

Aus dem Labor für Pädiatrische Molekularbiologie der Klinik für Pädiatrie
mit Schwerpunkt Onkologie und Hämatologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Zellzykluskontrolle β -herpesviraler Kinasen

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Max Schmidt
aus Neubrandenburg (Mecklenburg)

Datum der Promotion: 17. September 2021

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1) Abkürzungsverzeichnis	1
2) Abbildungsverzeichnis	3
3) Kurzzusammenfassung	
a. Deutsch	4
b. Englisch (<i>abstract</i>)	5
4) Manteltext	
a. Einleitung	7
b. Methoden	11
c. Resultate	20
d. Diskussion	26
e. Klinische Bedeutung und Translation	30
f. Literaturverzeichnis	31
5) Eidesstattliche Versicherung	38
6) Ausführliche Anteilserklärung	39
7) Auszug aus der <i>Journal Summary List</i>	41
8) Publikation	42
9) Lebenslauf	56
10) Publikationsliste	57
11) Danksagung	59

1) Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung (<i>figure/ fig.</i>)
ACN	Acetonitril
AP	Affinitätsaufreinigung (<i>affinity purification</i>)
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	Bakteriell, artifizielles Chromosom
BSA	Bovines Serumalbumin
CAK	CDK-aktivierende Kinase
CDK	Cyclin abhängige Kinase (cyclin dependent kinase)
v-CDK	Virale CDK-ähnliche Kinasen
CHPK	Konservierte herpesvirale Proteinkinasen
CKI	CDK-Inhibitor
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DDR	DNA Schadensantwort (<i>DNA damage response</i>)
DMEM	Modifiziertes Eagle-Medium von Dulbecco
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EdU	5-Ethynyl-2'-deoxyuridin
FSC	Vorwärtsstreulicht (<i>forward scatter</i>)
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
HHV	Humanes Herpesvirus
HHV-1/ HSV-1	Humanes Herpesvirus I (Herpes simplex virus I/ labialis)
HHV-2/ HSV-2	Humanes Herpesvirus II (Herpes simplex virus II/ genitalis)

HHV-3/ VZV	Humanes Herpesvirus III (Varicella-Zoster-Virus)
HHV-4/ EBV	Humanes Herpesvirus IV (Ebstein-Barr Virus)
HHV-5/ HCMV	Humanes Herpesvirus V (Cytomegalievirus)
HHV-6 A/B	Humanes Herpesvirus VI (Roseolavirus)
HHV-7	Humanes Herpesvirus VII
HHV-8/ KSHV	Humanes Herpesvirus VIII (Karposi-Sarkom-Virus)
hpi	Stunden nach Infektion (<i>hours post infection</i>)
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
IP	Immunpräzipitation
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion
LC-MS/MS	Nanoskalige Flüssigkeitschromatographie mit gekoppelter Massenspektrometrie
MOI	Infektionsmultiplizität (<i>multiplicity of infection</i>)
NLS	Nukleäres Lokalisationssignal
OP	Originalpublikation
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SILAC	Stabile Isotopenmarkierung durch Aminosäuren in der Zellkultur (<i>stable isotope labeling by amino acids in cell culture</i>)
SSC	Seitwärtsstreulicht (<i>Side scatter</i>)
TCID50	Mediane infektiöse Gewebeskulturdosis (<i>tissue culture infective dose</i>)
TFA	Trifluoressigsäure

2) Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vergleichende, N-terminale AS-Sequenzdarstellung der CHPK von HHV-6/-7 sowie von Nagetiercytomegalieviren - Seite 22

Hinweis: Wo entsprechend gekennzeichnet, wird auf die Abbildungen der Originalpublikation (OP) verwiesen. Diese können unter Punkt 8 eingesehen werden.

3) Kurzzusammenfassung

a. Deutsch

Herpesviren sind Meister der Koevolution, welche vielfach Gene und Sequenzmotive ihres Wirtes entlehnen oder nachahmen, um zielgerichtet und effizient in zelluläre Prozesse einzugreifen. Die Phosphorylierung von Proteinen ist ein essenzieller Mechanismus der zellulären Signaltransduktion, der von Herpesviren in besonderem Maße genutzt wird. Alle acht bekannten humanpathogenen Herpesviren kodieren konservierte Proteinkinasen (CHPK), welche eine Vielzahl an Virus- und Wirtsproteinen phosphorylieren können und die eine Schlüsselrolle in der antiviralen Therapie spielen. Die CHPK der β - und γ -Herpesviren weisen strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten mit zellulären Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) auf. Im Unterschied zu CDK gelten die CHPK jedoch als konstitutiv aktiv, da ihnen die Sequenzabschnitte fehlen, welche wichtig für die Regulation durch Cycline oder CDK-Inhibitoren (CKI) sind.

Diese Arbeit versucht mit Hilfe quantitativer, proteomischer Analysen das zelluläre Interaktom klinisch relevanter CHPK aufzuschlüsseln, um Rückschlüsse auf ihre regulatorischen Funktionen zu ermöglichen. Dabei konnte gezeigt werden, dass allen analysierten CHPK die Interaktion mit zentralen Regulatoren der zellulären Transkription und Replikation gemein ist. Die β -herpesviralen Kinasen interagieren darüber hinaus mit Akteuren der Zellzykluskontrolle und des DNA-Schadens- und Reparaturkomplex. Insbesondere die Interaktion mit Cyclin A-CDK-Komplexen stellt eine spezifische Signatur der β -herpesviralen CHPK dar. In den nicht-katalytischen N-terminalen Domänen der CHPK aus den humanen Herpesviren 6 und 7 sowie aus Nagercytomegalieviren konnten ein hochkonserviertes RXL/Cy-Motiv identifiziert werden, das die Bindung an Cyclin A vermittelt. Dieses RXL/Cy-Motiv wurde in partieller Sequenzüberlappung mit einem ebenfalls konservierten nukleären Lokalisationsmotiv (NLS) vorgefunden. Mit Hilfe von Punktmutationen, welche spezifisch entweder die RXL- oder die NLS-Funktion ausschalten, konnten wir in einem auf murinen Cytomegalievirus (MCMV)-basierenden Infektionsmodell zeigen, dass sich Cyclin A-Bindung und NLS-Funktion der MCMV-Kinase M97 infolge kompetitiver Bindung gegenseitig ausschließen. So führt die virusinduzierte Cyclin A-Expression zu einer stöchiometrischen Komplexbildung von M97 und Cyclin A, einer daraus resultierenden Maskierung des M97-NLS und Umverteilung von M97 und

Cyclin A vom Zellkern in das Zytoplasma. Dieser Mechanismus ermöglicht einerseits einen dynamischen Wechsel der Lokalisation und des Substratspektrums der viralen Kinase, andererseits begründet der Entzug von Cyclin A aus dem Zellkern die virale Hemmung der zellulären DNA-Synthese. Somit führt die β -herpesvirale M97-Kinase sowohl CDK- wie auch CKI-typische Funktionen aus und trägt in der MCMV-Infektion deutlich zum Viruswachstum bei.

Diese Arbeit stellt die erste umfassende Analyse des Interaktoms der CHPK dar und unterstreicht ihre Bedeutung als zentrale Regulatoren der herpesviralen Infektion. Darüber hinaus konnte die physiologische Relevanz des komplexen Zusammenspiels zwischen einer viralen Kinase und Cyclin A gezeigt werden, einer essenziellen Komponente des Zellteilungszyklus.

b. Englisch (*abstract*)

Herpesviruses are masters of co-evolution, often borrowing or mimicking genes and sequence motifs from their hosts to efficiently interfere with cellular processes. Protein phosphorylation is an essential mechanism of cellular signal transduction, which is particularly exploited by herpesviruses. All eight known human pathogenic herpesviruses encode conserved protein kinases (CHPK), which can phosphorylate a variety of viral and host proteins and play an important role in antiviral therapy. The CHPK of β - and γ -herpesviruses share structural and functional similarities with cellular cyclin-dependent kinases (CDK). However, unlike CDK, CHPK are considered constitutively active because they lack sequence regions important for regulation by cyclins or CDK inhibitors (CKI).

This work attempts to use quantitative proteomic analyses to dissect the cellular interactome of clinically relevant CHPK to draw conclusions about their regulatory functions. All analyzed CHPK showed interactions with central regulators of cellular transcription and replication. The β -herpesviral kinases also interact with players in cell cycle control and the DNA damage and repair complex. Particularly, interaction with cyclin A-CDK complexes represents a specific signature of β -herpesviral CHPK. A highly conserved RXL/Cy motif mediating binding to cyclin A was identified in the non-catalytic N-terminal domains of CHPK from human herpesviruses 6 and 7 and from

rodent cytomegaloviruses. This RXL/Cy motif was found in partial sequence overlap with a nuclear localization motif (NLS) that was also conserved. Using point mutations that specifically disable either RXL or NLS function, we demonstrated in a murine cytomegalovirus (MCMV)-based infection model that cyclin A binding and NLS function of the MCMV kinase M97 are mutually exclusive as a result of competitive binding. Thus, virus-induced cyclin A expression leads to stoichiometric complex formation of M97 and cyclin A, the subsequent masking of the M97 NLS as well as redistribution of M97 and cyclin A from the nucleus to the cytoplasm. This mechanism allows a dynamic change in the localization and substrate spectrum of the viral kinase. Furthermore, the withdrawal of cyclin A from the nucleus establishes viral inhibition of cellular DNA synthesis. Thus, β -herpesviral M97 kinase performs both CDK- and CKI-annotated functions and contributes considerably to viral growth in MCMV infection.

This work represents the first comprehensive analysis of the interactome of CHPK and highlights their importance as key regulators of herpesviral infection. Furthermore, the physiological relevance of the complex interplay between a viral kinase and cyclin A, an essential component of the cell division cycle, was demonstrated.

4) Manteltext

a. Einleitung – Stand der Wissenschaft

Herpesviren sind als Pathogene omnipräsent. Dies zeigt sich unter anderem an den bislang über 100 isolierten herpesviralen Gattungen, die in der Natur beschrieben wurden (Davison, 2010). Unter den Humanpathogenen gehören die Vertreter der Familie der Herpesviren zu den am weitesten verbreiteten Viren weltweit – dies manifestiert sich sowohl im globalen Verteilungsmuster als auch im Durchseuchungsgrad der Bevölkerung (Bradley et al., 2014; Ludwig and Hengel, 2009; Malkin, 2004; Wen et al., 2018). Die Koevolution der Herpesviren mit ihren Wirtsorganismen reicht sehr weit zurück und hat eine Kospeziation zur Folge gehabt, die sich heute in den diversifizierten Herpesvirusgattungen mit ausgeprägten Wirts- als auch Gewebstropismen widerspiegelt.

Die acht bekannten, humanpathogenen Virusspezies lassen sich in drei Unterfamilien gliedern: neurotropische α -Herpesviren (HHV-1, -2, -3), breit infektiöse β -Herpesviren (HHV-5, -6, -7) und lymphotrope γ -Herpesviren (HHV-4, -8). Trotz der sehr variierenden klinischen Erscheinungsformen bei Erstinfektion, von schwer symptomatisch (z.B. HHV-3/ HHV-4) bis oligo- oder gar asymptomatisch (z.B. HHV-5, -6, -7) reichend, eint alle Herpesviren der latente Infektionsmodus. Im Gegensatz zur lytischen Infektion garantiert dieser eine niedrig replikative Persistenz der Herpesviren in Latenzorganen bzw. -geweben oft ein Wirtsleben lang (Cohen, 2020). Zumeist kommt es im Verlauf der latenten Infektion nur zu Reaktivierungen und symptomatischen Erkrankungen, wenn das Immunsystem des Wirts iatrogen, altersbedingt oder krankhaft geschwächt ist. Besondere Bedeutung fällt hier Patientenkollektiven unter antineoplastischer oder zytostatischer Behandlung sowie nach Transplantation zu, bei denen es zu klinisch schwer symptomatischen bis lethal-komplexen Verläufen kommen kann (Al Hamed et al., 2020; Ljungman, 2002; Ljungman et al., 2011; Sagedal et al., 2005; Uehara et al., 2020). Sowohl die lytische Erstinfektion, aber auch eine Reaktivierung der latenten Infektion können aufgrund der Plazentagängigkeit humaner Herpesviren zu schweren konnatalen Infektionssyndromen führen. Diese resultieren je nach Schwere und Zeitpunkt in der Schwangerschaft in Embryofetopathien, die in einen natürlichen Abort oder teils schweren physischen wie geistigen Einschränkungen des geborenen Kindes münden können (Ahn et al., 2016; Nahmias et al., 1971). Hierzu gehören im Falle des humanen

Cytomegalievirus (HCMV, HHV-5) beispielhaft Einschränkungen des ZNS wie ein Hydrozephalus oder die Mikrozephalie mit entsprechenden Folgen wie psychomotorischer Retardierung, Hör- wie auch Sehstörungen (Buxmann et al., 2017; Pass et al., 2006; Pereira et al., 2014).

Trotz ihrer unterschiedlichen Spezifika vereinen Herpesviren diverse Kerngene, welche gattungsübergreifend und teils familienumfassend konserviert sind. Man geht davon aus, dass das Genom des prä-evolutionären Ursprungsherpesvirus noch heute in ca. 43 Genen der modernen α -, β - und γ -Herpesviren wiederzufinden ist (McGeoch and Davison, 1999). So erscheinen essentielle Schritte der Virusbiologie wie der Eintritt in die Zelle, die DNA-Replikation, die Kapsidbildung sowie der Austritt des Virions seit Anbeginn hochkonserviert zu sein (Edward S. Mocarski Jr., 2007). Gerade Vertreter dieses Konservierungsclusters wie die virale DNA-Polymerase sind potente Ziele umfassender Therapiestrategien. Das konnte der nachhaltige Erfolg der virostatistischen Therapie mit dem Nukleosidanalogon Aciclovir seit der Einführung 1982 zeigen (Bryan-Marrugo et al., 2015). Später erfolgreich eingeführte, virostatistische Substanzen wie Ganciclovir und Foscarnet machen sich die gleichen Wirkprinzipien zunutze (Biron, 2006).

Einen weiteren Konservierungscluster findet man unter den konservierten herpesviralen Proteinkinasen (CHPK). Die acht humanpathogenen Herpesviren kodieren insgesamt 16 Kinasen. Acht hiervon – jeweils eine pro Virus – sind Serin/Threonin-Proteinkinasen, die untereinander eine bemerkenswerte Homologie sowohl in ihrer genomischen Position als auch in der Aminosäuresequenz ihrer katalytischen Domäne aufweisen (Kuny et al., 2010). CHPK teilen sich bedeutende, idente Eigenschaften wie die Autophosphorylierung, die Kernlokalisierung, die Beteiligung am Tegumentaufbau sowie die Phosphorylierung weiterer viraler, zellulärer und somit wirtsspezifischer Proteine (Gershburg and Pagano, 2008). Eine therapeutische Bedeutung wurde unter den CHPK bislang nur für die UL97-Kinase des Cytomegalievirus (HCMV, HHV-5) festgestellt. UL97 phosphoryliert als Kinase die *Prodrug*-Form des Nukleosidanalogons Ganciclovir und führt somit zu dessen pharmakologischer Aktivierung (Littler et al., 1992; Sullivan et al., 1992).

CHPK ähneln funktionell aufgrund ihres bisher bekannten Substratspektrums Cyclin abhängigen Kinasen (CDK). Beispielhaft sind bislang folgende gemeinsame Wirtssubstrate beschrieben worden:

- Elongationsfaktor EF-1 δ in HSV-1 UL13/ HCMV UL97/ EBV BGLF4 (Bellé et al., 1990; Kawaguchi et al., 1999, 1998)
- Lamin A/C in HCMV UL97 (Marschall et al., 2005; Peter et al., 1990)
- TIP60 und H2AX als Teil des DDR-Komplex in EBV BGLF4/ HCMV UL97/ KSHV ORF 36/ HSV-1 UL13 (Li et al., 2011; Maude and Enders, 2005; Tarakanova et al., 2007)
- pRB, SamHD1 und p27 in HCMV UL97 (Kuny et al., 2010)

Die Imitation CDK-typischer Funktionen durch die CHPK gewährleistet die Bereitstellung von dNTP als auch zellulären Replikationsfaktoren für die Virusreplikation und befördert den elementaren Austritt der Viruskapside aus dem Nucleus.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass CHPK und CDK fähig sind, gezielt die gleichen Aminosäuresequenzen auf Substratproteinen zu binden und zu phosphorylieren (Kawaguchi et al., 2003). Die funktionelle Homologie zwischen den CHPK und CDK scheint aber die α -herpesviralen Serin/Threonin-Proteinkinasen überwiegend auszusparen (Kuny et al., 2010). Hingegen führte die sowohl funktionelle wie auch strukturelle Homologie der β - und γ -herpesviralen Kinasen zur Beschreibung derselben als virale CDK-ähnliche Kinasen (v-CDK).

Dennoch fehlen den v-CDK im Gegensatz zu ihren zellulären Orthologen essenzielle Regulationsmerkmale. Weder das PSTAIRE-Cyclinbindemotiv noch die bekannten Motive zur Interaktion mit CDK-Inhibitoren (CKI) und CDK-aktivierenden Kinasen (CAK) oder mit p21 sind in den β - und γ -herpesviralen v-CDK konserviert (Kuny et al.). Somit kann sich das Virus unter Nutzung des vorteilhaften CDK-Substratspektrums den Kontrollmöglichkeiten seiner Wirtszelle effektiv entziehen. Dennoch zeigt das Beispiel von pUL97, dass CHPK weiterhin mit Cyclinen interagieren können (Steingruber et al., 2019).

CHPK werden zunehmend besser charakterisiert und verstanden. Neben einem gemeinsamen Substratspektrum und Motiven zur Substraterkennung sind ebenfalls

Kinase-unabhängige Funktionen als konserviert bekannt (Avey et al., 2016; Iwahori et al., 2015; Li et al., 2012; Prichard et al., 2008). Ein Beispiel hierfür ist die durch α - und β -herpesvirale CHPK vermittelte Zerstörung nukleärer Aggresome infizierter Zellen, wodurch ein Mechanismus der zellulären antiviralen Abwehr behindert wird (Prichard et al., 2008; Wileman, 2007).

Eine systematische und umfassende Erhebung CHPK-vermittelter Proteininteraktionen fehlte bislang, um weitere Funktionen dieser Kinasen entschlüsseln zu können. Die vorliegende Arbeit versucht anhand der ersten CHPK-übergreifenden Interaktomanalyse gemeinsame und spezifische Bindungspartner zu identifizieren. Unsere Daten bestärken die Ansicht, dass sich die CHPK zu einer multimodalen Drehscheibe für Proteininteraktionen entwickelt haben und auf Schlüsselregulatoren der DNA-Replikation, -Reparatur und Transkription einwirken. Neben der Bestätigung bereits bekannter Interaktoren gelingt es den Cyclin A-CDK2-Komplex als klassenspezifischen Bindungspartner der β -herpesviralen v-CDK zu identifizieren. Die nicht enzymatische Komplexierung der v-CDK mit Cyclin A führt zu deren zytoplasmatischer Retention, wodurch die zelluläre DNA-Replikation blockiert wird und es zu Alterationen im Substratspektrum der CHPK kommt.

b. Methoden

Zellkultur

Für die folgenden Experimente wurden HEK-293T-Zellen sowie NIH-3T3-Fibroblasten genutzt. Beide Zelllinien wurden in modifiziertem Eagle-Medium von Dulbecco (DMEM) kultiviert, dem 10% Fötale- (HEK-293T) bzw. Neugeborenen- (3T3) Rinderserum, 2 mM L-Alanyl-L-Glutamin, 100 U/ml-Penicillin und 100 µg/ml-Streptomycin hinzugefügt wurde. Zur Synchronisierung der Zellen in der quieszenten G₀/G₁-Phase im Rahmen der Zellzyklusanalysen erfolgte 48 h vor Infektion der Entzug von Wachstumsfaktoren durch Reduktion des Serumanteils im Medium auf 0,05 %. Die Zellen wurden in Inkubatoren bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Die Ernte der Zellen erfolgte durch Trypsin-vermitteltes Ablösen oder durch physisches Abschaben. Die Zellen wurden im Kulturüberstand aufgefangen und das Trypsin durch das verbliebene Serum inaktiviert. Gewaschen wurden die Zellen in PBS. Die Zellzählung erfolgte standardmäßig in der Neubauer-Zählkammer.

Für die massenspektrometrischen Analysen wurden ausschließlich zuvor SILAC-markierte Zellen genutzt. Hierzu sind die Zellen für fünf Passagen in Lysin- und Arginin-armen DMEM mit 10 % dialysiertem Serum (*Cut-off* 10 kDa) kultiviert worden. Weitere Zusätze waren 200 mg/L L-Prolin (nur Zellen für die Phosphoproteomanalyse), schwere (L-[¹³C₆,¹⁵N₂]-Lysin (Lys₈), L-[¹³C₆,¹⁵N₄]-Arginin (Arg₁₀)), mittlere (L-[²H₄]-Lysin (Lys₄), L-[¹³C₆]-Arginin (Arg₆)) oder leichte (natürliches Lysin (Lys₀) und Arginin (Arg₀)) Aminosäuren. Als Qualitätskontrolle wurde die Effizienz der SILAC-Markierung und der Arginin-Prolin-Umwandlung durch LC-MS/MS überprüft.

Viren, Virusmutanten und Infektion

Die in dieser Arbeit für die Infektionsexperimente genutzten Viren entsprechen dem murinen Cytomegalievirus (MCMV). Sie leiten sich aus dem MCMV-Stamm „*Smith*“ mit dem BAC pSM3fr-MCK-2fl66 ab. Aufgrund nachgewiesener Wachstumsdefekte dieses Stammes in-vivo in Folge einer Mutation des Chemokinhomologs MCK2 des m129-Gens wurde in einem ersten Schritt mittels BAC-Mutagenese der m129-Wildtyp rekonstituiert (Jordan et al., 2011; Stahl et al., 2015). Die BAC-Mutagenese ist ein etabliertes Verfahren zur Sequenzmodifikation unter Zuhilfenahme der Red-basierten

Rekombination und der I-SceI Endonuklease (Tischer et al., 2010). Hierfür wurde der E. coli-Stamm GS1783 mit einer induzierbaren Red- und I-SceI-Expression genutzt. So konnte primär ein N-terminaler *HA-tag* in das M97-Gen eingeführt werden. Konsekutiv erfolgte in MCMV-HA-M97 die Einführung folgender Mutationen das M97-Gen betreffend: K290Q (*kinase dead*), R45A/L47A (RXL→AXA), L47A/F49A (LXF→AXA) und M1STOP. Die hierfür genutzten Oligonukleotidprimer und die Auswertung der PCR-Sequenzierung zur Kontrolle sind den Angaben der Originalpublikation zu entnehmen (Bogdanow et al., 2020a). Die so erhaltenen Bacmide wurden zusammen mit dem pp71-Expressionsplasmid mittels Elektroporation in die 3T3-Fibroblasten transfiziert. Nachfolgend wurde daraus das Virus rekonstituiert und infektiöse Virusüberstände geerntet.

