

**Identifizierung neuer *immediate-early* 3  
Proteine des Maus-Cytomegalovirus (MCMV)  
und ihre Charakterisierung als  
putative Interferon-Antagonisten**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

**Stephanie Rattay**  
aus Langenau

Düsseldorf, April 2013

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  
Korreferent: Prof. Dr. Michael Feldbrügge

Tag der mündlichen Prüfung: 03.07.2013

## **Für meine Familie**

„In der Wissenschaft gleichen wir alle nur den Kindern, die am Rande des Wissens hie und da einen Kiesel aufheben, während sich der weite Ozean des Unbekannten vor unseren Augen erstreckt.“

Isaac Newton (1643-1727)  
englischer Physiker, Mathematiker u. Astronom

## Inhaltsverzeichnis

<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>8</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>11</b>
<b>ABKÜRZUNGEN</b>	<b>12</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>17</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>18</b>
<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>19</b>
<b>1.1 Viren</b>	<b>19</b>
1.1.1 Herpesviren	20
1.1.2 Das Cytomegalovirus	21
1.1.2.1 Historie	21
1.1.2.2 Der lytische CMV-Infektionszyklus	22
1.1.2.3 Das CMV-Genom	24
1.1.3 Klinische Relevanz von HCMV-Infektionen	26
1.1.4 MCMV als Modellsystem	27
1.1.5 Die MCMV <i>immediate-early</i> -Genregion	28
1.1.5.1 Spleißen - ein eukaryotischer und viraler Mechanismus zur Steigerung der Protein-Diversität	28
1.1.5.2 Alternative Spleißvorgänge innerhalb der MCMV <i>immediate-early</i> -Genregion	30
1.1.5.3 Funktionen der MCMV <i>immediate-early</i> -Gene und Phänotypen der Deletionsviren	31
1.1.5.4 Rolle der <i>immediate-early</i> -Gene während Latenz und Reaktivierung	34
<b>1.2 Das Immunsystem und die Erkennung von Pathogenen</b>	<b>35</b>
1.2.1 Das angeborene und das erworbene Immunsystem	35
1.2.2 Erkennung von Pathogenen	37
1.2.3 Induktion der Interferon-Expression	40
1.2.4 IFN-Signaltransduktion	45
1.2.5 Interferon-induzierte Effektorgene	47
1.2.5.1 Die <i>Interferon-stimulated gene 56</i> -Familie	47
1.2.5.2 Die Proteinkinase R (PKR)	48
1.2.5.3 Das 2´-5´-Oligoadenylat-Synthetase (OAS)-RNase L System	48
1.2.5.4 IFN-induzierte Apoptose	49
1.2.6 Virale Immunevasion	49
1.2.6.1 Evasionsstrategien verschiedener Viren	49
1.2.6.2 Immunevasionsmechanismen der Cytomegaloviren	50
<b>1.3 Ziel dieser Arbeit</b>	<b>55</b>

<b>2. ERGEBNISSE</b>	<b>56</b>
<b>2.1. Identifizierung des NF-<math>\kappa</math>B-Antagonisten</b>	<b>56</b>
2.1.1 70 MCMV-Genprodukte sind für die I $\kappa$ B $\alpha$ -Stabilisierung nicht essentiell	56
2.1.2 Das <i>M45</i> -Protein trägt zur verlängerten I $\kappa$ B $\alpha$ -Halbwertszeit bei	58
2.1.3 Generierung und Kontrolle der $\Delta M45$ - und $\Delta M28$ -Deletionsviren	59
2.1.4 Das <i>M45</i> -Genprodukt vermittelt die Verlängerung der I $\kappa$ B $\alpha$ -Halbwertszeit	61
<b>2.2 <i>M28</i> - ein MCMV Kandidatengen für die Inhibition der IFN-<math>\beta</math>-Induktion?</b>	<b>63</b>
2.2.1 Die <i>M28</i> -Transposoninsertionsmutante repliziert in IFN- $\beta$ -defizienten Zellen 100-fach besser als in wt-Zellen	63
2.2.2 Die definierte Deletion des <i>M28</i> -Gens führt zu keinem Wachstumsnachteil in wt-Zellen	64
<b>2.3. Identifikation von neuen <i>ie3</i>-kodierten Transkript- und Proteinisoformen</b>	<b>66</b>
2.3.1 Evaluation der BALB/c <i>immortalized</i> MEFs (BIM)	66
2.3.2 Die MCMV <i>ie1</i> - bzw. <i>ie2</i> -Genprodukte sind für die Interferenz mit dem IRF-3-vermittelten Signalweg nicht essentiell	67
2.3.3 Nachweis von zwei nicht beschriebenen MCMV-exprimierten <i>ie3</i> -Isoformen auf Transkript- und Proteinebene	69
2.3.4 Analyse der subzellulären Lokalisation der IE3-Proteinisoformen	77
2.3.5 Generierung einer $\Delta$ IE-611-Virusmutante	82
2.3.6 Die Deletionsviren $\Delta$ IE-611 und Srev sind replikationsfähig	90
<b>2.4 Die IE-611-Proteinisoform trägt zur Hemmung der IFN-<math>\beta</math>-Induktion bei</b>	<b>95</b>
2.4.1 Analyse der ISG54-Promotor/Enhancer-Induktion nach Überexpression der IE3-Proteinisoformen	95
2.4.2 Die Infektion mit dem $\Delta$ IE-611-Virus löst eine gesteigerte Aktivierung des ISRE-Promotors/Enhancers aus	99
2.4.3 $\Delta$ IE-611-Virus-infizierte Zellen induzieren höhere IFN- $\beta$ -Transkriptmengen als wt-Virus-infizierte Zellen	102
<b>3 DISKUSSION</b>	<b>105</b>
<b>3.1 Das <i>M45</i>-Genprodukt hemmt den NF-<math>\kappa</math>B-vermittelten Signalweg</b>	<b>105</b>
<b>3.2 Die Transkript- und Proteinisoformen des MCMV <i>ie3</i>-Gens</b>	<b>108</b>
3.2.1 Die Generierung verschiedener <i>immediate-early</i> -Proteinisoformen ist zwischen HCMV und MCMV konserviert	108
3.2.2 Die Abundanz der <i>ie3</i> -Transkriptvarianten kann durch die Spleißstellen-Stärke und durch spleißregulatorische Proteine beeinflusst werden	110
3.2.3. Das Expressionsniveau der IE-611-, IE-453- und IE-310-Proteine	114
<b>3.3 Analyse der IE3-Proteinisoformen</b>	<b>116</b>
3.3.1 Werden die IE3-Proteine posttranslational modifiziert?	116
3.2.2 Putative Proteindomänen und -Funktionen	117
3.3.3 Inhibition der Typ I IFN-Induktion durch pIE-611?	121
<b>4 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>127</b>
<b>4.1 Material</b>	<b>127</b>
4.1.1 Geräte	127
4.1.2 Verbrauchsmaterialien	129
4.1.3 Chemikalien und Biochemikalien	129

4.1.4 Kits	132
4.1.5 Enzyme	133
4.1.6 Oligonukleotide	133
4.1.7 Plasmide und Bacmide	135
4.1.8. Bakterienstämme	136
4.1.9 Antikörper	136
4.1.10 Zellkulturmedien und Zusätze	137
4.1.11 Zellkulturgefäße und Plastikwaren	137
4.1.12 Zellen	138
4.1.13 Viren	139
4.1.14 Puffer und Lösungen	139
4.1.15 Computer-Programme	142
<b>4.2 Methoden</b>	<b>143</b>
4.2.1 Arbeiten mit <i>E.coli</i>	143
4.2.1.1 Herstellung chemisch-kompetenter <i>E.coli</i> für die Transformationen von Plasmiden	143
4.2.1.2 Herstellung elektro-kompetenter <i>E.coli</i> für die BAC-Mutagenese	143
4.2.1.3 Transformation von chemisch-kompetenten <i>E.coli</i>	144
4.2.1.4 Transformation elektro-kompetenter <i>E.coli</i>	144
4.2.1.5 Herstellung von Glycerin-Dauerkulturen	145
4.2.2 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen	145
4.2.2.1 Zellkultur	145
4.2.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen	145
4.2.2.3 Herstellung von primären murinen embryonalen Fibroblasten (MEF)	146
4.2.2.4 Transfektion von eukaryotischen Zellen	148
4.2.2.5 Generierung von klonalen, stabilen Transfektanten	148
4.2.2.6 Inhibition der zellulären Translation	149
4.2.3 Virologische Arbeiten	149
4.2.3.1 Herstellung von rekombinanten MCMV-Mutanten	149
4.2.3.2 Herstellung eines gereinigten MCMV-Stocks	150
4.2.3.3 Herstellung eines ungereinigten MCMV-Stocks	151
4.2.3.4 Infektionen mit MCMV	151
4.2.3.5 Replikationsanalysen	151
4.2.3.6 Titrationsen	152
4.2.3.7 UV-inaktivierung von MCMV	152
4.2.3.8 Exklusive Expression von viralen <i>ie</i> -Genen	152
4.2.3.9 Herstellung von MCMV-Immunsereum	153
4.2.3.10 Proteinase K-Verdau	153
4.2.4 Molekularbiologische Arbeiten	154
4.2.4.1 Isolierung von Plasmid-DNA	154
4.2.4.2 Isolierung von Bacmid-DNA	154
4.2.4.3 Arbeiten mit RNA	155
4.2.4.4 Semi-quantitative RT-PCR	155
4.2.4.5 Herstellung einer Digoxigenin (DIG)-markierten Sonde	156
4.2.4.6 Southern-Blot, Hybridisierung und DIG-Detektion	157
4.2.5 Proteinbiochemische und immunologische Methoden	158
4.2.5.1 Herstellung von Gesamtzell-Protein-Lysaten	158
4.2.5.2 Herstellung nativer cytoplasmatischer und nukleoplasmatischer Protein-Lysate	158
4.2.5.3 Bradford-Bestimmung	159
4.2.5.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	159
4.2.5.5 Western-Blot	160
4.2.5.6 Luciferase-Reportergen-Analysen	161
4.2.5.7 Immunfluoreszenz-Färbung (IF)	162

<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>163</b>
<b>ANHANG</b>	<b>195</b>
<b>Publikationen (mit eigener Beteiligung)</b>	<b>195</b>
<b>Präsentationen</b>	<b>196</b>
<b>Danksagung</b>	<b>197</b>
<b>Erklärung</b>	<b>199</b>

## Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1.1 Modell des HCMV Virions.
- Abb. 1.2 Konsensus-Sequenzen humaner Spleißstellen.
- Abb. 1.3 Schematische Darstellung der MCMV *immediate-early* Genregion.
- Abb. 1.4 Zelluläre Lokalisation der *pattern recognition* Rezeptoren mit den jeweiligen PAMPs.
- Abb. 1.5 Vereinfachte Darstellung der Signalwege, die zur Typ I IFN-Induktion führen.
- Abb. 1.6 Schematische Darstellung des IFN- $\beta$ -Enhanceosoms.
- Abb. 1.7 Schematische Darstellung der IFN-induzierten JAK-STAT-Signalwege.
- 
- Abb. 2.1 70 MCMV-kodierte Genprodukte sind für die I $\kappa$ B $\alpha$ -Stabilisierung nicht essentiell.
- Abb. 2.2 Das *M45*-Genprodukt ist an der Verlängerung der I $\kappa$ B $\alpha$ -Halbwertszeit beteiligt.
- Abb. 2.3 Kontrollverdau, Southern-Blot und PCR der definierten  $\Delta M28$ - bzw.  $\Delta M45$ -Deletionsmutanten.
- Abb. 2.4 Das *M45*-Genprodukt vermittelt die Verlängerung der I $\kappa$ B $\alpha$ -Halbwertszeit.
- Abb. 2.5 Der Wachstumsnachteil der Transposon-Viren Tn *M28* und Tn *M45* ist in IFN- $\beta^{-/-}$ -MEF geringer.
- Abb. 2.6 Die definierten  $\Delta M28$ - und  $\Delta M45$ -Viren replizieren effizienter als die entsprechenden Transposoninsertions-Viren.
- Abb. 2.7 BIM-Zellen weisen ein ähnliches mTLR-Expressionsmuster wie primäre BALB/c MEFs und NIH3T3-Fibroblasten auf.
- Abb. 2.8 Die *ie1*- und *ie2*-Genprodukte sind für die p(Ser396)-IRF-3-Inhibition nicht essentiell.
- Abb. 2.9 Identifikation von neuen *ie3*-Transkripten.
- Abb. 2.10 Schema der *ie1/3* Region mit inserierter HA-Epitop-Sequenz stromaufwärts des TGA<sub>2</sub>.
- Abb. 2.11 Überprüfung der IE3-HA-Mutante.
- Abb. 2.12 Die Proteine IE-611, IE-453 und IE-310 werden von MCMV exprimiert.

- Abb. 2.13 Die IE-611-, IE-453- und IE-310-Proteine werden unter selektiven *immediate-early*-Bedingungen exprimiert.
- Abb. 2.14 Schematische Darstellung der MCMV Proteine pIE-611, pIE-453 und pIE-310.
- Abb. 2.15 Die Proteine IE-611, IE-453 und IE-310 sind hauptsächlich nukleär lokalisiert.
- Abb. 2.16 Die IE-611-, IE-453- und IE-310-Proteine weisen in infizierten Zellen eine hauptsächlich nukleäre Lokalisation auf.
- Abb. 2.17 Quantifizierung des IE3-Proteinisoformen-Anteils im Nucleus bzw. Cytoplasma.
- Abb. 2.18 Schematische Darstellung der klonierten  $\Delta$ IE-611-Mutante.
- Abb. 2.19 Kontrollgel und Southern-Blot der  $\Delta$ IE-611-Mutante.
- Abb. 2.20 PCR und Restriktionsanalyse von Bacmid-DNA sowie von DNA aus verschiedenen  $\Delta$ IE-611-Virus-Aliquots.
- Abb. 2.21 wt-IE-611-,  $\Delta$ IE-611- und Srev- Sequenz.
- Abb. 2.22 Aufgrund der Deletion der IE-611-Isoform entsteht ein selektiver Druck, der die Wiederherstellung des ursprünglichen Leserasters begünstigt.
- Abb. 2.23 Die Deletion der IE-611-Isoform führt nicht zum Verlust der viralen *early*- und *late*-Genexpression.
- Abb. 2.24 Die Deletion der IE-611-Isoform resultiert in einem replikationskompetenten Virus mit Wachstumsnachteilen.
- Abb. 2.25 Der  $\Delta$ IE-611-Genotyp hat sich während der Replikationsanalyse nicht verändert.
- Abb. 2.26 pIE-611 sowie pIE-Srev und HCMV pIE2 hemmen die ISG54-Promotor/Enhancer-Aktivität.
- Abb. 2.27 Kontroll-Immunoblot der Luciferase-Proben.
- Abb. 2.28 Die Deletion der IE-611-Isoform führt zu einer gesteigerten ISRE-Promotor/Enhancer-Aktivierung.
- Abb. 2.29 Das  $\Delta$ IE-611-Virus induziert höhere IFN- $\beta$ -Transkriptmengen als das wt- und das Srev-Virus.
- Abb. 2.30 Das  $\Delta$ IE-611-Virus induziert eine stärkere IFN- $\beta$ -Expression als das wt- oder das Srev-Virus.

- Abb. 3.1 pM45 inhibiert RIP1 und NEMO und verhindert dadurch die NF- $\kappa$ B-Signaltransduktion.
- Abb. 3.2 Schematische Darstellung der Spleißstellen, die für die Generierung des IE-611-, IE-453- oder IE-310-Transkripts genutzt werden.
- Abb. 3.3 Putative Bindestellen der spleißregulatorischen SR-Proteine innerhalb der Exon 2-, 2a-, 5- und 5a-Sequenz.
- Abb. 3.4 Putative Phosphorylierungsstellen des pIE-611.
- Abb. 3.5 Der C-Terminus des HCMV pIE2 (pIE86) und des MCMV pIE-611 besteht zu 41% aus identischen Aminosäuren.

## **Tabellenverzeichnis**

Tab. 1.1 Essentielle MCMV- und HCMV-ORFs.

Tab. 1.2 Evasionsstrategien verschiedener Viren.

Tab. 2.1 Vorhersage des WoLF PSORT-Algorithmus für die subzelluläre Lokalisation der IE3-Proteine.

## Abkürzungen

A	Ampere
aa	<i>amino acid</i> ; Aminosäure
Abb.	Abbildung
Act D	Actinomycin D
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
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 fabricii (in Vögeln) selektierte IgG sekretierende Zelle
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celcius
ca.	circa
CARD	<i>caspase recruitment domain</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i> , Nomenklatur für zell. Oberflächenmarker
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
CIP	<i>calf intestine alkaline phosphatase</i> , alkalische Phosphatase
CPE	Cytopathischer Effekt infizierter Zellen
CpG	hypomethyliertes DNA-Motiv: Cytosin-Phosphat-Guanosin
C-terminal	carboxyterminal
Cul4A	Cullin 4 Isoform A
d	<i>day(s)</i> , Tag(e)
DC	<i>dendritic cell</i> , dendritische Zelle
DDB1	<i>DNA-Binding DNA damage protein 1</i>
d.h.	das heißt
DIG	Digoxigenin
DMEM	<i>Dulbeccos Modified Eagle Medium</i>

## Abkürzungen

---

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	2-Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	alle vier 2-Desoxy-Nukleotide (A, T, C, G)
dpi	<i>days post infection</i> , Tage nach der Infektion
ds	Doppelstrang/doppelsträngig
DTT	1,4-Dithiothreitol
e	<i>early</i> , früh exprimierte CMV-Gene
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid (+Na<sub>2</sub>)</i>
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EGTA	<i>Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	<i>fetal calf serum</i> , 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
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
h	<i>hour</i> , Stunde
HA	Hämagglutinin
HAV	Hepatitis A Virus
HBV	Hepatitis B Virus
HCMV	Humanes Cytomegalovirus
HEPES	<i>N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid</i>
HIV	Humanes Immunodefizienz Virus
HMG	<i>high mobility group</i>
H <sub>2</sub> O	Wasser
hpi	<i>hours post infection</i> , Stunden nach Infektion
HSV	Herpes simplex Virus
<i>ie</i>	<i>immediate-early</i> , sehr früh exprimierte CMV-Gene
IFN	Interferon

## Abkürzungen

---

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
IP	Immunopräzipitation
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 Promotor-Element
IU/ml	<i>international units per ml</i> , internationale Einheiten
Jak	Janus Kinase
k	Kilo (1000)
kDa	kilo-Dalton
l	Liter
/	<i>late</i> , spät exprimierte CMV-Gene
LPS	Lipopolysaccharid
Luc	Gen für Luciferase
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> , muriner embryonaler Fibroblast
MEM	<i>Minimal Essential Medium</i>
MEN	Puffer mit MOPS, EDTA und Natriumacetat
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> , Haupthistokompatibilitätsfaktor
MIEP	<i>major immediate-early promoter</i> , erster Promotor der Cytomegaloviren
min	Minute
Mock	"so tun, als ob": uninfiziert, aber gleich behandelt
MOI	<i>multiplicity of infection</i>

## Abkürzungen

---

MOPS	<i>3-(N-Morpholino) propanesulfonic acid</i>
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
n	nano (1/10 <sup>9</sup> )
NaCl	Natriumchlorid
NCS	<i>newborn calf serum</i> , Serum neugeborener Kälber
NF-κB	nukleärer Faktor κB
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NLS	<i>nuclear localization sequence</i>
NP-40	Nonidet P-40 Detergenz
N-terminal	aminoterminal
OAS	Oligoadenylat-Synthetase
OD	Optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i> , offener Leserahmen
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMP	<i>pattern associated molecular pattern</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFU	<i>plaque forming units</i> , Plaque-bildende Einheit
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
PKR	Proteinkinase R
PMSF	<i>Phenylmethan-Sufonylflouride</i>
poly(d)IC	<i>(desoxy) Polyinosinic-Polycytidylic-Acid</i>
ppX	Phosphoprotein mit X kDa (z.B. pp89)
pX	Protein X (z.B. pIE-611)
PRD	<i>positive regulatory domain</i> , positive regulatorische (Promotor-) Domäne
RLRs	<i>RIG-I-like receptors</i> , RIG-I-ähnliche Rezeptoren
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase Polymerasekettenreaktion
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
SA	Spleißakzeptor (auch 3´-Spleißstelle)

## Abkürzungen

---

SCID	<i>severe combined immunodeficient</i> , schwere kombinierte Immundefizienz
SD	Spleißdonor (auch 5´-Spleißstelle)
SDS	Sodium(Natrium)dodecylsulfat
sec	Sekunde
ss	Einzelstrang/einzelsträngig
SSC	Puffer mit Sodium(Natrium)-Chlorid und –Citrat
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
Tab.	Tabelle
TBE	Puffer mit Tris, Borat und EDTA in Wasser
TBK-1	<i>TANK binding kinase 1</i>
TBST	Puffer mit <i>tris buffered saline</i> und Tween-20
TEMED	N,N,N',N',Tetramethylethylendiamin
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TMD	Transmembran-Domäne
Tn	Transposon
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tyk	Tyrosin-Kinase
T-Zelle	Thymus-selektierte Immunzelle (adaptive Immunität)
U/ml	<i>units per ml</i> , Einheiten pro ml
ü.N.	über Nacht
UTP	Uridin-Trisphosphat
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	<i>volume per volume</i> , Verdünnungsverhältnis zweier Flüssigkeiten
w/v	<i>weight per volume</i> , Gewicht pro Volumen
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

## Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, Interferon (IFN)-Inhibitoren des Maus-Cytomegalovirus (MCMV) zu identifizieren, da gezeigt wurde, dass MCMV mit der NF- $\kappa$ B- sowie der IRF-3-abhängigen Typ I IFN-Induktion interferiert. Befunde unserer Arbeitsgruppe belegten zudem, dass für die Inhibition der IRF-3 Signaltransduktion die Expression der MCMV *immediate-early*-Gene hinreichend ist. Da in Immunoblot Analysen von wt-,  $\Delta ie1$ - und  $\Delta ie2$ -Virus-infizierten Zellen eine vergleichbare IRF-3-Inhibition zu beobachten war, rückte das *ie3*-Genprodukt (pIE-611) in den Fokus der Untersuchungen. Im Rahmen der *ie3*-Funktionsanalysen wurden zwei weitere bisher unbekannte *ie3*-Isoformen identifiziert. Diese *ie3*-Transkriptvarianten werden durch alternative Spleißvorgänge generiert und kodieren für die neuen IE3-Proteinisoformen pIE-453 (453 aa; 60 kDa) und pIE-310 (310 aa; 35-40 kDa). Die IE-453- und IE-310-Proteine werden wie das kanonische IE-611-Protein unter selektiven *immediate-early*-Bedingungen exprimiert. Auf Basis dieser Befunde wurde eine  $\Delta$ IE-611 MCMV-Mutante konstruiert, die kein pIE-611 exprimiert, aber noch intakte pIE-453- und pIE-310-kodierende Sequenzen enthält. Mittels dieser Mutante konnte im Gegensatz zu bisherigen Annahmen erstmals nachgewiesen werden, dass das kanonische *ie3*-Genprodukt (pIE-611) für die MCMV-Replikation nicht essentiell ist. Der Nachweis einer erhöhten ISRE-Promotor/Enhancer-Aktivität und einer gesteigerten IFN- $\beta$ -Gen-Transkription in  $\Delta$ IE-611-infizierten Zellen deutet auf eine Beteiligung des IE-611-Proteins bei der Inhibition der Typ I IFN-Induktion hin. Im Rahmen von Western-Blot Analysen wurden stark erhöhte pIE1 (pp89)- sowie leicht erhöhte pM112/M113 (pE1)-Mengen in  $\Delta$ IE-611-Virus- im Vergleich zu wt-Virus-infizierten Zellen nachgewiesen. Die verstärkte Expression viraler Genprodukte in  $\Delta$ IE-611-Virus-infizierten Zellen spricht für eine Promotor-Repressor-Funktion des IE-611-Proteins. Insgesamt konnten somit neue *ie3*-kodierte Transkript- und Proteinisoformen identifiziert und dem pIE-611 eine potenzielle Funktion als IFN-Antagonist und als Promotor-Repressor zugeordnet werden.

## Summary

Aim of this thesis was the identification of mouse cytomegalovirus (MCMV)-encoded interferon (IFN) inhibitors, since it has been shown that MCMV interferes with the NF- $\kappa$ B- and the IRF-3-mediated type I IFN induction.

Data of our group demonstrated, that the MCMV *immediate-early* genes are sufficient for the repression of IRF-3 signaling. Since immunoblot analysis of wt-,  $\Delta ie1$ - and  $\Delta ie2$ -virus-infected cells revealed a similar inhibition of IRF-3 activation, the subsequent studies focused on the *ie3* gene. While analyzing the *ie3* (IE-611) gene functions, two unknown *ie3* isoforms could be identified. These *ie3* transcript isoforms are generated by alternative splicing and encode the new IE3 protein isoforms pIE-453 (453 aa; 60 kDa) and pIE-310 (310 aa; 35-40 kDa). Like the canonical IE-611 protein, the IE-453 and IE-310 protein isoforms are expressed under selective *immediate-early* conditions. Based on these findings, a  $\Delta$ IE-611 MCMV mutant with defective pIE-611 but intact pIE-453 and pIE-310 coding sequences was constructed. In contrast to current opinion, this mutation resulted in a replication-competent virus, demonstrating for the first time that the canonical *ie3* gene product (pIE-611) is non-essential for MCMV replication. The detection of a pronounced ISRE-promoter/enhancer activity as well as an enhanced IFN- $\beta$  gene transcription in  $\Delta$ IE-611-infected cells points towards an inhibitory function of the IE-611 protein concerning the type I IFN induction. In the context of immunoblot analysis strongly pronounced pIE1 (pp89) and slightly enhanced pM112/M113 (pE1) expression was detected in  $\Delta$ IE-611- compared to wt-virus-infected cells. The pronounced expression of viral gene products in  $\Delta$ IE-611-infected cells indicates a promoter repressor function of pIE-611. Altogether, new *ie3* encoded transcript and protein isoforms were identified and a putative function as an IFN antagonist and a promoter repressor could be assigned to pIE-611.

# 1. Einleitung

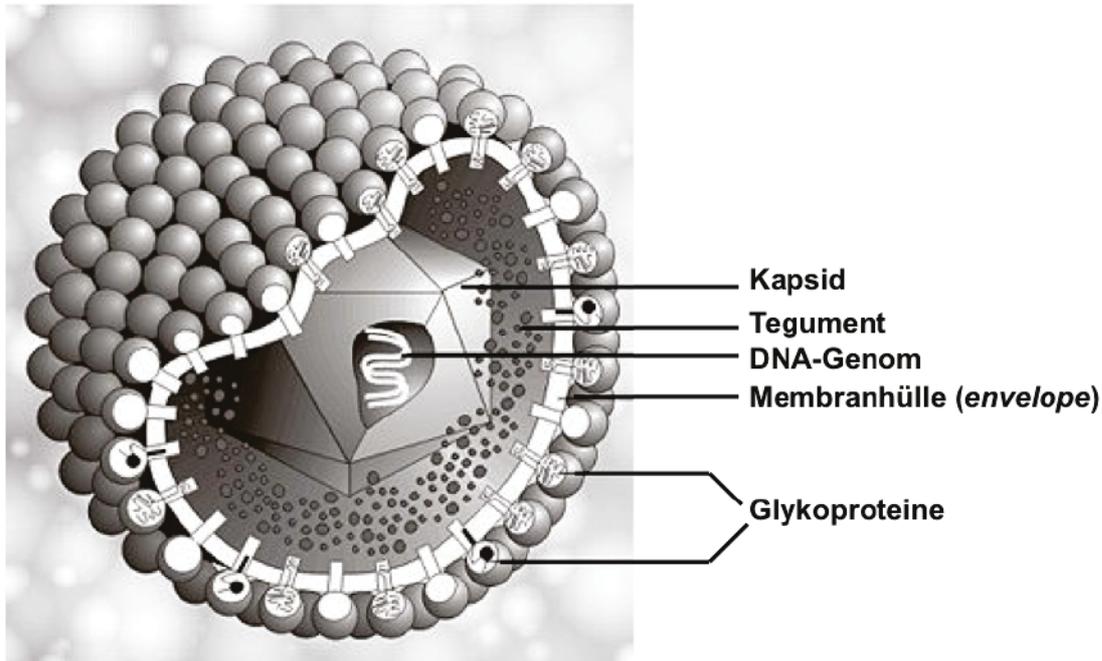
## 1.1 Viren

Erste Beobachtungen von Erregern, die heutzutage als Viren bekannt sind, wurden schon 1879 von dem deutschen Forscher Adolf Meyer bei der Untersuchung der Tabakmosaik-Krankheit gemacht. Er impfte gesunde Tabakpflanzen mit dem Extrakt kranker Pflanzen an, den er durch das Abreiben kranker Blätter in Wasser gewonnen hatte, und zeigte, dass 90% der ursprünglich gesunden Pflanzen die Tabakmosaik-Krankheit entwickelten. Er bewies somit die Infektiosität der Krankheit. Er schlussfolgerte allerdings, dass es sich um ein Bakterium handeln müsste, obwohl er aus dem Extrakt weder Bakterien noch Pilze isolieren oder kultivieren konnte (Levine and Enquist, 2007; Mayer, 1886). Weitere Experimente von Dimitri Ivanovskij und Martinus Beijerinck lieferten Hinweise darauf, dass sich das Pathogen in lebenden Zellen vermehrt. Beijerinck bezeichnete den Erreger der Tabakmosaik-Krankheit deshalb als eine ansteckende lebende Flüssigkeit (*Contagium Vivum Fluidum*) und beschrieb damit eines der ersten Viren (Beijerinck, 1898; Ivanovskij, 1882; 1903). Zur gleichen Zeit (1897) entdeckten und isolierten die Wissenschaftler Loeffler und Frosch den Erreger der Maul- und Klauenseuche und Walter Reed et al. identifizierte 1900 das Gelbfieber-Agens (Loeffler and Frosch, 1897; Reed et al., 1900; 1983).

Der Begriff Virus stammt aus dem Lateinischen und bedeutet schleimige Flüssigkeit oder Gift (Hughes, 1977). Viren sind Pathogene, deren Genom zwar die Informationen für ihre Vermehrung und Ausbreitung beinhaltet, da sie aber keinen eigenen Stoffwechsel besitzen, sind sie für ihre Replikation auf eine Wirtszelle und deren Stoffwechsel und Organellen angewiesen. Das Genom von Viren kann in Form von DNA oder RNA (einzel- oder doppelsträngig) vorliegen. Innerhalb einer Wirtszelle nutzen Viren die zelluläre Maschinerie, um anhand der viralen Nukleinsäure die entsprechenden Genprodukte bzw. Proteine zu synthetisieren. Außerhalb einer Zelle liegt das Virus als infektiöses Partikel (Virion) vor, das zum Schutz der Erbinformation-kodierenden Nukleinsäure von einer Proteinhülle (Kapsid) umgeben ist (unbehüllte Viren). Manche Viren weisen zusätzlich zum Kapsid eine Membranhülle (*envelope*) auf (behüllte Viren).

### 1.1.1 Herpesviren

Die Familie der *Herpesviridae* umfasst eine umfangreiche Gruppe von mehr als 200 zur Zeit bekannten behüllten, doppelsträngigen (ds) DNA-Viren mit linearem Genom. Herpesviren gehören hinsichtlich ihrer Genomgröße (z.B. Cytomegalovirus  $\approx$  240 kb) und ihrer Morphologie (80-200 nm) zu den größten und komplexesten humanpathogenen Viren.



**Abbildung 1.1 Modell des HCMV Virions.**

Das virale DNA-Genom wird von einem Kapsid umschlossen, welches zusätzlich von einer Membranhülle (*envelope*) umgeben ist. Zwischen Membranhülle und Kapsid befindet sich eine Proteinmatrix (Tegument), die hauptsächlich aus Phosphoproteinen besteht.

Modifiziertes Bild basierend auf: "Human Cytomegalovirus (HCMV, Human Herpesvirus 5) cartoon"; [http://www.virology.net/Big\\_Virology/BVDNAherpes.html#Beta](http://www.virology.net/Big_Virology/BVDNAherpes.html#Beta) von Dr. Marko Reschke, Marburg.

Die Membranhülle (*envelope*) der Virionen besteht aus einer Lipiddoppelschicht, in die viral-kodierte Glykoproteine, aber auch von Wirtszellmembranen abstammende Proteine eingelagert sind (Pellett and Roizman, 2007). Sie umschließt das Kapsid, in dem das virale Genom eingeschlossen ist. Zwischen dem Kapsid und der Virusmembran befindet sich eine Proteinmatrix, die als Tegument bezeichnet wird (Abbildung 1.1). Das Tegument besteht hauptsächlich aus Phosphoproteinen, wie im Fall des Humanen Cytomegalovirus (HCMV) z.B. pp28 (pUL99), pp65 (pUL83), pp71 (pUL82) und pp150 (pUL32) (Yu et al., 2011). Hauptzweck des Teguments ist es, in neu infizierten Zellen, Virion abgeleitete präformierte Proteine bereitzustellen, die

sofort zur Verfügung stehen und dadurch die virale Replikation begünstigen und zelluläre Abwehrmechanismen hemmen (Pellett and Roizman, 2007).

Für Herpesviren typisch ist deren Fähigkeit zur persistierenden Infektion. Im Gegensatz zu vielen anderen Virus-Infektionen ist der Wirt, unabhängig von dessen Immunstatus, nach einer primären Herpesvirus-Infektion nicht in der Lage, das Virus vollständig zu eliminieren. Das Immunsystem produziert zwar viruspezifische T- und B-Zellen, erreicht aber keine sterile Immunität. Jede Herpesinfektion führt also zu lebenslanger Persistenz und zu Episoden der Reaktivierung der lytischen, produktiven Infektion während immungeschwächten oder stressreichen Phasen des Wirtes (siehe Abschnitt 1.1.5.4).

### **1.1.2 Das Cytomegalovirus**

Das Cytomegalovirus (CMV; griechisch cyto = „Zelle“; megalos = „groß“), auch Zytomegalievirus genannt, gehört zu den behüllten doppelsträngigen (ds) DNA-Viren. Es wird in die Familie der *Herpesviridae* und in die Unterfamilie der *Betaherpesvirinae* eingegliedert. Der Name Cytomegalovirus beschreibt sehr treffend den cytopathischen Effekt (CPE) den es, morphologisch betrachtet, in Virus-infizierten Zellen auslöst - die Zellen blähen sich regelrecht auf und werden deutlich größer als uninfizierte Zellen.

#### **1.1.2.1 Historie**

Das Virus ist der Erreger der Einschlusskörperchen-Krankheit in der Speicheldrüse. Die ersten Inklusionen-tragenden Zellen wurden bereits 1881 von H. Ribbert beobachtet, der diese Zellen in der Niere eines an Syphilis erkrankten und totgeborenen Kindes entdeckte. Er beschrieb die Inklusionen als homogenen Körper innerhalb des Zellkerns, der durch eine klare Region von der Zellkernmembran getrennt ist (Ribbert, 1904; Riley, 1997). Von 1920-1950 berichteten viele Wissenschaftler über die Zell-Inklusionen. Die Vermutungen über deren Ursprung reichten allerdings von Amöben über Coccidien bis zu Sporozoen. Die ersten Forscher, die ein Virus als Ursache für die zellulären Veränderungen in Betracht zogen, waren 1921 Goodpasture und Talbot (Goodpasture, 1921). 1950 untersuchten Smith und Vellios 89 Fälle der Inklusionen-Krankheit. Die Erkrankung wurde von ihnen generalisierte Speicheldrüsen Virus-Infektion, Einschluss-Krankheit,

oder cytomegale Einschluss-Krankheit genannt, da noch keine einheitliche Nomenklatur bestand. Durch Analogien zwischen natürlichen und experimentellen Infektionen von Nagern und der humanen Krankheit lieferten sie Hinweise darauf, dass die Krankheit durch ein Virus verursacht wird. Da der Hauptteil der Fälle dieser Infektion innerhalb der ersten 2 Lebensjahre auftrat, schlussfolgerten Smith und Vellios, dass die Infektion im Uterus stattfinden könnte (Smith and Vellios, 1950). 1954 wurde das Speicheldrüsen-Virus aus Mäusen zum ersten Mal erfolgreich von Smith in primärem Mäuseembryonen-Gewebe kultiviert (Smith, 1954). Kurz darauf wurde auch das humane Virus isoliert (Smith, 1956). Weller et al. prägte ab 1960 den Begriff Cytomegalovirus weil die Nomenklatur der CID (*cellular inclusion disease*)-Speicheldrüsen Virus-Krankheit sperrig und missverständlich war, da beispielsweise die Speicheldrüse nur einer von vielen möglichen Infektionsorten ist (Weller et al., 1960).

### 1.1.2.2 Der lytische CMV-Infektionszyklus

Der erste Schritt der Virus-Infektion erfordert das Andocken (*attachment*) des Virus-Partikels an die Wirtszelle. Anschließend verschmelzen die virale Membranhülle und die Zellmembran, wodurch das virale Kapsid in das Cytoplasma der Wirtszelle gelangt (*entry*). Für das Andocken des Partikels an die Zelle sind Rezeptor/Ligand-Interaktionen notwendig. In diesem Zusammenhang sind verschiedene zelluläre Oberflächenmoleküle, an die virale Proteine binden, diskutiert worden (z.B. (Carlson et al., 1997; Chan et al., 2009; Compton et al., 1993; Feire et al., 2004; Hobom et al., 2000; Isaacson et al., 2007; Kari and Gehrz, 1992; 1993; Mach et al., 2000; Navarro et al., 1993; Soroceanu et al., 2008; Wang and Shenk, 2005a; 2005b; Wang et al., 2003).

Nach dem *entry*-Prozess wird das virale Kapsid mit Hilfe des Mikrotubuli-Apparats zum Kernporenkomplex transportiert (Ogawa-Goto et al., 2003; Sodeik et al., 1997). Dort dissoziiert das Kapsid (*uncoating*), die virale DNA wird in den Zellkern geschleust und die Genexpression beginnt (Mocarski et al., 2007).

Die Genexpression der CMV-Viren ist koordiniert und wird in drei Phasen unterteilt. Die erste Phase der sehr frühen (*immediate-early*; *ie*) Gene, beginnt direkt nach der Infektion der Wirtszelle (Lacaze et al., 2011; Misra et al., 1978). Für die *immediate-early*-Genexpression ist keine virale *de novo* Protein-Synthese notwendig, da diese durch Bindung von zellulären Transkriptionsfaktoren an den *major immediate-early promoter/enhancer* (MIEP) oder durch Virion-assoziierte regulatorische Proteine

induziert und mittels zellulärer RNA-Polymerase durchgeführt wird. Der MIEP ist konstitutiv aktiv und wird in vielen Zelltypen aktiviert. Die *immediate-early*-Genprodukte wirken als Transaktivatoren der zweiten, frühen Phase (*early*, *e*) der viralen Genexpression, d.h. sie leiten die Transkription der *early*-Gene ein (Chang et al., 1989; Malone et al., 1990). Hierbei spielen die HCMV *ie2*- und die MCMV *ie3*-Genprodukte eine essentielle Rolle (ausführliche Beschreibung in Abschnitt 1.1.5.3). Während der *early* Phase der viralen Genexpression werden vor allem Nichtstrukturproteine, d.h. Genprodukte, die für die virale DNA-Synthese und Replikation sowie die Kapsid-Maturation benötigt werden, hergestellt. Zudem werden Proteine synthetisiert, welche die zelluläre Umgebung zugunsten der viralen Replikation verändern oder die Wirtszellen-Reaktion aufgrund der Infektion modulieren (Mocarski et al., 2007).

Der Beginn der dritten Phase, der spät (*late*, *l*)-induzierten Gene, welche hauptsächlich für die viralen Strukturproteine kodieren, ist von der viralen Genomreplikation abhängig (Mocarski et al., 2007). Experimentell können die *immediate-early*- von den *early*-Genen durch eine Blockade der Protein-Translation (z.B. Cycloheximid) und die *early*- von den *late*-Genen durch eine Hemmung der viralen DNA-Polymerase unterschieden werden (z.B. Phosphono-Essigsäure (PAA) oder Ganciclovir (GCV)).

Die virale DNA-Synthese erfolgt in abgegrenzten nukleären Replikationskompartimenten, die sich in räumlicher Nähe zu den zellulären ND10 (*nuclear domain 10*)-Domänen befinden. Es konnte nachgewiesen werden, dass die virale DNA an ND10-Domänen akkumuliert und dort auch die *ie*-Transkription stattfindet (Ishov et al., 1997). Diese Beobachtung erscheint zunächst verwunderlich, weil die ND10-assoziierten Proteine (*promyelocytic leukemia protein* (PML) und Sp100) sowie das PML-bindende Protein Daxx an der Reprimierung der Transkription beteiligt sind, da sie bei der Formation von Heterochromatin involviert sind (Ishov et al., 2004; Seeler et al., 1998; Xu et al., 2001). Zudem wird die Expression von ND10-assoziierten Proteinen durch Interferone induziert (Maul, 1998). Die ND10-Domänen scheinen somit eher Orte der nukleären Abwehr darzustellen. Trotzdem findet die sehr frühe virale Transkription dort statt und wurde deshalb frühe Transkript-Umgebung (*immediate transcript environment*) genannt.

Nach der Akkumulation von *late*-Genprodukten im Zellkern erfolgt der Zusammenbau von verschiedenen Strukturproteinen zu Partikelvorläufern. Dabei assoziieren die Kapsid-Proteine zu partikulären Vorstufen, die allerdings noch keine virale DNA beinhalten. Daraufhin wird ein virales Genom in das Vorkapsid eingeschleust (*encapsidation*), worauf sich die Bindung von einem Teil der Tegument-Proteine anschließt. Im nächsten Schritt wandern die Nukleokapside zur inneren Kernmembran. Durch das *budding* an der inneren Kernmembran erhält das Nukleokapsid eine Hülle (*primary envelopment*) und liegt dadurch im Perinuklearraum als primäres Virion vor. Anschließend fusioniert die Hülle des primären Virions mit der äußeren Kernmembran (*deenvelopment*). Das wieder unbehüllte Kapsid gelangt in das Cytoplasma und wird während des cytoplasmatischen Transports mit einem Großteil der Tegument-Proteine versehen. An Vesikeln des Trans-Golgi-Netzwerks wird das Kapsid erneut umhüllt (*secondary envelopment*) und die Assoziation von Glykoproteinen erfolgt. Daraufhin wird das reife Virion vermutlich innerhalb eines Exozytose-Vesikels zur Plasmamembran transportiert. Beim letzten Schritt des *egress*-Prozesses fusioniert das Virion-enhaltende Exozytose-Vesikel mit der zellulären Plasmamembran und gelangt dadurch in den extrazellulären Raum (*release*) (Mocarski et al., 2007).

### 1.1.2.3 Das CMV-Genom

Das CMV-Genom (ds DNA) umfasst ungefähr 240 kb und kodiert, wie erst kürzlich gezeigt wurde, im Fall von HCMV für mehr als 750 Translationsprodukte (MCMV:(Brocchieri et al., 2005; Rawlinson et al., 1996) HCMV: (Ma et al., 2012; Stern-Ginossar et al., 2012)). Beide Stränge der DNA kodieren in zum Teil gegensätzlicher Orientierung für die Transkription von mRNA. Diese große Kodierungskapazität erlaubt dem Virus die Expression hochspezialisierter Proteine, die für eine bestimmte Aufgabe im Laufe der Evolution entwickelt wurden. MCMV und HCMV weisen beide kolineare Genome auf und zeichnen sich durch homologe Genbereiche und konservierte Proteine aus. Die Homologie bestimmter MCMV-Gene bezogen auf HCMV wird hierbei durch Großbuchstaben gekennzeichnet z.B. *M122* oder *M45*. Nicht homologe Gene werden klein geschrieben.

## Einleitung

MCMV ORF	HCMV ORF	Beschreibung
	<i>UL32</i>	Tegument-Protein, HCMV pp150
	<i>UL34</i>	Repression der <i>US3</i> -Transkription
	<i>UL37.1</i>	anti-apoptotische Funktion, <i>mitochondrial inhibitor of apoptosis</i> (vMIA)
<b>M44</b>	<b>UL44</b>	DNA-Bindeprotein
<b>M46</b>	<b>UL46</b>	Kapsid-Protein ( <i>minor capsid protein</i> )
<b>M48</b>	<b>UL48</b>	Tegument-Protein ( <i>large tegument protein</i> )
<i>m48.1</i>		
<i>m48.2</i>		Kapsid-Protein ( <i>smallest capsid protein</i> )
	<i>UL48.5</i>	Kapsid-Protein ( <i>smallest capsid protein</i> )
<b>M49</b>	<b>UL49</b>	
	<i>UL50</i>	Nukleärer Export
<b>M51</b>	<b>UL51</b>	Verpacken und Schneiden von DNA
<b>M52</b>	<b>UL52</b>	Verpacken und Schneiden von DNA
<b>M53</b>	<b>UL53</b>	nukleärer Export
<b>M54</b>	<b>UL54</b>	DNA-Polymerase
<b>M55</b>	<b>UL55</b>	Glykoprotein B
<b>M56</b>	<b>UL56</b>	Tegument-Protein; Homolog der HCMV Terminase-Untereinheit; HSV ICP18,5 Homolog
<b>M57</b>	<b>UL57</b>	Haupt-ssDNA-Bindeprotein ( <i>major DNA binding protein</i> )
	<i>UL60</i>	Putativer OriLyt
<b>M70</b>	<b>UL70</b>	DNA-Helikase/Primase-Untereinheit
<b>M71</b>	<b>UL71</b>	Tegument-Protein
<b>M73</b>	<b>UL73</b>	Glykoprotein N
<b>M75</b>	<b>UL75</b>	Glykoprotein H
	<i>UL76</i>	Virion-assoziiertes regulatorisches Protein
<b>M77</b>	<b>UL77</b>	Pyruvoyl-Decarboxylase-Homolog, Verpacken und Schneiden von DNA
<b>M79</b>	<b>UL79</b>	
<b>M80</b>	<b>UL80</b>	Kapsid-Assemblierungs-Protein; Protease
	<i>UL85</i>	Kapsid-Protein ( <i>minor capsid protein</i> )
	<i>UL86</i>	Kapsid-Protein ( <i>major capsid protein</i> )
	<i>UL87</i>	
<b>M89 Exon 1</b>	<b>UL89 Exon 1</b>	Verpacken und Schneiden von DNA
<i>M89 Exon 2</i>		Konserviertes Herpesvirus gespleißtes Gen
	<i>UL90</i>	
<b>M91</b>	<b>UL91</b>	
<b>M92</b>	<b>UL92</b>	
<b>M93</b>	<b>UL93</b>	Tegument-Protein
<b>M94</b>	<b>UL94</b>	Tegument-Protein
<b>M95</b>	<b>UL95</b>	
<b>M96</b>	<b>UL96</b>	Tegument-Protein
	<i>UL98</i>	Alkaline Nuklease
<b>M99</b>	<b>UL99</b>	Tegument-Protein; HCMV pp28
<b>M100</b>	<b>UL100</b>	Glykoprotein M
<b>M102</b>	<b>UL102</b>	DNA-Helikase/Primase-Untereinheit
<b>M104</b>	<b>UL104</b>	Struktur-Protein; Verpacken und Schneiden von DNA
<b>M105</b>	<b>UL105</b>	DNA-Helikase/Primase-Untereinheit
<i>M112 Exon 1-3</i>		Exon 1-3 des <i>early 1</i> -Gens
<i>M113</i>		Potentiell alternativ gespleißtes <i>M112/113</i> -Genprodukt bestehend aus <i>M112 Exon 1</i> und <i>M113</i>
<b>M115</b>	<b>UL115</b>	Glykoprotein L
<b>M122 Exon 5</b>	<b>UL122</b>	Exon 5 des <i>ie3</i> -Gens, <i>ie3</i> ist das Homolog zu HCMV <i>ie2</i>
<i>m142</i>		
<i>m143</i>		

**Tabelle 1.1 Essentielle MCMV- und HCMV-ORFs** (basierend auf (Brune et al., 1999; Dunn et al., 2003; Lacaze et al., 2011; Mocarski et al., 2007; Rawlinson et al., 1996).

Angegeben ist jeweils der MCMV- bzw. der HCMV-ORF (*open reading frame*) und, falls bekannt, eine Beschreibung der Genprodukt-Funktion oder weitere Erläuterungen wie beispielsweise verschiedene Spleißvarianten. Fett gedruckte ORFs sind sowohl in MCMV als auch in HCMV "essentiell", d.h. die Deletion dieser Gene resultiert in einem replikationsinkompetenten Virus.

Die Einteilung der Gene in homolog und nicht homolog erfolgte aufgrund von Positionshomologien, d.h. es wurde analysiert ob im HCMV-Genom ein Gen vorhanden ist, das eine gewisse genetische Ähnlichkeit aufweist. Die Funktionen der Genprodukte blieben dabei unberücksichtigt.

Zentral im CMV-Genom sind Gene lokalisiert, welche für Struktur-Komponenten des Virus-Partikels kodieren oder eine Rolle bei der viralen Genom-Replikation spielen (Brocchieri et al., 2005; Rawlinson et al., 1996). Viele dieser Gene sind für die Virusreplikation "essentiell", d.h. eine Deletion dieser Gene resultiert in einem replikationsinkompetenten Virus (siehe Tabelle 1.1). Dieser zentrale Bereich ist in unterschiedlichen CMV-Spezies konserviert. Der äußere Bereich des Genoms vermittelt häufig Funktionen des Wirts- und Zelltropismus sowie der Immunevasion.

### **1.1.3 Klinische Relevanz von HCMV-Infektionen**

HCMV kann über Körperflüssigkeiten (Speichel, Blut, Urin, genitale Ausscheidungen und Muttermilch), aber auch diaplazentar von der Mutter auf den Fötus transmittiert werden. Die diaplazentare Übertragung wird bei MCMV im Gegensatz zu HCMV nicht beobachtet. Die HCMV-Seroprävalenz liegt bei Erwachsenen, abhängig vom Alter und Geschlecht sowie vom sozialen und ökonomischen Status, zwischen 45% und fast 100% (Bate et al., 2010; Cannon et al., 2010). Grundsätzlich sind die geringsten Durchseuchungsraten in Westeuropa sowie den Vereinigten Staaten von Amerika (USA 50,4%) und die höchsten Raten in Südamerika, Afrika und Asien beobachtet worden (Bate et al., 2010; Cannon et al., 2010).

Die Primärinfektion von gesunden Erwachsenen verläuft normalerweise subklinisch und bleibt häufig unbemerkt. Es sind aber auch schwerere Verläufe, bei scheinbar immunkompetenten Patienten, dokumentiert. Bei diesen Patienten sind vor allem CMV-induzierte Manifestationen im Bereich des Gastrointestinal-Trakts (z.B. Kolitis) und des Zentralen Nervensystems (Meningitis, Enzephalitis, Querschnittsmyelitis) beschrieben (Rafailidis et al., 2008).

Besondere Relevanz hat eine CMV-Infektion bei Menschen mit geschwächtem Immunsystem. Eine Immuninkompetenz kann beispielsweise durch Stress, durch immunsuppressive Behandlung nach einer Organtransplantation oder durch Pathogene, die bevorzugt Immunzellen infizieren (z.B. HIV), ausgelöst werden und begünstigt die Primärinfektion als auch die Reaktivierung des Virus. Typische HCMV-

assoziierte Erkrankungen sind bei diesen Patienten Kolitis, Retinitis oder Encephalitis.

Wie bereits erwähnt wurde, kann HCMV auch diaplazentar von der Mutter auf den Fötus übertragen werden. Eine HCMV-Primärinfektion während der Schwangerschaft betrifft 1-8% der Mütter (Rahav, 2007) und führt in ca. 32% der Fälle zu einer kongenitalen Infektion (Kenneson and Cannon, 2007). 10-18% der Neugeborenen kommen nach einer Primärinfektionen der Mutter mit symptomatischen kongenitalen CMV-Erkrankungen zur Welt (Fowler et al., 1992; Modlin et al., 2003). In 10-20% der Fälle ist die kongenitale Infektion letal (Dollard et al., 2007; Modlin et al., 2003) und in 40-58% werden Spätfolgen beobachtet (Dahle et al., 2000; Dollard et al., 2007). Die HCMV-assoziierten Erkrankungen umfassen Hörschäden, motorische Störungen, Beeinträchtigungen des Sehvermögens oder geistige Retardation. Bis zu 90% der Neugeborenen kommen ohne Symptome zur Welt und ca. 10-15% dieser Kinder erleiden Spätschäden (hauptsächlich sensorineurale Schwerhörigkeit) (Fowler et al., 1992; Ludwig and Hengel, 2009; Nigro, 2009). 1,4% der Föten werden aufgrund von Reaktivierung oder Superinfektion (mit anderen CMV-Stämmen) kongenital infiziert (Rahav, 2007).

Eine Behandlung von HCMV-Infektionen ist normalerweise nur bei immungeschwächten Patienten oder während einer Schwangerschaft erforderlich. Immunsupprimierte Menschen werden in der Regel mit Virostatika (z.B. Ganciclovir, Foscarnet, Cidofovir) therapiert, wodurch die Virusreplikation gehemmt und somit die Viruslast reduziert wird. Die Behandlung von Schwangeren mit Virostatika wird nicht empfohlen, da die Medikamente potenziell kanzerogen und teratogen wirken. Verschiedene Studien ergaben allerdings Hinweise darauf, dass die intravenöse, passive Immunisierung von Schwangeren mit CMV-spezifischem Hyperimmunglobulin (CMV-IVIG = *intravenous immunoglobulin*), wie beispielsweise Cytotect® (Biotest AG), zu einer Verringerung der kongenitalen Infektionsrate sowie der CMV-assoziierten Erkrankungen führt (Adler and Nigro, 2009; Nigro et al., 2005; 2012).

### **1.1.4 MCMV als Modellsystem**

Die Cytomegaloviren sind durch ihre lange Koevolution mit einer Wirtsspezies äußerst speziesspezifisch, d.h. das Humane CMV kann nur Menschen, das Maus-CMV kann nur Mäuse infizieren. Allerdings können *in vitro* zum Teil Zellen anderer Spezies mit CMV infiziert werden, was zu einer gewissen Replikation des Virus führt

(Ellsmore et al., 2003; Walker and Hudson, 1987; Wu et al., 1997). Bei der Infektion von speziesfremden Zellen wurde beobachtet, dass virale *immediate-early*- und *early*-Gene exprimiert werden können, *late*-Gene waren allerdings nicht nachweisbar, d.h. das Virus kann keinen vollständigen Replikationszyklus durchlaufen (Ellsmore et al., 2003; Walker and Hudson, 1987; Wu et al., 1997). Dies deutet darauf hin, dass die von der viralen Genomreplikation abhängigen Genprodukte in speziesfremden Zellen nicht hergestellt werden können. Im Umkehrschluss bedeutet dies aber auch, dass zur Analyse von *immediate-early*- oder *early*-Phänotypen von MCMV beispielsweise humane Zellen verwendet werden können.

Die ausgeprägte Wirtsspezifität hat experimentell betrachtet zwei Konsequenzen: Einerseits sind alle CMV-Viren, abgesehen von HCMV, für den Menschen apathogen. Andererseits bedeutet dies auch, dass die HCMV-Forschung auf *in vitro* Experimente mit permissiven Zellen begrenzt ist und keine *in vivo* Versuche möglich sind.

MCMV eignet sich aufgrund der Genhomologien zu HCMV, aber auch durch einen ähnlichen Zell- und Organtropismus sowie deren assoziierte Krankheitsverläufe (Bolger et al., 1999; Brody and Craighead, 1974; de Maar et al., 2003; Reddehase et al., 1985) als Modellsystem zur Analyse von Virus-Wirt-Interaktionen. Das Vorhandensein eines geeigneten Kleintiermodells (natürlicher Wirt für MCMV ist die Wildmaus *Mus musculus*) ermöglicht die Beantwortung von virusgenetischen, molekularbiologischen und immunologischen Fragestellungen *in vivo*. Besonders hervorzuheben ist zudem die Vielzahl der heutzutage verfügbaren *knockout*-Mäuse, die wertvolle Hinweise auf die Beteiligung bestimmter Signaltransduktionswege von zellulären Abwehrmechanismen gegenüber der Virus-Infektion geben können.

### **1.1.5 Die MCMV *immediate-early*-Genregion**

#### **1.1.5.1 Spleißen - ein eukaryotischer und viraler Mechanismus zur Steigerung der Protein-Diversität**

Die DNA weist Protein-kodierende Bereiche, die als Exons bezeichnet werden, und nicht Protein-kodierende Bereiche auf, die Introns genannt werden. Im Rahmen der Transkription wird die DNA in prä-mRNA umgeschrieben, welche die unterbrechenden Intron-Sequenzen noch enthält. Parallel zur Transkription werden

die Introns durch die Spleiß-Maschinerie entfernt, wodurch dann die reife mRNA entsteht. Dabei können aus einer prä-mRNA mehrere verschiedene mRNAs prozessiert werden, die wiederum zu funktionell unterschiedlichen Proteinisofomen translatiert werden können.

Die Exon/Intron-Grenzen weisen konservierte Sequenz-Bereiche auf. Die 5'-Spleißstelle (Spleißdonor, SD) zeichnet sich durch ein GT-Dinukleotid an den Positionen +1 und +2 innerhalb des Introns aus (Abbildung 1.2). Werden die Sequenzbereiche, die *up-* und *downstream* des GT-Nukleotids liegen, mit berücksichtigt, ergibt sich ein degeneriertes Konsensus-Motiv mit der Sequenz: MAG/GTRAGTNN (M = Cytidin oder Adenosin; R = Purin d.h. Adenosin oder Guanosin; / = Grenze zwischen Exon und Intron; N = jedes Nukleotid).

Die 3'-Spleißstelle (Spleißakzeptor, SA) zeichnet sich an den Positionen -2 und -1 des Introns durch ein AG-Dinukleotid aus (Abbildung 1.2). Stromaufwärts dieses Dinukleotids liegt ein Pyrimidin-reicher Bereich, der Polypyrimidin-Trakt (PPT) genannt wird, und aus 10-20 Nukleotiden besteht. 11-40 Nukleotide *upstream* des AG-Dinukleotids befindet sich zudem die Verzweigungssequenz (*branch point sequence*, BPS), die das Konsensus-Motiv YNYTRAC (Y=Pyrimidin d.h. Cytidin oder Thymin; R=Purin, N=Pyrimidin oder Purin, **A**=Verzweigungsstelle) aufweist (Berglund et al., 1998; Burge et al., 1999; Moore, 1999).



**Abbildung 1.2 Konsensus-Sequenzen humaner Spleißstellen** (modifiziert nach (Moore, 1999)).

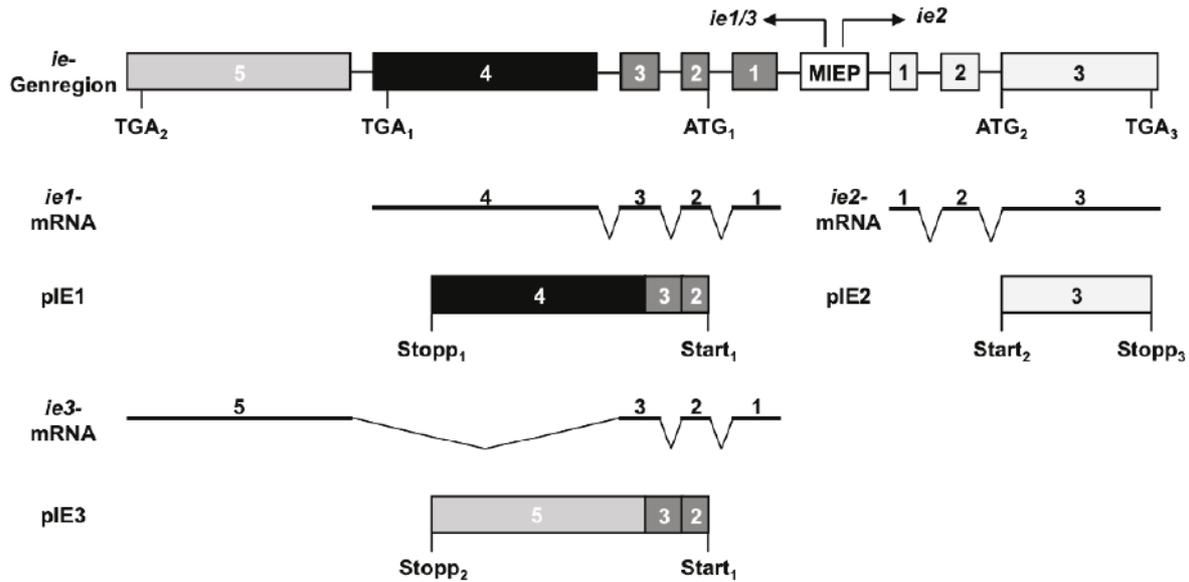
Die 5'-Spleißstelle (Spleißdonor, SD) eines Introns (schwarze Linie, die Exon 1 und Exon 2 verbindet) ist durch das GT-Dinukleotid (rot) an den Positionen +1 und +2 gekennzeichnet. Die 3'-Spleißstelle (Spleißakzeptor, SA) weist an den Positionen -2 und -1 ein AG (rot) mit vorgelagertem Polypyrimidin-Trakt (blau) auf. 11-40 Nukleotide *upstream* des AG-Dinukleotids liegt die Verzweigungsstelle, die hauptsächlich durch ein Adenosin definiert ist. Rot gekennzeichnet sind die am stärksten konservierten Nukleotide. Y = Pyrimidin, R = Purin, N = Pyrimidin oder Purin.

Alternative Spleißvorgänge finden nicht nur bei Eukaryoten, sondern auch bei DNA- und Retroviren statt. Das HI-Virus Typ 1 generiert beispielsweise durch die Nutzung verschiedener Spleißdonoren und –akzeptoren aus nur einem Primärtranskript mehr als 40 verschiedene mRNAs (Furtado et al., 1991; Purcell and Martin, 1993). Auch CMV-Viren nutzen alternatives Spleißen, indem sie aus einer Vorläufer-RNA verschiedene fertige mRNAs prozessieren, um damit ihre Protein-Diversität zu erhöhen.

#### **1.1.5.2 Alternative Spleißvorgänge innerhalb der MCMV *immediate-early*-Genregion**

Die MCMV *immediate-early* (*ie*) Region ist ein prototypisches Beispiel für eine Genregion, die von alternativen Spleißvorgängen beeinflusst wird. Innerhalb dieser Genregion sind drei *immediate-early* Gene *ie1*, *ie2* und *ie3* beschrieben (Keil et al., 1987a; 1987b; Messerle et al., 1992; 1991).

Zentral in der *ie*-Genregion liegt der *major immediate-early promoter/enhancer* (MIEP), von dem aus sowohl *ie1/ie3* als auch *ie2* transkribiert werden (Abbildung 1.3). Die Exons 1-5 der *ie1/ie3*-Genregion befinden sich stromabwärts, die Exons 1-3 des *ie2*-Gens stromaufwärts des MIEP. Die Transkription der *ie1/3*-Sequenz resultiert in einer prä-mRNA von 5,1 kb Länge. Für die Bildung des *ie1*- bzw. *ie3*-spezifischen Transkripts sind alternative Spleißvorgänge unumgänglich. Hierbei entsteht eine pIE1-kodierende mRNA durch ein Zusammenfügen der Exons 1, 2, 3 und des *ie1*-spezifischen Exons 4. Um eine pIE3-kodierende mRNA herzustellen, werden dagegen die Exons 1, 2, 3 mit dem *ie3*-spezifischen Exon 5 unter Ausschluss des *ie1*-spezifischen Exons 4 zusammengespleißt (Keil et al., 1987a; 1987b; Messerle et al., 1992). Somit beinhaltet sowohl die gespleißte *ie1*- als auch die *ie3*-mRNA die Exons 1, 2 und 3. Da beide Transkripte mit ca. 2,75 kb zudem gleich groß sind können sie nur anhand der spezifischen Exon 4- bzw. Exon 5-Sequenz voneinander unterschieden werden. Als Translationsstart-Kodon für die Generierung von pIE1 und pIE3 wird in beiden Transkripten das ATG<sub>1</sub> (Start<sub>1</sub>) in Exon 2 genutzt. Das Exon 1 ist nicht kodierend. Die Translation des *ie1-open reading frames* (ORF) endet am Stopp-Kodon TGA<sub>1</sub>, (Stopp<sub>1</sub>) wohingegen die Translation des *ie3*-ORF am TGA<sub>2</sub> (Stopp<sub>2</sub>) stoppt (Abbildung 1.3).



**Abbildung 1.3 Schematische Darstellung der MCMV *immediate-early* Genregion.**

Die *ie1*- und *ie3*-Transkripte beinhalten beide die Exons 1-3. Spezifität für das *ie1*- oder *ie3*-Transkript wird über das Exon 4 bzw. Exon 5, das durch alternatives Spleißen angefügt wird, vermittelt (Keil et al., 1987a; 1987b; Messerle et al., 1992). Das *ie1/3* Exon 1 ist nicht kodierend. Stromaufwärts der *ie1/3*-Genregion liegt der *major immediate-early promoter/enhancer* (MIEP), der sowohl die Expression des *ie1/3*- als auch des *ie2*-Gens initiiert. Das *ie2*-Gen besteht aus 3 Exons, wobei hier die Exons 1 und 2 nicht kodierend sind (Keil et al., 1987a; Messerle et al., 1991). Intronische Bereiche, sind als schwarze Linien, welche die Exons (Rechtecke) miteinander verbinden, dargestellt. Unterhalb der *ie*-Genregion sind die Spleiß-Vorgänge, die zur Generierung der *ie1*-, *ie2*- und *ie3*-mRNA notwendig sind, veranschaulicht. Die Translation der *ie1*- und *ie3*-mRNAs beginnt am ATG<sub>1</sub> (Start<sub>1</sub>) und endet am TGA<sub>1</sub> (Stopp<sub>1</sub>) bzw. TGA<sub>2</sub> (Stopp<sub>2</sub>). Für die Generierung des IE2-Proteins wird das ATG<sub>2</sub> (Start<sub>2</sub>) und das TGA<sub>3</sub> (Stopp<sub>3</sub>) genutzt.

Für die Herstellung der *ie2*-mRNA werden die Exons 1, 2 und 3 *upstream* des MIEP zusammengefügt. Die Translation der pIE2-kodierenden mRNA beginnt am ATG<sub>2</sub> (Start<sub>2</sub>) im Exon 3 und endet am TGA<sub>3</sub> (Stopp<sub>3</sub>), d.h. die Exons 1 und 2 sind nicht kodierend (Keil et al., 1987a; Messerle et al., 1991).

### 1.1.5.3 Funktionen der MCMV *immediate-early*-Gene und Phänotypen der Deletionsviren

Die *major immediate-early* Regionen von HCMV und MCMV weisen ein hohes Maß an strukturellen Ähnlichkeiten auf. Stromabwärts des *major immediate-early promoter/enhancer* (MIEP) liegt in beiden Virusgenomen eine Transkriptionseinheit, die aus fünf Exons besteht und für alternativ gespleißte Transkripte kodiert. Das Zusammenfügen der Exons 1-4 resultiert in dem *ie1*-Transkript (Keil et al., 1987a; 1987b; Stenberg et al., 1984; Stinski et al., 1983) wohingegen das Transkript,

bestehend aus Exon 1, 2, 3 und 5 für das HCMV pIE2 bzw. für das MCMV-Homolog pIE3 kodiert (siehe auch Abschnitt 1.1.5.2) (Messerle et al., 1992; Stenberg et al., 1989; 1985)

Das MCMV 89 kDa pIE1 (pp89) besteht aus 595 Aminosäuren während sich das HCMV pIE1 (72 kDa) aus 491 aa zusammensetzt (Keil et al., 1987a; Messerle et al., 1992; Stenberg et al., 1984; Stinski et al., 1983). Sowohl für MCMV als auch für HCMV sind weitere IE1-Proteinisoformen nachgewiesen worden. MCMV exprimiert z.B. zusätzlich die pp76-Form, während HCMV z.B. das pIE19 generiert (Münch et al., 1991; Shirakata et al., 2002).

HCMV pIE1 und MCMV pIE1 weisen nur eine 12%-Aminosäure-Homologie auf, die hauptsächlich auf der "sauren" C-terminalen Region der Proteine beruht (Maul and Negorev, 2008). Allerdings ist ihre Sekundärstruktur sehr ähnlich. Beide Proteine unterstützen die Transaktivierung von *early*-Promotoren und verstärken dadurch den Effekt des HCMV IE2- bzw. MCMV IE3-Proteins (Messerle et al., 1992; Stenberg et al., 1990). Des Weiteren sind für beide IE1-Proteine aktivierende Wirkungen auf zelluläre Promotoren beschrieben (z.B. (Gribaudo et al., 2000; Margolis et al., 1995)). Die *ie1*-Genprodukte sind außerdem an der Dispersion der ND10-Domänen, die aus PML (*promyelocytic leukemia protein*), HDACs (Histon-Deacetylasen) und Daxx bestehen, beteiligt (Ahn et al., 1998; Ishov et al., 1997). Es konnte gezeigt werden, dass die CMV IE1-Proteine die Sumoylierung von PML reduzieren. Deshalb wird spekuliert, dass sich durch die PML-Desumoylierung eventuell die PML-gebundenen Proteine wie Daxx ablösen (Maul and Negorev, 2008). Daxx rekrutiert HDACs an bestimmte Promotoren und hemmt so die Transkription (Hollenbach et al., 2002; Li et al., 2000). Für das MCMV IE1-Protein konnte eine Interaktion mit mDaxx, HDAC2 und PML nachgewiesen werden. Zudem wurde eine inhibitorische Funktion des MCMV pIE1 auf die Deacetylierungsaktivität von HDAC2 beobachtet (Tang and Maul, 2003). Neueste Erkenntnisse beweisen, dass eine Deletion des MCMV *ie1*-Gens zu einer Erhöhung der TNF- $\alpha$ -Produktion *in vivo* führt, was auf eine regulatorische Funktion des pIE1 hinsichtlich der zellulären proinflammatorischen Antwort hindeutet (Rodriguez-Martin et al., 2012).

Trotz dieser Vielfalt an Funktionalitäten sind weder das HCMV- noch das MCMV-IE1-Protein für die virale Replikation essentiell (Greaves and Mocarski, 1997; Nevels et al., 2004). Im Fall von MCMV ist *in vitro*, unabhängig von der Start-MOI, kein Replikationsdefizit zu beobachten; *in vivo* ist ein 2-60-facher Wachstumsnachteil

(abhängig vom analysierten Organ, dem Zeitpunkt nach der Infektion und dem Mausstamm) und eine geringere Virulenz des Deletionsvirus nachweisbar (Ghazal et al., 2005).

Das MCMV pIE3 (611 aa) weist eine Größe von 88 kDa auf (Messerle et al., 1992). Das HCMV IE2-Protein (IE86) besteht aus 579 aa und ist 86 kDa groß (Stenberg et al., 1985; 1989). Die Proteine setzen sich, beim Vergleich der C-terminalen Aminosäure-Sequenz, zu 56% aus identischen oder konservierten Aminosäuren zusammen (Busche et al., 2008).

