IE86 blocks virus-induced chemokine expression. *J. Virol.* *80*, 920-928.

Temin,H.M. and Mizutani,S. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* *226*, 1211-1213.

- Terajima, M. and Leporati, A.M. (2005). Role of Indoleamine 2,3-Dioxygenase in Antiviral Activity of Interferon-gamma Against Vaccinia Virus. *Viral Immunol.* *18*, 722-729.
- Terenzi, F., Hui, D.J., Merrick, W.C., and Sen, G.C. (2006). Distinct induction patterns and functions of two closely related interferon-inducible human genes, ISG54 and ISG56. *J. Biol. Chem.* *281*, 34064-34071.
- Thale, R., Lucin, P., Schneider, K., Eggers, M., and Koszinowski, U.H. (1994). Identification and expression of a murine cytomegalovirus early gene coding for an Fc receptor. *J. Virol.* *68*, 7757-7765.
- Uddin, S., Chamdin, A., and Platanias, L.C. (1995). Interaction of the transcriptional activator Stat-2 with the type I interferon receptor. *J. Biol. Chem.* *270*, 24627-24630.
- Ulane, C.M. and Horvath, C.M. (2002). Paramyxoviruses SV5 and HPIV2 assemble STAT protein ubiquitin ligase complexes from cellular components. *Virology* *304*, 160-166.
- Ulane, C.M., Rodriguez, J.J., Parisien, J.P., and Horvath, C.M. (2003). STAT3 ubiquitylation and degradation by mumps virus suppress cytokine and oncogene signaling. *J. Virol.* *77*, 6385-6393.
- Ullman, A.J. and Hearing, P. (2008). The cellular proteins PML and Daxx mediate an innate antiviral defense antagonized by the adenovirus E4 ORF3 protein. *J. Virol.*
- Valchanova, R.S., Picard-Maureau, M., Budt, M., and Brune, W. (2006). Murine cytomegalovirus m142 and m143 are both required to block protein kinase R-mediated shutdown of protein synthesis. *J. Virol.* *80*, 10181-10190.
- Veals, S.A., Schindler, C., Leonard, D., Fu, X.Y., Aebersold, R., Darnell, J.E., Jr., and Levy, D.E. (1992). Subunit of an alpha-interferon-responsive transcription factor is related to interferon regulatory factor and Myb families of DNA-binding proteins. *Mol. Cell Biol.* *12*, 3315-3324.
- Vinkemeier, U., Moarefi, I., Darnell, J.E., Jr., and Kuriyan, J. (1998). Structure of the amino-terminal protein interaction domain of STAT-4. *Science* *279*, 1048-1052.
- Wagner, B.J., Hayes, T.E., Hoban, C.J., and Cochran, B.H. (1990). The SIF binding element confers sis/PDGF inducibility onto the c-fos promoter. *EMBO J.* *9*, 4477-4484.
- Wagner, M., Jonjic, S., Koszinowski, U.H., and Messerle, M. (1999). Systematic excision of vector sequences from the BAC-cloned herpesvirus genome during virus reconstitution. *J. Virol.* *73*, 7056-7060.
- Wakasugi, M., Matsuura, K., Nagasawa, A., Fu, D., Shimizu, H., Yamamoto, K., Takeda, S., and Matsunaga, T. (2007). DDB1 gene disruption causes a severe growth defect and apoptosis in chicken DT40 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *364*, 771-777.
- Walker, S., Hagemeyer, C., Sissons, J.G., and Sinclair, J.H. (1992). A 10-base-pair element of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat (LTR) is an absolute requirement for transactivation by the human cytomegalovirus 72-kilodalton IE1 protein but can be compensated for by other LTR regions in transactivation by the 80-kilodalton IE2 protein. *J. Virol.* *66*, 1543-1550.