Die Virusinfektion wurde mit dem Verfahren der Zentrifugationsverstärkung (*spin oculation*) durchgeführt. Hierfür wurden nach der primären Virusadsorptionsdauer von 30 Minuten die Zellkulturen samt Inokulationsvolumen für 30 Minuten bei 1000 g zentrifugiert. Frisches Medium (10% Serum) ersetzte anschließend den virushaltigen Überstand, sodass mit der Infektion die Phase des Serumentzugs beendet wurde. Die Bestimmung der Virustiter erfolgte analog der TCID₅₀-Methode. Hierfür wurden 3T3-Fibroblasten in Triplikaten mit den jeweils verdünnten Virusüberständen nach obigem Ablauf infiziert. Mittels Durchflusszytometrie wurden 6 h nach Infektion die Population von IE1-positiven – somit infizierten – Zellen bestimmt. Der jeweilige Titer errechnete sich folglich aus der absoluten Zellzahl, der Verdünnungsstufe und dem Anteil infizierter (IE1-positiver) Zellen. Im Rahmen der weiteren Infektionsexperimente wurde eine Infektionsmultiplizität (MOI) von 5 IE1-formenden Einheiten (IU) auf eine gezählte Zelle verwendet. Bei den Infektionsexperimenten mit konsekutiver Zellzyklusanalyse wurde, wo angegeben, dem Nährmedium infizierter Zellen 50 µM Ganciclovir zugesetzt.

Plasmide

Es wurden PCGN-basierte Expressionsplasmide für HA-Markierungen bei HHV1-UL13, HHV3-ORF47, HHV4-BGLF4, HHV5-UL97, HHV6-U69, HHV7-U69 und HHV8-ORF36 genutzt. Als Expressionsplasmid für HA-markiertes M97 nutzten wir PCIneo-3HA-M97. Die gewünschten Mutationen wurden mittels PCR-Mutagenese eingeführt.

Die spezifischen Primer sind dem Anhang der Originalpublikation zu entnehmen. Die NLS-RXL/Cy-Doppelmotive von M97 und U69 wurden PCR basiert amplifiziert und zwischen NheI- und XbaI-Stellen von pHM830 kloniert. Die entstandenen Plasmide sind mittels Sanger-Sequenzierung kontrolliert und mittels Cäsiumchlorid-Ethidiumbromid-Gleichgewichtszentrifugation gereinigt worden. Für die Transfektion in HEK-293T-Zellen wurde PEI MAX (Polysciences) entsprechend den Herstellerangaben verwendet.

Proteinabundanzmessung und Fraktionierung

Zur Messung der Proteinabundanz in Proben aus Ganzzelllysaten oder Zellfraktionen erfolgte die Auftrennung und Vereinzelung der Proteine nach Größe (kDa) mittels Gelelektrophorese und anschließender Übertragung auf eine Membran entlang eines Spannungsgradienten (*Western Blotting*). Die Proteine auf der Membran konnten nach Inkubation mit den entsprechenden Antikörpern und wiederum deren Detektion durch sekundäre, *HRP*-gekoppelte Antikörper per Chemilumineszenz und Autoradiographie indirekt nachgewiesen werden.

Hierfür wurden die jeweiligen Zellen zunächst mittels Ultraschall-Sonizierung im Lysepuffer (50 mM Tris-Cl (pH 6,8), 2% SDS, 10% Glycerin, 1 mM DTT, 2 µg/mL Aprotinin, 10 µg/mL Leupeptin, 1 µM Pepstatin, 0,1 mM Pefabloc) lysiert. Die Proteinkonzentration des nach Zentrifugation verbliebenen Überstandes wurde mit dem Bio-Rad DC-Proteinassay (Verfahren nach Lowry) gemessen und die Lysate folgend äquibriert. Die jeweils gleiche Masse an Protein wurde mit 100 mM Dithiothreitol (DTT) und Bromphenolblau vermengt und 3 min bei 95°C gekocht.

Im Falle der subzellulären Fraktionierung in Zellkerne und Zytoplasma wurden die jeweiligen Zellen mittels Dounce-Homogenisierung in hypotonischem Puffer (10 mM Hepes (pH 8,0), 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,34 M Saccharose, 10% Glycerin, 0,1 mM DTT und Protease-Inhibitoren) lysiert. Das Lysat wurde bei niedriger Geschwindigkeit (4 min, 1300 g, 4 °C) zentrifugiert, sodass die Zellkerne als Pellet gesammelt werden konnten. Der Überstand mit dem Zytoplasmaextrakt wurde durch Hochgeschwindigkeitszentrifugation (15 min, 20.000 g, 4 °C) geklärt, bevor er

weiterverwendet wurde. Die Zellkernextrakte wurden wiederum einmal im hypotonen Puffer gewaschen und folgend im o.g. Lysepuffer soniziert.

Die Proteine der Lysate wurden durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (*SDS-PAGE*) aufgetrennt und folgend auf Polyvinylidenfluoridmembranen übertragen (*Blotting*). Die Membranen wurden in Tris-gepufferter Kochsalzlösung - 0,1% Tween-20 (TTBS) – ergänzt mit 5% Magermilch – inkubiert. Hiernach wurden die Blots in der gleichen Lösung unter Hinzunahme der jeweiligen Primärantikörper inkubiert. Abschließend erfolgte die Inkubation der Blots mit *HRP*-konjugierten Sekundärantikörpern und die Entwicklung mit Hilfe des Chemilumineszenz-Detektionssystem Super Signal West Dura (Thermo Fisher). Eine Übersicht der benutzten Primär- sowie Sekundärantikörper sind dem Anhang der Originalpublikation zu entnehmen (Bogdanow et al., 2020a). Die Antikörper wurden jeweils auf 1 µg/ml verdünnt genutzt.

Immunpräzipitation (IP)

Die Immunpräzipitation ist ein weit verbreitetes Verfahren. Es dient der affinitätsbasierten Aufreinigung von Proteinen oder Protein-Protein-Interaktionskomplexen mit Hilfe der Antigen-Antikörperbindung. Hierbei ködern und binden an feste Strukturen (*Beads* aus z.B. Agarose/ Sepharose) fixierte Antikörper oder Proteine ihre jeweiligen Antigene oder Interaktoren aus einer Probe heraus (z.B. Ganzzelllysate). Die Immunpräzipitate können anschließend mittels *SDS-PAGE* und *Western Blotting* analysiert werden.

Im Rahmen der Immunpräzipitation wurden die jeweiligen Zellen geerntet und in dem IP-Puffer (50 mM Tris-Cl pH 7,4, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM NaF, 0,5 mM Na₃VO₄, 0,5% Nonidet P-40, 10% Glycerin, 1 mM DTT, 2 µg/mL Aprotinin, 1 mM Leupeptin, 1 mM Pefabloc) durch aufeinanderfolgendes Einfrieren und Auftauen lysiert. Die Klärung der Ganzzelllysate erfolgte durch Zentrifugation bei 20.000 g. Die Extrakte wurden mit Cyclin A (H432) konjugierten Agarose-*Beads* inkubiert. Im Falle von HA-IP wurde das µMACS-HA-Isolationskit (Miltenyi Biotec) nach Herstellerangaben genutzt. Die Extrakte wurden hierfür mit HA-Antikörper (3F10) und

Protein G-konjugierten Agarose-Beads inkubiert. Der IP-Puffer wurde bei allen Schritten als Lyse- und Waschpuffer genutzt.

Kinase Assay

Die Methode basiert auf der Sichtbarmachung radioaktiv markierter Substrate bzw. Liganden von zu untersuchenden Proteinen auf lichtempfindlichen Filmen. Im Falle von Proteinkinasen eignet sich hierzu insbesondere radioaktiv markiertes ATP.

Für diese in-vitro-Analyse wurden zunächst HA-M97 Immunpräzipitate (s. Immunpräzipitation) aus infizierten Zellen gewonnen. Die Immunpräzipitate wurden mehrmals mit IP-Puffer und zweimal mit 20 mM Tris-Cl (pH 7,4), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT gewaschen. Anschließend folgte die Inkubation im Kinasereaktionspuffer (20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 10 mM β-Glycerophosphat, 50 μM ATP, 5 μCi [γ -³²P] ATP) bei 30°C unter ständigem Schütteln. Die Kinasereaktion im Sinne einer Substratbindung des radioaktiv markierten ATP wurde mittels 8% SDS-PAGE und folgender Autoradiographie untersucht.

Immunfluoreszenzmikroskopie

Um die zelluläre oder subzelluläre Lokalisation von Proteinen und deren Expression anschaulich zu analysieren, kann man die Immunfluoreszenzmikroskopie nutzen. Sie ist eine etablierte Weiterentwicklung der Lichtmikroskopie basierend auf der Färbung lebender oder fixierter Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen und fluoreszenzmarkierten Antikörpern.

3T3-Fibroblasten wurden hierfür auf Deckgläsern in Petrischalen gezüchtet und gemäß dem bereits beschriebenen Verfahren der Zentrifugationsverstärkung infiziert. Alle Waschschrte wurden mit PBS ausgeführt. Die EdU-Markierung erfolgte, indem die Zellen für 30 min mit 10 μM 5-Ethynyl-2'-Deoxyuridin (EdU) inkubiert wurden. Es folgte die Fixierung der Zellen für 10 min in PBS-4% Paraformaldehyd-Lösung. Nach einem Waschschrte wurden die Zellen in PBS-T-Permeabilisierungslösung inkubiert

(PBS, 0,1% Triton X-100, 0,05% Tween 20 und 2% Rinderserumalbumin (BSA)-Fraktion V/ PBS-T-Blockierungslösung). Das eingebrachte EdU wurde durch das Click-iT EdU-Markierungskit (Thermo Fisher) mit dem Fluorophor Alexa-Fluor-488 gemäß Herstellerangaben konjugiert. Die Inkubation mit den folgenden Primärantikörpern erfolgte über Nacht im Kühlraum bei 4°C: Anti-HA (Klon 3F10) oder Anti-M57 (Klon M57.02) - jeweils auf 1 µg/mL in PBS-T mit 2% BSA verdünnt. Nach dem Waschen wurden die Proben mit folgenden Sekundärantikörpern bei Raumtemperatur für 1h inkubiert: anti-IgG Antikörper mit den Fluorophoren Alexa-Fluor-488 oder -647. Nach einem letzten Waschschrift wurden die Deckgläser mit der zellbewachsenen Seite nach unten auf ein Glasobjektträger in 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) enthaltenem Fluoromount-G-Medium für die mikroskopische Analyse platziert. Die Bilddaten wurden mit einem Eclipse A1 Laser-Scanning-Mikroskop unter Verwendung der dazugehörigen NIS-Elements-Software (Nikon Instruments) gewonnen. Hierfür wurden nach initialer Adjustierung stets die gleichen Mikroskopeinstellungen und Belichtungszeiten genutzt.

Durchflusszytometrie

Virustiter, Viruswachstumskurven sowie Zellzyklusanalysen wurden durch Färbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern oder Fluoreszenzfarbstoffen mittels Durchflusszytometrie mit einem FACS Canto II-Gerät bestimmt. Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um ein etabliertes Verfahren. Hierbei passieren die markierten Zellen einer Probe nach ihrer Vereinzelung verschiedene voreingestellte Laser, die die Fluoreszenzmarker zur Emission elektromagnetischer Signale anregen. Diese werden zur zielgerichteten Detektion konsekutiv durch ein elaboriertes System aus Spiegeln und Filtern geleitet. Einer möglichen spektralen Überlappung der unterschiedlichen Signale wird durch präventive Vorauswahl verschiedener Fluorophore oder durch Signalkompensation der einzelnen Kanäle entgegengewirkt.

Die jeweiligen Zellen wurden geerntet, in PBS gewaschen und in eiskaltem PBS-80% Ethanol über Nacht fixiert sowie permeabilisiert. Nach einem Waschschrift mit PBS-1% BSA-Lösung, die gleichzeitig zur Blockade unspezifischer Proteinbindungen

diente, folgte die Inkubation über Nacht auf Eis mit einem der folgenden Primärantikörper: anti-IE1 (Klon Croma 101) oder anti-M57 (Klon M57.02) jeweils auf 1 µg/mL in PBS-1% BSA verdünnt. Nach dem Waschen wurden die Zellen in dem anti-Maus-IgG Antikörper, der mit dem Fluorophor Alexa-Fluor-647 konjugiert ist, für mindestens 1 h bei 25 °C inkubiert. Nach einem letzten Waschschritt wurden die Zellen final in PBS mit 0,1 mg/mL RNase A und 25 µg/mL Propidiumiodid resuspendiert und mussten für mindestens 15 min bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubieren bis zu der sich zeitnah anschließenden Messung. Die durchflusszytometrische Messung wurde durch die FACSDiva- und CellQuestPro-Software (jeweils Becton Dickinson) unterstützt. Die *Gating*-Strategie stellte sich wie folgt dar: Zunächst wurde ein Punktdiagramm (*dot-plot*) angelegt, das linear die Vorwärts- (FSC) und Seitwärtslichtstreuung (SSC) der vermessenen Partikel anzeigt. Zum Ausschluss von Zelldetritus wurden jeweils entsprechende Schwellwerte festgelegt. Darüber hinaus wurde ein Bereich definiert, der weitere geschädigte Zellen oder Zellaggregate ausschließt. Diese Subpopulation wurde mit Hilfe des Propidiumiodid-Fluoreszenzsignals weiter beschnitten, um Zelldoubletten auszuschließen. Diese von Zelldoubletten bereinigte Subpopulation wurde basierend auf dem Alexa-Fluor-647-Fluoreszenzsignal der IE-1 Immunfärbung weiter spezifiziert, sodass nicht infizierte Zellen ausgegrenzt werden konnten. Diese bereinigte, eingegrenzte Zellpopulation wurde wiederum auf ihre Propidiumiodid-Fluoreszenz untersucht. Hierbei konnten DNA-Histogramme zur Darstellung des DNA-Gehalts in infizierten Zellen gewonnen werden.

Im Falle der Virustitration wurde analog der obigen Beschreibung der Anteil an IE1-gekoppeltem Alexa-Fluor-647-Fluoreszenzsignal an der Gesamtpartikelzahl gemessen. Anhand der TCID50-Methode modifiziert nach Spearman/ Kärber (Lei et al., 2020) konnten dann die Virustiter bestimmt werden.

Massenspektrometrische Interaktom- und Phosphoproteomanalysen

Hinweis: Dieser Teil der methodischen Arbeit wurde freundlicherweise durch den Kooperationspartner und meinen Co-Erstautor Boris Bogdanow unter Leitung von Mathias Selbach praktisch ausgeführt. Dies ist aufgrund der

Interdisziplinarität der Arbeit ein wichtiger Bestandteil derselben und wird deshalb hier aufgeführt. Die folgenden MS-Methoden entsprechen einer simplifizierten Beschreibung. Für weitere Details wird auf die Originalpublikation (Bogdanow et al., 2020b) verwiesen.

- Aufbereitung für die Affinitätsaufreinigung im Rahmen der Interaktomanalyse

Im Falle der M97-Interaktomanalyse wurden die Zellen 12 h sowie 36 h nach MCMV-Infektion und im Fall der CHPK-Interaktomanalyse 24 h nach Transfektion durch Abschaben in PBS geerntet sowie gewaschen. Es folgte die Zentrifugation, um die somit abgetrennten Zellen in einem AP-Lysepuffer zu lysieren (25 mM Tris-HCl (pH 7,4), 125 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1% Nonidet P-40, 0,1% SDS, 5% Glycerin, 1 mM DTT, 2 µg/mL Aprotinin, 10 µg/mL Leupeptin, 1 µM Pepstatin, 0,1 mM Pefabloc). Sowohl die Lysereaktion als auch folgende Schritte erfolgten unter Kühlung auf Eis oder in einem entsprechenden Kühlraum, sofern nicht anders angegeben. Zur Aufreinigung der HA-markierten Kinasen und ihrer Interaktoren aus dem Lysat wurde das µMACS HA-Isolierungskit (Miltenyi Biotec) gemäß Herstellerangaben genutzt. Dabei wurde das Protokoll in folgenden drei Punkten abgeändert:

1) Die Ganzzelllysate wurden für 1 h in einer Lösung mit magnetischen Beads inkubiert.

2) Vor dem Auftragen auf die Säule wurden entsprechend ihrer SILAC-Markierung die Lysatproben gepoolt.

3) Die aufgetragenen Proben wurden erst in dem AP-Lysepuffer gewaschen, gefolgt von dem detergentenbefreiten AP-Lysepuffer und zuletzt in 25 mM Tris-HCl (pH 7,4).

Die Elution aus der Säule erfolgte in 8 M Guanidinhydrochlorid bei 95°C. Das in den Eluaten verbliebene Protein wurde mittels LiChrosolv Ethanol und GlycoBlue ausgefällt, durch Zentrifugation abgetrennt und in 6 M Harnstoff-2 M Thioharnstoff-Puffer gelöst. Anschließend folgte die Reduktion in 10 mM Dithiothreitol (DTT) und die Alkylierung in 50 mM Iodoacetamid. Die Proben wurden in zwei aufeinanderfolgenden Schritten verdaut. Hierzu erfolgte zuerst die Inkubation in Lysyl-Endopeptidase (Wako Pure Chemicals) über 3 h, gefolgt von dem Verdau in modifiziertem Trypsin (Promega)

über 16 h. Durch Hinzugabe von Trifluoressigsäure wurde die enzymatische Reaktion durch Ansäuerung abgebremst. Die Entsalzung vor der MS-Analyse erfolgte unter Verwendung spezieller, mit C18-Harz beschichteter Probengefäße.

- Anreicherung von Phosphopeptiden für die Phosphoproteomanalyse

Die zuvor SILAC-markierten Zellen wurden 24 h nach MCMV-Infektion durch Abschaben in PBS geerntet und gewaschen. Das nach Zentrifugation verbliebene Zellpellet wurde in 6 M Harnstoff-2 M Thioharnstoff-0,1 M Tris-HCl (pH 8,0) auf Eis gekühlt lysiert. Anschließend wurden die Proben reduziert, alkyliert, verdaut und entsalzen analog der Aufbereitung für die Affinitätsreinigung (s. oben). Nach Entsalzung und Elution in einem Ladepuffer aus 80% Acetonitril (ACN) und 6% TFA (vol/vol) wurden die Phosphopeptide mittels Zentrifugation auf mit TiO₂-Partikeln bepackten Mikrosäulenspitzen (Titansphere microcolumns, GL Sciences) geladen. Die so gebundenen Phosphopeptide wurden mit 5% Ammoniumhydroxid und 5% Piperidin eluiert sowie in 20 – 100% Ameisensäure angesäuert.

- Massenspektrometrie

Für diese Arbeit wurde die nanoskalige Flüssigkeitschromatographie mit gekoppelter Massenspektrometrie verwendet. Hierbei wird durch die Flüssigkeitschromatographie die sequenzielle Auftrennung der (Phospho-) Peptide erreicht, die dann mittels Massenspektrometrie quantifiziert und bestimmt werden können. Die aufbereiteten (Phospho-) Peptide wurden hierfür auf eine hochauflösende C18-MonoCap Säule (GL Sciences) geladen und in Folge aufgetrennt sowie vermessen. Standardisiert für die jeweilige Anwendung variierten die Flussraten (250 – 300 nl/min), die Injektionszeit (10 – 160 ms) und die Auflösung (17.500 – 70.000) mit den entsprechenden Zielwerten (1 x 10⁵ – 5 x 10⁵ Ionen). Die gewonnenen Rohdaten wurden in die MaxQuant-Software (Versionen: 1.5.2.8; 1.6.0.1) zur weiteren Analyse eingespeist. Im Falle der Interaktom- und Phosphoproteomanalyse der M97-Kinase in MCMV infizierten 3T3-Fibroblasten wurden anreichernde Signale gegen Proteindatenbanken von *Mus musculus* (Uniprot-Datenbank) und des MCMV-Stamms *Smith* abgeglichen. Für die Interaktomanalyse der CHPK in transfizierten HEK-293T-Zellen wurde gegen Datenbanken humaner Proteine (Uniprot-Datenbank) sowie die Sequenzen der CHPK abgeglichen.

c. Ergebnisse

Folgend sind in knapper Form die wesentlichen neuen Erkenntnisse der Arbeit aufgeführt (Bogdanow et al., 2020b). Wo indiziert, wird auf Abbildungen der Originalpublikation (OP) verwiesen.

Interaktome der CHPK umfassen Schlüsselregulatoren der Transkription und Replikation

Zur Identifikation des in-vitro Interaktoms der CHPK von sieben humanpathogenen Herpesviren mit Hilfe der LC-MS/MS wurden SILAC-markierte und mit den entsprechenden HA-markierten Kinasen transfizierte HEK-293T-Zellen nach HA-Affinitätsreinigung analysiert (Fig.1a, OP). Hierbei wurden ca. 2.000 Proteine gefunden, von denen 135 Proteine als aussichtsreiche Interaktionskandidaten eingestuft wurden. Unter anderem handelte es sich hierbei um bereits zuvor identifizierte Interaktoren einzelner CHPK wie SAMHD1 (Zhang et al., 2019), RBL2 (Iwahori et al., 2017), PPP2CA, PUM1 und PRDX1 (Li et al., 2011) sowie Substrate wie NUMA1, TUBA1B, MAP7D1 (Umaña et al., 2018). Mit allen untersuchten Kinasen präzipitierend zeigten sich CCT (*chaperonin containing TCP1*) sowie der Kinasereifungskomplex (CDC37, HSP90), welche bereits in früheren Arbeiten beschrieben wurden (Schulman et al., 1998; Sun et al., 2013) (Fig.1c, OP).