Sowohl HCMV pIE2 als auch MCMV pIE3 fungieren als Transaktivatoren der viralen *early*-Genexpression (wie z.B. von *UL112/113* bzw. *M112/113 = e1*) (Angulo et al., 2000; Malone et al., 1990; Messerle et al., 1992; Perez et al., 2013). Gleichzeitig sind sie Autorepressoren des MIEP und regulieren somit ihre eigene Genexpression (Hermiston et al., 1990; Macias et al., 1996; Messerle et al., 1992; Petrik et al., 2007; Pizzorno and Hayward, 1990; Pizzorno et al., 1988; Stenberg et al., 1990). Neuere Studien von Martínez et al. belegen eine Interaktion von pIE3 mit HDAC2 zu einem späteren Zeitpunkt der Infektion (24 hpi) wodurch die reprimierende Aktivität von HDAC2 auf die *e1*-Genexpression aufgehoben wird (Martínez et al., 2010).

pIE2 und pIE3 weisen zudem Zellzyklus-regulatorische Funktionen auf. pIE2 stoppt den Zellzyklus von HCMV-infizierten Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase während pIE3 einen Zellzyklus-Arrest von MCMV-infizierten Zellen in der G<sub>1</sub>- und der G<sub>2</sub>-Phase bewirkt (Murphy et al., 2000; Wiebusch and Hagemeyer, 1999; Wiebusch et al., 2008).

Aufgrund ihrer entscheidenden Rolle bei der Aktivierung der *early*-Genexpression sind das HCMV *ie2*- und das MCMV *ie3*-Gen essentiell für die virale Replikation, d.h. die Deletion der entsprechenden Gene resultiert in replikationsinkompetenten Viren (Angulo et al., 2000; Heider et al., 2002; Marchini et al., 2001; White et al., 2004).

Stromaufwärts des MIEP liegt der für MCMV-spezifische *ie2*-Genlokus. Für das MCMV *ie2*-Gen ist kein Homolog in HCMV bekannt. Das *ie2*-Transkript besteht aus den Exons 1-3 und wird in ein 391 aa umfassendes Protein mit einer Größe von 43 kDa translatiert (Keil et al., 1987a; Messerle et al., 1991). Kotransfektionsdaten deuten darauf hin, dass pIE2 eine transaktivierende Funktion auf den MIEP ausübt (Cardin et al., 1995). *In vitro* und *in vivo* Experimente zeigen, dass das pIE2 für die

virale Replikation nicht essentiell ist (Cardin et al., 1995; Manning and Mocarski, 1988).

#### **1.1.5.4 Rolle der *immediate-early*-Gene während Latenz und Reaktivierung**

Sowohl HCMV als auch MCMV entwickeln nach der Primärinfektion den Zustand der Latenz. Die latente Infektion ist durch die Anwesenheit von latenten viralen Genomen bei gleichzeitiger Abwesenheit von infektiösen viralen Partikeln und Transkripten der produktiven Infektion (insbesondere die HCMV *ie2*- und MCMV *ie3*-Transkripte) charakterisiert. Die latenten viralen Genome sind dabei in hämatopoetischen Zellen nachweisbar (Mocarski et al., 2007).

Die CMV Gen-Expression ist in latent infizierten Zellen auf ein Minimum beschränkt und bis jetzt wurden nur wenige putative Latenz-assoziierte Transkripte beschrieben wie beispielsweise ein *UL81-82 antisense* Transkript (Bego et al., 2005), die *sense* und *antisense* Transkripte der HCMV *immediate-early*-Region (ORF94/pUL126a) (Kondo et al., 1996; White et al., 2000), das *UL138*-Genprodukt (Goodrum et al., 2007) und eine Isoform des viralen IL-10 Homologs, das von der *UL111.5A*-Region kodiert wird (Jenkins et al., 2008; 2004). Zudem wurde eine auf bestimmte Foci beschränkte, zeitlich begrenzte und stochastische Transkription der MCMV *ie1*- und *ie2*-Gene in Lungengewebe von latent infizierten Mäusen nachgewiesen (Grzimek et al., 2001; Kurz et al., 1999). *ie3*-Transkripte konnten innerhalb dieser Foci nicht detektiert werden (Kurz et al., 1999).

Welche Vorgänge außerhalb und innerhalb der latent-infizierten Zelle notwendig sind, um eine Virus-Reaktivierung auszulösen, ist bis heute nicht ausreichend aufgeklärt. Reaktivierung wird insbesondere nach Stammzell-, Knochenmark- und Organtransplantationen sowie bei HIV-infizierten Patienten beobachtet (Fietze et al., 1994; Mutimer et al., 1997). Es wird angenommen, dass die Reaktivierung durch eine Aktivierung des MIEP und der damit einhergehenden *immediate-early*-Genexpression induziert wird (Stinski and Isomura, 2007). Latenz-Studien von MCMV und HCMV deuten darauf hin, dass (Stress-induzierte) Signaltransduktionsvorgänge und die zelluläre Differenzierung zur Reaktivierung führen (Mocarski et al., 2007; Prösch et al., 2000).

Obwohl die zelluläre Differenzierung einen entscheidenden Schritt bei der Reaktivierung darstellt, führt diese oder ein Zytokin-Stimulus (z.B. TNF- $\alpha$ ) nicht immer automatisch zur Reaktivierung. Aufgrund dessen schlagen Kurz und

Reddehase eine induzierte Reaktivierung mit mehreren Kontrollpunkten vor (Kurz and Reddehase, 1999). Das erste Signal, das für die Aktivierung der Transkription der *ie1*- und *ie3*-Genregion benötigt wird, ist die Bindung eines Transkriptionsfaktors an den MIEP. Neuere Daten von Busche und Kollegen zeigen allerdings, dass das MCMV *ie1*-Gen weder für die Latenz-Etablierung noch für die Reaktivierung benötigt wird (Busche et al., 2009). Das 2. Signal ist entscheidend daran beteiligt die Inhibition des *ie3*-Spleißvorgangs aufzuheben. Eine Hemmung der *ie3*-RNA-Prozessierung wird angenommen, weil *ie1*- und *ie2*-Transkripte auch während der Latenz detektiert werden, aber keine *ie3*-Transkripte nachweisbar sind. Da aber auch die Präsenz von *ie3*-Transkripten (und sogar von gB) nicht zwingend zu einer produktiven Infektion mit infektiösen Viruspartikeln führt, muss es noch weitere Kontrollpunkte im Anschluss an die *ie*-Transkription geben, die für eine vollständige Reaktivierung überwunden werden müssen (Kurz and Reddehase, 1999).

## 1.2 Das Immunsystem und die Erkennung von Pathogenen

### 1.2.1 Das angeborene und das erworbene Immunsystem

Das Immunsystem wird klassischerweise in eine unspezifische, angeborene (*innate*) und eine spezifische, erworbene (*adaptive*) Immunantwort unterteilt. Nur die Kombination beider Immunantworten gewährleistet einen effizienten Schutz gegenüber Pathogenen. Da im Rahmen dieser Doktorarbeit Virus-Wirt-Interaktionen während der Phase der angeborenen Immunität untersucht wurden, wird auf die adaptive Immunantwort nur kurz (und unvollständig) eingegangen.

Wie die englische Bezeichnung für das erlernte Immunsystem (*adaptive immunity*) schon erkennen lässt, ist diese Immunität sehr anpassungsfähig und bildet ein Gedächtnis aus. Diese Anpassungsfähigkeit beruht auf der somatischen Hypermutationen (Insertion von Mutationen in die Gene einer reifenden B-Zelle) und der somatischen V(D)J Rekombination. Die V(D)J Rekombination erfolgt bei der Generierung von Immunglobulin (Antikörper)-produzierenden B-Zellen und von T-Zell-Rezeptoren. Im Rahmen der V(D)J Rekombination werden bestimmte Gensegmente (*Variable, Diverse, Joining*) beinahe zufällig miteinander kombiniert, wodurch aus einer relativ kleinen Anzahl an Genen eine Vielzahl von unterschiedlichen Antigen-Rezeptoren generiert wird. Da diese gewollte genetische Rekombination und die damit einhergehende Veränderung der Erbinformation in den

proliferierenden Zellen irreversibel ist, erhalten alle Tochterzellen, welche aus dieser Mutterzelle hervorgehen, dieselbe klonotypische Rezeptor-Spezifität (Murphy, 2011). Im Falle einer Infektion erkennen die Zellen, die diese spezifischen Rezeptoren aufweisen (Antikörper-produzierende B-Zellen, T-Helferzellen ( $CD4^+$ ) und cytotoxische T-Zellen ( $CD8^+$ )), Antigene auf Antigen-präsentierenden Zellen (Dendritische Zellen, Makrophagen). Da diese pathogenspezifischen Zellen bei einer Primärinfektion zunächst aktiviert, vermehrt und zum Ort der Infektion wandern müssen, greifen die Abwehrmechanismen der adaptiven Immunität erst in einer späteren Phase der Infektion. Der Vorteil der adaptiven Immunabwehr besteht somit in der spezifischen Erkennung von Pathogenen, aber auch in der Bildung von sogenannten B- bzw. T-Gedächtniszellen (*memory B-/T-cells*), die bei einer erneuten Infektion mit demselben Erreger nach einer kurzen Vermehrungsphase schnell einsatzbereit sind. Durch die Generierung der *memory*-Zellen wird die lebenslange Immunität gegen bereits durchgemachte Infektionen gewährleistet (Murphy, 2011).

Während der ersten Phase einer Infektion, in denen die Abwehrmechanismen der adaptiven Immunantwort noch nicht greifen, spielt die angeborene Immunität eine essentielle Rolle und wird deswegen auch oft als "*first line of defense*" bezeichnet. Ohne die Mechanismen der angeborenen Immunantwort hätten die Pathogene genug Zeit, um sich so stark zu vermehren, dass dies zum Tod des Wirtes führen würde, bevor die adaptive Immunantwort überhaupt einsatzbereit ist.

Die angeborene Immunität basiert auf der Erkennung von Pathogenen durch nicht anpassungsfähige, Keimbahn-kodierte Rezeptoren. Diese Rezeptoren (*pattern recognition receptors* (PRR)) detektieren konservierte molekulare Strukturen, die viele Pathogene gemeinsam haben (*pathogen-associated molecular pattern* (PAMP)) (Murphy, 2011), wie beispielsweise die Lipopolysaccharide (LPS) von Gram-negativen Bakterien. Die PRRs sind dadurch in der Lage, zelleigene (selbst) von zellfremden (nicht selbst) Molekülen zu unterscheiden. Die Bindung eines PAMPs (Ligand) an einen PRR führt zur Aktivierung von proinflammatorischen Signaltransduktionskaskaden, welche die Expression von Effektorgenen (wie z.B. Zytokine) einleiten. Außerdem wird durch die PRR-vermittelte Signaltransduktion die Reifung von Dendritischen Zellen (DCs) induziert, was wiederum essentiell für die Aktivierung der adaptiven Immunabwehr ist. DCs sowie Makrophagen sind in der Lage, Pathogene zu phagozytieren und zu lysieren, um deren Antigene anschließend

den Zellen der adaptiven Immunität zu präsentieren. Durch diesen instruktiven Prozess wird die Differenzierung der naiven B- und T-Zellen zu Effektor/Gedächtnis-B- und T-Zellen sowie deren Vermehrung induziert (Murphy, 2011).

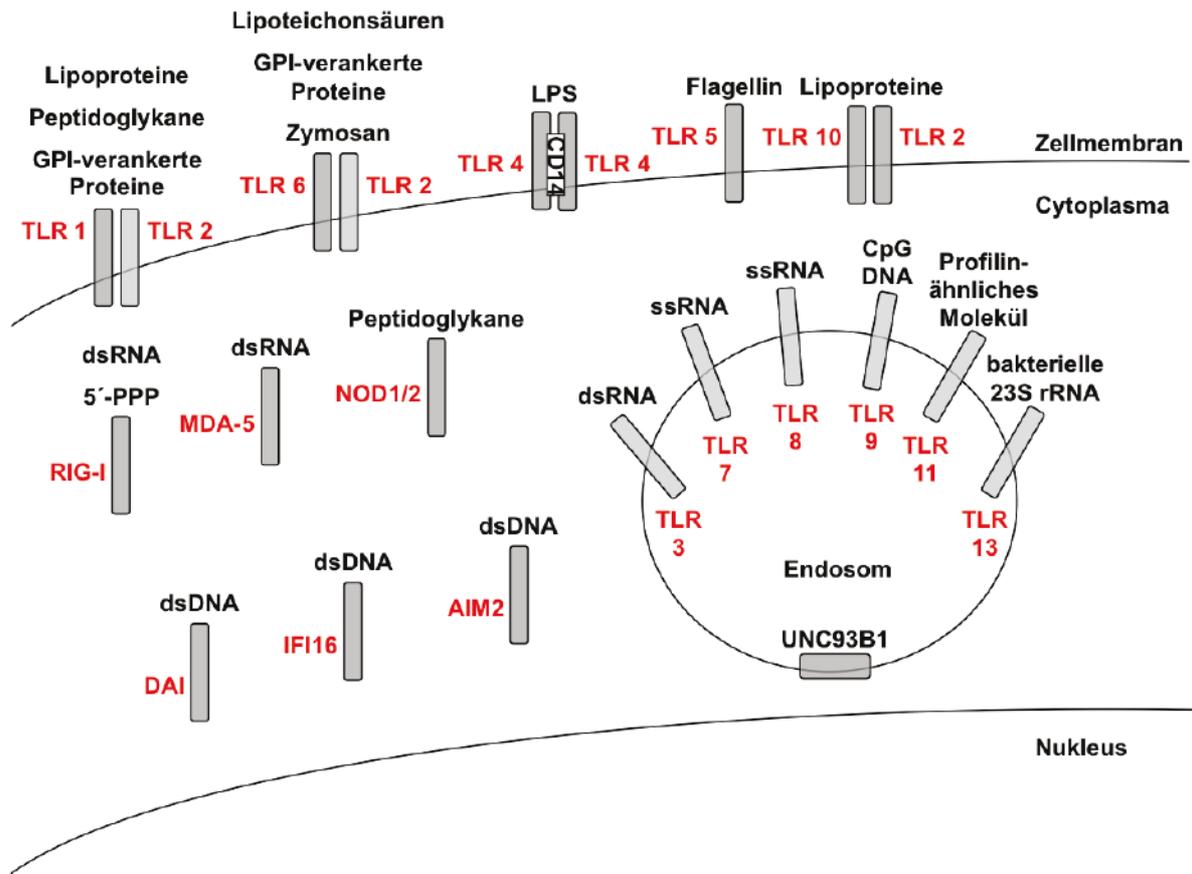
### 1.2.2 Erkennung von Pathogenen

Die PRRs werden in zwei Gruppen unterteilt: die Toll-*like*-Rezeptoren (TLR) und die nicht-Toll-*like*-Rezeptoren (*non*-TLRs). Der erste Toll-Rezeptor wurde ursprünglich in *Drosophila melanogaster* identifiziert (Lemaitre et al., 1996). Die Säuger-Homologe wurde daraufhin als Toll-*like* Rezeptoren bezeichnet. Der erste humane Toll-*like* Rezeptor (heute TLR 1) wurde 1994 auf dem Chromosom 4p14 entdeckt (Nomura et al., 1994; Taguchi et al., 1996). Mittlerweile sind 10 humane (TLR 1-10) und 12 murine (TLR 1-9 und 11-13) TLRs beschrieben, wobei die TLRs 1-9 konserviert sind (Abbildung 1.4) (Kawai and Akira, 2010).

TLRs sind Transmembranproteine und bestehen aus der extrazellulären Ektodomäne (vermittelt Avidität zu den PAMPs), der Transmembrandomäne (Membranverankerung des TLRs) und der intrazellulären Toll-Interleukin (IL)-1 Rezeptor (TIR)-Domäne (Interaktion mit *downstream* Adapter-Proteinen). UNC93B1 ist ein Transmembran-Protein, das im Endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert ist. Es interagiert mit den TLRs 3, 7, 9 sowie 11 und reguliert deren Transport vom ER zum Endosom (Brinkmann et al., 2007; Kim et al., 2008; Pifer et al., 2011; Tabeta et al., 2006).

Zu den *non*-TLRs gehören die dsRNA-erkennenden RIG-I-*like* Rezeptoren RIG-I (*retinoic acid inducible gene 1*) und MDA-5 (*melanoma differentiation-associated protein 5*). Die von RIG-I- und MDA-5-induzierten Signalwege werden über das Adaptermolekül MAVS (auch bekannt als IPS-1/Cardif/VISA) vermittelt und führen zur IRF-3 (*Interferon regulatory factor 3*)- und NF- $\kappa$ B (*nuclear factor  $\kappa$ B*)-Aktivierung (Kawai et al., 2005; Meylan et al., 2005; Seth et al., 2005; Xu et al., 2005).

Eine weitere sehr umfangreiche Untergruppe der *non*-TLRs sind die cytoplasmatischen NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*)-*like* Rezeptoren. Die NOD-*like* Rezeptoren werden aufgrund zusätzlich vorhandener Domänen (wie z.B. eine CARD- oder eine Pyrin-Domäne) weiter untergliedert. NOD1 und NOD2 sind Mitglieder der NLRC (*NOD-like receptor containing a CARD domain*)-Untergruppe und erkennen z.B. bakterielle Peptidoglykane (Elinav et al., 2011).



**Abbildung 1.4** Zelluläre Lokalisation der *pattern recognition* Rezeptoren mit den jeweiligen PAMPs.

Die TLRs (rot) 1, 2, 4, 5, 6 und 10 werden auf der Zelloberfläche präsentiert (Kawai and Akira, 2010). Nach erfolgter Rezeptor/Ligand-Interaktion sind die TLRs 3, 7, 8, 9, 11 und 13 im Endosom lokalisiert. Die TLRs 1-9 sind im humanen und im murinen Genom konserviert. Ein funktioneller TLR 10 wird von der Maus nicht synthetisiert, da die Sequenz durch eine retrovirale Insertion unterbrochen ist (Pseudogen) (Chuang and Ulevitch, 2001). Die TLRs 11-13 sind in der murinen Sequenz identifiziert worden. Im humanen Genom ist deren Sequenz nicht präsent (Oldenburg et al., 2012; Yarovinsky et al., 2005). Für TLR 12 ist sowohl die Lokalisation als auch der Ligand unbekannt (deshalb in der Abb. 1.4 nicht dargestellt). UNC93B1 ist ein Transmembran-Protein, das mit den TLRs 3, 7, 9 sowie 11 interagiert und deren Transport vom Endoplasmatischen Retikulum zum Endosom reguliert. Zu den *non*-TLR PRRs (rot) gehören die cytosolischen Rezeptoren RIG-I und MDA-5 (RIG-I-like Rezeptoren), IFI16 und AIM2 (AIM2-like Rezeptoren), die Familie der NOD-like Rezeptoren (hier exemplarisch NOD1 und 2) und DAI.

Zu den PRRs gehört außerdem die Familie der AIM2-like Rezeptoren, welche AIM2 (*absent in melanoma 2*) und IFI16 (auch bekannt als *gamma-interferon-inducible protein* IFNGIP1) einschließt. Beide Sensoren erkennen dsDNA und sind Interferon-induzierbare Mitglieder der HIN-200 Familie (Fernandes-Alnemri et al., 2009; Unterholzner et al., 2010). Das Maus Ortholog von IFI16 ist p204. Eine MCMV-Infektion induziert die Expression von p204 (Hertel et al., 1999; Rolle et al., 2001). In dominant-negativen p204-Zellen ist die MCMV DNA-Synthese aufgrund einer

verzögerten p1E1- und DNA-Polymerase-Expression signifikant langsamer. Zudem kann MCMV den Zellzyklus in p204-negativen Zellen nicht in der G<sub>1</sub>-Phase stoppen. Dies deutet darauf hin, dass MCMV p204 nutzt, um den Zellzyklus zu regulieren und um seine eigene DNA-Synthese zu beschleunigen (Hertel et al., 1999; Rolle et al., 2001).

Ein ebenfalls cytoplasmatisch-lokalisierter dsDNA-Sensor ist DAI (*DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors*; auch DLM-1 oder ZBP1 [*Z-DNA binding protein 1*] genannt). DAI rekrutiert TBK-1 (*TANK-binding kinase*) und IRF-3 (*Interferon regulatory factor 3*) oder RIP1 sowie RIP3 (*receptor-interacting binding kinase 1* bzw. 3) und induziert somit entweder die phosphorylierungsabhängige Aktivierung des IRF-3- (Takaoka et al., 2007; Wang et al., 2008) oder des NF- $\kappa$ B-Signalwegs (Kaiser et al., 2008; Rebsamen et al., 2009).

Nachfolgend wird auf die PRRs und Signaltransduktionsmechanismen eingegangen, die bei der Erkennung von CMV eine Rolle spielen. Es ist bekannt, dass bereits das *attachment* und das *entry* des viralen Partikels zur Aktivierung von proinflammatorischen Signaltransduktionswegen führen. So konnte nachgewiesen werden, dass lösliches Glykoprotein gB und gH von HCMV zu einer rezeptorabhängigen Induktion von *Interferon-stimulated genes* (ISG) wie ISG54 oder OAS (2´-5´-Oligoadenylat-Synthetase) führt (Boyle et al., 1999; Yurochko et al., 1997). Zellen, die mit gB behandelt wurden, wiesen dabei ein sehr ähnliches Transkriptionsprofil auf wie Zellen, die mit HCMV infiziert wurden (Simmen et al., 2001) und sowohl eine HCMV-Infektion als auch die Behandlung mit löslichem gB führt zur Aktivierung von IRF-3 und letztlich zur Expression von IFN- $\beta$  (Boehme et al., 2004).

UV-inaktiviertes aber auch replikationskompetentes HCMV induziert eine TLR 2-abhängige und NF- $\kappa$ B-vermittelte Zytokin-Expression (z.B. Interleukin-6 und -8) (Compton et al., 2003). Die Zytokin-Initiation wird dabei in Anwesenheit von dem Korezeptor CD14 verstärkt. TLR 2-defiziente Zellen induzieren nach einer HCMV-Infektion kein IL-6 mehr. Da die Zytokin-Produktion unabhängig von der viralen Replikation induziert wird, deutet dies darauf hin, dass TLR 2 in Kombination mit CD14 *envelope*-Proteine des Virus-Partikels erkennt (Compton et al., 2003).

Hinsichtlich der Rolle von TLR 3 bei der CMV-Erkennung gibt es kontroverse Daten. Während Tabeta et al. erhöhte Virus-Titer in TLR 3-defizienten Mäusen nachweisen

konnte, führte der Verlust von TLR 3 in einer späteren *in vivo* Studie von Delale et al. zu keiner gesteigerten Viruslast (Delale et al., 2005; Tabeta et al., 2004).

Im Gegensatz dazu wurde die TLR 9-abhängige MCMV-Erkennung von mehreren Arbeitsgruppen beobachtet. Daten von Tabeta et al. zeigen, dass eine MCMV-Infektion den TLR 9-abhängigen und MyD88 (*Myeloid differentiation primary response gene 88*)-vermittelten Signaltransduktionsweg induziert (Tabeta et al., 2004). In Übereinstimmung mit diesen Daten wurden in TLR 9- und MyD88-defizienten Mäusen höhere Virus-Titer als in wt-Mäusen detektiert (Delale et al., 2005; Krug et al., 2004).

Das UNC93B-Transmembran-Protein reguliert den Transport der TLRs 3, 7, 9 und 11 vom ER zum Endosom und ist deshalb entscheidend an der Funktionalität dieser PRRs beteiligt. In Mäusen, die eine Mutation innerhalb des UNC93B-Gens aufweisen, kommt die TLR 3-, 7- und 9-vermittelte Signaltransduktion zum Erliegen. Entsprechend konnte eine erhöhte Sterblichkeit bei diesen Mäusen nach einer MCMV-Infektion nachgewiesen werden (Tabeta et al., 2006).

Neuere Daten zeigen, dass der cytoplasmatische dsDNA-Sensor DAI essentiell für die HCMV-induzierte IRF-3-Aktivierung und die IFN- $\beta$ -Expression ist. Die Überexpression von DAI resultiert in einer Inhibition der HCMV-Replikation (DeFilippis et al., 2010). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass HCMV dsDNA von DAI als PAMP erkannt wird.

Außerdem könnten die NOD-like Rezeptoren und AIM2 an der CMV-bedingten IFN-Induktion beteiligt sein, da ihre Deletion in geringerer IFN- $\alpha$ - bzw. IFN- $\beta$ -Expression resultiert (Kuenzel et al., 2010; Rathinam et al., 2010).

### 1.2.3 Induktion der Interferon-Expression

Interferone sind pleiotrope Zytokine, die infolge der Erkennung eines Pathogens produziert und sekretiert werden. Sie wirken hauptsächlich als Botenmoleküle, die eine erhebliche Veränderung des zellulären Transkriptomprofils auslösen und dadurch zur Induktion der angeborenen Immunität und zur Stimulation der adaptiven Immunantwort führen. IFNs werden aufgrund von strukturellen Homologien, der Verwendung spezifischer Rezeptorkomplexe und der biologischen Aktivität in drei Gruppen unterteilt: Typ I IFN (alle IFN- $\alpha$ -Subtypen, IFN- $\beta$ , IFN- $\epsilon$ , IFN- $\kappa$  und IFN- $\omega$ ), Typ II IFN (IFN- $\gamma$ ) und Typ III IFN (IFN- $\lambda$  1-3 auch bekannt als IL-28A, IL-28B und

IL-29) (Donnelly and Kotenko, 2010; Kotenko et al., 2003; Pestka, 1987; Samuel, 2001; Sheppard et al., 2003; Trilling et al., 2012). Obwohl die Typ I und Typ III Interferone an verschiedene Rezeptorkomplexe (IFNAR1/2 resp. IL28R $\alpha$ /IL10R $\beta$ ) binden, aktivieren sie die gleiche intrazelluläre JAK-STAT-Signaltransduktionskaskade und induzieren eine ähnliche transkriptionelle Antwort (Kotenko et al., 2003; Sheppard et al., 2003). Typ I und Typ III IFNs weisen eine starke intrinsische antivirale Aktivität auf und sind in der Lage einen antiviralen Status in einem breiten Spektrum von Zellen zu induzieren (Donnelly and Kotenko, 2010; Levy and García-Sastre, 2001; Samuel, 2001). IFN- $\gamma$  stimuliert die Zell-vermittelten Immunantworten, die entscheidend für den Schutz des Wirtes gegen intrazelluläre Mikroorganismen (z.B. *Mycobacterium tuberculosis*) sind. Zudem spielt IFN- $\gamma$  eine Rolle bei der Entwicklung der anti-Tumor-Immunantworten und es kann die Induktion der antiviralen Aktivität von IFN- $\alpha/\beta$  verstärken (Donnelly and Kotenko, 2010).

Die Interaktion eines PAMPs mit einem PRR führt zur Aktivierung verschiedener Signaltransduktionskaskaden und zur Expression proinflammatorischer Effektorgene. Da sich diese Doktorarbeit mit der Identifikation MCMV-kodierter Interferon (IFN) Antagonisten befasst, werden hier ausschließlich Signalkaskaden beschrieben, die zur Typ I IFN-Induktion führen. Eine stark vereinfachte Übersicht dieser Signaltransduktionskaskaden ist in Abbildung 1.5 dargestellt.

Die Signaltransduktionswege werden aufgrund der Rekrutierung von spezifischen cytoplasmatischen Adaptermolekülen durch die PRRs in einen sogenannten MyD88 (*myeloid differentiation primary response gene 88*)- oder TRIF (*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$* )-vermittelten Signalweg unterteilt. MyD88 wird von allen TLRs außer TLR 3 genutzt. Nach der initialen Aktivierung von MyD88 rekrutiert dieses verschiedene IRAKs (*IL-1 receptor-associated kinases*). Die IRAK-Aktivierung führt zu deren Interaktion mit TRAF6 (*TNF receptor associated factor*), einer E3-Ligase. TRAF6 katalysiert die Synthese von Polyubiquitinketten, die zur Aktivierung des TAK1 (*Transforming growth factor beta-activated kinase 1*)-Kinase-Komplexes führen (Kanayama et al., 2004; Ordureau et al., 2008). Polyubiquitinketten oder lineare Di-Ubiquitine (Rahighi et al., 2009) binden auch an die Ubiquitin-Binde-Domäne von NEMO (*Nuclear factor-kappa B essential modulator*), einer essentiellen regulatorischen Komponente des IKK ( $\text{I}\kappa\text{B}$ -Kinase)-Komplexes.

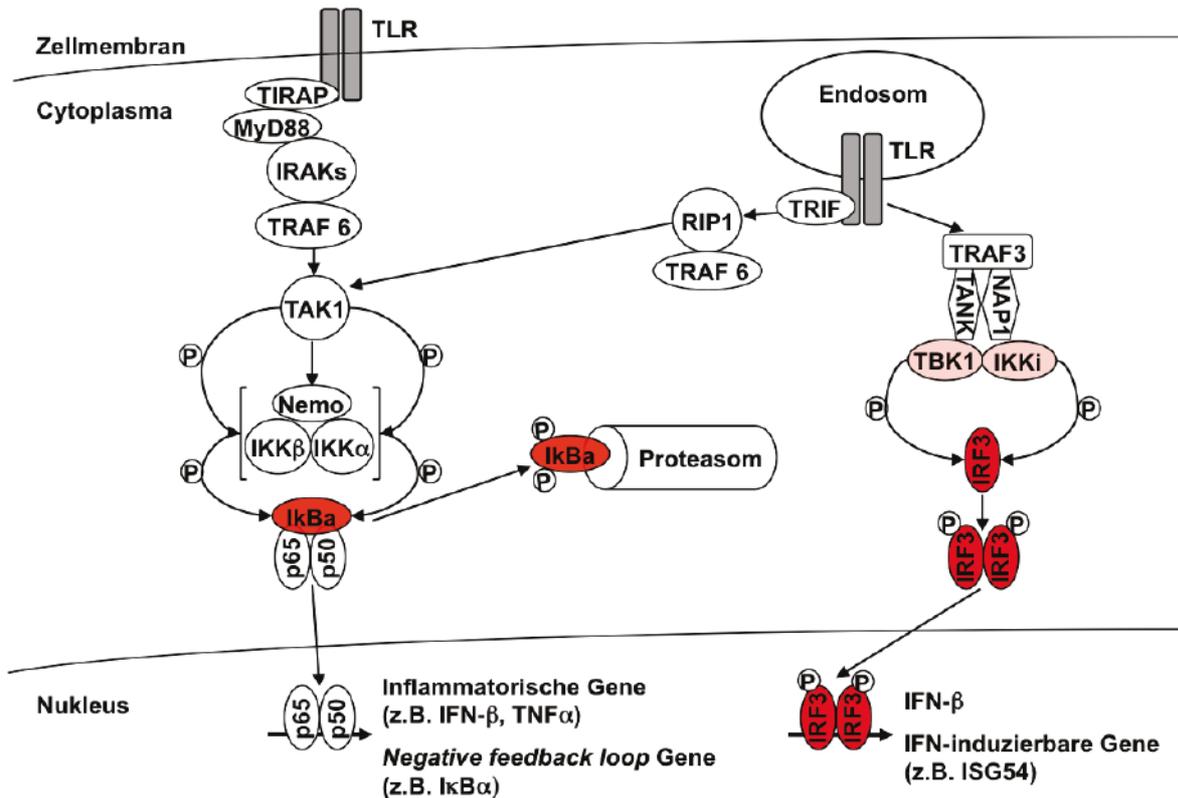


Abbildung 1.5 Vereinfachte Darstellung der Signalwege, die zur Typ I IFN-Induktion führen.

Die ausführliche Beschreibung der einzelnen Moleküle, Abkürzungen und Aktivierungsschritte erfolgt im Text. Farblich rot hervorgehoben sind die Moleküle, die für das Verständnis des Ergebnis-Teils eine Rolle spielen.

Hinsichtlich der IKK $\beta$ -Aktivierung gibt es zwei verschiedene Hypothesen. Entweder wird TAK1 durch die Polyubiquitinierung von TAK1 und NEMO in räumliche Nähe zu IKK $\beta$  gebracht und ist dadurch in der Lage, IKK $\beta$  zu phosphorylieren, oder es erfolgt eine LUBAC (*linear ubiquitin chain assembly complex*)-vermittelte Ubiquitinierung von NEMO. LUBAC ist eine E3-Ligase, die lineare Ubiquitin-Ketten bildet. Aktiviertes IKK $\beta$  wiederum phosphoryliert I $\kappa$ B $\alpha$  (*Inhibitor of  $\kappa$ B  $\alpha$* ), welches dadurch ubiquitiniert und proteasomal degradiert wird (Karin and Ben-Neriah, 2000). I $\kappa$ B $\alpha$  inhibiert (im unphosphorylierten/inaktiven Zustand) den NF- $\kappa$ B-Komplex durch Maskierung des *nuclear localization signals* (NLS), wodurch der Transkriptionsfaktor im Cytoplasma zurückgehalten wird. Durch den proteasomalen I $\kappa$ B $\alpha$ -Abbau ist das Rel/NF- $\kappa$ B-Homo/Hetero-Dimer (z.B. p50 und p65/RelA) in der Lage, in den Zellkern zu translozieren und durch Bindung an  $\kappa$ B-sites innerhalb bestimmter Promotoren die Expression von Effektorgenen, wie IFN- $\beta$  oder TNF- $\alpha$ , aber auch von negativen Rückkopplungsgenen (*negative feedback loop*), wie I $\kappa$ B $\alpha$ , zu induzieren (Chen and Ghosh, 1999). Durch den *negative feedback loop* und die damit einhergehende Expression von I $\kappa$ B $\alpha$  wird die NF- $\kappa$ B-Aktivität nach Elimination des NF- $\kappa$ B-Stimulus

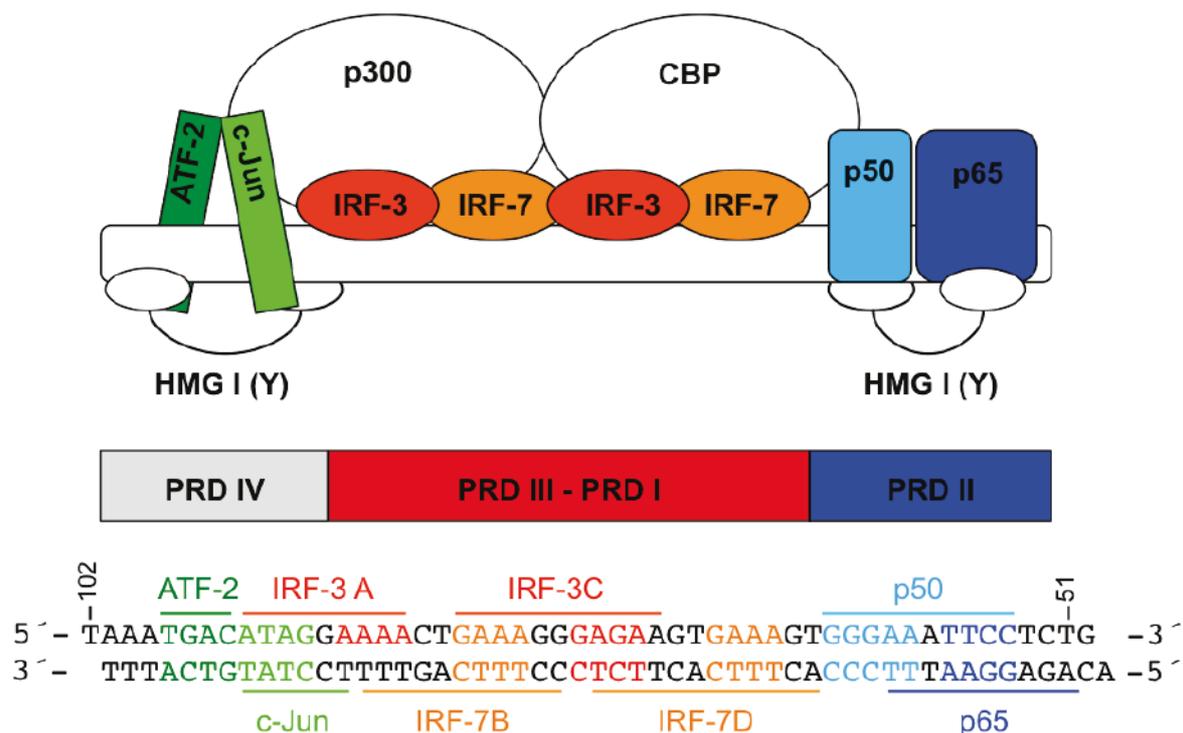
gehemmt und dadurch reguliert. Somit kann das  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Protein experimentell als Indikator für den Aktivierungszustand des NF- $\kappa$ B-vermittelten Signaltransduktionswegs genutzt werden.

Der TRIF-vermittelte Signalweg kann sowohl eine NF- $\kappa$ B als auch eine IRF-3 (*Interferon regulatory factor 3*)-Aktivierung induzieren. TLR 3 ist der einzige PRR, der ausschließlich den TRIF-vermittelten Signalweg nutzt. Werden von TRIF die Moleküle RIP1 und TRAF6 rekrutiert, mündet dieser Signalweg in der vorher beschriebenen Aktivierung von TAK1 und führt zur Induktion des NF- $\kappa$ B Signalwegs. Die Rekrutierung der Adaptermoleküle TRAF3, NAP1 und TANK hingegen aktiviert die Kinasen TBK1 und IKKi, welche die Phosphorylierung von IRF-3 induzieren. Phosphoryliertes IRF-3 dimerisiert, transloziert in den Zellkern und bindet an Promotoren von IFN-Genen wie IFN- $\beta$  und IFN-induzierter Gene (*Interferon-stimulated genes* (ISG)) z.B. ISG54 (Lin et al., 1998; Mori et al., 2004).

Die Expression des IFN- $\beta$ -Gens wird durch Bindung eines Transkriptions-Enhancer Komplexes, auch Enhanceosom genannt, initiiert. Das Enhanceosom setzt sich aus den Transkriptionsfaktoren, IRF-3 bzw. IRF-7, NF- $\kappa$ B und ATF-2 (*activating transcription factor 2*)/c-Jun sowie dem *high-mobility-group* Protein HMG-I (Y), das eine Funktion in der DNA-Strukturierung ausübt, zusammen (Du et al., 1993; Wathelet et al., 1998; Yie et al., 1999). Der IFN- $\beta$ -Promotor beinhaltet spezifische Bindestellen, sogenannte *positive regulatory domains* (PRD), an welche die aktivierten Transkriptionsfaktoren binden (Abbildung 1.6) (Goodbourn and Maniatis, 1988). PRD I und PRD III werden von IRF-3 bzw. IRF-7 erkannt, die nach erfolgter Dimer-Bildung im Cytoplasma in den Nukleus transloziert sind (Escalante et al., 2007). Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B bindet an PRD II (Chen and Ghosh, 1999; Escalante et al., 2002; Garoufalidis et al., 1994), wohingegen PRD IV von dem Heterodimer ATF-2/c-Jun erkannt wird (Du and Maniatis, 1992; Du et al., 1993; Panne et al., 2004). Die Phosphorylierung und Aktivierung dieses Heterodimers wird durch MAPK (*mitogen activated protein kinases*) ausgeführt (Davis, 2000; Kyriakis and Avruch, 2001). Die MAPK reagieren auf Stress-induzierte Signale wie z.B. proinflammatorische Zytokine, UV-Bestrahlung oder DNA-Schäden (van Dam et al., 1995). c-Jun ist hauptsächlich im Kern lokalisiert. Inaktives ATF-2 zirkuliert zwischen dem Nukleus und dem Cytoplasma, da es sowohl zwei *nuclear localization sequences* (NLSs) als auch ein *nuclear export signal* (NES) aufweist. Erst die

Phosphorylierung und Dimerisierung von ATF-2 und c-Jun hält ATF-2 im Kern und macht den Komplex transkriptionell aktiv (Liu et al., 2006).

Die aktivierten Transkriptionsfaktoren (IRF-3 bzw. IRF-7, NF- $\kappa$ B, ATF-2/cJun) assoziieren im Zellkern mit den Transkriptionskofaktoren CBP (*CREB binding protein*) sowie p300 und induzieren daraufhin synergistisch die IFN- $\beta$ -Transkription (Merika et al., 1998; Yoneyama et al., 1998).



**Abbildung 1.6 Schematische Darstellung des IFN- $\beta$ -Enhanceosoms.**

Die Transkriptionsfaktoren ATF-2 (grün) und c-Jun (hellgrün) binden an PRD IV. IRF-3- (rot) bzw. IRF-7- (orange) Dimere erkennen die PRD III-PRD I-Region des IFN- $\beta$ -Promotors. Das NF- $\kappa$ B-Dimer, bestehend aus p50 (hellblau) und p65/RelA (blau), bindet an PRD II. Die Transkriptionsfaktoren assoziieren im Zellkern mit den Transkriptionskofaktoren CBP (*CREB binding protein*) sowie p300 und induzieren die IFN- $\beta$ -Transkription. Innerhalb der DNA-Sequenz sind die Kern-Bindestellen der Transkriptionsfaktoren mit demselben Farbcode markiert. Modifiziertes Bild basierend auf (Panne, 2008).

IFN- $\beta$  und im murinen System zusätzlich IFN- $\alpha$ 4 sind die beiden ersten Typ I IFN-Subtypen, die in Fibroblasten aufgrund einer Virus-Infektion gebildet werden (Marié et al., 1998). Die anderen IFN- $\alpha$  Subtypen werden in Fibroblasten IFN- $\beta$ -abhängig im Rahmen der positiven Rückkopplung (*positive feedback loop*) hergestellt (Erlandsson et al., 1998). Als Teil des *positive feedback loops* induziert sekretiertes IFN- $\beta$  die Expression von IRF-7, welches durch den bereits stimulierten Signalweg selber

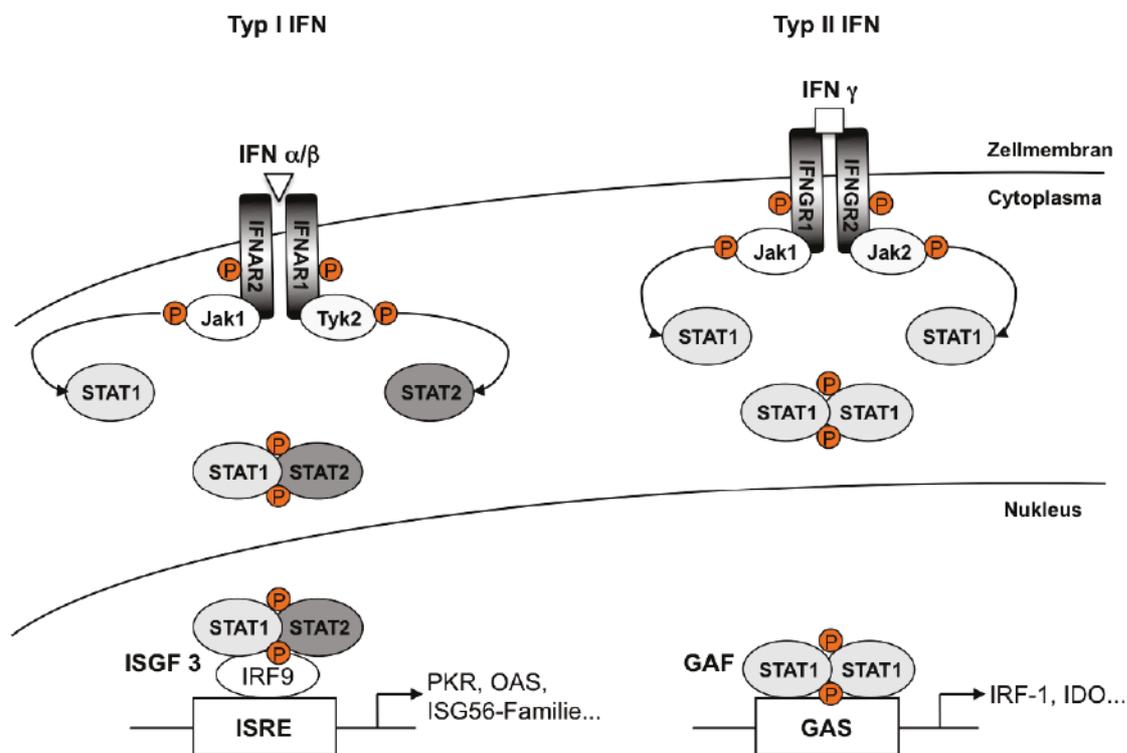
aktiviert wird und dadurch eine fortlaufende Expression von IFN- $\beta$  und IFN- $\alpha 4$  induziert. Der proinflammatorische Zustand der Zelle wird also nicht nur aufrechterhalten, sondern sogar verstärkt.

Die molekularen Mechanismen, die zur IFN- $\gamma$  (Typ II IFN) Induktion führen, werden im Folgenden nur kurz beschrieben. IFN- $\gamma$  wird hauptsächlich von NK (*natural killer*)-Zellen und T-Lymphozyten hergestellt. Inaktive, naive T-Zellen produzieren sehr wenig IFN- $\gamma$ . Die Stimulation von naiven CD8<sup>+</sup>-T-Zellen durch ein Antigen führt zunächst zur Proliferation und zu schwacher klonaler Expansion, aber nicht zur Entwicklung von Effektorfunktionen. Erst die zusätzliche Stimulation durch Interleukin-12 oder IFN- $\alpha$  resultiert in starker Expansion und der Ausbildung der Effektorfunktionen (Mescher et al., 2006). IL-12 spielt dabei eine wichtige Rolle bei der Regulation der Transkriptionsfaktoren T-bet (*T-box transcription factor expressed in T-cells*) und Eomes (Eomesodermin), die wiederum bei der Regulation der IFN- $\gamma$ -Expression entscheidend sind (Ansel et al., 2006; Intlekofer et al., 2005; Mullen et al., 2001; Pearce, 2003; Rengarajan et al., 2000; Szabo et al., 2000; 2002; Takemoto et al., 2006; Zheng and Flavell, 1997). Mehrere Arbeitsgruppen haben *conserved non-coding sequences* (NCS) im IFN- $\gamma$  Promotor identifiziert, die upstream des IFN- $\gamma$  Gens lokalisiert sind und für die IFN- $\gamma$  Expression wichtig sind (Hatton et al., 2006; Shnyreva et al., 2004).

#### 1.2.4 IFN-Signaltransduktion

Sekretiertes IFN induziert autokrin und parakrin eine Signalkaskade, die als JAK-STAT-Signalweg bekannt ist. Die Typ I Interferone binden an den IFN-alpha Rezeptor (IFNAR) und die Typ II Interferone an den IFN-gamma Rezeptor (IFNGR) (Abbildung 1.7). Der IFNAR-Komplex besteht aus zwei Transmembran-Rezeptorketten, IFNAR1 und 2, die mit den Kinasen Tyk2 (Tyrosinkinase 2) und Jak1 (Januskinase 1) assoziiert sind. Die Bindung von Typ I IFN an den Rezeptor aktiviert den Rezeptor-Komplex und führt zur Rekrutierung und Phosphorylierung von *signal transducer and activator of transcription* (STAT)1 und 2 (Fu, 1992; Improta et al., 1994; Shuai et al., 1993a). Anschließend heterodimerisiert STAT1 mit STAT2 und IRF-9 (auch ISGF3 $\gamma$  oder p48 genannt) wird rekrutiert (Veals et al., 1992). Der Heterotrimer-Komplex aus STAT1:STAT2:IRF-9 wird als *Interferon-stimulated gene factor 3* (ISGF 3) bezeichnet. ISGF 3 transloziert in den Nukleus und bindet an

Promotorelemente, die *Interferon-stimulated response elements* (ISRE) genannt werden. Die Bindung von ISGF3 an ISRE-sites (Konsensus-Motiv AGTTTN<sub>3</sub>TTTC) induziert die Expression von ISGs wie beispielsweise die Proteinkinase R (PKR), 2'-5'-Oligoadenylat-Synthetasen (OAS) oder die ISG56-Familie (siehe Abschnitt 1.2.5). IFN- $\gamma$  bindet an den IFNGR, der ebenfalls aus zwei Rezeptorketten (IFNGR1 und 2) besteht (Aguet et al., 1988; Gray et al., 1989; Hemmi et al., 1994; 1989; Munro and Maniatis, 1989). Die Januskinase Jak1 ist mit dem IFNGR1 präassoziiert und Jak2 wird nach der Ligandbindung vom IFNGR 2 rekrutiert (Müller et al., 1993; Sakatsume et al., 1995; Shuai et al., 1993b; Silvennoinen et al., 1993; Watling et al., 1993). Die Bindung von IFN- $\gamma$  an den IFNGR induziert die Phosphorylierung von Jak1, Jak2, den Rezeptorketten und STAT1 (Igarashi et al., 1994). Aktivierte STAT1 Moleküle homodimerisieren und bilden den *gamma activated factor* (GAF) (Decker et al., 1991; Shuai et al., 1993b). Dieser transloziert in den Zellkern und initiiert durch Bindung an Promotor-Elemente, die *gamma activated sequences* (GAS; Konsensus-Sequenz: TTCNNNA) genannt werden, die Expression von Zielgenen wie beispielsweise IRF-1 oder IDO.



**Abbildung 1.7 Schematische Darstellung der IFN-induzierten JAK-STAT-Signalwege.**

Die von Typ I IFN (IFN- $\alpha$  bzw. - $\beta$ ) initiierte Signalkaskade ist links, die von Typ II IFN (IFN- $\gamma$ ) induzierte Kaskade ist rechts dargestellt. Die Abfolge der Ereignisse und die Abkürzungen sind im Text ausführlich beschrieben.

### 1.2.5 Interferon-induzierte Effektorgene

Wie bereits in Abschnitt 1.2.4 erwähnt, resultiert die Aktivierung der JAK-STAT-Signaltransduktionskaskaden in der Expression von *Interferon-stimulated genes* (ISGs), welche die (antiviralen) Effektormechanismen vermitteln. Abhängig vom Zelltyp und der Dauer der IFN-Behandlung werden zwischen 120 und 300 Wirtsgene direkt durch IFN reguliert (de Veer et al., 2001; Der et al., 1998). Die eminente Bedeutung der antiviralen IFN-vermittelten Immunantwort wird durch *in vivo* Experimente mit *knockout*-Mäusen, in denen Komponenten des IFN-Systems spezifisch deletiert wurden, deutlich. Mäuse, denen der IFNGR fehlt, sind ca. 5-fach anfälliger für eine tödlich verlaufende MCMV Primärinfektion als wt-Mäuse. IFNAR-defiziente Mäuse weisen eine 100-fach erhöhte und IFNAR/IFNGR-Doppel-*knockout*-Mäuse sogar eine  $10^5$ -fach höhere Suszeptibilität gegenüber einer MCMV-Infektion auf (Gil et al., 2001; Presti et al., 1998).

Aufgrund der Vielzahl der Interferon-induzierten Abwehrmechanismen beschränkt sich der folgende Abschnitt auf die wichtigsten und gut charakterisierten antiviralen Faktoren.

#### 1.2.5.1 Die *Interferon-stimulated gene 56*-Familie

Die ISG56-Familie (auch bekannt als *IFN-induced tetratricopeptide repeats* (IFITs)) umfasst im humanen System vier Mitglieder: ISG56 (IFIT1), ISG54 (IFIT2), ISG60 (IFIT3) und ISG58 (IFIT5) (Chebath et al., 1983; de Veer et al., 1998; Levy et al., 1986; Niikura et al., 1997; Wathelet et al., 1986). In der Maus sind drei Mitglieder beschrieben: ISG56 (IFIT1), ISG54 (IFIT2) und ISG49 (IFIT3) (Bluyssen et al., 1994; Fensterl and Sen, 2011; Sarkar and Sen, 2004). Die ISG56-Familienmitglieder können über den IFN-vermittelten JAK-STAT-Signalweg, aber auch direkt und IFN-unabhängig über die Bindung von PAMPs an PRRs und die damit einhergehende Aktivierung von IRF-1, -3, -5 und -7 induziert werden (Barnes et al., 2004; Bluyssen et al., 1994; Grandvaux et al., 2002; Lou et al., 2009). Hinsichtlich der antiviralen Wirkungsweise der ISG56-Familie gibt es verschiedene Befunde. Frühere Publikationen zeigen, dass das humane ISG54- und ISG56- sowie das murine ISG54- und ISG56-Protein durch die Bindung des Translationsinitiationsfaktors eIF3 die Proteintranslation hemmen (Guo and Sen, 2000; Hui et al., 2003; Terenzi et al., 2006). Später wurden Daten veröffentlicht, die zeigen, dass das mISG54 und mISG56 virale mRNAs erkennt, denen die 2'-O-Methylierung des 5'-Guanosin-Caps fehlt (Daffis et al., 2010) oder die virale Replikation durch 5'-Triphosphate-Bindung

hemmen (hISG54, hISG56, hISG60) (Fensterl et al., 2012; Pichlmair et al., 2011; Schmeisser et al., 2010). Zusätzlich gibt es Daten, die darauf hinweisen, dass ISG56-Familienmitglieder die Apoptose fördern (hISG54), die Zytokin-Produktion regulieren (hISG56) und die Zellmigration inhibieren (hISG54) (Lai et al., 2008; Li et al., 2009; Stawowczyk et al., 2011).

### **1.2.5.2 Die Proteinkinase R (PKR)**

Die PKR ist ein zelluläres Protein, welches eine wichtige Rolle bei der Regulation der Translation spielt. Die PKR-Expression wird vorwiegend über IFN- $\alpha/\beta$  induziert. Die Serin/Threonin-Kinase PKR erkennt dsRNA, die in eukaryotischen Zellen normalerweise nicht vorkommt, aber in Virus-infizierten Zellen generiert wird. Die Bindung von dsRNA bewirkt eine Konformationsänderung, die zur Dimerbildung und Autophosphorylierung führt und die PKR aktiviert (Wu and Kaufman, 1996). Im aktivierten Zustand phosphoryliert die PKR die  $\alpha$ -Untereinheit des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktors eIF2 und verhindert dadurch dessen Recycling. Bedingt durch den Mangel an eIF2, wird die zelluläre Proteintranslation und damit auch die virale Proteinsynthese und Replikation gestoppt (Clemens and Elia, 1997; Wu and Kaufman, 1996). Zudem induziert die PKR die Stress-bedingte Apoptose über den FADD-vermittelten Signalweg (Balachandran et al., 1998; Der et al., 1997).

### **1.2.5.3 Das 2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase (OAS)-RNase L System**

Die OAS wird durch Typ I IFN induziert und durch dsRNA aktiviert. Aktivierte OAS nutzt Adenosin-Triphosphate und katalysiert die Synthese von Oligoadenylaten, die über eine unübliche 2'-5'-Verbindung verknüpft sind (Kerr and Brown, 1978). Die 2'-5'-Oligoadenylate werden durch die monomere Form der Endonuclease L (RNase L) erkannt, wodurch diese dimerisiert und aktiviert wird (Jacobs and Langland, 1996). Aktivierte RNase L schneidet cytoplasmatische Einzelstrang-RNA, d.h. mRNA und tRNA, wodurch letztlich die Proteintranslation und -synthese gehemmt wird (Player and Torrence, 1998). Die 2'-5'-Nukleinsäuren sind sehr instabil. Deshalb ist die Aktivierung der RNase L von der lokalen Anwesenheit aktivierter OAS abhängig. Dieser Mechanismus gewährleistet einen bevorzugten Abbau viraler Transkripte, welche sich häufig in der Nähe von dsRNA befinden, die wiederum von OAS erkannt wird (Nilsen and Baglioni, 1979). Das 2'-5'-OAS-RNase L-System ist somit in der Lage, virale und zelluläre mRNA zu unterscheiden.

#### **1.2.5.4 IFN-induzierte Apoptose**

Typ I IFN-behandelte Zellen, die mit einem Virus infiziert werden, induzieren häufig Apoptose. Entscheidend für diese IFN- und Virus-induzierte Apoptose sind mehrere und vermutlich überlappende Mechanismen. Beispielsweise induziert die MDA5-vermittelte PKR-Aktivierung den FADD/Caspase-8 Todessignalweg (*death signaling pathway*) (Balachandran et al., 1998; 2000). Das Tumorsuppressor-Gen p53 spielt vermutlich ebenfalls eine Rolle bei der Virus-induzierten Apoptose. p53 ist aufgrund eines ISRE-Motivs im Promotor über Typ I IFN-vermittelte Signalkaskaden induzierbar. p53-defiziente Zellen sind nicht mehr in der Lage, aufgrund einer VSV-Infektion Apoptose zu initiieren. Zudem sind p53 *knockout*-Mäuse *in vivo* äußerst suszeptibel für eine VSV-Infektion (Takaoka et al., 2003). Für IFN- $\gamma$  wurde berichtet, dass es durch eine Induktion der Fas- und Fas-Ligand-Expression Apoptose induzieren kann (Xu et al., 1998).

#### **1.2.6 Virale Immunevasion**

Das Immunsystem immunkompetenter Wirte ist ein hochentwickeltes Netzwerk verschiedenster Effektormechanismen, welches Pathogene, wie z.B. Viren, trotz deren Eindringen in den Wirtsorganismus kontrolliert und idealerweise sogar eliminiert. Da Viren für ihre Replikation und Vermehrung die zelluläre Maschinerie des Wirtes benötigen, müssen sie zumindest so lange in der Wirtszelle überleben, bis ein Replikationszyklus durchlaufen ist. Dazu müssen die Viren zunächst intrinsische Resistenz-Mechanismen (z.B. PML, Daxx), im Anschluss die angeborene Immunität mit dem dazugehörigen IFN-System und letztlich die adaptive Immunität überwinden. Aufgrund der Koevolution von Pathogenen und ihren Wirten, die zum Teil vor Millionen von Jahren begann und bis heute andauert, haben Viren und andere Pathogene ihrerseits Evasionsmechanismen entwickelt, um das Immunsystem des Wirtes zu unterlaufen bzw. zu hemmen.

##### **1.2.6.1 Evasionsstrategien verschiedener Viren**

Im Grunde genommen exprimiert jedes Virus mindestens ein Protein, dessen Hauptaufgabe es ist, das Immunsystem des Wirtes zu inhibieren und zu kontrollieren und dadurch die virale Replikation zu begünstigen. Da eine vollständige Aufzählung aller, bisher identifizierter Evasionsmechanismen unmöglich ist, beschränkt sich die Tabelle 1.2 auf einige wenige ausgewählte virale Evasionstrategien, die das IFN-System betreffen (Hengel et al., 2005; Taylor and Mossman, 2012).

	Virus	Virus ORF/Protein	Referenz
Virus-Erkennung	Lassa-Fieber-Virus	Nukleoprotein (NP)	(Hastie et al., 2011)
	Herpes-Simplex-Virus-2 (HSV-2)	<i>virion host shutoff</i> (vhs)	(Yao and Rosenthal, 2011)
	Hepatitis-C-Virus (HCV)	E1E2 ( <i>envelope</i> )	(Eksioglu et al., 2011)
	Hepatitis-C-Virus (HCV)	NS5A (nicht Strukturprotein)	(Tamura et al., 2011)
IFN-Induktion	Hepatitis-A-Virus (HAV)	3 <sup>CD</sup>	(Qu et al., 2011)
	Enterovirus 71	3C	(Lei et al., 2011)
	Hepatitis-B-Virus (HBV)	HBeAg	(Lang et al., 2011)
	Coxsackie-Virus B3	3C <sup>pro</sup>	(Mukherjee et al., 2011)
Transkriptionsfaktoren	Masern-Virus	V-Protein	(Schuhmann et al., 2011)
	Zaire-Ebola-Virus	VP24	(Halfmann et al., 2011)
	Zaire-Ebola-Virus	VP35	(Basler et al., 2003; Prins et al., 2009)
	Varizella-Zoster-Virus (VZV)	ORF61	(Zhu et al., 2011)
	Humanes Immundefizienz-Virus 1 (HIV-1)	Vpr und Vif	(Doehle et al., 2009; Okumura et al., 2008)
	Respiratorisches-Synzytial-Virus (RSV)	NS1	(Ren et al., 2011)
IFN-Signaltransduktion	Vaccinia-Virus (VV)	B18R	(Colamonici et al., 1995; Symons et al., 1995)
	Respiratorisches-Synzytial-Virus (RSV)	NS1 und NS2	(Jie et al., 2011)
	Kaposi-Sarkom-assoziiertes Herpesvirus (KSHV)	vIRF2	(Mutocheluh et al., 2011)
IFN-induzierte Effektor-mechanismen	Vaccinia-Virus (VV)	E3L	(Chang et al., 1992; Perdiguero and Esteban, 2009; Rivas et al., 1998; Romano et al., 1998)
	Influenza-Virus	NS1	(Hale et al., 2008; Li et al., 2006; Min and Krug, 2006; Min et al., 2007)

**Tabelle 1.2 Evasionsstrategien verschiedener Viren.**

Dargestellt sind Evasionstrategien verschiedener Viren, die das IFN-System betreffen. Zur besseren Übersicht erfolgte eine Untergliederung hinsichtlich des viralen Angriffspunkts/Wirkmechanismus wie z.B. Hemmung der Virus-Erkennung.

### 1.2.6.2 Immunevasionsmechanismen der Cytomegaloviren

Trotz vieler Ähnlichkeiten von HCMV und MCMV (siehe Abschnitt 1.1.2 und 1.1.4) gibt es doch Unterschiede zwischen den Viren. Der größte Sequenz-Unterschied befindet sich in den genomischen Termini der CMVs, d. h. in dem Bereich, wo die meisten Gene lokalisiert sind, die an der Immunmodulation beteiligt sind. Dieser

Unterschied ist nicht verwunderlich, da sich die CMVs seit  $10^8$  Jahren in verschiedenen Wirten entwickeln (McGeoch et al., 2000). Dies hat zur Folge, dass die immunmodulatorischen ORFs und ihr genauer Wirkmechanismus zwischen den CMVs oft unterschiedlich ist (Loewendorf and Benedict, 2010). Grundsätzlich sind aber die Immunmechanismen, die von den CMVs gehemmt werden, recht konserviert, d.h. HCMV und MCMV bauen beispielsweise beide STAT2 ab, nutzen dafür aber unterschiedliche ORFs (Le et al., 2008a; Trilling et al., 2011; Zimmermann et al., 2005).

Da im Rahmen dieser Doktorarbeit CMV-Genprodukte identifiziert werden sollen, welche die angeborene Immunität und insbesondere das IFN-System hemmen, werden nachfolgend bereits publizierte CMV-kodierte Antagonisten des IFN-Systems beschrieben. CMV-Gene, die bei der Hemmung der adaptiven Immunantwort eine Rolle spielen, sind unter anderem in den folgenden (Übersichts)artikeln beschrieben (Atalay et al., 2002; Babić et al., 2011; Benedict and Janssen, 2007; Budt et al., 2004; Corrales-Aguilar et al., 2013; Halenius et al., 2011; Hengel et al., 1998; Jonjic et al., 2008; Lenac et al., 2008; Loewendorf and Benedict, 2010; Sinclair, 2008; Sprague et al., 2008; Thäle et al., 1994; Wilkinson et al., 2008).

Einer der frühesten zellulären Immunantwort-Induktionsmechanismen ist die Erkennung eines PAMPs durch einen PRR, wodurch die IFN-Expression initiiert wird. Dabei spielen die Transkriptionsfaktor-Komplexe NF- $\kappa$ B, IRF-3 sowie ATF2/c-Jun eine wichtige Rolle.

Das HCMV IE2-Protein (kodiert von *UL122*, auch bekannt als pIE86 oder pp86) interferiert mit der Induktion von IFN- $\beta$  (Taylor and Bresnahan, 2005). pIE2 hemmt dabei die DNA-Bindung des NF- $\kappa$ B-Transkriptionskomplexes p50:p65 und verringert dadurch die Expression vieler Gene, die eine  $\kappa$ B-Bindestelle im Promotor aufweisen wie z.B. IFN- $\beta$  (Taylor and Bresnahan, 2005; 2006a; 2006b).

Für das HCMV *UL83*-Protein (pp65) wird ebenfalls eine IFN-inhibitorische Funktion diskutiert, da die Infektion mit einer  $\Delta$ *UL83*-Mutante im Vergleich zum wt-Virus unter anderem in einer stärkeren IFN- $\beta$ -Transkription resultierte (Abate et al., 2004; Browne and Shenk, 2003). Weitere Studien belegten allerdings, dass das  $\Delta$ *UL83*-Virus signifikant geringere Mengen der HCMV Proteine pIE2 und pUL82 (pp71) exprimiert. Eine Virus-Mutante, in welcher der *UL83*-ORF nicht deletiert, sondern durch die Insertion eines Stopp-Kodons unterbrochen wurde, zeigte wieder wt-artige

pUL82- und pIE2-Expression und war wieder in der Lage, die IFN- $\beta$ -Induktion zu hemmen (Taylor and Bresnahan, 2006b). Da das IE2-Protein einerseits ein wichtiger Transaktivator der viralen Genexpression ist, andererseits aber auch die NF- $\kappa$ B-Aktivierung hemmt, deuten diese Daten daraufhin, dass zumindest ein Teil des  $\Delta$ UL83-Phänotyps auf die geringere pIE2-Menge zurückzuführen ist. Neueste Erkenntnisse zeigen, dass pUL83 mit IFI16, IFI16b und IFIX (HIN-200-Familien-Mitglieder) koimmunopräzipitiert. pUL83 und IFI16 binden an den HCMV MIEP, wobei IFI16 für eine effiziente *ie*-Genexpression und virale Replikation (bei geringer Infektionsdosis) benötigt wird (Cristea et al., 2010).

Das *UL111a*-Genprodukt (auch virales IL-10 (vIL-10) genannt) besitzt in produktiv-infizierten Zellen eine Größe von 20 kDa. Es wirkt wie das zelluläre IL-10 immunsuppressiv und hemmt die Typ I IFN-Produktion von pDCs (Chang et al., 2009; Kotenko et al., 2000). Eine etwas kleinere Spleißvariante des viralen IL-10 (16 kDa) wurde in latent-infizierten Zellen identifiziert (Jenkins et al., 2004).

Unsere Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass MCMV die initiale Typ I IFN-Expression in Fibroblasten nach einer kurzen Induktionsphase aktiv hemmt (Le et al., 2008b). Die viralen Antagonisten sowie deren zelluläre Zielmoleküle waren zu Beginn dieser Doktorarbeit nicht identifiziert.

Das MCMV *M45*-Genprodukt wurde ursprünglich als Ribonukleotid-Reduktase-Sequenz-Homolog beschrieben (Brune et al., 2001b; Rawlinson et al., 1996). Neuere Studien belegen allerdings, dass pM45 keine Nukleotid-Reduktase-Aktivität aufweist (Lembo et al., 2004), sondern vielmehr an der Inhibition des TNF-Rezeptor 1-, des TLR 3- und des DAI-initiierten Signalwegs beteiligt ist (Mack et al., 2008; Rebsamen et al., 2009; Upton et al., 2008).

Cytomegaloviren interferieren nicht nur mit der IFN-Induktion, sondern auch mit der IFN-Signaltransduktion im JAK/STAT-Signalweg.

Das HCMV IE1-Protein (auch pUL123 oder pp72 genannt) kolokalisiert mit ISGF3, der aus STAT1, STAT2 und IRF-9 besteht. pIE1 kopräzipitiert in nukleären Lysaten stark mit STAT2 und schwach mit STAT1. Die Formation des ISGF3-Komplexes wird von pIE1 nicht gestört. In Anwesenheit des IE1-Proteins konnte eine schlechtere DNA-Bindung des ISGF3 an ISRE-enthaltende Promotoren beobachtet und geringere Mengen an ISGs nachgewiesen werden. Zudem wurde eine pIE1-bedingte Relokalisation von STAT2 in nukleären ND10-Domänen beschrieben (Huh et al.,

2008; Paulus et al., 2006). Für das HCMV-Virus ist außerdem publiziert, dass es Proteine exprimiert, die mit JAK1 (Miller et al., 1998), STAT2 (Le et al., 2008a) und IRF-9 (Miller et al., 1999) interferieren. Die verantwortlichen Gene sind allerdings noch nicht identifiziert.

Das MCMV *M27*-Genprodukt interferiert ebenfalls mit der Signaltransduktion im JAK/STAT-Signalweg. *pM27* wird für die virale Replikation in Fibroblasten *in vitro* nicht benötigt, ist aber für eine effiziente *in vivo* Replikation essentiell (Abenes et al., 2001; Zimmermann et al., 2005). Erste Hinweise für die *pM27*-Beteiligung an der Hemmung der IFN-Signaltransduktion lieferten Experimente mit einem  $\Delta M27$ -Virus. Dabei stellte sich heraus, dass das *M27*-Deletionsvirus *in vitro* annähernd Wildtyp-artig wächst, so lange die Zellen nicht mit IFN behandelt werden (Zimmermann et al., 2005). Zudem konnten nach Infektionen mit dem  $\Delta M27$ -Virus erhöhte ISG-Mengen nachgewiesen werden (Khan et al., 2004). Weitere Analysen ergaben, dass das *M27*-Protein die zelluläre STAT2-Menge reduziert, indem es die STAT2-Halbwertszeit verkürzt. *pM27* rekrutiert dazu den DDB1-Cullin 4A-Komplex (ein Multiprotein E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex) und induziert dadurch eine STAT2-Polyubiquitinierung, wodurch STAT2 proteasomal abgebaut wird (Trilling et al., 2011; Zimmermann et al., 2005). Für MCMV ist zudem beschrieben, dass es mit der Promotor-Assemblierung IFN- $\gamma$ -induzierter Gene interferiert (Popkin et al., 2003).

Zwei IFN-induzierte und durch dsRNA aktivierte Effektormoleküle, die durch CMV-Infektionen gehemmt werden, sind die Proteinkinase R und die 2'5'-Oligoadenylat-Synthetase.

Das HCMV *UL126a*-Protein (auch ORF94 genannt) ist ein nukleäres und Latenz-assoziiertes Protein. Die Anwesenheit des *pUL126a* inhibiert die OAS-Expression, wodurch eine geringere Kapazität bei deren Katalyse der 2'-5'-Oligoadenylat-Formation resultiert. (Kondo et al., 1996; Tan et al., 2011; White et al., 2000).

Sowohl HCMV als auch MCMV kodieren für Inhibitoren der PKR. Die HCMV *IRS1*- und *TRS1*-Genprodukte binden dsRNA und PKR. Durch die Bindung von *pIRS1* und *pTRS1* wird die PKR aus dem Cytoplasma in den Nukleus transportiert, um sie von der cytoplasmatischen dsRNA und ihrem Substrat, dem eIF2 $\alpha$ , zu entfernen (Hakki and Geballe, 2005; Hakki et al., 2006).

Die MCMV *m142*- und *m143*-Genprodukte interagieren miteinander und sind essentiell für die MCMV-Replikation. Indem sie mit der PKR assoziieren, verhindern

sie die PKR-Aktivierung durch dsRNA, die Phosphorylierung des eIF2 $\alpha$  und somit auch das Abschalten der Proteinsynthese (Budt et al., 2009; Valchanova et al., 2006).