## Referenzen und Zitate

- Wan,L., Lin,C.W., Lin,Y.J., Sheu,J.J., Chen,B.H., Liao,C.C., Tsai,Y., Lin,W.Y., Lai,C.H., and Tsai,F.J. (2008). Type I IFN induced IL1-Ra expression in hepatocytes is mediated by activating STAT6 through the formation of STAT2: STAT6 heterodimer. *J. Cell Mol. Med.* *12*, 876-888.
- Wang,D. and Shenk,T. (2005a). Human cytomegalovirus UL131 open reading frame is required for epithelial cell tropism. *J. Virol.* *79*, 10330-10338.
- Wang,D. and Shenk,T. (2005b). Human cytomegalovirus virion protein complex required for epithelial and endothelial cell tropism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *102*, 18153-18158.
- Wang,X., Huang,D.Y., Huong,S.M., and Huang,E.S. (2005). Integrin alphavbeta3 is a coreceptor for human cytomegalovirus. *Nat. Med.* *11*, 515-521.
- Wang,X., Huong,S.M., Chiu,M.L., Raab-Traub,N., and Huang,E.S. (2003). Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus. *Nature* *424*, 456-461.
- Wang,X., Hussain,S., Wang,E.J., Wang,X., Li,M.O., Garcia-Sastre,A., and Beg,A.A. (2007). Lack of essential role of NF-kappa B p50, RelA, and cRel subunits in virus-induced type 1 IFN expression. *J. Immunol.* *178*, 6770-6776.
- Wang,Z., Choi,M.K., Ban,T., Yanai,H., Negishi,H., Lu,Y., Tamura,T., Takaoka,A., Nishikura,K., and Taniguchi,T. (2008). Regulation of innate immune responses by DAI (DLM-1/ZBP1) and other DNA-sensing molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *105*, 5477-5482.
- Watanabe,N., Sakakibara,J., Hovanessian,A.G., Taniguchi,T., and Fujita,T. (1991). Activation of IFN-beta element by IRF-1 requires a posttranslational event in addition to IRF-1 synthesis. *Nucleic Acids Res.* *19*, 4421-4428.
- Wathelet,M.G., Lin,C.H., Parekh,B.S., Ronco,L.V., Howley,P.M., and Maniatis,T. (1998). Virus infection induces the assembly of coordinately activated transcription factors on the IFN-beta enhancer in vivo. *Molecular Cell* *1*, 507-518.
- Wathen,M.W. and Stinski,M.F. (1982). Temporal patterns of human cytomegalovirus transcription: mapping the viral RNAs synthesized at immediate early, early, and late times after infection. *J. Virol.* *41*, 462-477.
- 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*, 446-459.
- Watling,D., Guschin,D., Muller,M., Silvennoinen,O., Witthuhn,B.A., Quelle,F.W., Rogers,N.C., Schindler,C., Stark,G.R., Ihle,J.N., and . (1993). Complementation by the protein tyrosine kinase JAK2 of a mutant cell line defective in the interferon-gamma signal transduction pathway. *Nature* *366*, 166-170.
- Wen,X., Duus,K.M., Friedrich,T.D., and de Noronha,C.M. (2007). The HIV1 protein Vpr acts to promote G2 cell cycle arrest by engaging a DDB1 and Cullin4A-containing ubiquitin ligase complex using VprBP/DCAF1 as an adaptor. *J. Biol. Chem.* *282*, 27046-27057.
- Wu,S. and Kaufman,R.J. (1996). Double-stranded (ds) RNA binding and not dimerization correlates with the activation of the dsRNA-dependent protein kinase (PKR). *J. Biol. Chem.* *271*, 1756-1763.

## Referenzen und Zitate

Xu,L.G., Wang,Y.Y., Han,K.J., Li,L.Y., Zhai,Z.H., and Shu,H.B. (2005). VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Molecular Cell* 19, 727-740.

Yamamoto,M., Sato,S., Hemmi,H., Hoshino,K., Kaisho,T., Sanjo,H., Takeuchi,O., Sugiyama,M., Okabe,M., Takeda,K., and Akira,S. (2003). Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301, 640-643.

Yamamoto,M., Sato,S., Mori,K., Hoshino,K., Takeuchi,O., Takeda,K., and Akira,S. (2002). Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J. Immunol.* 169, 6668-6672.