Bei der Anreicherungsanalyse der Subgruppen zeigten sich Cluster im Bereich verschiedener Replikationsregulatoren. Beispielhaft reicherten sich gemeinsam mit der Kinase BGLF4 des Epstein-Barr-Virus der DNA-Replikation (HERC2, E4F1, PCNA, SSBP1) und Chromatin-Regulierung (SMCHD1, CABIN1, HIRA, BEND3) zugeordnete Proteine an. Funktionell an der Transkriptionsregulation beteiligte Proteine wie PHC2, RING1, CBX4, TRIM28, ZNF136 und ZNF791 verhielten sich gegenüber der vom HCMV kodierten Kinase UL97 ähnlich. Die hier ebenso anreichernden Transkriptionsregulatoren BMI1, CCAR2, SPOP und TRIM28 konnten darüber hinaus als Interaktoren von pUL97 in einer HA-Ko-IP bestätigt werden.

β-herpesvirale Kinasen vereinen Zellzyklusregulatoren in ihren Interaktomen

Ein herausstechender Befund der proteomischen Interaktomanalyse war die Anreicherung von Regulatoren der S- sowie G₂-Phase des Zellzyklus mit allen Kinasen der humanen β-Herpesviren (Fig.1d, OP). Hierzu zählten neben den Cyclinen A und B (CCNA2, CCNB1), die affilierten Cyclin abhängigen Kinasen (CDK1, CDK2) sowie darüber hinaus assoziierte Proteine (SKP1, SKP2). Mittels reverser Koimmunpräzipitation konnten Cyclin A/ CDK2 als spezifische Interaktoren von pU69, pUL97 sowie der vom MuHV-1 (MCMV) kodierenden M97-Kinase validiert werden (Fig.1e, OP). Im Einklang mit früheren Beobachtungen implizieren diese Daten eine hohe funktionelle Relevanz der Cyclin A-CDK2 Interaktion für die β-herpesvirale Infektion (Bogdanow et al., 2013; Caffarelli et al., 2013; Eifler et al., 2014).

Ein konserviertes NLS-RXL Motiv in β-herpesviralen CHPK vermittelt Cyclin-CDK-Bindung

Die Säugetierwirtszelle als biologische Blaupause für die herpesvirale Koevolution bietet zwei elaborierte Interaktions- und Bindungsmechanismen mit oder innerhalb des Cyclin/ CDK-Komplex: Zum einen die PSTAIRE-Helix, worüber Cycline an CDK binden können und mittels einer hierdurch induzierten Konformitätsänderung deren Kinaseaktivitäten entfesseln. Zum anderen die sogenannten RXL/Cy-Motive, welche von bekannten CDK-Substraten, -Inhibitoren und -Aktivatoren zur Cyclinbindung genutzt werden (Child et al., 2010). Während Homologien zur PSTAIRE-Helix unter den β-herpesviralen Kinasen fehlen, ließ sich unter ihnen ein hochkonservierter Bereich möglicher RXL/Cy-Motive gerade im sonst stark sequenzdivergierenden N-Terminus identifizieren (Fig.1f, OP). Ebenfalls und zum Teil überlappend konserviert war ein Cluster positiv geladener Aminosäuren - suggestiv für ein NLS (*nuclear localization signal*) in diesem Bereich. Ein NLS besteht zumeist aus einer Sequenz basischer Aminosäuren. Sie können ein- bis zweigliedrig, getrennt durch 9-12 Aminosäurepositionen, auftreten und dienen als Bindemotiv für Importine, die wiederum den nukleären Import über Kernporen ermöglichen (Fig.1g/ 2a, OP). Mit der Etablierung einer Mutationsstrategie, welche die antizipierten Funktionen der Cyclin-Bindung und des nukleären Imports einzeln attackieren konnte, ließen sich die Kinasen und das NLS-RXL-Motiv funktionell testen (Abb.1). Hierbei beeinflusste die

R45A/L47A-Mutation (RXL → AXA) sowohl das putative RXL/Cy-Motiv als auch das antizipierte NLS. Eine zweite L47A/F49A-Mutation (LXF → AXA) zielte derweil überlappend nur auf das putative RXL/Cy Motiv.

Für die M97- und U69-Kinasen konnten wir in der Koimmunpräzipitation transfizierter Zellen die Bindung an Cyclin A und deren Dissoziation durch die Mutationen des RXL/Cy-Motivs nachweisen (Fig.2b, OP). In der korrelierenden Interaktomanalyse war die Defizienz der Cyclin A-Bindung gleichzeitig verbunden mit einer Minderanreicherung Cyclin-assoziiierter Faktoren. Diese Korekrutierung essenzieller Faktoren ließ dahinter auch eine funktionell bedeutsame Interaktion vermuten.

Der Frage nach der Bedeutung des Doppelmotivs für die subzelluläre Lokalisation wurde unter Zuhilfenahme eines GFP-basierten Reporterkonstrukts nachgegangen. Hierfür wurden kurze, die das Motiv umfassende Sequenzen (pU69 AS 15-47/ pM97 AS 20-55) in den Reporter überführt und anschließend transfiziert (Fig.2c-e, OP). Das üblicherweise sich zytoplasmatisch anreichernde GFP-Signal konnte in der Fluoreszenzmikroskopie im Falle eines intakten NLS-Motivs (M97-WT; L47A/F49A) nukleär nachgewiesen werden. Die eingeführte R45A/L47A-Mutation hingegen schädigte das NLS derart, dass ein nukleärer Import des GFP-Signals nicht nachgewiesen wurde.

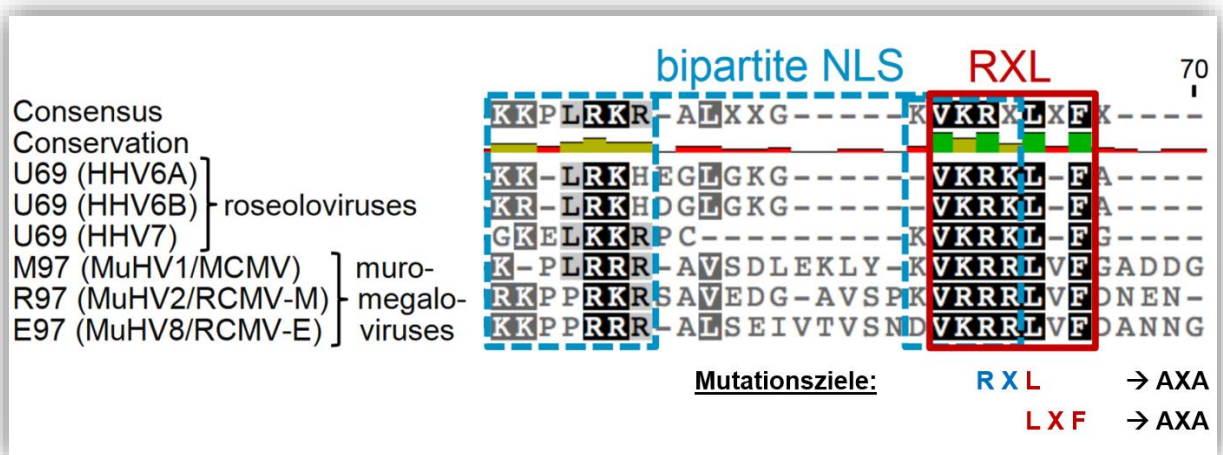


Abb. 1) Vergleichende, N-terminale AS-Sequenzdarstellung der CHPK von HHV-6/ -7 sowie von Nagetiercytomegalieviren: Das RXL/Cy Motiv (RXL - rot) überlappt in der Sequenz mit einem zweiteiligen NLS (bipartite NLS - blau). Beide Motive sind stark konserviert. Die eingebrachten Mutationen zielen entweder auf das RXL/Cy-Motiv (rot) oder zusätzlich auf das NLS (blau).

M97 komplexiert früh und anhaltend mit Cyclin-CDK in infizierten Zellen

Aufgrund des herpesviralen Wirtstropismus griffen wir auf die MCMV-Infektion als etabliertes Testsystem für β -Herpesviren zurück - gerade vor dem Hintergrund möglicher in-vivo Versuche. Die bisherigen Beobachtungen konnten exemplarisch für die M97-Kinase in der MCMV-Infektion in-vitro validiert werden. In beiden Analysemodi – MS und IP/ *Western Blot* – konnte die Koanreicherung von M97 und Cyclin A-CDK2 zu verschiedenen Zeiten der Infektion bestätigt werden (Fig.3a, 3c-d, OP). Interessanterweise zeigten sich Cyclin und CDK in der MS-Interaktomanalyse sowohl exklusiv früh als auch anhaltend spät in der Infektion stark mit pM97 anreichernd. Eine enge Interaktionsbeziehung ließ sich angesichts ähnlicher Expressionsniveaus der Beteiligten annehmen (Fig.3b, OP). Der Verlust der Cyclin A-Bindung lässt sich durch die Mutation des entsprechenden RXL/Cy-Motivs herbeiführen.

M97-Abundanz und -Kinaseaktivität sind Cyclin-unabhängig

Der Verlust der Bindung von M97 mit dem Cyclin A/ CDK2-Komplex durch Mutation des RXL/Cy-Motivs hat keine Auswirkungen auf die Abundanz der betreffenden Proteine. Eine Expressionskinetik viraler IE-, E- und L-Proteine zeigte keine Unterschiede zwischen M97-WT und den -Mutanten. Von der Cyclin-Bindung unabhängig zeigte sich darüber hinaus die M97-Kinaseaktivität in der Autoradiographie. Dies stützt vorherige Beobachtungen, die die CHPK generell als Cyclin-unabhängig beschrieben haben (Kuny et al., 2010). Umgekehrt zeigte sich auch die Aktivität Cyclin-assoziiierter Kinasen unabhängig von M97 (Fig.3b, 3e-f, OP).

Cyclinbindung reguliert die subzelluläre Lokalisierung von M97

Quieszenten Zellen fehlen entsprechend dem G₀-Status des Zellzyklus Cyclin A. Eine Infektion mit MCMV und β -Herpesviren im Allgemeinen induziert in diesem Fall bekanntermaßen die Cyclin A-Expression (Jault et al., 1995; Salvant et al., 1998). In diesem System der infektionsinduzierten, progredienten Expressionskinetik wurden die Cyclin A-abhängigen Veränderungen immunfluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Während WT-M97 in der frühen Infektion (8 hpi) nukleär lokalisiert ist, korreliert die zunehmende Cyclin A-Expression zu späteren Zeitpunkten (≥ 24 hpi) mit seiner Verschiebung ins Zytoplasma. Die Beschädigung des NLS durch die R45A/L47A-Mutation resultierte in der konstant zytoplasmatischen Retention von M97 unabhängig von der Cyclin A-Expression. Eine konstitutiv nukleäre Lokalisation zeigte M97 lediglich mit intaktem NLS aber bei defizienter Cyclin A-Bindung wie im Falle der L47A/F49A-Mutation. Die Cyclin A-abhängige Umverteilung von WT-M97 ins Zytoplasma trotz intaktem NLS ließ also auf einen das NLS maskierenden Interaktionscharakter schließen (Fig.4a-c, OP).

Inhibition der Wirts-DNA-Synthese erfolgt durch M97-vermittelte Sequestrierung von Cyclin A ins Zytoplasma

Cyclin A fällt bei der Koordinierung der DNA-Replikation und Zellteilung im Rahmen des Zellzyklus eine Schlüsselrolle zu. Die hierbei ablaufenden Vorgänge spielen sich im Zellkern ab, sodass eine zumindest partiell nukleäre Lokalisation für die Beteiligung an diesen Prozessen elementar ist. Wie bereits beschrieben, kommt es unter der MCMV-Infektion zur Induktion der Cyclin A-Expression. Neu war die Beobachtung, dass es abhängig von M97 und dessen intaktem NLS-RXL-Doppelmotiv zu einer spezifischen Anreicherung von Cyclin A im Zytoplasma kommt. In dem subzellulären Fraktionierungsassay zeigten sich weitere Cycline wie Cyclin E hiervon nicht betroffen. Wo die Interaktion mit Cyclin A entweder aufgrund räumlicher Trennung durch den Defekt im NLS (R45A/L47A) und oder durch Mutation des RXL/Cy-Bindemotivs (R45A/L47A- und L47A/F49A) nicht möglich war, verblieb Cyclin A mehrheitlich im Nucleus (Fig.5a, OP).

Die zytoplasmatische Sequestrierung von Cyclin A korrelierte in der durchflusszytometrischen Zellzyklusanalyse mit dem nach MCMV-Infektion quieszenter Zellen einsetzenden Zellzyklusarrest in der G₁/S-Phase (Fig.5b, OP) (Lu and Shenk, 1996; Wiebusch et al., 2008). Die nachgewiesene DNA-Replikation korrelierte in der Fluoreszenzmikroskopie exklusiv kolokalisiert mit viralen Replikationsmarkern (M57 – virales DNA-Einzelstrang-Bindeprotein) im Nucleus und zeigte sich somit vom Zellzyklus der Wirtszelle entkoppelt (Fig.5d-e, OP). Verliert M97 durch Mutation des NLS-RXL-Motivs die Fähigkeit Cyclin A im Zytoplasma zu binden,

wird der G₁/S-Arrest überwunden. Ohne in die Mitose einzutreten, kommt es zur Verdopplung des zellulären DNA-Gehalts analog des üblichen Progresses in die G₂/M-Phase. Dabei konnten die DNA-Replikationsfoci unabhängig von viralen Markern ubiquitär im Nucleus nachgewiesen werden (Fig.5b-e, OP).

M97 vermag es durch den nukleären Entzug des Cyclin A die Wirtszelle in einem DNA-Synthese freundlichen Zustand zu konservieren und verhilft der viralen Replikationsmaschinerie somit zu einer Umgebung frei von konkurrierenden zellulären Prozessen.

M97 trägt durch sein nukleäres Interaktom und die Cyclinbindung zur produktiven Infektion bei

M97 ist für die Produktion ansteckungsfähiger Viren bei der MCMV-Infektion in-vitro nicht essenziell. Dennoch trägt M97 mit seinem funktionellen NLS-RXL-Doppelmotiv sowie als Kinase zur produktiven Infektion bei. In dem Viruswachstumsassay wird die Bedeutung am besten ersichtlich im Falle des Wachstums-defizienten, R45A/L47A-mutierten Virus, dem - im Vergleich zum WT-MCMV durch das defekte NLS - sowohl das frühe nukleäre Interaktom als auch die Bindung an Cyclin A fehlt. Die reine M97-Kinaseaktivität hat hierzu im Wachstumsvergleich eine noch geringere Bedeutung für die produktive Virusinfektion (Fig.5f, OP).

d. Diskussion und darüberhinausgehende Forschungsfragen

Herpesviren sind bekanntermaßen Meister der Koevolution mit ihren Wirtsorganismen. Die konservierten herpesviralen Kinasen (CHPK) sind hierfür ein herausragendes Beispiel (Kuny et al., 2010). Ihre zu Teilen erfolgte Charakterisierung als v-CDK fußt bereits auf einer Vielzahl von Substrat- und Interaktionsbeschreibungen sowie ersten proteomischen Daten (Oberstein et al., 2015). Diese Arbeit versucht es die CHPK als Gruppe von Funktionshomologen mit ihrer eigenen Interaktionssignatur zu begreifen, um weitere Rückschlüsse auf ihre Bedeutung für die Virusinfektion zu erlauben. Hierbei fällt eine zuvor unbekannte Vielfalt von zellulären Interaktionspartnern auf. Die spezifische Signatur der CHPK-Interaktion umfasst Vertreter der zellulären DNA-Synthese, -Reparatur (Li et al., 2011) und der Zellzyklusregulation (Kuny et al., 2010), von denen einige bereits zuvor beschrieben wurden. Hervorzuheben ist zudem die Identifikation zahlreicher Transkriptionsrepressoren als CHPK-Bindungspartner. So konnte die Interaktion der UL97-Kinase mit dem TRIM28-ZNF-Komplex gezeigt werden, der bekanntermaßen phosphorylierungsabhängig zur Stilllegung der lytischen HCMV-Genexpression in Stammzellen beitragen kann (Rauwel et al., 2015). Die Koanreicherung von Vertretern des Polycomb-Repressor-Komplexes (PHC2, Ring1, CBX4, BMI1) mit pUL97 könnte zudem im Zusammenhang mit dessen kürzlich beschriebener Bedeutung für den lytischen Infektionsmodus von Interesse sein (Svrlanska et al., 2019). Ebenfalls auf transkriptioneller Ebene interferierend lassen sich Einheiten des HIRA-Histon-Chaperon-Komplexes (CABIN1, HIRA, UBN2) als Bindungspartner der EBV-Kinase nachweisen. Hier kann es durch Rekrutierung von Histon H3.3 zur Stilllegung der lytischen Genexpression kommen (Rai et al., 2017). So scheint es, dass die Herpesviren in ihren CHPK die essenzielle Interaktion mit den Wirtsregulatoren der viralen Transkription konserviert haben. Ihre Rolle als potenzielles Bindeglied zwischen latentem und lytischem Infektionsmodus sollte Gegenstand weiterer Forschung bleiben, insbesondere weil dies Möglichkeiten für neue Therapieansätze birgt.

Insbesondere die CHPK der β - und γ -Herpesviren sind zuvor bereits als v-CDK charakterisiert worden (Hamirally et al., 2009; Hume et al., 2008; Kuny et al., 2010): Dies geschah erstens basierend auf einer deutlichen Sequenzhomologie, sowie zweitens aufgrund der Tatsache, dass sie CDK-typische Funktionen wie die pRB- und

Lamin A/C-Phosphorylierung ausführen und den für die virale Replikation wichtigen S-Phase-Stoffwechsel aktivieren. Trotz dieser Homologien zeigt sich bei den v-CDK durchweg der Verlust spezifischer Sequenzen (z.B. PSTAIRE-Helix), über die normalerweise die Bindung und Regulation durch Cycline, CAK und CKI erfolgen kann (Hume et al., 2008). Dadurch können die v-CDK autark agieren und entziehen sich der üblichen Kontrolle durch wirtszelleigene Regulatoren. Doch diese Arbeit zeigt, dass die β -herpesviralen CHPK ein ebenfalls der Wirtszelle entlehntes RXL/Cy-Motiv zur Bindung von Cyclin A erworben haben. Dieses ermöglicht zum einen die zellzyklusabhängige Regulation der betreffenden Kinasen und zum anderen die funktionelle Neutralisierung von Cyclin A durch stöchiometrische Bindung und zytoplasmatische Sequestrierung. Somit kann für die β -herpesviralen CHPK eine Bifunktionalität als CDK sowie als CKI postuliert werden, wodurch diese befähigt sind nicht nur den S-Phase-Stoffwechsel zu forcieren, sondern auch die DNA-Synthese der Wirtszelle effektiv zu hemmen.

Unter den β -herpesviralen Kinasen stellt einzig die von HCMV kodierte Kinase UL97 eine Ausnahme diesbezüglich dar. In der HCMV-Infektion hat sich dennoch ein homologer Mechanismus etabliert, der aus dem Wechselspiel der viralen Proteine pp150 und UL21a mit Cyclin A basierend auf RXL/Cy Motiven besteht (Bogdanow et al., 2013; Caffarelli et al., 2013; Eifler et al., 2014). Das virale Tegumentprotein pp150 sorgt für die Cyclin A-abhängige Synchronisation der lytischen Genexpression mit der G₁-Phase. Ein Produkt der lytischen HCMV-Expression, UL21a, verhindert wiederum durch Komplexierung mit und den konsekutiv proteasomalen Abbau von Cyclin A den Zellzyklusprogress über die S/G₂-Phase hinaus. Dadurch wird einem G₂/M-Arrest gleich der Eintritt der infizierten Zelle in das Mitosestadium unterbunden, was andernfalls eine abortive Infektion zur Folge hat (Eifler et al., 2014). Insbesondere konnte beobachtet werden, dass der Mitoseeintritt HCMV-infizierter Zellen eine genomische Instabilität erzeugt, die sich in aberranten Spindelfiguren, chromosomaler Fragmentierung und unvollständig kondensiertem Chromatin zeigt und in den apoptotischen Zelltod mündet. Der aus der HCMV-Infektion überlieferte G₂/M-Arrestphänotyp zeigte sich auch in dieser Arbeit nach Mutation des RXL/Cy-Motivs der M97-Kinase in MCMV-infizierten Zellen. Doch weder deuteten die durchflusszytometrischen Zellzyklusanalysen auf einen unkontrollierten Mitoseeintritt noch die Viruswachstumskurven auf eine abortive Infektion hin. Die β -Herpesviren

scheinen neben dem NLS-RXL-Doppelmotiv ihrer Kinasen einen weiteren Mechanismus etabliert zu haben, der die lytische Genexpression stabilisiert und die infizierte Zelle an dem abortiven Mitoseeintritt hindert. Vor diesem Hintergrund ist die Koanreicherung von Cyclin B/ CDK1 mit den β -herpesviralen Kinasen in der MS-Analyse erwähnenswert. Ob der G₂/M-Arrestphänotyp in dieser Interaktion mit den wichtigsten Vermittlern des Mitoseeintritts oder aber mit einem der identifizierten DNA-Reparaturproteine determiniert ist, sollte Gegenstand weiterer Forschung werden.

Diese Arbeit beleuchtet funktionelle Motive der Wirtszelle, die in das Virusgenom inkorporiert wurden. Solche der Wirtszelle entlehnten kurzen linearen Motive (*SLiMs* – *short linear motifs*) bieten dem viralen Mimikry ähnliche, wenn nicht die selben Möglichkeiten der Einflussnahme auf zelluläre Netzwerke wie ihre biologischen Originale (Van Roey et al., 2014). Zu den bekannteren Beispielen gehört in der HPV-Infektion die für deren Onkogenität elementare Bindung des viralen E7-Proteins an die Taschenregion (*pocket region*) des Rb-Proteins unter zu Hilfenahme eines inkorporierten LxCxE-Motivs (Jones et al., 1990). Aber das bisher bekannte Repertoire umfasst ebenso *SLiMs* zur Interaktion mit der Kernimportmaschinerie (Tarendeau et al., 2007) sowie zur Bindung von Transkriptions-(Ko-)faktoren (EBV kodiertes LMP1-Protein mit JAK via PxxPxP-Motiv (Gires et al., 1999); HIV kodiertes Vif-Protein mit Elongin-C via SLxxxLxxxL-Motiv (Stanley et al., 2008); adenovirales E3-Protein mit CtBP2 via PxDLS-Motiv (Schaeper et al., 1995)), Zellzyklusregulatoren (HPV-kodiertes E1-Protein mit Cyclin E/ CDK via RXL-Motiv (Ma et al., 1999)).