### **1.3 Ziel dieser Arbeit**

Das IFN-System als wesentlicher Teil des angeborenen Immunsystems stellt eine der ersten Hürden dar, die ein Virus für eine effiziente Replikation und Vermehrung überwinden muss. Aufgrund dessen haben viele Viren Antagonisten entwickelt, die mit der zellulären IFN-Induktion und den IFN-vermittelten Effektormechanismen interferieren.

Daten unserer Arbeitsgruppe belegen, dass MCMV die Typ I IFN-Expression nach einer nur kurz andauernden initialen Induktionsphase aktiv hemmt (Le et al., 2008b). Die Inhibition des NF- $\kappa$ B-Signalwegs konnte dabei durch eine Verlängerung der I $\kappa$ B $\alpha$ -Halbwertszeit gezeigt werden. Die Hemmung der IRF-3-vermittelten Signalkaskade wurde durch eine geringere nukleäre Akkumulation von phosphoryliertem bzw. dimerisiertem IRF-3 nach einer MCMV-Infektion nachgewiesen (Le et al., 2008b). Da zu Beginn dieser Doktorarbeit weder der Antagonist des NF- $\kappa$ B- noch des IRF-3-Signalwegs bekannt war, sollten im Rahmen dieser Arbeit das bzw. die viralen MCMV-kodierten Genprodukt(e) identifiziert werden, die zur Hemmung der initialen Typ I IFN-Induktion beitragen.

## 2. Ergebnisse

Ausgangspunkt für diese Untersuchungen waren frühere Experimente der Arbeitsgruppe, die zeigten, dass das murine Cytomegalovirus die initiale Typ I IFN-Expression nach einer kurzen Induktionsphase aktiv inhibiert. Durch den Nachweis einer verlängerten Halbwertszeit von  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  (Inhibitor of  $\kappa\text{B}$   $\alpha$ ) konnte belegt werden, dass MCMV die NF- $\kappa\text{B}$  Signalkaskade hemmt. Die Interferenz mit dem IRF-3-vermittelten Signalweg wurde durch eine verminderte nukleäre Akkumulation von phosphoryliertem bzw. dimerisiertem IRF-3 nach MCMV-Infektion belegt. Ferner konnte gezeigt werden, dass die IFN- $\beta$ -Expression, die aufgrund einer Sendai-Virus-Infektion (ein starker IFN- $\beta$ -Stimulus) ausgelöst wird, durch eine Koinfektion mit MCMV inhibiert wird (Le et al., 2008b).

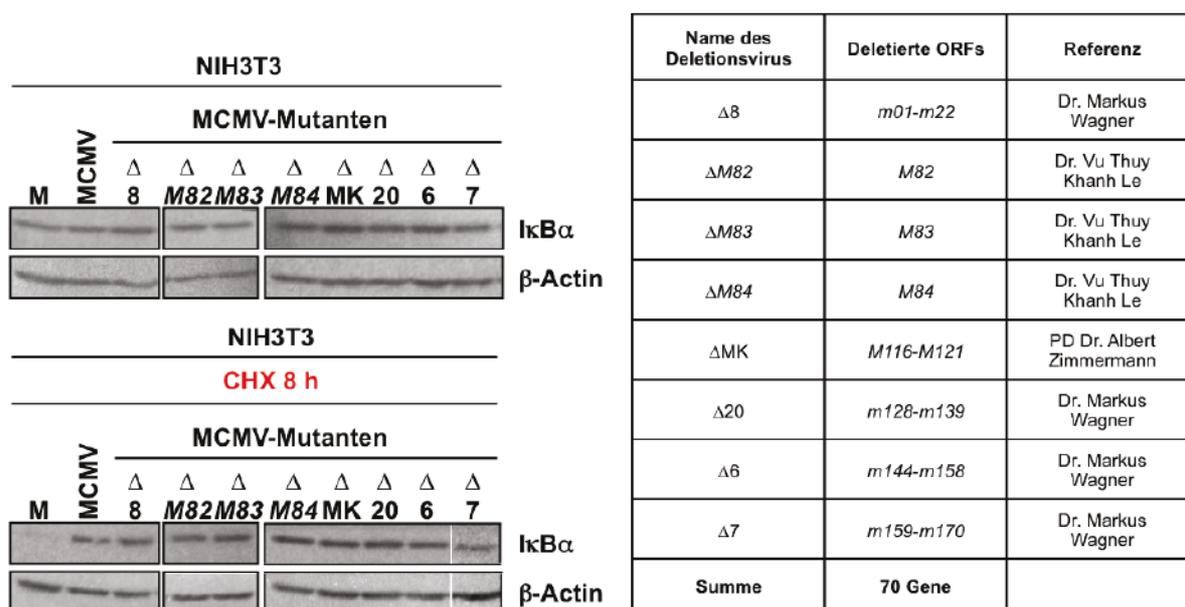
Da zu diesem Zeitpunkt weder der MCMV-kodierte NF- $\kappa\text{B}$ - noch der IRF-3-Antagonist bekannt waren, wurde der Fokus dieser Arbeit zunächst auf die Identifikation des NF- $\kappa\text{B}$ -Antagonisten gelegt, weil dieser Phänotyp mit Hilfe der  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Stabilisierung nach einer pharmakologischen Blockade der Translation durch Cycloheximid (CHX) und anschließender Western-Blot Analyse einfach zu untersuchen war.

### 2.1. Identifizierung des NF- $\kappa\text{B}$ -Antagonisten

#### 2.1.1 70 MCMV-Genprodukte sind für die $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Stabilisierung nicht essentiell

Um die MCMV-Genregion, die für den NF- $\kappa\text{B}$ -Antagonisten kodiert, zu identifizieren, wurden NIH3T3 Fibroblasten Mock-behandelt (M) oder mit Wildtyp (wt)-Virus bzw. verschiedenen MCMV-Deletionsmutanten infiziert und 24 Stunden (h) nach der Infektion entweder unbehandelt weiter inkubiert oder für 8 Stunden mit dem Translationshemmer Cycloheximid (CHX) behandelt. Anschließend wurden Proteinlysate hergestellt, die Proteinmengen durch Bradford-Bestimmung normalisiert und  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  sowie  $\beta$ -Actin mittels spezifischer Antikörper per Western-Blot Analyse untersucht. Die  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Halbwertszeit diente als Marker für die MCMV-vermittelte Interferenz mit dem NF- $\kappa\text{B}$  Signalweg, wohingegen  $\beta$ -Actin als Nachweis für eine

gleichmäßige Beladung des Protein-Gels fungierte. Erwartungsgemäß war in der Mock-Probe nach 8 h CHX-Behandlung im Gegensatz zur unbehandelten Probe kein  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Protein mehr nachweisbar. Allerdings konnte sowohl in den wt-Virus-infizierten Zellen als auch bei allen Zellen, die mit den verschiedenen Deletionsviren infiziert wurden, nach 8 h CHX-Behandlung eine deutliche  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Bande detektiert werden. Dies deutet darauf hin, dass keine der 70 untersuchten Genregionen für die  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Stabilisierung essentiell ist (Abbildung. 2.1).



**Abbildung 2.1 70 MCMV-kodierte Genprodukte sind für die  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Stabilisierung nicht essentiell.**

NIH3T3 Fibroblasten wurden Mock-behandelt (M) oder für 24 h mit Wildtyp-Virus (MCMV) bzw. verschiedenen MCMV-Deletionsviren infiziert (MOI 6; deletierte ORFs siehe Tabelle). Anschließend wurden die Zellen entweder für weitere 8 h unbehandelt inkubiert oder mit dem Translationshemmer Cycloheximid (CHX) behandelt. Protein-Lysate von Mock-, wt-infizierten- oder Deletionsvirus-infizierten-Zellen wurden hergestellt und  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  detektiert.  $\beta$ -Actin diente als Ladekontrolle.

Für MCMV konnte gezeigt werden, dass Interferone und insbesondere  $\text{IFN-}\gamma$  die Replikation *in vitro* und *in vivo* inhibieren können (Gil et al., 2001; Lucin et al., 1993; Presti et al., 1998; 2001). Eine Vorbehandlung von Fibroblasten mit  $\text{IFN-}\alpha$  oder  $\text{IFN-}\gamma$  führt zu einer Hemmung der wt-MCMV-Replikation um das 5-10-fache ( $\text{IFN-}\alpha$ ) bzw. 50-fache ( $\text{IFN-}\gamma$ ) (Presti et al., 2001; Zimmermann et al., 2005). Dieser Wachstumsphänotyp wird bei Mutanten, die eine Deletion in einem *open reading frame* (ORF) aufweisen, der an der Inhibition der  $\text{IFN}$ -Induktion/Signaltransduktion beteiligt ist, ausgeprägter. Beispielsweise repliziert das  $\Delta M27$ -Virus ( $\text{pM27}$  rekrutiert den DDB1-Cullin 4A-Komplex und induziert eine STAT2-Polyubiquitinierung wodurch

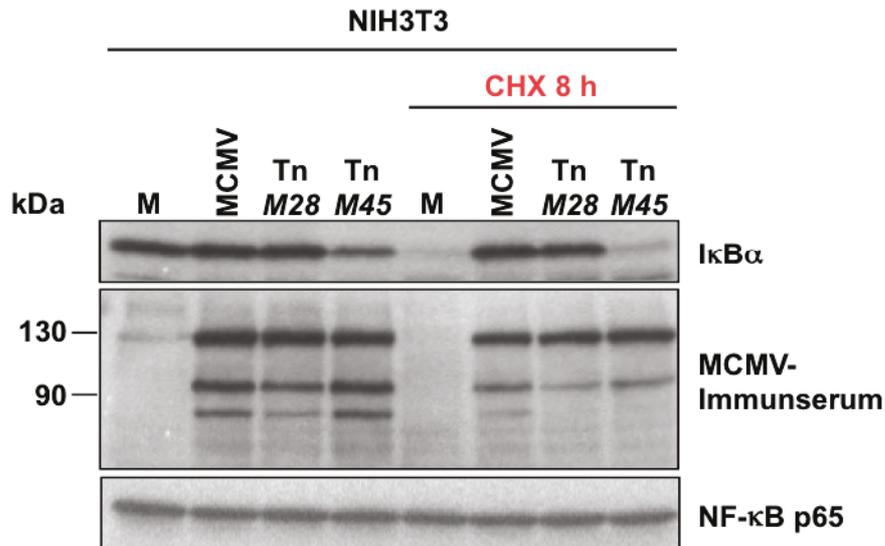
STAT2 proteasomal abgebaut wird) in IFN- $\alpha$  vorbehandelten Fibroblasten 20-fach und nach IFN- $\gamma$  Vorbehandlung sogar 10.000-fach schlechter (Zimmermann et al., 2005).

Da keine weiteren Deletionsviren zur Verfügung standen, wurden die nachfolgenden Experimente mit Viren durchgeführt, bei denen einzelne ORFs durch eine zufällige Insertion von Transposon-Sequenzen zerstört wurden. Nachfolgend werden diese Viren Transposon (Tn)-Mutanten genannt. Zwei Virusmutanten, die eine Transposon-Insertion im *M28*- bzw. im *M45*-Gen (Tn *M28* und Tn *M45*) aufweisen, kamen als Antagonisten in Frage, da beide Tn-Viren ein ausgeprägtes Replikationsdefizit in wt-Fibroblasten, die Typ I IFN exprimieren, aufwiesen.

### **2.1.2 Das *M45*-Protein trägt zur verlängerten $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Halbwertszeit bei**

Um zu überprüfen, ob das *M28*- bzw. *M45*-Genprodukt an der Verlängerung der  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Halbwertszeit beteiligt ist, wurden NIH3T3-Fibroblasten mit wt-, Tn *M28*- und Tn *M45*-Virus (MOI 8) infiziert. 24 h nach der Infektion wurden die Zellen entweder weiter unbehandelt belassen oder für 8 h mit CHX inkubiert. Daraufhin wurden Protein-Lysate hergestellt und die Proteinmengen mit Hilfe von Bradford-Bestimmung normalisiert. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und abschließend mit spezifischen Antikörpern im Rahmen einer Western-Blot Analyse untersucht.

In der Mock-infizierten Kontrollprobe war erwartungsgemäß nach 8 h CHX-Inkubation kein  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Protein nachweisbar (Abbildung 2.2). Im Gegensatz dazu konnte in wt- und Tn *M28*-Virus-infizierten Zellen die Verlängerung der  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Halbwertszeit nach CHX-Behandlung nachgewiesen werden, da beide Proben ungefähr die gleiche  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Proteinmenge wie die jeweilige CHX-unbehandelte Probe aufwiesen. Anhand dieser Daten konnte geschlussfolgert werden, dass das *M28*-Genprodukt nicht an der  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Stabilisierung beteiligt ist. In Tn *M45*-Virus-infizierten Zellen war jedoch nach 8-stündiger CHX-Inkubation nur noch eine geringe Menge des  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Proteins detektierbar. Zudem konnte bereits ohne CHX-bedingte Hemmung der Translation in Tn *M45*-infizierten Zellen eine verminderte  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Proteinmenge im Vergleich zu Mock- oder wt- bzw. Tn *M28*-infizierten Zellen beobachtet werden. Diese Befunde lieferten erste Hinweise darauf, dass das pM45 für die Verlängerung der  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Halbwertszeit verantwortlich sein könnte.



**Abbildung 2.2 Das *M45*-Genprodukt ist an der Verlängerung der  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Halbwertszeit beteiligt.**

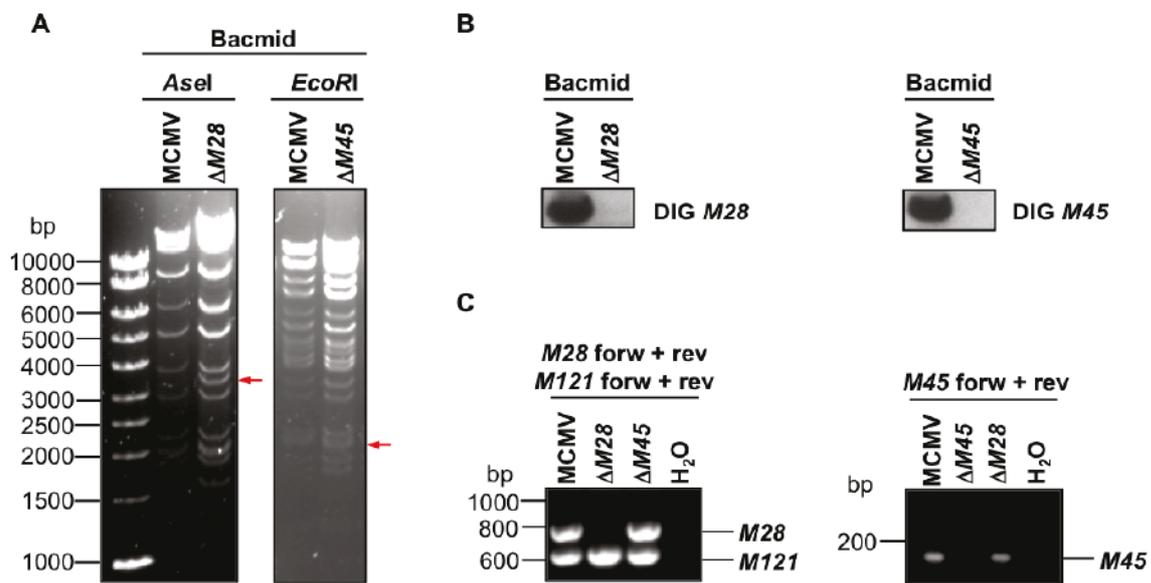
NIH3T3-Fibroblasten wurden Mock (M)-behandelt oder für 24 h mit wt-, Tn *M28*- oder Tn *M45*-Virus infiziert (MOI 8). Anschließend wurden die Zellen weiter unbehandelt inkubiert oder für 8 h mit CHX behandelt. Auf die Herstellung von Protein-Lysaten folgte die Normierung der Proteinmenge mittels Bradford-Bestimmung, die gelelektrophoretische Auftrennung mit Hilfe von SDS-PAGE und die Detektion verschiedener Proteine im Rahmen einer Western-Blot Analyse. Die  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Protein-Halbwertszeit wurde mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers detektiert. MCMV-Immuneserum diente als Infektionsnachweis und NF- $\kappa\text{B}$  p65 fungierte als Ladekontrolle.

Da diese Daten aber unter Verwendung von Transposon-Mutanten generiert wurden, erfolgte die Herstellung der  $\Delta M45$ - und  $\Delta M28$ -Mutanten, um die Experimente mit definierten Deletionsviren wiederholen zu können.

### 2.1.3 Generierung und Kontrolle der $\Delta M45$ - und $\Delta M28$ -Deletionsviren

Die  $\Delta M28$ - und  $\Delta M45$ -Mutanten wurde mit Hilfe von Bacmid-Mutagenese, die auf homologer Rekombination basiert, kloniert. Um die Bacmid-Deletionsmutanten zu überprüfen, wurde ein Restriktionsverdau der Bacmid-DNA durchgeführt und dieser anschließend auf einem Agarose-Gel aufgetrennt. Beide Deletionsmutanten wiesen das erwartete Restriktionsmuster auf (Abbildung 2.3 A). Anschließend wurden die Deletion des *M28*- bzw. *M45*-Gens mit Hilfe einer Southern-Blot Analyse mit genspezifischen Sonden überprüft. In der wt-MCMV-Kontrollspur war das *M28*- bzw. *M45*-Gen nachweisbar, wohingegen keine Bande in der jeweiligen Deletionsmutante zu erkennen war (Abbildung 2.3 B). Um die erfolgreiche Deletion der Gene *M28* und *M45* abschließend zu überprüfen, erfolgte eine PCR mit genspezifischen Primern.

Ein *M28*-spezifisches PCR-Produkt war ausschließlich bei der Verwendung von wt-MCMV- bzw.  $\Delta M45$ -DNA als Template und nicht in der  $\Delta M28$ -Deletionsmutante nachweisbar. Als Kontrolle wurden zusätzlich *M121*-Primer in der PCR-Reaktion eingesetzt, um ein PCR-Produkt von einem Gen nachzuweisen, welches durch die Deletion von *M28* bzw. *M45* nicht beeinflusst sein sollte. Wie erwartet konnte mit wt-,  $\Delta M28$ - sowie mit  $\Delta M45$ -DNA als Template das *M121*-PCR-Produkt amplifiziert werden. Die PCR mit *M45*-spezifischen Primern wiederum zeigte bei wt-MCMV- und  $\Delta M28$ -DNA als Template eine Bande, wohingegen kein PCR-Produkt bei der *M45*-Deletionsmutante zu erkennen war (Abbildung 2.3 C).



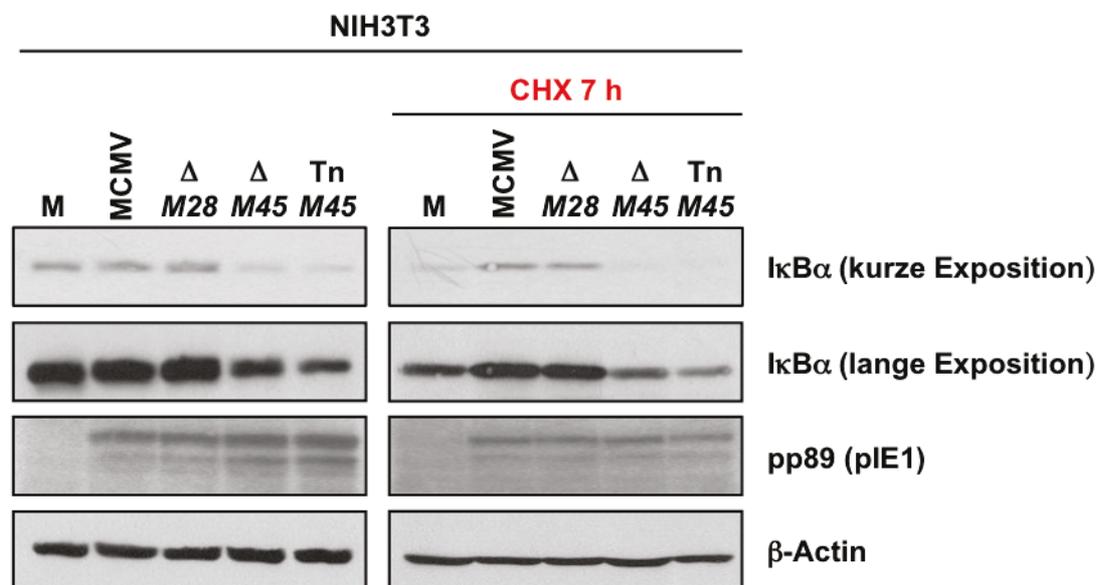
**Abbildung 2.3** Kontrollverdau, Southern-Blot und PCR der definierten  $\Delta M28$ - bzw.  $\Delta M45$ -Deletionsmutanten.

**A)** Bacmid-DNA der Mutanten  $\Delta M28$  und  $\Delta M45$  wurde mit den Restriktionsenzymen *AseI* bzw. *EcoRI* verdaut und mit Hilfe eines 0,5%-Agarose-Gels aufgetrennt. Das *AseI*-Fragment (10320 bp) der wt-Bacmid-DNA wird in der Kanamycin-Resistenzkassette-enthaltenden  $\Delta M28$ -Bacmid-DNA in zwei Fragmente mit Größen von 7055 bp und 3763 bp (mit rotem Pfeil markiert) gespalten. Der *EcoRI*-Restriktionsverdau der wt-Bacmid-DNA resultiert unter anderem in zwei Fragmenten mit Größen von 8704 bp und 2429 bp. Das Restriktionsmuster der  $\Delta M45$ -Bacmid-DNA weist diese Fragmente nicht mehr auf, enthält aber drei zusätzliche Fragmente mit Größen von 8765 bp, 2248 bp (mit rotem Pfeil markiert) und 21 bp. **B)** Southern-Blot Analyse der Mutanten unter Verwendung von DIG-markierten genspezifischen Sonden. Die *M28*-spezifische Sonde hybridisiert mit dem 10320 bp Fragment (*AseI*-Verdau) und die *M45*-spezifische Sonde hybridisiert mit dem 8704 bp Fragment (*EcoRI*-Verdau) der wt-Bacmid-DNA. **C)** PCR-Untersuchung der Deletionsmutanten mittels genspezifischer Primer und anschließender Agarose-Gelelektrophorese. Bei der *M28*-spezifischen PCR wurden zusätzlich *M121*-Primer eingesetzt, um für alle Spuren ein Kontroll-PCR-Produkt von einem Gen zu amplifizieren, welches durch die Deletion nicht beeinflusst sein sollte.

Anhand der Ergebnisse aus Restriktionsverdau, Southern-Blot und Kontroll-PCR konnte die definierte Deletion des *M28*- bzw. des *M45*-Gens bestätigt werden, worauf die Entfernung der Kanamycin-Kassette und die Rekonstitution der Viren erfolgte.

### 2.1.4 Das *M45*-Genprodukt vermittelt die Verlängerung der $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Halbwertszeit

Wie bereits in Abschnitt 2.1.2 erwähnt, konnte mit Hilfe des *M45*-Transposon-Insertionsvirus das *M45*-Genprodukt als Kandidat für die  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Stabilisierung ermittelt werden. Um diesen Phänotyp zu überprüfen, wurden NIH3T3-Zellen mit wt-Virus oder verschiedenen Virus-Mutanten ( $\Delta M45$ , Tn *M45* und als Kontrolle  $\Delta M28$ ) für 12 h infiziert (MOI 8). Die infizierten Zellen wurden anschließend entweder unbehandelt belassen oder für 7 h mit Cycloheximid inkubiert. Die Western-Blot Analyse ergab, dass Viren, die entweder eine Transposoninsertion (Tn *M45*) oder eine gezielte Deletion des *M45*-Gens ( $\Delta M45$ ) aufweisen, nicht mehr in der Lage sind, den NF- $\kappa$ B-Signalweg zu inhibieren, da bei den *M45*-defizienten Mutanten im Vergleich zu wt- oder  $\Delta M28$ -infizierten Zellen die  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Halbwertszeit nach CHX-Behandlung nicht gesteigert wird (Abbildung 2.4).



**Abbildung 2.4** Das *M45*-Genprodukt vermittelt die Verlängerung der  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Halbwertszeit.

NIH3T3 Fibroblasten wurden Mock (M)-behandelt oder mit wt-,  $\Delta M28$ -,  $\Delta M45$ -Virus bzw. einer *M45*-Transposoninsertionsmutante (Tn *M45*) infiziert (MOI 8). 12 h nach der Infektion wurden die Zellen entweder für weitere 7 h unbehandelt belassen oder für 7 h mit CHX inkubiert. Auf die Herstellung von Protein-Lysaten folgte die Normierung der Proteinmengen mittels Bradford-Bestimmung. Nach der SDS-PAGE-Auftrennung der Proben wurde die  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Protein-Stabilität mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers per Western-Blot Analyse nachgewiesen. MCMV pp89 (pIE1) diente als Infektions- und  $\beta$ -Actin als Ladekontrolle.

Zudem ist (wie schon in Abbildung 2.2 beobachtet) sowohl in Tn *M45*- als auch in  $\Delta M45$ -Virus-infizierten Zellen ohne zusätzliche CHX-Behandlung eine geringere Menge an I $\kappa$ B $\alpha$ -Protein im Vergleich zu Mock (M)-Zellen oder wt- bzw.  $\Delta M28$ -Virus-infizierten Zellen nachweisbar.

Während die Versuche mit den *M45*-Mutanten durchgeführt wurden, erschienen innerhalb kurzer Zeit mehrere Publikationen, in denen sowohl der *M45*-Phänotyp als auch die zellulären Interaktionspartner (RIP1 und RIP3) beschrieben wurden (Lembo and Brune, 2009; Mack et al., 2008; Upton et al., 2008). Aufgrund dieser Veröffentlichungen wurden die Experimente bzgl. der I $\kappa$ B $\alpha$ -Stabilisierung nicht weiter verfolgt.

## 2.2 *M28* - ein MCMV Kandidatengen für die Inhibition der IFN- $\beta$ -Induktion?

### 2.2.1 Die *M28*-Transposoninsertionsmutante repliziert in IFN- $\beta$ -defizienten Zellen 100-fach besser als in wt-Zellen

Wie bereits in Abschnitt 2.1.1 erwähnt wurde, zeichnen sich die Transposon-Viren Tn *M28* und Tn *M45* durch ein ausgeprägtes Wachstumsdefizit in wt-Fibroblasten, die Typ I IFN exprimieren, aus. Der Wachstumsphänotyp der Tn *M45*-Mutante ist vermutlich durch die defiziente Inhibition des NF- $\kappa$ B-Signalwegs bedingt. Die Ursachen des Tn *M28*-Virus-Wachstumsdefizits waren aber nicht bekannt. Deshalb wurde das *M28*-Genprodukt als Kandidat für die MCMV-vermittelte Hemmung der IFN- $\beta$ -Induktion in Betracht gezogen, da bekannt war, dass nicht nur der NF- $\kappa$ B-, sondern auch der IRF-3- und der ATF-2/c-Jun-abhängige Signalweg von MCMV inhibiert wird.

Um die Rolle des *M28*-Genprodukts hinsichtlich der Inhibition der IFN- $\beta$ -Induktion näher zu untersuchen, wurden zunächst Wachstumsanalysen durchgeführt. Dazu wurden primäre BALB/c MEF (*mouse embryonic fibroblast*) oder IFN- $\beta$ -defiziente BALB/c MEF (IFN- $\beta^{-/-}$ ) mit wt-, Tn *M28*- und als Kontrolle Tn *M45*-Virus infiziert (MOI 0,005) und Virus-Zell-Suspensionen von Tag 0 bis 6 nach der Infektion (dpi) eingefroren. Die Virus-Titer wurden anschließend mittels Plaque-Titration in wt-BALB/c MEF bestimmt.

Die Wachstumsanalyse ergab, dass beide Tn-Viren in wt-Zellen ein ca. 1000-fach schlechteres Wachstum im Vergleich zum wt-Virus (4 dpi) aufwiesen (Abbildung 2.5). Im Gegensatz dazu replizierten die Tn-Mutanten in IFN- $\beta^{-/-}$  BALB/c MEF an Tag 4 nach der Infektion im Vergleich zum wt-Virus nur 10- (Tn *M45*) bzw. 30-fach (Tn *M28*) schlechter. Diese Daten deuten darauf hin, dass das *M28*-Genprodukt an der MCMV-vermittelten IFN- $\beta$ -Inhibition beteiligt sein könnte, da die Kultivierung des Tn *M28*-Virus in IFN- $\beta^{-/-}$  BALB/c MEF zu einer gravierenden Wachstumsverbesserung führte. Das deutlich verbesserte Wachstum der Tn-*M45*-Mutante in IFN- $\beta$ -defizienten MEF bekräftigt die Hypothese, dass das pM45 an der Inhibition der NF- $\kappa$ B-vermittelten IFN- $\beta$ -Induktion beteiligt ist.

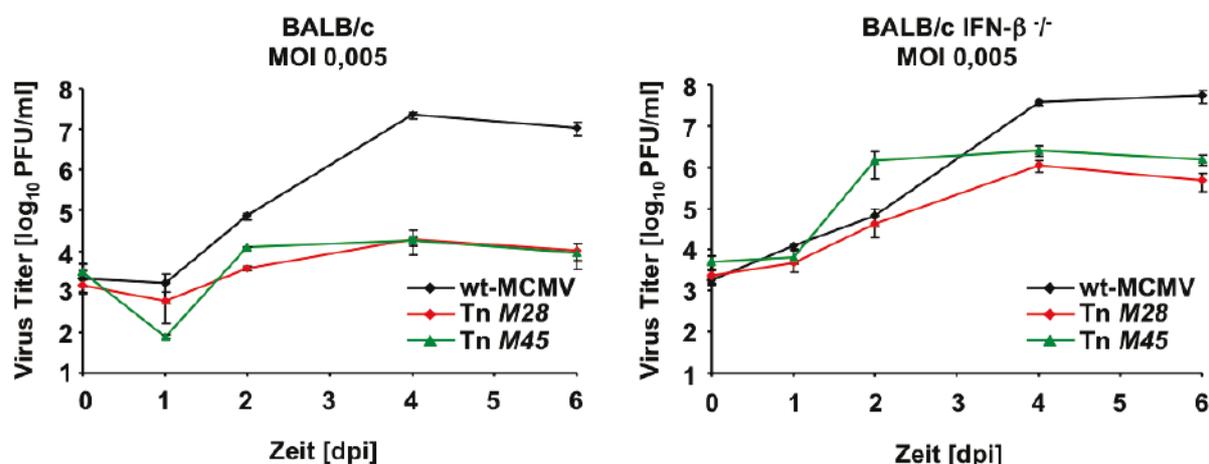


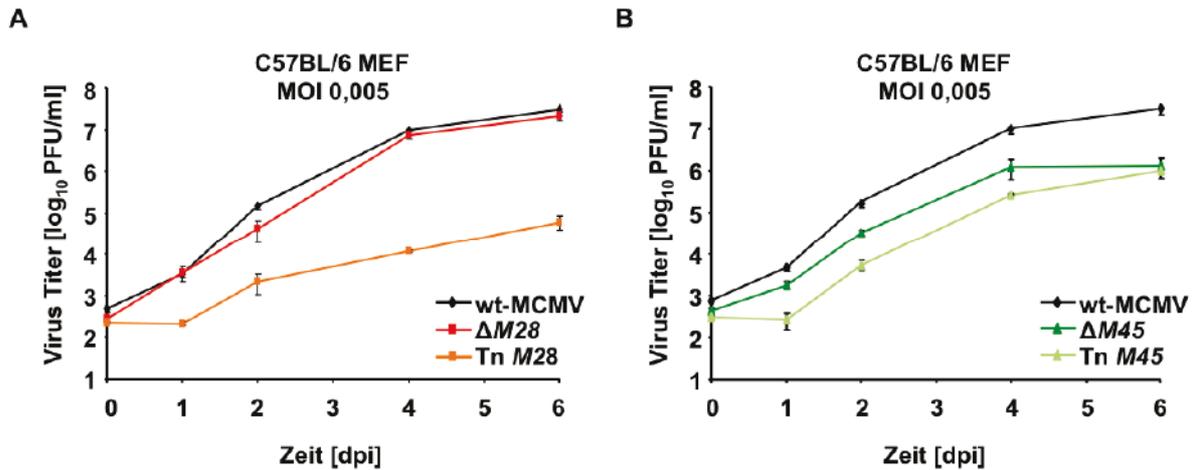
Abbildung 2.5 Der Wachstumsnachteil der Transposon-Viren Tn *M28* und Tn *M45* ist in IFN-β<sup>-/-</sup>-MEF geringer.

BALB/c MEF oder IFN-β<sup>-/-</sup>-BALB/c MEF wurden mit wt-MCMV bzw. mit den Transposon-Mutanten Tn *M28* und Tn *M45* infiziert (MOI 0,005). 0 bis 6 Tage nach der Infektion (dpi) wurden Virus-Zell-Suspensionen eingefroren. Die Virus-Titer Bestimmung erfolgte mittels Plaque-Titration in BALB/c MEFs (Titration in Triplikaten).

## 2.2.2 Die definierte Deletion des *M28*-Gens führt zu keinem Wachstumsnachteil in wt-Zellen

Um die Replikationsfähigkeit der generierten definierten Deletionsmutanten ( $\Delta M28$  und  $\Delta M45$ ) im Vergleich zu den jeweiligen Transposoninsertions-Viren (Tn *M28* und Tn *M45*) zu untersuchen, wurden erneut Wachstumsanalysen durchgeführt. Dazu wurden C57BL/6 MEF mit den verschiedenen Viren infiziert (MOI 0,005) und Virus-Zell-Suspensionen von Tag 0 bis 6 nach der Infektion eingefroren. Die Virus-Titer-Bestimmung erfolgte mittels Plaque-Titration.

Unerwarteterweise replizierte die  $\Delta M28$ -Mutante zu jedem Zeitpunkt der Analyse annähernd wt-artig, d.h. es war fast keine Wachstumsbeeinträchtigung nachweisbar. Das ca. 1000-fach schlechtere Wachstum des Tn *M28*-Virus konnte allerdings bestätigt werden (Abbildung 2.6 A). Die definierte Deletion des *M45*-Gens resultierte in einem 10-fach schlechteren Wachstum, wohingegen die *M45*-Transposon-Insertation zu einer 30-fach schlechterer Replikation im Vergleich zum wt-Virus führte (Abbildung 2.6 B). Der beträchtliche Wachstumsnachteil, den beide Tn-Mutanten in Abbildung 2.5 aufwiesen, wurde unter Verwendung der definierten Deletionsmutanten nicht reproduziert. Aufgrund dessen wurde auf eine Wachstumsanalyse in IFN-β<sup>-/-</sup>-Zellen verzichtet.



**Abbildung 2.6** Die definierten  $\Delta M28$ - und  $\Delta M45$ -Viren replizieren effizienter als die entsprechenden Transposoninsertions-Viren.

C57BL/6 MEF wurden mit A) wt-,  $\Delta M28$ - und Tn *M28*-Virus oder B) wt-,  $\Delta M45$  und Tn *M45*-Virus infiziert (MOI 0,005). 0 bis 6 Tage nach der Infektion (dpi) wurden Virus-Zell-Suspensionen eingefroren. Die Virus-Titer-Bestimmung erfolgte mittels Plaque-Titration (Titration in Triplikaten).

Diese Daten belegen, dass die Generierung von definierten Deletionsviren essentiell für die Analyse und Bestätigung bestimmter Phänotypen ist, da durch die Insertion von Transposons nicht nur die betroffenen Gene, sondern auch Gene in der Nachbarschaft beeinträchtigt sein können.

Da für das Wachstumsdefizit der *M45*-Mutanten (Tn *M45* und  $\Delta M45$ ) wahrscheinlich die defiziente Inhibierung der NF- $\kappa$ B-vermittelten IFN- $\beta$ -Induktion verantwortlich ist, und die definierte  $\Delta M28$ - im Gegensatz zur Tn *M28*-Mutante wt-artig wuchs, wurden keine weiteren Experimente durchgeführt, um die Funktionen der Genprodukte zu untersuchen.

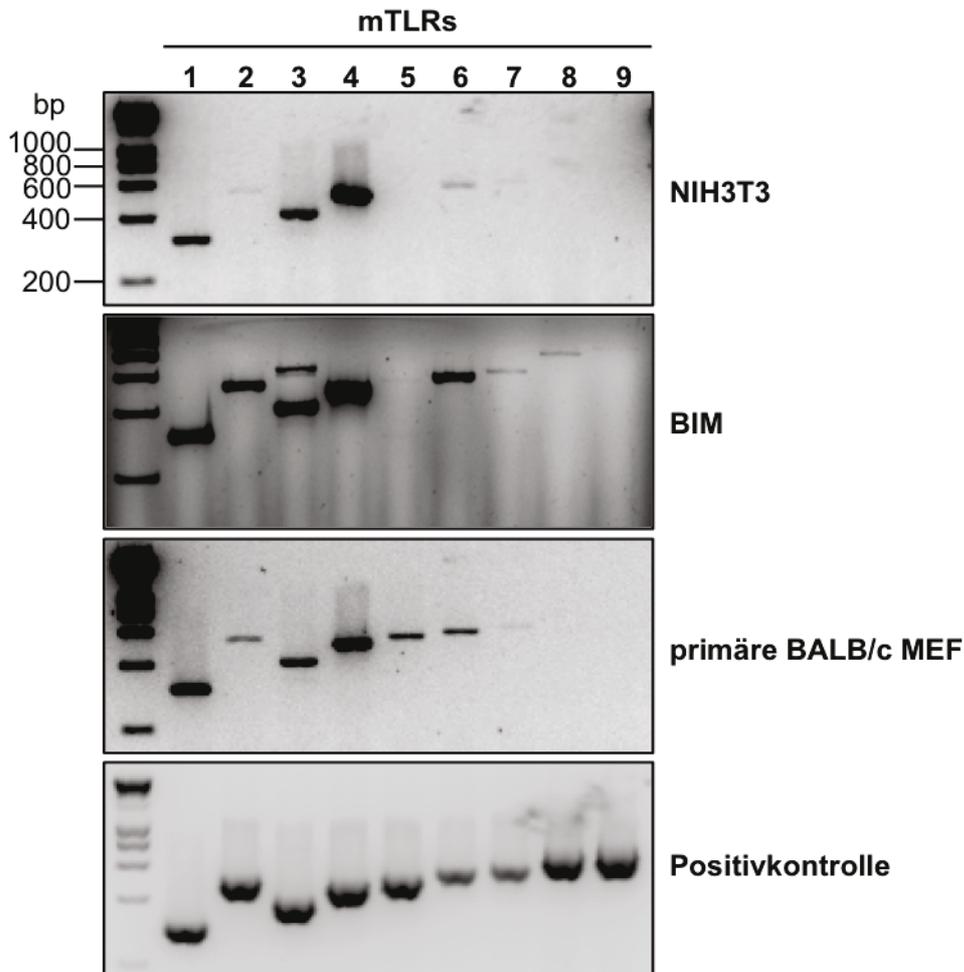
## 2.3. Identifikation von neuen *ie3*-kodierten Transkript- und Proteinisoformen

### 2.3.1 Evaluation der BALB/c *immortalized* MEFs (BIM)

Während der Durchführung dieser Arbeit wurden in unserem Labor von Dr. Mirko Trilling BALB/c *immortalized* MEFs (BIM) hergestellt, indem primäre BALB/c-Fibroblasten über viele Passagen kultiviert wurden. Die primären Fibroblasten durchlaufen dabei hinsichtlich der Proliferation eine Krise, d.h. sie teilen sich sehr langsam und sehr viele Zellen sterben. Nach einer gewissen Zeit wird diese Krise aber von manchen Zellen überwunden und es entstand eine Fibroblasten-Zell-Linie, die effizient mit MCMV infiziert werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Um die generierten BIMs mit primären MEFs und der häufig für MCMV-Experimente genutzten Fibroblasten-Zell-Linie NIH3T3 vergleichen zu können, wurde das Expressionsmuster der TLRs auf diesen Zellen analysiert. Dazu wurde von allen drei Zellarten Gesamt-RNA isoliert und diese als Template für eine semi-quantitative RT-PCR mit spezifischen Primern für die murinen TLRs 1-9 verwendet. Als Positivkontrolle diente dsDNA, die in dem Primer-Set enthalten war (Invivogen mTLR RT-Primer Set). Anschließend wurden die PCR-Produkte mit Hilfe eines 2%-Agarose-Gels elektrophoretisch aufgetrennt (Abbildung 2.7).

In NIH3T3-Fibroblasten konnte die Expression der TLRs 1, 2, 3, 4, 6 und 7 nachgewiesen werden, wobei die PCR-Produktmengen der TLRs 2, 6 und 7 sehr gering waren. Die BIM-Zellen weisen die TLRs 1, 2, 3, 4, 5 (sehr schwach), 6, 7, 8 und 9 (sehr schwach) auf und in primären BALB/c MEFs konnten die cDNAs der TLRs 1, 2, 3, 4, 5, 6, und 7 detektiert werden. Beim Vergleich der jeweiligen TLRs fällt auf, dass die PCR-Produktmenge der TLRs 2 und 7 in BIMs und primären Fibroblasten ähnlicher ist als die Menge in NIH3T3-Zellen. Außerdem ist zu erkennen, dass die TLR 5-Expression von primären MEFs, über BIM- zu NIH3T3-Fibroblasten abnimmt. Dies korreliert mit der Kultivierungsdauer der Zellen. Insgesamt konnte somit bestätigt werden, dass sich BIM-Zellen für MCMV-Infektionsexperimente eignen, da sie zum Einen effizient infizierbar sind und zum anderen ein ähnliches TLR-Expressionsprofil wie primäre murine embryonale Fibroblasten aufweisen, aber im Gegensatz zu primären MEFs länger kultivierbar sind.



**Abbildung 2.7 BIM-Zellen weisen ein ähnliches mTLR-Expressionsmuster wie primäre BALB/c MEFs und NIH3T3-Fibroblasten auf.**

Gesamt-RNA wurde aus NIH3T3- und BIM (BALB/c *immortalized MEF*)-Zellen sowie aus primären BALB/c-MEFs isoliert und diese als Template für eine semi-quantitative RT-PCR mit spezifischen Primern für die murinen TLRs eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden anschließend in einem 2%-Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die erwarteten PCR-Produktgrößen sind: TLR 1= 309 bp, TLR 2= 508 bp, TLR 3=415 bp, TLR 4=510 bp, TLR 5=545 bp, TLR 6= 575 bp; TLR 7= 610 bp, TLR 8= 769 bp und TLR 9= 808 bp.

### **2.3.2 Die MCMV *ie1*- bzw. *ie2*-Genprodukte sind für die Interferenz mit dem IRF-3-vermittelten Signalweg nicht essentiell**

Befunde von Dr. Vu Thuy Khanh Le aus unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass für die Inhibition der IRF-3-Phosphorylierung die Expression und Anwesenheit der MCMV *immediate-early*-Gene ausreicht (Daten nicht gezeigt). Wie bereits im Abschnitt 1.1.5 erläutert, waren zum damaligen Zeitpunkt drei *ie*-Gene, *ie1*, *ie2* und *ie3*, beschrieben (Keil et al., 1987a; 1987b; Messerle et al., 1991; 1992).

Die Arbeitsgruppe um Angulo et al. konnte aufgrund der Tatsache, dass das  $\Delta ie3$ -Virus weder *in vitro* noch *in vivo* replikationsfähig ist und nur auf

komplementierenden Zellen wächst, nachweisen, dass das MCMV *ie3*-Genprodukt essentiell ist (Angulo et al., 2000). Im Gegensatz dazu ist das *ie1*- und das *ie2*-Genprodukt nicht essentiell, da sowohl das  $\Delta ie1$ - als auch das  $\Delta ie2$ -Virus *in vitro* replikationsfähig ist (Ghazal et al., 2005; Manning and Mocarski, 1988). In BALB/c Mäusen weist die  $\Delta ie1$ -Virusmutante in der Milz und der Speicheldrüse einen ca. 10-fachen, in der Leber einen 2- bis 18-fachen und in der Niere einen 3-fachen Wachstumsnachteil im Vergleich zum wt-Virus auf. In der Leber von CB17 SCID-Mäusen repliziert das  $\Delta ie1$ -Virus im Vergleich zum wt-Virus bis zu 60-fach schlechter (Ghazal et al., 2005). Für das  $\Delta ie2$ -Virus wurde in der Niere, Leber, Milz, Lunge, Bauchspeicheldrüse und in der Speicheldrüse ein mit dem wt-Virus vergleichbares Wachstum beobachtet (Cardin et al., 1995).

Um die *ie1*- bzw. *ie2*-Genprodukte als potentielle IRF-3-Antagonisten zu überprüfen, wurden BIM-Zellen mit wt-,  $\Delta ie1$ -,  $\Delta ie2$ - (freundlicherweise von Prof. Dr. Martin Messerle zur Verfügung gestellt) und als Kontrolle mit UV-inaktiviertem-Virus infiziert (MOI 5) und 3 sowie 6 hpi Protein-Lysate hergestellt.

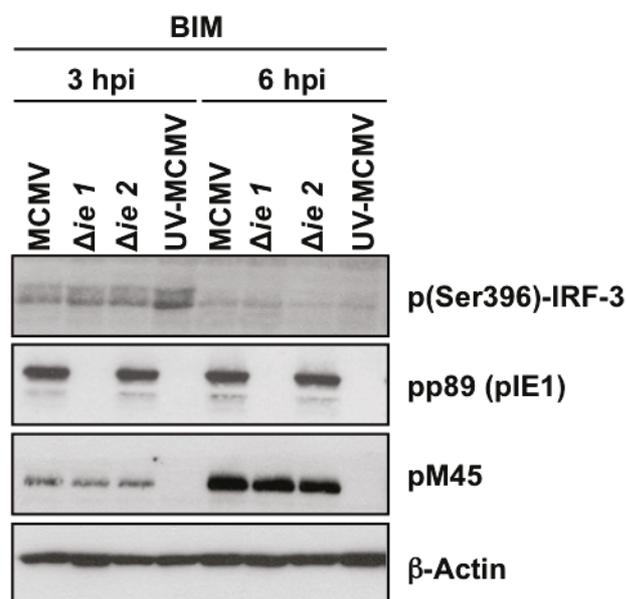


Abbildung 2.8 Die *ie1*- und *ie2*-Genprodukte sind für die p(Ser396)-IRF-3-Inhibition nicht essentiell.

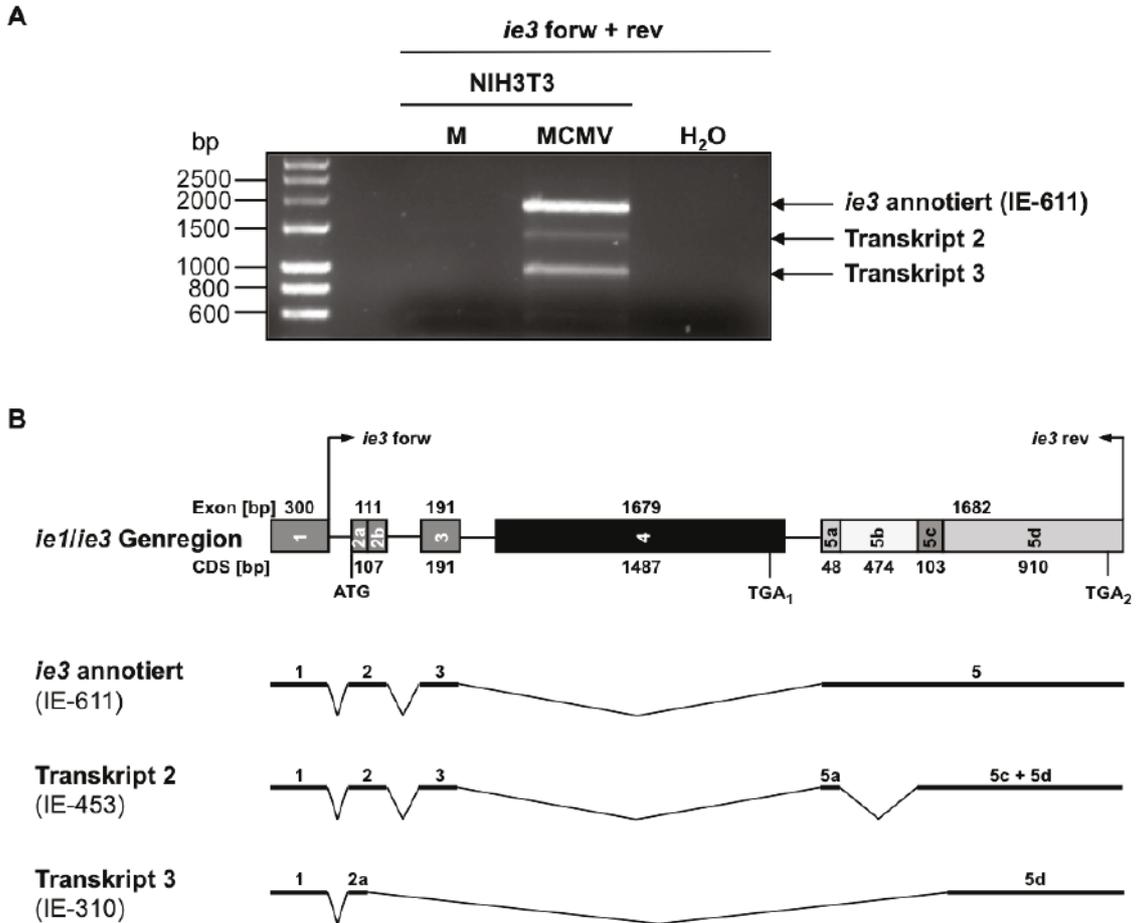
BIM-Zellen wurden mit wt-,  $\Delta ie1$ -,  $\Delta ie2$ - oder UV-inaktiviertem-Virus infiziert (MOI 5). 3 bzw. 6 h nach der Infektion wurden Protein-Lysate hergestellt und p(Ser396)-IRF-3 mittels Western-Blot Analyse nachgewiesen. Als Gendeletions- bzw. Infektions-Kontrollen wurde MCMV pp89 (pIE1) und pM45 detektiert.  $\beta$ -Actin diente als Ladekontrolle.

Anhand der Western-Blot Analyse mit p(Ser396)-spezifischem IRF-3-Antikörper konnte geschlussfolgert werden, dass das *ie1*- und das *ie2*-Genprodukt für die Inhibition der IFN- $\beta$ -Induktion nicht essentiell sind, da 3 hpi in wt- und in  $\Delta ie1$ - bzw.  $\Delta ie2$ -infizierten Zellen vergleichbare Proteinmengen des p(Ser396)-IRF-3-Proteins detektierbar waren, wohingegen die Infektion mit UV-MCMV (replikationsinkompetent) zu einer erhöhten p(Ser396)-IRF-3-Proteinmenge führte.

6 h nach der Infektion war in wt-MCMV- sowie in  $\Delta ie1$ - bzw.  $\Delta ie2$ -infizierten Zellen kein phosphoryliertes IRF-3-Protein nachweisbar (Abbildung 2.8). Somit konnte sowohl das *ie1*- als auch das *ie2*-Genprodukt als IFN- $\beta$ -Antagonist ausgeschlossen werden, wodurch die *ie3*-Genregion in den Fokus der Untersuchungen rückte.

### **2.3.3 Nachweis von zwei nicht beschriebenen MCMV-exprimierten *ie3*-Isoformen auf Transkript- und Proteinebene**

Um die *ie3*-Sequenz zu amplifizieren und in einen Expressionsvektor zu klonieren, wurde eine *ie3*-spezifische-RT-PCR mit RNA aus MCMV-infizierten NIH3T3-Zellen durchgeführt. Überraschenderweise konnte reproduzierbar nicht nur ein, sondern drei spezifische PCR-Produkte detektiert werden (Abbildung 2.9 A). Das größte Transkript entspricht der erwarteten Bande (1995 bp) für das annotierte *ie3*-Gen (Messerle et al., 1992). Die Banden mit einer Größe von ungefähr 1500 bp (Transkript 2) und ca. 1000 bp (Transkript 3) waren unbekannt. Um die Sequenzen der Transkripte analysieren zu können, wurden alle Banden aus dem Gel ausgeschnitten, die jeweilige cDNA aus dem Gel isoliert und diese anschließend sequenziert. Aufgrund der cDNA-Sequenz konnten die Transkripte 2 und 3 als zwei bisher nicht beschriebene *ie3*-Transkriptisoformen identifiziert werden. Abbildung 2.9 B veranschaulicht die alternativen Spleißvorgänge, die zu den verschiedenen *ie3*-Transkriptvarianten führen. Für die Generierung des Transkripts, das für das kanonische pIE3 (= pIE-611) kodiert, werden die Exons 1, 2, 3 und 5 unter Ausschluss des *ie1*-spezifischen Exons 4 zusammengefügt. Die mRNA des Transkripts 2 (IE-453) setzt sich aus den Exons 1, 2, 3, 5a, 5c und 5d zusammen. Die Sequenz des Exons 5b (474 bp) wird in diesem Fall als Intron behandelt und herausgespleißt. Um das Transkript 3 (IE-310) herzustellen, werden die Exons 1, 2a (20 bp) und 5d (CDS = 910 bp) verbunden. Die Translation aller *ie3*-ORFs beginnt am selben Start (ATG)- und endet am selben Stopp-Kodon (TGA<sub>2</sub>), d.h. sie werden im gleichen Leseraster (*frame*) translatiert (Abbildung 2.9 B).



**Abbildung 2.9** Identifikation von neuen *ie3*-Transkripten.

**A)** Eine *ie3*-spezifische RT-PCR mit RNA aus MCMV-infizierten NIH3T3-Zellen ergibt drei PCR-Produkte.

Aus MCMV-infizierten (MOI 5) NIH3T3-Zellen wurde 12 hpi Gesamt-RNA isoliert. Die nachfolgende RT-PCR mit *ie3*-spezifischen Primern (*ie3* forw und rev) und anschließender Agarose-Gelelektrophorese ergab drei verschiedene PCR-Produkte.

**B)** Schema der alternativen Spleißvorgänge zur Generierung der verschiedenen *ie3*-Transkriptvarianten.

Für die Herstellung des annotierten *ie3*-Transkripts (IE-611) werden die Exons 1, 2, 3 und 5 zusammengefügt und das *ie1*-spezifische Exon 4 wird herausgespleißt. Im Vergleich zum IE-611-Transkript fehlt der mRNA des Transkripts 2 (IE-453) die Sequenz des Exons 5b (474 bp). Diese Region wird bei der Generierung des IE-453-Transkripts als Intron behandelt und herausgespleißt. Um das Transkript 3 (IE-310) herzustellen, werden die Exons 1, 2a (20 bp) und 5d (CDS = 910 bp) zusammengefügt. Die Basenpaar (bp)-Anzahl über den Exons, kennzeichnet die Exon-Gesamtlänge, während unterhalb der Exons, die Basenpaar-Anzahl der *coding sequence* (CDS) dargestellt ist. *ie3* forw und *ie3* rev stellt die Bindestellen der Primer dar, die für die RT-PCR in Abbildung A verwendet wurden. Die Translation des *ie1*- und der *ie3*-ORFs beginnt am selben Start (ATG)-Kodon. Die Translation des pIE1-kodierenden Transkripts endet am TGA<sub>1</sub>, wohingegen die Translation der alternativen *ie3*-Transkripte am TGA<sub>2</sub> stoppt.

Es konnte also gezeigt werden, dass drei verschiedene *ie3*-Transkriptvarianten von MCMV generiert werden. Diese wurden aufgrund der berechneten Aminosäuren-Anzahl IE-611, IE-453- und IE-310 benannt. Ob die drei Transkripte allerdings auch

zu Proteinen translatiert werden, war nicht bekannt. Um diese Fragestellung zu analysieren, wurde mittels Bacmid-Mutagenese eine Mutante konstruiert, bei der stromaufwärts des TGA<sub>2</sub> eine HA-Epitop-Sequenz inseriert wurde (Abbildung 2.10). Da alle drei *ie3*-Transkriptisoformen im selben *frame* translatiert werden, sind in dieser Mutante die *ie3*-Isoformen auf Proteinebene mit einem HA-Epitop markiert und mit Hilfe eines anti-HA-Antikörpers per Western-Blot Analyse nachweisbar, sofern die Proteine exprimiert werden. Zusätzlich zur Bacmid-Mutagenese wurde jeweils die *coding sequence* (CDS) der drei *ie3*-Isoformen HA-markiert in einen Expressionsvektor kloniert, um jede der Isoformen unabhängig von den anderen *ie3*-Varianten exprimieren und untersuchen zu können.



**Abbildung 2.10** Schema der *ie1/3* Region mit inserierter HA-Epitop-Sequenz stromaufwärts des TGA<sub>2</sub>.

Mittels Bacmid-Mutagenese wurde in die *ie1/3*-Genregion *upstream* des TGA<sub>2</sub> die Sequenz des HA-Epitops inseriert (IE-611-453-310-HA, nachfolgend IE3-HA genannt). Da alle *ie3*-Transkriptvarianten im selben *frame* translatiert werden, können sie mit Hilfe eines HA-spezifischen Antikörpers per Western-Blot Analyse nachgewiesen werden, sofern sie auf Proteinebene exprimiert werden. Die Basenpaar (bp)-Anzahl über den Exons, zeigt die Exon-Gesamtlänge an, wohingegen unterhalb der Exons, die Basenpaar-Anzahl der *coding sequence* (CDS) dargestellt ist.

Sowohl die DNA des klonierten IE-611-453-310-HA-Bacmids (nachfolgend IE3-HA genannt) als auch die DNA aus rekonstituiertem Virus wies nach einem *EcoRI*-Restriktionsverdau und elektrophoretischer Auftrennung mit Hilfe eines Agarose-Gels, das erwartete Restriktionsmuster auf (Abbildung 2.11 A). Im Southern-Blot konnten im wt und in der HA-Mutante *ie3*- bzw. *ie1*-DNA-Fragmente mit der erwarteten Größe nachgewiesen werden (Abbildung 2.11 B). Um die Insertion des HA-Epitops zu überprüfen, wurde eine PCR mit einem *ie3*-spezifischen *forward* und einem HA-spezifischen *reverse* Primer durchgeführt. Als Template wurde entweder Bacmid-, Virus- und als Positivkontrolle Plasmid-DNA verwendet. Mit allen Templates konnte ein spezifisches PCR-Produkt amplifiziert werden, wodurch die erfolgreiche Insertion der HA-Sequenz sowohl im Bacmid als auch im Virus bestätigt wurde (Abbildung 2.11 C).

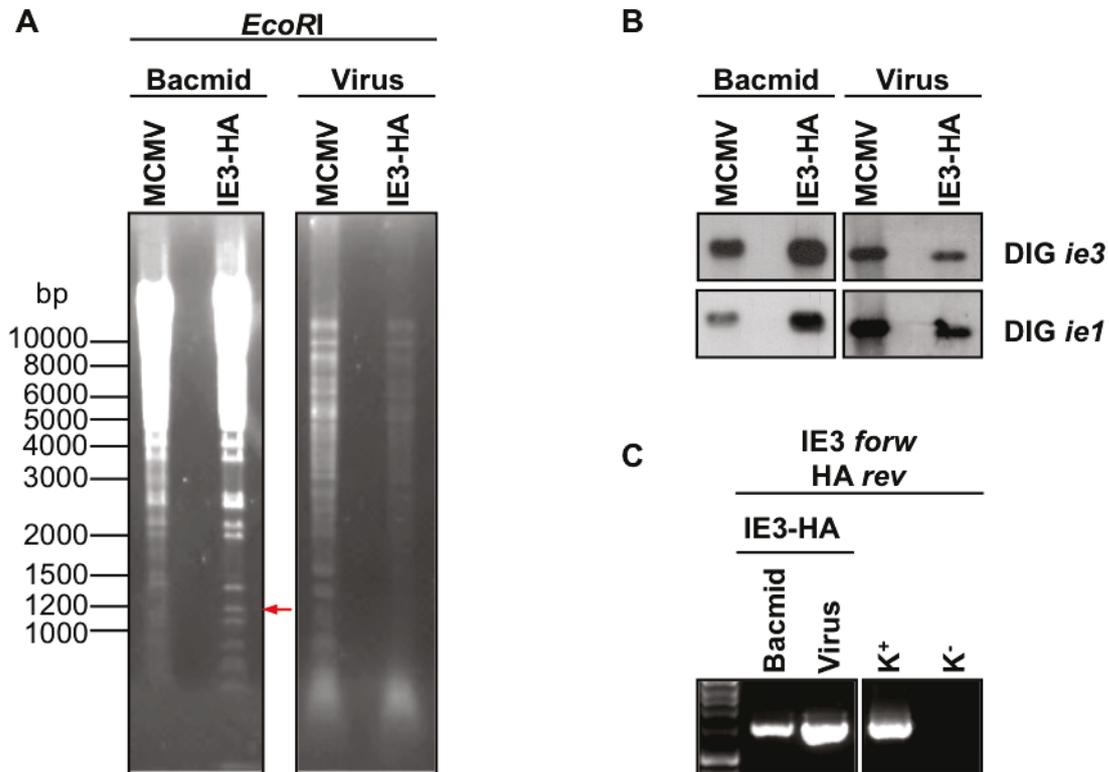


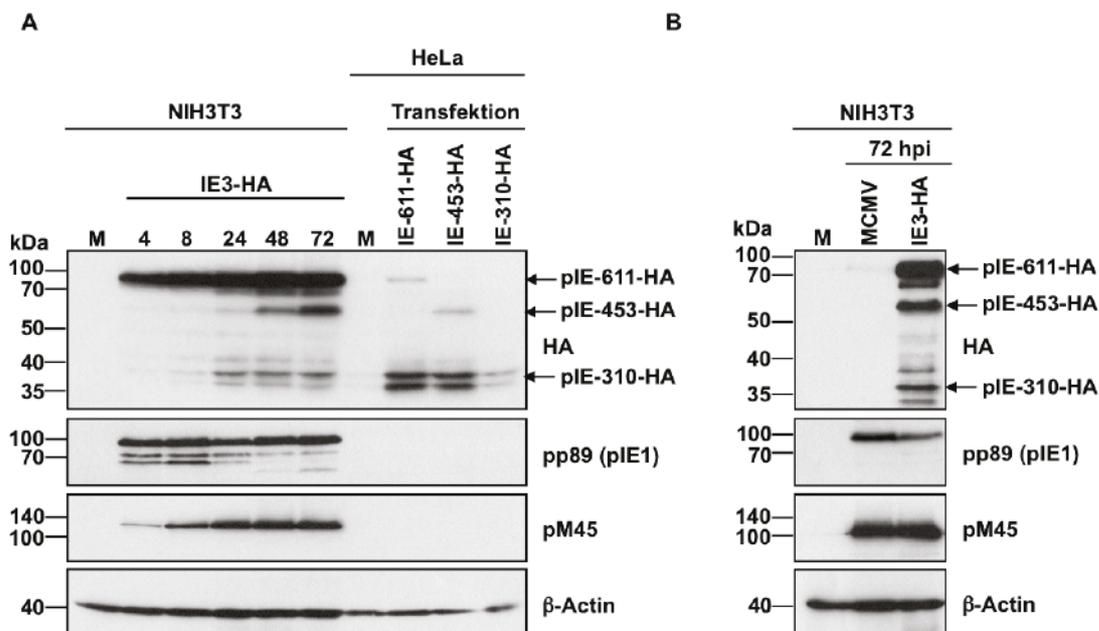
Abbildung 2.11 Überprüfung der IE3-HA-Mutante.

**A)** Der *EcoRI*-Kontrollverdau mit anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung von wt- und IE3-HA-Bacmid- und -Virus-DNA zeigte das erwartete Restriktionsmuster. Das 12662 bp große *EcoRI*-Fragment der wt-Bacmid- und Virus-DNA wurde in der IE3-HA-Mutante erwartungsgemäß in zwei Fragmente (11728 bp und 1102 bp) geschnitten. Der rote Pfeil markiert das 1102 bp große Fragment, das sich aufgrund der Insertion der HA-Epitop-Sequenz vom wt-Restriktionsmuster unterscheidet. **B)** Mit Hilfe einer *ie3*- bzw. *ie1*-spezifischen Sonde konnten die DNA-Fragmente beider *ie*-Gene im Southern-Blot nachgewiesen werden. Die *ie1*- sowie die *ie3*-spezifische-Sonde hybridisiert mit dem 12662 bp großen Fragment der *EcoRI*-geschnittenen wt-DNA, während beide Sonden an das 11728 bp große Fragment der verdauten IE3-HA-DNA binden. **C)** Die Amplifikation eines spezifischen PCR-Produkts nach Verwendung eines IE3 *forward* und eines HA *reverse* Primers mit Bacmid-, Virus- und Plasmid-DNA (K<sup>+</sup>) als Template beweist die erfolgreiche Insertion der HA-Sequenz. K<sup>-</sup> kennzeichnet die H<sub>2</sub>O-Negativkontrolle.

Daraufhin wurden NIH3T3-Zellen mit dem IE3-HA Virus infiziert (MOI 2) und 4, 8, 24, 48 und 72 hpi Protein-Lysate hergestellt. Als Spezifitäts- und Größenkontrolle wurden HeLa-Zellen mit den IE3-Isoform-Expressionsplasmiden transient transfiziert und ebenfalls Protein-Lysate hergestellt. Die Lysate wurden mittels Bradford-Messung normalisiert, durch PAGE aufgetrennt und mit Hilfe einer Immunoblot Analyse untersucht.

Die Detektion mit einem HA-spezifischen Antikörper ergab mehrere Banden in den IE3-HA-infizierten NIH3T3-Zellen (Abbildung 2.12 A). Am stärksten wurde ein 88 kDa

Protein exprimiert, das von 4-72 hpi detektierbar war. Dieses Protein entspricht in Größe und Expressionskinetik dem annotierten pIE3 (pIE-611) (Messerle et al., 1992). Bestätigt wurde dies durch das Lysat, bei dem das pIE-611-exprimierende Plasmid transfiziert wurde und ebenfalls ein 88 kDa Protein zu beobachten war (Abbildung 2.11 A; Spur IE-611-HA). Von 8-72 hpi konnte die IE-453-Proteinisoform nachgewiesen werden, wobei hier die Proteinmenge mit fortschreitender Infektionszeit zunahm. Sowohl im Viruskontext als auch nach Transfektion des Expressionsplasmids wies das pIE-453 eine Größe von ca. 60 kDa auf. Von der IE-310-Proteinisoform scheint es drei verschiedene Formen mit einer Größe zwischen 35 und 40 kDa zu geben. pIE-310 war ebenfalls von 8-72 hpi nachweisbar und die Proteinmenge nahm mit fortschreitender Infektionszeit zu (Abbildung 2.12 A).



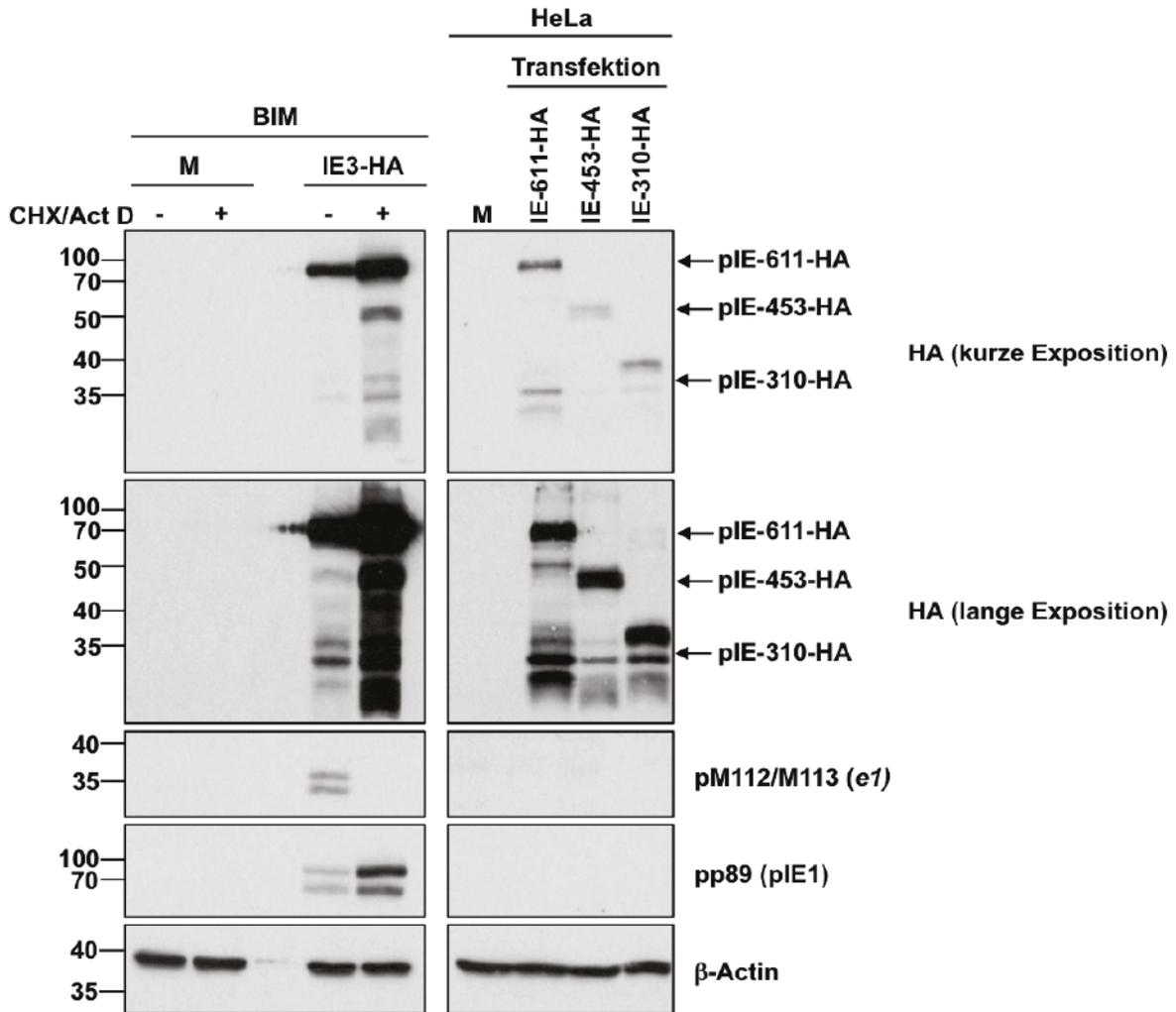
**Abbildung 2.12 Die Proteine IE-611, IE-453 und IE-310 werden von MCMV exprimiert.**

**A)** NIH3T3-Zellen wurden Mock-behandelt (M) oder mit IE3-HA Virus infiziert (MOI 2) und zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion Protein-Lysate hergestellt. Außerdem wurden HeLa-Zellen transient mit Expressionsplasmiden, die jeweils die HA-Epitop-markierte CDS einer *ie3*-Transkriptvariante enthalten, transfiziert (2 µg, ü.N.). Die Lysate wurden normalisiert, mit PAGE aufgetrennt und mittels Western-Blot Analyse untersucht. Die Proteine pIE-611 (88 kDa), pIE-453 (ca. 60 kDa) und pIE-310 (35-40 kDa) sind nach Detektion mit einem HA-spezifischen Antikörper in MCMV-infizierten Zellen nachweisbar. **B)** Als Spezifitätskontrolle für den HA-Antikörper gegenüber MCMV-Proteinen wurden zudem ein Mock-, ein wt-MCMV- und ein IE3-HA-Lysat mittels PAGE aufgetrennt und im Rahmen einer Immunoblot Analyse mit anti-HA-Antikörper detektiert. Der Nachweis von pp89 (pIE1) und pM45 diente als Infektionskontrolle; β-Actin fungierte als Ladekontrolle.