Yan,H., Krishnan,K., Greenlund,A.C., Gupta,S., Lim,J.T., Schreiber,R.D., Schindler,C.W., and Krolewski,J.J. (1996a). Phosphorylated interferon-alpha receptor 1 subunit (IFN $\alpha$ R1) acts as a docking site for the latent form of the 113 kDa STAT2 protein. *EMBO J.* 15, 1064-1074.

Yan,H., Krishnan,K., Lim,J.T., Contillo,L.G., and Krolewski,J.J. (1996b). Molecular characterization of an alpha interferon receptor 1 subunit (IFN $\alpha$ R1) domain required for TYK2 binding and signal transduction. *Mol. Cell Biol.* 16, 2074-2082.

Yang,C.H., Shi,W., Basu,L., Murti,A., Constantinescu,S.N., Blatt,L., Croze,E., Mullersman,J.E., and Pfeffer,L.M. (1996). Direct association of STAT3 with the IFNAR-1 chain of the human type I interferon receptor. *J. Biol. Chem.* 271, 8057-8061.

Yang,S., Netterwald,J., Wang,W., and Zhu,H. (2005). Characterization of the elements and proteins responsible for interferon-stimulated gene induction by human cytomegalovirus. *J. Virol.* 79, 5027-5034.

Yoneyama,M., Kikuchi,M., Matsumoto,K., Imaizumi,T., Miyagishi,M., Taira,K., Foy,E., Loo,Y.M., Gale,M., Jr., Akira,S., Yonehara,S., Kato,A., and Fujita,T. (2005). Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J. Immunol.* 175, 2851-2858.

Yoneyama,M., Kikuchi,M., Natsukawa,T., Shinobu,N., Imaizumi,T., Miyagishi,M., Taira,K., Akira,S., and Fujita,T. (2004). The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat. Immunol.* 5, 730-737.

Young,D.F., Carlos,T.S., Hagmaier,K., Fan,L., and Randall,R.E. (2007). AGS and other tissue culture cells can unknowingly be persistently infected with PIV5; a virus that blocks interferon signalling by degrading STAT1. *Virology* 365, 238-240.

Yuan,J., Wegenka,U.M., Lutticken,C., Buschmann,J., Decker,T., Schindler,C., Heinrich,P.C., and Horn,F. (1994). The signalling pathways of interleukin-6 and gamma interferon converge by the activation of different transcription factors which bind to common responsive DNA elements. *Mol. Cell Biol.* 14, 1657-1668.

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, 5051-5059.

Zhan,X., Lee,M., Abenes,G., Von,R., I, Kittinunvorakoon,C., Ross-Macdonald,P., Snyder,M., and Liu,F. (2000). Mutagenesis of murine cytomegalovirus using a Tn3-based transposon. *Virology* 266, 264-274.

## Referenzen und Zitate

Zhang,S.Y., Jouanguy,E., Ugolini,S., Smahi,A., Elain,G., Romero,P., Segal,D., Sancho-Shimizu,V., Lorenzo,L., Puel,A., Picard,C., Chapgier,A., Plancoulaine,S., Titeux,M., Cognet,C., von Bernuth,H., Ku,C.L., Casrouge,A., Zhang,X.X., Barreiro,L., Leonard,J., Hamilton,C., Lebon,P., Heron,B., Vallee,L., Quintana-Murci,L., Hovnanian,A., Rozenberg,F., Vivier,E., Geissmann,F., Tardieu,M., Abel,L., and Casanova,J.L. (2007). TLR3 deficiency in patients with herpes simplex encephalitis. *Science* 317, 1522-1527.

Zimmerer,J.M., Lesinski,G.B., Radmacher,M.D., Ruppert,A., and Carson,W.E., III (2007). STAT1-dependent and STAT1-independent gene expression in murine immune cells following stimulation with interferon-alpha. *Cancer Immunol. Immunother.* 56, 1845-1852.

Zimmermann,A., Trilling,M., Wagner,M., Wilborn,M., Bubic,I., Jonjic,S., Koszinowski,U., and Hengel,H. (2005). A cytomegaloviral protein reveals a dual role for STAT2 in IFN- $\gamma$  signaling and antiviral responses. *J. Exp. Med.* 201, 1543-1553.