In dieser Arbeit sehen wir am Beispiel von HHV-6, HHV-7 und MCMV sogar gleich zwei *SLiMs* zu einem regulatorisch bedeutsamen Sequenzelement fusioniert. Dabei wird die überlappende Komposition des Importin-bindenden NLS und des Cyclin A-bindenden RXL/Cy-Motivs durch ihre Charakteristik, sich in Sequenzen positiv geladener basischer Aminosäuren einzubetten, begünstigt. Durch die Fusion entsteht ein molekularer Schalter, der abhängig von der kompetitiven Bindung der Interaktionspartner die virale Kinasefunktion determiniert (Fig.6a, OP). Für das intermolekulare Maskieren des NLS regulatorisch wichtiger Proteine, um deren Erkennung durch die Kernimportmaschinerie zu verhindern, gibt es eine Reihe von Beispielen. Die Maskierung des NLS von NF κ B und seiner aktiven Untereinheiten p50 und p65 durch I κ B α ist von allen wohl am besten verstanden (Christie et al., 2016; Huxford et al., 1998). Die originelle Komposition eines NLS-RXL-Doppelmotivs lässt

sich, obwohl nicht als solches primär beschrieben, in bemerkenswert vielen eukaryotischen Zellzyklusregulatoren nachweisen (Fig.6b, OP). Die unabhängig voneinander berichteten NLS- und Cyclinbindemotive von RB1 (Adams et al., 1999; Zacksenhaus et al., 1993), p21 (Adams et al., 1996; Rodríguez-Vilarrupla et al., 2002), E2F1 (Krek et al., 1994; Müller et al., 1997) und CDT1 (Nishitani et al., 2004; Sugimoto et al., 2004) zeigen sich nicht nur miteinander überlappend, sondern sind darüber hinaus hoch konserviert (Bogdanow et al., 2020b). Die Bedeutung dieses potenziell die subzelluläre Lokalisation beeinflussenden und Cyclin-abhängigen Doppelmotivs ist bislang nur unzureichend erforscht. Dass es sich aber funktionell auf die Beteiligung der jeweiligen Proteine an der Zellzyklusregulation auswirkt, liegt nahe (Coqueret, 2003; Jiao et al., 2008; Müller et al., 1997).

Die Aussagekraft dieser Arbeit ist nur so gut wie die jeweiligen Schwächen der eingebrachten Methoden. Im Folgenden möchte ich auf einige methodische Limitationen eingehen. Diese Arbeit stützt sich gerade in ihren Aussagen bezüglich des Interaktoms und Phosphoproteoms der β -herpesviralen Kinasen auf MS-Analysen. Dabei muss beachtet werden, dass die vermessenen Proteininteraktionen sich in den unterschiedlichen Zellmodellen und Expressionsmodi unterscheiden können. So kann die Expression von Proteinen nach erfolgreicher Infektion im Gegensatz zur Transfektion nicht nur in der Dynamik divergieren, sondern ebenso zu verändertem Abundanz-, Faltungs- und Lokalisationsverhalten führen. Da zum Teil unbekannt und unvorhersehbar konnten diese Variablen nur unzureichend in der Auswertung berücksichtigt werden.

Die hier genutzten HEK-293T-Zellen und 3T3-Fibroblasten sind oft genutzte und breit anerkannte Zellmodelle. Dennoch gelten sie als immortalisiert und sind nicht ausreichend, um normale murine oder humane Zellen umfassend abzubilden. Wie teilweise bereits erfolgt, ist daher die Validierung der Ergebnisse in primären Zelllinien von zusätzlichem Wert. Um weiterführende systemische Konsequenzen auf die Virusinfektion zu untersuchen, sind zudem in-vivo Versuche in entsprechenden Tiermodellen nach sorgfältiger Planung in Betracht zu ziehen.

e. Klinische Bedeutung und Translation

Herpesviren im Allgemeinen und die β -Herpesviren mit dem Cytomegalievirus im Speziellen sind häufige und zum Teil aggressive Humanpathogene. Sie schädigen insbesondere therapie-, krankheits- oder altersbedingt immungeschwächte Menschen. Die aktuell zur Verfügung stehenden Therapien sind aber in ihrer Effektivität und Wirksamkeit zunehmend durch Resistenzen bedroht (Piret and Boivin, 2017). Zudem haben die bislang entwickelten Virostatika insbesondere bei intensiverer oder langanhaltender Anwendung ein ungünstiges Nebenwirkungsspektrum, wodurch die Therapie internistisch komplex vorerkrankter Patientenkollektive verkompliziert wird.

Die unmittelbare klinische Anwendbarkeit der in dieser Arbeit dargelegten neuen Erkenntnisse ist nicht gegeben. Dennoch können die Ergebnisse zu weitergehenden Forschungsfragen und neuen Therapien beitragen. Hierbei ist die Identifikation von zellulären Transkriptionsregulatoren als Interaktionspartner der CHPK und die mögliche Bedeutsamkeit für den Wechsel zwischen dem latenten und lytischen Infektionsmodus zu nennen. Mechanismen, die die Viruslatenz befördern führen zwar zur fortwährenden Zirkulation von Viruspartikeln oder zumindest des viralen Genoms, dennoch bewahren sie den Wirt vor dem symptomatischen Verlauf einer lytischen Infektion. Gleichzeitig kann ein besseres Verständnis der Latenz zukünftig Wege eröffnen der Etablierung eines solchen viralen Reservoirs entgegenzuwirken.

Darüber hinaus ist es interessant die Mechanismen zu verstehen, die den G₂/M-Arrestphänotyp bedingen und somit den Abort der Virusinfektion verhindern (Eifler et al., 2014). Könnte man den Arrest überwinden und spezifisch die infizierte Zelle in die unkontrollierte Mitose bringen, würde aufgrund der konsekutiv einsetzenden Apoptose eine produktive Virusinfektion vereitelt werden. Allerdings bedarf es hierzu noch einem tieferen Verständnis der Abläufe. Insbesondere die chromosomale Instabilität nach Mitoseeintritt in infizierten Zellen kann Gefahren wie eine hohe Onkogenität bergen, wenn beispielsweise durch einen mitotischen Ausbruch (*mitotic slippage*) nicht alle betroffenen Zellen in Apoptose gehen (Sinha et al., 2019).

f. Literaturverzeichnis

- Adams, P.D., Li, X., Sellers, W.R., Baker, K.B., Leng, X., Harper, J.W., Taya, Y., Kaelin, W.G., 1999. Retinoblastoma Protein Contains a C-terminal Motif That Targets It for Phosphorylation by Cyclin-cdk Complexes. *Mol. Cell. Biol.* 19, 1068–1080. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.2.1068>
- Adams, P.D., Sellers, W.R., Sharma, S.K., Wu, A.D., Nalin, C.M., Kaelin, W.G., 1996. Identification of a cyclin-cdk2 recognition motif present in substrates and p21-like cyclin-dependent kinase inhibitors. *Mol. Cell. Biol.* 16, 6623–6633. <https://doi.org/10.1128/MCB.16.12.6623>
- Ahn, K.H., Park, Y.-J., Hong, S.-C., Lee, E.H., Lee, J.-S., Oh, M.-J., Kim, H.-J., 2016. Congenital varicella syndrome: A systematic review. *J. Obstet. Gynaecol.* 36, 563–566. <https://doi.org/10.3109/01443615.2015.1127905>
- Al Hamed, R., Bazarbachi, A.H., Mohty, M., 2020. Epstein-Barr virus-related post-transplant lymphoproliferative disease (EBV-PTLD) in the setting of allogeneic stem cell transplantation: a comprehensive review from pathogenesis to forthcoming treatment modalities. *Bone Marrow Transplant.* 55, 25–39. <https://doi.org/10.1038/s41409-019-0548-7>
- Avey, D., Tepper, S., Pifer, B., Bahga, A., Williams, H., Gillen, J., Li, W., Ogden, S., Zhu, F., 2016. Discovery of a Coregulatory Interaction between Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus ORF45 and the Viral Protein Kinase ORF36. *J. Virol.* 90, 5953–5964. <https://doi.org/10.1128/JVI.00516-16>
- Bellé, R., Cormier, P., Poulhe, R., Morales, J., Huchon, D., Mulner-Lorillon, O., 1990. Protein phosphorylation during meiotic maturation of *Xenopus* oocytes: cdc2 protein kinase targets. *Int. J. Dev. Biol.* 34, 111–115.
- Biron, K.K., 2006. Antiviral drugs for cytomegalovirus diseases. *Antiviral Res., Special Issue To Honour Professor Erik De Clercq* 71, 154–163. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2006.05.002>
- Bogdanow, B., Schmidt, M., Weisbach, H., Gruska, I., Vetter, B., Imami, K., Ostermann, E., Brune, W., Selbach, M., Hagemeyer, C., Wiebusch, L., 2020a. Cross-regulation of viral kinases with cyclin A secures shutoff of host DNA synthesis. *Nat. Commun.* 11, 4845. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18542-1>
- Bogdanow, B., Schmidt, M., Weisbach, H., Gruska, I., Vetter, B., Imami, K., Ostermann, E., Brune, W., Selbach, M., Hagemeyer, C., Wiebusch, L., 2020b. Cross-regulation of viral kinases with cyclin A secures shutoff of host DNA synthesis. *Nat. Commun.* 11, 4845. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18542-1>
- Bogdanow, B., Weisbach, H., von Einem, J., Straschewski, S., Voigt, S., Winkler, M., Hagemeyer, C., Wiebusch, L., 2013. Human cytomegalovirus tegument protein pp150 acts as a cyclin A2–CDK-dependent sensor of the host cell cycle and differentiation state. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 17510–17515. <https://doi.org/10.1073/pnas.1312235110>
- Bradley, H., Markowitz, L.E., Gibson, T., McQuillan, G.M., 2014. Seroprevalence of Herpes Simplex Virus Types 1 and 2—United States, 1999–2010. *J. Infect. Dis.* 209, 325–333. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit458>
- Bryan-Marrugo, O.L., Ramos-Jiménez, J., Barrera-Saldaña, H., Rojas-Martínez, A., Vidaltamayo, R., Rivas-Estilla, A.M., 2015. History and progress of antiviral drugs: From acyclovir to direct-acting antiviral agents (DAAs) for Hepatitis C. *Med. Univ.* 17, 165–174. <https://doi.org/10.1016/j.rmu.2015.05.003>

- Buxmann, H., Hamprecht, K., Meyer-Wittkopf, M., Friese, K., 2017. Primary Human Cytomegalovirus (HCMV) Infection in Pregnancy. *Dtsch. Ärztebl. Int.* 114, 45–52. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2017.0045>
- Caffarelli, N., Fehr, A.R., Yu, D., 2013. Cyclin A Degradation by Primate Cytomegalovirus Protein pUL21a Counters Its Innate Restriction of Virus Replication. *PLOS Pathog.* 9, e1003825. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003825>
- Child, E.S., Hendrychová, T., McCague, K., Futreal, A., Otyepka, M., Mann, D.J., 2010. A cancer-derived mutation in the PSTAIRE helix of cyclin-dependent kinase 2 alters the stability of cyclin binding. *Biochim. Biophys. Acta* 1803, 858–864. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.04.004>
- Christie, M., Chang, C.-W., Róna, G., Smith, K.M., Stewart, A.G., Takeda, A.A.S., Fontes, M.R.M., Stewart, M., Vértessy, B.G., Forwood, J.K., Kobe, B., 2016. Structural Biology and Regulation of Protein Import into the Nucleus. *J. Mol. Biol., Functional and Mechanistic Landscape of the Nuclear Pore Complex* 428, 2060–2090. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.10.023>
- Cohen, J.I., 2020. Herpesvirus latency. *J. Clin. Invest.* 130, 3361–3369. <https://doi.org/10.1172/JCI136225>
- Coqueret, O., 2003. New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *Trends Cell Biol.* 13, 65–70. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(02\)00043-0](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(02)00043-0)
- Davison, A.J., 2010. Herpesvirus systematics. *Vet. Microbiol., Special issue: 3rd Veterinary Herpesvirus Symposium of the European Society for Veterinary Virology (ESVV)* 143, 52–69. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.02.014>
- Edward S. Mocarski Jr., E.S.M., 2007. Comparative analysis of herpesvirus-common proteins, Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis. Cambridge University Press.
- Eifler, M., Uecker, R., Weisbach, H., Bogdanow, B., Richter, E., König, L., Vetter, B., Lenac-Rovis, T., Jonjic, S., Neitzel, H., Hagemeyer, C., Wiebusch, L., 2014. PUL21a-Cyclin A2 Interaction is Required to Protect Human Cytomegalovirus-Infected Cells from the Deleterious Consequences of Mitotic Entry. *PLOS Pathog.* 10, e1004514. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004514>
- Gershburg, E., Pagano, J.S., 2008. Conserved herpesvirus protein kinases. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics, Inhibitors of Protein Kinases (5th International Conference, IPK-2007) and Workshop Session on Molecular Design and Simulation Methods (Warsaw, Poland, June 23-27, 2007)* 1784, 203–212. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2007.08.009>
- Gires, O., Kohlhuber, F., Kilger, E., Baumann, M., Kieser, A., Kaiser, C., Zeidler, R., Scheffer, B., Ueffing, M., Hammerschmidt, W., 1999. Latent membrane protein 1 of Epstein–Barr virus interacts with JAK3 and activates STAT proteins. *EMBO J.* 18, 3064–3073. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.11.3064>
- Hamirally, S., Kamil, J.P., Ndassa-Colday, Y.M., Lin, A.J., Jahng, W.J., Baek, M.-C., Noton, S., Silva, L.A., Simpson-Holley, M., Knipe, D.M., Golan, D.E., Marto, J.A., Coen, D.M., 2009. Viral Mimicry of Cdc2/Cyclin-Dependent Kinase 1 Mediates Disruption of Nuclear Lamina during Human Cytomegalovirus Nuclear Egress. *PLOS Pathog.* 5, e1000275. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000275>
- Hume, A.J., Finkel, J.S., Kamil, J.P., Coen, D.M., Culbertson, M.R., Kalejta, R.F., 2008. Phosphorylation of Retinoblastoma Protein by Viral Protein with Cyclin-Dependent Kinase Function. *Science* 320, 797–799. <https://doi.org/10.1126/science.1152095>

- Huxford, T., Huang, D.-B., Malek, S., Ghosh, G., 1998. The Crystal Structure of the I κ B α /NF- κ B Complex Reveals Mechanisms of NF- κ B Inactivation. *Cell* 95, 759–770. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81699-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81699-2)
- Iwahori, S., Hakki, M., Chou, S., Kalejta, R.F., 2015. Molecular Determinants for the Inactivation of the Retinoblastoma Tumor Suppressor by the Viral Cyclin-dependent Kinase UL97. *J. Biol. Chem.* 290, 19666–19680. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.660043>
- Iwahori, S., Umaña, A.C., VanDeusen, H.R., Kalejta, R.F., 2017. Human cytomegalovirus-encoded viral cyclin-dependent kinase (v-CDK) UL97 phosphorylates and inactivates the retinoblastoma protein-related p107 and p130 proteins. *J. Biol. Chem.* 292, 6583–6599. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.773150>
- Jault, F.M., Jault, J.M., Ruchti, F., Fortunato, E.A., Clark, C., Corbeil, J., Richman, D.D., Spector, D.H., 1995. Cytomegalovirus infection induces high levels of cyclins, phosphorylated Rb, and p53, leading to cell cycle arrest. *J. Virol.* 69, 6697–6704.
- Jiao, W., Lin, H.-M., Datta, J., Braunschweig, T., Chung, J.-Y., Hewitt, S.M., Rane, S.G., 2008. Aberrant nucleocytoplasmic localization of the retinoblastoma tumor suppressor protein in human cancer correlates with moderate/poor tumor differentiation. *Oncogene* 27, 3156–3164. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210970>
- Jones, R.E., Wegrzyn, R.J., Patrick, D.R., Balishin, N.L., Vuocolo, G.A., Riemen, M.W., Defeo-Jones, D., Garsky, V.M., Heimbrook, D.C., Oliff, A., 1990. Identification of HPV-16 E7 peptides that are potent antagonists of E7 binding to the retinoblastoma suppressor protein. *J. Biol. Chem.* 265, 12782–12785.
- Jordan, S., Krause, J., Prager, A., Mitrovic, M., Jonjic, S., Koszinowski, U.H., 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. <https://doi.org/10.1128/JVI.00545-11>
- Kawaguchi, Y., Kato, K., Tanaka, M., Kanamori, M., Nishiyama, Y., Yamanashi, Y., 2003. Conserved Protein Kinases Encoded by Herpesviruses and Cellular Protein Kinase cdc2 Target the Same Phosphorylation Site in Eukaryotic Elongation Factor 1 δ . *J. Virol.* 77, 2359–2368. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.4.2359-2368.2003>
- Kawaguchi, Y., Matsumura, T., Roizman, B., Hirai, K., 1999. Cellular Elongation Factor 1 δ Is Modified in Cells Infected with Representative Alpha-, Beta-, or Gammaherpesviruses. *J. Virol.* 73, 4456–4460. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.5.4456-4460.1999>
- Kawaguchi, Y., Sant, C.V., Roizman, B., 1998. Eukaryotic Elongation Factor 1 δ Is Hyperphosphorylated by the Protein Kinase Encoded by the UL13 Gene of Herpes Simplex Virus 1. *J. Virol.* 72, 1731–1736. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.3.1731-1736.1998>
- Krek, W., Ewen, M.E., Shirodkar, S., Arany, Z., Kaelin, W.G., Livingston, D.M., 1994. Negative regulation of the growth-promoting transcription factor E2F-1 by a stably bound cyclin A-dependent protein kinase. *Cell* 78, 161–172. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90582-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90582-7)
- Kuny, C.V., Chinchilla, K., Culbertson, M.R., Kalejta, R.F., 2010. Cyclin-Dependent Kinase-Like Function Is Shared by the Beta- and Gamma- Subset of the Conserved Herpesvirus Protein Kinases. *PLOS Pathog.* 6, e1001092. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001092>

- Lei, C., Yang, J., Hu, J., Sun, X., 2020. On the Calculation of TCID₅₀ for Quantitation of Virus Infectivity. *Virol. Sin.* <https://doi.org/10.1007/s12250-020-00230-5>
- Li, R., Wang, L., Liao, G., Guzzo, C.M., Matunis, M.J., Zhu, H., Hayward, S.D., 2012. SUMO Binding by the Epstein-Barr Virus Protein Kinase BGLF4 Is Crucial for BGLF4 Function. *J. Virol.* 86, 5412–5421. <https://doi.org/10.1128/JVI.00314-12>
- Li, R., Zhu, J., Xie, Z., Liao, G., Liu, J., Chen, M.-R., Hu, S., Woodard, C., Lin, J., Taverna, S.D., Desai, P., Ambinder, R.F., Hayward, G.S., Qian, J., Zhu, H., Hayward, S.D., 2011. Conserved Herpesvirus Kinases Target the DNA Damage Response Pathway and TIP60 Histone Acetyltransferase to Promote Virus Replication. *Cell Host Microbe* 10, 390–400. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.08.013>
- Littler, E., Stuart, A.D., Chee, M.S., 1992. Human cytomegalovirus UL97 open reading frame encodes a protein that phosphorylates the antiviral nucleoside analogue ganciclovir. *Nature* 358, 160–162. <https://doi.org/10.1038/358160a0>
- Ljungman, P., 2002. β -Herpesvirus Challenges in the Transplant Recipient. *J. Infect. Dis.* 186, S99–S109. <https://doi.org/10.1086/342962>
- Ljungman, P., Hakki, M., Boeckh, M., 2011. Cytomegalovirus in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 25, 151–169. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2010.11.011>
- Lu, M., Shenk, T., 1996. Human cytomegalovirus infection inhibits cell cycle progression at multiple points, including the transition from G1 to S. *J. Virol.* 70, 8850–8857.
- Ludwig, A., Hengel, H., 2009. Epidemiological impact and disease burden of congenital cytomegalovirus infection in Europe. *Eurosurveillance* 14, 19140. <https://doi.org/10.2807/ese.14.09.19140-en>
- Ma, T., Zou, N., Lin, B.Y., Chow, L.T., Harper, J.W., 1999. Interaction between cyclin-dependent kinases and human papillomavirus replication-initiation protein E1 is required for efficient viral replication. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 382–387. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.2.382>
- Malkin, J.-E., 2004. Epidemiology of genital herpes simplex virus infection in developed countries. *Herpes J. IHMF* 11 Suppl 1, 2A-23A.
- Marschall, M., Marzi, A., aus dem Siepen, P., Jochmann, R., Kalmer, M., Auerochs, S., Lischka, P., Leis, M., Stamminger, T., 2005. Cellular p32 recruits cytomegalovirus kinase pUL97 to redistribute the nuclear lamina. *J. Biol. Chem.* 280, 33357–33367. <https://doi.org/10.1074/jbc.M502672200>
- Maude, S.L., Enders, G.H., 2005. Cdk inhibition in human cells compromises chk1 function and activates a DNA damage response. *Cancer Res.* 65, 780–786.
- McGeoch, Duncan J., Davison, A.J., 1999. Chapter 17 - The Molecular Evolutionary History of the Herpesviruses, in: Domingo, E., Webster, R., Holland, J. (Eds.), *Origin and Evolution of Viruses*. Academic Press, London, pp. 441–465. <https://doi.org/10.1016/B978-012220360-2/50018-0>
- Müller, H., Moroni, M.C., Vigo, E., Petersen, B.O., Bartek, J., Helin, K., 1997. Induction of S-phase entry by E2F transcription factors depends on their nuclear localization. *Mol. Cell. Biol.* 17, 5508–5520. <https://doi.org/10.1128/MCB.17.9.5508>
- Nahmias, A., Josey, W.E., Naib, Z.M., Freeman, M.G., Fernandez, R.J., Wheeler, J.H., 1971. Perinatal risk associated with maternal genital herpes simplex virus infection. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 110, 825–837. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(71\)90580-1](https://doi.org/10.1016/0002-9378(71)90580-1)