Auffällig ist zudem, dass sowohl von dem pIE-611- als auch von dem pIE-453-Expressionsplasmid zusätzlich die Transkriptvariante, die für die drei Formen des pIE-310 kodiert, generiert wird. Im Vergleich zu der starken IE-310-Expression, die in IE-611-HA- und IE-453-HA-transfizierten HeLa-Zellen nachgewiesen werden konnte, war die IE-310-Proteinmenge in IE-310-HA-transfizierten Zellen eher gering.

Um die Spezifität des HA-Antikörpers zu überprüfen, wurde in einer weiteren Western-Blot Analyse ein Mock-, ein wt-MCMV- und ein IE3-HA-Lysat (beide MOI 2; 72 hpi) miteinander verglichen. Wie zu erwarten, waren spezifische Proteinbanden nach Detektion mit einem anti-HA-Antikörper nur im Lysat mit der HA-markierten IE3-Virusmutante zu erkennen, wohingegen im Mock- und im wt-MCMV-Lysat kein Signal nachweisbar war (Abbildung 2.12 B). Der Nachweis von pp89 (pIE1) und pM45 erfolgte bei beiden Western-Blots als Infektionskontrolle. Die gleichmäßige Beladung der Gele wurde mit Hilfe von  $\beta$ -Actin kontrolliert. Es kann also geschlossen werden, dass MCMV die Proteine IE-611, IE-453 und IE-310 exprimiert und diese unterschiedliche Expressionskinetiken aufweisen.

Da somit gezeigt werden konnte, dass die drei IE3-Proteine vom Virus generiert werden, wurde im nächsten Schritt analysiert, ob die IE3-Proteinisoformen auch unter selektiven *immediate-early*-Bedingungen exprimiert werden. Deshalb wurden BIM-Zellen mit dem IE3-HA-Virus infiziert (MOI 5) und für 3 h mit dem Translationshemmer Cycloheximid (CHX) behandelt, um *ie*-Transkripte anzureichern. Im Anschluss wurde das CHX-Medium entfernt und die infizierten Zellen für weitere 4 h mit Actinomycin D-haltigem Medium inkubiert. Die Behandlung mit Actinomycin D (Act D) hemmt die Transkription, so dass nur die bereits vorhandenen Transkripte translatiert werden können, während die Transkription von *early*- und *late*-Genen inhibiert wird. Als Größenkontrolle erfolgte die Transfektion von HeLa-Zellen mit dem jeweiligen Expressionsplasmid für jede IE3-Isoform. Daraufhin wurden Proteinlysate hergestellt und die Proteinmengen mittels Bradford-Bestimmung normalisiert. Da die Transfektion von HeLa-Zellen mit dem IE-310-HA-Plasmid im vorherigen Experiment nur zu einer schwachen Expression des pIE-310 führte (Abbildung 2.12 A) wurde von diesem Lysat viermal mehr als von den Lysaten der IE-611-HA- bzw. IE-453-HA-transfizierten HeLa-Zellen auf das Gel aufgetragen, um die drei Formen des pIE-310 besser nachweisen zu können. Nach der SDS-PAGE wurde eine Western-Blot Analyse durchgeführt.



**Abbildung 2.13** Die IE-611-, IE-453- und IE-310-Proteine werden unter selektiven *immediate-early*-Bedingungen exprimiert.

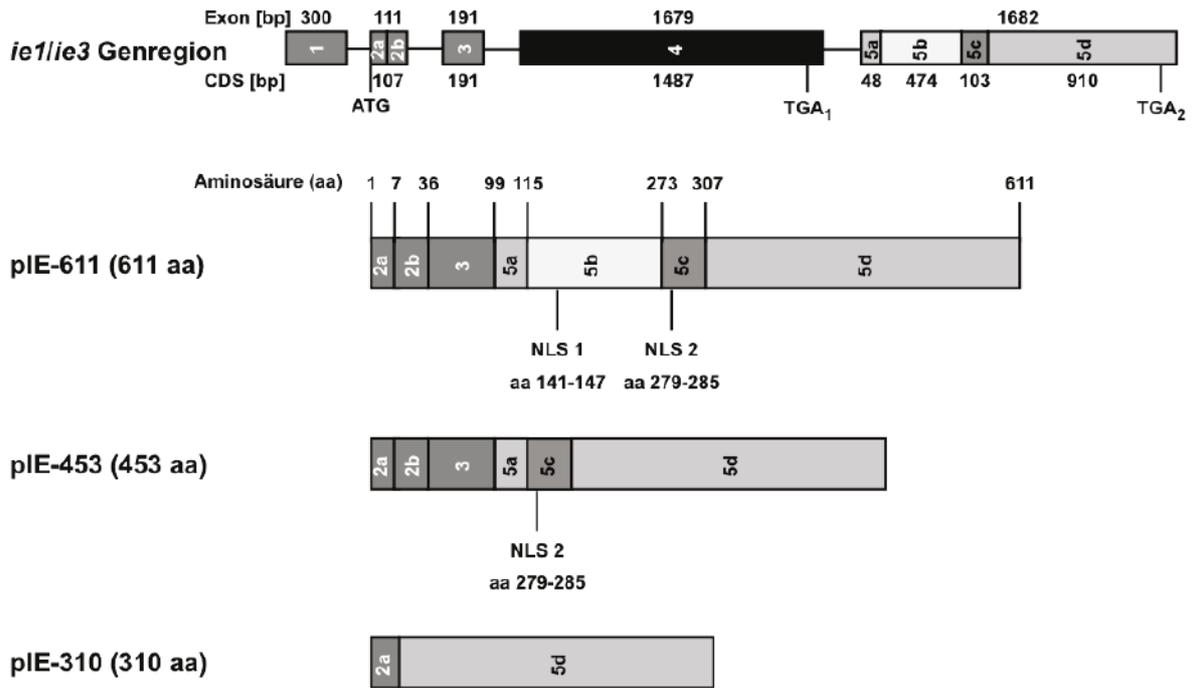
BIM-Zellen wurden mit dem IE3-HA-Virus infiziert (MOI 5) oder uninfiziert belassen (Mock = M). Zudem wurden uninfizierte oder IE3-HA-Virus-infizierte Zellen entweder unbehandelt belassen (CHX/Act D -) oder zunächst für 3 h mit CHX (100 µg/ml) inkubiert, um die Translation zu hemmen und dadurch *ie*-Transkripte anzureichern. Nach 3 h Behandlung wurde das CHX-enhaltende Medium entfernt und durch Act D-haltiges Medium (5 µg/ml) ersetzt und die Zellen für weitere 4 h inkubiert (CHX/Act D +). Als Protein-Größenkontrolle wurden HeLa-Zellen mit dem jeweiligen Expressionsplasmid für jede IE3-Isoform transfiziert (2 µg; ü.N.). Daraufhin erfolgte die Herstellung von Protein-Lysaten, die durch Bradford-Bestimmung normalisiert wurden. Von dem Lysat der IE-310-HA-transfizierten HeLa-Zellen wurde viermal mehr als von den Lysaten der IE-611-HA- bzw. IE-453-HA-transfizierten HeLa-Zellen auf das Gel aufgetragen, um pIE-310 besser nachweisen zu können. Abschließend wurden die Proteine mit SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Immunoblot Analyse untersucht. Mit Hilfe des HA-Antikörpers wurden die einzelnen IE3-Proteinvarianten dargestellt. Die Detektion von pM112/M113 (*e1*) diente als Nachweis für die Wirksamkeit der CHX/Act D-Behandlung. pp89 (pIE1) und  $\beta$ -Actin fungierten als Infektions- bzw. Ladekontrolle.

Die Detektion mit HA-Antikörper zeigte sowohl in unbehandelten, als auch in CHX/Act D-behandelten IE3-HA-infizierten Zellen die Expression des IE-611-, IE-453- und des IE-310-Proteins (Abbildung 2.13). Dabei war in den CHX/Act D-

behandelten Zellen eine Anreicherung aller IE3-Proteinisoformen zu beobachten, wodurch bestätigt wurde, dass die drei Proteine unter *immediate-early*-Bedingungen exprimiert werden.

Die Wirksamkeit der CHX/Act D-Behandlung wurde mit Hilfe eines pM112/M113 (*e1*)-spezifischen Antikörpers überprüft. Die *e1*-Transkription hängt von der Expression der IE-Proteine ab. Die Act D-vermittelte Transkriptionshemmung (nach 3 h CHX) erlaubt zwar die Expression der IE-Proteine, aber nicht die Transkription der transaktivierten *early*-Gene. Entsprechend war ausschließlich in unbehandelten und infizierten Zellen pM112/M113 (*e1*)-Expression detektierbar, wohingegen in CHX/Act D-behandelten, infizierten Zellen kein *M112/M113 (e1)*-Genprodukt zu beobachten war. Demzufolge war die CHX/Act D-Behandlung erfolgreich und ausschließlich *immediate-early*-exprimierte Proteine konnten gebildet werden. Als Infektionskontrolle wurde das pp89 (IE1)-Protein detektiert, das wie erwartet nur in infizierten Zellen nachweisbar war. Auch hier konnte durch die Hemmung der Translation mit anschließender Inhibition der Transkription die IE1-Proteinmenge erhöht werden. Als Nachweis für eine gleichmäßige Gelbeladung diente  $\beta$ -Actin. Die Spezifität aller Antikörper wurde durch die Abwesenheit von Virus-spezifischen Protein-Banden in Mock-Zellen gezeigt.

Die Abbildung 2.14 veranschaulicht den Aufbau, der neu identifizierten IE3-Proteine mit Hilfe einer schematischen Darstellung. Das annotierte pIE-611 besteht aus 611 Aminosäuren und weist zwei putative Signalsequenzen für die nukleäre Lokalisation (NLS) auf (NLS 1 aa 141-147 und NLS 2 aa 279-285) (Messerle et al., 1992). Das pIE-453 umfasst 453 Aminosäuren und weist die NLS 2 auf, wohingegen das IE-310-Protein aus 310 aa besteht und keine vorhergesagte Signalsequenz für die nukleäre Lokalisation aufweist.

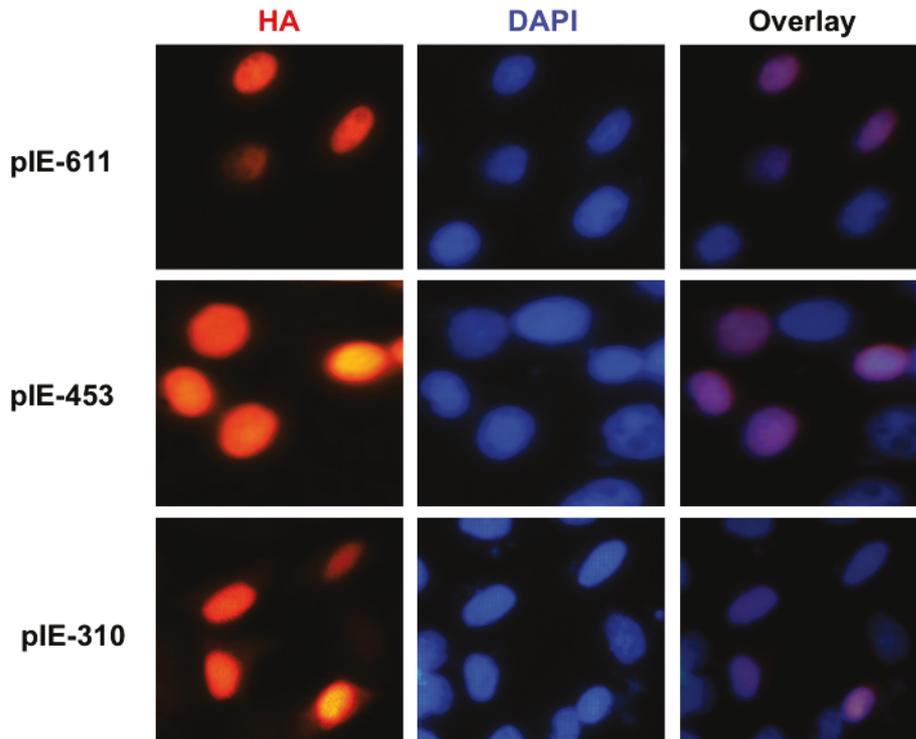


**Abbildung 2.14** Schematische Darstellung der MCMV Proteine pIE-611, pIE-453 und pIE-310.

Das annotierte pIE-611 besteht aus 611 Aminosäuren (aa). Das pIE-611 besitzt zwei putative Signalsequenzen für die nukleäre Lokalisation (NLS 1 aa 141-147 und NLS 2 aa 279-285) (Messerle et al., 1992). Das pIE-453 umfasst 453 aa und weist die NLS 2 auf, wohingegen pIE-310 aus 310 aa besteht und keine vorhergesagte Signalsequenz besitzt.

### 2.3.4 Analyse der subzellulären Lokalisation der IE3-Proteinisoformen

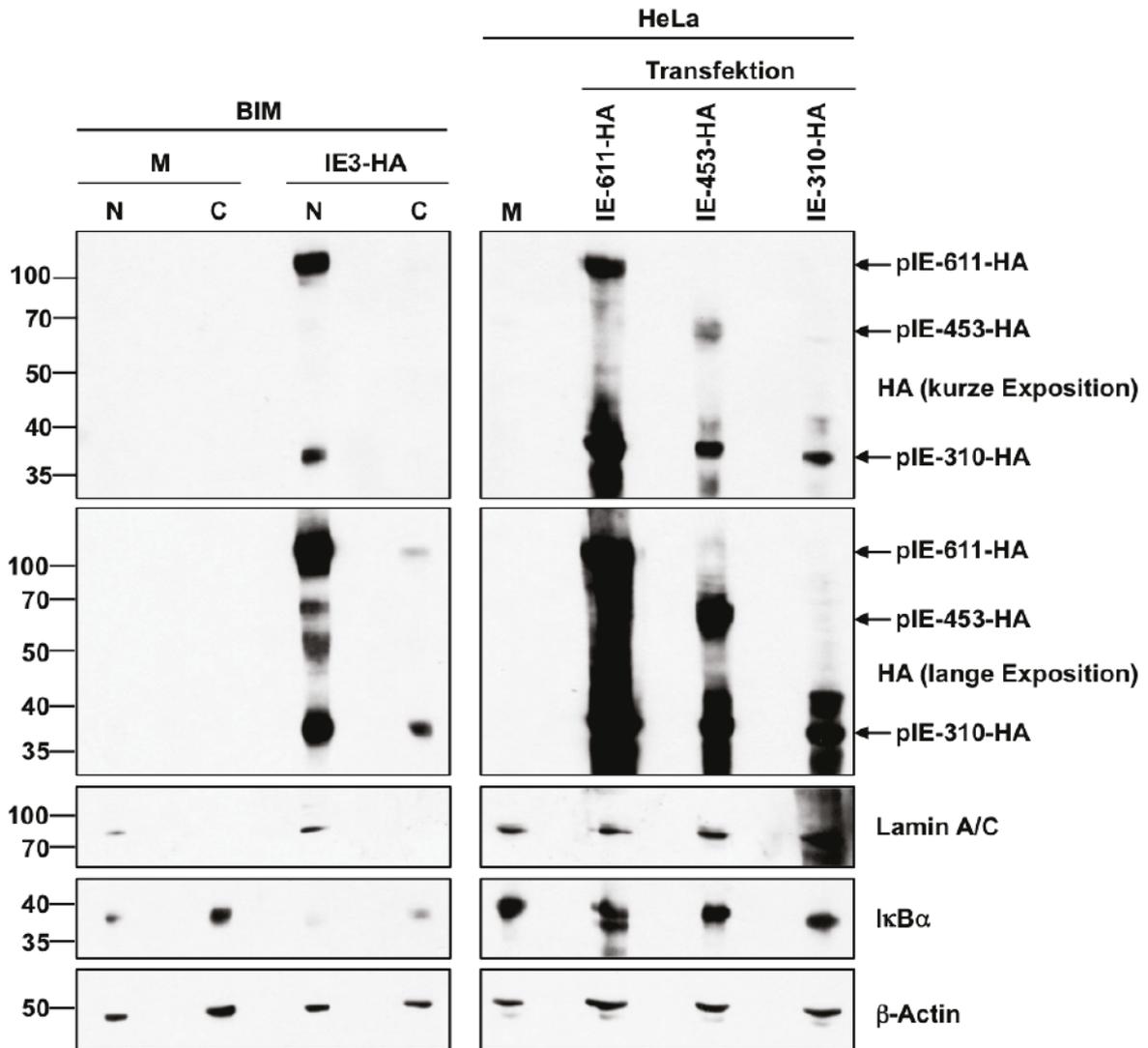
Das IE-611-Protein besitzt zwei putative *nuclear localization sequences* (NLS 1 und NLS 2; Abbildung 2.14) und ist auch als hauptsächlich nukleär-lokalisiertes Protein beschrieben (Tang et al., 2005). Um die subzelluläre Lokalisation der neu identifizierten IE-453- und IE-310-Proteinisoformen zu analysieren, wurden HeLa-Zellen mit den Expressionsplasmiden, die jeweils die HA-markierte CDS einer IE3-Isoform enthalten, transient transfiziert. Anschließend erfolgte eine Immunfluoreszenz-Färbung mit HA-spezifischem Antikörper und die Gegenfärbung der Nuklei mit DAPI (Abbildung 2.15). Die Analyse der Immunfluoreszenz-Färbung ergab, dass sich das IE-611-Protein, wie erwartet, hauptsächlich im Nukleus der Zellen befindet, was mit Hilfe des Overlays der HA- und DAPI-Färbung gut zu erkennen ist. Das pIE-453 wies ebenfalls eine überwiegend nukleäre Lokalisation auf. Erstaunlicherweise konnte das IE-310-Protein trotz der Abwesenheit der NLS 1 und 2 ebenfalls im Kern nachgewiesen werden. Die cytoplasmatische Färbung des pIE-310 war aber im Vergleich zu pIE-611 und -453 ausgeprägter (Abbildung 2.15).



**Abbildung 2.15** Die Proteine IE-611, IE-453 und IE-310 sind hauptsächlich nukleär lokalisiert.

HeLa-Zellen wurden mit den verschiedenen IE3-Expressionsplasmiden transfiziert (0,3 µg; ü.N). Anschließend wurden die Zellen mit 3 % Paraformaldehyd fixiert, mit 0,1 % TritonX permeabilisiert und mit 2% Ziegen Serum/PBS inkubiert. Um die HA-Epitop-markierten IE3-Proteinisoformen zu färben, wurden die Zellen zunächst 60 min mit HA-Primärantikörper und darauf für 45 min mit Cy3-gekoppeltem Sekundärantikörper inkubiert. Abschließend erfolgte die Gegenfärbung mit DAPI.

Um die subzelluläre Lokalisation im Virus-Kontext zu überprüfen, wurden BIM-Zellen mit dem IE3-HA-Virus infiziert (MOI 5). Da eine Immunfluoreszenz-Färbung mit dem HA-markierten Virus immer alle drei IE3-Proteinisoformen gleichzeitig anfärben würde, wäre eine Unterscheidung der einzelnen Proteine unmöglich. Deshalb wurden 48 hpi fraktionierte Protein-Lysate hergestellt, wobei die cytoplasmatische von der nukleären Proteinfraction getrennt wurde, indem die (infizierten) Zellen zunächst mit einem cytoplasmatischen und anschließend mit einem nukleoplasmatischen Lysepuffer aufgeschlossen wurden. Wiederum wurden HeLa-Zellen mit den IE3-Expressionsplasmiden als Größenkontrolle transfiziert. Nach der Proteinmengen-Normalisierung durch Bradford-Bestimmung erfolgte die elektrophoretische Auftrennung mit Hilfe eines SDS-Gels, worauf sich eine Western-Blot Analyse anschloss (Abbildung 2.16).



**Abbildung 2.16** Die IE-611-, IE-453- und IE-310-Proteine weisen in infizierten Zellen eine hauptsächlich nukleäre Lokalisation auf.

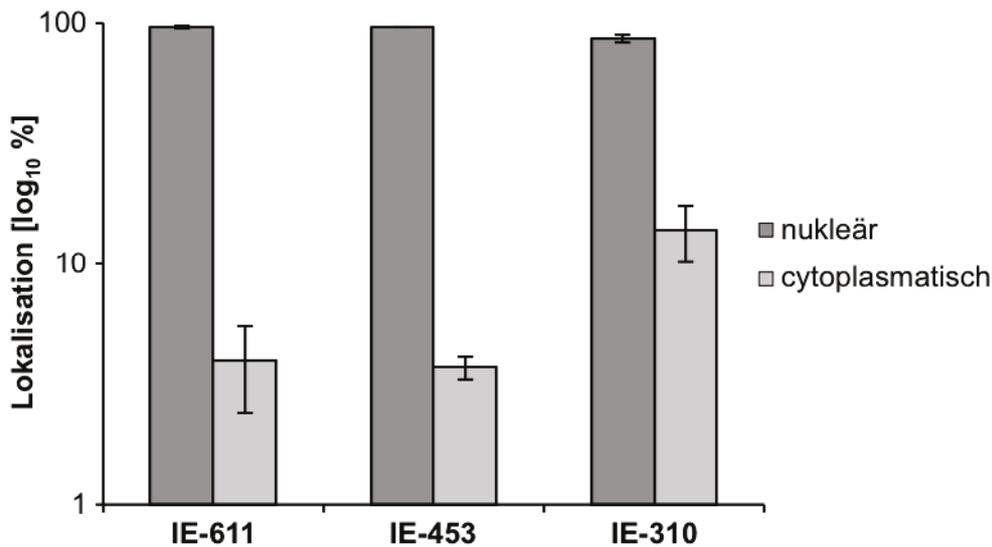
BIM-Zellen wurden unbehandelt belassen oder mit dem IE3-HA-Virus infiziert (MOI 5). 48 hpi erfolgte die Herstellung von fraktionierten Protein-Lysaten, wobei die nukleäre (N) von der cytoplasmatischen (C) Proteinfraction getrennt wurde, indem die (infizierten) Zellen zunächst mit cytoplasmatischem und anschließend mit nukleoplasmatischem Lysepuffer aufgeschlossen wurden. Zudem wurden als Größenkontrollen HeLa-Zellen mit den IE3-Expressionsvektoren transfiziert (2 µg; ü.N). Im Fall der transfizierten HeLa-Zellen wurden Gesamtzell-Lysate hergestellt. Nach der Normierung der Proteinmengen (Bradford-Bestimmung) wurden die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Immunoblot Analyse untersucht. HA-Antikörper wurde zum Nachweis der IE3-Proteinisofornen eingesetzt. Als Kontrolle für die Trennung der Proteinfractionen wurde einerseits das nukleär-lokalisierte Protein Lamin A/C und andererseits das cytoplasmatisch-lokalisierte Protein IκBα detektiert. β-Actin diene als Ladekontrolle.

HA-Signale konnten (nach einer kurzer Exposition der Membran) ausschließlich in den nukleären Lysaten (N-Lysate) von IE3-HA-infizierten Zellen nachgewiesen werden. Die Signale entsprachen den Protein-Größen der jeweiligen transfizierten Isoform (siehe Spuren HeLa Transfektion). Das abundanteste Protein war pIE-611.

Die Proteinmenge von pIE-310 war etwas geringer, wohingegen fast keine pIE-453-Expression beobachtet werden konnte. Nach einer längeren Exposition der Membran waren die IE-611- und IE-310-Proteine sowohl in der nukleären als auch in der cytoplasmatischen Fraktion detektierbar, wobei im nukleären Lysat jeweils eine stärkere Proteinexpression zu erkennen war. Die pIE-453-Expression blieb auf den Nukleus beschränkt und resultierte in den geringsten Proteinmengen.

Um die Trennung der nukleären von der cytosolischen Proteinfraction zu kontrollieren, wurde Lamin A/C-Protein, das im Nukleus lokalisiert ist, detektiert. Lamin A/C konnte nur in den N-Lysaten der BIM-Zellen nachgewiesen werden. Als Kontrolle für ein cytoplasmatisch-lokalisiertes Protein wurde  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  ausgewählt. In diesem Fall waren sowohl in den nukleären, als auch in den cytoplasmatischen Lysaten der BIM-Zellen Banden zu erkennen. Die  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Signalintensität war aber in den C-Lysaten eindeutig stärker, was darauf hindeutet, dass in den N-Lysaten nur geringe Mengen der cytosolischen Proteinfraction enthalten waren. Die Spuren der transfizierten HeLa-Zellen entsprechen Gesamtprotein-Lysaten, d.h. hier erfolgte keine Separierung der Proteinfractionen.  $\beta$ -Actin fungierte als Ladekontrolle.

Um eine prozentuale Verteilung der N- und C-Proteinmenge für jede IE3-Proteinisofom berechnen zu können, wurde die mit anti-HA Antikörper entwickelte Membran aus Abbildung 2.16 mit Hilfe des ChemoCam Imagers (INTAS) detektiert und die Bandenintensität unter Verwendung der Software Gel Image 1D (INTAS) gemessen. Bei der quantitativen Auswertung wurde die Summe des N- und C-Signals je IE3-Proteinisofom als 100% festgelegt. Der jeweilige Intensitätsanteil der N- bzw. C-Proteinmenge wurde dann in Bezug zu der Signalsumme in Prozent berechnet. Diese Berechnung erfolgte jeweils für drei unterschiedlich starke Expositionen der Membran (Daten nicht gezeigt). In Abbildung 2.17 ist der nukleäre bzw. cytoplasmatische Proteinmengen-Anteil in  $\log_{10}$  Prozent der Gesamtproteinmenge dargestellt. Die Quantifizierung ergab, dass das IE-611- bzw. IE-453-Protein je zu 96% im Nukleus und zu 4% im Cytoplasma lokalisiert ist. Dem cytoplasmatischen pIE-453-Anteil von 4% liegt eine Signalintensität zu Grunde, die zwar mit der Gel Image 1D Software detektiert werden konnte, aber auf dem entwickelten Film nicht zu erkennen war. Das pIE-310 weist im Vergleich zu pIE-611 und pIE-453 einen geringeren nukleären Proteinanteil von 86% auf und ein entsprechend größerer Teil des Proteins (14%) ist cytoplasmatisch lokalisiert (Abbildung 2.17).



**Abbildung 2.17 Quantifizierung des IE3-Proteinisoformen-Anteils im Nukleus bzw. Cytoplasma.**

Die mit HA-Antikörper entwickelte Membran aus Abb. 2.16 wurde mit dem ChemoCam Imager (INTAS) detektiert und die Signalintensität mit Hilfe des Programmes Gel Image 1D (INTAS) quantifiziert. Für die Auswertung wurde die Summe der N- und C-Signalintensität jeder IE3-Proteinisoform gebildet und als 100% festgelegt und der prozentuale Anteil des jeweiligen N- bzw. C-Signals berechnet. Diese Auswertung erfolgte für drei unterschiedlich starke Expositionen der Membran. Dargestellt sind die gebildeten Mittelwerte aus den drei Einzelmessungen bezogen auf die Gesamtsignal-Intensität je Proteinisoform in log<sub>10</sub> %.

Abschließend wurden die Daten der Immunfluoreszenz-Färbung und der quantitativen Auswertung der N- und C-Proteinmenge mit den Vorhersagen des WoLF PSORT-Algorithmus (<http://wolffpsort.org>) verglichen. Dieses Programm sagt anhand von *Sorting* Signal Motiven und der Aminosäuren-Komposition eines Proteins dessen Lokalisation innerhalb der Zelle mit einer Genauigkeit von ca. 70% voraus (Horton et al., 2007). Je höher der Wert, desto wahrscheinlicher ist das Protein innerhalb des jeweiligen Zell-Kompartiments lokalisiert.

Die Vorhersagen für die Lokalisation der einzelnen IE3-Proteinisoformen sind in der Tabelle 2.1 zusammengefasst. Insgesamt ergaben die Vorhersagen für das pIE-611 und pIE-453 eine Lokalisation hauptsächlich im Nukleus, wobei aber die Zirkulation zwischen Nukleus und Cytoplasma möglich ist (Werte bei 17). Laut Vorhersage von WoLF PSORT befindet sich das pIE-310 hauptsächlich im Cytoplasma (Wert 17,5). Dies stimmt nicht mit den Immunfluoreszenz- und den Western-Blot-Befunden überein, in denen eine stärkere pIE-310-Expression im Nukleus und eine schwächere Expression im Cytoplasma detektiert wurde. Allerdings ist der Wert für eine Lokalisation sowohl im Nukleus als auch im Cytoplasma mit einem Wert von 15 nur geringfügig niedriger.

Protein	Berechnete Werte des WoLF PSORT-Algorithmus		
	Nukleus	Nukleus und Cytoplasma	Cytoplasma
pIE-611	26	17	6
pIE-453	21	17	11
pIE-310	11,5	15	17,5

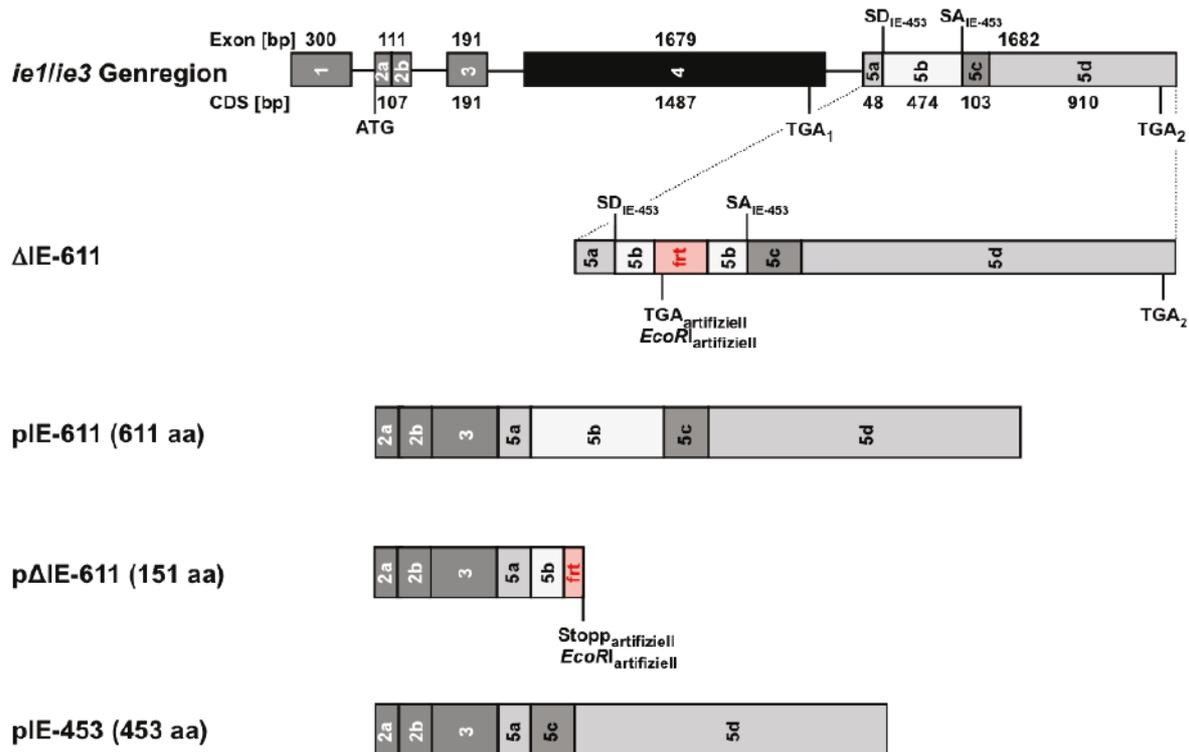
**Tabelle 2.1: Vorhersage des WoLF PSORT-Algorithmus für die subzelluläre Lokalisation der IE3-Proteine.** Der Algorithmus sagt anhand von *Sorting* Signal-Motiven und der Aminosäure-Zusammensetzung von Proteinen deren subzelluläre Lokalisation mit einer Genauigkeit von 70% vorher. Je höher der Wert, desto wahrscheinlicher ist das Protein im jeweiligen Zell-Kompartiment lokalisiert.

### 2.3.5 Generierung einer $\Delta$ IE-611-Virusmutante

Die Untersuchung des  $\Delta$ ie3-Virus war bis jetzt nur auf komplementierenden Zellen möglich, da die Deletion des *ie3*-Gens in einem replikationsinkompetenten Virus resultiert (Angulo et al., 2000). Die genaue Analyse der Sequenz, welche die Arbeitsgruppe um Angulo et al. für die Generierung des  $\Delta$ ie3-Virus entfernt hat, ergab allerdings, dass von dieser Deletion alle drei, der in dieser Arbeit beschriebenen, *ie3*-Transkript- und damit auch die Proteinisoformen betroffen sind. Um einzugrenzen, welche der drei IE3-Proteinisoformen für das Viruswachstum essentiell ist, wurde eine Mutante kloniert, die ausschließlich eine defiziente pIE-611-Expression aufweist.

Wie bereits in Abschnitt 2.3.3 erwähnt, besteht der Unterschied zwischen dem IE-611- und dem IE-453-Transkript im Ein- bzw. Ausschluss der Sequenz des Exons 5b (Abbildung 2.9 und 2.14). Um eine spezifische Mutation innerhalb des pIE-611-kodierenden Transkripts zu erzielen, wurde deshalb die Exon 5b-Sequenz der *ie3*-Genregion mit Hilfe von Bacmid-Mutagenese deletiert (Abbildung 2.18). Dabei wurden jeweils 100 bp *downstream* vom IE-453-Spleißdonor ( $SD_{IE-453}$ ) und 100 bp *upstream* vom IE-453-Spleißakzeptor ( $SA_{IE-453}$ ) unverändert belassen. Damit wurde sichergestellt, dass die Spleißstellen und die Sequenzumgebung, die bei der Generierung der IE-453-Transkriptvariante eine Rolle spielen, weiterhin funktionell sind. Die Deletion von 226 Nukleotiden innerhalb des Exons 5b und die Insertion eines artifiziellen TGA (Stopp-Kodon) sollte sicherstellen, dass das Leseraster des  $\Delta$ IE-611-ORFs verschoben wird und falls ein Protein entstehen sollte, dessen Translation zusätzlich durch das artifizielle Stopp-Kodon frühzeitig beendet wird. Die artifizielle *EcoRI*-Restriktionsschnittstelle wurde inseriert, um die  $\Delta$ IE-611- von der

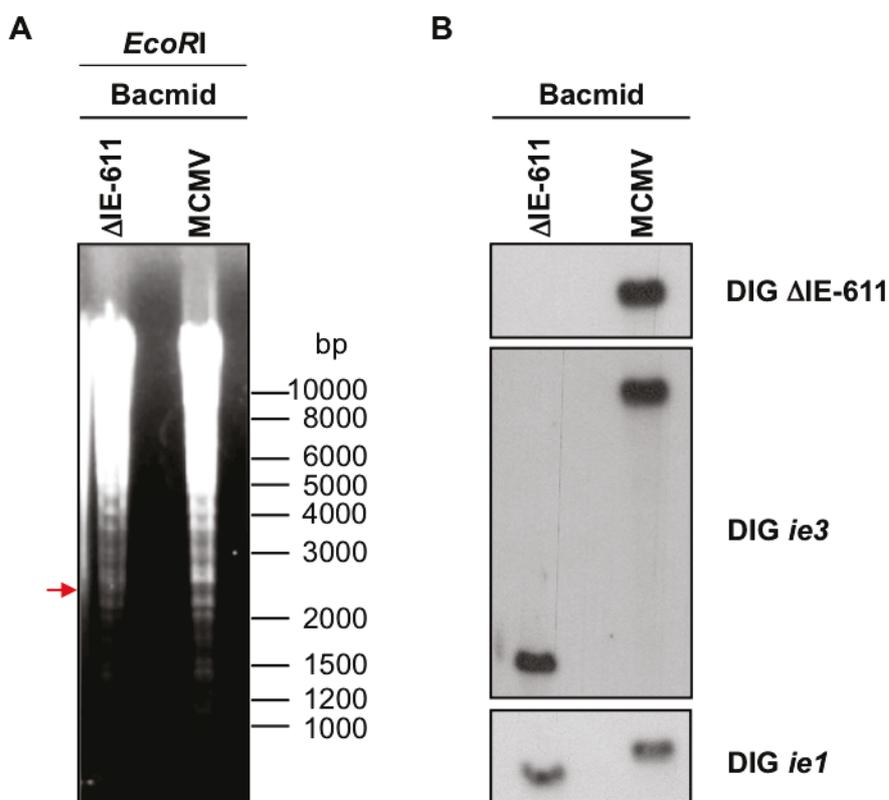
wt-Sequenz sowohl im Bacmid als auch später im Virus unterscheiden zu können, da ansonsten ein Größenunterschied von 226 bp z.B. auf einem Agarose-Gel nur schwer erkennbar gewesen wäre. Die  $\Delta$ IE-611-Mutante wurde mit Hilfe von homologer Rekombination generiert. Nach der Entfernung des Antibiotikum-Resistenzgens (in diesem Fall Kanamycin) blieben Sequenzreste der *frt*-Rekombinationsstellen in der klonierten Mutante erhalten (*frt*) (Abbildung 2.18).



**Abbildung 2.18** Schematische Darstellung der klonierten  $\Delta$ IE-611-Mutante.

Der Unterschied zwischen den pIE-611- und pIE-453-kodierenden Transkripten besteht im Ein- bzw. Ausschluss des Exons 5b. Um die  $\Delta$ IE-611-Deletionsmutante zu klonieren, wurden mit Hilfe von Bacmid-Mutagenese 226 bp innerhalb des Exons 5b deletiert. Dabei wurde sichergestellt, dass die Spleißstellen und die Sequenzumgebung, die für die Generierung des pIE-453-kodierenden Transkripts essentiell sind, weiterhin funktionell sind, indem 100 bp stromabwärts vom Spleißdonor (SD<sub>IE-453</sub>) und 100 bp stromaufwärts vom Spleißakzeptor (SA<sub>IE-453</sub>) in der Sequenz erhalten blieben. Die Deletion von 226 bp resultiert in einer Verschiebung des Leserasters bei der Translation des p $\Delta$ IE-611-kodierenden Transkripts. Falls das  $\Delta$ IE-611-Protein trotz Leseraster-Verschiebung translatiert werden sollte, wurde zudem ein artifizielles TGA in die Sequenz eingefügt, um einen frühzeitigen Translationsabbruch zu bewirken. Nach der Deletion mittels homologer Rekombination, blieben Sequenzreste der *frt*-Rekombinationsstellen in der Sequenz zurück. Um das wt-Virus von der Deletionsmutante unterscheiden zu können, wurde eine artifizielle *EcoRI*-Schnittstelle inseriert.

Um die Deletion zu kontrollieren, wurde  $\Delta$ IE-611- und wt-Bacmid-DNA mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* verdaut und mit Hilfe eines Agarose-Gels elektrophoretisch aufgetrennt. Die Deletionsmutante wies das erwartete Bandenmuster in der Restriktionsanalyse auf (Abbildung 2.19 A). Im Rahmen einer Southern-Blot Analyse wurde die *EcoRI*-geschnittene wt- und  $\Delta$ IE-611-Bacmid-DNA mit einer spezifischen DIG-markierten Sonde, die innerhalb der deletierten Sequenz bindet (DIG  $\Delta$ IE-611), einer *ie3*-spezifischen Sonde (die in einem Bereich bindet, der nicht deletiert wurde) und einer DIG-*ie1*-Sonde untersucht (Abbildung 2.19 B).



**Abbildung 2.19** Kontrollgel und Southern-Blot der  $\Delta$ IE-611-Mutante.

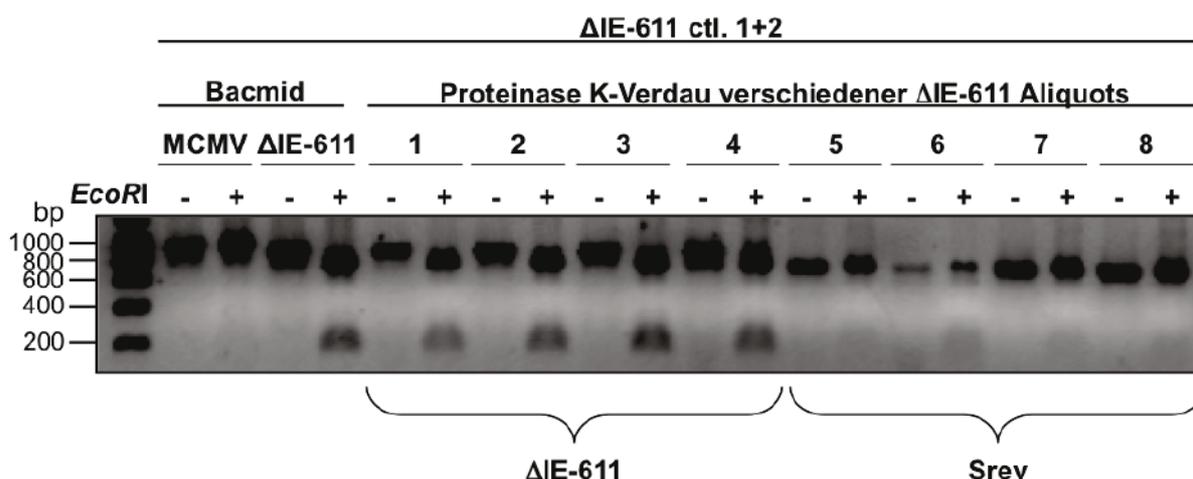
**A)**  $\Delta$ IE-611- und wt-Bacmid-DNA, wurden mit *EcoRI* verdaut und anschließend per Gelelektrophorese aufgetrennt. Das 12662 bp Fragment der *EcoRI*-geschnittenen wt-Bacmid-DNA wird in der  $\Delta$ IE-611-Bacmid-DNA in zwei Fragmente mit Größen von 10319 bp und 2277 bp (mit rotem Pfeil markiert) geschnitten. **B)** Southern-Blot Analyse von  $\Delta$ IE-611- und wt-Bacmid-DNA mit einer Sonde, die innerhalb der deletierten Exon 5b-Sequenz hybridisiert (DIG  $\Delta$ IE-611), und einer Sonde, die *downstream* der deletierten Sequenz bindet (DIG *ie3*). Die Detektion mit einer DIG *ie1*-Sonde diente als Nachweis für die Präsenz der *ie1* Exon 4-Sequenz. Die  $\Delta$ IE-611-Sonde sowie die *ie1*- und die *ie3*-Sonde hybridisieren mit dem 12662 bp Fragment der wt-Bacmid-DNA, während die *ie1*-Sonde an das 10319 bp Fragment und die *ie3*-Sonde an das 2277 bp Fragment der  $\Delta$ IE-611-Bacmid-DNA bindet.

Mit Hilfe der DIG  $\Delta$ IE-611-Sonde konnte in der Spur mit wt-DNA ein klares Signal detektiert werden, wohingegen keine Hybridisierung bei der  $\Delta$ IE-611-Mutante ersichtlich war. Somit war die vorgesehene Sequenz innerhalb des Exons 5b im  $\Delta$ IE-611-Bacmid erfolgreich deletiert worden. Bei Verwendung der *ie3*-spezifischen Sonde war in beiden Spuren ein deutliches Signal sichtbar. Der Größenunterschied zwischen beiden Spuren ist durch die Deletion in der  $\Delta$ IE-611-Mutante und durch die zusätzliche artifizielle *EcoRI*-Schnittstelle zu erklären, wodurch das Fragment kleiner wird. Diese Daten deuten darauf hin, dass die *ie3*-Sequenz, die *downstream* der Deletion liegt, vorhanden ist und somit die Isoformen IE-453 und IE-310 weiterhin exprimiert werden sollten. Als Kontrolle wurde anschließend mit einer *ie1*-spezifischen Sonde hybridisiert, um sicherzustellen, dass die *ie1*-spezifische Sequenz noch erhalten ist. Eine Veränderung war nicht zu erkennen, da sowohl in der wt- als auch in der  $\Delta$ IE-611-Spur eine eindeutige Bande detektierbar war. Der *ie1*-Fragment-Größenunterschied zwischen wt- und  $\Delta$ IE-611-Spur ist auch in diesem Fall auf die artifizielle *EcoRI*-Schnittstelle in der  $\Delta$ IE-611-Mutante im benachbarten *ie3*-Gen zurückzuführen (Abbildung 2.19 B).

Nach der Überprüfung der  $\Delta$ IE-611-Mutante wurde die Bacmid-DNA in BIM-Zellen transfiziert. Überraschenderweise war es möglich, das  $\Delta$ IE-611-Virus zu rekonstituieren, was darauf hindeutete, dass das Vorhandensein der IE-611-Proteinisoform nicht essentiell für das Viruswachstum ist. Nach der Generierung eines Virus-Stocks wurden BIM-Zellen infiziert und aus den infizierten Zellen 6 hpi RNA isoliert. Diese wurde als Template für eine RT-PCR mit *ie3*-spezifischen Primern (*ie3 forward* und *reverse*) verwendet, um das  $\Delta$ IE-611-Transkript zu amplifizieren. Das PCR-Produkt wurden mit Hilfe eines Agarose-Gels elektrophoretisch aufgetrennt, die Bande ausgeschnitten und die DNA isoliert. Die DNA wurde mittels Topo/TA-Ligation in einen Expressionsvektor kloniert und anschließend sequenziert. Die Sequenz-Analyse bestätigte die korrekte Deletion der 226 bp innerhalb des Exons 5b in der  $\Delta$ IE-611-Virus-Mutante.

Beim Vergleich des  $\Delta$ IE-611- mit dem wt-Virus war im Mikroskop visuell ein Wachstumsnachteil des Deletionsvirus zu erkennen. Dieser Nachteil wurde aber mit zunehmender Virus-Passage und bei der Generierung von verschiedenen Virus-Stocks geringer. Um das  $\Delta$ IE-611-Virus auf mögliche Veränderungen zu untersuchen, wurde Gesamt-DNA mittels Proteinase K-Verdau und anschließender Phenol/Chloroform-Aufreinigung aus verschiedenen  $\Delta$ IE-611-Virus Aliquots isoliert.

Diese DNA wurde als Template für eine PCR mit  $\Delta$ IE-611-Kontroll-Primern ( $\Delta$ IE-611 ctl. 1 und 2), die stromauf- und stromabwärts der Deletion binden, verwendet. Das PCR-Produkt unter Verwendung von  $\Delta$ IE-611-DNA als Template ist 876 bp groß (wt-PCR-Produkt = 942 bp). Die DNA wurde mit Isopropanol gefällt, mit 70 % Ethanol gewaschen und in 20  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und anschließend auf zwei Aliquots à 10  $\mu$ l aufgeteilt. Die eine Hälfte des PCR-Produktes wurde unbehandelt belassen, die andere Hälfte wurde mit *Eco*RI verdaut, da sich in der amplifizierten  $\Delta$ IE-611-Sequenz die artifizielle *Eco*RI-Schnittstelle befindet. Nach dem Verdau wurden beide Proben der verschiedenen Virus-Passagen/Stocks (Aliquots 1-8) mit Hilfe von Gelelektrophorese aufgetrennt (Abbildung 2.20).



**Abbildung 2.20 PCR und Restriktionsanalyse von Bacmid-DNA sowie von DNA aus verschiedenen  $\Delta$ IE-611-Virus-Aliquots.**

Gesamt-DNA aus verschiedenen  $\Delta$ IE-611-Virus-Aliquots wurde mit Hilfe eines Proteinase K-Verdau und anschließender Phenol/Chloroform Extraktion isoliert. Diese DNA oder Bacmid-DNA diente als Template für eine PCR mit  $\Delta$ IE-611-Kontroll-Primern ( $\Delta$ IE-611 ctl 1+2). Die PCR-Produkte wurden mit Isopropanol gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen, in 20  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und auf zwei Aliquots à 10  $\mu$ l aufgeteilt. Die eine Hälfte blieb unbehandelt, während die andere Hälfte des PCR-Produktes mit *Eco*RI verdaut wurde. Nach dem Verdau erfolgte die gelelektrophoretische Auftrennung. Das unverdaubare wt-PCR Produkt weist eine Größe von 942 bp auf. Der *Eco*RI-Verdau der PCR-Produkte mit  $\Delta$ IE-611-Bacmid- oder Virus-DNA der Aliquots 1-4 als Template führte erwartungsgemäß zu zwei Fragmenten mit Größen von 732 bp und 144 bp. Überraschenderweise war nach dem Restriktionsverdau der PCR-Produkte mit DNA der Virus Aliquots 5-8 (Srev) als Template sehr wenig bzw. kein 144 bp Fragment nachweisbar.

In den Spuren der (un)verdauten PCR-Produkte mit wt-Bacmid-DNA als Template, konnte ausschließlich das ungeschnittene 942 bp große Fragment nachgewiesen werden, da die wt-DNA keine artifizielle *Eco*RI-Schnittstelle aufweist. Der Verdau der PCR-Produkte mit  $\Delta$ IE-611-Bacmid- bzw. Virus-DNA der Aliquots 1-4 (Virus-Aliquots,

die kurz nach der Rekonstitution eingefroren wurden) als Template resultierte, wie erwartet, in zwei Fragmenten mit Größen von 732 bp und 144 bp. Die Intensität und damit die Menge des 144 bp Fragmentes der *EcoRI*-verdauten PCR-Produkte mit Virus-DNA der Aliquots 5-8 (Srev; Virus-Aliquots von späteren Virus-Passagen) als Template, wurde allerdings immer weniger (Abbildung 2.20).

Um zu überprüfen, was sich während der Passagierung innerhalb des Virusgenoms verändert hat, wurde je ein Virus-Aliquot mit vorhandenem 144 bp *EcoRI*-Fragment und ein Aliquot, das die artifizielle *EcoRI*-Schnittstelle scheinbar verloren hat, erneut mit Proteinase K verdaut und die DNA mittels Phenol/Chloroform Extraktion isoliert. Daraufhin erfolgte die  $\Delta$ IE-611-Kontroll-PCR ( $\Delta$ IE-611 ctl. 1 und 2) mit der DNA der verschiedenen Virus-Aliquots als Template. Die PCR-Produkte wurden gereinigt, in zwei Aliquots aufgeteilt und je ein Aliquot mit *EcoRI* verdaut, während das andere Aliquot unbehandelt blieb. Anschließend erfolgte die elektrophoretische Auftrennung mit Hilfe eines Agarosegels. Erneut konnte die Virus-DNA der späteren Virus-Passage nicht mit *EcoRI* verdaut werden (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde jeweils das PCR-Produkt der verschiedenen Virus-Passagen, das unbehandelt belassen wurde (d.h. nicht mit *EcoRI* verdaut wurde), aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA isoliert. Diese wurde in einen Topo/TA-Vektor kloniert und sequenziert. Die Sequenz-Analyse der DNA, die das 144 bp Fragment nach dem *EcoRI*-Verdau noch aufwies, ergab die erwartete Sequenz der klonierten  $\Delta$ IE-611-Deletionsmutante. Der Verlust des *EcoRI*-Fragments in den Virus-Aliquots 5-8 war hingegen durch eine Sequenz-Veränderung dieser Viren entstanden. Die Sequenzanalyse der entstandenen Virusvariante (nachfolgend Srev = spontane Revertante genannt) ergab, dass diese beinahe die gesamte Sequenz der zurückgebliebenen *frt-sites* (137 bp von 141 bp) und weitere 15 bp von der stromabwärts liegenden Exon 5b-Sequenz deletiert hat. Diese zusätzliche Deletion führte zum Einen zum Verlust des artifiziellen Stopp-Kodons und der artifiziellen *EcoRI*-Schnittstelle, zum Anderen aber auch zur Wiederherstellung des ursprünglichen Leserasters (Abbildung 2.21).



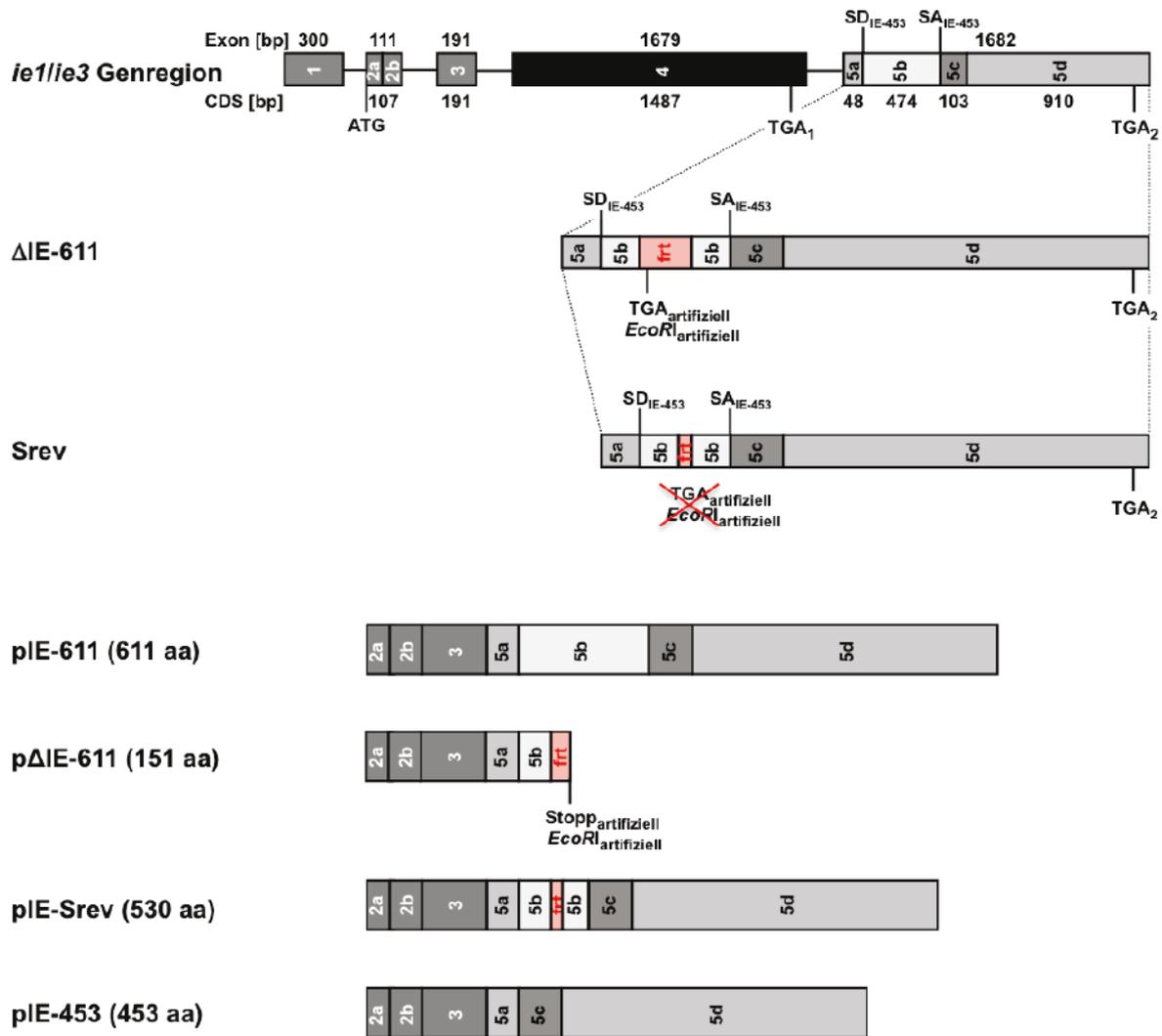


Abbildung 2.22 Aufgrund der Deletion der IE-611-Isoform entsteht ein selektiver Druck, der die Wiederherstellung des ursprünglichen Leserasters begünstigt.

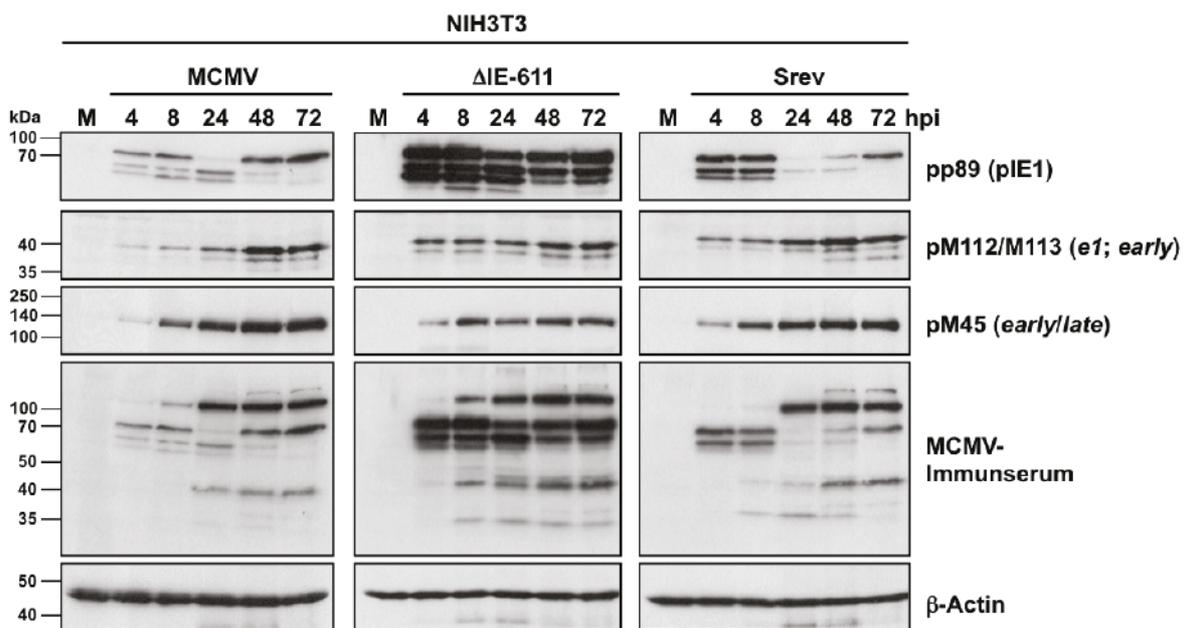
Durch die Passagierung der ΔIE-611-Mutante auf wt-Fibroblasten wurde anscheinend selektiver Druck auf das Deletionsvirus ausgeübt, wodurch das Srev (spontane Revertante)-Virus entstand. Im Srev-Virusgenom ist ein Großteil der frt-Sequenz (137 bp von 141 bp), ein 15 bp Stück der downstream liegenden Exon 5b-Sequenz sowie das artifizielle TGA und die artifizielle EcoRI-Schnittstelle nicht mehr enthalten. Diese zusätzliche Deletion führte zur Wiederherstellung des ursprünglichen Leserasters. Das pIE-Srev besteht aus 530 aa, wohingegen sich das pΔIE-611 nur aus 151 aa zusammensetzt.

Das ΔIE-611-Virus weist in wt-Zellen einen im Mikroskop zu beobachtenden Wachstumsnachteil im Vergleich zum wt-Virus auf. Dieser, durch die Zellen, ausgeübte selektive Druck begünstigte anscheinend Viren mit der in Abbildung 2.21 und 2.22 beschriebenen Mutation. Das Srev-Virus weist also eine Sequenzveränderung auf, die dazu führte, dass sich das Verhältnis von ΔIE-611- zu Srev-Virus von Passage zu Passage zugunsten der Srev-Mutante verschob. Dieser

Vorgang konnte durch die schrittweise Verminderung des 144 bp *EcoRI*-Fragments im Agarose-Gel verfolgt werden (Abbildung 2.20).

### 2.3.6 Die Deletionsviren $\Delta$ IE-611 und Srev sind replikationsfähig

Um das  $\Delta$ IE-611- und das Srev-Virus im Vergleich zum wt-Virus analysieren zu können, wurden definierte, d.h. über den in Abschnitt 2.3.5 beschriebenen *EcoRI*-Verdau kontrollierte Virus-Stocks hergestellt. Zunächst wurde deren virale Genexpression mittels Western-Blot Analyse anhand verschiedener *immediate-early*-, *early*- und *late*-exprimierter Proteine verfolgt. Dazu wurden NIH3T3 Zellen mit wt-,  $\Delta$ IE-611- oder Srev-Virus (MOI 2) infiziert und 4-72 hpi Protein-Lysate hergestellt. Nach der Normierung mittels Bradford-Bestimmung erfolgte die Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE und die Detektion mit verschiedenen Primär/Sekundär-Antikörper-Kombinationen im Western-Blot.



**Abbildung 2.23 Die Deletion der IE-611-Isoform führt nicht zum Verlust der viralen *early*- und *late*-Genexpression.**

NIH3T3-Zellen wurden Mock (M) behandelt oder mit wt-,  $\Delta$ IE-611 oder Srev-Virus infiziert (MOI 2). Die Herstellung der Protein-Lysate erfolgte von 4-72 hpi. Diese wurden mit Hilfe von Bradford-Bestimmung normiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und abschließend mit Antikörpern, die für jeweils eine der drei Replikationsphasen repräsentativ sind, im Western-Blot detektiert.  $\beta$ -Actin fungierte als Ladekontrolle.

Der Nachweis eines *immediate-early* Proteins (pp89=pIE1) ergab, dass das  $\Delta$ IE-611-Virus eine kontinuierlich und massiv erhöhte Expression im Vergleich zum wt- aber auch zum Srev-Virus aufwies (Abbildung 2.23). Die pp89 (pIE1)-Expression war nach Infektion mit wt- und Srev-Virus hingegen recht ähnlich, obgleich gewisse Unterschiede in Abundanz und Expressionskinetik von pp89 (pIE1) verzeichnet wurden: 4 und 8 hpi war das pp89 (pIE1)-Signal beim Srev-Virus etwas stärker; zu späteren Zeitpunkten glich sich die Intensität aber an.

In  $\Delta$ IE-611-Virus-infizierten Zellen konnte zu frühen Zeitpunkten nach der Infektion (4 und 8 hpi) eine leicht erhöhte Expression des *early* 1-Proteins (pM112/M113 = pE1) nachgewiesen werden. In wt-Virus- und Srev-Virus-infizierten Zellen waren die pM112/M113 (pE1)-Expressionskinetiken und -Proteinmengen relativ ähnlich. Die Expressionsstärke des *early/late*-exprimierten M45-Proteins war in wt-,  $\Delta$ IE-611- und Srev-Virus-infizierten Zellen vergleichbar. Die Detektion mit polyklonalem MCMV-Immunsereum ergab eine massiv verstärkte pp89 (pIE1)-Expression (Signale zwischen 60-90 kDa) in  $\Delta$ IE-611-infizierten Zellen im Vergleich zu den wt- und Srev-Lysaten. Die Expression der anderen Proteine, die durch das Immunsereum erkannt werden, waren bei allen drei Viren ähnlich. Der Nachweis von  $\beta$ -Actin fungierte als Ladekontrolle.

Es lässt sich zusammenfassen, dass die Deletion der pIE-611-Isoform zu einer deutlichen Erhöhung der pp89 (pIE1)- und zu einer leichten Erhöhung der pM112/M113 (pE1)-Proteinmenge führt. Die verstärkte pp89 (pIE1)-Expression ist auch nach der Detektion mit MCMV-Immunsereum nachweisbar. Diese Befunde deuten auf eine Promotor-Repressor-Funktion des pIE-611 hin. Auffällig ist zudem, dass sich die Proteinmengen und -kinetiken von wt- und Srev-Virus sehr ähneln. Scheinbar ermöglicht die Wiederherstellung des ursprünglichen Leserasters im Srev-Virus (trotz fehlender Exon 5b-Sequenzbereiche), eine wt-artigere Protein-Expressionskinetik. Außerdem kann anhand der Daten nachgewiesen werden, dass sowohl das  $\Delta$ IE-611- als auch das Srev-Virus in der Lage sind, *early*- und *late*-exprimierte Proteine zu generieren.

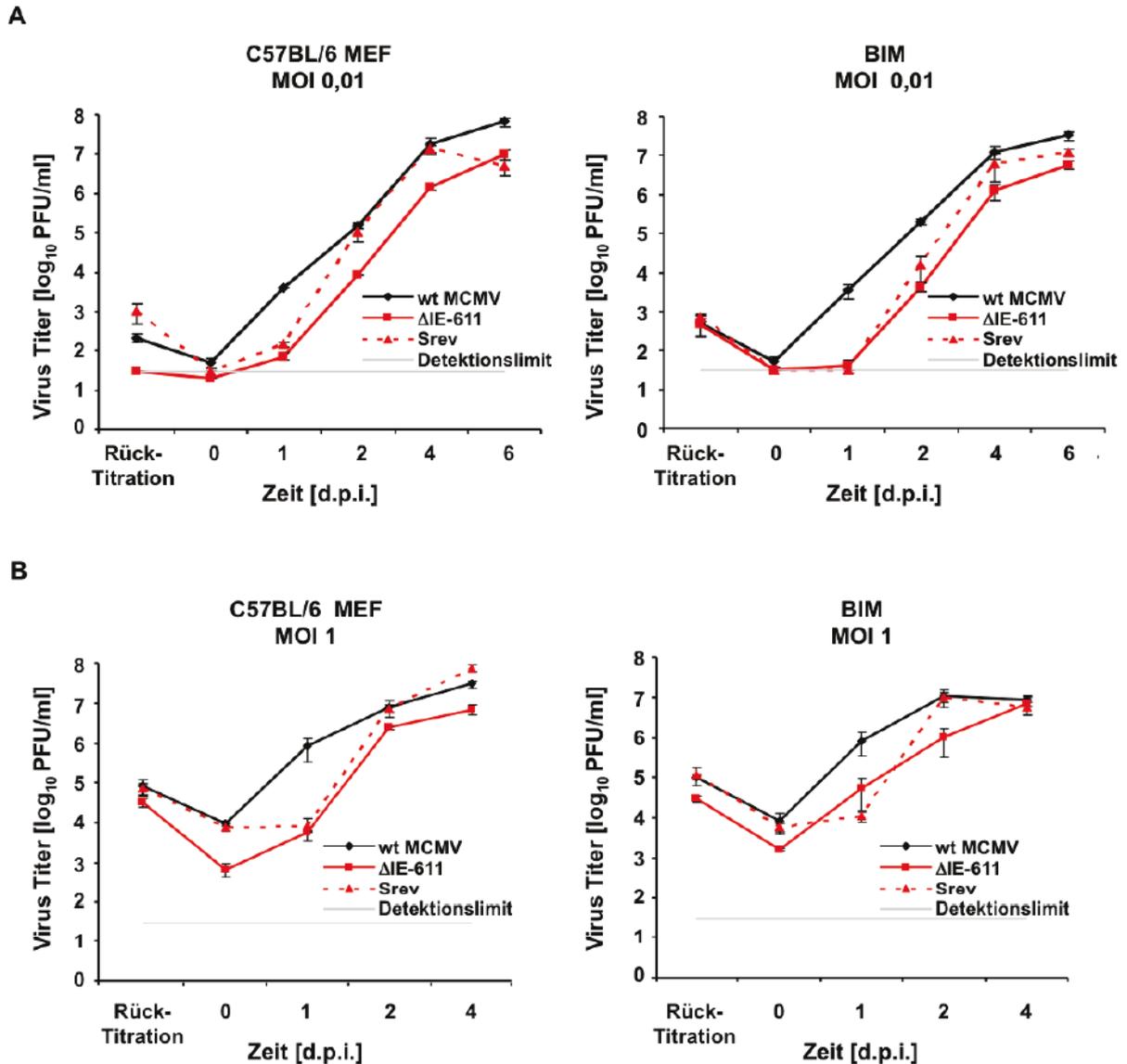
Aufgrund der Erkenntnis, dass das  $\Delta$ IE-611- und Srev-Virus *early* und *late* Gene exprimieren, wurden anschließend Replikationsanalysen durchgeführt, um den Wachstumsnachteil gegenüber dem wt-Virus, der bereits im Mikroskop zu beobachten war, genauer zu beziffern und um nachzuweisen, dass die Viren ohne die Expression der IE-611-Proteinisoform replizieren. Dazu wurden primäre C57BL/6

MEFs und BIM-Zellen jeweils mit wt-,  $\Delta$ IE-611- und Srev-Virus mit einer niedrigen MOI (0,01) und einer höheren MOI (1) infiziert. 0, 1, 2, 4 und 6 Tage nach Infektion (dpi) wurde jeweils Virus-Zell-Suspensionen eingefroren. Anschließend wurden die Virus-Titer des jeweiligen Zeitpunkts mit Hilfe der Plaque-Titration auf BIM-Zellen bestimmt.

Die Auswertung der Wachstumsanalysen ergab, wie erwartet, einen Wachstumsnachteil der  $\Delta$ IE-611-Mutante im Vergleich zum wt-Virus (Abbildung 2.24 A und B). Dieser Wachstumsnachteil des  $\Delta$ IE-611-Virus gegenüber des wt-Virus war bei einer Infektion mit niedriger MOI (0,01) sowohl auf C57BL/6 als auch auf BIM-Zellen an Tag 1 nach der Infektion am ausgeprägtesten (ungefähr 55- bis 90-fach) und verringerte sich bis zum Tag 4 nach der Infektion auf das ca. 10-fache. Das Srev-Virus hatte einen Tag nach der Infektion ein Wachstumsdefizit zwischen 30- und 120-fach im Vergleich zum wt-Virus. 4 dpi erreichte diese Mutante allerdings in beiden Zellarten fast die wt-Virus-Titer (Abbildung 2.24 A). Die Srev-Mutante replizierte an Tag 4 nach der Infektion im Vergleich zur  $\Delta$ IE-611-Mutante 5- bis 10-fach besser.

Wurden die Zellen mit der höheren MOI 1 infiziert, wuchs das  $\Delta$ IE-611-Virus im Vergleich zum wt-Virus an Tag 1 nach der Infektion in BIM-Zellen nur 15-fach schlechter. Der Wachstumsnachteil in C57BL/6-Zellen war bedeutend stärker (130-fach). 4 dpi verringerte sich das Defizit in C57BL/6 auf das 5-fache; in BIM-Zellen erreichte der  $\Delta$ IE-611-Virus-Titer sogar wt-Niveau (Abbildung 2.24 B). Das Srev-Virus wuchs auf beiden Fibroblasten-Arten einen Tag nach Infektion 70- bis 100-fach schlechter als das wt-Virus. Der wt-Virus-Titer wurde allerdings bereits an Tag 2 nach der Infektion erreicht (Abbildung 2.24 B). Im Vergleich zum Srev-Virus replizierte das  $\Delta$ IE-611-Virus 1 dpi ungefähr gleich effizient. 2 und 4 Tage nach der Infektion hatte das Srev-Virus gegenüber der  $\Delta$ IE-611-Mutante einen maximal 10-fachen Wachstumsvorteil.