Zullo,J.N., Cochran,B.H., Huang,A.S., and Stiles,C.D. (1985). Platelet-derived growth factor and double-stranded ribonucleic acids stimulate expression of the same genes in 3T3 cells. *Cell* 43, 793-800.

## ANHANG

### **PUBLIKATIONEN (MIT EIGENER BETEILIGUNG)**

*Counteraction of Interferon-Induced Antiviral Responses by Cytomegalovirus.*

Zimmermann A, **Trilling M**, Wilborn M und Hengel H  
in Prösch S, Cinatl J, Scholz M (eds): New Aspects of CMV-Related Immunopathology.  
Monogr. Virol. Basel, Karger, 2003

*A cytomegaloviral protein reveals a dual role for STAT2 in IFN- $\gamma$  signaling and antiviral responses*

Albert Zimmermann, **Mirko Trilling**, Markus Wagner, Manuel Wilborn, Ivan Bubic, Stipan Jonjic, Ulrich Koszinowski und Hartmut Hengel  
Journal of Experimental Medicine, 2005, 201(10), p1543-1553

*Mouse cytomegalovirus inhibits interferon- $\beta$  gene expression and controls activation pathways of the interferon- $\beta$  enhanceosome*

Vu Thuy Khanh Le, **Mirko Trilling**, Albert Zimmermann und Hartmut Hengel  
Journal of General Virology, 2008, 89: p1131-1141

*Human cytomegalovirus interferes with signal transducer and activator of transcription (STAT) 2 protein stability and tyrosine phosphorylation*

Vu Thuy Khanh Le\*, **Mirko Trilling\***, Manuel Wilborn, Hartmut Hengel und Albert Zimmermann (\*gleichberechtigte Erstautorenschaft)  
Journal of General Virology, 2008, 89, p2416-2426

*An IFN- $\gamma$ -Induced IRF-1-Dependent Antiviral Response Inhibits Vaccinia Virus Replication in Mouse but Not Human Fibroblasts*

**Mirko Trilling**, Albert Zimmermann, Vu Thuy Khanh Le, Holger Ludwig, Klaus Pfeffer, Gerd Sutter, Geoffrey L. Smith und Hartmut Hengel  
*in revision* (seit 04.11.2008) Journal of Virology  
Manuskript liegt der Arbeit in elektronischer Form bei (siehe CD).

*A Novel Assay System for the Detection and Quantification of Virus-specific IgG Antibodies Triggering Fc $\gamma$ -Receptors*

Eugenia Corrales-Aguilar, **Mirko Trilling**, Albert Zimmermann, Sabine Santibanez, Ofer Mandelboim und Hartmut Hengel  
Manuskript in Vorbereitung

*A Simple Luciferase Based Assay Allows Quantitative Assessment of Herpesvirus Entry and Neutralization in Adherent and Non-Adherent Cells*

Henrike Reinhard, Vu Thuy Khanh Le, Mats Ohlin, Hartmut Hengel\* und **Mirko Trilling\***  
(\* gleichberechtigte Letztautorenschaft)  
Manuskript in Vorbereitung

*The Cytomegalovirus pM27 Protein Disrupts Interferon Jak-STAT-Signaling by Recruiting STAT2 to the DNA Damage Binding (DDB1)-CUL4A E3 Ligase complex*

Anhang: Publikationen (mit eigener Beteiligung)

**Mirko Trilling**, Albert Zimmermann, Vu Thuy Khanh Le, Manuela Fiedler und Hartmut Hengel  
Manuskript in Vorbereitung

**PRÄSENTATIONEN**

**2004**

*Mouse CMV Does Not Read Immunology Textbooks: STAT2 Is Part of the IFN- $\gamma$  Signaling cascade*

**Mirko Trilling**, Albert Zimmermann und Hartmut Hengel  
3rd Workshop GFV Study group „Immunbiology of Viral Infections“, Zeilitzheim, Germany, Vortrag

**2005**

*The Cytomegaloviral pM27 Protein Disrupts Interferon-Receptor Jak-STAT-Signalling by Encoding Ubiquitin E3 Ligase Activity: Evidence for a Novel Type of Viral E3-Ubiquitin-Ligase*