- Nishitani, H., Lygerou, Z., Nishimoto, T., 2004. Proteolysis of DNA Replication Licensing Factor Cdt1 in S-phase Is Performed Independently of Geminin through Its N-terminal Region. *J. Biol. Chem.* 279, 30807–30816. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312644200>
- Oberstein, A., Perlman, D.H., Shenk, T., Terry, L.J., 2015. Human cytomegalovirus pUL97 kinase induces global changes in the infected cell phosphoproteome. *PROTEOMICS* 15, 2006–2022. <https://doi.org/10.1002/pmic.201400607>
- Pass, R.F., Fowler, K.B., Boppana, S.B., Britt, W.J., Stagno, S., 2006. Congenital cytomegalovirus infection following first trimester maternal infection: Symptoms at birth and outcome. *J. Clin. Virol., CMV Special Section - neonatal infections* 35, 216–220. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2005.09.015>
- Pereira, L., Petitt, M., Fong, A., Tsuge, M., Tabata, T., Fang-Hoover, J., Maidji, E., Zydek, M., Zhou, Y., Inoue, N., Loghavi, S., Pepkowitz, S., Kauvar, L.M., Ogunyemi, D., 2014. Intrauterine Growth Restriction Caused by Underlying Congenital Cytomegalovirus Infection. *J. Infect. Dis.* 209, 1573–1584. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu019>
- Peter, M., Nakagawa, J., Dorée, M., Labbé, J.C., Nigg, E.A., 1990. In vitro disassembly of the nuclear lamina and M phase-specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase. *Cell* 61, 591–602. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90471-P](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90471-P)
- Piret, J., Boivin, G., 2017. Herpesvirus Resistance to Antiviral Drugs, in: Mayers, D.L., Sobel, J.D., Ouellette, M., Kaye, K.S., Marchaim, D. (Eds.), *Antimicrobial Drug Resistance: Clinical and Epidemiological Aspects, Volume 2*. Springer International Publishing, Cham, pp. 1185–1211. https://doi.org/10.1007/978-3-319-47266-9_24
- Prichard, M.N., Sztul, E., Daily, S.L., Perry, A.L., Frederick, S.L., Gill, R.B., Hartline, C.B., Streblow, D.N., Varnum, S.M., Smith, R.D., Kern, E.R., 2008. Human Cytomegalovirus UL97 Kinase Activity Is Required for the Hyperphosphorylation of Retinoblastoma Protein and Inhibits the Formation of Nuclear Aggregates. *J. Virol.* 82, 5054–5067. <https://doi.org/10.1128/JVI.02174-07>
- Rai, T.S., Glass, M., Cole, J.J., Rather, M.I., Marsden, M., Neilson, M., Brock, C., Humphreys, I.R., Everett, R.D., Adams, P.D., 2017. Histone chaperone HIRA deposits histone H3.3 onto foreign viral DNA and contributes to anti-viral intrinsic immunity. *Nucleic Acids Res.* 45, 11673–11683. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx771>
- Rauwel, B., Jang, S.M., Cassano, M., Kapopoulou, A., Barde, I., Trono, D., 2015. Release of human cytomegalovirus from latency by a KAP1/TRIM28 phosphorylation switch. *eLife* 4, e06068. <https://doi.org/10.7554/eLife.06068>
- Rodríguez-Vilarrupla, A., Díaz, C., Canela, N., Rahn, H.-P., Bachs, O., Agell, N., 2002. Identification of the nuclear localization signal of p21cip1 and consequences of its mutation on cell proliferation. *FEBS Lett.* 531, 319–323. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)03549-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03549-4)
- Sagedal, S., Hartmann, A., Rollag, H., 2005. The impact of early cytomegalovirus infection and disease in renal transplant recipients. *Clin. Microbiol. Infect.* 11, 518–530. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01190.x>
- Salvant, B.S., Fortunato, E.A., Spector, D.H., 1998. Cell Cycle Dysregulation by Human Cytomegalovirus: Influence of the Cell Cycle Phase at the Time of Infection and Effects on Cyclin Transcription. *J. Virol.* 72, 3729–3741. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.5.3729-3741.1998>

- Schaeper, U., Boyd, J.M., Verma, S., Uhlmann, E., Subramanian, T., Chinnadurai, G., 1995. Molecular cloning and characterization of a cellular phosphoprotein that interacts with a conserved C-terminal domain of adenovirus E1A involved in negative modulation of oncogenic transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 10467–10471. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.23.10467>
- Schulman, B.A., Lindstrom, D.L., Harlow, E., 1998. Substrate recruitment to cyclin-dependent kinase 2 by a multipurpose docking site on cyclin A. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 10453–10458.
- Sinha, D., Duijf, P.H.G., Khanna, K.K., 2019. Mitotic slippage: an old tale with a new twist. *Cell Cycle* 18, 7–15. <https://doi.org/10.1080/15384101.2018.1559557>
- Stahl, F.R., Keyser, K.A., Heller, K., Bischoff, Y., Halle, S., Wagner, K., Messerle, M., Förster, R., 2015. Mck2 -dependent infection of alveolar macrophages promotes replication of MCMV in nodular inflammatory foci of the neonatal lung. *Mucosal Immunol.* 8, 57–67. <https://doi.org/10.1038/mi.2014.42>
- Steingruber, M., Keller, L., Socher, E., Ferre, S., Hesse, A.-M., Couté, Y., Hahn, F., Büscher, N., Plachter, B., Sticht, H., Marschall, M., 2019. Cyclins B1, T1, and H differ in their molecular mode of interaction with cytomegalovirus protein kinase pUL97. *J. Biol. Chem.* 294, 6188–6203. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.007049>
- Sugimoto, N., Tatsumi, Y., Tsurumi, T., Matsukage, A., Kiyono, T., Nishitani, H., Fujita, M., 2004. Cdt1 Phosphorylation by Cyclin A-dependent Kinases Negatively Regulates Its Function without Affecting Geminin Binding. *J. Biol. Chem.* 279, 19691–19697. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313175200>
- Sullivan, V., Talarico, C.L., Stanat, S.C., Davis, M., Coen, D.M., Biron, K.K., 1992. A protein kinase homologue controls phosphorylation of ganciclovir in human cytomegalovirus-infected cells. *Nature* 358, 162–164. <https://doi.org/10.1038/358162a0>
- Sun, X., Bristol, J.A., Iwahori, S., Hagemeyer, S.R., Meng, Q., Barlow, E.A., Fingerroth, J.D., Tarakanova, V.L., Kalejta, R.F., Kenney, S.C., 2013. Hsp90 Inhibitor 17-DMAG Decreases Expression of Conserved Herpesvirus Protein Kinases and Reduces Virus Production in Epstein-Barr Virus-Infected Cells. *J. Virol.* 87, 10126–10138. <https://doi.org/10.1128/JVI.01671-13>
- Svrlanska, A., Reichel, A., Schilling, E.-M., Scherer, M., Stamminger, T., Reuter, N., 2019. A Noncanonical Function of Polycomb Repressive Complexes Promotes Human Cytomegalovirus Lytic DNA Replication and Serves as a Novel Cellular Target for Antiviral Intervention. *J. Virol.* 93. <https://doi.org/10.1128/JVI.02143-18>
- Tarakanova, V.L., Leung-Pineda, V., Hwang, S., Yang, C.-W., Matatall, K., Basson, M., Sun, R., Piwnicka-Worms, H., Sleckman, B.P., Virgin, H.W., 2007. γ -Herpesvirus Kinase Actively Initiates a DNA Damage Response by Inducing Phosphorylation of H2AX to Foster Viral Replication. *Cell Host Microbe* 1, 275–286. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2007.05.008>
- Tarendeau, F., Boudet, J., Guilligay, D., Mas, P.J., Bougault, C.M., Boulo, S., Baudin, F., Ruigrok, R.W.H., Daigle, N., Ellenberg, J., Cusack, S., Simorre, J.-P., Hart, D.J., 2007. Structure and nuclear import function of the C-terminal domain of influenza virus polymerase PB2 subunit. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 229–233. <https://doi.org/10.1038/nsmb1212>
- Tischer, B.K., Smith, G.A., Osterrieder, N., 2010. En Passant Mutagenesis: A Two Step Markerless Red Recombination System, in: Braman, J. (Ed.), *In Vitro Mutagenesis Protocols: Third Edition, Methods in*

Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 421–430. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-652-8_30

Uehara, H., Hirano, H., Matsunaga, T., Minami, K., Komura, K., Ibuki, N., Inamoto, T., Nomi, H., Azuma, H., 2020. Management of alpha-herpesvirus infection following kidney transplantation: Our experience (7 cases). *Transplant. Rep.* 5, 100051. <https://doi.org/10.1016/j.tpr.2020.100051>

Umaña, A.C., Iwahori, S., Kalejta, R.F., 2018. Direct Substrate Identification with an Analog Sensitive (AS) Viral Cyclin-Dependent Kinase (v-Cdk). *ACS Chem. Biol.* 13, 189–199. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00972>

Van Roey, K., Uyar, B., Weatheritt, R.J., Dinkel, H., Seiler, M., Budd, A., Gibson, T.J., Davey, N.E., 2014. Short Linear Motifs: Ubiquitous and Functionally Diverse Protein Interaction Modules Directing Cell Regulation. *Chem. Rev.* 114, 6733–6778. <https://doi.org/10.1021/cr400585q>

Wen, L., Qiu, Y., Cheng, S., Jiang, X., Ma, Y.-P., Fang, W., Wang, W., Cui, J., Ruan, Q., Zhao, F., Hu, F., Luo, M.-H., 2018. Serologic and viral genome prevalence of HSV, EBV, and HCMV among healthy adults in Wuhan, China. *J. Med. Virol.* 90, 571–581. <https://doi.org/10.1002/jmv.24989>

Wiebusch, L., Neuwirth, A., Grabenhenrich, L., Voigt, S., Hagemeyer, 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. <https://doi.org/10.1128/JVI.01212-08>

Wileman, T., 2007. Aggresomes and Pericentriolar Sites of Virus Assembly: Cellular Defense or Viral Design? *Annu. Rev. Microbiol.* 61, 149–167. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090836>

Zacksenhaus, E., Bremner, R., Phillips, R.A., Gallie, B.L., 1993. A bipartite nuclear localization signal in the retinoblastoma gene product and its importance for biological activity. *Mol. Cell. Biol.* 13, 4588–4599. <https://doi.org/10.1128/MCB.13.8.4588>

Zhang, K., Lv, D.-W., Li, R., 2019. Conserved Herpesvirus Protein Kinases Target SAMHD1 to Facilitate Virus Replication. *Cell Rep.* 28, 449–459.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.04.020>

5) Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Max Schmidt, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Zellzykluskontrolle β -herpesviraler Kinasen“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet. Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht. Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Erstbetreuer, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte. Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

6) Ausführliche Anteilserklärung

Boris Bogdanow*, **Max Schmidt***, Henry Weisbach, Iris Gruska, Barbara Vetter, Koshi Imami, Eleonore Ostermann, Wolfram Brune, Matthias Selbach, Christian Hagemeyer & Lüder Wiebusch: „*Cross-regulation of viral kinases with cyclin A secures shutoff of host DNA synthesis*“

*) Ko-Erstautoren: Boris Bogdanow und Max Schmidt

Nat Commun 11, 4845 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18542-1>

Beitrag im Einzelnen:

Konzeption Aktive Beteiligung an der Konzeption der Experimente, die zu folgenden Abbildungen der o.g. Publikation führten: *1e-g, 2a-b, 2d, 3b-f, 4a-c, 5a-f*

Methoden Klonierungen mit den PCIneo- sowie PCGN-basierten Expressionsplasmiden; Rekonstitution des/ der genutzten Virus (-mutanten); Etablierung des Infektionssystems der Zentrifugationsverstärkung; Proteinabundanzmessung (inkl. Expressionskinetik viraler sowie zellulärer Proteine) und subzelluläre Fraktionierung; (Ko-) Immunpräzipitation; Zellkulturarbeiten auf S2-Niveau; praktische Durchführung der auf Transfektions- sowie Infektionsgeschehen basierenden Experimente (ausgenommen Transfektion für LC-MS/MS-Analysen, inkl. Infektion SILAC-markierter Zellen); praktische Durchführung der durchflusszytometrischen Analysen (inkl. Viruswachstumsassay, Zellzyklusanalyse, Mitoseassay)

Aktive Beteiligung an der Durchführung der Experimente, die zu folgenden Abbildungen der o.g. Publikation führten: *1e, 2b, 3b-d, 4a, 5a-d, 5f*

Auswertung Analyse, Auswertung und Darstellung der durchflusszytometrischen Analysen; Auswertung und Darstellung der immunfluoreszenzmikroskopischen Analysen infizierter Zellen; Analyse, Auswertung und Darstellung der subzellulären Fraktionierung; Analyse, Auswertung und Darstellung der viralen und zellulären Expressionskinetik

Aktive Beteiligung an der Auswertung der Experimente, die zu folgenden Abbildungen der o.g. Publikation führten: *1e-g, 2a-b, 2e, 3b-f, 4a-b, 5a-f, 6a*

Manuskript Planung und Verfassung des Manuskripts mit den darin enthaltenen Abbildungen gemeinsam mit Lüder Wiebusch und Boris Bogdanow

Unterschrift, Datum und Stempel des erstbetreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden

7) **Auszug aus der *Journal Summary List***

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2018** Selected Editions: SCIE,SSCI
 Selected Categories: **"MULTIDISCIPLINARY SCIENCES"** Selected Category
 Scheme: WoS

Gesamtanzahl: 69 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	NATURE	745,692	43.070	1.285010
2	SCIENCE	680,994	41.037	1.070190
3	National Science Review	1,842	13.222	0.006500
4	Science Advances	21,901	12.804	0.110010
5	Nature Communications	243,793	11.878	1.103290
6	Nature Human Behaviour	1,230	10.575	0.006550
7	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA	661,118	9.580	1.022190
8	Science Bulletin	3,569	6.277	0.009840
9	Scientific Data	3,240	5.929	0.015610
10	Frontiers in Bioengineering and Biotechnology	1,994	5.122	0.006540
11	Journal of Advanced Research	2,691	5.045	0.004780
12	Research Synthesis Methods	1,932	5.043	0.005420
13	GigaScience	2,674	4.688	0.012510
14	Annals of the New York Academy of Sciences	46,385	4.295	0.025840
15	Scientific Reports	302,086	4.011	1.061540
16	Journal of the Royal Society Interface	12,933	3.224	0.029190
17	NPJ Microgravity	203	3.111	0.000670
18	PHILOSOPHICAL TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY A-MATHEMATICAL PHYSICAL AND ENGINEERING SCIENCES	19,227	3.093	0.028200

8) Publikation

Boris Bogdanow*, **Max Schmidt***, Henry Weisbach, Iris Gruska, Barbara Vetter, Koshi Imami, Eleonore Ostermann, Wolfram Brune, Matthias Selbach, Christian Hagemeyer & Lüder Wiebusch:

„Cross-regulation of viral kinases with cyclin A secures shutoff of host DNA synthesis“

Nat Commun 11, 4845 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18542-1>

*) Ko-Erstautoren: Boris Bogdanow, Max Schmidt

Cross-regulation of viral kinases with cyclin A secures shutoff of host DNA synthesis

Boris Bogdanow^{1,5,9}, Max Schmidt^{2,6,9}, Henry Weisbach^{2,7}, Iris Gruska², Barbara Vetter², Koshi Imami^{1,8}, Eleonore Ostermann³, Wolfram Brune³, Matthias Selbach^{1,4}, Christian Hagemeyer² & Lüder Wiebusch²✉

Herpesviruses encode conserved protein kinases (CHPKs) to stimulate phosphorylation-sensitive processes during infection. How CHPKs bind to cellular factors and how this impacts their regulatory functions is poorly understood. Here, we use quantitative proteomics to determine cellular interaction partners of human herpesvirus (HHV) CHPKs. We find that CHPKs can target key regulators of transcription and replication. The interaction with Cyclin A and associated factors is identified as a signature of β -herpesvirus kinases. Cyclin A is recruited via RXL motifs that overlap with nuclear localization signals (NLS) in the non-catalytic N termini. This architecture is conserved in HHV6, HHV7 and rodent cytomegaloviruses. Cyclin A binding competes with NLS function, enabling dynamic changes in CHPK localization and substrate phosphorylation. The cytomegalovirus kinase M97 sequesters Cyclin A in the cytosol, which is essential for viral inhibition of cellular replication. Our data highlight a fine-tuned and physiologically important interplay between a cellular cyclin and viral kinases.

¹Research group “Proteome Dynamics”, Max Delbrück Center for Molecular Medicine, 13125 Berlin, Germany. ²Labor für Pädiatrische Molekularbiologie, Charité Universitätsmedizin Berlin, 13353 Berlin, Germany. ³Heinrich Pette Institute, Leibniz Institute for Experimental Virology, 20251 Hamburg, Germany. ⁴Charité-Universitätsmedizin Berlin, 10117 Berlin, Germany. ⁵Present address: Research group “Structural Interactomics”, Leibniz Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie, 13125 Berlin, Germany. ⁶Present address: Medizinische Klinik m.S. Hämatologie, Onkologie und Tumorummunologie, Charité Universitätsmedizin Berlin, 12200 Berlin, Germany. ⁷Present address: PenCef Pharma GmbH, 13509 Berlin, Germany. ⁸Present address: Laboratory of Molecular & Cellular BioAnalysis, Kyoto University, 606-8501 Kyoto, Japan. ⁹These authors contributed equally: Boris Bogdanow, Max Schmidt. ✉email: lueder.wiebusch@charite.de

Herpesviruses are a wide-spread family of large, double-stranded DNA viruses replicating within the nuclei of their host cells. Generally, herpesviruses are highly adapted to their hosts and persist in a latent mode of infection unless immunodeficiency provokes viral reactivation and disease¹. They have diversified into three subfamilies: neurotropic α -herpesviruses, broadly infective β -herpesviruses, and lymphotropic γ -herpesviruses. Despite their widely different pathogenic properties and clinical manifestations, all herpesviruses share a common set of conserved core genes, mostly encoding essential structural components and replication factors². Among the few core genes with regulatory function are the conserved herpesvirus protein kinases (CHPKs)³, which are medically important both as drug targets⁴ and as prodrug activating enzymes⁵.

CHPKs belong to the group of viral serine/threonine kinases⁶. Although possessing a considerable sequence divergence, CHPKs have a number of common characteristics including autophosphorylation, nuclear localization, incorporation into the tegument layer of virus particles, and phosphorylation of other tegument proteins⁶. CHPKs target regulators of the DNA damage checkpoint^{7,8}, phosphorylate the translational elongation factor EF-1 δ ⁹, and counteract the IRF3-dependent type I interferon response¹⁰.

CHPKs were reported to preferentially target cellular cyclin-dependent kinase (CDK) phosphorylation sites^{11,12}. In particular, the kinases of human β - and γ -herpesviruses show significant structural and functional homology to CDKs^{13–16}. This has led to their designation as viral CDK-like kinases (v-CDKs)¹³. V-CDKs lack amino acids that are known to be essential for interaction of cellular CDKs with cyclins, CDK inhibitors (CKIs) and CDK activating kinases (CAKs). Accordingly, v-CDKs are considered immune to cellular control mechanisms¹⁷, despite the fact that the UL97 kinase of human cytomegalovirus (human herpesvirus 5, HHV5) can physically interact with various cyclins¹⁸. V-CDKs mimic CDK1 and 2 in phosphorylating Lamin A/C^{13,14}, retinoblastoma-associated tumor suppressor RB1 (refs. 13,17,19), and deoxynucleoside triphosphate (dNTP) hydrolase SAMHD1 (refs. 20,21). Collectively, the CDK-like activities of CHPKs facilitate the nuclear egress of virus capsids²² and secure the supply of dNTPs and cellular replication factors for viral DNA replication^{20,23}.

Significant knowledge has accumulated over the recent years about CHPK functions. It is known that CHPKs can recruit cellular proteins as substrates via conserved docking motifs^{19,24}. Further, CHPKs can be regulated by their interaction partners and even exert kinase independent functions^{25,26}. However, a systematic analysis of CHPK protein–protein interactions is lacking and data linking interactions to functions of the kinase are scarce. To broaden our understanding of CHPKs, we used an affinity purification–mass spectrometry (AP–MS) approach and identified shared and differential interaction partners of CHPKs from all herpesvirus subfamilies. We found that Cyclin A–CDK complexes build a common set of interactors for β -herpesvirus v-CDKs. Taking mouse cytomegalovirus (MCMV, murid herpesvirus 1 (MuHV-1)) as a model system, we show that during infection the stoichiometric formation of cytoplasmic v-CDK and Cyclin A assemblies causes a global shift in substrate phosphorylation and the viral shutoff of host DNA synthesis. Collectively, our data demonstrates that herpesvirus kinases have evolved as protein–interaction hubs that can recruit a rich repertoire of cellular proteins. The functional versatility of β -herpesvirus v-CDKs is underpinned by their ability to cross-talk with a cellular cyclin via direct, non-catalytic interaction.