Die Wachstumsanalyse der beiden Virus-Mutanten zeigte zusammengefasst, dass der Wachstumsnachteil des  $\Delta$ IE-611-Virus im Vergleich zum wt-Virus größer ist als der des Srev-Virus. Dies gilt für niedrige und höhere MOI. Zudem kann geschlussfolgert werden, dass die IE-611-Proteinisoform für das Virus-Wachstum nicht essentiell ist, deren Deletion aber in einen 5- bis 130-fach (abhängig von der Infektionsdosis, dem analysierten Zeitpunkt nach der Infektion und der Zellart) schlechter-wachsenden Virus resultiert.

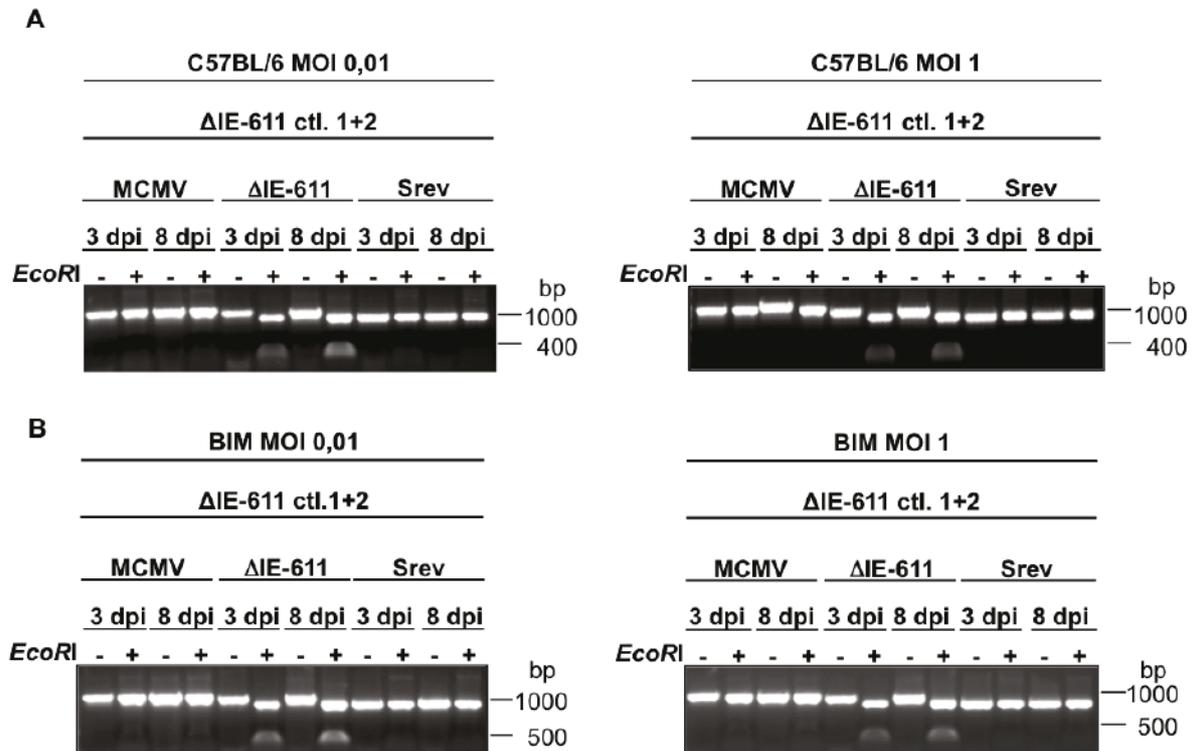


**Abbildung 2.24** Die Deletion der IE-611-Isoform resultiert in einem replikationskompetenten Virus mit Wachstumsnachteilen.

Primäre C57BL/6 MEF bzw. BIM-Zellen wurden mit wt-,  $\Delta$ IE-611- oder Srev-Virus mit **A)** MOI 0,01 und **B)** MOI 1 infiziert. 0 bis 6 dpi wurden Virus-Zell-Suspensionen eingefroren. Die Virus-Titer-Bestimmung erfolgte mittels Plaque-Titration in BIM-Zellen (Titration in Triplikaten).

Um sicherzustellen, dass sich das  $\Delta$ IE-611-Virus aufgrund des Selektionsdrucks nicht erneut zum Srev-Virus verändert hat, wurden parallel zur Wachstumsanalyse weitere Aliquots der Virus-infizierten C57BL/6- bzw. BIM-Zellen 3 dpi und 8 dpi eingefroren. Aus diesen Aliquots wurde mittels Proteinase K-Verdau und Phenol/Chloroform-Aufreinigung Gesamt-DNA isoliert, welche als Template für die bereits beschriebene (Abschnitt 2.3.5)  $\Delta$ IE-611-Kontroll-PCR verwendet wurde. Nach der Fällung der PCR-Produkte mit Isopropanol wurden diese in 20  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O aufgenommen. Die eine Hälfte jedes PCR-Produkts wurde mit *EcoRI* verdaut,

während die andere Hälfte unbehandelt blieb. Letztlich erfolgte die Auftrennung der DNA mittels Gelelektrophorese. Abbildung 2.25 zeigt die Agarose-Gele der (un)verdauten PCR-Produkte von wt-MCMV-,  $\Delta$ IE-611- und Srev-Virus aus infizierten C57BL/6- oder BIM-Zellen.



**Abbildung 2.25 Der  $\Delta$ IE-611-Genotyp hat sich während der Replikationsanalyse nicht verändert.**

Parallel zur Wachstumsanalyse wurden 3 und 8 dpi zusätzliche Lysate der Virus-infizierten **A)** C57BL/6-Zellen und **B)** BIM-Zellen eingefroren. Aus diesen wurden mittels Proteinase K-Verdau und Phenol/Chloroform-Aufreinigung Gesamt-DNA isoliert. Anschließend erfolgte eine PCR mit  $\Delta$ IE-611-Kontroll-Primern ( $\Delta$ IE-611 ctl. 1+2). Die PCR-Produkte wurden mit Isopropanol gefällt, in 20  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und in 2 Aliquots aufgeteilt, wobei die eine Hälfte unbehandelt blieb, während die andere Hälfte mit *EcoRI* verdaut wurde. Die (un)verdauten Proben wurden mit Hilfe von Gelelektrophorese aufgetrennt. Erwartete Fragment-Größen: wt-MCMV (un)geschnitten 942 bp;  $\Delta$ IE-611 unverdaut = 876 bp; verdaut = 732 bp und 144 bp; Srev (un)geschnitten 724 bp.

Wie erwartet konnte in den Spuren von wt-MCMV 3 und 8 dpi nach erfolgreichem *EcoRI*-Verdau in beiden Zell-Linien und bei beiden verwendeten MOIs nur das ungeschnittene PCR-Produkt (942 bp) detektiert werden, da die wt-Sequenz die artifizielle *EcoRI*-Schnittstelle nicht enthält. Die PCR-Produkte, die aus  $\Delta$ IE-611-Virus infizierten Zellen amplifiziert wurden, konnten 3 als auch 8 dpi mit *EcoRI* geschnitten werden, was durch die Größenveränderung zwischen unverdautem (876 bp) und verdautem (732 bp und 144 bp) PCR-Produkt eindeutig belegt werden konnte. In den

Proben aus Srev-Virus-infizierten Zellen war kein geschnittenes PCR-Produkt erkennbar (Abbildung 2.25). Dieser Umstand belegt, dass diesem Virus die artifizielle *EcoRI*-Sequenz fehlt. Die Größenveränderung im Vergleich zum wt-PCR-Produkt wiederum ließ den Schluss zu, dass die für das Srev-Virus spezifische Deletion noch vorhanden war. Insgesamt zeigte der *EcoRI*-Verdau, dass sich der Genotyp des  $\Delta$ IE-611- und des Srev-Virus über den Zeitraum der Wachstumsanalyse (0 bis 6 dpi) nicht verändert hat.

## **2.4 Die IE-611-Proteinisoform trägt zur Hemmung der IFN- $\beta$ -Induktion bei**

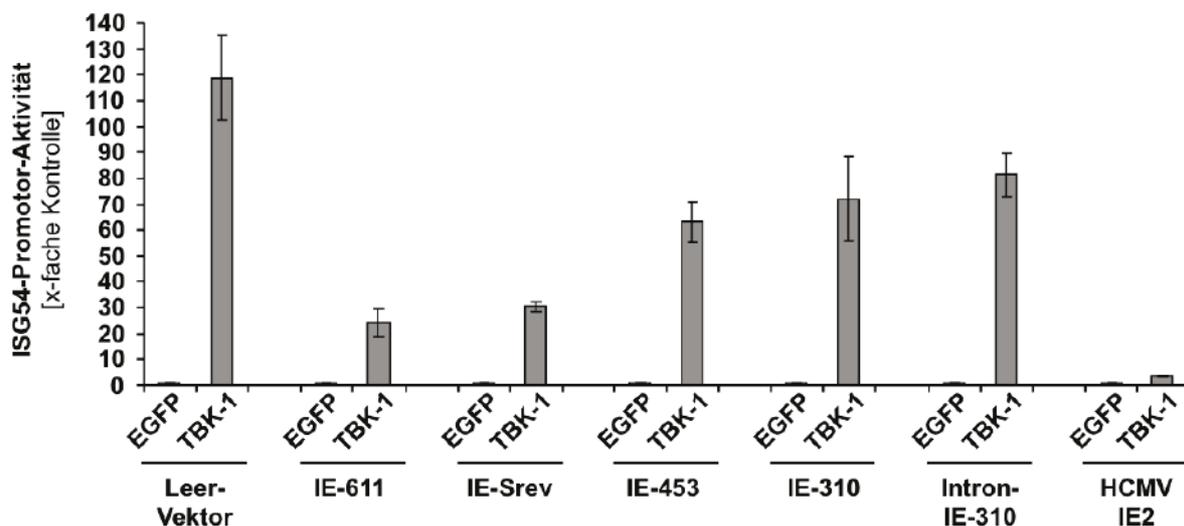
### **2.4.1 Analyse der ISG54-Promotor/Enhancer-Induktion nach Überexpression der IE3-Proteinisoformen**

Um zu ermitteln, ob eine der IE3-Proteinisoformen für die Interferenz mit der IFN- $\beta$ -Induktion in Frage kommt, wurden Luciferase-Reporter Analysen durchgeführt. Weil pIE-310 in vorherigen Immunoblot Analysen nur schwach exprimiert war, wurde zunächst ein IE-310-exprimierendes Plasmid kloniert, das *downstream* der Promotor- und *upstream* der IE-310-Sequenz ein Intron beinhaltet (pIntron-IE-310), da erfahrungsgemäß durch die Insertion eines Introns die Expression mancher Proteine verstärkt werden kann. Zudem wurde ein Konstrukt kloniert, das die HA-markierte IE-Srev-Sequenz exprimiert.

Für die Luciferase-Experimente wurde ein Reporter-Konstrukt verwendet, bei dem das Luciferase-Gen von dem ISG54-Promotor/Enhancer kontrolliert wird und dessen Expression somit IRF-3/IFN- $\beta$ -induzierbar ist. Das ISG54-Luciferase-Konstrukt wurde in Kombination mit den IE3-Expressionsplasmiden oder einem HCMV-IE2-Kontrollvektor in HEK293T-Zellen transfiziert. HCMV pIE2 (pIE86) interferiert mit der IFN- $\beta$  Induktion, indem es die DNA-Bindung des NF- $\kappa$ B-Transkriptionskomplexes p50:p65 hemmt und dadurch die Expression vieler Gene, die eine  $\kappa$ B-Bindestelle im Promotor enthalten (z.B. IFN- $\beta$ ) verringert (Taylor and Bresnahan, 2005; 2006a). Als Promotor-Stimulus wurde ein Plasmid, das TBK-1 exprimiert, verwendet. Die Serin-Kinase TBK-1 phosphoryliert, wie bereits in der Einleitung erwähnt, die monomere IRF-3-Form und führt dadurch zu deren Aktivierung, Dimerisierung und Translokation in den Nukleus, wodurch IRF-3-abhängige Zielgene wie ISG54 exprimiert werden.

Als nicht Promotor-stimulierendes Kontrollplasmid wurde EGFP kotransfiziert. Im Anschluss an die Transfektion erfolgte die Zell-Lyse mit Luciferase-Lyse-Puffer. Die Luciferase-Expression wurde photometrisch in *relative light units* (rLU) gemessen und ist jeweils als x-facher Wert bezogen auf die jeweilige EGFP-Kontrolle dargestellt (Abbildung 2.26).

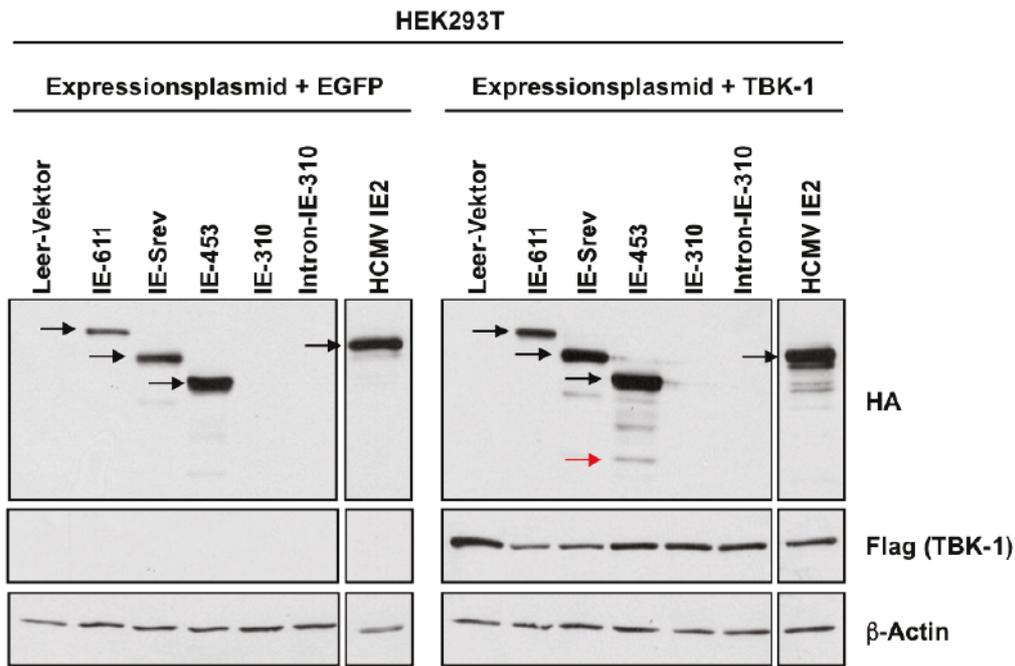
Die Koexpression des Leer-Vektors (pcDNA 3.1), in den die HA-markierte CDS aller *ie3*-Transkriptisoformen und die CDS des HCMV pIE2 (pIE86) kloniert wurden, mit TBK-1 resultierte im Vergleich zu der nicht Promotor-stimulierenden EGFP-Kontrolle in einer 120-fachen Luciferase-Induktion. Die Koexpression von pIE-453, pIE-310 und pIntron-IE-310 verhinderte die Stimulation des ISG54-Promotors/Enhancers nicht. Die gemessene Aktivität erreichte aber Werte (zwischen 70- und 90-fach), die niedriger als die Induktion mit koexprimiertem Leervektor waren. Nach Expression des IE-611- sowie des IE-Srev-Proteins und erfolgter TBK-1-Stimulation konnte eine deutlich verminderte Luciferase-Expression nachgewiesen werden (30-40-fach). Die geringste ISG54-Promotor/Enhancer-Aktivität erzielte die Koexpression des HCMV IE2 (IE86)-Proteins.



**Abbildung 2.26 pIE-611 sowie pIE-Srev und HCMV pIE2 hemmen die ISG54-Promotor/Enhancer-Aktivität.** HEK293T-Zellen wurden mit dem Luciferase-Reporter (ISG54-Luciferase 0,2 µg) und Expressionsplasmiden, welche die HA-markierte CDS der *ie3*-Transkriptisoformen oder die CDS des HCMV pIE2 (pIE86) (0,3 µg) enthalten, transfiziert. TBK-1 (0,3 µg) diente als Promotor-Stimulus und EGFP (0,3 µg) als nicht-stimulierende Kontrolle. Die Transfektion erfolgte über Nacht. Auf die Zell-Lyse folgte die photometrische Bestimmung der Luciferase-Aktivität in *relative light units* (rLU). Dargestellt sind die x-fachen Werte bezogen auf die jeweilige EGFP-Kontrolle (Messung in Triplikaten).

Die Luciferase-Messungen wurden in unabhängigen Experimenten mehrfach wiederholt. Dabei variierte die x-fache Induktion des ISG54-Promotors/Enhancers aufgrund der unterschiedlichen Transfektionseffizienzen. Generell konnte aber die stärkste Induktion des ISG54-Promotors/Enhancers bei Expression des Leervektors in Kombination mit der TBK-1-Kinase detektiert werden. Die stärkste Inhibition war konstant nach Koexpression des IE-611- bzw. IE-Srev- und des HCMV IE2 (IE86)-Proteins nachweisbar, wobei HCMV pIE2 (pIE86) immer ein stärkerer Inhibitor als pIE-611 und pIE-Srev war. Die ISG54-Promotor/Enhancer-Aktivität, die durch Kotransfektion von pIE-453 bzw. pIE-310 und TBK-1 ausgelöst wurde, lag immer zwischen der höchsten und der niedrigsten x-fachen Induktion des jeweiligen Experiments.

Die Expression aller transfizierten Proteine wurde mit Hilfe einer Immunoblot Analyse der Lysate kontrolliert (Abbildung 2.27). Dabei wurden die drei Einzelproben einer Bedingung (Messung in Triplikaten) vereint, durch Bradford-Bestimmung normalisiert, mit SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend im Rahmen einer Western-Blot Analyse mit Hilfe spezifischer Antikörper detektiert. Alle IE-Proteine, bis auf pIE-310 und pIntron-IE-310, waren nachweisbar. Leider konnte die IE-310-Expression auch nicht durch die Insertion eines Introns verstärkt werden, da pIE-310 in keiner der Luciferase-Messungen mit anschließender Western-Blot Analyse detektierbar war. Dementsprechend kann die beobachtete, verminderte Luciferase-Aktivität nach pIE-310- und pIntron-IE-310-Expression entweder auf experimentell bedingte Schwankungen zurückgeführt werden oder geringste IE-310-Proteinmengen sind ausreichend, um eine partielle Inhibition der ISG54-Promotor/Enhancer-Aktivierung zu bewirken. Das TBK-1-Protein konnte in allen Proben nachgewiesen werden, wodurch sichergestellt werden konnte, dass bei allen Bedingungen eine Stimulation des Promotors erfolgt ist. Allerdings war die detektierte TBK-1-Proteinmenge nach Koexpression des pIE-611 oder pIE-Srev geringer.



**Abbildung 2.27 Kontroll-Immunoblot der Luciferase-Proben.**

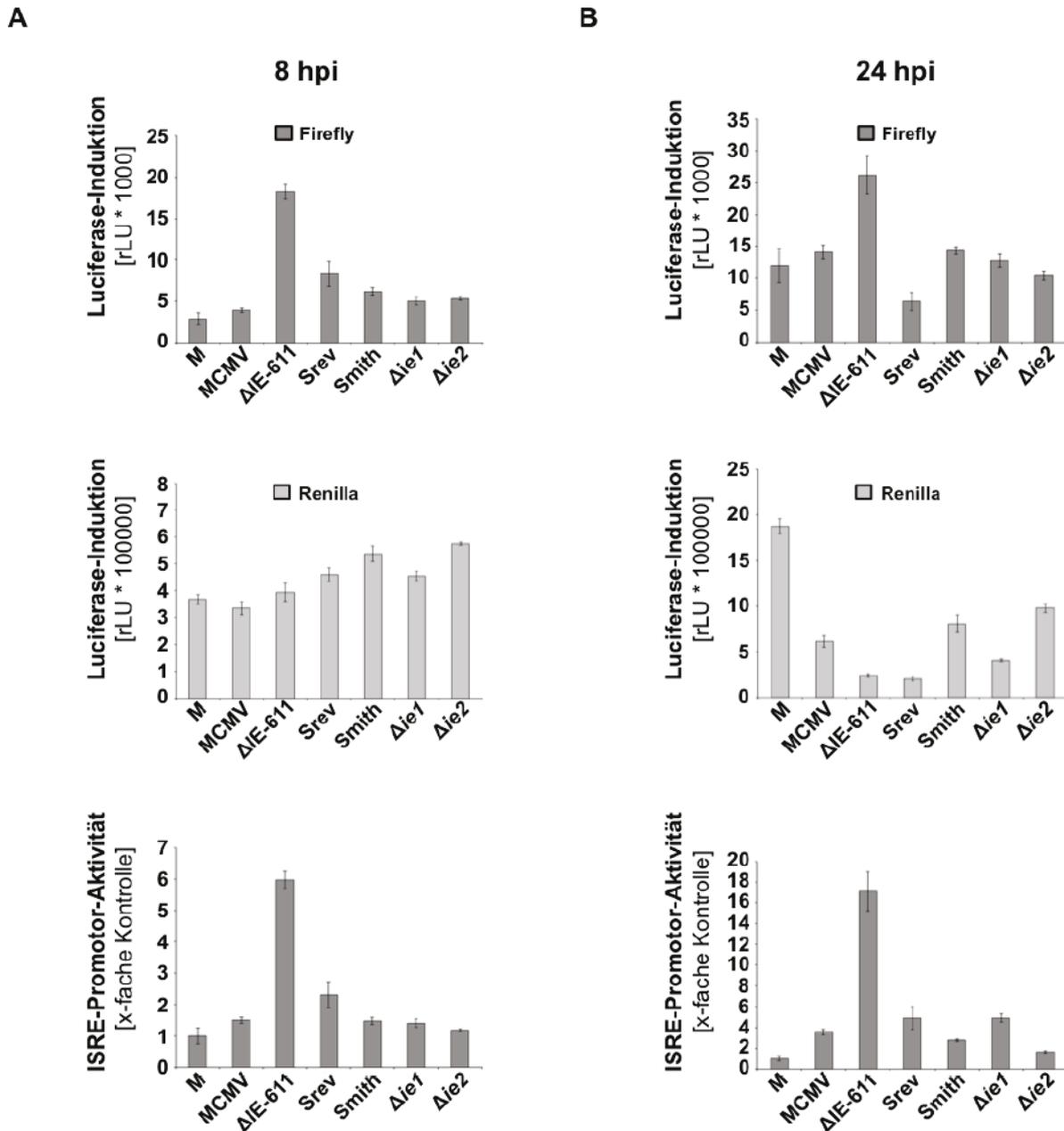
Die drei einzelnen Proben jeder Bedingung (Messung in Triplikaten) wurden vereint, mit Bradford-Bestimmung normalisiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend erfolgte die Detektion mit anti-HA-Antikörper als Expressionsnachweis des jeweiligen IE-Proteins (gekennzeichnet durch schwarze Pfeile) im Rahmen einer Western-Blot Analyse. Der rote Pfeil markiert das pIE-310, in IE-453-Plasmid-transfizierten HEK293T-Zellen und soll die erwartete IE-310-Proteingröße anzeigen. Nach einer längeren Exposition der Membran konnte das pIE-310 in allen HEK293T-Zell-Lysaten nachgewiesen werden, die mit dem IE-611-, IE-Srev und IE-453-Expressionsplasmid transfiziert wurden (nicht gezeigt). Die Detektion mit Flag-Antikörper erfolgte, um die Expression des Flag-Epitop-markierten TBK-1-Proteins zu bestätigen. β-Actin diente als Ladekontrolle.

Die Befunde deuten darauf hin, dass sowohl das IE-611- als auch das IE-Srev-Protein die TBK-1-vermittelte Induktion des ISG54-Promotors/Enhancers hemmt und somit kommt das pIE-611 als Kandidat für die HCMV-kodierte IRF-3-Inhibierung in Frage. Das TBK-1-Protein wird aber im verwendeten Expressionsplasmid unter der Kontrolle des HCMV MIEP exprimiert. Da in Abschnitt 2.3.6 eine potenzielle Funktion des pIE-611 als Promotor-Repressor beschrieben wurde und nach Koexpression des pIE-611 bzw. pIE-Srev eine geringere TBK-1-Proteinmenge detektiert wurde, kann die verminderte ISG54-Promotor/Enhancer-Aktivität auch durch die Hemmung der MIEP-abhängigen TBK-1-Expression und somit durch eine schwächere ISG54-Promotor/Enhancer-Stimulation bedingt sein. Für das pIE-453 konnte eine partielle Hemmung der ISG54-Promotor/Enhancer-Induktion beobachtet werden. Die stärkste Inhibition der ISG54-Aktivierung wurde nach der Kotransfektion des HCMV IE2 (IE86)-Proteins detektiert.

## 2.4.2 Die Infektion mit dem $\Delta$ IE-611-Virus löst eine gesteigerte Aktivierung des ISRE-Promotors/Enhancers aus

Um die Funktion der IE-611-Proteinisoform hinsichtlich der Inhibition der IFN-Induktion auch im viralen Kontext untersuchen zu können, wurde eine stabile ISRE-Promotor/Enhancer-Reporter-Zell-Linie (NIH3T3-ISRE-Luc-Renilla #4) generiert. Diese stabile Transfektante exprimiert konstitutiv die Renilla-Luciferase (unter der Kontrolle des nicht IFN-responsiven HSV-TK-Promotors) und zudem die Firefly-Luciferase unter der Kontrolle des ISRE-Promotors/Enhancers, d.h. die Expression der Firefly-Luciferase ist von der Induktion der Typ I Interferone abhängig. Die NIH3T3-ISRE-Luc-Renilla-Zellen wurden mit zwei verschiedenen wt-Viren (MCMV = MW97.01 und Smith-Virusstamm) und den Mutanten  $\Delta$ IE-611, Srev,  $\Delta$ ie1 und  $\Delta$ ie2 (freundlicherweise von Prof. Dr. Martin Messerle zur Verfügung gestellt) infiziert (MOI 3) und 8 hpi sowie 24 hpi Luciferase-Lysate hergestellt. Im Anschluss erfolgte die Detektion der Firefly- bzw. der Renilla-Luciferase mit Hilfe eines Dual-Luciferase-Messsystems. Die Firefly-Daten repräsentieren die Aktivität des ISRE-Promotors/Enhancers und somit die IFN-Antwort. Die Werte der Renilla-Luciferase wurden für die Normierung der ISRE-Firefly-Werte verwendet (Abbildung 2.28 A und B). Während die Renilla-Luciferase-Daten 8 h nach der Infektion bei allen Bedingungen ähnlich waren (Abbildung 2.28 A), betrugen die Renilla-Werte in Virus-infizierten Zellen 24 hpi nur noch ca. 10-50% der nicht-infizierten Zellen (Abbildung 2.28 B). Insbesondere die Infektion mit  $\Delta$ IE-611- oder Srev-Virus verursachte eine Renilla-Messwert-Reduktion um das 7,8- bzw. 9,2-fache im Vergleich zu Mock-infizierten Zellen. Im Vergleich zu wt-Virus infizierten Zellen fielen die Renilla-Luciferase-Messwerte um das 2,5- ( $\Delta$ IE-611) bzw. 3,0-fache (Srev). Bei beiden analysierten Zeitpunkten waren in  $\Delta$ IE-611-infizierten Zellen im Vergleich zu den anderen Virus-infizierten Zellen zunehmende Firefly-Luciferase-Messwerte nachweisbar und das trotz sinkender Renilla-Werte 24 hpi. Um die unterschiedlichen Renilla-Werte hinsichtlich der ISRE-Promotor-Aktivierung zu berücksichtigen, wurden die Renilla-Messdaten der Mock-Zellen im Verhältnis zu dem jeweiligen Wert aus infizierten Zellen kalkuliert (= "Renilla-Faktor").

$$\text{Renilla – Faktor} = \frac{\text{Renilla – Wert Mock – Zellen}}{\text{Renilla – Wert infizierte Zellen (z.B.MCMV)}}$$



**Abbildung 2.28** Die Deletion der IE-611-Isoform führt zu einer gesteigerten ISRE-Promotor/Enhancer-Aktivierung.

Stabile 3T3-ISRE-Luc-Renilla-Zellen wurden mit zwei verschiedenen wt-Viren (MCMV = MW97.01- und Smith-Stamm) sowie den Mutanten  $\Delta$ IE-611, Srev,  $\Delta$ ie1 und  $\Delta$ ie2 infiziert (MOI 3). **A**) 8 hpi und **B**) 24 hpi wurden Protein-Lysate hergestellt und die Firefly- bzw. Renilla-Luciferase-Expression mit Hilfe eines Dual-Luciferase-Messsystems detektiert. Die Werte der Renilla-Luciferase (konstitutiv exprimiert) wurden für die Normierung der ISRE-Firefly-Daten verwendet. Die Firefly-Luciferase wird durch den Typ I IFN-responsiven ISRE-Promotor/Enhancer induziert und spiegelt somit die IFN-Antwort wider. Die x-fache ISRE-Promotor-Aktivität ist bezogen auf nicht-infizierte Mock-Zellen. Die Messung erfolgte pro Bedingung in Triplikaten.

Die ISRE-Promotor-Aktivität wurde daraufhin mit folgender Formel berechnet:

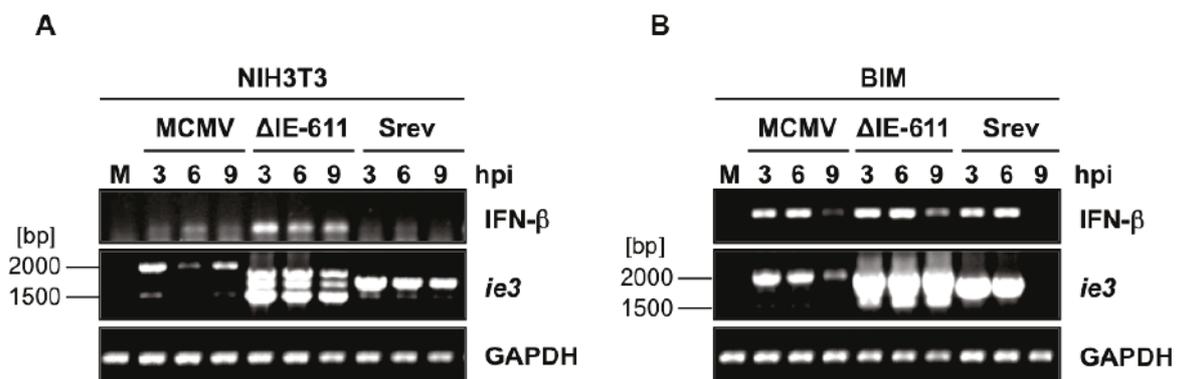
$$\text{ISRE – Promotor – Aktivität} = \left( \frac{\text{Firefly-Wert infizierte Zellen (z.B.MCMV)}}{\text{Firefly-Wert Mock-Zellen}} \right) * \text{Renilla – Faktor}$$

Aufgrund dieser Berechnung konnte 8 hpi eine 4-fach und 24 hpi eine 4,8-fach gesteigerte ISRE-Promotor-Aktivität in  $\Delta$ IE-611-infizierten im Vergleich zu wt-Virus-infizierten Zellen detektiert werden. Die Infektion mit wt-, Srev-,  $\Delta$ ie1- oder  $\Delta$ ie2-Virus führte im Vergleich zu Mock-Zellen auch zu einer gewissen Aktivierung des ISRE-Promotors/Enhancers. Diese Aktivierung ist aber auf die initiale IFN-Induktion, die für wt-MCMV gezeigt wurde (Le et al., 2008b), zurückzuführen. Da die Messwerte der wt-, Srev-,  $\Delta$ ie1- oder  $\Delta$ ie2-Virus-infizierten Zellen aber zum jeweiligen Zeitpunkt miteinander vergleichbar waren, kann geschlussfolgert werden, dass die deletierten Gene dieser Virus-Mutanten für die IFN-Inhibition nicht essentiell sind. Dieses Experiment wurde mit einem weiteren Klon der stabilen Transfektante wiederholt (NIH3T3-ISRE-Luc-Renilla #8), der ebenfalls konstitutiv die Renilla-Luciferase und die Firefly-Luciferase unter der Kontrolle des ISRE-Promotors/Enhancers exprimiert. Mit dieser Zell-Linie wurden in  $\Delta$ IE-611-infizierten Zellen 8 hpi eine 3,7-fach und 24 hpi eine 3,1-fach erhöhte ISRE-Promotor/Enhancer-Aktivität im Vergleich zu wt-Virus-infizierten Zellen gemessen (Daten nicht gezeigt). Die Infektion mit wt-, Srev-,  $\Delta$ ie1- oder  $\Delta$ ie2-Virus resultierte bei beiden Zeitpunkten in einer leichten Induktion des ISRE-Promotors/Enhancers im Vergleich zu nicht infizierten Zellen. Diese Aktivierung war aber in allen Virus-infizierten Zellen vergleichbar und ist wiederum auf die initiale IFN-Induktion zurückzuführen (Daten nicht gezeigt).

Insgesamt führte die Deletion der IE-611-Proteinisoform bei beiden gemessenen Zeitpunkten und in zwei verschiedenen Klonen der stabilen Transfektante (NIH3T3-ISRE-Luc-Renilla) zu der stärksten ISRE-Promotor/Enhancer-Aktivität, wodurch eine potentielle Rolle der IE-611-Proteinvariante bei der Inhibition der Typ I Interferon-Induktion bekräftigt wird.

### 2.4.3 $\Delta$ IE-611-Virus-infizierte Zellen induzieren höhere IFN- $\beta$ -Transkriptmengen als wt-Virus-infizierte Zellen

Da die Luciferase-basierenden Experimente darauf hindeuteten, dass das pIE-611 zur Inhibition von Interferon-stimulierten Genen beiträgt, wurde die IFN- $\beta$ -Induktion auf Transkriptebene untersucht. NIH3T3- bzw. BIM-Zellen wurden mit wt-,  $\Delta$ IE-611- oder Srev-Virus infiziert (MOI 5) und 3, 6 sowie 9 hpi Gesamt-RNA isoliert. Diese diente als Template für eine semi-quantitative RT-PCR mit genspezifischen Primern. Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe von Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. In NIH3T3-Zellen war zu jedem (analysierten) Zeitpunkt der Infektion mehr IFN- $\beta$ -Induktion in  $\Delta$ IE-611- als in wt- oder in Srev-infizierten Zellen detektierbar (Abbildung 2.29). In BIM-Zellen konnte ebenfalls mehr IFN- $\beta$ -Expression nach  $\Delta$ IE-611- als nach wt- bzw. nach Srev-Infektion beobachtet werden. Der Unterschied war in diesem Experiment nach 9 h Infektion am ausgeprägtesten.



**Abbildung 2.29** Das  $\Delta$ IE-611-Virus induziert höhere IFN- $\beta$ -Transkriptmengen als das wt- und das Srev-Virus.

**A)** NIH3T3- oder **B)** BIM-Fibroblasten wurden mit wt-,  $\Delta$ IE-611- oder Srev-Virus infiziert (MOI 5). 3, 6 und 9 hpi wurde Gesamt-RNA isoliert, die als Template für eine semi-quantitative RT-PCR mit genspezifischen Primern eingesetzt wurde. Abschließend erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der Proben mit Hilfe eines 0,7%-Agarosegels. GAPDH fungierte als Ladekontrolle.

Die verstärkte IFN- $\beta$ -Expression nach Infektion mit dem  $\Delta$ IE-611-Virus wurde in mehreren voneinander unabhängigen Experimenten reproduziert. Die unterschiedlich starke IFN- $\beta$ -Induktion in wt- und  $\Delta$ IE-611-infizierten Zellen schwankte dabei zwischen den hier exemplarisch in NIH3T3- und BIM-Zellen dargestellten Intensitäten (Abbildung 2.29). Grundsätzlich war die IFN- $\beta$ -Transkriptmenge aber in den verschiedenen Experimenten immer in den  $\Delta$ IE-611-Virus-infizierten Zellen höher als in wt-Virus-infizierten Zellen. Dementsprechend repräsentieren die in

Abbildung 2.29 mit wt-,  $\Delta$ IE-611 oder Srev-infizierten NIH3T3-Zellen ein Experiment mit einem großen Unterschied hinsichtlich der IFN- $\beta$ -Induktion, während die infizierten BIM-Zellen ein Experiment mit einem geringeren Unterschied abbilden. Bei den hier nicht gezeigten Experimenten lagen die Unterschiede der IFN- $\beta$ -Transkriptmenge innerhalb der hier exemplarisch dargestellten Intensitäten.

Die *ie3*-spezifische RT-PCR resultierte, wie erwartet, in einem 1995 bp großen PCR-Produkt (IE-611) in wt-Virus-infizierten Zellen. Dieses PCR-Produkt, wurde durch die 226 bp große Deletion im  $\Delta$ IE-611-Virus und die zusätzliche Deletion der *frt-sites* und weiteren 15 bp innerhalb des Exons 5b im Srev-Virus in den entsprechenden Spuren kleiner. Die 1521 bp Bande entspricht dem IE-453-Transkript, welches in allen Virus-infizierten Zellen (wt,  $\Delta$ IE-611 und Srev) nachgewiesen werden konnte. Da in der 9 hpi-Spur von Srev-Virus-infizierten BIM-Zellen kein IE-611- und kein IE-453-Transkript detektiert wurde, war diese RT-PCR-Amplifikation nicht erfolgreich und entsprechend verliert die Abwesenheit des IFN- $\beta$ -Transkripts an Aussagekraft. Die IE-310-Transkriptisoform war in den semi-quantitativen RT-PCR-Experimenten aufgrund des geringen PCR-Gesamtvolumens (pro Probe 10  $\mu$ l; vgl. Abbildung 2.9 pro Probe 50  $\mu$ l) nur schwach amplifizierbar und kaum zu erkennen. Deshalb ist die IE-310-Transkriptvariante in Abbildung 2.29 nicht dargestellt. GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) ist ein Enzym der Glykolyse, welches ubiquitär exprimiert wird, und diente in den RT-PCR-Experimenten als Ladekontrolle. Um die IFN- $\beta$ -Transkriptmenge in wt-,  $\Delta$ IE-611- und Srev-Virus-infizierten NIH3T3- oder BIM-Zellen besser vergleichen zu können, wurde die IFN- $\beta$ -Bandenintensität der Abbildung 2.29 mit Hilfe der LumiAnalyst Software (Roche) quantifiziert. Sowohl in NIH3T3- als auch in BIM-Zellen war zu jedem gemessenen Zeitpunkt eine stärkere IFN- $\beta$ -Signalintensität in  $\Delta$ IE-611-Virus-infizierten als in wt- oder Srev-Virus-infizierten Zellen detektierbar (Abbildung 2.30 A und B oben).

Der Nachweis einer erhöhten IFN- $\beta$ -Transkriptmenge in  $\Delta$ IE-611-Virus-infizierten Zellen deutet auf eine antagonistische Funktion der IE-611-Proteinisoform hinsichtlich der IFN- $\beta$ -Induktion hin.

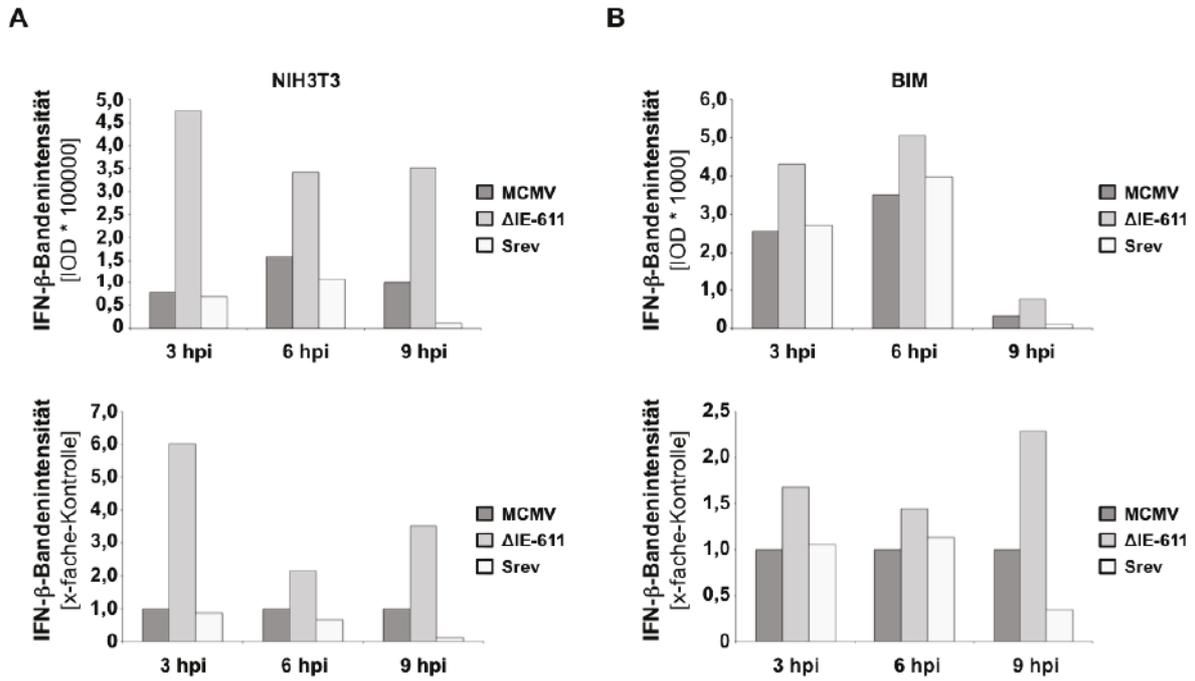


Abbildung 2.30 Das  $\Delta$ IE-611-Virus induziert eine stärkere IFN- $\beta$ -Expression als das wt- oder das Srev-Virus.

Die Bandenintensität der IFN- $\beta$ -Transkripte aus Abbildung 2.29 von wt-,  $\Delta$ IE-611- oder Srev-Virus infizierten **A)** NIH3T3- oder **B)** BIM-Zellen wurde mit Hilfe der LumiAnalyst-Software quantifiziert. Im oberen Bereich der Abbildung sind die Rohdaten und im unteren Teil der Abbildung ist die x-fache Bandenintensität, bezogen auf den jeweiligen wt-Virus-Wert je Zeitpunkt, dargestellt.

## 3 Diskussion

### 3.1 Das *M45*-Genprodukt hemmt den NF- $\kappa$ B-vermittelten Signalweg

Beim Vergleich von wt-Virus, Tn *M45* (*M45*-Transposoninsertionsmutante) und  $\Delta M45$ , konnte in den Tn *M45*- bzw.  $\Delta M45$ -infizierten Zellen im Gegensatz zu wt-Virus-infizierten Zellen keine Verlängerung der I $\kappa$ B $\alpha$ -Halbwertszeit beobachtet werden (Abbildung 2.2 und 2.4). Anhand dieser Daten wurde geschlussfolgert, dass das *M45*-Genprodukt zu einer Verlängerung der I $\kappa$ B $\alpha$ -Halbwertszeit beiträgt und somit ein Antagonist des NF- $\kappa$ B-Signalwegs sein könnte. Während die Experimente hinsichtlich der I $\kappa$ B $\alpha$ -Halbwertszeitverlängerung mit den *M45*-Mutanten durchgeführt wurden, erschienen mehrere Publikationen in denen pM45 als Inhibitor verschiedener PRR-induzierter Signalwege beschrieben wurde (Abbildung 3.1) (Mack et al., 2008; Rebsamen et al., 2009; Upton et al., 2008).

Das *M45*-Genprodukt wurde ursprünglich als Ribonukleotid-Reduktase-Sequenz-Homolog beschrieben (Brune et al., 2001b; Rawlinson et al., 1996). Diese Befunde wurden aber etwas später relativiert, da das pM45 keine Ribonukleotid-Reduktase-Aktivität aufweist (Lembo et al., 2004). Weitere Veröffentlichungen zeigen, dass pM45 die TNF- $\alpha$  abhängige Aktivierung des NF- $\kappa$ B- und des p38 MAPK (MAP-Kinase)-Signalwegs inhibiert. Zudem hemmt das *M45*-Genprodukt die TLR 3-vermittelte NF- $\kappa$ B-Aktivierung, indem es mit dem Adaptermolekül RIP1 (*Receptor-interacting protein kinase 1*) interagiert und dadurch die Ubiquitinierung von RIP1, die für die NF- $\kappa$ B-Aktivierung notwendig ist, verhindert (Mack et al., 2008). Des Weiteren inhibiert pM45 die Todesrezeptor (*death receptor*)-, TRIF- oder DAI-vermittelte Apoptose, Nekroptose und die Virus-induzierte programmierte Nekrose über eine Interaktion des *M45*-RHIM-Motivs mit RIP1 und/oder 3 (Mack et al., 2008; Upton et al., 2008; 2010; 2012). Die Arbeitsgruppe um Rebsamen et al. konnte nachweisen, dass das *M45*-Protein die DAI-vermittelte Induktion des NF- $\kappa$ B-Signalwegs inhibiert, indem es mit der RHIM-abhängigen Rekrutierung von RIP1 und 3 interferiert (Rebsamen et al., 2009).

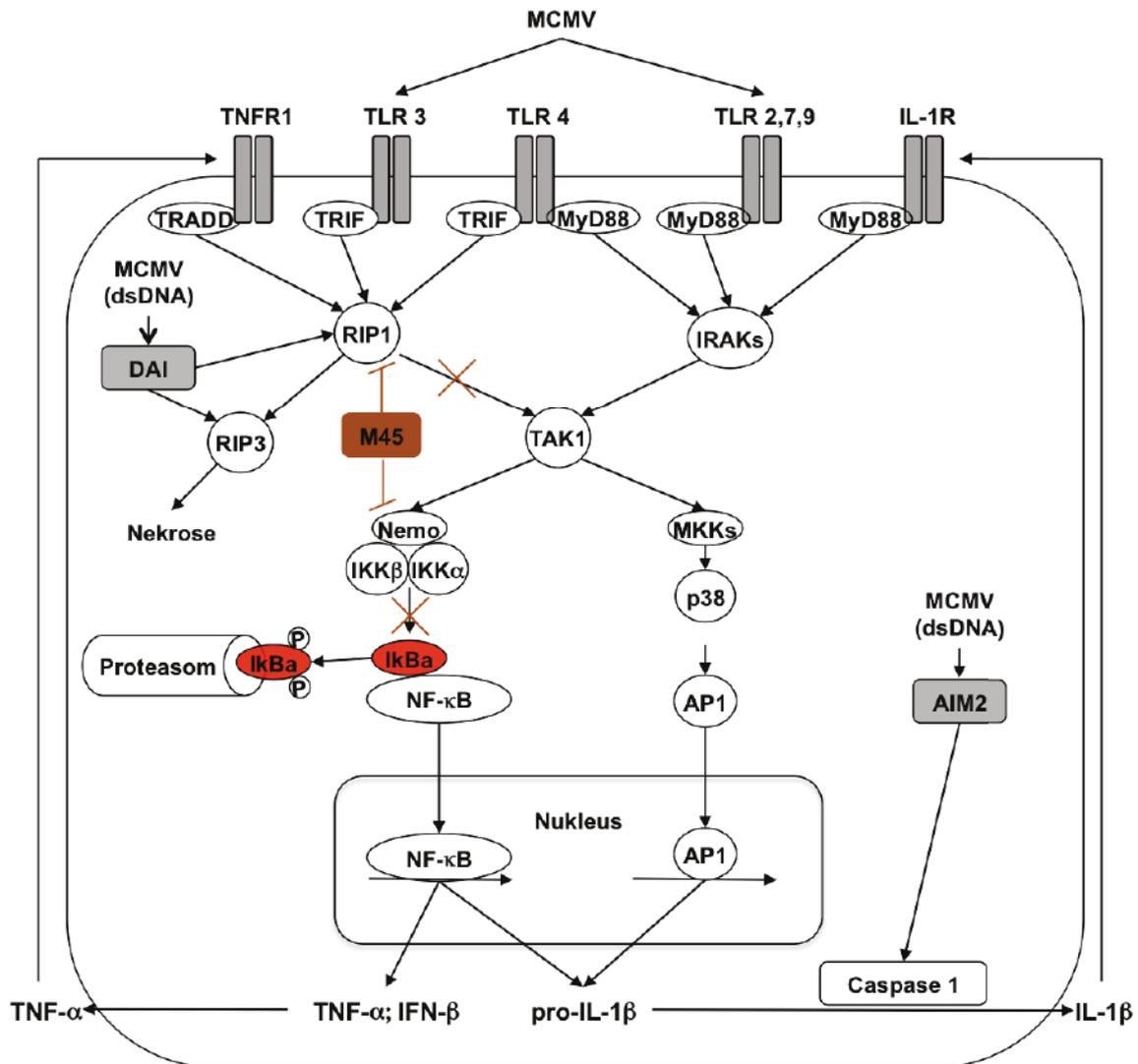


Abbildung 3.1 pM45 inhibiert RIP1 und NEMO und verhindert dadurch die NF-κB-Signaltransduktion (Bild modifiziert nach (Fliss et al., 2012))

Die Aktivierung der verschiedenen Rezeptoren (dunkelgrau) führt entweder RIP1- oder IRAK- (IL-1 receptor-associated kinase) vermittelt zur Induktion von TAK1 (Transforming growth factor beta-activated kinase 1), wodurch entweder der NF-κB- oder der p38 MAPK-Signalweg initiiert wird.

Kürzlich wurde für das M45-Genprodukt außerdem eine Inhibition des TLR 2-, 4-, 7-, 9- und des Interleukin 1-Rezeptor (IL-1R)-induzierten NF-κB-Signalwegs beschrieben (Fliss et al., 2012). Diese Rezeptoren aktivieren MyD88-abhängig und RIP-unabhängig die NF-κB-Signaltransduktion. Um die RIP-unabhängige NF-κB-Aktivierung zu hemmen, bindet das M45-Protein den NF-κB essential modulator (NEMO), wodurch dieser in Autophagosomen umgeleitet und dort mit Hilfe von Lysosomen degradiert wird. (Fliss et al., 2012). MCMV pM45 inhibiert die Signaltransduktion des NF-κB-Signalwegs somit über zwei verschiedene Mechanismen (Abbildung 3.1).

Die publizierten Daten stehen im Einklang mit der in dieser Arbeit beobachteten Verlängerung der I $\kappa$ B $\alpha$ -Halbwertszeit in wt-Virus-infizierten Zellen, da I $\kappa$ B $\alpha$  im Rahmen der NF- $\kappa$ B-Signaltransduktionskaskade sowohl *downstream* von RIP1 als auch *downstream* von NEMO aktiviert und die Signaltransduktion durch das *M45*-Genprodukt bereits früher unterbrochen wird (Abbildung 3.1).

Es fällt allerdings auf, dass in Tn *M45*- und in  $\Delta$ *M45*-infizierten Zellen eine dauerhafte Verringerung der I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteinmenge nachweisbar ist (Abbildung 2.2 und 2.4), obwohl die Zellen nicht mit einem exogenen Stimulus behandelt wurden. Eine mögliche Erklärung besteht darin, dass die Infektion *per se* zu einer Stimulation des NF- $\kappa$ B-Signalwegs führt, wodurch I $\kappa$ B $\alpha$  phosphoryliert und abgebaut wird. Da das I $\kappa$ B $\alpha$ -Gen einen NF- $\kappa$ B-responsiven Promotor aufweist, resultiert die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs allerdings auch in einer I $\kappa$ B $\alpha$ -Expression. Sofern kein fortwährender Stimulus vorliegt, müsste die NF- $\kappa$ B-Signaltransduktion nach der initialen infektionsbedingten Aktivierung wieder inaktiviert und die I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteinmenge aufgrund der I $\kappa$ B $\alpha$ -Genexpression wieder das Mock-Niveau erreichen. Diese I $\kappa$ B $\alpha$ -Kinetik ist in wt-Virus-infizierten Zellen zu beobachten (Le et al., 2008b). Die I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteinmenge ist 3 hpi in wt-Virus-infizierten Zellen im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen niedriger, wohingegen die I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteinlevel in Mock- und wt-Virus-infizierten Zellen ab 6 hpi (und zu späteren Zeitpunkten der Infektion) vergleichbar sind (Le et al., 2008b). Im Gegensatz dazu ist die I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteinmenge in Tn *M45*- oder  $\Delta$ *M45*-infizierten Zellen auch 12 hpi noch geringer als in nicht-infizierten Zellen (Abbildung 2.4). Die intrinsische I $\kappa$ B $\alpha$ -Halbwertszeit beträgt in CHX-behandelten Fibroblasten ungefähr 50 min, während das I $\kappa$ B $\alpha$ -Protein in wt-Virus-infizierten und CHX-behandelten Zellen für mehr als 6 h stabil ist (Le et al., 2008b). In Tn *M45*- oder  $\Delta$ *M45*-infizierten und CHX-behandelten Zellen ist die I $\kappa$ B $\alpha$ -Halbwertszeit nicht verlängert (Abbildung 2.2 und 2.4). Deshalb könnte es einerseits sein, dass die Infektion mit dem Tn *M45*- und dem  $\Delta$ *M45*-Virus zu einer dauerhaften Stimulation des NF- $\kappa$ B-Signalwegs führt, wodurch I $\kappa$ B $\alpha$  fortwährend phosphoryliert und abgebaut wird. Andererseits ist es möglich, dass das *M45*-Genprodukt direkt mit I $\kappa$ B $\alpha$  interagiert und dadurch zu einer Stabilisierung des Proteins beiträgt. Eine Interaktion des *M45*-Genprodukts mit I $\kappa$ B $\alpha$  könnte durch Koimmunopräzipitationsanalysen untersucht werden.

Ähnliche Beobachtungen wurden auch von Fliss et al. gemacht. Eine Inhibition der  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Degradierung konnte in wt-Virus-infizierten und mit verschiedenen Rezeptor-Agonisten (z.B. LPS, IL-1 $\beta$ ) stimulierten Zellen nachgewiesen werden, wohingegen in  $\Delta\text{M45}$ -Virus-infizierten und stimulierten Zellen  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  abgebaut wurde (Fliss et al., 2012).

## **3.2 Die Transkript- und Proteinisoformen des MCMV *ie3*-Gens**

### **3.2.1 Die Generierung verschiedener *immediate-early*-Proteinisoformen ist zwischen HCMV und MCMV konserviert**

Zur Steigerung der Protein-Diversität nutzen sowohl Eukaryoten als auch DNA- und Retroviren alternative Spleißvorgänge.

Für HCMV und MCMV sind verschiedene IE1-Proteinisoformen beschrieben. HCMV exprimiert z.B. die pIE1- (72 kDa) (Stenberg et al., 1984; Stinski et al., 1983) und die pIE19-Form (Shirakata et al., 2002), während MCMV die pIE1- (89 kDa, pp89)- (Keil et al., 1987a; 1987b) und die pp76-Variante (Münch et al., 1988) generiert. Die HCMV IE19-Transkriptvariante entsteht durch alternatives Spleißen des Exons 4 (der 5'-Bereich von Exon 4 wird herausgespleißt). pIE19 umfasst 172 aa und ist 38 kDa groß. Der Name pIE19 entstand durch die kalkulierte molekulare Masse von 19 kDa (Awasthi et al., 2004; Shirakata et al., 2002).

Das HCMV *ie2*-Gen kodiert ebenfalls für verschiedene Proteinisoformen. Das größte HCMV IE2-Protein (pIE86) besteht aus 579 aa und ist 86 kDa groß (Stenberg et al., 1985; 1989). Weitere beschriebene pIE2-Varianten sind pIE55 und pIE18, welche von alternativen Transkripten, die unterschiedliche Spleißstellen im Exon 5 nutzen (Baracchini et al., 1992; Kerry et al., 1995; Spector, 1996; Stenberg, 1996), kodiert werden. Die IE2<sub>338aa</sub>/IE2p40-Proteinisoform wird durch Nutzung eines Leserahmens, der den C-terminalen 338 Aminosäuren des IE86-Proteins entspricht, hergestellt (Jenkins et al., 1994; Plachter et al., 1993).

In Abschnitt 2.3.3 wurde die Analyse von MCMV-exprimierten IE3-Proteinisoformen beschrieben. Zusätzlich zum kanonischen pIE-611 konnten zwei bisher unbekannte IE3-Proteinvarianten IE-453 und IE-310 identifiziert werden. Diese Proteinisoformen werden durch unterschiedliche *ie3*-Transkriptvarianten kodiert, welche durch

alternative Spleißvorgänge innerhalb des *ie3*-Exons 5 und im Fall des IE-310-Transkripts durch zusätzliche Entfernung eines Großteils des Exons 2 und des gesamten Exons 3 entstehen. Für die Translation dieser alternativen *open reading frames* (ORFs) wird dasselbe Start (ATG)- und Stopp-Kodon (TGA<sub>2</sub>) verwendet, d.h. IE-453 und IE-310 werden im gleichen Leseraster wie IE-611 translatiert (Abbildung 2.9 und 2.14). pIE-611 besteht aus 611 aa und ist 88 kDa groß. Die beiden hier neu identifizierten IE3-Proteinisoformen setzen sich aus 453 aa (pIE-453) bzw. 310 aa (pIE-310) zusammen und weisen im SDS-Gel ein Molekulargewicht von ca. 60 kDa bzw. 35-40 kDa auf (Abbildung 2.12 und 2.14). Alle drei Proteinisoformen werden unter selektiven *immediate-early*-Bedingungen exprimiert (Abbildung 2.13) und sind hauptsächlich im Nukleus lokalisiert (Abbildung 2.15 bis 2.17).

In einer Publikation von Marshall et al. wurden nach der Detektion mit einem MCMV pIE3-spezifischen Antikörper, dessen Epitop im C-Terminus lokalisiert ist (aa 596-609 von pIE-611), mehrere IE3-Proteine nachgewiesen (88 kDa, 60 kDa, 45 kDa) (Marshall et al., 2011). Die Gruppe schlug allerdings aufgrund einer RLM-RACE mit RNA aus MCMV-infizierten Zellen als Template und einer Computer-gestützten Vorhersage zur Bestimmung der Stärke von ATGs, als Translationsinitiationskodon des 60 kDa- und des 45 kDa-Proteins alternative Start-Kodons innerhalb des Exons 5 vor.

Die in dieser Doktorarbeit identifizierten pIE-453- und pIE-310-kodierenden Transkriptisoformen wurden mit Hilfe einer *ie3*-spezifischen RT-PCR mit RNA aus MCMV-infizierten Zellen als Template amplifiziert und sequenziert. Anhand dieser Sequenz-Analyse konnten alternative Spleißvorgänge, die zur Generierung der Transkriptvarianten führten, bestätigt werden. Die Translation aller drei *ie3*-ORFs (pIE-611 (88 kDa), pIE-453 (ca. 60 kDa) und pIE-310 (35-40 kDa)) beginnt am selben Start- (ATG) und endet am selben Stopp-Kodon (TGA<sub>2</sub>). Die Befunde dieser Arbeit und die Daten von Marshall et al. sind deshalb weder widersprüchlich noch identisch.

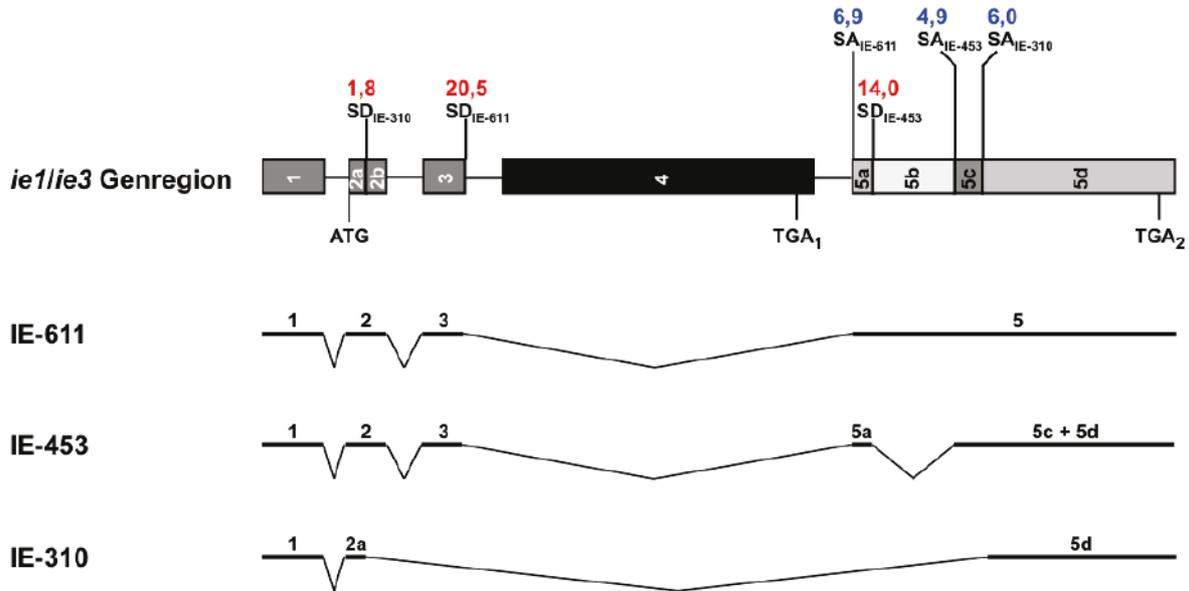
Somit generieren sowohl HCMV als auch MCMV mehrere *ie1*- und *ie3*-basierte Transkriptvarianten, die die Protein-Diversität in der sehr frühen Phase der Infektion erhöhen.

### **3.2.2 Die Abundanz der *ie3*-Transkriptvarianten kann durch die Spleißstellen-Stärke und durch spleißregulatorische Proteine beeinflusst werden**

Die Nutzung einer Spleißstelle hängt unter anderem von deren effizienter Erkennung durch Komponenten der Spleißmaschinerie ab. Das Spleißen wird mit Hilfe eines makromolekularen 50-60S Komplexes, dem Spleißosom, katalysiert. Das Spleißosom setzt sich aus 5 nukleären Ribonukleoprotein-Partikeln (snRNPs) und weiteren 150-200 Proteinen zusammen. Die snRNPs bestehen aus verschiedenen kurzen Uracil-reichen RNAs (U1-, U2-, U4/U6- und U5-snRNA), welche mit Proteinen assoziiert sind (Jurica and Moore, 2003). Das Spleißosom assembliert während des Spleißprozesses schrittweise (Wahl et al., 2009). Als erstes bindet das U1 snRNP an den Spleißdonor, indem das freie 5'-Ende der U1-snRNA mit den komplementären Basen des Spleißdonors Wasserstoff-Brücken-Bindungen (H-Brücken) ausbildet. Hierbei gilt unter Berücksichtigung von Nachbarschaftsbeziehungen, je mehr H-Brücken zwischen der 5'-Spleißstelle und der U1-snRNA ausgebildet werden können, desto größer ist die intrinsische Stärke der 5'-Spleißstelle (Freund et al., 2003; 2005; Kammler et al., 2001; Mount et al., 1983).

Algorithmen zur Kalkulation der Spleißdonor-Stärke sind z.B. der HBond Score ([http://www.uni-duesseldorf.de/rna/html/hbond\\_score.php](http://www.uni-duesseldorf.de/rna/html/hbond_score.php)), der die Nukleotide -3 bis +8 der 5'-Spleißstelle (z.B. SD<sub>IE-611</sub> CAGGTGAGTGT) bei der Berechnung berücksichtigt oder der MaxEntScan ([http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentseq\\_scoreseq.html](http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentseq_scoreseq.html)) (Yeo and Burge, 2004).

Die intrinsische Stärke des Spleißakzeptors wird vornehmlich über den Pyrimidingehalt im Polypyrimidin-Trakt bestimmt. Hierbei spielt die Bindungsfähigkeit der U2AF 65 kDa-Untereinheit eine Rolle, d.h. je höher der Pyrimidingehalt desto größer ist die U2AF65-Affinität und umso größer ist die intrinsische Spleißakzeptor-Stärke (Wu et al., 1999). Mit Hilfe des MaxEntScan-Algorithmus kann die Spleißakzeptor-Stärke berechnet werden ([http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentseq\\_scoreseq\\_acc.html](http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentseq_scoreseq_acc.html)) (Yeo and Burge, 2004).



**Abbildung 3.2** Schematische Darstellung der Spleißstellen, die für die Generierung des IE-611-, IE-453- oder IE-310-Transkripts genutzt werden.

Markiert sind ausschließlich die Spleißdonoren (SD) oder Spleißakzeptoren (SA), die bei der Generierung der verschiedenen *ie3*-Transkriptvarianten eine Rolle spielen. Über den Spleißstellen, ist deren intrinsische Stärke dargestellt. Zur Berechnung der Spleißdonor-Stärke (rot hervorgehobene Werte) wurde der HBond Score-Algorithmus und zur Kalkulation der Spleißakzeptor-Stärke (blaue Werte) wurde der MaxEntScan-Algorithmus verwendet. Im unteren Bereich der Abbildung sind die alternativen Spleißvorgänge, die zur Generierung der *ie3*-Transkriptvarianten führen, schematisch dargestellt.

Die kalkulierten intrinsischen Spleißstellen-Stärken der IE-611-, IE-453-, und IE-310-Transkriptvarianten unter Verwendung des HBond Score-Algorithmus für Spleißdonoren und des MaxEntScan-Algorithmus für Spleißakzeptoren sind in der Abbildung 3.2 zusammengefasst. Die Spleißstellen der Transkriptisoform, welche für IE-611 ( $SD_{IE-611} = 20,5$ ;  $SA_{IE-611} = 6,9$ ) kodiert, sind stärker als die der Isoform, die für IE-453 ( $SD_{IE-453} = 14,0$ ;  $SA_{IE-453} = 4,9$ ) kodiert. Deshalb werden die IE-611-Spleißstellen vermutlich effizienter von dem Spleißosom erkannt, wodurch die höhere Abundanz der IE-611- im Vergleich zur IE-453-Transkriptmenge erklärt werden könnte (Abbildungen 2.9 und 2.29). Die 5'-Spleißstelle, die für die Herstellung der IE-310-Transkriptisoform verwendet wird, besteht lediglich aus einem isolierten GT-Dinukleotid und es überrascht daher sehr, dass dieses überhaupt als Spleißstelle erkannt wird ( $SD_{IE-310} = 1,8$ ). Die IE-310 3'-Spleißstelle ( $SA_{IE-310} = 6,0$ ) ist etwas schwächer als der Spleißakzeptor der IE-611-Transkriptisoform und ein wenig stärker als der Akzeptor, der für die IE-435-Transkriptvariante genutzt wird. Demzufolge müssten die Spleißstellen (insbesondere der Donor) der IE-310-Transkriptvariante nur äußerst ineffizient erkannt werden. Obwohl die absoluten

Werte der intrinsischen Spleißdonor-Stärken unter Verwendung des MaxEntScan-Algorithmus ( $SD_{IE-611} = 10,67$ ;  $SD_{IE-453} = 7,46$ ;  $SD_{IE-310} = -21,79$ ) im Vergleich zu den HBond Score-Werten variieren, ergibt sich die gleiche Abstufung der intrinsischen Spleißdonor-Stärke, d.h. der  $SD_{IE-611}$  sollte besser als der  $SD_{IE-453}$  vom Spleißosom erkannt werden, wohingegen die Stärke des  $SD_{IE-310}$  mit einem negativen Wert als äußerst gering bewertet wird. Offensichtlich wird der IE-310-Spleißdonor aber trotz seiner sehr geringen intrinsischen Stärke genutzt, da das IE-310-Transkript nachweisbar ist (Abbildung 2.9).

Anhand dieser Befunde muss geschlussfolgert werden, dass die Nutzung einer Spleißstelle auch heutzutage noch nicht ausschließlich mit Hilfe von Algorithmen, welche die intrinsische Spleißstelle-Stärke kalkulieren, vorhergesagt werden kann.

Dies steht im Einklang mit der Erkenntnis, dass es weitere Faktoren gibt, die die Auswahl und Nutzung einer Spleißstelle stark beeinflussen können. Hierbei spielen sogenannte *cis*-wirkende regulatorische Sequenzelemente, welche die prä-mRNA aufweisen kann, eine Rolle. Diese Sequenzelemente können die Spleißstellen-Erkennung und -Nutzung sowohl fördern als auch hemmen. Sie werden abhängig von ihrer relativen Lage als exonische Spleiß-*Enhancer* (ESE) bzw. –*Silencer* (ESS) und intronische Spleiß-*Enhancer* (ISE) bzw. –*Silencer* (ISS) bezeichnet (Blencowe, 2000; Pozzoli and Sironi, 2005). Die spleißregulatorischen *cis*-wirkenden Sequenzmotive werden von spezifischen Kernproteinen gebunden. Zu diesen Spleißfaktoren gehört unter anderem die Familie der SR (Serin/Arginin-reiche)-Proteine und die Familie der hnRNP (*heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*)-Proteine. Früher wurden SR-Proteine als spleißfördernd und hnRNP-Proteine als spleißinhibitorisch klassifiziert (Jurica and Moore, 2003; Long and Caceres, 2009; Martinez-Contreras et al., 2006). Neuere Erkenntnisse zeigen allerdings, dass SR-Proteine auch spleißinhibitorisch (Buratti et al., 2006; Dauksaite and Akusjärvi, 2002; Kanopka et al., 1996; Qi et al., 2007; Shen and Mattox, 2011) und hnRNPs ebenso spleißfördernd wirken können (Chou et al., 1998; Garneau et al., 2005; Hastings et al., 2001; Min et al., 1995). Die fördernde bzw. inhibitorische Wirkung der Spleißproteine hängt dabei von ihrer relativen Bindeposition zur Spleißstelle (d.h. im Exon oder im Intron) ab (Erkelenz et al., 2013; Llorian et al., 2010; Tollervey et al., 2011; Ule et al., 2006).

Da sich stromaufwärts des intrinsisch sehr schwachen IE-310-Spleißdonors (definiert das Exon 2a) putative Bindestellen für die spleißregulatorischen SR-Proteine

SF2/ASF und SC35 befinden, könnten diese zur Förderung und Nutzung dieser 5'-Spleißstelle beitragen (Abbildung 3.3 oben). *Upstream* des IE-453-Spleißdonors (definiert das Exon 5a) werden ebenfalls putative ESE-Motive vorhergesagt, die Bindestellen für die SR-Proteine SF2/ASF, SC35, SRp40 und SRp55 darstellen. Auch in diesem Fall könnte die  $SD_{IE-453}$ -Erkennung durch die Assoziation der spleißregulatorischen Proteine gefördert werden (Abbildung 3.3 unten).