**Mirko Trilling**, Albert Zimmermann, Manuela Fiedler und Hartmut Hengel  
30<sup>th</sup> International Herpesvirus Workshop, Turku, Finland, Vortrag

*Size Matters: Vaccinia Virus and Interferons in Human and Mouse*

**Mirko Trilling**, Albert Zimmermann und Hartmut Hengel  
4th Workshop GFV Study group „Immunbiology of Viral Infections“, Zeilitzheim, Germany, Vortrag

*Das viralkodierte Protein pM27 inhibiert den Jak-STAT-Interferon-Signalweg über einen neuartigen Ubiquitin-E3-Ligasemechanismus*

**Mirko Trilling**, Albert Zimmermann und Hartmut Hengel  
Tag des wissenschaftlichen Nachwuchses der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Germany, Vortrag

**2006**

*Interferon- $\gamma$  induced antiviral genes as determinants of poxvirus host range*

**Mirko Trilling**, Albert Zimmermann, Vu Thuy Khanh Le, Holger Ludwig, Gerd Sutter, Geoffrey L. Smith und Hartmut Hengel  
Annual Meeting Gesellschaft für Virologie, München, Germany, Poster

*One Exception Proves the Rule: STAT2 Degradation by HCMV Strains and Clinical Isolates*

**Mirko Trilling\***, Vu Thuy Khanh Le\*, Albert Zimmermann, Manuel Wilborn und Hartmut Hengel (\*gleichberechtigte Erstautorenschaft)  
5th Workshop GFV Study group „Immunbiology of Viral Infections“, Zeilitzheim, Germany, Vortrag

**2007**

*The Cytomegalovirus pM27 Protein disrupts Interferon Jak-STAT-Signalling by Encoding STAT2-specific Ubiquitin E3 Ligase Activity*

## Anhang: Präsentationen

**Mirko Trilling**, Albert Zimmermann, Manuela Fiedler und Hartmut Hengel

Keystone Symposium: Jaks, STATs and Immunity, Colorado, USA,

Vortrag & *Keystone Symposia Scholarship (based on NIH-Grant #1 R13 AI071686-01)*

*The cytomegaloviral pM27 protein disrupts interferon Jak-STAT signalling by recruiting STAT2 to the DNA damage binding (DDB1)-Cul4A E3 ligase complex*

**Mirko Trilling**, Albert Zimmermann, Manuela Fiedler und Hartmut Hengel

32<sup>nd</sup> International Herpesvirus Workshop, Asheville, USA, Vortrag & Travel-Grant

*Interstrain Difference in Human Cytomegalovirus Encoded STAT2 Degradation: A Role For STAT2 Beyond Interferon Signalling*

**Mirko Trilling\***, Vu Thuy Khanh Le\*, Manuel Wilborn, Hartmut Hengel und Albert Zimmermann (\*gleichberechtigte Erstautorenschaft)

Satellite Workshop: Betaherpesvirus des 32<sup>nd</sup> International Herpesvirus Workshop, Asheville, USA, Vortrag & Travel-Grant

*The Cytomegalovirus pM27 Protein Disrupts Interferon JAK-STAT-Signaling by Recruiting STAT2 to the DNA Damage Binding (DDB1)-CUL4A E3 Ligase Complex*

**Mirko Trilling**, Albert Zimmermann, Manuela Fiedler und Hartmut Hengel (hat Vortrag gehalten)

3<sup>rd</sup> European Congress of Virology, Nürnberg, Germany, Vortrag

Verlust der molekularen Kommunikation im Interferonsystem: Subversive Aktionen von Cytomegaloviren

**Mirko Trilling**, Vu Thuy Khanh Le, Albert Zimmermann, Anne Halenius und Hartmut Hengel

Tag des wissenschaftlichen Nachwuchses der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Germany, Vortrag

*The Cytomegalovirus pM27 Protein Disrupts Interferon Jak-STAT-Signalling by Recruiting STAT2 To The DNA Damage Binding (DDB1)-CUL4A E3 Ligase Complex*

**Mirko Trilling**, Albert Zimmermann, Manuela Fiedler und Hartmut Hengel

6. Workshop des GFV-Arbeitskreises Immunbiologie und Virusinfektionen, Deidesheim, Germany, Vortrag

**DANKSAGUNG**

Ich möchte diese Arbeit vier Menschen widmen.