Results

CHPKs target key regulators of transcription and replication. Systems-level approaches have provided important insights into

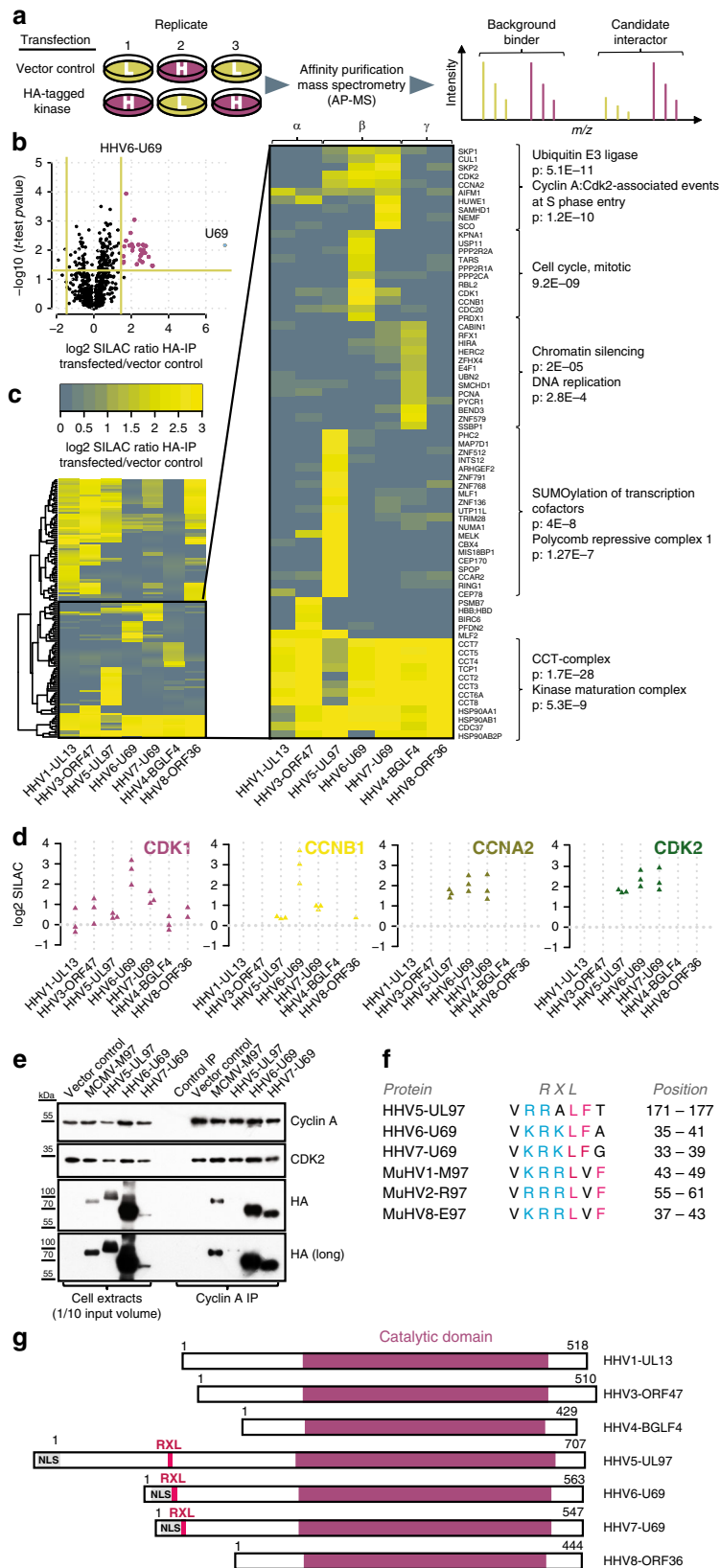
the molecular functions of CHPKs. For example, yeast 2-hybrid screens revealed several binary binding partners of CHPKs^{27,28} and phosphoproteome profiling was successfully used to assess CHPK substrate specificity^{7,12,29,30}. However, comprehensive and comparative information about CHPK interaction partners at the proteome level is lacking.

To identify CHPK interaction partners, we transfected SILAC (stable isotope labeling of amino acids in cell culture) heavy and light labeled HEK-293T cells with HA-tagged CHPKs of seven different human herpesviruses (HHVs) or vector controls. We performed these experiments in triplicates, including label-swaps (Fig. 1a), and subjected the samples to HA affinity purification (HA-AP) and shotgun proteomics. We specifically detected the baits in extracts of transfected cells and in eluates of HA-APs (Supplementary Fig. 1a, b). The baits were among the most abundant proteins in the eluates (Supplementary Fig. 1c), consistent with good enrichment. We observed an overall good reproducibility of SILAC fold-changes for the individual replicates (Supplementary Fig. 2a). To discriminate candidate interactors from background binders, they were required to fall below a *p*-value of 0.05 and meet a SILAC fold-change cut-off at 1% false discovery rate (FDR). (Fig. 1b, Supplementary Fig. 2b, c). We quantified about 1500–2000 proteins in individual samples (Supplementary Fig. 1d) and classified 135 proteins as candidate interaction partners to at least one kinase (Supplementary Data 1). This list includes several previously found CHPK interactors and substrates, such as SAMHD1 (ref. 20), RBL2 (ref. 31), PPP2CA, PUM1, PRDX1 (ref. 7), and NUMA1, TUBA1B, MAP7D1 (ref. 30).

We next aimed to determine interaction partners that were common to all kinases, class-specific (i.e., restricted to either kinases of α , β , or γ -classes) or unique to individual kinases. Therefore, we clustered the SILAC fold-changes of candidate interactors across all tested kinases (Fig. 1c). We found the chaperonin containing TCP1 and the kinase maturation complex (CDC37, HSP90) to co-purify with all kinases analyzed. This confirms the previous observation that CHPKs interact with the same set of cellular proteins that assist in folding and maturation of cellular kinases^{32,33}.

Proteins that co-purified with BGLF4 (HHV4, Epstein–Barr virus), but were not significantly enriched with other kinases, include factors involved in DNA replication (HERC2, E4F1, PCNA, SSBP1) and chromatin silencing (SMCHD1, CABIN1, HIRA, BEND3). Proteins that co-purified with pUL97 (HHV5) but not other kinases were functionally related to regulation of transcription (PHC2, RING1, CBX4, TRIM28, ZNF136, ZNF791). To validate our approach, we performed an additional SILAC AP–MS experiment directly comparing proteins enriched to BGLF4 and pUL97 (Supplementary Fig. 3a). Again, we found selective enrichment of the specific sets of host interactors described above to either BGLF4 or pUL97 (Supplementary Fig. 3b, Supplementary Data 2). By performing co-immunoprecipitation (co-IPs) experiments, we were able to validate the transcriptional regulators SPOP, CCAR2, BMI1, and TRIM28 as specific interactors of pUL97 (Supplementary Fig. 3c–f).

Importantly, we found that all human β -herpesvirus kinases co-purify with S/G2 phase-specific cyclins (Cyclin A, gene symbol: CCNA2, Cyclin B, gene symbol: CCNB1), CDKs (CDK1, CDK2), and associated proteins (SKP1, SKP2). While enrichment of Cyclin A–CDK2 was reproducibly strong, Cyclin B–CDK1 did not enrich with pUL97 in our transfection experiment (Fig. 1d). We were able to validate the interaction with Cyclin A–CDK2 by reverse co-IPs. Also, we observed this type of interaction for the homologous M97 kinase of MuHV-1, better known as MCMV (Fig. 1e). Collectively our interactome of human CHPKs provides a rich resource and suggests



that these kinases are crucially involved in the regulation of transcription, epigenetic remodeling, and cell cycle control. Cyclin A–CDK2 complexes build a common subset of interactors for β -herpesvirus kinases, suggesting important functional implications.

β -herpesvirus kinases bind cyclin–CDKs via NLS–RXL modules. β -herpesvirus kinases lack most of the residues of CDKs that directly interact with cyclins, including a conserved PSTAIRE helix¹⁷. Instead, we found RXL/Cy motifs in the N-terminal, non-catalytic parts of β -herpesvirus kinases (Fig. 1f–g). Such motifs

Fig. 1 **CHPKs target key regulators of cellular replication and transcription.** **a** Experimental setup. SILAC heavy and light labeled HEK-293T cells were transfected with constructs encoding HA-tagged versions of human herpesviral kinases or control vectors in triplicates ($n = 3$). Samples were subjected to anti-HA affinity purification followed by mass-spectrometry. **b** Candidate selection. Candidate interaction partners were distinguished from background binders based on a combination of the t -test p -value of three replicates and the mean of the SILAC ratios. P -value cut-off at 0.05 and fold-change cut-off at $FDR = 1\%$. A volcano plot for the HHV6-U69 kinase is exemplarily shown. **c** Cross-comparison of kinase interaction partners. All candidate interaction partners were compared for co-enrichment across the indicated kinases of α -, β -, and γ -HHVs. Enrichment profiles were clustered and selected sets of clusters were subjected to GO enrichment (inlet and brackets). **d** Cyclin-CDK complexes co-purify with β -herpesviral kinases. Depicted are the SILAC ratios of individual replicates ($n = 3$) for prey proteins CDK1, CCNB1, CCNA2, and CDK2 across AP-MS samples of the indicated kinases. **e** Validation of Cyclin A-CDK binding to β -herpesviral kinases. Whole cell extracts from transfected 293T cells were subjected to Cyclin A co-IP and analyzed by immunoblotting for the presence of Cyclin A, CDK2, and HA-tagged kinases. The immunoblots are representative of three independent experiments with similar results. **f** Alignment of putative Cyclin A binding sites in human and rodent β -herpesvirus kinases. Basic residues are highlighted in blue, bulky hydrophobic residues in pink. **g** Schematic of human herpesviral kinases. Shown are the location of the conserved catalytic domains and the relative positions of RXL/Cy motifs (pink) and predicted or experimentally validated nuclear localization signals (NLS) (gray) within the less-conserved N-terminal parts of the proteins.

are typically used for substrate and inhibitor recruitment to cyclin-CDKs³⁴. Importantly, the positions of the RXL-type sequences within the largely divergent N termini are well conserved (Supplementary Fig. 4). These putative Cyclin A binding elements in β -herpesvirus kinases of the roseolovirus (HHV6, HHV7) and muromegalovirus (MuHV1, MuHV2, MuHV8) genera are in close proximity to clusters of positively charged residues (Supplementary Fig. 4), which are predicted, and in the case of HHV6 validated, classical bipartite nuclear localization signals (NLS)³⁵. In fact, the C-terminal part of the NLS sequences directly overlaps with the N-terminal part of the RXL motifs (Fig. 2a). Thus, when we set out to test the contribution of RXL motifs in U69 and M97 to Cyclin A binding, we had to consider the possibility that RXL mutations may negatively affect NLS function. We therefore designed two mutant versions of each kinase: one disrupting the core of the RXL motif (RXL- > AXA) and one changing only the hydrophobic part (LF- > AA, LXF- > AXA), leaving the basic residues of the NLS intact (Fig. 2a). Both mutations abolished binding of M97 and U69 kinases to Cyclin A (Fig. 2b). Thus, RXL sequence motifs found in β -herpesvirus kinases act as Cyclin A docking sites. RXL mutation not only prevents Cyclin A binding but also interaction with other cyclin-associated factors found in the interactome analysis (Fig. 1c), as exemplarily shown for HHV6-U69 (Supplementary Fig. 5). This indicates that those factors are not direct v-CDK interactors but instead co-recruited with Cyclin A. Thus, the RXL motif triggers the formation of higher-order v-CDK-cyclin-CDK complexes.

We then assessed the consequences of RXL mutations for NLS function. To this end, we cloned 32–37 amino acid segments encompassing the overlapping NLS and RXL elements of M97 and U69 kinases into an NLS reporter construct³⁶ (Fig. 2c). Integration of wild-type (WT) NLS-RXL regions into the chimeric reporter induced nuclear accumulation of the otherwise cytoplasmic GFP signal (Fig. 2d, e), indicative of a functional NLS. RXL to AXA mutations weakened this activity in HHV6-U69 and even disrupted it in M97. By contrast, the NLS function remains intact when only the hydrophobic residues of the RXL/Cy motifs are mutated (Fig. 2d, e). These results demonstrate that cyclin binding and NLS sequences are integrated into a composite motif that can be functionally separated by mutations.

M97 assembles cyclin-CDK complexes in infected cells. We then aimed to analyze the NLS-RXL module in a representative infection system and chose MCMV for ease of manipulation. We first assessed the time-resolved protein interactome of M97 using SILAC and AP-MS (Supplementary Fig. 6a, Supplementary Data 3). Early during infection (12 h), the M97 interactome consisted almost exclusively of cyclins, CDKs, and associated

proteins (Supplementary Fig. 4b). In the late phase (36 h), additional viral and cellular factors co-purified with M97 (Supplementary Fig. 4d), including M50–M53, the nuclear egress complex of MCMV³⁷, and Lin54, the DNA-binding subunit of the cell cycle regulatory MuvB complex³⁸, which is known to be regulated by pUL97 (ref. 39). Taken together, this indicates that M97 functions in cell cycle regulation, viral egress, and control of gene expression.

In consistency with the data from transfected cells, M97 interacted with Cyclin A/B-CDK complexes throughout infection (Fig. 3a, Supplementary Fig. 6b,d). In particular, Cyclin A-CDK2 was present in similar molar amounts as M97 itself in HA-M97 MS samples (Supplementary Fig. 6c, e), suggesting a strong and stoichiometric interaction in infected cells. Mutation of the RXL/Cy motif (Supplementary Fig. 5) disrupted the interaction of Cyclin A with M97 (Fig. 3c, d). However, these mutations did not influence Cyclin A protein levels (Fig. 3b) or Cyclin A-associated kinase activity (Fig. 3f). Moreover, RXL/Cy mutations, in contrast to the “kinase dead” K290Q mutation²³, did not compromise M97 levels and activity (Fig. 3b, e). Thus, M97-Cyclin A binding has no influence on abundance and enzymatic activity of the involved interaction partners. This is consistent with the view that β -herpesviral CHPKs are cyclin-independent kinases¹⁷.

Cyclin binding controls subcellular localization of M97. In respect of the overlapping NLS and RXL/Cy motifs within M97, we next tested whether Cyclin A binding alters the subcellular localization of M97. To address this, we chose a system where Cyclin A levels are dynamically changing. In quiescent cells, Cyclin A is absent at very early time points of infection (Fig. 3b) and induced between 6 and 24 h by MCMV (Fig. 3b). Using immunofluorescence microscopy, we observed that M97-WT is nuclear at 8 h post infection (Fig. 4a), when Cyclin A is still low, but redistributes to a predominantly cytoplasmic localization pattern at 24 and 48 h post infection (Fig. 4a, middle left column), when Cyclin A levels are high. Thus, the appearance of M97 in the cytosol correlates with increased Cyclin A expression.

Then we tested the contribution of the RXL/NLS module to the time dependent change in M97 localization. When the NLS function was disrupted by R45A/L47A mutation, M97 was confined to the cytoplasm throughout infection (Fig. 4a, b, middle right column). By contrast, when the NLS part of the NLS-RXL module was left intact and only Cyclin binding was prevented (L47A/F49A), M97 showed a constitutively nuclear localization pattern (Fig. 4a, b, right column). Thus, Cyclin A binding is responsible for the late relocalization of M97. This provides evidence for a scenario, where Cyclin A masks the NLS and thereby effectively interferes with nuclear entry of M97.

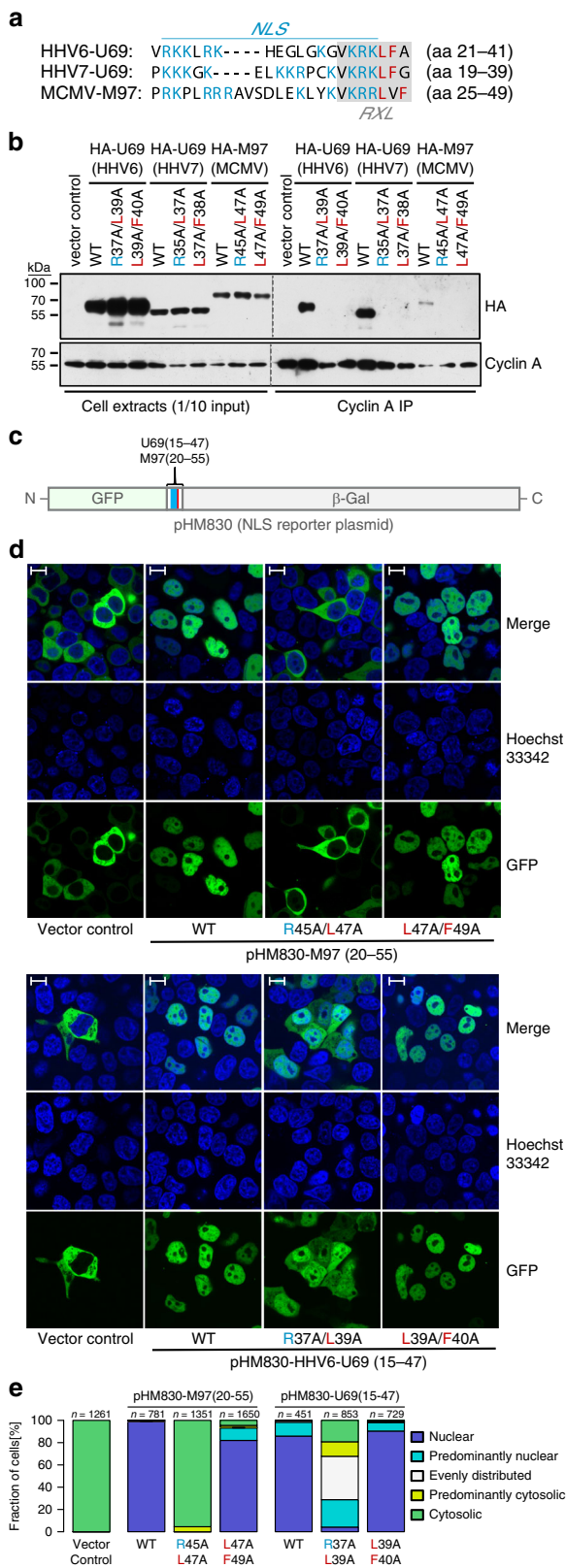


Fig. 2 NLS and RXL/Cy motifs overlap in U69 and M97 kinases.

a Sequence alignment of overlapping NLS-RXL elements in M97 and U69 kinases. Stretches of basic residues characteristic for nuclear localization signals (NLS) are highlighted in blue, conserved leucine and phenylalanine residues participating only in the RXL/Cy motif in pink. A mutation strategy was designed to separate NLS function from cyclin binding. RXL-AXA mutations affect both RXL and NLS sequences, LXF-AXA and LF-AA mutations only the RXL/Cy motif. **b** HEK-293T cells were transfected with HA-tagged wild-type (WT) or mutant forms of U69 and M97 kinases. Cyclin A co-IP was carried out at 2 days post transfection and analyzed by immunoblotting for the presence of viral kinases and Cyclin A. The immunoblots are representative of three independent experiments with similar results. **c** Sequence fragments encompassing the NLS-RXL region of U69/M97 mutant and wild-type kinases were cloned between and in-frame with the green fluorescent protein (GFP) and β -galactosidase genes in pHM830. **d, e** 293T cells were transfected with the M97/U69-NLS reporter constructs, as indicated. The subcellular localization of GFP was analyzed at 24 h post transfection using confocal live-cell imaging microscopy. Nuclei were counterstained with Hoechst-33342. Scale bars: 10 μ m. **e** The indicated number of cells were categorized based on the subcellular localization of the GFP reporter relative to the Hoechst stain.

We globally assessed substrate phosphorylation by performing a proteomic analysis of phosphopeptides and whole cell lysates of SILAC-labeled cells at 24 h post infection (Supplementary Fig. 8a, Supplementary Data 4).

First, we corrected phosphosite ratios for protein level changes (Supplementary Fig. 8b, c). Next, we categorized proteins and corresponding phosphosites based on their GO annotation as nuclear, cytoplasmic or unclear (“no category”) (Supplementary Fig. 8d). Then, we specifically analyzed phosphosites that match known v-CDK target motifs¹², such as pSP, pSXXX, LXpSP (p denotes the phosphorylated residue). When cells were infected with M97^{R45A/L47A} mutant, pS/TP and pSXXX sites residing in the cytosol were significantly stronger phosphorylated than nuclear sites (Fig. 4c). By contrast, when cells were infected with the M97^{L47A/F49A} mutant, the same set of sites were stronger phosphorylated when they belonged to nuclear proteins. The most pronounced differences in the target spectrum were observed when phospho-serines followed by prolines were positioned between hydrophobic amino acids and lysines (Supplementary Fig. 8e). Collectively, these data argue that Cyclin A binding enables switch-like changes in the substrate spectrum and subcellular distribution of M97.

M97 inhibits host DNA synthesis by Cyclin A sequestration.

The binding of M97 to Cyclin A may have functional consequences not only for M97 but also for Cyclin A. Cyclin A is essential for cellular DNA replication and cell cycle progression from S phase to mitosis⁴⁰. Importantly, Cyclin A function depends on its nuclear localization^{41,42}. Therefore, we analyzed whether M97 binding impacts the subcellular distribution of Cyclin A. We found Cyclin A, and to a lesser extent CDK2, to be depleted from the nucleus in MCMV-WT-infected cells (Fig. 5a). This effect was Cyclin A specific as Cyclin E was evenly distributed between nuclear and cytoplasmic fractions. Mutation of the M97 translation start site prevented the cytoplasmic enrichment of Cyclin A. Mutations of the RXL/Cy motif in M97 even led to a predominant nuclear localization of Cyclin A. Thus, Cyclin A is sequestered within the cytosol dependent on its binding to M97.

This observation prompted us to investigate whether the nuclear depletion of Cyclin A by M97 affects cell cycle

Next, we studied how the dynamic and Cyclin A-dependent relocalization of M97 impacts protein phosphorylation. Therefore, we compared cells that were either infected with RXL deficient MCMV-M97^{L47A/F49A} or NLS-RXL deficient MCMV-M97^{R45A/L47A}. The two mutant viruses reflect the early nuclear or late cytosolic localization of M97 during MCMV-WT infections.