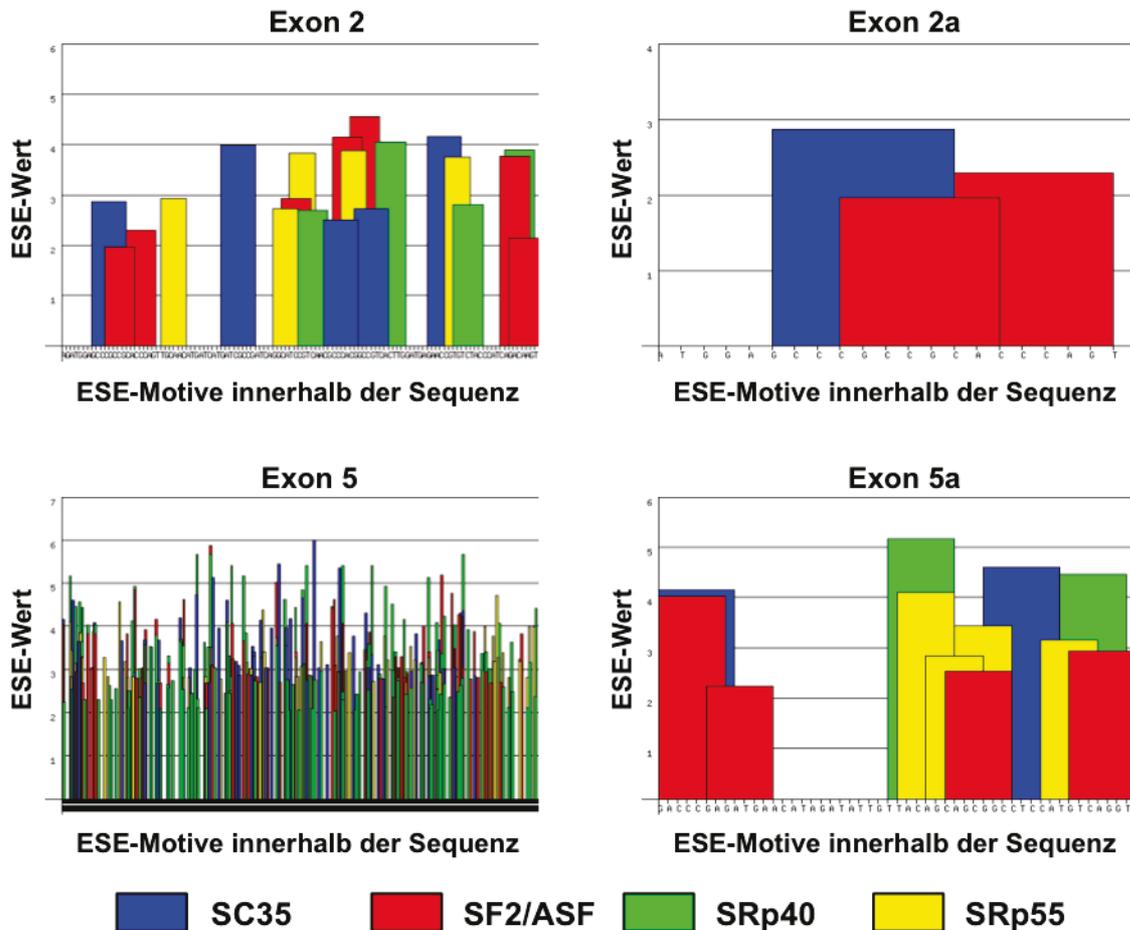


Abbildung 3.3 Putative Bindestellen der spleißregulatorischen SR-Proteine innerhalb der Exon 2-, 2a-, 5- und 5a-Sequenz.

Die Sequenzen der verschiedenen Exons wurde mit Hilfe des Programmes ESEfinder 3.0 (<http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/ese finder.cgi?process=home>) (Cartegni et al., 2003; Smith et al., 2006) auf ESE (*exonic splice enhancer*)-Motive untersucht. Es wurden putative Bindestellen für das SC35- (Schwellenwert 2,383), SF2/ASF- (Schwellenwert 1,956), SRp40- (Schwellenwert 2,67) und SRp55-Protein (Schwellenwert 2,676) vorhergesagt. Links in der Abbildung dargestellt, sind die ESE-Motive des gesamten Exons 2 bzw. 5. Auf der rechten Seite der Abbildung sind die putativen SR-Protein-Bindestellen der Exons 2a und 5a gezeigt. Die Sequenzen der Exons 2a und 5a wurden einschließlich des GT-Dinukleotids des jeweiligen Spleißdonors analysiert, um den Übergang zwischen exonischer und intronischer Sequenz für die jeweilige Transkriptisoform zu zeigen.

Insgesamt ist zu erkennen, dass die gesamte Exon 2- bzw. Exon 5-Sequenz zahlreiche putative Bindestellen für SR-Proteine enthält, die zur Spleißfaktor-vermittelten Regulation der Spleißstellen-Erkennung und -Nutzung beitragen könnten. Umgekehrt könnte auch die Nutzung einer beispielsweise intrinsisch starken Spleißstelle durch die Bindung von Mitgliedern der hnRNP-Familie gehemmt werden. Eine Möglichkeit dafür besteht darin, dass die Repression über sterische Hinderung erfolgt, indem die hnRNP-Proteine an Bindestellen assoziieren, die mit ESE-Motiven oder Spleißstellen überlappen und dadurch die Bindung von SR-Proteinen oder anderen Spleißosom-Komponenten an diese Sequenzen verhindern (Doktor et al., 2011; Hallay et al., 2006).

### **3.2.3. Das Expressionsniveau der IE-611-, IE-453- und IE-310-Proteine**

Sowohl von dem pIE-611- als auch von dem pIE-453-Expressionsplasmid wird zusätzlich die alternative Transkriptvariante, die für pIE-310 kodiert, gebildet (Abbildung 2.12 A). Dies liegt vermutlich daran, dass die jeweiligen cDNAs der längeren Isoformen IE-611 bzw. IE-453, die Spleißstellen flankierenden genomischen Sequenzen enthalten, die für die Prozessierung der IE-310-Transkriptvariante nötig sind, d.h. die IE-310-Spleißstellen sind in den IE-611- und IE-453-Vektoren funktionell und können genutzt werden (Abbildung 3.2). Darüber hinaus zeigt dieses Ergebnis, dass sich die Spleißstellen-regulierenden *cis*-wirkenden Bereiche innerhalb dieser längeren cDNA-Sequenzen befinden müssen. Erstaunlicherweise exprimieren die IE-611- und IE-453-Vektoren in transfizierten HeLa-Zellen sogar höhere IE-310-Proteinmengen als der IE-310-Expressionsvektor an sich (Abbildung 2.12 A). Um die drei Formen des IE-310-HA-Proteins in späteren Immunoblot Analysen besser detektieren zu können, wurde von dem Lysat der IE-310-transfizierten HeLa-Zellen 4-mal mehr als von den Lysaten der IE-611- bzw. IE-453-transfizierten HeLa-Zellen aufgetragen (Abbildung 2.13 und 2.16). Die IE-310-Proteinmenge ist in Virus-infizierten Fibroblasten zwar geringer als die Menge der IE-611- und der IE-453-Proteinisoform, aber insgesamt höher als nach ektopischer, isolierter IE-310-Expression. Da die pIE-310-Menge in Anwesenheit des pIE-611 und des pIE-453 sowohl im Viruskontext als auch nach ektopischer Expression in den verwendeten Zell-Linien höher war, ist es möglich, dass die beiden größeren Isoformen zur Stabilität des pIE-310 beitragen oder dessen Abbau verhindern. Dies

könnte durch eine Kotransfektion des IE-611- oder des IE-453-Vektors in Kombination mit dem pIE-310-kodierenden Plasmid mit anschließender Immunoblot Analyse getestet werden. Um die IE-310-Proteinbanden (generiert vom IE-611- bzw. IE-453-Vektor) von den IE-310-Signalen, die von den IE-310-Plasmid exprimiert werden, unterscheiden zu können, müsste die CDS im IE-310-Vektor mit einem anderen Epitop (z.B. Flag) markiert werden. Eine etwaige Interaktion zwischen den IE3-Proteinisoformen ist durch Koimmunopräzipitationsexperimente untersuchbar.

Zudem ist es vorstellbar, dass sich das Expressionsmuster in anderen Zellarten zugunsten des IE-310-Proteins verändert, da die Menge der spleißregulatorischen Proteine ebenfalls innerhalb verschiedener Zellarten variiert (Hanamura et al., 1998; Kamma et al., 1995; la Grange et al., 2010). Im Fall von HIV-1 konnte nachgewiesen werden, dass die Konzentration der SR-Proteine das Spleißmuster des Virus verändert (Jacquenot et al., 2005). Die Überexpression des ASF/SF2-Proteins in HIV-1-transfizierten 293T-Zellen führte zu stark erhöhten Mengen von Vpr1, Vpr 3, Tat2, Tat3 und Tat6, während eine Überexpression von SC35 in einem Spleißmuster resultierte, bei dem fast ausschließlich das Tat1-Transkript hergestellt wurde. Zudem konnte nach Überexpression des ASF/SF2-Proteins eine fast vollständige Unterdrückung der Gag- und Env-Expression und eine Verminderung der Virus-Infektiosität beobachtet werden (Jacquenot et al., 2005). Um eine eventuelle Zelltyp-abhängige Expression der IE3-Proteine zu untersuchen, können unterschiedliche Zellarten mit dem IE-3-HA-Virus infiziert (z.B. primäre Hepatozyten) werden.

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass die Proteinisoformen IE-611 und IE-453 hauptsächlich während der lytischen Infektion (die im Rahmen dieser Doktorarbeit untersucht wurde) exprimiert werden und die Isoform IE-310 eher eine Rolle bei der Reaktivierung und/oder in der latenten Phase spielt und deshalb in lytisch-infizierten Zellen nur geringe Transkript- und Proteinmengen generiert werden. In einer Studie von Kurz et al. wurde kein *ie3*-Transkript in latent-infiziertem Lungengewebe von Mäusen nachgewiesen (Kurz and Reddehase, 1999). Da der verwendete *ie3*-reverse-Primer in dieser Studie aber in einem Sequenzabschnitt des 5' Bereichs von Exon 5 bindet, der in den IE-453- und IE-310-Transkripten nicht enthalten ist, war nur eine Amplifikation des IE-611-Transkripts möglich.

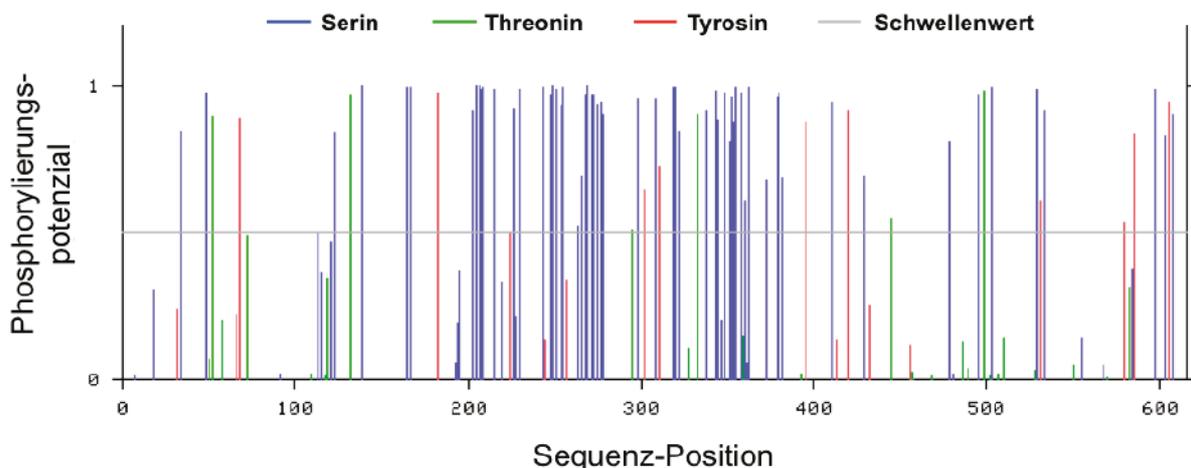
Zudem wurde in einer Computer-gestützten Analyse von *Microarray*-basierenden Gen-Expressionsprofilen gezeigt, dass sich die Spleißfaktor-Expression während der Zell-Differenzierung (die bei der Reaktivierung eine Rolle spielt (Mocarski et al.,

2007)) und innerhalb verschiedener Zell-Gewebe ändert (Grosso et al., 2008). Die Veränderung der Spleißfaktor-Expression von undifferenzierten Zellen (Orte der viralen Latenz (Jarvis and Nelson, 2007)) zu differenzierten Zellen könnte deshalb auch zu einer unterschiedlichen Abundanz der IE3-Transkript- und Proteinvarianten führen.

### 3.3 Analyse der IE3-Proteinisoformen

#### 3.3.1 Werden die IE3-Proteine posttranslational modifiziert?

Die kalkulierte molekulare Masse, die auf der Aminosäure-Sequenz der einzelnen Proteinisoformen beruht ([http://www.bioinformatics.org/sms2/protein\\_mw.html](http://www.bioinformatics.org/sms2/protein_mw.html)), ergibt für pIE-611 ein Molekulargewicht von 68,13 kDa, für pIE-453 von 50,30 kDa und für pIE-310 von 34,65 kDa. Nach Auftrennung mittels SDS-PAGE weist das pIE-611 allerdings eine Größe von 88 kDa und das pIE-453 eine Größe von ca. 60 kDa auf. Von dem IE-310-Protein sind drei Formen mit einer Größe zwischen 35-40 kDa nachweisbar. Das höhere Molekulargewicht der IE3-Proteinisoformen nach SDS-PAGE könnte durch posttranslationale Modifikationen wie z.B. Phosphorylierung oder Sumoylierung entstehen. Da die aa-Sequenz des pIE-611 Bereiche enthält, in denen sich Serin-Gruppen häufen, wurde bereits 1992 von Messerle et al. eine putative posttranslationale Phosphorylierung des IE-611-Proteins vorgeschlagen (Messerle et al., 1992).



**Abbildung 3.4 Putative Phosphorylierungsstellen des pIE-611.**

Die Analyse der Aminosäure-Sequenz des pIE-611 mit Hilfe von NetPhos 2.0 ergibt eine Vielzahl von putativen Serin-, Threonin- und Tyrosin-Phosphorylierungsstellen.

Eine *in silico* Analyse der pIE-611-Sequenz (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) (Blom et al., 1999) ergibt insbesondere eine Vielzahl von putativen Serin-Phosphorylierungsstellen (Abbildung 3.4). Obwohl die Gesamtanzahl der Phosphorylierungsstellen aufgrund der kürzeren Aminosäure-Sequenz in den IE-453- und IE-310-Proteinen sinkt, werden noch zahlreiche putative Serin-, Threonin- oder Tyrosin-Phosphorylierungsmotive vorhergesagt (Daten nicht gezeigt).

Für das HCMV IE2 (IE86)-Protein ist eine kovalente Sumoylierung an den Lysinen K175 (SUMOplot™ Wert = 0,94) und K180 (Wert = 0,94) publiziert (Ahn et al., 2001; Hofmann et al., 2000). pIE2 (pIE86) interagiert zusätzlich nicht kovalent über ein SUMO-*interaction motif* (SIM) (aa 200-208; aa-Motiv IVISDEEE) mit SUMO-1 (Ahn et al., 2001; Berndt et al., 2009). Die Sumoylierung des IE2 (IE86)-Proteins ist wichtig für dessen Transaktivierungsaktivität von *early*-Genen und das Viruswachstum. Mutationen innerhalb des SIM-Motivs verringern die virale Replikation, die Akkumulation von *early*- und *late*- exprimierten Proteinen, die Formation der frühen Transkriptionsdomänen und die Assoziation des *ie2*-Genprodukts mit viralen Promotoren. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von HCMV pIE2 (pIE86) mit dem TATA-*binding protein* (TBP)-*associated factor* 12 (TAF12), ein Bestandteil des TFIID-Komplexes, SIM-abhängig ist und diese Bindung die Transaktivierungsaktivität von pIE2 (pIE86) erhöht (Kim et al., 2010). Die *in silico* Analyse mit dem Algorithmus SUMOplot™ (<http://www.abgent.com/sumoplot/>) des pIE-611 ergibt drei mögliche Sumoylierungsstellen (K36, K337, K412), wobei K36 (Wert = 0,39) vom Exon 3 kodiert und K337 (Wert = 0,59) sowie K412 (Wert = 0,34) vom Exon 5d kodiert werden. Das Anfügen eines Sumo-Proteins führt zu Erhöhung der molekularen Masse um ca. 11 kDa. Eine Sumoylierung des pIE-611 und pIE-453 wäre demzufolge denkbar. Entsprechende Experimente zum Nachweis einer Phosphorylierung oder Sumoylierung wie beispielweise eine Massenspektrometrie oder eine Detektion mit einem Phospho/Sumo-spezifischen Antikörper wurden in dieser Arbeit nicht durchgeführt.

### 3.2.2 Putative Proteindomänen und -Funktionen

Wie bereits im Abschnitt 1.1.5.3 erwähnt wurde, weisen das HCMV pIE2 (pIE86) und das MCMV pIE-611 innerhalb des C-Terminus zu 56% identische oder konservierte Aminosäuren auf (Busche et al., 2008). Hierbei sind die HCMV pIE86 aa 334-559 und die MCMV pIE-611 aa 382-601 zu 41% identisch (Abbildung 3.5).

pIE86	334	NEKVRNIMKDKNTPFCTPNVQTRRGRVKIDEVSRMFRNTNRSLEYKNLPFTTIPSMHQVLD	393
		++K+R+++ + PN ++ R ++ SR + R+LEYKNLPF S +L	
pIE-611	382	SDKIRDMVDRTAGGYVAPNAH-KKCR---EDKSRKY--PARALEYKNLPFRPQSPQYLLG	435
pIE86	394	EAIKACKTMQVNNKGIQIIYTRNHEVKSEVDAVRCRLGTMCNLALSTPFLMEHTMPV <b>THP</b>	453
		+AI+ CK V++K I + YTR+ +V+ VD R R+G NL++S PF+ EHT P+ H	
pIE-611	436	KAIQFCKEETVHDKFIMLFYTRSQDVRKAVIDETRARMGMRPNLSISCPFMTEHTKPINHS	495
pIE86	454	<b>FEVAQRTADACNEGKAAWSLKEHLHQLCPRSSDYRNMIHAATPVDLLGALNLCPLM</b>	513
		E RT+ AC G +A W ++E + PR+SDYR+MII AA P D LGA+ CL L	
pIE-611	496	RETIDRTSAACTAGTQAVWDMERRGQKCVPRTSDYRSMIIQAANPPDFLGAVKTCCLHLS	555
pIE86	514	<b>QKFPKQVMVRIFSTNQGGMFLPIYETAAKAYAVGQFEQPTETPPED</b>	559
		Q FPKQV +R+ S G LPIYE +Y QFE + ED	
pIE-611	556	QVFPKQVCMRLCSITGGLNPLPIYEETVSSYVNAQFEADDISHHED	601

**Abbildung 3.5** Der C-Terminus des HCMV pIE2 (pIE86) und des MCMV pIE-611 besteht zu 41% aus identischen Aminosäuren.

Das Alignment der HCMV pIE86 (Towne)- und der pIE-611 (MW97.01)-Sequenz ergibt im C-Terminus der Proteine eine Aminosäure-Identität von 41%. 56% der Sequenz besteht aus konservierten Aminosäuren. Rot markiert ist die HCMV pIE86 Core-Region (aa 450-552) (Asmar et al., 2004).

Für das HCMV IE2 (IE86)-Protein ist eine sogenannte *Core*-Region (aa 450-552) im C-Terminus beschrieben, die für dessen Funktionen als MIEP-Repressor (Autoregulation), als Transaktivator der *early*-Genexpression sowie für die Zellzyklus-Regulation und die *in vitro* DNA-Bindefähigkeit entscheidend ist (siehe auch Abschnitt 1.1.5.3) (Asmar et al., 2004). Ein Alignment der Aminosäure-Sequenz der HCMV IE86-*Core*-Region mit der vollständigen Protein-Sequenz des pIE-611 ergab eine Sequenz-Identität von 47% zwischen den HCMV pIE86 Aminosäuren 450-552 und den aa 490-569 des MCMV IE-611-Proteins (siehe oben). Die aa 490-569 des pIE-611 werden von dem 3'-gelegenen Bereich des Exons 5d kodiert. Da bisher keine MCMV *ie3*-Transkriptvariante, bei der Teile des Exons 5d herausgespleißt werden, identifiziert wurde, scheint dieser Bereich wichtig für die vielfältigen publizierten Aufgaben des IE3-Proteins zu sein. Zudem spricht dies für eine gewisse Funktionsredundanz der verschiedenen IE3-Proteine. Leider wird dadurch aber auch eine Vorhersage erschwert, welches IE3-Protein für welche Aufgabe verantwortlich ist.

Aufgrund der Identifikation der IE-453- sowie der IE-310-Transkript- und Proteinisoformen ergeben sich neue Ansätze zur Untersuchung der MCMV *ie3*-vermittelten Funktionen. Durch die gezielte Deletion der Exon 5b-Sequenz im Rahmen der Generierung der  $\Delta$ IE-611-Virusmutante waren zum ersten Mal Infektionsstudien in Abwesenheit des kanonischen pIE-611 möglich. Durch den Nachweis, dass das  $\Delta$ IE-611-Virus replikationskompetent ist, konnte gezeigt werden,

dass die IE-611-Proteinisoform, im Gegensatz zu bisherigen Annahmen, für das Viruswachstum nicht essentiell ist (Abbildung 2.24). Zudem scheint das pIE-611 nicht für die Transaktivierung der viralen *early*- und *late*-Genexpression benötigt zu werden, da in  $\Delta$ IE-611-infizierten Zellen sowohl das pM112/M113 (*early* 1) als auch das *early/late*-exprimierte pM45 in Western-Blot Analysen nachgewiesen werden konnte (Abbildung 2.23). Vermutlich werden diese Aufgaben, aufgrund von potenziellen Funktionsredundanzen der IE3-Proteinisoformen, in Abwesenheit des pIE-611 von pIE-453 und/oder pIE-310 bewerkstelligt. Welche der IE3-Proteinvarianten essentiell für das virale Wachstum ist, könnte in der Zukunft mit Hilfe der Wiederherstellung der Replikationsfähigkeit der  $\Delta$ ie3-Virusmutante (in der das gesamte Exon 5 deletiert wurde) auf komplementierenden Zellen, die jeweils eine der drei IE3-Proteine in *trans* bereitstellen, analysiert werden. Aufgrund der Expression des pIE-310 durch die IE-611- und IE-453-Expressionsplasmide müsste zunächst das GT-Dinukleotid des IE-310-Spleißdonors in diesen Plasmiden mutiert werden, um eine exklusive Expression von nur einer Proteinvariante zu gewährleisten. Ferner ist eine Identifikation der essentiellen IE3-Proteinisoform durch Wachstums- und Immunoblotanalysen mit Virusmutanten möglich, in denen zusätzlich zur Deletion der Exon 5b Sequenz ( $\Delta$ IE-611), das GT-Dinukleotid des SD<sub>IE-453</sub> oder des SD<sub>IE-310</sub> mutiert wurde, wodurch die Spleißdonor-Erkennung und somit die Generierung der jeweiligen Transkript- und Proteinisoform erschwert wird. Im Rahmen dieser Experimente kann zudem untersucht werden, welche der IE3-Proteinvarianten für die Transaktivierung der *early*- und *late*-Genexpression verantwortlich ist.

Die massiv verstärkte pp89 (pIE1)-Expression und die leicht erhöhte pM112/M113 (pE1)-Proteinmenge in  $\Delta$ IE-611-infizierten Zellen deutet stark auf eine Funktion des pIE-611 als Promotor-Repressor hin (Abbildung 2.23). Außerdem wurde eine gesteigerte Abundanz der *ie1*-Transkriptmenge in RT-PCR-Reaktionen mit RNA aus  $\Delta$ IE-611-infizierten Zellen detektiert (Daten nicht gezeigt). Diese Befunde stehen im Einklang mit der erhöhten *ie1*-Transkriptmenge in  $\Delta$ ie3-Virus-infizierten Zellen, die von Angulo et al. beobachtet wurde (Angulo et al., 2000). Das Srev-Virus weist dagegen eine annähernd wt-Virus-artige *ie1*-Transkript- als auch Proteinmenge (Abbildung 2.23) auf, obwohl das IE-Srev-Protein 81 Aminosäuren weniger als das wt-IE-611-Protein enthält. Auf den ersten Blick scheinen deshalb die Aminosäuren, die von dem 3'-Bereich des Exons 5b translatiert werden, für die (Auto)repression

verantwortlich zu sein (Abbildung 2.21). Dies kann allerdings nicht mit Gewissheit gesagt werden, da im Srev-Virus das ursprüngliche Leseraster wieder hergestellt ist, wodurch der C-terminale Bereich des IE-611/IE-Srev-Proteins im Gegensatz zum  $\Delta$ IE-611-Protein translatiert werden kann. Die Immunoblot Analyse einer Zeitkinetik, bei der die MIEP-abhängige Proteinexpression eines Kontrollgens mit und ohne Kotransfektion von jeweils einer MIEP-unabhängig exprimierten IE3-Proteinvariante (z.B. unter Kontrolle des *human elongation factor 1 alpha* (EF-1- $\alpha$ )-Promotors) verfolgt wird, kann Aufschluss über die Autorepressionsfähigkeit einer der Proteinisoformen geben. Führt die Kotransfektion einer *ie3*-Isoform zu einer geringeren Expression des Kontrollproteins im Vergleich zu Zellen, die nicht mit einer *ie3*-Isoform kotransfiziert wurden, wäre dies ein Hinweis dafür, dass diese IE3-Proteinvariante an der Inhibition des MIEP beteiligt ist. Eine mit wt-Virus vergleichbare pp89 (pIE1)- und/oder pM112/M113 (pE1)-Expression von  $SD_{IE-453}$ - und/oder  $SD_{IE-310}$ -Virusmutanten würde die pIE-611-vermittelte (Auto)repression bekräftigen. Falls alle drei Proteinisoformen zur Hemmung des MIEPs oder anderer viraler Promotoren beitragen, kann eine genaue Lokalisation der (Auto)repressionsdomäne durch eine schrittweise Verkürzung des 3'-Endes der Exon 5d-Sequenz oder durch interne Deletionen innerhalb der Exon 5d-Sequenz erfolgen. Die HCMV IE55-Proteinisoform, die von einem alternativen Transkript, das unterschiedliche Spleißstellen im Exon 5 nutzt, kodiert wird, und der im Vergleich zum IE86-Protein die aa 365-519 fehlen, ist allerdings nicht in der Lage den HCMV MIEP zu hemmen (Klucher et al., 1993).

Insgesamt scheint die Abwesenheit der IE-611-Proteinisoform zu einer Deregulation der viralen Genexpression zu führen, was auf eine Funktion des pIE-611 als Promotor-Repressor hindeutet. Bei der Interpretation von *ie3-knockdown* Befunden, die beispielsweise mit Hilfe von *ie3* Exon 5-spezifischen shRNAs generiert wurden, sollte deshalb die Deregulation der viralen Genexpression berücksichtigt werden, da indirekte Effekte aufgrund der Veränderung des viralen Genexpressionsmusters nicht auszuschließen sind. Zudem ist eine genaue Analyse der shRNA-Bindestellen innerhalb der *ie3* Exon 5-Sequenz notwendig, um den gezielten *knockdown* von einer bzw. mehrerer IE3-Proteinisoformen sicherzustellen.

### 3.3.3 Inhibition der Typ I IFN-Induktion durch pIE-611?

Das IFN-System stellt einen der frühesten Abwehrmechanismen der Zelle dar und wird sofort nach der Erkennung eines Pathogens initiiert. Schon das *attachment* und das *entry* des Viruspartikels an/in die Zelle führt zur Initiation von verschiedenen Signalkaskaden und löst eine Aktivierung der drei Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B, IRF-3 und ATF/cJun aus (siehe Abschnitt 1.2.2). Durch die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren und deren Bindung an verschiedene Promotoren (z.B. IFN- $\beta$ ) wird die Expression von Interferonen sowie von *Interferon-stimulated genes* (ISG) ausgelöst und die Zelle in einen antiviralen Zustand versetzt. Deshalb ist für eine effiziente Virus-Replikation und –Vermehrung ein kurz nach dem Eintritt in die Zelle zur Verfügung stehender viraler Antagonist des IFN-Systems von Vorteil. Da die *ie*-Gene die ersten viralen Gene darstellen, die in der infizierten Zelle exprimiert werden, sind sie ideale Kandidaten für eine schnelle Inhibition der zellulären IFN-Antwort.

Das HCMV *ie2*-Genprodukt pIE86 stellt so einen prototypischen, früh im lytischen Replikationszyklus exprimierten Antagonisten der IFN- $\beta$ -Induktion dar. pIE86 hemmt die Bindung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B an Gen-Promotoren, die eine  $\kappa$ B-Bindestelle enthalten (z.B. IFN- $\beta$ ), und interferiert dadurch mit der IFN- $\beta$ -Induktion (Taylor and Bresnahan, 2005; 2006a).

Mit Hilfe der IE3-Expressionsplasmide konnte in Abschnitt 2.4.1 eine starke Inhibition der ISG54-Promotor/Enhancer-Aktivität nach Koexpression des IE-611- und des TBK-1-Proteins detektiert werden. Eine partielle Hemmung der ISG54-Promotor/Enhancer-Induktion wurde nach Kotransfektion des pIE-453 mit TBK-1 beobachtet (Abbildung 2.26). Die  $\Delta$ IE-611-Virus-Infektion von stabilen Transfektanten, welche die Firefly-Luciferase unter der Kontrolle des ISRE-Promotors/Enhancers exprimieren, resultierte in einer erhöhten ISRE-Promotor/Enhancer-Aktivität im Vergleich zu wt-Virus-infizierten Zellen (Abbildung 2.28). Zudem konnten höhere IFN- $\beta$ -Transkriptmengen in  $\Delta$ IE-611-Virus- im Vergleich zu wt-Virus-infizierten Zellen detektiert werden (Abbildung 2.29 und 2.30).

Aufgrund der beschriebenen Befunde könnte pIE-611 das MCMV-kodierte Analog für einen frühen Antagonisten der IFN-Induktion sein.

Eine mögliche Interpretation für die beobachtete Hemmung der IFN- $\beta$ -Induktion ist eine pIE-611-vermittelte Inhibition des IRF-3-abhängigen Signalwegs, da die TBK-1-induzierte ISG54-Promotor/Enhancer-Aktivität reduziert wird und die Hemmung des

NF- $\kappa$ B-vermittelten Signalwegs durch das MCMV *M45*-Genprodukt sichergestellt ist (Fliss et al., 2012; Mack et al., 2008; Rebsamen et al., 2009; Upton et al., 2008). Eine Redundanz der Typ I IFN-Inhibition durch pIE-453 und pIE-310 kann nicht ausgeschlossen werden, da insbesondere das pIE-453 zu einer partiellen Hemmung der ISG54-Promotor/Enhancer-Aktivierung führt. In Anbetracht der Tatsache, dass die wt-Virus-vermittelte Hemmung der IFN- $\beta$ -Genexpression sowie die Inhibition der IRF-3-Phosphorylierung bereits 6 hpi nachweisbar ist (Le et al., 2008b), und sowohl das pIE-453 als auch das pIE-310 in IE3-HA-infizierten Zellen erst schwach nach 8 h Infektion im Western-Blot detektierbar ist (Abbildung 2.12), erscheint das pIE-611 aber wahrscheinlicher (4 hpi starke Expression). Um synergistische oder kompetitierende Funktionen der IE3-Proteinisofomen aufeinander zu untersuchen, könnten verschiedene Kombinationen der IE3-Expressionsplasmide zusammen mit dem ISG54-Luciferase- und dem TBK-1-Vektor kotransfiziert und die ISG54-Promotor/Enhancer-Aktivität verfolgt werden.

Nach Kotransfektion des HCMV IE2- und des TBK-1-Expressionsplasmids wurde die stärkste Inhibition der ISG54-Promotor/Enhancer-Aktivität detektiert. Das HCMV IE2 (IE86)-Protein ist als Antagonist der IFN- $\beta$ -Induktion beschrieben (Taylor and Bresnahan, 2005; 2006a). Es hemmt die DNA-Bindung des NF- $\kappa$ B-Heterodimers und dadurch die Expression von Genen, die  $\kappa$ B-Bindestellen im Promotor aufweisen (z.B. IFN- $\beta$ ). Der ISG54-Promotor/Enhancer ist IRF-3/IFN- $\beta$ -responsiv, enthält aber keine NF- $\kappa$ B-Bindestellen (Bluyssen et al., 1994; Doukas and Sarnow, 2011; Grandvaux et al., 2002). Die Hemmung der ISG54-Promotor/Enhancer-Aktivität nach Koexpression des HCMV IE2- und des TBK-1-Proteins deutet deshalb darauf hin, dass das HCMV pIE2 die IRF-3-vermittelte Signaltransduktion über einen noch unbekanntem Wirkmechanismus inhibiert.

Nach ektopischer Expression des pIE-611 bzw. des pIE-Srev wurden reproduzierbar geringere TBK-1-Flag-Proteinmengen beobachtet (Abbildung 2.27). Eine mögliche Erklärung ist eine pIE-611-vermittelte Interferenz mit der TBK-1-Synthese oder -Stabilität. Eine Interferenz des IE-611-Proteins (oder des IE-454- bzw. IE-310-Proteins) mit TBK-1 bzw. mit dem IRF-3-abhängigen Signalweg kann beispielsweise durch eine IRF-3-spezifische Immunfluoreszenz-Färbung gezeigt werden. Die Transfektion von Zellen mit einem Kontrollplasmid und einem TBK-1-Vektor sollte zu einer nukleären Translokation von IRF-3 führen. Wird bei einer Kotransfektion von jeweils einem IE3-Expressionsplasmid zusammen mit TBK-1 keine Translokation von

IRF-3 in den Zellkern beobachtet, spricht dies für eine Inhibition des IRF-3-abhängigen Signalwegs. Für das analoge Experiment im Virus-Kontext könnten Zellen mit wt-Virus und den  $\Delta$ IE-611-, SD<sub>IE-453</sub>- bzw. SD<sub>IE-310</sub>-Virusmutanten infiziert und die IRF-3-Phosphorylierung bzw. -Dimerisierung mittels Western-Blot Analyse untersucht werden. Ist eine der Virusmutanten, im Gegensatz zum wt-Virus, nicht mehr fähig, die IRF-3-Phosphorylierung/Dimerisierung 6 hpi zu hemmen, deutet dies auf eine antagonistische Funktion der deletierten IE3-Proteinvariante hin.

Für das Ebola-Virus konnte eine Inhibition der IRF-3-Aktivierung nachgewiesen werden. Das VP35-Protein bindet IKKi und TBK-1 und hemmt dadurch nötige Interaktion der Kinasen miteinander, aber auch von den Kinasen mit ihren Substraten IRF-3 und IRF-7, wodurch die IRF-3 Aktivierung verhindert wird (Basler et al., 2003; Prins et al., 2009).

Eine andere Erklärung für die geringe TBK-1-Expression in Anwesenheit des IE-611-Proteins ist die vorher bereits angesprochene putative Funktion des pIE-611 als Autorepressor. Die TBK-1-Expression wird in dem verwendeten Expressionsplasmid durch den HCMV-MIEP kontrolliert. Falls die Sequenzen/Domänen, die bei der Autorepression eine Rolle spielen, zwischen HCMV und MCMV stark konserviert sind, wäre es denkbar, dass das IE-611-Protein auch den HCMV-MIEP inhibiert. Der geringeren Aktivierung des ISG54-Promotors/Enhancers würde in diesem Fall eine schwächere Stimulation zu Grunde liegen.

Zudem ist es möglich, dass das pIE-611 sowohl nach ektopischer Expression als auch im Virus-Kontext fähig ist, verschiedene zelluläre Promotoren zu hemmen. Um eine Promotor-inhibitorische Funktion des pIE-611 zu überprüfen, könnten Luciferase-Reporter-Gen-Analysen durchgeführt werden, bei denen das Luciferase-Gen unter der Kontrolle verschiedener zellulärer Promotoren (z.B. IRF-1) exprimiert wird und die Luciferase-Expression nach Kotransfektion der IE3-Expressionsplasmide und einem entsprechenden Stimulus detektiert wird.

Im Rahmen der Dual-Luciferase-Experimente mit den stabilen Transfektanten (NIH3T3-ISRE-Luc-Renilla) wurden 24 hpi niedrigere Renilla-Luciferase-Werte nach Infektion mit dem  $\Delta$ IE-611-Virus (2,5-fach) bzw. mit dem Srev-Virus (3,0-fach) im Vergleich zum wt-Virus detektiert. Die Renilla-Luciferase wurde mit Hilfe eines nicht-IFN-responsiven Kontrollpromotors (HSV-Tymin-Kinase) konstitutiv exprimiert und die gemessenen Werte zur Normierung der ISRE-Firefly-Werte verwendet. Die niedrigeren Renilla-Werte sprechen für eine erhöhte Zelltod-Rate, die durch die

Infektion mit dem  $\Delta$ IE-611- oder Srev-Virus ausgelöst wird. Eine mögliche Erklärung für die geringeren Renilla-Werte ist die gesteigerte Expression von Stress- bzw. IFN-induzierten Effektorgenen, da bekannt ist, dass beispielsweise die PKR (in Kombination mit viraler dsRNA) Apoptose auslösen kann (Balachandran et al., 1998; 2000; Der et al., 1997). Zudem ist das pro-apoptotische p53-Gen IFN-induzierbar (Takaoka et al., 2003). Allerdings erfolgt die Hemmung der IFN-Expression bzw. -Signaltransduktion im Fall von MCMV durch mehrere Genprodukte wie z.B. *M45 (early/late)* (Fliss et al., 2012; Mack et al., 2008; Rebsamen et al., 2009; Upton et al., 2008; 2010) oder auch *M27 (early/late)* (Trilling et al., 2011; Zimmermann et al., 2005), wodurch zumindest nach Expression der *early*-Genprodukte die Inhibition der IFN-Expression/Signaltransduktion in  $\Delta$ IE-611-infizierten Zellen gewährleistet ist. Ein direkter Zusammenhang der verminderten Renilla-Werte mit der gesteigerten ISRE-Promotor/Enhancer-Aktivierung in  $\Delta$ IE-611-Virus-infizierten Zellen erscheint deshalb unwahrscheinlich, zumal die Infektion mit dem Srev-Virus 24 hpi zu keiner gesteigerten Induktion des ISRE-Promotors/Enhancers führt, obwohl in diesen Luciferase-Lysaten sogar geringere Renilla-Luciferase-Werte als in  $\Delta$ IE-611-Virus-Lysaten detektiert wurden (Abbildung 2.28).

Ein weiterer Faktor der zur Steigerung der ISRE-Promotor/Enhancer-Aktivität sowie zur Erhöhung der IFN- $\beta$ -Genexpression führen kann, ist die Anwesenheit von *defective-interfering* (DI)-Partikeln in Virus-Präparationen. DI-Partikel enthalten virale Genome, die interne Deletionen oder sogenannte *Copybacks* aufweisen (d.h. kein vollständiges Genom), und werden spontan als Nebenprodukte von *non-defective* (ND)-Partikeln während der Genom-Replikation generiert (Lazzarini et al., 1981; Perrault, 1981). Wie ihr Name schon vermuten lässt, kompetieren die DI- mit den ND-Partikeln um die Replikationssubstrate (Garcin et al., 1994). Da die DI-Partikel einen Replikationsvorteil haben, akkumulieren sie beispielsweise in Sendai-Virus (SeV)-Stocks, die wiederholt in Eiern passagiert werden (Johnston, 1981; Magnus, 1951a; 1951b). Unter anderem konnte bei der Analyse von verschiedenen SeV-Stocks gezeigt werden, dass sich die SeV-induzierte IFN- $\beta$ -Expression proportional zur Abundanz von DI-Partikeln innerhalb der Virus-Stocks verhält (Strahle et al., 2006). Es kann deshalb nicht ausgeschlossen werden, dass die erhöhte ISRE-Promotor/Enhancer-Aktivierung sowie die gesteigerte IFN- $\beta$ -Genexpression in  $\Delta$ IE-611-Virus-infizierten Zellen durch eine gesteigerte Abundanz von DI-Partikeln in  $\Delta$ IE-611-Virus-Stocks hervorgerufen wird.

Für das HCMV IE2 (IE86)-Protein wurden die bereits zuvor erwähnte *Core*-Region (aa 450-552) innerhalb des C-Terminus beschrieben, welche für dessen Funktionen als Transaktivator, Autorepressor und für die *in vitro*-DNA-Bindefähigkeit sowie den Zellzyklus-Arrest benötigt wird (Asmar et al., 2004). Allerdings wurden im Rahmen dieser Publikation auch zentral lokalisierte Sequenz-Bereiche (*Specific and Essential Modulator* (SEM) genannt) identifiziert, deren Deletion nur zum teilweisen Verlust der pIE2-Funktionen führte. Beispielweise resultierte die Deletion der pIE2 (pIE86) aa 330-349 (in einem Expressionsplasmid) in einer stark eingeschränkten DNA-Bindekapazität, einer moderaten Verringerung der Transaktivierungsfunktion, wohingegen die Funktionen der Zellzyklus-Kontrolle und der Autorepression unbeeinträchtigt blieben. Die  $\Delta$ IE-611-Virusmutante weist eine Deletion auf, die nur die Expression der aa 1-151 des pIE-611 erlaubt, während die IE-453- und IE-310-Proteine einschließlich des C-Terminus exprimiert werden sollten (auf Proteinebene nicht nachgewiesen), d.h. die putative *Core*-Region müsste durch die beiden anderen IE3-Proteinisoformen generiert werden. Trotzdem konnte in  $\Delta$ IE-611-Virus-infizierten Zellen eine deutlich gesteigerte pp89 (pIE1)- sowie eine leicht erhöhte pM112/M113 (pE1)-Expression (Hinweis für fehlende Promotor-Repression) und eine erhöhte Typ I IFN-Induktion nachgewiesen werden. Deshalb ist es vorstellbar, dass zwar innerhalb des C-Terminus bestimmte Funktionalitäten der Proteine konserviert sind, die zentralen Bereiche der Proteine aber für einzigartige Aufgaben verantwortlich sind, insbesondere weil sich explizit dieser Bereich zwischen den IE3-Proteinvarianten am stärksten unterscheidet. Demzufolge ist es durchaus möglich, dass der vom Exon 5b kodierte Bereich, der ausschließlich in der IE-611-Proteinvariante enthalten ist, für spezielle Funktionen wie die Typ I IFN-Inhibition oder die Promotor-Repression verantwortlich ist, während essentielle Funktionen wie die Transaktivierung der *early*- und *late*-Genexpression innerhalb des Exons 5d kodiert werden und somit eine Redundanz durch alle Proteinisoformen gewährleistet ist.

Abschließend kann zusammengefasst werden, dass im Rahmen dieser Doktorarbeit neue *ie3*-kodierte Transkript- und Proteinisoformen identifiziert wurden. Aufgrund dieser Befunde wurde durch gezielte Mutagenese gezeigt, dass pIE-611 im Gegensatz zu bisherigen Annahmen nicht essentiell ist. Außerdem konnten erstmalig Hinweise für einen von der MCMV *immediate-early*-Region kodierten und deshalb

früh im Replikationszyklus exprimierten putativen IFN-Antagonisten, pIE-611, dargestellt werden. Um die genauen Funktionen der IE3-Proteinvarianten aufzuklären, sind aber die bereits oben erwähnten Experimente und weitere Analysen notwendig.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Geräte

-80°C Schrank	Revco Ultima II über Welabo, Düsseldorf, Deutschland
-80°C Truhe	Hettich Freezer, Andreas Hettich GmbH & Co KG
Begasungsbrutschrank	BBD 6220, Heraeus/ Kendro, Langenselbold, Deutschland
Blotter ( <i>semi-dry</i> )	Fastblot B44 (klein), Biometra, Göttingen, Deutschland Fastblot B64 (groß), Biometra, Göttingen, Deutschland
Crosslinker (UV)	CL-1000, UVP, Upland, Kanada
DNA-Meßgerät	Nanodrop 1000, Peqlab, Erlangen, Deutschland
Douncer	Wheaton über VWR, Batavia, USA
ECL-Chemilumineszenz-Messgerät	ChemoCam Imager 3.2, Intas, Göttingen, Deutschland
Elektrophoresekammer	SDS-Gele: klein: Minigel-Twin, Biometra, Göttingen, Deutschland mittel: MAXI-Vertikal, Roth, Karlsruhe, Deutschland DNA-/RNA-Agarosegele: klein: Agagel mini, Biometra, Göttingen, Deutschland mittel: Agagel maxi, Biometra, Göttingen, Deutschland
Elektroporator	Genepulser II, Bio-Rad, München, Deutschland
Entwickler (Filme)	Cawomat 2000 IR, CAWO, Schrobenshausen, Deutschland
Fluoreszenz-Mikroskop	TE2000-S, Nikon, Düsseldorf, Deutschland Axiovert 40 CFL, Zeiss, Göttingen, Deutschland
Heizblöcke	Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg, Deutschland Thermostat plus, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Hybridisierungsöfen	OV5, Biometra, Göttingen, Deutschland
Inkubatoren	unbegaster Bakterien-Inkubator, New Brunswick Scientific, Nürtingen, Deutschland G25 Incubator Shaker, New Brunswick Scientific, Nürtingen, Deutschland
Luminometer	TriStar2 LB 942, Berthold, Bad Wildbad, Deutschland

## Material und Methoden

---

	Mithras LB 940, Berthold, Bad Wildbad, Deutschland
Mikroskop	TS100, Nikon, Düsseldorf, Deutschland
Mikrowelle	Sharp oder Küppersbusch
Power Supplies	Power Pac 300, Bio-Rad, München, Deutschland EPS 301, Amersham über GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
	Power Pack P25 T, Biometra, Göttingen, Deutschland
Spektralphotometer	UV-VIS Spectrophotometer UVmini 1240, Shimadzu, Duisburg, Deutschland
Sterile Arbeitsbank	Hera Safe, Heraeus, Hanau, Deutschland
Stickstoff-Tank	Biosafe MD mit ApolloLIN Versorgungsbehälter, Cryotherm, Kirchen, Deutschland
Thermoblock/-mixer	Eppendorf Thermomixer comfort, Hamburg, Deutschland Eppendorf Thermomixer 5436 , Hamburg, Deutschland
Thermocycler	T1 und T3000, Biometra, Göttingen, Deutschland
TurboBlotter	Schleicher und Schuell, Dassel, Deutschland
UV-Handlampe	Benda Laborgeräte (Ser. Nr. 7841200), Wieloch, Deutschland
UV-Transilluminator	Gel iX Imager, Intas, Göttingen, Deutschland
Vortexer	L46, Labinco, Breda, Niederlande VV3, VWR, Batavia, USA
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 (gekühlt), Eppendorf, Hamburg, Deutschland Avanti J-E, Beckman-Coulter, Krefeld, Deutschland OptimaL-70K, Beckman-Coulter, Krefeld, Deutschland

#### 4.1.2 Verbrauchsmaterialien

1,5 / 2ml Reaktionsgefäße (Eppis safe lock)	Eppendorf
15 / 50 ml Falcons	Greiner #188271; #227261
Cryoröhrchen	Nunc #377267
Elektroporationsküvetten	0,2 cm Bio-Rad #165-2086
Filme	24x30 BioMax MR, Kodak #8912560 35x43 BioMax MR, Kodak #8915187 Amersham Hyperfilme ECL, GE Healthcare #90260
Größenmarker für Western-Blot	Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder, Thermo Scientific #26634
Größenmarker für Gelelektrophorese	Hyperladder I, Biorline #Bio-33025 2-Log DNA Ladder NEB #23200S
Nitrocellulosemembran	Protran Nitrocellulose Transfer Membran (0,45 µm) Whatman über GE Healthcare #10401196
Nylonmembran positiv geladen	Nylon membran positively charged, Roche #11417240001
PCR-tubes	Starlab #1402-8108
Polyallomerröhrchen	Beckman-Coulter #32 68 23
Verpackungsfolie (Saran)	Dow über Geyer #9068.1
Whatman-Papier	3MM Chromatographiepapier, Whatman über GE Healthcare #3030917

#### 4.1.3 Chemikalien und Biochemikalien

Actinomycin D	AppliChem #A1489,0005
Aceton	Merck #1.00014.2511
Agarose	LE Agarose SeaKem, Lonza #50004
Anti-Digoxigenin-AP Fab	Roche #11093274910
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck #1.01201.0500
Ampicillin	Roth #K029.2
β-Mercaptoethanol	Merck #8.05740.0250

## Material und Methoden

---

Bacitracin	Fluka #11702
Beetle-Juice	pjk #102511
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma #A9418-59
Bromphenolblau	Merck #1.08122.0005
Calciumchlorid	Roth #A119.1
CDP-Star	Roche #11685627001
Chloramphenicol	Sigma CO378-25G
Ciprofloxacin Hydrochlorid	ICN Biochemicals #199020
Complete Protease Inhibitors	Roche #11836145001
Coomassie Brilliant Blue G250	Serva #17524
Cycloheximid	Sigma #C7698
4',6-Diamidino-2-phenylindole- dihydrochloride (DAPI):	Polysciences #09224
DIG-11-dUTP	Roche #11573179910
DIG-Blocking-Reagenz	Roche #11096176001
DIG-Easy Hyb granules	Roche #11796895001
Digitonin	Calbiochem #300410
N,N-Dimethylformamid	Fluka #40225
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth #A994.2
Dithiothreitol (DTT)	Serva #20710
DNA-Größenstandard:	
Hyperladder I	Bioline #Bio-33025
2-Log DNA Ladder	NEB #23200S
DNase I	Roche #104159001
DNase I, RNase-frei	Roche #10882822
dNTPs (Set)	Qiagen #201913
Ethylenedinitrilo tetraacetic acid (EDTA)	Serva #11280
Essigsäure (96%)	Roth #X895.2
Essigsäure (100%), Eisessig	Merck #1.00063.2500
Ethanol (100%)	Merck #1.00983.2500
Ethidiumbromid 10mg/ml Lösung	Roth #7870.2
Formaldehyd 37%	Merck #8.18708.1000
37% Geneticin, G418	Gibco #11811-031

## Material und Methoden

---

Glycerol	Roth #3783.2
Glycin	Roth #3908.5
HEPES	Roth #9105.4
Imidazol ultrapure	AppliChem #A3635
Iodacetamid	Calbiochem #407710
Isopropanol	VWR 20842.330
Kaliumchlorid	Merck #1.04936.1000
Kanamycin	Sigma #K4000-5G
Kaliumhydroxid (KOH)	Roth #6751.3
L-Arabinose	Sigma A3256-25G
LB ( <i>lysogeny broth</i> )-Medium (Lennox)	Roth #X964.2
LB Agar	Invitrogen #22700-025
Leupeptin	Sigma #L8884
Magermilchpulver Sucofin	Comet, Düsseldorf
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Merck #8.14733.0100
Maleinsäure	Merck #8.00380.1000
Methanol	Merck #1.06009.2500
Methylcellulose	Fluka #64630
Minimal Essential Medium (MEM) 10x	Sigma #M0275
MOPS	Serva #29836
Natriumacetat	Roth #X891.2
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck #1.06346.1000
Natriumchlorid (NaCl)	Roth #3597.2
Natriumcarbonat	Merck #1.06392.1000
Natriumcitrat (tri-, dihydrat)	Roth #3580.3
Natriumdesoxycholat	Merck #1.06504
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth #2326.2
Natriumfluorid (NaF)	Serva #30192
Natriumhydrogencarbonat	Merck #1.06329.1000
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck #1.06580.1000
Natriumhydroxid	Merck # 1.06498.1000
NP40/Igepal	Sigma #I3021-100ml

Paraformaldehyd (PFA)	Roth #0335.2
Pepstatin-A	Sigma #P4265
Roti Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Roth #A156.2
Phosphonoessigsäure	Sigma #P-6909
Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA)	Sigma #P-1585
PMSF	Roth #6367.2
Ponceau S	Roth #5938.1
Proteinase K	Roche #03115879001
Reblot Plus Stripping Solution	Millipore #2504
RNA-Probenpuffer	Fermentas #R0641
Rotiphorese-30-Acrylamid	Roth #3029.1
Saccharose	Roth #4621.1
Salzsäure	Roth #4625.1
D-Sorbitol	Roth #6213.1
T4-DNA-Ligase	NEB M0202
TEMED	Roth # 2367.1
Tris-Base	Roth #AE15.3
Triton-X-100	Serva #37240
X-Gal	Sigma Aldrich #B4252
Zeocin	Invitrogen #R250-05
Ziegenserum	Jackson ImmunoResearch #005-000-121

### 4.1.4 Kits

Beetle-Juice (P.J.K., Kleinblittersdorf, Deutschland)

DIG High Prime (Roche, Mannheim, Deutschland)

Dual-Luciferase-Reporter Assay System (Promega, Mannheim, Deutschland)

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

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

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

Nucleobond AX100 (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland)

mTLR RT-Primer Set (InvivoGen, San Diego, USA)

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

Plasmid Mini und Midi Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)  
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (NEB, Ipswich, USA)  
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)  
TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad/CA, USA)

#### 4.1.5 Enzyme

Alkalische Phosphatase ( <i>Calf Intestinal Phosphatase</i> , CIP)	NEB
DNA Restriktionsenzyme	NEB oder Fermentas
T4 DNA Ligase	NEB

#### 4.1.6 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden bei der Firma MWG bestellt. Die lyophilisierten Oligonukleotide wurden in DNase- und RNase-freiem Wasser aufgenommen und als 100 mM Stocklösung bei -20°C gelagert. Für die PCR-Ansätze wurden die Oligonukleotide auf 10 mM mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt.

#### Klonierungsprimer:

pcDNA3.1-IE3-Expressionsplasmide:

IE3 forw (KL-MCMV IE3-1)	5-GAGAAGCTTATGGAGCCCGCCGCACCC AG-3
IE3 rev (KL-MCMV IE3-HA2)	5-CGGAATTCTCAAGCGTAATCTGGAACATCG TATGGGTACTCGCAGTCAGACTCATACTC-3

#### Kontrollprimer:

HA-rev	5-CGCGTAATCTGGAACATCGTATGG-3
M28 forw	5-TAACGCCGCTCCTCTGTTCG-3
M28 rev	5-ACGAAAGCCTTCACCTCGTCG-3
M28-Sonde forw (AZ-M28-S1)	5-GTGTCGTTCGACCTCGGAAGA-3

M28-Sonde rev (AZ-M28-S2)	5-GCCAACACGATAGCGGGATT-3
M45 forw	5-ACCCAGCACCACCGCGTCGC-3
M45 rev	5-CATCAACCTGGAGAACTGCG-3
M45-Sonde forw	5-GTGGTGGACGCCATGGCGCA-3
M45-Sonde rev	5-GAGTCTAGATCACGCGTAATCTGGAACATC GTATGGGTACGTCCGCGGCGTAGC-3
M121 forw (KL-M121 forw)	5-CGTTTCGCTTCTGAAACTGATTGTG-3
M121 rev (KL-M121 rev)	5-TGGGAATGATGGCTCACCAG-3
$\Delta$ IE-611 ctl. 1	5-TGTTACAGCAGCGGCCTCCAT-3
$\Delta$ IE-611 ctl. 2	5-TTGTACTCCAAGGCCCTGGCTG-3
$\Delta$ IE-611-Sonde forw	5-ACTTGATGAAGTAGTTGCTAA-3
$\Delta$ IE-611-Sonde rev	5-ATAGAACTGTCCATCTCTAC-3
<i>ie1</i> -Sonde forw	5-GAATAAAAGAGGGGGTGTGGTGTTA-3
<i>ie1</i> -Sonde rev	5-CAGCAACTCATCCTATCCAGACCT-3
<i>ie3</i> -Sonde forw	5-CAGAGCCTCATGCACACCTGCT-3
<i>ie3</i> -Sonde rev	5-GGAGGAGACCGTGCATGACAAG-3

**Klonierungsprimer für BAC-Mutagenese:**

$\Delta$ M28 forw (AZ-M28-del1)	5-TCCGTGTGCATTTCTATCTCTTTTGTCTTTTCTGCCGA TCCCAGATAAAAATCAGTCGATCCAGTGAATTCGAGCTC GGTAC-3
$\Delta$ M28 rev (AZ-M28-del2)	5-AGGCGAGGCGAAACTGGCGGGATAACTGCAAGAGA GGGGAAAAGCGGTTCGATCCCAGCCGGACCATGATTACG CCAAGCTCC-3
$\Delta$ M45 forw	5-CCCCTCCTGTACGCGGCGACGATGCCGCCTCCCGCGAG CGTAACGACCGCCGCTGCCGCTCCAGTGAATTCGAGCTC GGTAC-3
$\Delta$ M45 rev	5- GAGGCGATTCATCACAGCGTGGAAGCCGACGACCCCGA TGTGCAGGTCGCGATAGAGCGTCACCATGATTACGCCAAG CTCC-3

IE3–HA forw	5-GAGGCAGATGATATAAGCCATCATGAGGATGAGTCTGGG GAGTATGAGTCTGACTGCGAGTACCCATACGATGTTCCAG ATTACGCGTGACCAGTGAATTCGAGCTCGGTAC-3
IE3–HA rev	5-TATGTATCTACATATTTTACAAAACAGGGTTCATCTTTAAT ACCAAGTCCACAGTACAGAGACCATGATTACGCCAAGCTC C-3
ΔIE-611 forw	5-CCCCAGACTTCAGAAGACACTCAGAAAAGAAAGCTAAGA AGCATAAGAACAAGCAGCGCCCCAGTGAATTCGAGCTCGG AC-3
ΔIE-611 rev	5-CCCCTGTAGCCACTATCTACCCGCTCATCCTCATCAT CTTCATCCTCAGAACCACTACACCATGATTACGCCAAGCTC C-3

**RT-PCR-Primer:**

GAPDH forw	5-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3
GAPDH rev	5-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3
MCMV <i>ie1</i> forw	5-GCCCCCTCGAGGACACACAATG-3
MCMV <i>ie1</i> rev	5-CATTAAGTACAGAGAATAAAAAGAGGG-3
MCMV <i>ie3</i> forw	5-GCCCCCTCGAGGACACACAATG-3
MCMV <i>ie3</i> rev	5-TAATAGGGTTCGACATGAGTTAAG-3
murines IFN-β forw	5-CATGAACAACAGGTGGATCCTCCACGC-3
murines IFN-β rev	5-TCAGTTTTGGAAGTTTCTGGTAAGTCTTCG-3

**4.1.7 Plasmide und Bacmide**

pcDNA3.1	Invitrogen
pcDNA3.1-Flag-TBK1	Rongtuan Lin (Montreal, Kanada)
pcDNA3.1 HCMV IE2	Dr. Vu Thuy Khanh Le (HHU, Düsseldorf)
pcDNA3.1-Zeo	PD Dr. Albert Zimmermann (HHU, Düsseldorf)
pCP20	(Cherepanov and Wackernagel, 1995)
pFRT2-Kana	PD Dr. Albert Zimmermann (HHU, Düsseldorf)
pFRTZ-MIEP-EGFP	Dr. Vu Thuy Khanh Le (HHU, Düsseldorf)
pGL3-ISG54 (ISG54-Luc)	Marc Servant (Montreal, Kanada)

pKD46	(Datsenko and Wanner, 2000)
pRL-TK (Renilla-Luciferase)	Marc Servant (Montreal, Kanada)
pTA-ISRE-Luc	Clontech
MCMV-BAC C3X	(Wagner et al., 1999)
MCMV-BAC C3X repair	Barbara Adler (LMU, München (Jordan et al., 2011))

#### 4.1.8. Bakterienstämme

*E. coli*-Stamm XLI-Blue: F<sup>+</sup>::Tn10 *pro A B lacI Δ(lacZ)M15/recA1 end A1 gyrA96 (Na1) thi hsdR17 (r<sub>k</sub>M<sub>k</sub>) glnV44 relA1 lac*

*E. coli*-Stamm DH10B: F<sup>-</sup> *mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu) 7697 galU galK rpsL nupG λ<sup>-</sup>*

*E. coli*-Stamm GS1783: DH10B λ *cI857 Δ(cro-bioA)<>araC-P<sub>BAD</sub>I-SceI* (Gregory A. Smith, Northwestern University Feinberg School of Medicine, Chicago, USA.)

#### 4.1.9 Antikörper

##### Primärantikörper (ungekoppelte Antikörper)

Bezeichnung	Bestellnummer	Hersteller	Spezies	Applikation	Verdünnung
β-Actin	A2228	Sigma	Maus	WB	1:50.000
Flag	M2 F3165	Sigma	Maus	WB	1:2000
HA	H6908	Sigma	Kaninchen	WB	1:2500-1:4000
HA	HA-7 H-3663	Sigma	Maus	WB, IF	1:2500-1:4000
I $\kappa$ Ba (C-21)	sc-371	Santa Cruz	Kaninchen	WB	1:2000
p(Ser396)-IRF-3	4947S	Cell Signaling	Kaninchen	WB	1:700-1:800
Lamin A/C	2032	Cell Signaling	Kaninchen	WB	1:1000
MCMV-Immunserum			Maus	WB	1:500-1:1000
MCMV pM45	4D4-A3	Prof. Jonjic	Maus	WB	1:250
MCMV pM112/M113 (e1)	CHROMA 103	Prof. Jonjic	Maus	WB	1:100
MCMV pp89 (IE1)	CHROMA 101	Prof. Jonjic	Maus	WB	1:500-1:1000
NF- $\kappa$ B p65 (F-6)	sc-8008	Santa Cruz	Kaninchen	WB	1:2000

IF: Immunfluoreszenz; WB: Western-Blot

### Sekundärantikörper (gekoppelte Antikörper)

Bezeichnung	Kopplung	Bestellnummer	Hersteller	Applikation	Verdünnung
$\alpha$ -Maus	POD	A2228	Sigma	WB	1:3000
$\alpha$ -Kaninchen	POD	A-6154	Sigma	WB	1:2500- 1:4000
$\alpha$ -Maus	Cy3	115-165-003	Jackson ImmunoResearch	IF	1:200

IF: Immunfluoreszenz; **POD**: Peroxidase; **WB**: Western-Blot;

#### 4.1.10 Zellkulturmedien und Zusätze

Alle folgenden Medien und Zusätze wurden von der Firma GIBCO (über Invitrogen) bezogen.

DMEM ( <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> ) (mit 4,5 g/l Glukose, L-Glutamin und Natriumpyruvat)	#41966
FCS ( <i>fetal calf serum</i> ) (vor Verwendung 30 min bei 56°C inaktiviert)	#10270-106
Geneticin G-418 Sulfate	#11811-031
L-Glutatmin (200 mM; 100x)	#25030-081
NCS ( <i>newborn calf serum</i> ) (vor Verwendung 30 min bei 56°C inaktiviert)	#16010-159
PBS ( <i>phosphate buffered saline</i> ) (mit CaCl <sub>2</sub> und MgCl <sub>2</sub> )	#14190-094
Penicillin-Streptomycin (PS, 10.000 U/ml)	#15140
Trypsin 2,5% (vor Verwendung mit PBS auf 0,5% verdünnt)	#15090
Zeocin (Invitrogen)	#R250-05

#### 4.1.11 Zellkulturgefäße und Plastikwaren

Sterile Einmalpipetten (5 ml (#4487), 10 ml (#4488) und 25 ml (#4489)) wurden von der Firma Costar bezogen. Von der Firma Greiner wurden 15 ml Falcons (#188271), 50 ml Falcons (#227261), Hybridom-Schalen (#633160) und 48-Lochplatten (#677180) verwendet. Die Zellschaber (#99003), 25 cm<sup>2</sup>-Flaschen (#90025), 75 cm<sup>2</sup>-Flaschen (#90075), 6-Lochplatten (#92406), 12-Lochplatten (#92412), 24-

Lochplatten (#92424) und 96-Lochplatten (#92696) wurden von der Firma TPP und die 175 cm<sup>2</sup>-Flaschen (#159910) von der Firma Nunc bezogen.

#### 4.1.12 Zellen

##### Zell-Linien

NIH3T3	Murine Fibroblasten, ATCC CRL-1658
NIH3T3-ISRE-Luc	Stabile und klonale, murine Fibroblasten, die das pTA-ISRE-Luc (Firefly)-Reportergen zusammen mit pcDNA3.1(Geneticin-Resistenz) enthalten (Zimmermann et al., 2005).
NIH3T3-ISRE-Luc+Renilla	Stabile und klonale, murine Fibroblasten, die auf den NIH3T3-ISRE-Luc-Zellen basieren und zusätzlich das pRL-TK (Renilla-Luciferase)-Plasmid in Kombination mit pcDNA3.1-Zeo (Zeocin-Resistenz) enthalten.
BIM	Murine krisenimmortalisierte Fibroblasten (aus primären BALB/c MEF generiert). Freundlicherweise von Prof. Dr. Mirko Trilling zur Verfügung gestellt.
HEK293T	humane Nierenzellen ATCC CRL-11268
HeLa	humane Epithelzellen ATCC CCL-2

Alle Zell-Linien mit NIH3T3-Hintergrund wurden in *Dulbecco's modified Eagle medium* (DMEM) mit 10% (v/v) neugeborenem Kälberserum (NCS) und 1% Penicillin/Streptomycin gehalten. Die stabilen NIH3T3-ISRE-Luc-Transfektanten wurden zusätzlich unter Geneticin-Selektion (G-418 Sulfate; 500 µg/ml) und die NIH3T3-ISRE-Luc+Renilla-Transfektanten unter Geneticin- (500 µg/ml) sowie Zeocin-Selektion (50 µg/ml) hergestellt und kultiviert.

BIM-, HeLa- und HEK293T-Zellen wurden in DMEM mit 10% (v/v) fötalem Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin/Streptomycin gehalten.

##### Primäre Zellen

Primäre MEF wurden aus BALB/c-, BALB/c IFN-β<sup>-/-</sup> und C57BL/6-Mäuse-Embryonen nach (Brune et al., 2001a) hergestellt und in DMEM mit 10% (v/v) fötalem Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin/Streptomycin kultiviert.

#### 4.1.13 Viren

MW97.01 (C3X)	Ein pSM3fr BAC-abgeleitetes MCMV, das auf dem Smith-MCMV-Stamm basiert (Messerle et al., 1997) und <i>in vitro</i> sowie <i>in vivo</i> wt-Eigenschaften aufweist (Wagner et al., 1999).
C3X repair	Ein pSM3fr BAC-abgeleitetes MCMV, bei dem eine <i>frameshift</i> -Mutation im MCK-2-ORF ( <i>m129</i> ) behoben wurde. Führt <i>in vivo</i> zu einer besseren Virus-Produktion in der Speicheldrüse (Jordan et al., 2011).
Smith	MCMV-Isolat, das erstmals 1954 beschrieben wurde (Smith, 1954).
MCMV $\Delta ie1$	Ein pSM3fr BAC-abgeleitetes MCMV, bei dem das Exon 4 des <i>ie1</i> -Gens deletiert wurde (Ghazal et al., 2005). Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Martin Messerle, Hannover, Deutschland
MCMV $\Delta ie2$	(= MCMV-GFP) Ein pSM3fr BAC-abgeleitetes MCMV, bei dem der <i>ie2</i> -Lokus durch die Sequenz des <i>green fluorescent protein</i> ersetzt wurde. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Martin Messerle, Hannover, Deutschland

#### 4.1.14 Puffer und Lösungen

AP-Puffer	100 mM Tris/HCl (pH 9,5) 100 mM NaCl
10x ( <i>semi-dry</i> )-Blot-Puffer	480 mM Tris 280 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
2x CaCl <sub>2</sub>	500 mM CaCl <sub>2</sub> 1 mM Tris (pH 7,5) 0,1 mM EDTA (pH 7-8)

## Material und Methoden

---

Cytoplasmatischer Lysepuffer (pH 7,4)	10 mM KCl 20 mM HEPES 0,2% (v/v) NP40/IGEPAL 1 mM EDTA 10% (v/v) Glycerol 0,1 mM Na-Vanadat 0,1 mM PMSF 1 mM DTT Complete Protease Inhibitors
2x HBS (pH 7,1)	50 mM HEPES 280 mM NaCl 1,5 mM Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
LB (Luria Bertani)-Medium	1% (w/v) Bacto-Trypton 5% (w/v) Bacto-Yeast-Extrakt 1% (w/v) NaCl
10x Laemmli-SDS-PAGE-Laufpuffer	252 mM Tris 1,92 mM Glycin 1% (w/v) SDS
Maleinsäurepuffer	100 mM Maleinsäure (pH 7,5) 150 mM NaCl
MCMV-Saccharose-VSB-Kissen (pH 7,8)	15% Saccharose 50 mM Tris/HCl 12 mM KCl 5 mM EDTA
10x MEN (pH 7,0)	200 mM MOPS 50 mM Natriumacetat 10 mM EDTA dunkel und bei 4°C lagern

## Material und Methoden

---

Methylcellulose (Schritt 1)	8,8 g Methylcellulose in 360 ml H <sub>2</sub> O → mit Rührfisch autoklavieren bei 4°C ü.N. rühren lassen
Methylcellulose (Schritt 2)	vor Verwendung hinzufügen: 40 ml 10x MEM 20 ml FCS 5 ml Penicillin/Streptomycin 5 ml L-Glutamin (200 mM) 20 ml NaHCO <sub>3</sub> (55g/L)
Nukleoplasmatischer Lysepuffer (pH7,6)	420 mM KCl 20 mM HEPES 1 mM EDTA 20% (v/v) Glycerol 0,1 mM Na-Vanadat 0,1 mM PMSF 1 mM DTT Complete Protease Inhibitors
4x Proteinase K-Puffer (pH 8,0)	2% (w/v) SDS 40 mM Tris 20 mM EDTA
5x SDS-Probenpuffer	0,25 M Tris/HCl (pH 6,8) 25% (v/v) Glycerol 20% (w/v) SDS 0,5% (v/v) β-Mercaptoethanol eine Spitze Bromphenolblau
20x SSC	3 M NaCl 0,3 M NaCitrat

10x TBE	900 mM Tris 900 mM Borsäure 20 mM EDTA (pH 8,0)
6x TBE-Probenpuffer	10% (v/v) Glycerol 6x TBE eine Spitze Bromphenolblau
10x TBST	0,1 M Tris/HCl (pH 8,0) 1,5 M NaCl 5% (v/v) Tween-20

#### 4.1.15 Computer-Programme

Diese Arbeit wurde mit Microsoft Word verfasst und die Referenzen mit Hilfe des Programmes Papers (Mekentosj) eingefügt. Alle Abbildungen wurden mit Microsoft PowerPoint bearbeitet und zusammengestellt. Die statistischen Auswertungen und Diagramme wurden mit Microsoft Excel erstellt. Die Immunfluoreszenz-Bilder wurden mit Hilfe der Software LUCIA (Laboratory Imaging) aufgenommen und mit dem Programm Gimp bearbeitet. Die Luciferase-Messungen wurden mit dem Programm Microwin 2000 (Berthold technologies) durchgeführt und die DNA/RNA-Konzentrationen mit der Software ND-1000 (Berthold Technologies) bestimmt. Die intrinsischen Spleißstellen-Stärken wurden unter Verwendung des Hbond Score- ([http://www.uni-duesseldorf.de/rna/html/hbond\\_score.php](http://www.uni-duesseldorf.de/rna/html/hbond_score.php)) oder des MaxEntScan-Algorithmus ([http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan\\_scoreseq\\_acc.html](http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq_acc.html)) (Yeo and Burge, 2004) berechnet und putative ESE-Motive mit Hilfe des Programmes ESEfinder 3.0 (<http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgi?process=home>) (Cartegni et al., 2003; Smith et al., 2006) vorhergesagt. Die putativen Phosphorylierungs- bzw. Sumoylierungsstellen wurde unter Verwendung der online zur Verfügung stehenden Algorithmen NetPhos 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) (Blom et al., 1999) bzw. SUMOplot™ (<http://www.abgent.com/sumoplot/>) vorhergesagt. Die Sequenzen-Alignments wurden mit Hilfe des Basic Local Alignment Search Tool (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) erstellt.