Meiner Mutter Marita Schwatke-Trilling, meinem Vater Peter Kraft, meinem Bruder Till Trilling und meiner Freundin Khanh Le.

Ihr habt dafür gesorgt, dass mein Leben sehr glücklich ist und mir so die Kraft, den Mut und die Freiheit gegeben, diesen manchmal doch sehr steinigen Weg einzuschlagen. Ihr habt mich immer ermuntert, Fragen zu stellen und gegebenenfalls auf eine Antwort zu bestehen. Ihr habt mir immer das Gefühl gegeben, dass ich keine Angst zu haben brauche, dass ich unabhängig von dem Erreichten geliebt werde und ich im Zweifelsfall immer jede menschenmögliche Hilfe von Euch bekomme.

Ihr habt mir die Freiheit gegeben, in die Welt herauszugehen, und das Gefühl gegeben, dass es trotzdem immer ein warmes Plätzchen daheim gibt.

DANKE. ICH LIEBE EUCH!

Des Weiteren möchte ich meinen Mentor und Doktorvater Hartmut Hengel für die gemeinsame Zeit danken. Du hast mir sehr viel beigebracht und ich hatte sehr viel Spaß bei Dir.

Des Weiteren möchte ich insbesondere Prof. Dr. Johannes Hegemann für die Betreuung meiner Doktorarbeit danken.

Mein Dank gilt außerdem der gesamten Arbeitsgruppe (Albert, Alex, Anne, Elke, Enver, Eugi, Eva, Gabi, Hartmut, Imke, Henrike, Jassin, Khanh, Manu, Marco, Sebastian, Stef und Steffi), die eine sehr angenehme Arbeitsumgebung kreiert und die (doch häufig ziemlich langen Tage und Wochenenden) mit Geburtstags-/Einstands- und „Ich-habe-leider-eine-Wette-verloren“-Kuchen oder „Paper-/Grant“-Sekt und Freitags-happy hour versüßt haben.

Ich danke Manuela Fiedler (rVACV-Verkürzungsmutanten), Dr. Vu Thuy Khanh Le ( $\Delta$ M27-EGFP-MCMV), Henrike Reinhard (Rekonstruktion der M27Flag- und STAT2HA-rVACV), Prof. Dr. G. L. Smith ( $\Delta$ B18R und  $\Delta$ B8R-VACV und Revertanten), Prof. Dr. Gerd Sutter (wt-,  $\Delta$ E3L-, earlylacZ- und latelacZ-MVA), Dr. Markus Wagner ( $\Delta$ M27-MCMV) und Dr. Albert Zimmermann (M27-MCMV-Revertante, M27HA-, M28HA-MCMV und  $\Delta$ UL27-HCMV) für die Möglichkeit, die von Ihnen konstruierten Viren und Virus-Mutanten verwenden zu dürfen.

Von den Mikrobiologen möchte ich Prof. Dr. Klaus Pfeffer, Dr. Sandra Beer, Dr. Bernhard Reis und Max von Holleben für Diskussionen, Reagenzien, Zellen und die gemeinsamen TGIF-Abende danken.

Ich danke Dr. Vu Thuy Khanh Le und Prof. Dr. Heiner Schaal für das sehr sorgfältige Lesen dieser Arbeit. Alle noch verbliebenen Fehler wurden eigenständig von mir nach dieser Korrektur „eingefügt“.

Der aufregendste Satz, den man in der Wissenschaft hören kann, der Satz, der neue Entdeckungen ankündigt, ist nicht „Heureka“ (Ich hab’s gefunden), sondern „Das ist komisch...“

Isaac Asimow

***ERKLÄRUNG***

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst und nur die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Die Arbeit wurde bisher noch nicht anderweitig als Dissertation eingereicht oder veröffentlicht.

Düsseldorf, den 10.11.2008

Trilling, Mirko