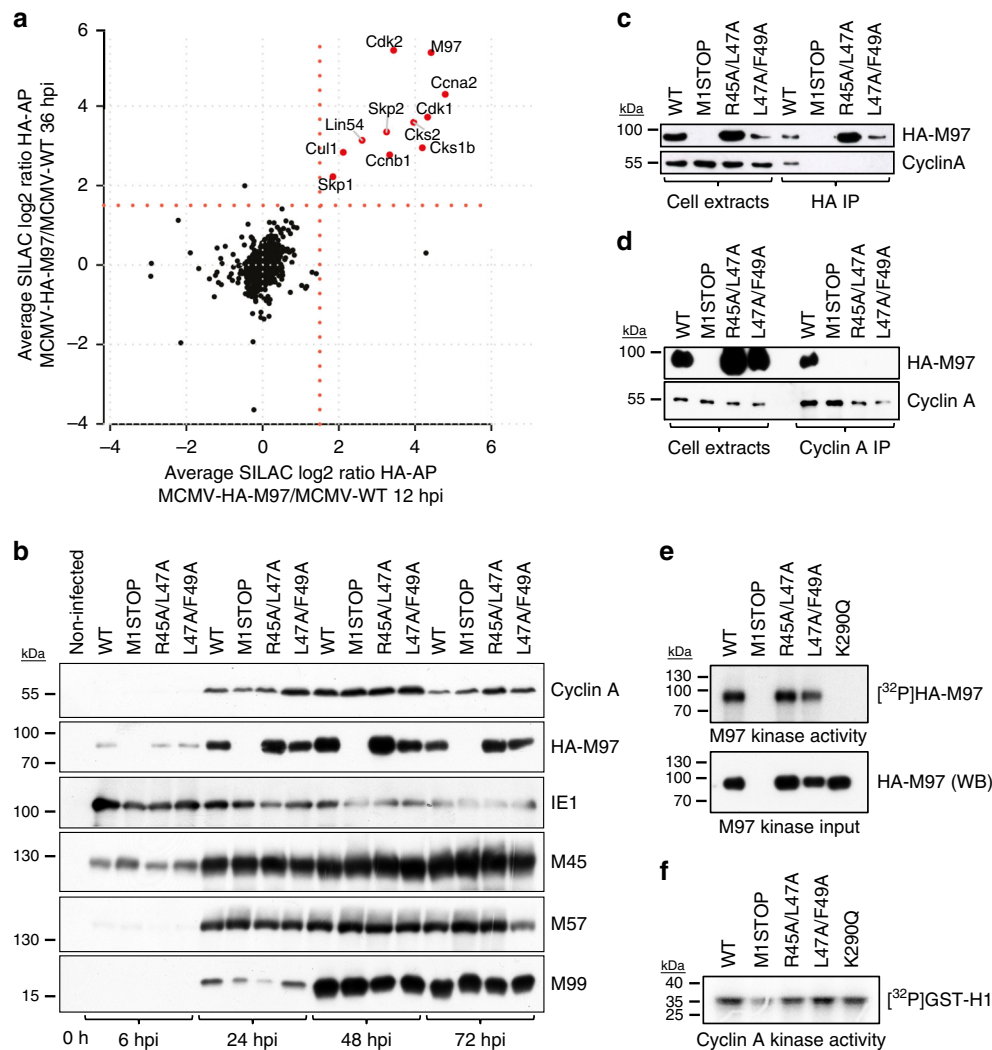


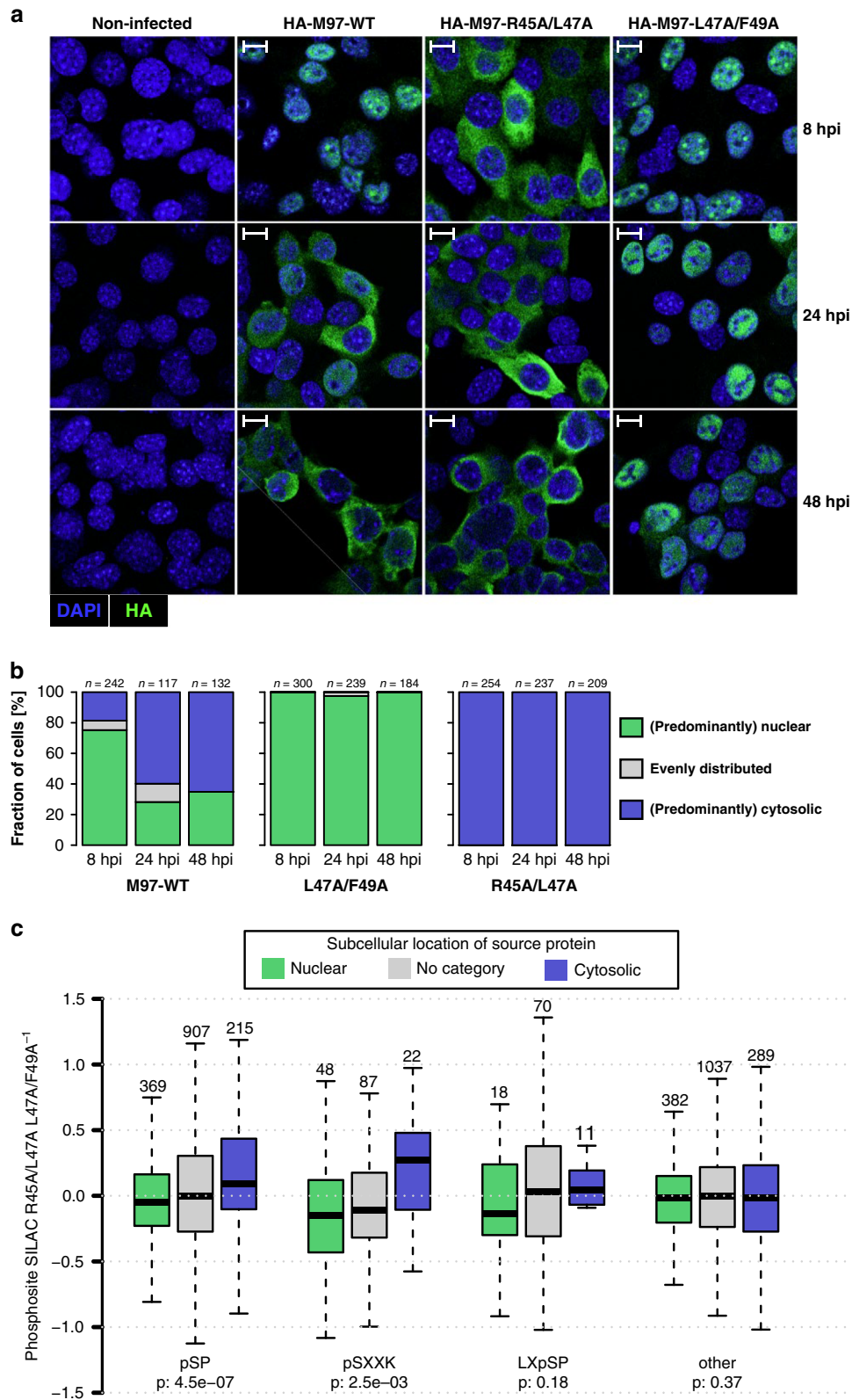
Fig. 3 Formation of M97-cyclin-CDK assemblies during infection. **a** A time-resolved interactome of M97 during MCMV infection (Supplementary Fig. 6). Enrichment ratios for proteins co-purifying with HA-M97 at 12 or 36 h post infection in a scatterplot. The cut-off at SILAC fold-change 1.5 is indicated by a red dotted line. The mean of $n = 3$ replicates is depicted. **b–f** Serum-starved 3T3 fibroblasts were infected with the indicated MCMV-HA-M97 variants. **b** The expression of Cyclin A and of selected immediate-early, early and late MCMV gene products was monitored by immunoblot analysis. Affinity purification of the indicated HA-M97 variants by anti-HA-coupled paramagnetic microbeads (**c**) or reverse co-IP (**d**) confirms RXL/Cy-dependent interaction with Cyclin A-CDK2. Assays for M97 (**e**) and Cyclin A (**f**) enzymatic activity. Lysates from MCMV-infected 3T3 fibroblasts were subjected to anti-HA-IP (**e**) or Cyclin A-IP (**f**) and used as input material for γ -P32-ATP kinase assay. Recombinant Histone H1 was used as RXL/Cy-independent Cyclin A substrate and autophosphorylation of M97 was measured for the M97 kinase assay. Incorporation of γ -P32-ATP was visualized by autoradiography. The immunoblots (**b–f**) and autoradiograph (**f**) are representative of three independent experiments with similar results.

progression. Therefore, we measured the DNA content of quiescent fibroblasts infected with WT and M97 mutant viruses by flow cytometry (Fig. 5b, c, Supplementary Fig. 9). We found a ganciclovir-sensitive increase of viral DNA in MCMV-WT-infected cells, consistent with previous reports⁴³. By contrast, M97 mutant viruses caused a rapid and ganciclovir-resistant accumulation of cells with a G2/M DNA content. The latter phenotype was reversed by stable and efficient knockdown of Cyclin A (Supplementary Fig. 10). These observations demonstrate that loss of M97–Cyclin A interaction causes S phase entry and cell cycle progression to G2/M phase.

We aimed to confirm the crucial role of M97–Cyclin A interaction for inhibition of cellular DNA synthesis by an orthogonal approach. We chose to combine EdU pulse labeling and fluorescence microscopy to spatially discriminate sites of

active viral or cellular DNA synthesis. In MCMV-WT-infected cells, DNA synthesis is confined to nuclear replication compartments that stain positive for the viral single-stranded DNA-binding protein M57 (Fig. 5d, e). By contrast, cells infected with M97-RXL/Cy mutants incorporated EdU in foci distributed over the whole nucleus, indicating that the restriction of cellular DNA replication was lost. Thus, M97–Cyclin A complex formation serves as a mechanism to shut off competing host DNA synthesis during productive infection.

Very similar results were obtained in primary, non-immortalized mouse embryonic fibroblasts (MEF), the only difference being that here the RXL/Cy mutation leads to a cellular DNA content that exceeds the normal 4n DNA content of diploid G2/M cells (Supplementary Fig. 11). This indicates that the M97 mutant virus bypasses cellular control mechanisms protecting primary cells from DNA over-replication.



Although M97 is not essential for MCMV in vitro, its deletion negatively affects virus growth⁴⁴. When we tested our set of M97 mutants on MEFs, a virus growth curve analysis revealed that the NLS-RXL module has a larger impact on virus replication than the kinase activity itself (Fig. 5f). This underlines the importance of nonenzymatic protein–protein interactions for the proper function of conserved β -herpesvirus kinases during the virus life cycle.

Discussion

Here, we present the first comparative analysis of CHPK interactomes. Our analysis led to the identification of host–protein interaction signatures that are common, class-specific or unique to CHPKs (Fig. 1c). The interaction of β -herpesvirus-CHPKs with Cyclin A orchestrates higher-order complex formation of cell cycle regulatory factors (Fig. 3). Notably, the interaction is

Fig. 4 The RXL-NLS module controls M97 localization and substrate phosphorylation. **a** Serum-starved 3T3 fibroblasts were infected with the indicated MCMV-HA-M97 variants or left uninfected. At 8, 24, and 48 h post infection, cells were examined by confocal immunofluorescence microscopy for subcellular localization of HA-M97 (green). Nuclei were counterstained with DAPI. Scale bars: 10 μ m. Representative images are shown. **b** The indicated number of cells were categorized based on the subcellular localization of HA-M97 relative to the DAPI stain. **c** SILAC-labeled 3T3 cells were serum starved and infected with NLS-RXL/Cy-deficient M97^{R45A/L47A} or RXL/Cy-deficient M97^{L47A/F49A} viruses (Supplementary Fig. 6). At 24 h post infection cells were harvested and subjected to a phosphoproteomic workflow. Boxplots for phosphosites that belong to proteins with nuclear, cytoplasmic, or uncategorized subcellular GO annotation are depicted with their SILAC log₂ fold-change between M97^{R45A/L47A} and M97^{L47A/F49A} infection. pSP, pSXXK, LxpSP, or all other sites were assessed individually. Center line, median; box limits, upper and lower quartiles; whiskers, 1.5 \times interquartile range; outliers (data points outside the whiskers) were removed for visibility. *P*-values are based on an one-sided Wilcoxon rank-sum test comparing nuclear and cytosolic subsets. Data represent the mean of *n* = 2 replicates.

regulatory and has functional consequences for both, the CHPK and Cyclin A. For MCMV, it results in the dynamic relocation of the viral kinase (Fig. 4a) and consequently an altered substrate spectrum (Fig. 4b). Further, the interaction leads to cytosolic sequestration of Cyclin A, which is essential for viral arrest of DNA replication (Fig. 5).

V-CDKs are a subset of CHPKs that share key aspects of host CDK-function and the ability to complement for CDK activity in yeast cells^{13,14,17}. V-CDKs have lost sequence features enabling control by cellular factors, such as CAK, CKI, and cyclins¹⁷. Instead, we show that some v-CDKs acquired RXL motifs (Fig. 1), which are typically used by cellular CDK substrates and inhibitors for recognition by cyclins^{34,45}. These motifs enable a regulatory cross-talk of Cyclin A and v-CDKs, which is characterized by cell cycle dependent regulation of the viral kinase on the one hand (Fig. 4) and neutralization of Cyclin A in stoichiometric protein assemblies on the other hand (Fig. 5, Supplementary Figs. 6 and 10, 11). The latter effect of v-CDK–Cyclin A interaction is reminiscent of CKI function. Thus, we propose that β -herpesviruses integrate the antipodal activities of CDKs and CKIs on one gene product. This combination allows a β -herpesvirus kinase like M97 to activate S/G2 metabolism²³ while inhibiting cellular DNA synthesis (Fig. 5).

An exception among human β -herpesviruses is HCMV, which has evolved a different gene product for neutralization of Cyclin A. HCMV produces the small protein pUL21a, which targets Cyclin A for proteasomal degradation^{46,47}. Therefore, it seems that HCMV has shifted its Cyclin A-antagonistic, CKI function from its kinase to pUL21a. In that context it is interesting that the RXL motif in HCMV-pUL97 does not overlap with an NLS⁴⁸, suggesting an alternative function of pUL97–Cyclin A interaction (Fig. 1).

Short linear motifs (SLiMs) can be rapidly acquired by viruses and other pathogens to target host proteins^{49,50}. Here, we found that within HHV6, HHV7, and rodent CMV kinases two such SLiMs are fused into one regulatory sequence element (Fig. 2). The physical overlap of RXL/Cy and NLS motifs is facilitated by their sequence composition as both contain contiguous stretches of basic amino acids. NLS motifs function as docking sites for nuclear import factors, mainly importin- α ⁵¹. Accordingly, a docking competition mechanism makes binding to Cyclin A and nuclear localization of M97 mutually exclusive, enabling switch-like changes in viral kinase function (Fig. 6a). This puts β -herpesvirus kinases in a row with a number of cellular and viral proteins known to control nucleo-cytoplasmic localization via intermolecular NLS-masking, with NF- κ B as the best understood example⁵².

Remarkably, composite NLS-RXL/Cy elements are apparent in a number of key regulatory proteins of the host cell cycle. Although independently described, NLS and RXL/Cy motifs are overlapping in RB1 (refs. 53,54), CDKN1A (also known as p21)^{45,55}, E2F1 (refs. 56,57), and CDT1 (refs. 58,59) (Fig. 6b). This feature is highly conserved in vertebrate orthologues (Supplementary Fig. 12). For

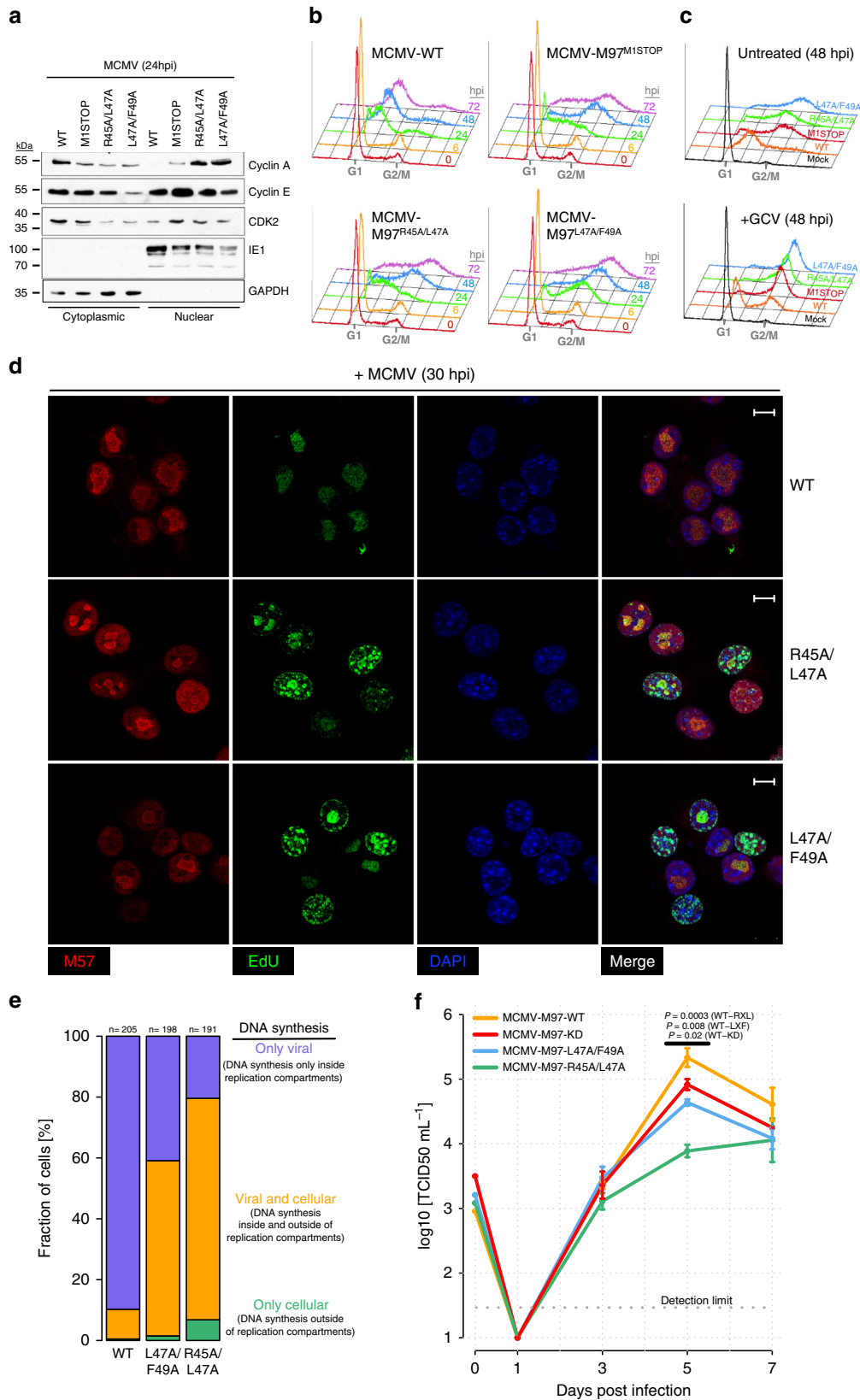
these cellular factors, it could be important to consider a docking competition between Cyclin A and importins, a possibility which is so far unexplored. Specifically, cyclin binding may be essential for the cell cycle dependent localization of these proteins^{57,60,61}. In other cases, such as CDC6, RXL motifs are adjacent to but not overlapping with NLS. There, Cyclin A recruits CDKs to neutralize the NLS by phosphorylation⁶².

In addition to the functionally important interaction of β -herpesvirus kinases with Cyclin/CDKs, our unbiased proteomic survey indicates that CHPKs interact with many more cellular proteins (Fig. 1c, Supplementary Data 1). Consistent with previous reports, many CHPK interaction partners are functionally related to DNA repair⁷ and cell cycle control¹³. Remarkably, we found that CHPKs also interact with a variety of prominent transcriptional repressor complexes. For example, pUL97 interacts with TRIM28-ZNF complexes (Fig. 1c, Supplementary Fig. 3e), known to silence CMV gene expression in stem cells depending on the phosphorylation status of TRIM28 (ref. 63). In addition, pUL97 co-purifies with PHC2, RING1, CBX4, and BMI1 (Fig. 1c, Supplementary Fig. 3f), all members of the polycomb repressive complex 1, which was recently linked to control of HCMV replication⁶⁴. Likewise, we found BGLF4 to interact with core subunits of the HIRA histone chaperone complex (HIRA, CABIN1, and UBN2). This complex restricts lytic infection by depositing histone H3.3 on incoming herpesvirus genomes⁶⁵. Collectively, these data indicate that CHPKs can target host-derived master regulators of viral transcription, governing the decision between lytic and latent infection programs. This could allow tegument-delivered CHPKs to actively influence the outcome of herpesvirus infections.

Our interactome analysis indicates that CHPKs target master regulators involved in host replication, DNA repair, and transcription. It is important to note that this type of experiment cannot resolve protein interactions that depend on the environment of an infected cell. For example, CHPKs may be differentially abundant, differently modified, differently folded, or differently localized in transfected compared to infected cells. It is thus critical to interpret our findings in the broader context of kinase-associated functions that dynamically change during infection. For instance, phosphorylation of the nuclear protein SAMHD1 could be maintained by the M97 kinase early during infection²³ when M97 localizes nuclear (Fig. 4a). During later stages of infection, the nuclear lamina is locally disassembled and egress of viral capsids to the cytoplasm occurs. The shift from nuclear replication to cytosolic assembly is accompanied by the concurrent relocation of the viral kinase. Thus, Cyclin A interaction helps the kinase to exert infection stage-specific functions.

Methods

Cells. HEK-293T cells and NIH-3T3 fibroblasts were cultivated in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% fetal (293T) or newborn (3T3) bovine serum, 2 mM L-alanyl-L-glutamine, 100 U mL⁻¹ penicillin, and



100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ streptomycin. Where indicated, cells were synchronized in G0/G1 phase by 48 h growth factor deprivation (0.05% serum). In preparation for proteomic analysis, cells were SILAC-labeled for at least five passages using lysine and arginine-depleted DMEM, supplemented with 10% dialyzed serum (cut-off: 10 kDa), 200 mg/L L-proline (only cells destined for phosphoproteome analysis), heavy (L-[$^{13}\text{C}_6$, $^{15}\text{N}_2$]-lysine (Lys8), L-[$^{13}\text{C}_6$, $^{15}\text{N}_4$]-arginine (Arg10)), medium (L-[$^2\text{H}_4$]-lysine (Lys4), L-[$^{13}\text{C}_6$]-arginine (Arg6)) or light (natural lysine (Lys0) and

arginine (Arg0)) amino acids. Labeling efficiency and arginine-proline conversion was checked using LC-MS/MS.