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Arbeiten mit *E.coli*

#### 4.2.1.1 Herstellung chemisch-kompetenter *E.coli* für die Transformationen von Plasmiden

Für die Generierung kompetenter *E.colis* wurden 3 ml LB-Medium mit dem jeweiligen *E.coli*-Stamm angeimpft und über Nacht auf einem Schüttler bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 100 ml LB-Medium mit 1 ml der Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C bis zu einer Dichte von OD<sub>600</sub> 0,4-0,5 geschüttelt. Die folgenden Schritte erfolgten auf Eis. Nach der Überführung der Kultur in 50 ml Falcons wurden diese für 10 min bei 3200 g (4000 rpm 5810R, Eppendorf) und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Pellets in 50 ml 0,1 M MgCl<sub>2</sub> (4°C) vereint und resuspendiert. Anschließend erfolgte erneut eine Zentrifugation für 10 min bei 3200 g und 4°C, woraufhin der Überstand verworfen und das Pellet in 50 ml 0,05 M CaCl<sub>2</sub> (4°C) resuspendiert wurde. Nach der abschließenden Zentrifugation (10 min, 3200 g, 4°C) wurde der Überstand erneut verworfen und das Pellet in 2 ml 0,05 M CaCl<sub>2</sub>/ 15 % (v/v) Glycerol (4°C) resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. 50 µl Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

#### 4.2.1.2 Herstellung elektro-kompetenter *E.coli* für die BAC-Mutagenese

Für die Arabinose-induzierte BAC-Rekombination wurden 3 ml LB-Medium mit *E.coli* Bakterien (Stamm DH10B) angeimpft, die bereits den wt-MCMV-BAC und pkD46 enthielten und ü.N. bei 30°C geschüttelt. Am nächsten Tag wurden 100 ml LB-Medium mit 1 ml Übernachtskultur angeimpft und die Kultur bei 30°C bis zu einer Dichte von OD<sub>600</sub> 0,1-0,15 geschüttelt. Im Anschluss wurde die Rekombinase-Aktivität durch Zugabe von 1 ml 10% (w/v) Arabinose (frisch angesetzt in ddH<sub>2</sub>O) induziert und die Kultur bei 30°C bis zum Erreichen von einer OD<sub>260</sub> 0,25-0,3 weiter geschüttelt. Die Inkubationszeit sollte hierbei 35 min nicht überschreiten. Daraufhin wurde die Kultur in 50 ml Falcons überführt und für 10 min bei 3200 g (4000 rpm 5810R, Eppendorf) und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets in 50 ml 10% (v/v) Glycerol/H<sub>2</sub>O (4°C) vereint und resuspendiert. Die Bakterien wurden erneut pelletiert (10 min, 3200 g, 4°C), der Überstand verworfen und das Pellet in 50 ml 10% (v/v) Glycerol/H<sub>2</sub>O (4°C) resuspendiert. Nach der

abschließenden Zentrifugation (10 min, 3200 g, 4°C) wurde der Überstand erneut verworfen, das Pellet in 0,5-1 ml 10% (v/v) Glycerol/H<sub>2</sub>O (4°C) (ca. 300 µl pro 0,1 End-OD<sub>260</sub>) aufgenommen und für 20 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden in 50 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Alternativ wurden 150 ml LB-Medium mit 3 ml Übernachtskultur (*E.coli* Stamm GS1873 enthält *Homingendonuklease I-SceI* Arabinose im Genom und C3X-repair) angeimpft und bei 30°C bis zur einer OD<sub>600</sub> 0,5-0,7 geschüttelt. Um die Rekombinase-Expression zu induzieren, wurden die Bakterien für 15 min bei 42°C im Wasserbad geschüttelt und im Anschluss für 20 min auf Eis inkubiert. Daraufhin erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei 3200 g (4000 rpm 5810R, Eppendorf) und 4°C. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 50 ml 10% (v/v) Glycerol/H<sub>2</sub>O (4°C) resuspendiert. Die Zentrifugation (5 min, 3200 g, 4°C) und die Resuspension des Pellets in 50 ml 10% (v/v) Glycerol/H<sub>2</sub>O (4°C) wurden weitere zwei mal wiederholt und das Pellet abschließend in 1,5 ml 10% (v/v) Glycerol/H<sub>2</sub>O (4°C) aufgenommen. Nach der Aliquotierung der Bakterien (50 µl) wurden diese in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

### **4.2.1.3 Transformation von chemisch-kompetenten *E.coli***

Für die Transformation von DNA in chemisch-kompetente *E.coli* wurden die kompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut und die zu transformierende DNA zugefügt. Nach ca. 30-minütiger Inkubation auf Eis wurde ein Hitzeschock für 1 min bei 42°C durchgeführt. Im Anschluss wurden die Bakterien mit 1 ml LB-Medium versetzt und für 30-60 min bei 37°C geschüttelt. Abschließend wurden die Bakterien auf LB-Agar-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und ü.N. bei 37°C inkubiert.

### **4.2.1.4 Transformation elektro-kompetenter *E.coli***

Um elektro-kompetente *E.coli* zu transformieren, wurden die Bakterien auf Eis aufgetaut, mit der zu transformierenden DNA versetzt und in eine Elektroporationsküvette (0,2 cm, Bio-Rad) überführt. Die Transformation erfolgte mit Hilfe eines Elektroporators (Genepulser II, Bio-Rad) unter Verwendung der Standardparameter für prokaryotische Zellen (2500 V, 200 Ω, 25 µF). Daraufhin

wurde 1 ml LB-Medium zu den Bakterien hinzugefügt und diese für 30-60 min bei 30°C (Temperatur-sensitiver Origin z.B. in pKD46) oder bei 37°C geschüttelt. Abschließend erfolgte die Ausplattierung auf LB-Agar-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum und eine Inkubation bei 30°C oder 37°C über Nacht.

### **4.2.1.5 Herstellung von Glycerin-Dauerkulturen**

Um generierte *E.coli*-Klone langfristig aufbewahren zu können, wurden Glycerin-Dauerkulturen erstellt. Dazu wurde eine Übernachtskultur des jeweiligen *E.coli*-Klons in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum angezogen. Am folgenden Tag wurde die Übernachtskultur im Verhältnis 1:1 mit autoklaviertem Glycerin gemischt und bei -80°C eingefroren.

## **4.2.2 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen**

### **4.2.2.1 Zellkultur**

Für die Kultivierung von Zellen wurde ausschließlich unter sterilen Bedingungen gearbeitet, um Kontaminationen zu vermeiden. Die Zellen wurden in einem Inkubator mit 5% CO<sub>2</sub>, 80% Luftfeuchtigkeit und 37°C kultiviert. Zudem wurde im Institut eine räumliche Trennung zwischen infizierter und nicht-infizierter Zellkultur eingehalten.

Die Zellen wurden im entsprechenden DMEM-Kulturmedium (siehe Abschnitt 4.1.12) gehalten. Zum Umsetzen adhärenter Zellen wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen einmal mit PBS (37°C) gespült und dieses wieder entnommen. Daraufhin wurden die Zellen mit 0,5%-Trypsin (in PBS) behandelt und die Lösung wieder entfernt. Die Trypsin-behandelten Zellen wurden bei 37°C inkubiert bis eine sichtbare Ablösung der Zellen von der Zellkulturflasche erfolgte. Anschließend wurde die Trypsin-Wirkung durch Zugabe von frischem Kulturmedium (37°C) gestoppt und die Zellen entsprechend dem jeweiligen Umsetzschema (abhängig von der Teilungsrate der Zellen und Größe der Zellkulturflasche; meist 1:3 bis 1:8) in ein neues Zellkulturgefäß transferiert.

### **4.2.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Um eine langfristige Erhaltung von Zellen zu gewährleisten, wurden diese in flüssigem Stickstoff gelagert. Dazu wurde das Kulturmedium entfernt und der

Zellrasen einmal mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 0,5%-Trypsin (in PBS) behandelt, bis sich diese vom Boden der Zellkulturflasche ablösen. Die Zellen wurden mit frischem Kulturmedium resuspendiert und in ein 15 ml Falcon überführt. Nach einer Zentrifugation für 3 min bei 330 g (1200 rpm, Allegra X-15R, Beckman-Coulter) und RT wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 ml Einfriermedium (50% (v/v) FCS/NCS; 40% (v/v) Kulturmedium und 10% (v/v) DMSO) resuspendiert. Die 1 ml Zellsuspension wurde in Cryoröhrchen (Nunc über Renner) überführt und diese zunächst langsam (-1°C/h) in Cryo-Einfrierbehältern (Qualifreeze, Qualilab) bei -80°C eingefroren, worauf sich die Lagerung in flüssigem Stickstoff anschloss.

Um Zellen aufzutauen wurden die Cryoröhrchen kurz bei 37°C im Wasserbad inkubiert und die Zellen nach der Überführung in ein 15 ml Falcon in 10 ml Kulturmedium aufgenommen. Um das Einfriermedium zu entfernen, wurden die Zellen für 3 min bei 330 g (1200 rpm, Allegra X-15R, Beckman-Coulter) und RT zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in frischem Kulturmedium resuspendiert und in ein Zellkulturgefäß transferiert.

### **4.2.2.3 Herstellung von primären murinen embryonalen Fibroblasten (MEF)**

Für die Präparation von primären MEFs wurden 4-6 schwangere Mäuse (Tag 16/17) nach zervikaler Dislokation (Genickbruch) vollständig in einer Schale mit 70% (v/v) Ethanol desinfiziert. Die nachfolgenden Arbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen. Um die Embryonen entnehmen zu können, wurde die Bauchdecke der Maus mit einer Schere aufgeschnitten. Die Embryonen wurden nach der Entfernung der inneren Organe in PBS gespült und anschließend in eine 10 cm Zellkulturschale mit 0,5 bis 1 ml PBS überführt. Dort wurden sie mit Hilfe einer gebogenen Schere zerkleinert. Je feiner die Gewebestückchen dieser Suspension waren, desto höher war die Ausbeute an MEFs. Die Gewebe-Suspension wurde mit einer 25 ml Pipette in ein 50 ml Falcon überführt, wobei mehrfach mit PBS nachgespült wurde, um möglichst alle Gewebestückchen zu transferieren. Anschließend wurde die Gewebesuspension im Falcon mit PBS auf 50 ml aufgefüllt. Um die Gewebestückchen von den Erythrozyten zu trennen, wurde die Suspension für ca. 5 min bei Raumtemperatur (RT) stehen gelassen, um eine Sedimentation der Gewebestückchen zu erzielen. Der Überstand (enthält die Erythrozyten) wurde

entfernt und das Falcon mit den verbliebenen Gewebestückchen erneut mit PBS auf 50 ml aufgefüllt. Dieser Waschschrift wurde so lange wiederholt, bis sich der PBS-Überstand nicht mehr rot färbte.

Im nächsten Schritt wurden die Gewebestückchen in einer ca. 0,7%-Trypsin-Lösung in einen Erlenmeyer-Kolben mit Glasperlen und Rührfisch überführt, um die Zellen aus dem Gewebe-Verbund zu lösen. Hierbei sollte das Zellstückchen/Trypsin-Gesamtvolumen gerade so groß sein, dass die Glasperlen bedeckt sind. Die Suspension wurde für 30 min bei 37°C gerührt, worauf sich die Zugabe von 5 ml 2,5%-Trypsin-Lösung und 50 µl DNase I (10 mg/ml) anschloss. Nach einer erneuten Inkubation von 30 min bei 37°C (unter Rühren) wurde die Zell-Suspension mit einer 25 ml Pipette in ein 50 ml Falcon überführt. Um den Verlust an Zellen so gering wie möglich zu halten, wurden die Glasperlen mehrfach mit PBS gespült. Alle dadurch erhaltenen Zellsuspensionen wurden vereinigt und anschließend bei 150 g (800 rpm Allegra X-15R, Beckman-Coulter) für 10 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen und das Zellpellet in wenig Zellkulturmedium (DMEM, 10% (v/v) FCS, 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin) möglichst gut resuspendiert. Nach dem Resuspendieren wurde das Falcon mit Kulturmedium auf 50 ml aufgefüllt und dieses bei RT stehen gelassen, um eine Sedimentation der großen Zellaggregate zu erzielen. Die Zellsuspension (Überstand) wurde in ein frisches Zellkulturgefäß überführt. Um die Ausbeute zu erhöhen, wurden die zurückgebliebenen Zell-Aggregate erneut mit wenig Kulturmedium resuspendiert und daraufhin mit Medium auf 50 ml aufgefüllt. Nach der Sedimentation der großen Zellaggregate wurde die Zellsuspension mit der ersten Zellsuspension vereint. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt, bis der Überstand nach dem Absinken der Zellaggregate nicht mehr trüb war. Die vereinigten Zellsuspensionen wurden in Zellkultur-Flaschen verteilt, wobei aus 10 Embryonen im optimalen Fall 4 bis 5 T175-Flaschen (175 cm<sup>2</sup>) gewonnen werden konnten.

Um eine effiziente Inaktivierung des Trypsins zu gewährleisten, wurde zu jeder T175-Flasche (mit Zellsuspension) 80 bis 100 ml Kulturmedium zugegeben. 4 bis 6 h nach dem Auslegen der MEFs wurde das vorhandene Kulturmedium abgenommen und durch 25 ml frisches Medium je T175-Flasche ersetzt. Hierbei wurde zuvor das Absetzen und die Adhärenz der MEFs im Mikroskop kontrolliert und sichergestellt. Diese gewonnenen MEFs wurden als Passage 0 definiert. Die Passage 0-MEFs wurden 1:4 bis 1:5 umgesetzt (Passage 1) und abschließend in entsprechenden

Aliquots (25 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup> und 175 cm<sup>2</sup>) in flüssigem Stickstoff eingefroren (siehe Abschnitt 4.3.2.2). Für die Experimente wurde die MEFs optimalerweise in Passage 3 verwendet. Dazu wurden die P1-MEFs aufgetaut (siehe Abschnitt 4.2.2.2) und durch Umsetzen im Verhältnis 1:2 oder 1:3 bis zur Passage 3 kultiviert und expandiert.

### **4.2.2.4 Transfektion von eukaryotischen Zellen**

Für die Transfektion wurden die Zellen am Vortag ausgelegt und am nächsten Tag bei einer Konfluenz von ca. 80% transfiziert. Die Transfektion erfolgte unter Verwendung des *Superfect Transfection Reagent* (Qiagen) nach Angaben des Herstellers.

Die HEK293T-Zellen wurden alternativ mit der Calcium-Phosphat-Methode nach folgendem Protokoll transfiziert: Für die Transfektion von 3 Wells einer 48-Lochplatte (ca.  $3 \times 10^5$  Zellen) wurden 1,5 µg DNA mit ddH<sub>2</sub>O auf 50 µl aufgefüllt und mit 7,5 µl 2x CaCl<sub>2</sub> und 50 µl 2x HBS versetzt. Der Ansatz wurde durch Vortexen gut gemischt und für 30 bis 60 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das vorhandene Kulturmedium der Zellen entfernt und durch 250 µl frisches Medium pro Well ersetzt. Abschließend erfolgte die Zugabe von 35 µl Transfektionsansatz pro Well und die Inkubation der Zellen bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 80% Luftfeuchtigkeit.

### **4.2.2.5 Generierung von klonalen, stabilen Transfektanten**

Für die Herstellung von stabilen Transfektanten wurden  $5 \times 10^5$  bis  $2 \times 10^6$  Zellen angelegt. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit Hilfe des *Superfect Transfection Reagent* (Qiagen) und nach den Angaben des Herstellers mit dem jeweiligen Expressionsplasmid transfiziert. Falls das Expressionsplasmid keine Antibiotika-Resistenzkassette aufwies, wurde es zusammen mit einem Vektor, der eine Resistenzkassette enthält, kotransfiziert. Dies erfolgte beispielsweise bei der Generierung der NIH3T3-ISRE-Luc+Renilla-Zellen. Der Renilla-Expressionsvektor (pRL-TK) verfügt über keine Resistenzkassette. Deshalb wurde der Renilla-Vektor zusammen mit dem Plasmid pcDNA3.1-Zeo (enthält Zeocin-Resistenzkassette) transfiziert. Um die transfizierten Zellen zu vereinzeln, wurden sie am nächsten Tag in eine Hybridom-Schale umgesetzt (siehe Abschnitt 4.2.2.1) und in Selektionsmedium (Kulturmedium mit Antibiotikum, in diesem Fall Geneticin (500

µg/ml) und Zeocin (50 µg/ml) gehalten. Wachsende Zellklone wurden gepickt und unter Selektionsmedium expandiert. Die wachsenden Zellklone wurden im Fall der NIH3T3-ISRE-Luc+Renilla-Zellen mit Hilfe einer Dual-Luciferase-Messung hinsichtlich der Firefly- sowie der Renilla-Luciferase-Expression getestet und doppelt-positive Zellklone weiter expandiert. Von diesen stabilen Transfektanten wurden mehrere Aliquots eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert (siehe Abschnitt 4.2.2.2)

### 4.2.2.6 Inhibition der zellulären Translation

Für Halbwertszeit-Analysen wurde die *de novo* Synthese von Proteinen gehemmt. Dafür wurden die Zellen mit dem Translationshemmer Cycloheximid (CHX, 50 µg/ml) behandelt. Um eine gleichmäßige Inhibition zu gewährleisten, wurden die Zellen zunächst einmal mit CHX-haltigem Medium gewaschen und anschließend mit neuem, CHX-haltigem Medium inkubiert.

## 4.2.3 Virologische Arbeiten

### 4.2.3.1 Herstellung von rekombinanten MCMV-Mutanten

Die Generierung der MCMV-Mutanten erfolgte mit Hilfe von homologer Rekombination linearer PCR-Produkte in den wt-MCMV-BAC MW97.01 (Wagner et al., 1999) ( $\Delta M28$ - und  $\Delta M45$ -Mutante) oder den wt-MCMV-BAC C3X repair (Jordan et al., 2011) (IE3-HA- und  $\Delta$ IE-611-Mutante). Das lineare DNA-Fragment wurde unter Verwendung des pFRT2-Kana-Plasmids als Template für die Kanamycin-Resistenzkassette hergestellt. Die Mutagenese-Primer enthielten Bindungsstellen für die Amplifikation der Kanamycin-Kassette und zusätzlich je eine ca. 60 bp umfassende Sequenz, die homolog zu den flankierenden Enden der zu deletierenden Region des MCMV-Genoms ist. Um ein MCMV-Genprodukt mit einem HA-Epitop zu markieren, wurde ein Mutagenese-Primer verwendet, der zusätzlich zu den Bindestellen für die Amplifikation der Kanamycin-Kassette und den homologen Bereichen, eine HA-Epitop-Sequenz enthielt. Nach der Generierung des linearen DNA-Fragments wurde dieses in elektrokompente *E.coli* transformiert (DH10B mit MCMV-BAC und pKD46 oder GS1783 mit C3X repair; siehe Abschnitt 4.2.1.2 und 4.2.1.4). Aufgrund der homologen Bereiche wurde die Rekombination mit spezifischen Sequenzen ermöglicht, wodurch die zu deletierende Genomregion

durch die Kanamycin-Resistenzkassette ersetzt wurde. Die Antibiotika-Resistenz erleichterte die anschließende Selektion auf Bakterienkolonien, die das gewünschte Gen deletiert haben. Die Entfernung der Resistenzkassette (die von zwei *frt-sites* flankiert wird) aus dem mutierten MCMV-Genom wurde durch die nachfolgende Transformation des pCP20-Plasmides (Cherepanov and Wackernagel, 1995) erreicht. pCP20 kodiert für die FLP-Rekombinase, welche die Resistenzkassette mittels homologer Rekombination der beiden *frt-sites* entfernt. Durch diesen Vorgang wird die erneute Mutagenese eines bereits mutierten MCMV-Genoms möglich, was die Generierung von Doppel- oder Reinsertionsmutanten vereinfacht.

#### **4.2.3.2 Herstellung eines gereinigten MCMV-Stocks**

Für die Generierung eines gereinigten MCMV-Stocks wurde zunächst ein "Vor-Stock" hergestellt, indem eine T75-Zellkulturflasche mit MEFs (Passage 3) oder BIM-Zellen mit MCMV infiziert wurde. Sobald diese Zellen durchinfiziert waren, wurden mit dem "Vor-Stock" 20 T175-Zellkulturflaschen mit MEFs (Passage 3) oder BIM-Zellen infiziert. 6 bis 9 Tage nach der Infektion wurde die Medium/Zellsuspension in 500 ml-Zentrifugenbecher überführt und für 10 min bei 5000 g (6000 rpm, J2-21, Beckman) und 10°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in 250 ml Zentrifugenbecher transferiert und das Pellet (Zellreste) verworfen. Daraufhin wurde der Überstand für 3 h mit 20.000 g (13.000 rpm, J2-21, Beckman) und 10°C zentrifugiert, um die MCMV-Virionen zu pelletieren. Nach dem Abgießen des Überstands wurde das Pellet in 15 ml Zellkulturmedium aufgenommen. Anschließend wurde die Virus-Suspension ü.N. auf Eis (im Kühlraum) inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Virus-Suspension resuspendiert, mit Hilfe eines sterilen und gekühlten *Douncers* (Wheaton) homogenisiert und vorsichtig auf ein Saccharosekissen (15% Saccharose/VSB) pipettiert. Daraufhin erfolgte eine Zentrifugation für 1 h bei 60.000 g (20.000 rpm OptimaL-70K, Beckman) und 10°C. Nach der Ultrazentrifugation wurde der Überstand vorsichtig abgegossen und das Virus-Pellet in 2 bis 3 ml 15% Saccharose/VSB ü.N. auf Eis (im Kühlraum) inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Viren resuspendiert, mit Hilfe eines *Douncers* (steril, gekühlt) homogenisiert und Aliquots (20 bis 50 µl) bei -80°C eingefroren.

#### **4.2.3.3 Herstellung eines ungereinigten MCMV-Stocks**

Für die Herstellung von ungereinigten Virus-Präparationen wurden entweder 3 T175-Zellkulturflaschen oder sechs 6-Lochplatten mit am Tag zuvor ausgelegten BIM-Zellen mit MCMV infiziert. Die Nutzung von 6-Lochplatten ermöglicht die Verstärkung der Virus-Infektiosität durch das sogenannte *centrifugal enhancement* (siehe Abschnitt 4.2.3.4), was insbesondere bei schlecht wachsenden Virus-Mutanten zu höheren Ausbeuten führt. Sobald die Zellen durchinfiziert waren, wurde die Medium/Zellsuspension in 50 ml Falcons überführt und für 5 min bei 3700 g (4000 rpm Allegra X-15R, Beckman-Coulter) und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde in frische 50 ml Falcons überführt. Das Pellet wurde in 10 ml Zellkulturmedium resuspendiert und mit einem *Douncer* (steril, gekühlt) homogenisiert, worauf sich eine erneute Zentrifugation für 5 min bei 3700 g (4000 rpm Allegra X-15R, Beckman-Coulter) und RT anschloss. Dieser Überstand wurde mit dem ersten Überstand vereint und in Aliquots (0,5 bis 2 ml) bei -80°C eingefroren.

#### **4.2.3.4 Infektionen mit MCMV**

Alle Infektionsexperimente wurden mit permissiven Zellen durchgeführt. Dabei wurde das berechnete Virus-Volumen (entsprechend der gewünschten MOI) mit Zellkulturmedium verdünnt, gut gemischt und auf die Zellen gegeben. Alle Infektionen mit MCMV wurden durch das sogenannte *centrifugal enhancement* verstärkt, indem die frisch infizierten Zellkulturgefäße in einer Plattenzentrifuge jeweils zwei mal für 15 min bei 900 g (2000 rpm, Allegra X-15R, Beckman-Coulter) bei RT zentrifugiert wurden. Durch die Zentrifugation wird die Infektiosität um das 10- bis 100-fache erhöht (Osborn and Walker, 1968). Die Titer-Bestimmung von Virus-Stocks oder von Replikationsanalysen erfolgte ebenfalls mit *centrifugal enhancement*. Die infizierten Zellen wurden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 80% Luftfeuchtigkeit inkubiert.

#### **4.2.3.5 Replikationsanalysen**

Für Wachstumsanalysen wurden permissive Zellen einen Tag vor der Infektion in 6-Lochplatten ausgelegt. Für die Infektion wurde das berechnete Virus-Volumen (abhängig von der MOI) mit Zellkulturmedium verdünnt und auf die Zellen gegeben. Die Infektion wurde durch *centrifugal enhancement* verstärkt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde jeweils eine gesamte 6-Lochplatte (d.h. Zellen mit Überstand)

bei -80°C eingefroren. Nachdem Abschluss des Experiments wurde alle Virus-Zell-Suspensionen gemeinsam aufgetaut und jede Bedingung (Virus(mutante) pro Zeitpunkt) in Triplikaten titriert.

### 4.2.3.6 Titrationsen

Für die Bestimmung des Virus-Titers eines Stocks oder einer Virus-Zell-Suspension wurden Passage 3-MEFs oder BIM-Zellen in 48-Lochplatten angelegt. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit Hilfe einer sequenziellen 1:10 Verdünnungsreihe der zu titrierenden Virussuspension infiziert, wobei die Infektion mittels *centrifugal enhancement* verstärkt wurde. Die Titration erfolgte dabei immer in Triplikaten. Ca. 2 h nach der Zentrifugation wurde das Medium der infizierten Zellen abgenommen und diese mit viskosem Methylcellulose-enthaltenden Medium überschichtet, um Infektionen über den Überstand zu verhindern und somit nur die Virus-Ausbreitung von Zelle zu Zelle zu erlauben. 3-4 Tage nach der Infektion wurden die Anzahl der Plaques mikroskopisch bestimmt und auf PFU/ml zurückgerechnet.

### 4.2.3.7 UV-inaktivierung von MCMV

Um nicht-infektiöse und nicht-replikationskompetente MCMV-Partikel zu erhalten, wurde das Virus-Volumen (abhängig von der MOI) in 1 ml Zellkulturmedium verdünnt und durch eine Behandlung mit UV-Licht (Crosslinker CL-1000, UVP; 750 mJ/cm<sup>2</sup>, 254 nm, ca. 15 cm Abstand von der Lichtquelle) inaktiviert. Im Anschluss wurden die UV-inaktivierten Virus-Partikel in ein Falcon überführt und mit Kulturmedium auf das benötigte Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Infektion erfolgte wie in Abschnitt 4.2.3.4 erläutert.

### 4.2.3.8 Exklusive Expression von viralen *ie*-Genen

Um Infektionsstudien unter selektiven *immediate-early*-Bedingungen durchzuführen, wurden permissive Zellen in Anwesenheit von 100 µg/ml Cycloheximid (CHX) infiziert. CHX ist ein reversibler Translationsinhibitor, der in infizierten Zellen dazu führt, dass zwar viele *ie*-Transkripte hergestellt, diese aber aufgrund der Hemmung nicht translatiert werden. Somit können keine IE-Proteine, die zur Transaktivierung der *early*-Genexpression benötigt werden, generiert werden. Nach 3 h CHX-Behandlung wurde das CHX-haltige Medium entfernt, die Zellen 2 mal mit 5 µg/ml Actinomycin D (Act D)-haltigem Medium gewaschen und anschließend für weitere 4

h in Act D-enthaltendem Medium inkubiert. Die Behandlung mit Actinomycin D hemmt die Transkription, so dass nur die bereits vorhandenen *ie*-Transkripte translatiert werden können, während die Transkription der *early*-Gene inhibiert wird.

#### 4.2.3.9 Herstellung von MCMV-Immunsrum

BALB/c oder C57BL/6-Mäuse wurden mit wt-MCMV ( $2 \times 10^6$  PFU pro Maus, Titer-Bestimmung mit *centrifugal enhancement*) intraperitoneal infiziert. 6 Wochen nach der Infektion wurde mittels Herzpunktion Blut entnommen und Serum präpariert. Das Serum enthält Antikörper gegen MCMV-spezifische Epitope und wurde beispielsweise in Immunoblot Analysen zur Detektion von MCMV-Proteinen genutzt.

#### 4.2.3.10 Proteinase K-Verdau

Um aus einem Virus-Stock oder von Virus-infizierten Zellen Gesamt-DNA zu isolieren, wurde ein Proteinase K-Verdau durchgeführt.

Im Fall von Virus-infizierten Zellen (ca.  $1 \times 10^6$  Zellen) wurden diese mit einem Zellschaber abgekratzt und die Virus-Zell-Suspension in ein 15 ml Falcon überführt. Nach einer Zentrifugation für 3 min bei 300 g (1200 rpm, 5810R Eppendorf) und RT wurde der Überstand verworfen, während das Pellet in 1 ml PBS aufgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt wurde. Nach einer erneuten Zentrifugation für 1 min bei 3300 g (6000 rpm, 5415D, Eppendorf) und RT wurde das PBS entfernt und das Pellet für den folgenden Proteinase K-Verdau verwendet.

##### Pipettierschema Virus-infizierte Zellen:

1x Proteinase K Puffer	190 µl
Proteinase K (10 mg/ml)	10 µl
Virus/Zellpellet	
	200 µl

##### Pipettierschema Virus-Stock:

4x Proteinase K Puffer	50 µl
Proteinase K (10 mg/ml)	10 µl
Virus-Stock	100 µl
ddH <sub>2</sub> O	40 µl
	200 µl

Der Ansatz wurde ü.N. bei 56°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) zu der Probe zugegeben und durch Invertieren gemischt. Im Anschluss wurde für 3 min bei 18.000 g (13.000 rpm, 5417R, Eppendorf) zentrifugiert, die obere Phase vorsichtig abgenommen und in ein

frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Diese Extraktion wurde mehrfach wiederholt bis die Interphase nicht mehr zu erkennen war. Daraufhin wurde die obere Phase mit 1 Volumen Isopropanol gemischt und die DNA bei 18.000 g (13.000 rpm, 5417R, Eppendorf) und 4°C für 30 min gefällt. Danach wurde die DNA durch Zugabe von 100 µl 70% (v/v) Ethanol und einer Zentrifugation für 10 min bei 18.000 g (13.000 rpm, 5417R, Eppendorf) und 4°C gewaschen und in 10 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

### **4.2.4 Molekularbiologische Arbeiten**

Alle im Folgenden nicht näher beschriebenen allgemeinen molekularbiologischen Methoden, wie z.B. Restriktionsverdau, DNA-Ligation und Färbung von Agarose-Gelen mittels Ethidiumbromid, wurden nach (Sambrook et al., 1989; Sambrook and Russell, 2001) oder nach den Angaben der Hersteller durchgeführt.

#### **4.2.4.1 Isolierung von Plasmid-DNA**

Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit oder dem Plasmid Midi Kit (beide Qiagen) nach den Angaben des Herstellers. Die Arbeiten mit Plasmid-DNA wurden nach Standard-Protokollen durchgeführt.

#### **4.2.4.2 Isolierung von Bacmid-DNA**

Bei Arbeiten mit Bacmid-DNA kann diese aufgrund ihrer Größe durch mechanische Belastung geschert werden. Um eine mechanische Scherung zu vermeiden, wurden alle Arbeiten mit abgeschnittenen Pipettenspitzen durchgeführt und auf ein Mischen durch Vortexen verzichtet.

Für die Minipräparation von Bacmid-DNA wurden 10 ml einer Übernachtskultur (mindestens 16 h geschüttelt) in ein Falcon überführt und für 10 min bei 3200 g (4000 rpm, 5810R, Eppendorf) und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 200 µl Puffer P1 (50 mM Tris/HCl, pH 8; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A) resuspendiert und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden in 300 µl Puffer P2 (0,2 M NaOH; 1% (w/v) SDS) durch Invertieren des Reaktionsgefäßes lysiert. Nach 5-minütiger Inkubationszeit bei RT wurden 300 µl Puffer P3 (3 M K-Acetat, pH 4,6) zugefügt, durch Invertieren gemischt und erneut für 5 min bei RT inkubiert. Um die genomische DNA und die denaturierten Proteine zu

pelletieren, erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 16.000 g (13.000 rpm, 5415D, Eppendorf) und RT. Der Überstand, der die Bacmid-DNA enthält, wurde vorsichtig abgenommen und in ein frisches 2,0 ml Reaktionsgefäß überführt. Im Anschluss wurde 1 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) zugegeben und durch Invertieren gemischt. Daraufhin wurde für 3 min bei 16.000 g (13.000 rpm, 5415D, Eppendorf) zentrifugiert, die obere Phase vorsichtig abgenommen und erneut Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) zugegeben. Die Extraktion wurde dabei so lange wiederholt bis die Interphase nicht mehr zu erkennen war. Daraufhin wurde die Bacmid-DNA mit 1 Volumen Isopropanol gemischt und für 30 min bei 18.000 g (13.000 rpm, 5417R, Eppendorf) und 4°C gefällt. Im Anschluss wurde die Bacmid-DNA durch Zugabe von 1 ml 70% (v/v) Ethanol und einer folgenden Zentrifugation für 10 min bei 18.000 g (13.000 rpm, 5417R, Eppendorf) und 4°C gewaschen. Abschließend wurde die BAC-DNA in 30 bis 100 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

BAC-Minipräparation wurde hergestellt, um *E.coli*-Kolonien hinsichtlich einer erfolgreichen homologen Rekombination zu überprüfen. Für die Präparation von größeren Mengen an Bacmid-DNA (z.B. für die Rekonstitution der MCMV-Mutanten) wurde das Nucleobond AX100 Kit (Macherey-Nagel) verwendet und nach den Angaben des Herstellers vorgegangen.

#### **4.2.4.3 Arbeiten mit RNA**

Für die Arbeiten mit RNA wurden ausschließlich RNase-freie Lösungen eingesetzt, um eine RNA-Degradation zu vermeiden. Gesamt-RNA wurden aus ca.  $2-4 \times 10^6$ -Zellen pro Probe und unter Verwendung des *RNease Mini Kits* (Qiagen) präpariert. Zuvor wurden die Zellen mit Hilfe des *QiaShredder-Kits* (Qiagen) aufgebrochen.

#### **4.2.4.4 Semi-quantitative RT-PCR**

Für die semi-quantitative Analyse von Transkripten aus Gesamt-RNA wurde der *OneStep RT-PCR Kit* (Qiagen) genutzt. Das vom Hersteller empfohlene Reaktionsvolumen (50 µl) wurde allerdings auf 10 µl reduziert.

Zunächst wurden die Konzentration der präparierten Gesamt-RNA (siehe Abschnitt 4.2.4.3) bestimmt (Nanodrop 1000, Peqlab). Um die RNA-Mengen von verschiedenen Proben anzugleichen, wurden je Probe 2 µg RNA mit 1,0 µl DNase (RNase-free) versetzt und das Reaktionsvolumen ad 10 µl mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt.

Daraufhin wurde der Ansatz für 20 min bei 22°C im Thermoblock inkubiert. Um die DNAse zu inaktivieren, erfolgte danach eine 10-minütige Inkubation bei 70°C. Die DNAse-behandelte RNA wurde im Anschluss in verschiedenen Verdünnungen als Template für die semi-quantitativen Analysen eingesetzt, wobei jeweils die Verdünnung verwendet wurde, die für das zu untersuchende Transkript limitierend ist. Die *Annealing*-Temperatur, die Elongationszeit und die Anzahl der Zyklen wurden auf das jeweilige Primerpaar und die zu erwartende PCR-Produkt-Größe abgestimmt.

<u>RT-PCR-Ansatz:</u>		<u>RT-PCR-Programm:</u>		
5x Puffer	2,0 µl	50°C	30 min	
dNTP-Mix	0,6 µl	95°C	15 min	
Primer forw	0,4 µl	95°C	30-45 sec	} 30-35 Zyklen
Primer rev	0,4 µl	x°C	30-45 sec	
Enzym-Mix	0,6 µl	72°C	x sec	
ddH <sub>2</sub> O	5,0 µl	72°C	10 min	
<u>RNA (10-250 ng/µl)</u>	<u>1,0 µl</u>	4°C	∞	
	10,0 µl			

Die PCR-Produkte (10 µl) wurden mit 3 µl 6x TBE-Probenpuffer versetzt und davon 9 µl mit Hilfe eines Agarose-Gels gelelektrophoretisch aufgetrennt und analysiert.

#### 4.2.4.5 Herstellung einer Digoxigenin (DIG)-markierten Sonde

Die DIG-markierten Sonden wurden entweder mittels *DIG High Prime Kit* (Roche) nach den Angaben des Herstellers oder mit Hilfe einer PCR unter Verwendung genspezifischer Primer generiert. Für die Herstellung von DIG-Sonden mit Hilfe von PCR wurden DIG-dUTP eingesetzt, wobei der dNTP-Mix 5 mM DIG-dUTP, 6,5 mM dTTP und je 10 mM dATP, dCTP und dGTP enthielt. Das PCR-Programm wurde anhand der verwendeten Primer-Paare (Annealing-Temperatur) sowie der erwarteten PCR-Produkt-Größe (Elongationszeit) angepasst. Da sich die Laufeigenschaften von DIG-markierten PCR-Produkten im Vergleich zu nicht-markierten PCR-Produkten verlangsamten, konnte die erfolgreiche DIG-Markierung einfach mittels Agarose-Gelelektrophorese bei gleichzeitiger Auftragung beider PCR-Produkte kontrolliert werden.

#### 4.2.4.6 Southern-Blot, Hybridisierung und DIG-Detektion

Alle generierten MCMV-Bacmid-Mutanten wurden mittels Southern-Blot-Hybridisierung unter Verwendung einer DIG-markierten Sonde gegen die inserierte Resistenzkassette bzw. gegen das deletierte Gen oder gegen ein Gen in unmittelbarer Nachbarschaft kontrolliert. Die Bacmid-DNA wurde dafür zunächst mit einem Restriktionsenzym geschnitten (z.B. *EcoRI* oder *Asel*) und mit Hilfe eines 0,5%-Agarose-Gels elektrophoretisch aufgetrennt. Um eine gute Auftrennung der Fragmente zu erzielen, wurden Gelkammern mit langer Laufstrecke verwendet. Im Anschluss wurden die DNA-Fragmente im Agarose-Gel für 10 min in 250 mM HCl inkubiert, 2 mal kurz mit H<sub>2</sub>O gewaschen und daraufhin 2 mal für 15 min in Denaturierungspuffer (0,5 M NaOH 1,5 N NaCl) inkubiert. Nach dem erneuten Waschen mit H<sub>2</sub>O erfolgte eine Inkubation in Neutralisierungspuffer (0,5 M Tris/HCl (pH 7,5), 3 M NaCl) für 2 mal 15 min. Das Gel wurde mit H<sub>2</sub>O gewaschen und danach in 20x SSC gelagert bis die Blotting-Apparatur aufgebaut war. Die DNA-Fragmente wurden mit Hilfe der Turbo-Blot-Apparatur (Schleicher & Schuell) nach den Angaben des Herstellers mittels Kapillarblot (mind. 4 h oder ü.N.) mit 20x SSC auf eine Nylonmembran (*Nylon membran positively charged*, Roche) transferiert. Nach dem Transfer wurde die DNA mit Hilfe von UV-Bestrahlung (UV-Crosslinker CL-1000, UVP) kovalent an die Membran gebunden. Daraufhin erfolgte die Prä-Hybridisierung mit DIG-Easy Hyb (Roche) bei 42°C für mindestens 1 h, worauf sich die Hybridisierung mit der denaturierten Sonde in DIG-Easy Hyb bei 42°C ü.N. anschloss. Danach wurde die Membran 2 mal kurz mit stringenterm Waschpuffer 1 (2x SSC, 0,1% (w/v) SDS) gespült und daraufhin 2 mal für 15 min bei 68°C mit dem stringenterm Waschpuffer 2 (0,2x SSC, 0,1% (w/v) SDS) gewaschen. Im Anschluss wurde die Membran kurz mit H<sub>2</sub>O gespült und mit Maleinsäurepuffer (0,1 M Maleinsäure (pH 7,5), 0,15 M NaCl) gewaschen.

Für die Detektion wurde das Digoxigenin-System (Roche) verwendet. Die Membran wurde für 30 min bei RT in 1x Blocking-Reagenz (Roche, verdünnt mit Maleinsäurepuffer) inkubiert, um unspezifische Signale zu reduzieren. Danach wurde der DIG-spezifische Antikörper (anti-DIG AP, Roche, Verdünnung 1:20.000 in 1x Blocking-Reagenz/ Maleinsäurepuffer) hinzugefügt und für weitere 30 min inkubiert. Die Membran wurde 3 mal für 10 min mit Maleinsäurepuffer gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Im Anschluss wurde die Membran für 5 min mit AP-Puffer (0,1 M Tris/HCl (pH 9,5), 0,1 M NaCl) behandelt und danach für 5 min mit

der Substratlösung (CDP-Star, Roche) inkubiert. Nach dem Trocknen der Membran mit Hilfe von Whatman-Papier wurde diese in Saran-Folie eingeschlagen. Die Alkalische Phosphatase, die an die Antikörper gebunden ist, führt zur Dephosphorylierung des Substrats, wodurch Energie in Form von Licht abgegeben wird. Das dadurch entstehende Signal wurde durch Auflegen eines Amersham Hyperfilms sichtbar gemacht.

## **4.2.5 Proteinbiochemische und immunologische Methoden**

### **4.2.5.1 Herstellung von Gesamtzell-Protein-Lysaten**

Für die Herstellung von Protein-Lysaten wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers (*cell scraper*, TPP) von dem jeweiligen Zellkulturgefäß abgekratzt und in ein 15 ml Falcon überführt. Pro Probe wurden dabei zwischen  $2,5 \times 10^5$  und  $2 \times 10^6$  Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden für 3 min bei 300 g (1200 rpm, 5810R Eppendorf) pelletiert, in 1 ml PBS (4°C) aufgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Daraufhin wurden die Zellen für 1 min bei 3300 g (6000 rpm, 5415D, Eppendorf) zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in ca. 50 µl Lysepuffer (aus dem *Luciferase Reporter Gene Assay high sensitivity Kit* (Roche)) pro  $10^6$  Zellen resuspendiert. Die Lysate wurden bei -20°C eingefroren. Nach dem Auftauen wurden die Lysate für 2 min bei 18.000 g (13.000 rpm, 5417R, Eppendorf) und 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für Western-Blot Analysen verwendet.

### **4.2.5.2 Herstellung nativer cytoplasmatischer und nukleoplasmatischer Protein-Lysate**

Für die Herstellung von nativen, fraktionierten Protein-Lysaten, in denen beispielsweise die Phosphorylierung erhalten blieb (Nachweis von Phospho-Proteinen oder Protein-Dimeren möglich) wurden die Zellen vom Zellkulturgefäß mit Hilfe eines Zellschabers (TPP) abgekratzt und in ein 15 ml Falcon überführt. Pro Probe wurden  $10^6$ - $10^7$  Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden für 3 min bei 300 g (1200 rpm, 5810R Eppendorf) und 4°C pelletiert, in 1 ml PBS (4°C) aufgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Daraufhin wurden die Zellen für 1 min bei 3800 g (6000 rpm, 5417R, Eppendorf) zentrifugiert. Der PBS-Waschschritt wurde 2 mal wiederholt. Das Zellpellet wurde im Anschluss in 100-150 µl cytoplasmatischem

Lysepuffer resuspendiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde danach für 16 sec bei 4°C zentrifugiert (5417R, Eppendorf). Der Überstand (Ü1) wurde zum cytoplasmatischen Lysat weiterverarbeitet, während aus dem Pellet P1 das nukleäre Lysat hergestellt wurde. Ü1 wurde für 10 min bei 19350g (13500 rpm 5417R, Eppendorf) und 4°C zentrifugiert. Der Überstand (Ü2, cytoplasmatisches Lysat) dieser Zentrifugation wurde in 30 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Das Pellet dieser Zentrifugation (P2) wurde verworfen.

Das Pellet P1 wurde in 100-150 µl nukleoplasmatischem Lysepuffer resuspendiert und für 25-30 min auf Eis inkubiert. Daraufhin erfolgte eine Zentrifugation für 25 min bei 19350g (13500 rpm 5417R, Eppendorf) und 4°C. Der Überstand (Ü3, nukleäres Lysat) dieser Zentrifugation wurde ebenfalls in 30 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert, während das Pellet verworfen wurde.

### **4.2.5.3 Bradford-Bestimmung**

Um eine vergleichbare Proteinmenge bei Immunoblot Analysen sicherzustellen, wurden die Protein-Lysate per Bradford-Bestimmung normalisiert. Dafür wurden 1-5 µl des entsprechenden Protein-Lysats mit 995-999 µl Bradford-Lösung versetzt und gemischt. Daraufhin wurde die Optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 595 nm in einem Spektralphotometer bestimmt. Die zu vergleichenden Protein-Lysate wurde normalisiert, indem von dem Lysat mit der geringsten  $OD_{595}$  das höchste Volumen ( $V_{max}$ ) pipettiert wurde. Die anderen Lysat-Volumina wurden aufgrund der jeweiligen gemessenen  $OD_{595}$  ins Verhältnis zu  $V_{max}$  gesetzt und aufgetragen. Die erfolgreiche Normalisierung wurde zusätzlich durch eine Ponceau-Färbung der geblotteten Membran und durch eine Detektion mit  $\beta$ -Actin-Antikörper kontrolliert.

### **4.2.5.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Bei der SDS-PAGE (Laemmli, 1970) werden Proteine abhängig von ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Durch die Interaktion der SDS-Moleküle mit den Proteinen werden diese denaturiert und die Eigenladung der Proteine neutralisiert. Dies hat zur Folge, dass nur noch die molekulare Masse der Proteine die Laufgeschwindigkeit innerhalb des Gels beeinflusst. Für die Auftrennung der Proteine wurden diskontinuierliche Gele eingesetzt, bei denen jeweils das Trenngel

mit einem Sammelgel überschichtet wurde. Die Gele wurden dabei nach folgendem Pipettierschema angesetzt.

	2 kleine Gele				2 mittlere Gele			
	Trenngel			Sammelgel	Trenngel			Sammelgel
	8%	10%	12%		8%	10%	12%	
30% Polyacrylamid (PAA) [ml]	3,2	4	4,8	1,5	19,2	24	28,8	6
2 M Tris/HCl (pH 8,0) [ml]	2,5	2,5	2,5	-	15,2	15,2	15,2	-
0,5 M Tris/HCl (pH 6,8) [ml]	-	-	-	1,2	-	-	-	4,8
20% (w/v) SDS [µl]	60	60	60	45	360	360	360	180
60% (w/v) Saccharose [ml]	-	-	-	2,1	-	-	-	8,4
dH <sub>2</sub> O [ml]	6,1	5,3	4,5	4,2	36,6	31,8	27	16,8
TEMED [µl]	24	24	24	12	144	144	144	48
10% (w/v) APS [µl]	144	144	144	120	800	800	800	240

Die normalisierten Proben wurden mit 5x SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Kleine Gele wurden bei 20 mA je Gel für 60-90 min und RT aufgetrennt. Die Elektrophorese der mittleren Gele erfolgte für 1 Gel bei 10 mA und 60 V und für 2 Gele bei 10 mA und 120 V für 14-16 h und 4°C.

#### 4.2.5.5 Western-Blot

Um die per SDS-PAGE aufgetrennten Proteine vom Gel auf eine Nitrocellulose-Membran (Protran, Whatman) zu transferieren wurde das *semi-dry* Blotverfahren mit Hilfe eines Elektrobloppers (Biometra) angewandt. Dafür wurden drei in Blotpuffer getränkte Whatman-Papiere (3MM, Whatman) auf die Anode gelegt. Auf die Whatman-Papiere wurde die ebenfalls in Blotpuffer äquilibrierte Nitrocellulose-Membran und das SDS-Gel geschichtet. Hierbei sollten sich zwischen dem Gel und der Membran keine Luftblasen befinden. Auf das Gel wurden drei in Blotpuffer getränkte Whatman-Papiere gelegt und die Proteine durch Blotten bei 1000 mA und 14 V für 70 min auf die Membran transferiert. Das erfolgreiche Blotten und die gleichmäßige Proteinbeladung wurden durch Ponceau-Färbung kontrolliert. Die Färbung wurde durch mehrmaliges Waschen mit TBST entfernt.

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

Anschließend wurde die Membran für 30-60 min in 5% (w/v) Magermilchpulver (Sucofin) in TBST inkubiert. Daraufhin erfolgte die Inkubation der Membran mit Primärantikörper in 1-3% (w/v) Milchpulver/TBST für mindestens 1 h bei RT oder ü.N. bei 4°C. Nicht gebundener Primärantikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit TBST für jeweils ca. 5 min entfernt. Im Anschluss wurde die Membran mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper in 1-3% (w/v) Milchpulver/TBST für mindestens 45 min bei RT inkubiert. Für die Detektion wurde die Membran 3 x 10 min in TBST gewaschen, zwischen zwei Whatman-Papieren getrocknet und mit der Entwicklerlösung (*ECL (Plus) Western Blotting Detection Systems*, GE Healthcare) für 3-5 min inkubiert. Nach dem erneuten Trocknen der Membran zwischen zwei Whatman-Papieren wurde diese in Saran-Folie eingeschlagen und die Proteinsignale durch Auflegen eines Films (Amersham Hyperfilme ECL oder BioMax MR<sup>®</sup> Filme, Kodak) sichtbar gemacht.

#### **4.2.5.6 Luciferase-Reportergen-Analysen**

Die Luciferase-Reportergen-Experimente wurden unter Verwendung des *Luciferase Reporter Gene Assay high sensitivity Kits* (Roche), des *Beetle-Juice Kits* (P.J.K.) oder des *Dual-Luciferase-Reporter Assay Systems* (Promega) durchgeführt. Für die Bestimmung der ISG54-Luciferase-Aktivität wurden HEK293T-Zellen in 48-Lochplatten angelegt. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit dem ISG54-Luciferase-Reporter, den IE-Expressionsplasmiden sowie dem TBK-1-Plasmid oder dem Kontrollplasmid pFRTZ-MIEP-EGFP mit Hilfe der Ca<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Methode transfiziert. Am nächsten Tag wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 150 µl Lyse-Puffer pro Well lysiert und die gesamte 48-Lochplatte bei -70°C eingefroren.

Für die parallele Bestimmung der ISRE-Firefly- und der Renilla-Expression wurden NIH3T3-ISRE-Luc+Renilla-Zellen in 48-Lochplatten ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit wt-Virus oder verschiedenen Deletionsviren mittels *centrifugal enhancement* infiziert. 8 bzw. 24 hpi wurde das Zellkulturmedium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Daraufhin wurden diese mit 150 µl Lysepuffer je Well lysiert und in der Zellkulturplatte bei -70°C eingefroren. Dadurch konnten Proben von unterschiedlichen Zeitpunkten gleichzeitig gemessen werden.

Nach dem Auftauen der Proben wurde die Lysate in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und für 2 min bei 18.000 g (13.000 rpm, 5417R, Eppendorf) bei 4°C

zentrifugiert. Pro Lysat wurden 50 µl des Überstands für die Bestimmung der Luciferase-Expression mit Hilfe des Mikroplatten-Luminometer (Model Mithras LB 940 oder TriStar2 LB 942; Berthold) eingesetzt. Die Analyse der ISG54-Luciferase-Expression erfolgte unter Verwendung *des Luciferase Reporter Gene Assay high sensitivity Kits* (Roche) oder *des Beetle-Juice Kits* (P.J.K.) nach den Angaben der Hersteller. Für die parallele Bestimmung der ISRE-Firefly- und der Renilla-Expression wurde nicht die vom Hersteller empfohlene Substratmenge von 100 µl sondern 50 µl pro Probe verwendet. Die Messung erfolgte jeweils in Triplikaten.

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

Für die IF-Färbung wurden HeLa-Zellen in 48-Lochplatten angelegt und diese am nächsten Tag mit den HA-markierten IE3-Expressionsplasmiden (0,3 µg) ü.N. transfiziert. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit PBS gewaschen, danach für 20 min mit 3% (v/v) Paraformaldehyd (PFA) fixiert und erneut mit PBS gespült. Im Anschluss wurden die Zellen für 15 min mit 0,1% (v/v) Triton-X-100 permeabilisiert und danach für 20 min mit Blockierungslösung (2% (v/v) Ziegen Serum/PBS) inkubiert. Daraufhin erfolgte eine 60-minütige Inkubation mit dem Primärantikörper ( $\alpha$ -HA, 1:200 verdünnt in 1/10 Blockierungslösung). Nicht gebundener Primärantikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Danach wurden die Zellen für 45 min (abgedunkelt) mit einem Fluorophor-gekoppelten (Cys2 oder Cys3) Sekundärantikörper (1:200 verdünnt in 1/10 Blockierungslösung, Jackson ImmunoResearch) inkubiert. Überschüssiger Sekundärantikörper wurde durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt. Daraufhin wurden die Zellen mit DAPI (5 min bei RT; 1 µg/ml [v/w] in PBS) gegengefärbt, um die Zellkerne sichtbar zu machen. Abschließend wurde die Zellen einmal mit PBS gewaschen und in PBS aufgenommen. Die Auswertung der IF erfolgte unter Verwendung des Nikon TE2000-S Mikroskops und der LUCIA 4.60 Software.

## Literaturverzeichnis

- 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.
- Adler, S.P., and Nigro, G. (2009). Findings and conclusions from CMV hyperimmune globulin treatment trials. *J. Clin. Virol.* 46 Suppl 4, S54–S57.
- Aguet, M., Dembić, Z., and Merlin, G. (1988). Molecular cloning and expression of the human interferon-gamma receptor. *Cell* 55, 273–280.
- Ahn, J.H., Brignole, E.J., and Hayward, G.S. (1998). Disruption of PML subnuclear domains by the acidic IE1 protein of human cytomegalovirus is mediated through interaction with PML and may modulate a RING finger-dependent cryptic transactivator function of PML. *Mol. Cell. Biol.* 18, 4899–4913.
- Ahn, J.H., Xu, Y., Jang, W.J., Matunis, M.J., and Hayward, G.S. (2001). Evaluation of interactions of human cytomegalovirus immediate-early IE2 regulatory protein with small ubiquitin-like modifiers and their conjugation enzyme Ubc9. *J. Virol.* 75, 3859–3872.
- Angulo, A., Ghazal, P., and Messerle, M. (2000). The major immediate-early gene ie3 of mouse cytomegalovirus is essential for viral growth. *J. Virol.* 74, 11129–11136.
- Ansel, K.M., Djuretic, I., Tanasa, B., and Rao, A. (2006). Regulation of Th2 differentiation and Il4 locus accessibility. *Annu. Rev. Immunol.* 24, 607–656.
- Asmar, J., Wiebusch, L., Truss, M., and Hagemeyer, C. (2004). The putative zinc finger of the human cytomegalovirus IE2 86-kilodalton protein is dispensable for DNA binding and autorepression, thereby demarcating a concise core domain in the C terminus of the protein. *J. Virol.* 78, 11853–11864.
- Atalay, R., Zimmermann, A., Wagner, M., Borst, E., Benz, C., Messerle, M., and Hengel, H. (2002). Identification and expression of human cytomegalovirus transcription units coding for two distinct Fcγ receptor homologs. *J. Virol.* 76, 8596–8608.
- Awasthi, S., Isler, J.A., and Alwine, J.C. (2004). Analysis of splice variants of the immediate-early 1 region of human cytomegalovirus. *J. Virol.* 78, 8191–8200.
- Babić, M., Krmpotić, A., and Jonjic, S. (2011). All is fair in virus-host interactions: NK cells and cytomegalovirus. *Trends Mol Med* 17, 677–685.
- Balachandran, S., Kim, C.N., Yeh, W.C., Mak, T.W., Bhalla, K., and Barber, G.N. (1998). Activation of the dsRNA-dependent protein kinase, PKR, induces apoptosis through FADD-mediated death signaling. *Embo J.* 17, 6888–6902.

- Balachandran, S., Roberts, P.C., Brown, L.E., Truong, H., Pattnaik, A.K., Archer, D.R., and Barber, G.N. (2000). Essential role for the dsRNA-dependent protein kinase PKR in innate immunity to viral infection. *Immunity* 13, 129–141.
- Baracchini, E., Glezer, E., Fish, K., Stenberg, R.M., Nelson, J.A., and Ghazal, P. (1992). An isoform variant of the cytomegalovirus immediate-early auto repressor functions as a transcriptional activator. *Virology* 188, 518–529.
- Barnes, B.J., Richards, J., Mancl, M., Hanash, S., Beretta, L., and Pitha, P.M. (2004). Global and distinct targets of IRF-5 and IRF-7 during innate response to viral infection. *J. Biol. Chem.* 279, 45194–45207.
- Basler, C.F., Mikulasova, A., Martinez-Sobrido, L., Paragas, J., Mühlberger, E., Bray, M., Klenk, H.-D., Palese, P., and García-Sastre, A. (2003). The Ebola virus VP35 protein inhibits activation of interferon regulatory factor 3. *J. Virol.* 77, 7945–7956.
- Bate, S.L., Dollard, S.C., and Cannon, M.J. (2010). Cytomegalovirus seroprevalence in the United States: the national health and nutrition examination surveys, 1988–2004. *Clin. Infect. Dis.* 50, 1439–1447.
- Bego, M., Maciejewski, J., Khaiboullina, S., Pari, G., and St Jeor, S. (2005). Characterization of an antisense transcript spanning the UL81–82 locus of human cytomegalovirus. *J. Virol.* 79, 11022–11034.
- Beijerinck, M.W. (1898). Concerning a Contagium Vivum Fluidum as Cause of the Spot Disease of Tobacco Leaves. *Verh Akad Wetensch, Amsterdam*, II 3–21.
- Benedict, C.A., and Janssen, E.M. (2007). Immunosuppression: learning from the masters. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 3, 659–662.
- Berglund, J.A., Abovich, N., and Rosbash, M. (1998). A cooperative interaction between U2AF65 and mBBP/SF1 facilitates branchpoint region recognition. *Genes Dev.* 12, 858–867.
- Berndt, A., Hofmann-Winkler, H., Tavalai, N., Hahn, G., and Stamminger, T. (2009). Importance of covalent and noncovalent SUMO interactions with the major human cytomegalovirus transactivator IE2p86 for viral infection. *J. Virol.* 83, 12881–12894.
- Blencowe, B.J. (2000). Exonic splicing enhancers: mechanism of action, diversity and role in human genetic diseases. *Trends Biochem. Sci.* 25, 106–110.
- Blom, N., Gammeltoft, S., and Brunak, S. (1999). Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J. Mol. Biol.* 294, 1351–1362.
- Bluyssen, H.A., Vlietstra, R.J., Faber, P.W., Smit, E.M., Hagemeyer, A., and Trapman, J. (1994). Structure, chromosome localization, and regulation of expression of the interferon-regulated mouse *lfi54/lfi56* gene family. *Genomics* 24, 137–148.
- 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.

- Bolger, G., Lapeyre, N., Rhéaume, M., Kibler, P., Bousquet, C., Garneau, M., and Cordingley, M. (1999). Acute murine cytomegalovirus infection: a model for determining antiviral activity against CMV induced hepatitis. *Antiviral Res.* *44*, 155–165.
- 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.
- Brinkmann, M.M., Spooner, E., Hoebe, K., Beutler, B., Ploegh, H.L., and Kim, Y.-M. (2007). The interaction between the ER membrane protein UNC93B and TLR3, 7, and 9 is crucial for TLR signaling. *J. Cell Biol.* *177*, 265–275.
- Brocchieri, 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.
- Brody, A.R., and Craighead, J.E. (1974). Pathogenesis of pulmonary cytomegalovirus infection in immunosuppressed mice. *J. Infect. Dis.* *129*, 677–689.
- 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. (2001a). A mouse model for cytomegalovirus infection. *Curr Protoc Immunol* *43*, 19.7.1–19.7.13.
- Brune, W., Ménard, C., Heesemann, J., and Koszinowski, U.H. (2001b). A ribonucleotide reductase homolog of cytomegalovirus and endothelial cell tropism. *Science* *291*, 303–305.
- Brune, W., Ménard, C., Hobom, U., Odenbreit, S., Messerle, M., and Koszinowski, U.H. (1999). Rapid identification of essential and nonessential herpesvirus genes by direct transposon mutagenesis. *Nature Biotechnology* *17*, 360–364.
- Budt, M., Niederstadt, L., Valchanova, R.S., Jonjic, S., and Brune, W. (2009). Specific inhibition of the PKR-mediated antiviral response by the murine cytomegalovirus proteins m142 and m143. *J. Virol.* *83*, 1260–1270.
- Budt, M., Reinhard, H., Bigl, A., and Hengel, H. (2004). Herpesviral Fcγ receptors: culprits attenuating antiviral IgG? *Int. Immunopharmacol.* *4*, 1135–1148.
- Buratti, E., Stuani, C., De Prato, G., and Baralle, F.E. (2006). SR protein-mediated inhibition of CFTR exon 9 inclusion: molecular characterization of the intronic splicing silencer. *Nucleic Acids Res.* *35*, 4359–4368.
- Burge, C.B., Tuschl, T., and Sharp, P.A. (1999). 20 Splicing of Precursors to mRNA by the Spliceosomes. *37*, 525–560.
- Busche, A., Marquardt, A., Bleich, A., Ghazal, P., Angulo, A., and Messerle, M. (2009). The Mouse Cytomegalovirus Immediate-Early 1 Gene Is Not Required for Establishment of Latency or for Reactivation in the Lungs. *J. Virol.* *83*, 4030–4038.

- Busche, A., Angulo, A., Kay-Jackson, P., Ghazal, P., and Messerle, M. (2008). Phenotypes of major immediate-early gene mutants of mouse cytomegalovirus. *Med Microbiol Immunol* 197, 233–240.
- Cannon, M.J., Schmid, D.S., and Hyde, T.B. (2010). Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Rev. Med. Virol.* 20, 202–213.
- Cardin, R.D., Abenes, G.B., Stoddart, C.A., and Mocarski, E.S. (1995). Murine Cytomegalovirus IE2, an Activator of Gene Expression, Is Dispensable for Growth and Latency in Mice. *Virology* 209, 236–241.
- Carlson, C., Britt, W.J., and Compton, T. (1997). Expression, purification, and characterization of a soluble form of human cytomegalovirus glycoprotein B. *Virology* 239, 198–205.
- Cartegni, L., Wang, J., Zhu, Z., Zhang, M.Q., and Krainer, A.R. (2003). ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Res.* 31, 3568–3571.
- Chan, G., Nogalski, M.T., and Yurochko, A.D. (2009). Activation of EGFR on monocytes is required for human cytomegalovirus entry and mediates cellular motility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 22369–22374.
- Chang, C.P., Malone, C.L., and Stinski, M.F. (1989). A human cytomegalovirus early gene has three inducible promoters that are regulated differentially at various times after infection. *J. Virol.* 63, 281–290.
- Chang, H.W., Watson, J.C., and Jacobs, B.L. (1992). The E3L gene of vaccinia virus encodes an inhibitor of the interferon-induced, double-stranded RNA-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 4825–4829.
- Chang, W.L.W., Barry, P.A., Szubin, R., Wang, D., and Baumgarth, N. (2009). Human cytomegalovirus suppresses type I interferon secretion by plasmacytoid dendritic cells through its interleukin 10 homolog. *Virology* 390, 330–337.
- Chebath, J., Merlin, G., Metz, R., Benech, P., and Revel, M. (1983). Interferon-induced 56,000 Mr protein and its mRNA in human cells: molecular cloning and partial sequence of the cDNA. *Nucleic Acids Res.* 11, 1213–1226.
- Chen, F.E., and Ghosh, G. (1999). Regulation of DNA binding by Rel/NF-kappaB transcription factors: structural views. *Oncogene* 18, 6845–6852.
- Cherepanov, P.P., and Wackernagel, W. (1995). Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* 158, 9–14.
- Chou, M.Y., Rooke, N., Turck, C.W., and Black, D.L. (1998). hnRNP H is a component of a splicing enhancer complex that activates a c-src alternative exon in neuronal cells. *Mol. Cell. Biol.* 19, 69–77.

- Chuang, T., and Ulevitch, R.J. (2001). Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1518, 157–161.
- Clemens, M.J., and Elia, A. (1997). The double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR: structure and function. *J. Interferon Cytokine Res.* 17, 503–524.
- Colamonici, O.R., Domanski, P., Sweitzer, S.M., Lerner, A., and Buller, R.M. (1995). Vaccinia virus B18R gene encodes a type I interferon-binding protein that blocks interferon alpha transmembrane signaling. *J. Biol. Chem.* 270, 15974–15978.
- Compton, T., Nowlin, D.M., and Cooper, N.R. (1993). Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology* 193, 834–841.
- 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.
- Corrales-Aguilar, E., Trilling, M., Reinhard, H., Mercé-Maldonado, E., Widera, M., Schaal, H., Zimmermann, A., Mandelboim, O., and Hengel, H. (2013). A novel assay for detecting virus-specific antibodies triggering activation of Fcγ receptors. *J. Immunol. Methods* 387, 21–35.
- Cristea, I.M., Moorman, N.J., Terhune, S.S., Cuevas, C.D., O'Keefe, E.S., Rout, M.P., Chait, B.T., and Shenk, T. (2010). Human cytomegalovirus pUL83 stimulates activity of the viral immediate-early promoter through its interaction with the cellular IFI16 protein. *J. Virol.* 84, 7803–7814.
- Daffis, S., Szretter, K.J., Schriever, J., Li, J., Youn, S., Errett, J., Lin, T.-Y., Schneller, S., Zust, R., Dong, H., et al. (2010). 2'-O methylation of the viral mRNA cap evades host restriction by IFIT family members. *Nature* 468, 452–456.
- Dahle, A.J., Fowler, K.B., Wright, J.D., and Boppana, S.B. (2000). Longitudinal investigation of hearing disorders in children with congenital cytomegalovirus. *Journal of the American Academy of Audiology* 11(5), 283–290.
- Datsenko, K.A., and Wanner, B.L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 6640–6645.
- Dauksaite, V., and Akusjärvi, G. (2002). Human splicing factor ASF/SF2 encodes for a repressor domain required for its inhibitory activity on pre-mRNA splicing. *J. Biol. Chem.* 277, 12579–12586.
- Davis, R.J. (2000). Signal Transduction by the JNK Group Review of MAP Kinases. *Cell* 103, 239–252.
- de Maar, E.F., Verschuuren, E.A.M., Harmsen, M.C., The, T.H., and van Son, W.J. (2003). Pulmonary involvement during cytomegalovirus infection in immunosuppressed patients. *Transpl Infect Dis* 5, 112–120.

- de Veer, M.J., Holko, M., Frevel, M., Walker, E., Der, S., Paranjape, J.M., Silverman, R.H., and Williams, B.R. (2001). Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays. *J. Leukoc. Biol.* *69*, 912–920.
- de Veer, M.J., Sim, H., Whisstock, J.C., Devenish, R.J., and Ralph, S.J. (1998). IFI60/ISG60/IFIT4, a new member of the human IFI54/IFIT2 family of interferon-stimulated genes. *Genomics* *54*, 267–277.
- Decker, T., Lew, D.J., Mirkovitch, J., and Darnell, J.E. (1991). Cytoplasmic activation of GAF, an IFN-gamma-regulated DNA-binding factor. *Embo J.* *10*, 927–932.
- DeFilippis, V.R., Alvarado, D., Sali, T., Rothenburg, S., and Früh, K. (2010). Human cytomegalovirus induces the interferon response via the DNA sensor ZBP1. *J. Virol.* *84*, 585–598.
- Delale, T., Paquin, A., Asselin-Paturel, C., Dalod, M., Brizard, G., Bates, E.E.M., Kastner, P., Chan, S., Akira, S., Vicari, A., et al. (2005). MyD88-dependent and -independent murine cytomegalovirus sensing for IFN- $\alpha$  release and initiation of immune responses in vivo. *J. Immunol.* *175*, 6723–6732.
- Der, S.D., Yang, Y.L., Weissmann, C., and Williams, B.R. (1997). A double-stranded RNA-activated protein kinase-dependent pathway mediating stress-induced apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *94*, 3279–3283.
- Der, S.D., Zhou, A., Williams, B.R., and Silverman, R.H. (1998). Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *95*, 15623–15628.
- Doehle, B.P., Hladik, F., McNevin, J.P., McElrath, M.J., and Gale, M. (2009). Human immunodeficiency virus type 1 mediates global disruption of innate antiviral signaling and immune defenses within infected cells. *J. Virol.* *83*, 10395–10405.
- Doktor, T.K., Schroeder, L.D., Vested, A., Palmfeldt, J., Andersen, H.S., Gregersen, N., and Andresen, B.S. (2011). SMN2 exon 7 splicing is inhibited by binding of hnRNP A1 to a common ESS motif that spans the 3' splice site. *Hum. Mutat.* *32*, 220–230.
- Dollard, S.C., Grosse, S.D., and Ross, D.S. (2007). New estimates of the prevalence of neurological and sensory sequelae and mortality associated with congenital cytomegalovirus infection. *Rev. Med. Virol.* *17*, 355–363.
- Donnelly, R.P., and Kotenko, S.V. (2010). Interferon-lambda: a new addition to an old family. *J. Interferon Cytokine Res.* *30*, 555–564.
- Doukas, T., and Sarnow, P. (2011). Escape from Transcriptional Shutoff during Poliovirus Infection: NF- $\kappa$ B-Responsive Genes I $\kappa$ B $\alpha$  and A20. *J. Virol.* *85*, 10101–10108.
- Du, W., and Maniatis, T. (1992). An ATF/CREB binding site is required for virus induction of the human interferon beta gene. *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.
- Eksioglu, E.A., Zhu, H., Bayouth, L., Bess, J., Liu, H.-Y., Nelson, D.R., and Liu, C. (2011). Characterization of HCV interactions with Toll-like receptors and RIG-I in liver cells. *PLoS ONE* 6, e21186.
- Elinav, E., Strowig, T., Henao-Mejia, J., and Flavell, R.A. (2011). Regulation of the antimicrobial response by NLR proteins. *Immunity* 34, 665–679.
- Ellsmore, V., Reid, G.G., and Stow, N.D. (2003). Detection of human cytomegalovirus DNA replication in non-permissive Vero and 293 cells. *J. Gen. Virol.* 84, 639–645.
- Erkelenz, S., Mueller, W.F., Evans, M.S., Busch, A., Schöneweis, K., Hertel, K.J., and Schaal, H. (2013). Position-dependent splicing activation and repression by SR and hnRNP proteins rely on common mechanisms. *RNA* 19, 96–102.
- 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. *Curr. Biol.* 8, 223–226.
- Escalante, C.R., Nistal-Villán, E., Shen, L., García-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.
- Escalante, C.R., Shen, L., Thanos, D., and Aggarwal, A.K. (2002). Structure of NF-kappaB p50/p65 heterodimer bound to the PRDII DNA element from the interferon-beta promoter. *Structure* 10, 383–391.
- 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.
- Fensterl, V., and Sen, G.C. (2011). The ISG56/IFIT1 gene family. *J. Interferon Cytokine Res.* 31, 71–78.
- Fensterl, V., Wetzel, J.L., Ramachandran, S., Ogino, T., Stohlman, S.A., Bergmann, C.C., Diamond, M.S., Virgin, H.W., and Sen, G.C. (2012). Interferon-induced Ifit2/ISG54 protects mice from lethal VSV neuropathogenesis. *PLoS Pathog.* 8, e1002712.
- Fernandes-Alnemri, T., Yu, J.-W., Datta, P., Wu, J., and Alnemri, E.S. (2009). AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature* 458, 509–513.
- Fietze, E., Prösch, S., Reinke, P., Stein, J., Döcke, W.D., Staffa, G., Löning, S., Devaux, S., Emmrich, F., and Baehr, von, R. (1994). Cytomegalovirus infection in transplant recipients. The role of tumor necrosis factor. *Transplantation* 58, 675–680.

- Fliss, P.M., Jowers, T.P., Brinkmann, M.M., Holstermann, B., Mack, C., Dickinson, P., Hohenberg, H., Ghazal, P., and Brune, W. (2012). Viral Mediated Redirection of NEMO/IKK $\gamma$  to Autophagosomes Curtails the Inflammatory Cascade. *PLoS Pathog.* 8, e1002517.
- 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.
- Freund, M., Asang, C., Kammler, S., Konermann, C., Krummheuer, J.R., Hipp, M., Meyer, I., Gierling, W., Theiss, S., Preuss, T., et al. (2003). A novel approach to describe a U1 snRNA binding site. *Nucleic Acids Res.* 31, 6963–6975.
- Freund, M., Hicks, M.J., Konermann, C., Otte, M., Hertel, K.J., and Schaal, H. (2005). Extended base pair complementarity between U1 snRNA and the 5' splice site does not inhibit splicing in higher eukaryotes, but rather increases 5' splice site recognition. *Nucleic Acids Res.* 33, 5112–5119.
- Fu, X.-Y. (1992). A transcription factor with SH2 and SH3 domains is directly activated by an interferon  $\alpha$ -induced cytoplasmic protein tyrosine kinase(s). *Cell* 70, 323–335.
- Furtado, M.R., Balachandran, R., Gupta, P., and Wolinsky, S.M. (1991). Analysis of alternatively spliced human immunodeficiency virus type-1 mRNA species, one of which encodes a novel tat-env fusion protein. *Virology* 185, 258–270.
- Garcin, D., De Melo, M., Roux, L., Kolakofsky, D., and Curran, J. (1994). Presence of a truncated form of the Sendai virus P protein in a long-term persistent infection: implications for the maintenance of the persistent state. *Virology* 201, 19–25.
- Garneau, D., Revil, T., Fiset, J.-F., and Chabot, B. (2005). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F/H proteins modulate the alternative splicing of the apoptotic mediator Bcl-x. *J. Biol. Chem.* 280, 22641–22650.
- 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.
- Ghazal, P., Visser, A.E., Gustems, M., García, R., Borst, E.M., Sullivan, K., Messerle, M., and Angulo, A. (2005). Elimination of ie1 significantly attenuates murine cytomegalovirus virulence but does not alter replicative capacity in cell culture. *J. Virol.* 79, 7182–7194.
- 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.
- Goodbourn, S., and Maniatis, T. (1988). Overlapping positive and negative regulatory domains of the human beta-interferon gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 1447–1451.

- Goodpasture, E.W. (1921). Concerning the Nature of "Protozoan-Like" Cells in Certain Lesions of Infancy. *Arch Pediatr Adolesc Med* 21, 415–425.
- Goodrum, F., Reeves, M., Sinclair, J., High, K., and Shenk, T. (2007). Human cytomegalovirus sequences expressed in latently infected individuals promote a latent infection in vitro. *Blood* 110, 937–945.
- Grandvaux, N., Servant, M.J., tenOever, B., Sen, G.C., Balachandran, S., Barber, G.N., Lin, R., and Hiscott, J. (2002). Transcriptional profiling of interferon regulatory factor 3 target genes: direct involvement in the regulation of interferon-stimulated genes. *J. Virol.* 76, 5532–5539.
- Gray, P.W., Leong, S., Fennie, E.H., Farrar, M.A., Pingel, J.T., Fernandez-Luna, J., and Schreiber, R.D. (1989). Cloning and expression of the cDNA for the murine interferon gamma receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 8497–8501.
- Greaves, R.F., and Mocarski, E.S. (1997). 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.
- Gribaudo, G., Riera, L., Lembo, D., De Andrea, M., Gariglio, M., Rudge, T.L., Johnson, L.F., and Landolfo, S. (2000). Murine cytomegalovirus stimulates cellular thymidylate synthase gene expression in quiescent cells and requires the enzyme for replication. *J. Virol.* 74, 4979–4987.
- Grosso, A.R., Gomes, A.Q., Barbosa-Morais, N.L., Caldeira, S., Thorne, N.P., Grech, G., Lindern, von, M., and Carmo-Fonseca, M. (2008). Tissue-specific splicing factor gene expression signatures. *Nucleic Acids Res.* 36, 4823–4832.
- Grzimek, N.K.A., Dreis, D., Schmalz, S., and Reddehase, M.J. (2001). Random, asynchronous, and asymmetric transcriptional activity of enhancer-flanking major immediate-early genes ie1/3 and ie2 during murine cytomegalovirus latency in the lungs. *J. Virol.* 75, 2692–2705.
- Guo, J., and Sen, G.C. (2000). Characterization of the interaction between the interferon-induced protein P56 and the Int6 protein encoded by a locus of insertion of the mouse mammary tumor virus. *J. Virol.* 74, 1892–1899.
- Hakki, M., and Geballe, A.P. (2005). Double-stranded RNA binding by human cytomegalovirus pTRS1. *J. Virol.* 79, 7311–7318.
- Hakki, M., Marshall, E.E., De Niro, K.L., and Geballe, A.P. (2006). Binding and nuclear relocalization of protein kinase R by human cytomegalovirus TRS1. *J. Virol.* 80, 11817–11826.
- Hale, B.G., Randall, R.E., Ortín, J., and Jackson, D. (2008). The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *J. Gen. Virol.* 89, 2359–2376.
- Halenius, A., Hauka, S., Dölken, L., Stindt, J., Reinhard, H., Wiek, C., Hanenberg, H., Koszinowski, U.H., Momburg, F., and Hengel, H. (2011). Human cytomegalovirus disrupts the major histocompatibility complex class I peptide-loading complex and inhibits tapasin gene transcription. *J. Virol.* 85, 3473–3485.

- Halfmann, P., Neumann, G., and Kawaoka, Y. (2011). The Ebola virus VP24 protein blocks phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Infect. Dis.* 204 Suppl 3, S953–S956.
- Hallay, H., Locker, N., Ayadi, L., Ropers, D., Guittet, E., and Branlant, C. (2006). Biochemical and NMR study on the competition between proteins SC35, SRp40, and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 at the HIV-1 Tat exon 2 splicing site. *J. Biol. Chem.* 281, 37159–37174.
- Hanamura, A., Cáceres, J.F., Mayeda, A., Franza, B.R., and Krainer, A.R. (1998). Regulated tissue-specific expression of antagonistic pre-mRNA splicing factors. *RNA* 4, 430–444.
- Hastie, K.M., Kimberlin, C.R., Zandonatti, M.A., MacRae, I.J., and Saphire, E.O. (2011). Structure of the Lassa virus nucleoprotein reveals a dsRNA-specific 3' to 5' exonuclease activity essential for immune suppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 2396–2401.
- Hastings, M.L., Wilson, C.M., and Munroe, S.H. (2001). A purine-rich intronic element enhances alternative splicing of thyroid hormone receptor mRNA. *RNA* 7, 859–874.
- Hatton, R.D., Harrington, L.E., Luther, R.J., Wakefield, T., Janowski, K.M., Oliver, J.R., Lallone, R.L., Murphy, K.M., and Weaver, C.T. (2006). A distal conserved sequence element controls *lfn* gene expression by T cells and NK cells. *Immunity* 25, 717–729.
- Heider, J.A., Bresnahan, W.A., and Shenk, T.E. (2002). Construction of a rationally designed human cytomegalovirus variant encoding a temperature-sensitive immediate-early 2 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 3141–3146.
- Hemmi, S., Böhni, 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.
- Hemmi, S., Peghini, P., Metzler, M., Merlin, G., Dembić, Z., and Aguet, M. (1989). Cloning of murine interferon gamma receptor cDNA: expression in human cells mediates high-affinity binding but is not sufficient to confer sensitivity to murine interferon gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 9901–9905.
- Hengel, H., Brune, W., and Koszinowski, U. (1998). Immune evasion by cytomegalovirus-survival strategies of a highly adapted opportunist. *Trends Microbiol* 6, 190–197.
- Hengel, H., Koszinowski, U.H., and Conzelmann, K.-K. (2005). Viruses know it all: new insights into IFN networks. *Trends Immunol.* 26, 396–401.
- Hermiston, T.W., Malone, C.L., and Stinski, M.F. (1990). Human cytomegalovirus immediate-early two protein region involved in negative regulation of the major immediate-early promoter. *J. Virol.* 64, 3532–3536.
- Hertel, L., De Andrea, M., Azzimonti, B., Rolle, A., Gariglio, M., and Landolfo, S. (1999). The Interferon-Inducible 204 Gene, a Member of the *lfi* 200 Family, Is Not Involved in the Antiviral State Induction by IFN- $\alpha$ , but Is Required by the Mouse

Cytomegalovirus for Its Replication. *Virology* 262, 1–8.

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.

Hofmann, H., Flöss, S., and Stamminger, T. (2000). Covalent modification of the transactivator protein IE2-p86 of human cytomegalovirus by conjugation to the ubiquitin-homologous proteins SUMO-1 and hSMT3b. *J. Virol.* 74, 2510–2524.

Hollenbach, A.D., McPherson, C.J., Mientjes, E.J., Iyengar, R., and Grosveld, G. (2002). Daxx and histone deacetylase II associate with chromatin through an interaction with core histones and the chromatin-associated protein Dek. *J. Cell. Sci.* 115, 3319–3330.

Horton, P., Park, K.-J., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams-Collier, C.J., and Nakai, K. (2007). WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Res.* 35, W585–W587.

Hughes, S.S. (1977). *The virus: A history of the concept* (Heinemann Educational Books (London and New York)).

Huh, Y.H., Kim, Y.-E., Kim, E.T., Park, J.J., Song, M.J., Zhu, H., Hayward, G.S., and Ahn, J.-H. (2008). Binding STAT2 by the acidic domain of human cytomegalovirus IE1 promotes viral growth and is negatively regulated by SUMO. *J. Virol.* 82, 10444–10454.

Hui, D.J., Bhasker, C.R., Merrick, W.C., and Sen, G.C. (2003). Viral stress-inducible protein p56 inhibits translation by blocking the interaction of eIF3 with the ternary complex eIF2.GTP.Met-tRNA<sub>i</sub>. *J. Biol. Chem.* 278, 39477–39482.

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.

Improta, T., Schindler, C., Horvath, C.M., Kerr, I.M., Stark, G.R., and Darnell, J.E. (1994). Transcription factor ISGF-3 formation requires phosphorylated Stat91 protein, but Stat113 protein is phosphorylated independently of Stat91 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 4776–4780.

Intlekofer, A.M., Takemoto, N., Wherry, E.J., Longworth, S.A., Northrup, J.T., Palanivel, V.R., Mullen, A.C., Gasink, C.R., Kaech, S.M., Miller, J.D., et al. (2005). Effector and memory CD8<sup>+</sup> T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. *Nature Immunology* 6, 1236–1244.

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.

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

Ishov, A.M., Vladimirova, O.V., and Maul, G.G. (2004). Heterochromatin and ND10 are cell-cycle regulated and phosphorylation-dependent alternate nuclear sites of the transcription repressor Daxx and SWI/SNF protein ATRX. *J. Cell. Sci.* 117, 3807–3820.

Ivanovskij, D.I. (1882). *O dvuch boleznyach tabaka. Tabacnaja pepliza. Mozatcnaja bolezn' tabaka.* Sel'Skoje Chozaistvo I Lesovodstvo St. Petersburg 104–121.

Ivanovskij, D.I. (1903). *Über die Mosaikkrankheit der Tabakpflanze.* Zeitschrift Für Pflanzenkrankheiten 13, 1–41.

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.

Jacquet, S., Decimo, D., Muriaux, D., and Darlix, J.-L. (2005). Dual effect of the SR proteins ASF/SF2, SC35 and 9G8 on HIV-1 RNA splicing and virion production. *Retrovirology* 2:33.

Jarvis, M.A., and Nelson, J.A. (2007). Chapter 42 Molecular basis of persistence and latency. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, A. Arvin, G. Campadelli-Fiume, E. Mocarski, P.S. Moore, B. Roizman, R. Whitley, K. Yamanishi, M.A. Jarvis, and J.A. Nelson, eds. (Cambridge: Cambridge University Press).

Jenkins, C., Garcia, W., Godwin, M.J., Spencer, J.V., Stern, J.L., Abendroth, A., and Slobedman, B. (2008). Immunomodulatory properties of a viral homolog of human interleukin-10 expressed by human cytomegalovirus during the latent phase of infection. *J. Virol.* 82, 3736–3750.

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.

Jenkins, D.E., Martens, C.L., and Mocarski, E.S. (1994). Human cytomegalovirus late protein encoded by ie2: a trans-activator as well as a repressor of gene expression. *J. Gen. Virol.* 75, 2337–2348.

Jie, Z., Dinwiddie, D.L., Senft, A.P., and Harrod, K.S. (2011). Regulation of STAT signaling in mouse bone marrow derived dendritic cells by respiratory syncytial virus. *Virus Research* 156, 127–133.

Johnston, M.D. (1981). The characteristics required for a Sendai virus preparation to induce high levels of interferon in human lymphoblastoid cells. *J. Gen. Virol.* 56, 175–184.

Jonjic, S., Polić, B., and Krmpotić, A. (2008). Viral inhibitors of NKG2D ligands: friends or foes of immune surveillance? *Eur J Immunol* 38, 2952–2956.

- Jordan, S., Krause, J., Prager, A., Mitrovic, M., Jonjic, S., Koszinowski, U.H., and Adler, B. (2011). Virus progeny of murine cytomegalovirus bacterial artificial chromosome pSM3fr show reduced growth in salivary Glands due to a fixed mutation of MCK-2. *J. Virol.* *85*, 10346–10353.
- Jurica, M.S., and Moore, M.J. (2003). Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins. *Mol. Cell* *12*, 5–14.
- Kaiser, W.J., Upton, J.W., and Mocarski, E.S. (2008). Receptor-interacting protein homotypic interaction motif-dependent control of NF-kappa B activation via the DNA-dependent activator of IFN regulatory factors. *J. Immunol.* *181*, 6427–6434.
- Kamma, H., Portman, D.S., and Dreyfuss, G. (1995). Cell type-specific expression of hnRNP proteins. *Exp. Cell Res.* *221*, 187–196.
- Kammler, S., Leurs, C., Freund, M., Krummheuer, J., Seidel, K., Tange, T.O., Lund, M.K., Kjems, J., Scheid, A., and Schaal, H. (2001). The sequence complementarity between HIV-1 5' splice site SD4 and U1 snRNA determines the steady-state level of an unstable env pre-mRNA. *RNA* *7*, 421–434.
- Kanayama, A., Seth, R.B., Sun, L., Ea, C.-K., Hong, M., Shaito, A., Chiu, Y.-H., Deng, L., and Chen, Z.J. (2004). TAB2 and TAB3 activate the NF-kappaB pathway through binding to polyubiquitin chains. *Mol. Cell* *15*, 535–548.
- Kanopka, A., Mühlemann, O., and Akusjärvi, G. (1996). Inhibition by SR proteins of splicing of a regulated adenovirus pre-mRNA. *Nature* *381*, 535–538.
- Kari, B., and Gehrz, R. (1992). A human cytomegalovirus glycoprotein complex designated gC-II is a major heparin-binding component of the envelope. *J. Virol.* *66*, 1761–1764.
- Kari, B., and Gehrz, R. (1993). Structure, composition and heparin binding properties of a human cytomegalovirus glycoprotein complex designated gC-II. *J. Gen. Virol.* *74*, 255–264.
- Karin, M., and Ben-Neriah, Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu. Rev. Immunol.* *18*, 621–663.
- Kawai, T., and Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology* *11*, 373–384.
- 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. *Nature Immunology* *6*, 981–988.
- Keil, G.M., Ebeling-Keil, A., and Koszinowski, U.H. (1987a). Immediate-early genes of murine cytomegalovirus: location, transcripts, and translation products. *J. Virol.* *61*, 526–533.
- Keil, G.M., Ebeling-Keil, A., and Koszinowski, U.H. (1987b). Sequence and structural organization of murine cytomegalovirus immediate-early gene 1. *J. Virol.* *61*, 1901–1908.

- Kenneson, A., and Cannon, M.J. (2007). Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *Rev. Med. Virol.* *17*, 253–276.
- 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.
- Kerry, J.A., Sehgal, A., Barlow, S.W., Cavanaugh, V.J., Fish, K., Nelson, J.A., and Stenberg, R.M. (1995). Isolation and characterization of a low-abundance splice variant from the human cytomegalovirus major immediate-early gene region. *J. Virol.* *69*, 3868–3872.
- Khan, S., Zimmermann, A., Basler, M., Groettrup, M., and Hengel, H. (2004). A cytomegalovirus inhibitor of gamma interferon signaling controls immunoproteasome induction. *J. Virol.* *78*, 1831–1842.
- Kim, E.T., Kim, Y.-E., Huh, Y.H., and Ahn, J.-H. (2010). Role of noncovalent SUMO binding by the human cytomegalovirus IE2 transactivator in lytic growth. *J. Virol.* *84*, 8111–8123.
- Kim, Y.-M., Brinkmann, M.M., Paquet, M.-E., and Ploegh, H.L. (2008). UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes. *Nature* *452*, 234–238.
- Klucher, K.M., Sommer, M., Kadonaga, J.T., and Spector, D.H. (1993). In vivo and in vitro analysis of transcriptional activation mediated by the human cytomegalovirus major immediate-early proteins. *Mol. Cell. Biol.* *13*, 1238–1250.
- Kondo, K., Xu, J., and Mocarski, E.S. (1996). Human cytomegalovirus latent gene expression in granulocyte-macrophage progenitors in culture and in seropositive individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *93*, 11137–11142.
- 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.
- Kotenko, S.V., Gallagher, G., Baurin, V.V., Lewis-Antes, A., Shen, M., Shah, N.K., Langer, J.A., Sheikh, F., Dickensheets, H., and Donnelly, R.P. (2003). IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nature Immunology* *4*, 69–77.
- Krug, A., French, A.R., Barchet, W., Fischer, J.A.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.
- Kuenzel, S., Till, A., Winkler, M., Häslér, R., Lipinski, S., Jung, S., Grötzinger, J., Fickenscher, H., Schreiber, S., and Rosenstiel, P. (2010). The Nucleotide-Binding Oligomerization Domain-Like Receptor NLRC5 Is Involved in IFN-Dependent Antiviral Immune Responses. *The Journal of Immunology* *184*, 1990–2000.

- Kurz, S.K., and Reddehase, M.J. (1999). Patchwork pattern of transcriptional reactivation in the lungs indicates sequential checkpoints in the transition from murine cytomegalovirus latency to recurrence. *J. Virol.* 73, 8612–8622.
- Kurz, S.K., Rapp, M., Steffens, H.P., Grzimek, N.K., Schmalz, S., and Reddehase, M.J. (1999). Focal transcriptional activity of murine cytomegalovirus during latency in the lungs. *J. Virol.* 73, 482–494.
- Kyriakis, J.M., and Avruch, J. (2001). Mammalian Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Transduction Pathways Activated by Stress and Inflammation. *Physiological Reviews* 81, 807–869.
- la Grange, de, P., Gratadou, L., Delord, M., Dutertre, M., and Auboeuf, D. (2010). Splicing factor and exon profiling across human tissues. *Nucleic Acids Res.* 38, 2825–2838.
- Lacaze, P., Forster, T., Ross, A., Kerr, L.E., Salvo-Chirnside, E., Lisnic, V.J., López-Campos, G.H., García-Ramírez, J.J., Messerle, M., Trgovcich, J., et al. (2011). Temporal profiling of the coding and noncoding murine cytomegalovirus transcriptomes. *J. Virol.* 85, 6065–6076.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lai, K.-C., Chang, K.-W., Liu, C.-J., Kao, S.-Y., and Lee, T.-C. (2008). IFN-induced protein with tetratricopeptide repeats 2 inhibits migration activity and increases survival of oral squamous cell carcinoma. *Mol. Cancer Res.* 6, 1431–1439.
- Lang, T., Lo, C., Skinner, N., Locarnini, S., Visvanathan, K., and Mansell, A. (2011). The hepatitis B e antigen (HBeAg) targets and suppresses activation of the toll-like receptor signaling pathway. *J. Hepatol.* 55, 762–769.
- Lazzarini, R.A., Keene, J.D., and Schubert, M. (1981). The origins of defective interfering particles of the negative-strand RNA viruses. *Cell* 26, 145–154.
- Le, V.T.K., 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.K., 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.
- Lei, X., Sun, Z., Liu, X., Jin, Q., Bin He, and Wang, J. (2011). Cleavage of the adaptor protein TRIF by enterovirus 71 3C inhibits antiviral responses mediated by Toll-like receptor 3. *J. Virol.* 85, 8811–8818.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., and Hoffmann, J.A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86, 973–983.

- Lembo, D., and Brune, W. (2009). Tinkering with a viral ribonucleotide reductase. *Trends Biochem. Sci.* 34, 25–32.
- Lembo, D., Donalizio, M., Hofer, A., Cornaglia, M., Brune, W., Koszinowski, U., Thelander, L., and Landolfo, S. (2004). The ribonucleotide reductase R1 homolog of murine cytomegalovirus is not a functional enzyme subunit but is required for pathogenesis. *J. Virol.* 78, 4278–4288.
- Lenac, T., Arapović, J., Traven, L., Krmpotić, A., and Jonjic, S. (2008). Murine cytomegalovirus regulation of NKG2D ligands. *Med Microbiol Immunol* 197, 159–166.
- Levine, A.J., and Enquist, L.W. (2007). History of Virology. In *Fields' Virology* 5<sup>th</sup> Edition, D.M. Knipe, and P.M. Howley, eds. (Lippincott Williams & Wilkins), pp. 3–23.
- Levy, D., Lerner, A., Chaudhuri, A., Babiss, L.E., and Darnell, J.E. (1986). Interferon-stimulated transcription: isolation of an inducible gene and identification of its regulatory region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 8929–8933.
- Levy, D.E., and García-Sastre, A. (2001). The virus battles: IFN induction of the antiviral state and mechanisms of viral evasion. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 12, 143–156.
- Li, H., Leo, C., Zhu, J., Wu, X., O'Neil, J., Park, E.J., and Chen, J.D. (2000). Sequestration and inhibition of Daxx-mediated transcriptional repression by PML. *Mol. Cell. Biol.* 20, 1784–1796.
- Li, S., Min, J.-Y., Krug, R.M., and Sen, G.C. (2006). Binding of the influenza A virus NS1 protein to PKR mediates the inhibition of its activation by either PACT or double-stranded RNA. *Virology* 349, 13–21.
- Li, Y., Li, C., Xue, P., Zhong, B., Mao, A.-P., Ran, Y., Chen, H., Wang, Y.-Y., Yang, F., and Shu, H.-B. (2009). ISG56 is a negative-feedback regulator of virus-triggered signaling and cellular antiviral response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 7945–7950.
- Lin, R., Heylbroeck, C., Pitha, P.M., and Hiscott, J. (1998). Virus-dependent phosphorylation of the IRF-3 transcription factor regulates nuclear translocation, transactivation potential, and proteasome-mediated degradation. *Mol. Cell. Biol.* 18, 2986–2996.
- Liu, H., Deng, X., Shyu, Y.J., Li, J.J., Taparowsky, E.J., and Hu, C.-D. (2006). Mutual regulation of c-Jun and ATF2 by transcriptional activation and subcellular localization. *Embo J.* 25, 1058–1069.
- Llorian, M., Schwartz, S., Clark, T.A., Hollander, D., Tan, L.-Y., Spellman, R., Gordon, A., Schweitzer, A.C., la Grange, de, P., Ast, G., et al. (2010). Position-dependent alternative splicing activity revealed by global profiling of alternative splicing events regulated by PTB. *Nat Struct Mol Biol* 17, 1114–1123.
- Loeffler, F., and Frosch, P. (1897). *Berichte der Kommission zur Erforschung der Maul- und Klauenseuche bei dem Institut für Infektionskrankheiten in Berlin.* Zbl. Bakt. I Orig 257–259.

- Loewendorf, A., and Benedict, C.A. (2010). Modulation of host innate and adaptive immune defenses by cytomegalovirus: timing is everything. *J. Intern. Med.* 267, 483–501.
- Long, J.C., and Caceres, J.F. (2009). The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression. *Biochem. J.* 417, 15–27.
- Lou, Y.J., Pan, X.R., Jia, P.M., Li, D., Xiao, S., Zhang, Z.L., Chen, S.J., Chen, Z., and Tong, J.H. (2009). IFR-9/STAT2 Functional Interaction Drives Retinoic Acid-Induced Gene G Expression Independently of STAT1. *Cancer Research* 69, 3673–3680.
- Lucin, P., Jonjic, S., Messerle, M., Polic, B., Hengel, H., and Koszinowski, U.H. (1993). Late phase inhibition of murine cytomegalovirus replication by synergistic action of interferon-gamma and tumour necrosis factor. *J. Gen. Virol.* 75, 101–110.
- Ludwig, A., and Hengel, H. (2009). Epidemiological impact and disease burden of congenital cytomegalovirus infection in Europe. *Euro Surveill.* 14, 26–32.
- Ma, Y., Wang, N., Li, M., Gao, S., Wang, L., Zheng, B., Qi, Y., and Ruan, Q. (2012). Human CMV transcripts: an overview. *Future Microbiol* 7, 577–593.
- Mach, M., Kropff, B., Dal Monte, P., and Britt, W. (2000). Complex formation by human cytomegalovirus glycoproteins M (gpUL100) and N (gpUL73). *J. Virol.* 74, 11881–11892.
- Macias, M.P., Huang, L., Lashmit, P.E., and Stinski, M.F. (1996). Cellular or viral protein binding to a cytomegalovirus promoter transcription initiation site: effects on transcription. *J. Virol.* 70, 3628–3635.
- Mack, C., Sickmann, A., Lembo, D., and Brune, W. (2008). Inhibition of proinflammatory and innate immune signaling pathways by a cytomegalovirus RIP1-interacting protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 3094–3099.
- Magnus, von, P. (1951a). Propagation of the PR8 strain of influenza A virus in chick embryos. II. The formation of incomplete virus following inoculation of large doses of seed virus. *Acta Pathol Microbiol Scand* 28, 278–293.
- Magnus, von, P. (1951b). Propagation of the PR8 strain of influenza A virus in chick embryos. III. Properties of the incomplete virus produced in serial passages of undiluted virus. *Acta Pathol Microbiol Scand* 29, 157–181.
- Malone, C.L., Vesole, D.H., and Stinski, M.F. (1990). Transactivation of a human cytomegalovirus early promoter by gene products from the immediate-early gene IE2 and augmentation by IE1: mutational analysis of the viral proteins. *J. Virol.* 64, 1498–1506.
- Manning, W.C., and Mocarski, E.S. (1988). Insertional mutagenesis of the murine cytomegalovirus genome: one prominent alpha gene (ie2) is dispensable for growth. *Virology* 167, 477–484.
- Marchini, A., Liu, H., and Zhu, H. (2001). Human cytomegalovirus with IE-2 (UL122) deleted fails to express early lytic genes. *J. Virol.* 75, 1870–1878.

- 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.
- Marié, 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 J.* 17, 6660–6669.
- Marshall, B., Zhang, M., and Atherton, S.S. (2011). The effect of murine cytomegalovirus IE-3 specific shRNA is dependent on intragenic target site due to multiple transcription initiation sites. *Herpesviridae* 2:9.
- Martinez-Contreras, R., Cloutier, P., Shkreta, L., Fiset, J.-F., Revil, T., and Chabot, B. (2006). hnRNP proteins and splicing control. *Adv. Exp. Med. Biol.* 623, 123–147.
- Martínez, F.P., Cosme, R.S.C., and Tang, Q. (2010). Murine cytomegalovirus major immediate-early protein 3 interacts with cellular and viral proteins in viral DNA replication compartments and is important for early gene activation. *J. Gen. Virol.* 91, 2664–2676.
- Maul, G.G. (1998). Nuclear domain 10, the site of DNA virus transcription and replication. *Bioessays* 20, 660–667.
- Maul, G.G., and Negorev, D. (2008). Differences between mouse and human cytomegalovirus interactions with their respective hosts at immediate early times of the replication cycle. *Med Microbiol Immunol* 197, 241–249.
- Mayer, A. (1886). Über die Mosaikkrankheit des Tabaks. *Die Landwirtschaftlichen Versuchsstationen* 451–467.
- McGeoch, D.J., Dolan, A., and Ralph, A.C. (2000). Toward a comprehensive phylogeny for mammalian and avian herpesviruses. *J. Virol.* 74, 10401–10406.
- Merika, M., Williams, A.J., Chen, G., Collins, T., and Thanos, D. (1998). Recruitment of CBP/p300 by the IFN beta enhanceosome is required for synergistic activation of transcription. *Mol. Cell* 1, 277–287.
- Mescher, M.F., Curtsinger, J.M., Agarwal, P., Casey, K.A., Gerner, M., Hammerbeck, C.D., Popescu, F., and Xiao, Z. (2006). Signals required for programming effector and memory development by CD8+ T cells. *Immunol Rev* 211, 81–92.
- Messerle, M., Bühler, B., Keil, G.M., and Koszinowski, U.H. (1992). Structural organization, expression, and functional characterization of the murine cytomegalovirus immediate-early gene 3. *J. Virol.* 66, 27–36.
- 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.
- Messerle, M., Keil, G.M., and Koszinowski, U.H. (1991). Structure and expression of murine cytomegalovirus immediate-early gene 2. *J. Virol.* 65, 1638–1643.

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, W.J., 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., 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.

Min, H., Chan, R.C., and Black, D.L. (1995). The generally expressed hnRNP F is involved in a neural-specific pre-mRNA splicing event. *Genes Dev.* 9, 2659–2671.

Min, J.-Y., and Krug, R.M. (2006). The primary function of RNA binding by the influenza A virus NS1 protein in infected cells: Inhibiting the 2'-5' oligo (A) synthetase/RNase L pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 7100–7105.

Min, J.-Y., Li, S., Sen, G.C., and Krug, R.M. (2007). A site on the influenza A virus NS1 protein mediates both inhibition of PKR activation and temporal regulation of viral RNA synthesis. *Virology* 363, 236–243.

Misra, V., Muller, M.T., Chantler, J.K., and Hudson, J.B. (1978). Regulation of murine cytomegalovirus gene expression. I. Transcription during productive infection. *J. Virol.* 27, 263–268.

Mocarski, E.S., Shenk, T., and Pass, R.F. (2007). Cytomegaloviruses. In *Fields' Virology* 5<sup>th</sup> Edition, D.M. Knipe, and P.M. Howley, eds. (Lippincott Williams & Wilkins), pp. 2702–2773.

Modlin, J.F., Grant, P.E., Makar, R.S., Roberts, D.J., and Krishnamoorthy, K.S. (2003). Case 25-2003: A Newborn Boy with Petechiae and Thrombocytopenia. *N Engl J Med* 349, 691–700.

Moore, M.J. (2000). Intron recognition comes of AGE. *Nat Struct Mol Biol* 7, 14–16.

Mori, M., Yoneyama, M., Ito, T., Takahashi, K., Inagaki, F., and Fujita, T. (2004). Identification of Ser-386 of interferon regulatory factor 3 as critical target for inducible phosphorylation that determines activation. *J. Biol. Chem.* 279, 9698–9702.

Mount, S.M., Pettersson, I., Hinterberger, M., Karmas, A., and Steitz, J.A. (1983). The U1 small nuclear RNA-protein complex selectively binds a 5' splice site in vitro. *Cell* 33, 509–518.

Mukherjee, A., Morosky, S.A., Delorme-Axford, E., Dybdahl-Sissoko, N., Oberste, M.S., Wang, T., and Coyne, C.B. (2011). The coxsackievirus B 3C protease cleaves MAVS and TRIF to attenuate host type I interferon and apoptotic signaling. *PLoS Pathog.* 7, e1001311.

- Mullen, A.C., High, F.A., Hutchins, A.S., Lee, H.W., Villarino, A.V., Livingston, D.M., Kung, A.L., Cereb, N., Yao, T.P., Yang, S.Y., et al. (2001). Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection. *Science* 292, 1907–1910.
- 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.
- Murphy, E.A., Streblow, D.N., Nelson, J.A., and Stinski, M.F. (2000). The human cytomegalovirus IE86 protein can block cell cycle progression after inducing transition into the S phase of permissive cells. *J. Virol.* 74, 7108–7118.
- Murphy, K. (2011). *Janeway's Immunobiology* (Garland Science).
- Mutimer, D., Mirza, D., Shaw, J., O'Donnell, K., and Elias, E. (1997). Enhanced (cytomegalovirus) viral replication associated with septic bacterial complications in liver transplant recipients. *Transplantation* 63, 1411–1415.
- Mutocheluh, M., Hindle, L., Aresté, C., Chanas, S.A., Butler, L.M., Lowry, K., Shah, K., Evans, D.J., and Blackbourn, D.J. (2011). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus viral interferon regulatory factor-2 inhibits type 1 interferon signalling by targeting interferon-stimulated gene factor-3. *J. Gen. Virol.* 92, 2394–2398.
- Müller, M., Briscoe, J., Laxton, C., Guschin, D., Ziemiecki, A., Silvennoinen, O., Harpur, A.G., Barbieri, G., Witthuhn, B.A., and Schindler, C. (1993). The protein tyrosine kinase JAK1 complements defects in interferon-alpha/beta and -gamma signal transduction. *Nature* 366, 129–135.
- Münch, K., Bühler, B., Messerle, M., and Koszinowski, U.H. (1991). The core histone-binding region of the murine cytomegalovirus 89K immediate early protein. *J. Gen. Virol.* 72, 1967–1974.
- Münch, K., Keil, G.M., Messerle, M., and Koszinowski, U.H. (1988). Interaction of the 89K murine cytomegalovirus immediate-early protein with core histones. *Virology* 163, 405–412.
- Navarro, D., Paz, P., Tugizov, S., Topp, K., La Vail, J., and Pereira, L. (1993). Glycoprotein B of human cytomegalovirus promotes virion penetration into cells, transmission of infection from cell to cell, and fusion of infected cells. *Virology* 197, 143–158.
- Nevels, M., Paulus, C., and Shenk, T. (2004). Human cytomegalovirus immediate-early 1 protein facilitates viral replication by antagonizing histone deacetylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 17234–17239.
- Nigro, G. (2009). Maternal-fetal cytomegalovirus infection: from diagnosis to therapy. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* 22, 169–174.
- Nigro, G., Adler, S.P., La Torre, R., and Best, A.M. (2005). Passive Immunization during Pregnancy for Congenital Cytomegalovirus Infection. *N Engl J Med* 353, 1350–1362.

- Nigro, G., Adler, S.P., Parruti, G., Anceschi, M.M., Coclite, E., Pezone, I., and Di Renzo, G.C. (2012). Immunoglobulin therapy of fetal cytomegalovirus infection occurring in the first half of pregnancy—a case-control study of the outcome in children. *J. Infect. Dis.* 205, 215–227.
- Niikura, T., Hirata, R., and Weil, S.C. (1997). A novel interferon-inducible gene expressed during myeloid differentiation. *Blood Cells Mol. Dis.* 23, 337–349.
- Nilsen, T.W., and Baglioni, C. (1979). Mechanism for discrimination between viral and host mRNA in interferon-treated cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 2600–2604.
- Nomura, N., Miyajima, N., Sazuka, T., Tanaka, A., Kawarabayasi, Y., Sato, S., Nagase, T., Seki, N., Ishikawa, K., and Tabata, S. (1994). Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. I. The coding sequences of 40 new genes (KIAA0001-KIAA0040) deduced by analysis of randomly sampled cDNA clones from human immature myeloid cell line KG-1. *DNA Res.* 1, 27–35.
- Ogawa-Goto, K., Tanaka, K., Gibson, W., Moriishi, E., Miura, Y., Kurata, T., Irie, S., and Sata, T. (2003). Microtubule network facilitates nuclear targeting of human cytomegalovirus capsid. *J. Virol.* 77, 8541–8547.
- Okumura, A., Alce, T., Lubyova, B., Ezelle, H., Strebel, K., and Pitha, P.M. (2008). HIV-1 accessory proteins VPR and Vif modulate antiviral response by targeting IRF-3 for degradation. *Virology* 373, 85–97.
- Oldenburg, M., Krüger, A., Ferstl, R., Kaufmann, A., Nees, G., Sigmund, A., Bathke, B., Lauterbach, H., Suter, M., Dreher, S., et al. (2012). TLR13 recognizes bacterial 23S rRNA devoid of erythromycin resistance-forming modification. *Science* 337, 1111–1115.
- Ordureau, A., Smith, H., Windheim, M., Peggie, M., Carrick, E., Morrice, N., and Cohen, P. (2008). The IRAK-catalysed activation of the E3 ligase function of Pellino isoforms induces the Lys63-linked polyubiquitination of IRAK1. *Biochem. J.* 409, 43–52.
- Osborn, J.E., and Walker, D.L. (1968). Enhancement of infectivity of murine cytomegalovirus in vitro by centrifugal inoculation. *J. Virol.* 2, 853–858.
- Panne, D. (2008). The enhanceosome. *Current Opinion in Structural Biology* 18, 236–242.
- Panne, D., Maniatis, T., and Harrison, S.C. (2004). Crystal structure of ATF-2/c-Jun and IRF-3 bound to the interferon- $\beta$  enhancer. *Embo J.* 23, 4384–4393.
- 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.
- Pearce, E.L. (2003). Control of Effector CD8<sup>+</sup> T Cell Function by the Transcription Factor Eomesodermin. *Science* 302, 1041–1043.

Pellett, P.E., and Roizman, B. (2007). The Family *Herpesviridae*: A Brief Introduction. In *Fields' Virology* 5<sup>th</sup> Edition, D.M. Knipe, and P.M. Howley, eds. (Lippincott Williams & Wilkins), pp. 2479–2499.

Perdiguero, B., and Esteban, M. (2009). The interferon system and vaccinia virus evasion mechanisms. *J. Interferon Cytokine Res.* 29, 581–598.

Perez, K.J., Martínez, F.P., Cosme-Cruz, R., Perez-Crespo, N.M., and Tang, Q. (2013). A Short Cis-Acting Motif in the M112-113 Promoter Region Is Essential for IE3 To Activate M112-113 Gene Expression And Is Important for Murine Cytomegalovirus Replication. *J. Virol.* 87, 2639–2647.

Perrault, J. (1981). Origin and replication of defective interfering particles. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 93, 151–207.

Pestka, S. (1987). Interferons and their Actions. *Biochemistry* 56, 727–777.

Petrik, D.T., Schmitt, K.P., and Stinski, M.F. (2007). The autoregulatory and transactivating functions of the human cytomegalovirus IE86 protein use independent mechanisms for promoter binding. *J. Virol.* 81, 5807–5818.

Pichlmair, A., Lassnig, C., Eberle, C.-A., Gónna, M.W., Baumann, C.L., Burkard, T.R., Bürckstümmer, T., Stefanovic, A., Krieger, S., Bennett, K.L., et al. (2011). IFIT1 is an antiviral protein that recognizes 5'-triphosphate RNA. *Nature Immunology* 12, 624–630.

Pifer, R., Benson, A., Sturge, C.R., and Yarovinsky, F. (2011). UNC93B1 is essential for TLR11 activation and IL-12-dependent host resistance to *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* 286, 3307–3314.

Pizzorno, M.C., and Hayward, G.S. (1990). The IE2 gene products of human cytomegalovirus specifically down-regulate expression from the major immediate-early promoter through a target sequence located near the cap site. *J. Virol.* 64, 6154–6165.

Pizzorno, M.C., O'Hare, P., Sha, L., LaFemina, R.L., and Hayward, G.S. (1988). Trans-activation and autoregulation of gene expression by the immediate-early region 2 gene products of human cytomegalovirus. *J. Virol.* 62, 1167–1179.

Plachter, B., Britt, W., Vornhagen, R., Stamminger, T., and Jahn, G. (1993). Analysis of proteins encoded by IE regions 1 and 2 of human cytomegalovirus using monoclonal antibodies generated against recombinant antigens. *Virology* 193, 642–652.

Player, M.R., and Torrence, P.F. (1998). The 2-5A system: modulation of viral and cellular processes through acceleration of RNA degradation. *Pharmacol. Ther.* 78, 55–113.

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.

- Pozzoli, U., and Sironi, M. (2005). Silencers regulate both constitutive and alternative splicing events in mammals. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 1579–1604.
- 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.
- Prins, K.C., Cárdenas, W.B., and Basler, C.F. (2009). Ebola virus protein VP35 impairs the function of interferon regulatory factor-activating kinases IKKepsilon and TBK-1. *J. Virol.* 83, 3069–3077.
- Prösch, S., Wendt, C.E.C., Reinke, P., Priemer, C., Oppert, M., Krüger, D.H., Volk, H.D., and Döcke, W.D. (2000). A novel link between stress and human cytomegalovirus (HCMV) infection: sympathetic hyperactivity stimulates HCMV activation. *Virology* 272, 357–365.
- Purcell, D.F.J., and Martin, M.A. (1993). Alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 mRNA modulates viral protein expression, replication, and infectivity. *J. Virol.* 67, 6365–6378.
- Qi, J., Su, S., and Mattox, W. (2007). The doublesex splicing enhancer components Tra2 and Rbp1 also repress splicing through an intronic silencer. *Mol. Cell. Biol.* 27, 699–708.
- Qu, L., Feng, Z., Yamane, D., Liang, Y., Lanford, R.E., Li, K., and Lemon, S.M. (2011). Disruption of TLR3 signaling due to cleavage of TRIF by the hepatitis A virus protease-polymerase processing intermediate, 3CD. *PLoS Pathog.* 7, e1002169.
- 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.
- Rahav, G. (2007). Congenital cytomegalovirus infection—a question of screening. *Isr. Med. Assoc. J.* 9, 392–394.
- Rahighi, S., Ikeda, F., Kawasaki, M., Akutsu, M., Suzuki, N., Kato, R., Kensche, T., Uejima, T., Bloor, S., Komander, D., et al. (2009). Specific recognition of linear ubiquitin chains by NEMO is important for NF-kappaB activation. *Cell* 136, 1098–1109.
- Rathinam, V.A.K., Jiang, Z., Waggoner, S.N., Sharma, S., Cole, L.E., Waggoner, L., Vanaja, S.K., Monks, B.G., Ganesan, S., Latz, E., et al. (2010). The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses. *Nature Immunology* 11, 395–402.
- 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.

- Rebsamen, M., Heinz, L.X., Meylan, E., Michallet, M.-C., Schroder, K., Hofmann, K., Vazquez, J., Benedict, C.A., and Tschopp, J. (2009). DAI/ZBP1 recruits RIP1 and RIP3 through RIP homotypic interaction motifs to activate NF-kappaB. *EMBO Rep.* 10, 916–922.
- Reddehase, M.J., Weiland, F., Münch, K., Jonjic, S., Lüske, A., and Koszinowski, U.H. (1985). Interstitial murine cytomegalovirus pneumonia after irradiation: characterization of cells that limit viral replication during established infection of the lungs. *J. Virol.* 55, 264–273.
- Reed, W., Carroll, J., Agramonte, A., and Lazear, J.W. (1900). The etiology of yellow fever.- A preliminary note. *Public Health Pap Rep.* 26, 37–53.
- Reed, W., Carroll, J., and Agramonte, A. (1983). The etiology of yellow fever. An additional note. *Jama* 250, 649–658.
- Ren, J., Liu, T., Pang, L., Li, K., Garofalo, R.P., Casola, A., and Bao, X. (2011). A novel mechanism for the inhibition of interferon regulatory factor-3-dependent gene expression by human respiratory syncytial virus NS1 protein. *J. Gen. Virol.* 92, 2153–2159.
- Rengarajan, J., Szabo, S.J., and Glimcher, L.H. (2000). Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. *Immunol. Today* 21, 479–483.
- Ribbert, H. (1904). Ueber protozoenartige Zellen in der Niere eines syphilitischen Neugeborenen und in der Parotis von Kindern. *Zentralbl Allg Pathol* 15, 945–948.
- Riley, H.D. (1997). History of the cytomegalovirus. *South. Med. J.* 90, 184–190.
- Rivas, C., Gil, J., Mělková, Z., Esteban, M., and Díaz-Guerra, M. (1998). Vaccinia virus E3L protein is an inhibitor of the interferon (i.f.n.)-induced 2-5A synthetase enzyme. *Virology* 243, 406–414.
- Rodriguez-Martin, S., Kropp, K.A., Wilhelmi, V., Lisnic, V.J., Hsieh, W.Y., Blanc, M., Livingston, A., Busche, A., Tekotte, H., Messerle, M., et al. (2012). Ablation of the regulatory IE1 protein of murine cytomegalovirus alters in vivo pro-inflammatory TNF-alpha production during acute infection. *PLoS Pathog.* 8, e1002901.
- Rolle, S., De Andrea, M., Gioia, D., Lembo, D., Hertel, L., Landolfo, S., and Gariglio, M. (2001). The Interferon-Inducible 204 Gene Is Transcriptionally Activated by Mouse Cytomegalovirus and Is Required for Its Replication. *Virology* 286, 249-255.
- Romano, P.R., Zhang, F., Tan, S.-L., Garcia-Barrio, M.T., Katze, M.G., Dever, T.E., and Hinnebusch, A.G. (1998). Inhibition of Double-Stranded RNA-Dependent Protein Kinase PKR by Vaccinia Virus E3: Role of Complex Formation and the E3 N-Terminal Domain. *Mol. Cell. Biol.* 18, 7304–7316.
- 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.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual (Second Edition)* (Cold Spring Harbor Laboratory Pr).

Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001). *Molecular cloning. A Laboratory Manual (Third Edition)* (Cold Spring Harbor Laboratory Pr).

Samuel, C.E. (2001). Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* 14, 778–809.

Sarkar, S.N., and Sen, G.C. (2004). Novel functions of proteins encoded by viral stress-inducible genes. *Pharmacol. Ther.* 103, 245–259.

Schmeisser, H., Mejido, J., Balinsky, C.A., Morrow, A.N., Clark, C.R., Zhao, T., and Zoon, K.C. (2010). Identification of Alpha Interferon-Induced Genes Associated with Antiviral Activity in Daudi Cells and Characterization of IFIT3 as a Novel Antiviral Gene. *J. Virol.* 84, 10671–10680.

Schuhmann, K.M., Pfaller, C.K., and Conzelmann, K.-K. (2011). The measles virus V protein binds to p65 (RelA) to suppress NF-kappaB activity. *J. Virol.* 85, 3162–3171.

Seeler, J.S., Marchio, A., Sitterlin, D., Transy, C., and Dejean, A. (1998). Interaction of SP100 with HP1 proteins: a link between the promyelocytic leukemia-associated nuclear bodies and the chromatin compartment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 7316–7321.

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.

Shen, M., and Mattox, W. (2011). Activation and repression functions of an SR splicing regulator depend on exonic versus intronic-binding position. *Nucleic Acids Res.* 40, 428–437.

Sheppard, P., Kindsvogel, W., Xu, W., Henderson, K., Schlutsmeyer, S., Whitmore, T.E., Kuestner, R., Garrigues, U., Birks, C., Roraback, J., et al. (2003). IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nature Immunology* 4, 63–68.

Shirakata, M., Terauchi, M., Ablikim, M., Imadome, K.-I., Hirai, K., Aso, T., and Yamanashi, Y. (2002). Novel immediate-early protein IE19 of human cytomegalovirus activates the origin recognition complex I promoter in a cooperative manner with IE72. *J. Virol.* 76, 3158–3167.

Shnyreva, M., Weaver, W.M., Blanchette, M., Taylor, S.L., Tompa, M., Fitzpatrick, D.R., and Wilson, C.B. (2004). Evolutionarily conserved sequence elements that positively regulate IFN-gamma expression in T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 12622–12627.

Shuai, K., Stark, G.R., Kerr, I.M., and Darnell, J.E., Jr (1993a). A single phosphotyrosine residue of Stat91 required for gene activation by interferon. *Science* 261, 1744–1746.

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

- 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 Früh, 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.
- Sinclair, J. (2008). Manipulation of dendritic cell functions by human cytomegalovirus. *Expert Rev Mol Med* 10;e35.
- Smith, G.L. (1954). Propagation of salivary gland virus of the mouse in tissue cultures. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 86, 435–440.
- Smith, G.L. (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, G.L., and Vellios, F. (1950). Inclusion disease or generalized salivary gland virus infection. *AMA Arch Pathol* 50, 862–884.
- Smith, P.J., Zhang, C., Wang, J., Chew, S.L., Zhang, M.Q., and Krainer, A.R. (2006). An increased specificity score matrix for the prediction of SF2/ASF-specific exonic splicing enhancers. *Hum Mol Genet* 15, 2490–2508.
- Sodeik, B., Ebersold, M.W., and Helenius, A. (1997). Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J. Cell Biol.* 136, 1007–1021.
- Soroceanu, L., Akhavan, A., and Cobbs, C.S. (2008). Platelet-derived growth factor- $\alpha$  receptor activation is required for human cytomegalovirus infection. *Nature* 455, 391–395.
- Spector, D.H. (1996). Activation and regulation of human cytomegalovirus early genes. *Intervirology* 39, 361–377.
- Sprague, E.R., Reinhard, H., Cheung, E.J., Farley, A.H., Trujillo, R.D., Hengel, H., and Bjorkman, P.J. (2008). The human cytomegalovirus Fc receptor gp68 binds the Fc CH2-CH3 interface of immunoglobulin G. *J. Virol.* 82, 3490–3499.
- Stawowczyk, M., Van Scoy, S., Kumar, K.P., and Reich, N.C. (2011). The interferon stimulated gene 54 promotes apoptosis. *J. Biol. Chem.* 286, 7257–7266.
- Stenberg, R.M. (1996). The human cytomegalovirus major immediate-early gene. *Intervirology* 39, 343–349.
- Stenberg, R.M., Depto, A.S., Fortney, J., and Nelson, J.A. (1989). Regulated expression of early and late RNAs and proteins from the human cytomegalovirus immediate-early gene region. *J. Virol.* 63, 2699–2708.
- Stenberg, R.M., Fortney, J., Barlow, S.W., Magrane, B.P., Nelson, J.A., and Ghazal, P. (1990). Promoter-specific trans activation and repression by human cytomegalovirus immediate-early proteins involves common and unique protein domains. *J. Virol.* 64, 1556–1565.

- Stenberg, R.M., Thomsen, D.R., and Stinski, M.F. (1984). Structural analysis of the major immediate early gene of human cytomegalovirus. *J. Virol.* *49*, 190–199.
- Stenberg, R.M., Witte, P.R., and Stinski, M.F. (1985). Multiple spliced and unspliced transcripts from human cytomegalovirus immediate-early region 2 and evidence for a common initiation site within immediate-early region 1. *J. Virol.* *56*, 665–675.
- Stern-Ginossar, N., Weisburd, B., Michalski, A., Le, V.T.K., Hein, M.Y., Huang, S.-X., Ma, M., Shen, B., Qian, S.-B., Hengel, H., et al. (2012). Decoding human cytomegalovirus. *Science* *338*, 1088–1093.
- Stinski, M.F., Thomsen, D.R., Stenberg, R.M., and Goldstein, L.C. (1983). Organization and expression of the immediate early genes of human cytomegalovirus. *J. Virol.* *46*, 1–14.
- Stinski, M.F., and Isomura, H. (2007). Role of the cytomegalovirus major immediate early enhancer in acute infection and reactivation from latency. *Med Microbiol Immunol* *197*, 223–231.
- Strahle, L., Garcin, D., and Kolakofsky, D. (2006). Sendai virus defective-interfering genomes and the activation of interferon-beta. *Virology* *351*, 101–111.
- Symons, J.A., Alcamí, 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.
- Szabo, S.J., Kim, S.T., Costa, G.L., Zhang, X., Fathman, C.G., and Glimcher, L.H. (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* *100*, 655–669.
- Szabo, S.J., Sullivan, B.M., Stemmann, C., Satoskar, A.R., Sleckman, B.P., and Glimcher, L.H. (2002). Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells. *Science* *295*, 338–342.
- Tabeta, K., Georgel, P., Janssen, E., Du, X., Hoebe, K., Crozat, K., Mudd, S., Shamel, L., Sovath, S., Goode, J., et al. (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., et al. (2006). The Unc93b1 mutation 3d disrupts exogenous antigen presentation and signaling via Toll-like receptors 3, 7 and 9. *Nature Immunology* *7*, 156–164.
- Taguchi, T., Mitcham, J.L., Dower, S.K., Sims, J.E., and Testa, J.R. (1996). Chromosomal localization of TIL, a gene encoding a protein related to the Drosophila transmembrane receptor Toll, to human chromosome 4p14. *Genomics* *32*, 486–488.
- Takaoka, A., Hayakawa, S., Yanai, H., Stoiber, D., Negishi, H., Kikuchi, H., Sasaki, S., Imai, K., Shibue, T., Honda, K., et al. (2003). Integration of interferon-alpha/beta signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence. *Nature* *424*, 516–523.

- Takaoka, A., Wang, Z., Choi, M.K., Yanai, H., Negishi, H., Ban, T., Lu, Y., Miyagishi, M., Kodama, T., Honda, K., et al. (2007). DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature* *448*, 501–505.
- Takemoto, N., Intlekofer, A.M., Northrup, J.T., Wherry, E.J., and Reiner, S.L. (2006). Cutting Edge: IL-12 inversely regulates T-bet and eomesodermin expression during pathogen-induced CD8<sup>+</sup> T cell differentiation. *J. Immunol.* *177*, 7515–7519.
- Tamura, R., Kanda, T., Imazeki, F., Wu, S., Nakamoto, S., Tanaka, T., Arai, M., Fujiwara, K., Saito, K., Roger, T., et al. (2011). Hepatitis C Virus Nonstructural 5A Protein Inhibits Lipopolysaccharide-Mediated Apoptosis of Hepatocytes by Decreasing Expression of Toll-Like Receptor 4. *J. Infect. Dis.* *204*, 793–801.
- Tan, J.C.G., Avdic, S., Cao, J.Z., Mocarski, E.S., White, K.L., Abendroth, A., and Slobedman, B. (2011). Inhibition of 2',5'-oligoadenylate synthetase expression and function by the human cytomegalovirus ORF94 gene product. *J. Virol.* *85*, 5696–5700.
- 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.
- Tang, Q., Li, L., and Maul, G.G. (2005). Mouse cytomegalovirus early M112/113 proteins control the repressive effect of IE3 on the major immediate-early promoter. *J. Virol.* *79*, 257–263.
- Taylor, K.E., and Mossman, K.L. (2012). Recent advances in understanding viral evasion of type I interferon. *Immunology* *138*, 190–197.
- 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.
- 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.
- Thäle, 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.
- Tollervy, J.R., Curk, T., Rogelj, B., Briese, M., Cereda, M., Kayikci, M., König, J., Hortobágyi, T., Nishimura, A.L., Zupunski, V., et al. (2011). Characterizing the RNA targets and position-dependent splicing regulation by TDP-43. *Nat Neurosci* *14*, 452–458.

- Trilling, M., Le, V.T.K., and Hengel, H. (2012). Interplay between CMVs and interferon signaling: implications for pathogenesis and therapeutic intervention. *Future Microbiol* 7, 1269–1282.
- Trilling, M., Le, V.T.K., Fiedler, M., Zimmermann, A., Bleifuss, E., and Hengel, H. (2011). Identification of DNA-damage DNA-binding protein 1 as a conditional essential factor for cytomegalovirus replication in interferon- $\gamma$ -stimulated cells. *PLoS Pathog.* 7, e1002069.
- Ule, J., Stefani, G., Mele, A., Ruggiu, M., Wang, X., Taneri, B., Gaasterland, T., Blencowe, B.J., and Darnell, R.B. (2006). An RNA map predicting Nova-dependent splicing regulation. *Nature* 444, 580–586.
- Unterholzner, L., Keating, S.E., Baran, M., Horan, K.A., Jensen, S.B., Sharma, S., Sirois, C.M., Jin, T., Latz, E., Xiao, T.S., et al. (2010). IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. *Nature Immunology* 11, 997–1004.
- Upton, J.W., Kaiser, W.J., and Mocarski, E.S. (2008). Cytomegalovirus M45 cell death suppression requires receptor-interacting protein (RIP) homotypic interaction motif (RHIM)-dependent interaction with RIP1. *J. Biol. Chem.* 283, 16966–16970.
- Upton, J.W., Kaiser, W.J., and Mocarski, E.S. (2010). Virus inhibition of RIP3-dependent necrosis. *Cell Host Microbe* 7, 302–313.
- Upton, J.W., Kaiser, W.J., and Mocarski, E.S. (2012). DAI/ZBP1/DLM-1 complexes with RIP3 to mediate virus-induced programmed necrosis that is targeted by murine cytomegalovirus vIRA. *Cell Host Microbe* 11, 290–297.
- 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.
- van Dam, H., Wilhelm, D., Herr, I., Steffen, A., Herrlich, P., and Angel, P. (1995). ATF-2 is preferentially activated by stress-activated protein kinases to mediate c-jun induction in response to genotoxic agents. *Embo J.* 14, 1798–1811.
- Veals, S.A., Schindler, C., Leonard, D., Fu, X.Y., Aebersold, R., Darnell, J.E., 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.
- 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.
- Wahl, M.C., Will, C.L., and Lührmann, R. (2009). The Spliceosome: Design Principles of a Dynamic RNP Machine. *Cell* 136, 701–718.
- Walker, D., and Hudson, J. (1987). Analysis of immediate-early and early proteins of murine cytomegalovirus in permissive and nonpermissive cells. *Arch. Virol.* 92, 103–119.

- 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., 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, 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.
- 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. *Mol. Cell* **1**, 507–518.
- Wathelet, M., Moutschen, S., Defilippi, P., Cravador, A., Collet, M., Huez, G., and Content, J. (1986). Molecular cloning, full-length sequence and preliminary characterization of a 56-kDa protein induced by human interferons. *Eur. J. Biochem.* **155**, 11–17.
- Watling, D., Guschin, D., Müller, M., Silvennoinen, O., Witthuhn, B.A., Quelle, F.W., Rogers, N.C., Schindler, C., Stark, G.R., and Ihle, J.N. (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.
- Weller, T.H., Hanshaw, J.B., and Scott, D.E. (1960). Serologic differentiation of viruses responsible for cytomegalic inclusion disease. *Virology* **12**, 130–132.
- White, E.A., Clark, C.L., Sanchez, V., and Spector, D.H. (2004). Small internal deletions in the human cytomegalovirus IE2 gene result in nonviable recombinant viruses with differential defects in viral gene expression. *J. Virol.* **78**, 1817–1830.
- White, K.L., Slobedman, B., and Mocarski, E.S. (2000). Human cytomegalovirus latency-associated protein pORF94 is dispensable for productive and latent infection. *J. Virol.* **74**, 9333–9337.
- Wiebusch, L., and Hagemeier, C. (1999). Human cytomegalovirus 86-kilodalton IE2 protein blocks cell cycle progression in G1. *J. Virol.* **73**, 9274–9283.
- Wiebusch, L., Neuwirth, A., Grabenhenrich, L., Voigt, S., and Hagemeier, C. (2008). Cell cycle-independent expression of immediate-early gene 3 results in G1 and G2 arrest in murine cytomegalovirus-infected cells. *J. Virol.* **82**, 10188–10198.
- Wilkinson, G.W.G., Tomasec, P., Stanton, R.J., Armstrong, M., Prod'homme, V., Aicheler, R., McSharry, B.P., Rickards, C.R., Cochrane, D., Llewellyn-Lacey, S., et al. (2008). Modulation of natural killer cells by human cytomegalovirus. *J. Clin. Virol.* **41**, 206–212.

- 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.
- Wu, S., Romfo, C.M., Nilsen, T.W., and Green, M.R. (1999). Functional recognition of the 3' splice site AG by the splicing factor U2AF35. *Nature* *402*, 832–835.
- Wu, T.C., Fuentes-Bernardo, D.A., Chan, Y.J., Au, W.C., Chiou, C.J., Fox, W.M., Hruban, R.H., Hayward, G.S., and Kurman, R.J. (1997). Detection of the Human Cytomegalovirus 2.0-kb Immediate Early Gene 1 Transcripts in Permissive and Nonpermissive Infections by RNA in situ Hybridization. *J. Biomed. Sci.* *4*, 19–27.
- Xu, L.-G., Wang, Y.-Y., Han, K.-J., Li, L.-Y., Zhai, Z., and Shu, H.-B. (2005). VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Mol. Cell* *19*, 727–740.
- Xu, X., Fu, X.Y., Plate, J., and Chong, A.S. (1998). IFN-gamma induces cell growth inhibition by Fas-mediated apoptosis: requirement of STAT1 protein for up-regulation of Fas and FasL expression. *Cancer Research* *58*, 2832–2837.
- Xu, Y., Ahn, J.H., Cheng, M., apRhys, C.M., Chiou, C.J., Zong, J., Matunis, M.J., and Hayward, G.S. (2001). Proteasome-independent disruption of PML oncogenic domains (PODs), but not covalent modification by SUMO-1, is required for human cytomegalovirus immediate-early protein IE1 to inhibit PML-mediated transcriptional repression. *J. Virol.* *75*, 10683–10695.
- Yao, X.-D., and Rosenthal, K.L. (2011). Herpes simplex virus type 2 virion host shutoff protein suppresses innate dsRNA antiviral pathways in human vaginal epithelial cells. *J. Gen. Virol.* *92*, 1981–1993.
- Yarovinsky, F., Zhang, D., Andersen, J.F., Bannenberg, G.L., Serhan, C.N., Hayden, M.S., Hieny, S., Sutterwala, F.S., Flavell, R.A., Ghosh, S., et al. (2005). TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* *308*, 1626–1629.
- Yeo, G., and Burge, C.B. (2004). Maximum entropy modeling of short sequence motifs with applications to RNA splicing signals. *J Comput Biol* *11*, 377–394.
- Yie, J., Merika, M., Munshi, N., Chen, G., and Thanos, D. (1999). The role of HMG I(Y) in the assembly and function of the IFN-beta enhanceosome. *Embo J.* *18*, 3074–3089.
- Yoneyama, M., Suhara, W., Fukuhara, Y., Fukuda, M., Nishida, E., and Fujita, T. (1998). Direct triggering of the type I interferon system by virus infection: activation of a transcription factor complex containing IRF-3 and CBP/p300. *Embo J.* *17*, 1087–1095.
- Yu, X., Shah, S., Lee, M., Dai, W., Lo, P., Britt, W., Zhu, H., Liu, F., and Zhou, Z.H. (2011). Biochemical and structural characterization of the capsid-bound tegument proteins of human cytomegalovirus. *J. Struct. Biol.* *174*, 451–460.

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.

Zheng, W., and Flavell, R.A. (1997). The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* *89*, 587–596.

Zhu, H., Zheng, C., Xing, J., Wang, S., Li, S., Lin, R., and Mossman, K.L. (2011). Varicella-zoster virus immediate-early protein ORF61 abrogates the IRF3-mediated innate immune response through degradation of activated IRF3. *J. Virol.* *85*, 11079–11089.

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.

## Anhang

### Publikationen (mit eigener Beteiligung)

**Human SAP18 mediates assembly of a splicing regulatory multiprotein complex via its ubiquitin-like fold.**

Kusum K Singh, Steffen Erkelenz, **Stephanie Rattay**, Anna Katharina Dehof, Andreas Hildebrandt, Klaus Schulze-Osthoff, Heiner Schaal, and Christian Schwerk  
RNA, 2010, 16(12), p2442-2454

**The Canonical Immediate Early 3 Gene Product of Mouse Cytomegalovirus Is Dispensable for Viral Replication**

**Stephanie Rattay**, Mirko Trilling, Dominik Megger, Barbara Sitek, Hartmut Hengel, and Vu Thuy Khanh Le

Manuskript in Vorbereitung

**Inhibition of Cytomegalovirus Replication by Hydrophobic Bile Acid in Murine Hepatocytes**

Anna-Kathrin Schupp, Mirko Trilling, Vu Thuy Khanh Le, Katrin Haselow, **Stephanie Rattay**, Diran Herebian, Dieter Häussinger, Hartmut Hengel\*, and Dirk Graf\*

(\*gleichberechtigte Letztautorenschaft)

Manuskript in Vorbereitung

## Präsentationen

2009

### **Identification and Characterization of MCMV-encoded Interferon-Antagonists**

**Stephanie Rattay\***, Vu Thuy Khanh Le\*, Mirko Trilling, and Hartmut Hengel

(\*gleichberechtigte Erstautorenschaft)

8. Workshop des GFV-Arbeitskreises Immunbiologie und Virusinfektionen, Deidesheim, Deutschland, Vortrag

2010

### ***M82* and *UL82*, not two of a kind**

**Stephanie Rattay\***, Vu Thuy Khanh Le\*, and Hartmut Hengel

(\*gleichberechtigte Erstautorenschaft)

35<sup>th</sup> Annual International Herpesvirus Workshop, Salt Lake City, USA, Poster

2012

### **Identification and Characterization of new MCMV *ie3*-isoforms**

**Stephanie Rattay\***, Vu Thuy Khanh Le\*, Mirko Trilling, and Hartmut Hengel

(\*gleichberechtigte Erstautorenschaft)

VISTRIE Meeting 2012, Rabac, Kroatien, Vortrag

2013

### **Identification of new MCMV *ie3* splice variants enables targeted deletion and functional analysis of the canonical IE3 form during infection**

**Stephanie Rattay**, Mirko Trilling, Hartmut Hengel, and Vu Thuy Khanh Le (hat Vortrag gehalten)

23<sup>rd</sup> Annual Meeting of the Society for Virology, Kiel, Deutschland, Vortrag

### Danksagung

Danken möchte ich an dieser Stelle Prof. Dr. Hartmut Hengel, der mir die Arbeit an diesem interessanten Thema ermöglicht hat und mir dabei die Freiheit gegeben hat, eigene Ideen umzusetzen und mich als Wissenschaftlerin in seinem Labor zu entwickeln.

Außerdem möchte ich mich bei Prof. Dr. Michael Feldbrügge für die Betreuung und die Übernahme des Gutachtens seitens der Math.-Nat. Fakultät bedanken.

Bei meinen Mentoren Prof. Dr. Karl Sebastian Lang und Prof. Dr. Stefanie Scheu möchte ich mich für die konstruktiven und lebhaften Diskussionen bedanken.

Mein herzlicher Dank geht an Dr. Vu Thuy Khanh Le für ihre kritische Auseinandersetzung mit meiner Arbeit, ihre vielen wertvollen und wichtigen Hinweise und Ideen, ihre unglaubliche Hilfsbereitschaft und Ruhe, für das Heranführen an neue Methoden und das sorgfältige Korrekturlesen dieser Arbeit. Du hast eine tolle Balance zwischen Anleitung und Freiraum geschaffen und mir dadurch ein selbständiges Arbeiten, ohne dabei die Richtung zu verlieren, ermöglicht.

Des Weiteren möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. Mirko Trilling für seinen großen Vorrat an Wissen, seine vielen Ideen und Vorschläge und das sorgfältige Korrekturlesen bedanken. Du hast während der praktischen Phase meiner Doktorarbeit die Rolle des "skeptischen Lesers" übernommen, der das Haar in der Suppe sucht und auch findet, und hast dadurch sowohl mich als auch die Doktorarbeit vorangebracht.

Khanh und Mirko, ich danke Euch, dass ihr mir während meiner Zeit als Doktorandin beigebracht habt, kritisch zu sein, sowie effizient und zielorientiert zu arbeiten, ohne dabei den Spaß zu verlieren. Ihr seid immer ansprechbar gewesen und habt mich im richtigen Moment aufgemuntert und motiviert.

Mein Dank geht auch an Prof. Dr. Heiner Schaal, Dr. Steffen Erkelenz, Marek Widera und Jan Peter für die Beantwortung aller Fragen, die das Spleißen betreffen.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Heiner und Steffen für das Korrekturlesen der Spleiß-Abschnitte.

Außerdem danke ich der ganzen CMV-Arbeitsgruppe und der AG Schaal für eine tolle Arbeitsatmosphäre, in der das Lachen, das Kicker spielen und das Kuchen essen nicht zu kurz kam.

Besonderer Dank gebührt auch Menschen, die außerhalb des Instituts eine wichtige Rolle spielen.

Zuerst möchte ich mich herzlich bei meinem Mann Oliver für seine Liebe, seinen bedingungslosen Rückhalt, seine Geduld und für seine Wärme bedanken. Du machst mein Leben sehr glücklich!

Außerdem bedanke ich mich von Herzen bei meinen Eltern Paul und Susanne sowie bei meiner Schwester Manuela. Ihr seid immer für mich da und habt mich auf diesem manchmal steinigen Weg mit Rat und Tat begleitet. Ihr habt mir Flügel und Wurzeln verliehen, indem ihr mich einerseits ermuntert habt meinen Weg zu gehen und mir andererseits das Gefühl gegeben habt, jederzeit heimkommen zu können und unabhängig von dem Erreichten geliebt zu werden. Dieser Rückhalt hat mich sehr gestärkt.

Danken möchte ich auch meiner gesamten (Schwieger-)Familie für das füreinander da sein und das "zusammen sind wir stark"-Lebensgefühl, das ich auch fernab der Heimat spüre.

Abschließend möchte ich mich bei Stefan, Teresa, Sebastian, Marimba, Catriona, Marcel, Philius, Christian, Diana, Simon, Tatjana, Khanh, Mirko, Sebastian, Benny, Manu, Daniel und Eva für ihre Freundschaft und ihre Unterstützung bedanken. Mit Euch habe ich viele schöne Abende erlebt, lecker gegessen, Konzerte besucht, Ausflüge gemacht - kurzum eine tolle Zeit gehabt, die ich nicht missen möchte. Dafür danke ich Euch! Bei Teresa, Stefan, Marimba und Sebastian möchte ich mich außerdem für das sorgfältige Korrekturlesen bedanken.

## **Erklärung**

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Die Arbeit wurde bisher noch nicht anderweitig als Dissertation eingereicht oder veröffentlicht.

Düsseldorf, den

Stephanie Rattay