Viruses. Viruses were derived from the m129-repaired MCMV strain Smith bacterial artificial chromosome (BAC) pSM3fr-MCK-2f⁶⁶. Infections were carried out at 37 °C under conditions of centrifugal enhancement. In brief, after a virus

Fig. 5 M97 causes shutoff of host DNA synthesis by Cyclin A sequestration. Serum-starved 3T3 cells were infected with the indicated recombinant viruses and subjected to subcellular fractionation (**a**), cell cycle analysis (**b, c**), or confocal microscopy (**d**). **a** The levels of Cyclin A, E, and Cdk2 proteins was determined at 24 h post infection in nuclear and cytosolic fractions by immunoblotting. The soluble viral nuclear protein IE1 and the cytosolic marker GAPDH served as controls. The immunoblots are representative of three independent experiments with similar results. **b, c** The DNA content of infected cells was analyzed by propidium iodide staining followed by flow cytometry and plotted as DNA histograms. **b** The accumulation of viral and cellular DNA was monitored over the time course of infection. **c** To discriminate viral from cellular DNA replication, infected cells were treated with ganciclovir (GCV) or left untreated. **d, e** At 30 hpi, infected cells were pulse-labeled with EdU. EdU staining via click-chemistry (green fluorescence) served to determine sites of cellular and viral DNA synthesis. EdU was combined with immunofluorescence detection of the viral replication factor M57 (red fluorescence) that marks sites of viral DNA synthesis. DAPI was used for nuclear counterstaining (blue fluorescence). Scale bars: 10 μ m. **e** The indicated number of cells were categorized based on the (co-)localization of EdU and M57 fluorescence within the nucleus. **f** Mouse embryonic fibroblasts were infected with the indicated viruses at an MOI of 0.02. At the indicated days post infection, the infectious supernatant was harvested and subjected to virus titration. Means (center of the error bars) and standard errors of the mean of $n = 3$ (3, 5, 7 days post infection) biological replicates are depicted. For 0 days post infection: $n = 2$. Two-sided t -tests without multiple hypothesis correction were performed comparing the indicated viruses at 5 days post infection.

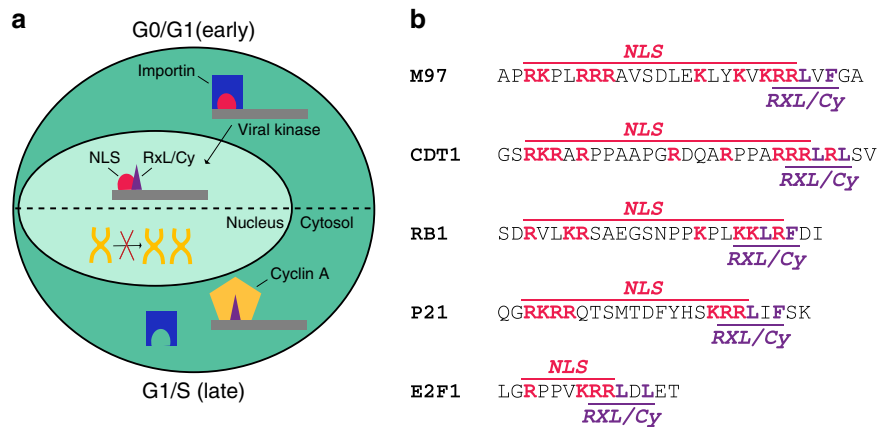


Fig. 6 The NLS-RXL module is conserved across several cell cycle regulators. **a** A model summarizing the function of the NLS-RXL/Cy module in infected cells. In the absence of Cyclin A (G0/G1, early), the NLS of M97 is functional and M97 is imported into the nucleus. MCMV induces Cyclin A and drives the cell cycle towards an S-phase environment (G1/S, late). Cyclin A binds to the RXL/Cy motif on M97 and masks the NLS, leading to cytosolic accumulation of M97-Cyclin A complexes. Cellular DNA synthesis is inhibited due to mislocalized Cyclin A. **b** Conservation of RXL/Cy-NLS modules across several cellular cell cycle regulatory proteins. The depicted sequences are of human origin.

adsorption period of 30 min, cell cultures were centrifuged for 30 min at 1000 g. Then, the virus inoculum was replaced by fresh medium. Virus titers were determined by flow cytometry of IE1 fluorescent cells at 6 h post infection or by using the median tissue culture infective dose (TCID₅₀) method. Unless otherwise stated, a multiplicity of infection (MOI) of 5 IE protein forming units (IU) per cell was used for experiments.

Bacmids. MCMV-HA-M97 and MCMV-M97-K290Q have been described recently²³. R45A/L47A, L47A/F49A, and M1STOP mutations were introduced into MCMV-HA-M97 by traceless BAC mutagenesis⁶⁷. The oligonucleotide primers used for BAC mutagenesis are specified in Supplementary Data 5. All mutants were controlled by diagnostic PCR and sequencing (Supplementary Fig. 5). To reconstitute infectious virus, BACs together with pp71 expression plasmid were transfected into 3T3 fibroblasts using an Amaxa nucleofector (Lonza).

Plasmids. PCGN-based expression plasmids for HA-tagged HHV1-UL13, HHV3-ORF47, HHV4-BGLF4, HHV5-UL97, HHV6-U69, HHV7-U69, and HHV8-ORF36 (Addgene plasmids #26687, #26689, #26691, #26693, #26695, #26697, #26698) were gifts from Robert Kalejta¹³. PCIneo-3HA-M97 was used as expression plasmid for HA-tagged M97 (ref. 23). RXL/Cy mutations were introduced by site-directed inverse PCR-mutagenesis (primers, see Supplementary Data 5). PHM830 (Addgene plasmid #20702) was a gift from Thomas Stamminger³⁶. Fragments encompassing the NLS-RXL/Cy modules of M97 and U69 were PCR-amplified and cloned between NheI and XbaI sites of pHM830 (primers listed in Supplementary Data 5). Plasmids were confirmed by Sanger sequencing and purified by cesium chloride-ethidium bromide equilibrium centrifugation. PEI MAX (Polysciences), transfection grade linear polyethylenimine hydrochloride with a molecular weight of 40 kDa, was used for transfection.

Phosphopeptide enrichment. SILAC-labeled cells were harvested 24 h post MCMV infection via scraping. Cells were lysed with 6 M urea/2 M thiourea in 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0. Samples were reduced with 10 mM dithiothreitol (DTT) and alkylated with 50 mM iodoacetamide for 30 min in the dark. Proteins were

digested by lysyl endopeptidase (Wako Pure Chemicals) at an enzyme-to-protein ratio of 1:100 (w/w) for 3 h. Subsequently, samples were diluted with 50 mM ammonium bicarbonate to a final concentration of 2 M urea. Digestion with proteomics-grade modified trypsin (Promega) was performed at an enzyme-to-protein ratio of 1:100 (w/w) under constant agitation for 16 h. Enzyme activity was quenched by acidification with trifluoroacetic acid (TFA). The peptides were desalted with C18 Stage Tips prior to nanoLC-MS/MS analysis (whole cell lysate samples). An aliquot of the whole cell lysates were further processed for phosphopeptide enrichment. The tryptic digests corresponding to 200 μ g protein per condition were desalted with big C18 Stage Tips packed with 10 mg of ReproSil-Pur 120 C18-AQ 5- μ m resin (Dr. Maisch GmbH). Peptides were eluted with 200 μ L loading buffer, consisting of 80% acetonitrile (ACN) and 6% TFA (vol/vol). Phosphopeptides were enriched using a microcolumn tip packed with 0.5 mg of TiO₂ (Titansphere, GL Sciences). The TiO₂ tips were equilibrated with 20 μ L of loading buffer via centrifugation at 100 g. 50 μ L of each sample were loaded on a TiO₂ tip via centrifugation at 100 g and this step was repeated until all the sample was loaded. The TiO₂ column was washed with 20 μ L of the loading buffer, followed by 20 μ L of 50% ACN/0.1% TFA (vol/vol). The bound phosphopeptides were eluted using successive elution with 30 μ L of 5% ammonium hydroxide and 30 μ L of 5% piperidine. Each fraction was collected into a fresh tube containing 30 μ L of 20% formic acid. 3 μ L of 100% formic acid was added to further acidify the samples. The phosphopeptides were desalted with C18 Stage Tips prior to nanoLC-MS/MS analysis.

Affinity purification. At 12 and 36 h post infection (M97 interactome) or 1 day post transfection (HHV kinases interactomes), cells were harvested by scraping in PBS. After centrifugation at 300 g, cell pellets were lysed in 25 mM Tris-HCl (pH 7.4), 125 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1% Nonidet P-40, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 5% glycerol, 1 mM DTT, 2 μ g mL⁻¹ aprotinin, 10 μ g mL⁻¹ leupeptin, 1 μ M pepstatin, 0.1 mM Pefabloc. For HA-AP, a μ MACS HA isolation kit (Miltenyi Biotec) was employed according to the manufacturer's instructions, with the following modifications. Lysates were incubated with the magnetic beads for 1 h and SILAC labels were mixed right before the lysates were applied to the column. Lysis buffer was used for the first washing step, lysis buffer without detergent for the

second and 25 mM Tris-HCl (pH 7.4) for the final washing step. Samples were eluted in a total volume of 0.2 mL 8 M guanidine hydrochloride at 95 °C. Proteins were precipitated from the eluates by adding 1.8 mL LiChrosolv ethanol and 1 µL GlycoBlue. After incubation at 4 °C overnight, samples were centrifuged for 1 h at 4 °C and ethanol was decanted before samples were resolved in 6 M urea-2 M thiourea buffer. Finally, samples were reduced, alkylated, digested, and desalted as described above (phosphoproteomics).

NanoLC-MS/MS analysis. Phosphopeptides and peptides from whole cell lysates were separated on a MonoCap C18 High Resolution 2000 column (GL Sciences) at a flow rate of 300 nL/min. 6 and 4 h gradients were performed for whole cell peptides and phosphopeptides, respectively. Peptides from HA-AP samples were separated on 45 min, 2 or 4 h gradients with a 250 nL/min flow rate on a 15 cm column (inner diameter: 75 µm), packed in-house with ReproSil-Pur C18-AQ material (Dr. Maisch GmbH). A Q Exactive Plus instrument (Thermo Fisher) was operated in the data-dependent mode with a full scan in the Orbitrap followed by 10 MS/MS scans, using higher-energy collision dissociation. For whole proteome analyses, the full scans were performed with a resolution of 70,000, a target value of 3×10^6 ions, a maximum injection time of 20 ms and a 2 m/z isolation window. The MS/MS scans were performed with a 17,500 resolution, a 1×10^6 target value and a 60 ms maximum injection time. For phosphoproteome analysis, the full scans were performed with a resolution of 70,000, a target value of 3×10^6 ions and a maximum injection time of 120 ms. The MS/MS scans were performed with a 35,000 resolution, a 5×10^5 target value, 160 ms maximum injection time and a 2 m/z isolation window. For AP-MS of M97 interactomes, full scans were performed at a resolution of 70,000, a target value of 1×10^6 and maximum injection time of 120 ms. MS/MS scans were performed with a resolution of 17,500, a target value of 1×10^5 and a maximum injection time of 60 ms. Isolation window was set to 4.0 m/z. A Q-Exactive HF-X instrument (Thermo Fisher) or Q-Exactive Plus instrument was used for AP-MS samples of HHV kinases. The Q-Exactive HF-X instrument was run in Top20 data-dependent mode. Full scans were performed at a resolution of 60,000, a target value of 3×10^6 and maximum injection time of 10 ms. MS/MS scans were performed with a resolution of 15,000, a target value of 1×10^5 and a maximum injection time of 22 ms. The isolation window was set to 1.3 m/z. The Q-Exactive Plus instrument was run in data-dependent top10 mode. Full scans were performed at a resolution of 70,000 a target value of 3×10^6 and maximum injection time of 120 ms. MS/MS scans were performed with a resolution of 35,000, a target value of 5×10^5 and a maximum injection time of 120 ms. The isolation window was set to 4.0 m/z. In all cases normalized collision energy was 26.

Data analysis. Raw data were analyzed and processed using MaxQuant 1.5.2.8 (M97 interactomes) or 1.6.0.1 (phosphoproteomics, whole cell lysates, and interactomes of HHV-CHPKs) software⁶⁸. Search parameters included two missed cleavage sites, fixed cysteine carbamidomethyl modification, and variable modifications including methionine oxidation, N-terminal protein acetylation, asparagine-glutamine deamidation. In addition, serine, threonine, and tyrosine phosphorylations were searched as variable modifications for phosphoproteome analysis. Arg10 and Lys8 and Arg6 and Lys4 were set as labels where appropriate. The peptide mass tolerance was 6 ppm for MS scans and 20 ppm for MS/MS scans. The “match between runs” option was disabled and “re-quantify”, “iBAQ” (intensity-based absolute quantification) and “second peptide” options were enabled. Database search was performed using Andromeda, the integrated MaxQuant search engine, against a protein database of MCMV strain Smith and a Uniprot database of mus musculus proteins (downloaded July 2015) with common contaminants. Raw data from AP-MS samples of HEK-293T cells were searched against a Uniprot database of human proteins (downloaded August 2018 or October 2016) and the sequences of transgenic HHV kinases including common contaminants. FDR was estimated based on target-decoy competition and set to 1% at PSM, protein and modification site level.

Bioinformatics of phosphoproteomic profiles. Phosphosite data and whole proteome data were filtered to exclude contaminants, reverse hits and proteins only identified by site (that is, only identified by a modified peptide). Phosphorylation sites were ranked according to their phosphorylation localization probabilities (P) as class I ($P > 0.75$), class II ($0.75 > P > 0.5$) and class III sites ($P < 0.5$). Class I sites (in at least one of the replicates) were used with a multiplicity of one (that is, only one phosphorylation site on a peptide). MaxQuant normalized site ratios (from Phospho(STY)Sites.txt file) were used and corrected by the ratio of the corresponding protein (from ProteinGroups.txt file) for the respective replicate. SILAC ratios of replicates were log2 transformed, averaged and sites were considered that were quantified in at least one of the replicates. Sites were then categorized as belonging to nuclear or cytosolic proteins, based on the GO annotation of the source protein. Source proteins and corresponding sites with no clear nuclear or cytosolic annotation were classified as “no category”. To assess differences in subcellular phosphoproteomic profiles we used the average SILAC ratio of cells infected with R45A/L47A and L47A/F49A mutant viruses and compared phosphosites that belong to nuclear or cytosolic proteins (see above). One-sided Wilcoxon rank-sum test was performed comparing these two subsets of phosphosites with any possible amino acid in the region +4 to -4 (0 refers to the

phosphorylated amino acid). Comparisons were considered when there were at least 19 phosphosites from both cytosolic and nuclear proteins for an amino acid at a given position quantified.

Bioinformatics of HHV-CHPK interactomes. AP-MS data were filtered as described above, ratios were log2 transformed and replicates were averaged (mean) when they were quantified in all three replicates. Two-sided one sample *t*-tests (null hypothesis: $\mu_0 = 0$) were performed on the experimental data and a set of simulated data where enrichment ratios were permuted for the individual replicates (999 permutations). The *t*-test *p*-values were then adjusted according to the permuted data. The *p*-values in Supplementary Data 1, Fig. 1 and Supplementary Fig. 1 were adjusted in this way. Candidate interactors were selected based on a combination of adjusted *p*-value and means of the three replicates. To harmonize the data obtained from the different CHPK-IPs, we discriminated between candidate interactors and background binders based on volcano plots. For all APs, we used a fixed *p*-value cut-off of 0.05 and a flexible SILAC fold-change cut-off according to an FDR estimation. For this, we used the simulated data as a false positive set and accepted candidate interactors above a SILAC fold-change that recalled maximum 1% false positives.

FDR calculations were based on the simulated data as false positives, as previously suggested⁶⁹. This yielded a set of high-confidence candidate interactors for APs with individual HHV kinases. To compare individual prey proteins across the APs with different kinases we imputed missing values with random values from a normal distribution (with mean 0 and standard deviation 0.25). Enrichment profiles were clustered using Euclidean distance and assembled into a heatmap using R. GO enrichment of the prey proteins in selected sets of clusters were performed using Metascape⁷⁰.

Bioinformatics of M97 interactomes. AP-MS data were filtered as described above, ratios were log2 transformed and replicates were averaged (mean) when they were quantified in at least two of the replicates. Two-sided one sample *t*-tests (null hypothesis: $\mu_0 = 0$) were performed on the experimental data and proteins were considered as interactors when they were below a *t*-test *p*-value of 0.05 and above a log2 SILAC fold-change of 1.5. Additionally, the molar amount of bait and prey proteins in MS samples was estimated by iBAQ values. Therefore, for samples where M97 was purified, the iBAQ values were summed up, sorted and log10 transformed.

Immunoblot analysis. Whole cells were harvested and subsequently lysed by sonication in 50 mM Tris-Cl (pH 6.8), 2% SDS, 10% glycerol, 1 mM DTT, $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ aprotinin, $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ leupeptin, 1 µM pepstatin, 0.1 mM Pefabloc. The lysates were clarified by centrifugation and protein concentration was measured using the Bio-Rad DC protein assay. Lysates were adjusted to equal protein concentration, supplemented with 100 mM dithiothreitol and bromophenol blue, and boiled at 95 °C for 3 min. For subcellular fractionation into nuclei and cytoplasmic extracts, cells were lysed by Dounce homogenization in hypotonic buffer, consisting of 10 mM Hepes (pH 8.0), 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.34 M sucrose, 10% glycerol, 0.1 mM DTT and protease inhibitors. Nuclei were collected by low-speed centrifugation (4 min, 1300 g, 4 °C). The supernatant was clarified by high-speed centrifugation (15 min, 20,000 g, 4 °C). The nuclei were washed once in the hypotonic extraction buffer and lysed then as described above for the preparation of whole cell lysates. Proteins were resolved by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and blotted to polyvinylidene fluoride membranes. To prevent nonspecific binding, blots were incubated in Tris-buffered saline-0.1% Tween-20 (TTBS) supplemented with 5% skim milk. Afterwards blots were incubated with the following primary antibodies: Cyclin A, C19 (Santa Cruz); cyclin E, M20 (Santa Cruz); CDK2, M2 (Santa Cruz); HA, clone 3F10 (Roche); M99, mouse antiserum (generously provided by Khanh Le-Trilling, University Hospital Essen); IE1, clone Croma 101; M45, clone M45.01; M57, clone M57.02 (all obtained from Center for Proteomics, Rijeka). The blots were developed using horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies in conjunction with the *Super Signal West Dura* chemiluminescence detection system (Thermo Fisher). All antibodies were diluted to 1 µg per mL in TTBS, 5% skim milk. Uncropped scans of the immunoblots are provided in the Source Data file.

Immunoprecipitation. Cells were lysed by freezing-thawing in IP buffer (IPB): 50 mM Tris-Cl pH 7.4, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM NaF, 0.5 mM Na₂VO₄, 0.5% Nonidet P-40, 10% glycerol, 1 mM DTT, $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ aprotinin, 1 mM leupeptin, 1 mM Pefabloc. Cell extracts were clarified by centrifugation at 20,000 g. Cyclin A IPs were performed by incubating the IPB extracts with Cyclin A, H432, conjugated agarose beads (Santa Cruz)⁴⁶. For HA IPs, a µMACS HA isolation kit (Miltenyi Biotec) was employed according to the manufacturer’s instructions, except that IPB was used as both lysis and washing buffer.

Kinase assay. First, HA-M97 was immunoprecipitated from infected cells. To this end, IPB extracts were prepared and incubated with HA antibody clone 3F10 (1 µg per mL) and Protein G-conjugated agarose beads. The precipitates were washed several times with IPB and twice with 20 mM Tris-Cl (pH 7.4), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT. Then, they were incubated under constant agitation for 60 min at 30 °C in kinase reaction buffer: 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT,

10 mM β -glycerophosphate, 50 μ M ATP, 5 μ Ci [γ - 32 P]ATP. Kinase reactions were analyzed by 8% SDS-PAGE followed by autoradiography.

Immunofluorescence microscopy. 3T3 fibroblasts were grown and infected on glass coverslips. Where indicated, cells were incubated with 10 μ M 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) for 30 min. To analyze for M97 localization and sites of EdU incorporation, coverslips were washed with PBS and incubated for 10 min in PBS-4% paraformaldehyde fixation solution, followed by additional washing and incubation in PBS-T permeabilization solution (PBS, 0.1% Triton X-100, 0.05% Tween 20) and 2% bovine serum albumin (BSA) fraction V/ PBS-T blocking solution. Afterwards, incorporated EdU was conjugated to Alexa Fluor 488 using the Click-iT EdU labeling kit (Thermo Fisher). Then samples were incubated overnight at 4 °C with the following antibodies: anti-HA clone 3F10 or anti-M57 clone M57.02 (Center for Proteomics, Rijeka), both diluted to 1 μ g mL⁻¹ in PBS-T containing 2% BSA. After washing in PBS, cells were incubated for 1 h at 25 °C with Alexa Fluor 488 or 647-coupled anti-IgG antibodies (Thermo Fisher). Coverslips were mounted on glass slides in 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) containing Fluoromount-G medium (Thermo Fisher). Images were acquired by an Eclipse A1 laser-scanning microscope, using NIS-Elements software (Nikon Instruments). Equal microscope settings and exposure times were used to allow direct comparison between samples. For quantification, the microscope slides were randomly scanned and all cells in the randomly acquired frames were analyzed by ImageJ.

Flow cytometry. Cells were fixed and permeabilized in ice-cold PBS-80% ethanol for at least 16 h. After washing, cells were incubated on ice for at least 16 h with one of the following primary antibodies: anti-IE1 (clone CromA 101) or anti M57 (clone m57.02), both diluted to 1 μ g mL⁻¹ in PBS-1% BSA. After washing, cells were incubated in Alexa Fluor 647 conjugated anti-mouse IgG for 1 h at 25 °C. Cells were washed again and incubated then for 15 min at 25 °C in PBS supplemented with 0.1 mg mL⁻¹ RNase A and 25 μ g mL⁻¹ propidium iodide. All washing steps and antibody dilution were performed using PBS-1% BSA. Flow cytometry was performed using a FACSCanto II instrument equipped with FACSDiva and Cell-Quest Pro software (Becton Dickinson).

Reporting summary. Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

Data availability

MS raw data and MaxQuant output tables have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE partner repository with the dataset identifier PXD016334. URL. The source data underlying Figs. 1e, 2b, e, 3b–f, 4b, 5a, e, f and Supplementary Figs. 1a, b, 3c–f and 10b are provided as a Source Data file. The source data underlying Figs. 1b–d, 3a, 4c and Supplementary Figs. 1a, c, 3b, 6b–e, 8b, c are provided in Supplementary Data files 1–4. Fasta files for proteomic searches were downloaded from Uniprot (<https://www.uniprot.org/>). All other relevant data are available from the corresponding author upon reasonable request. Source data are provided with this paper.

Received: 17 December 2019; Accepted: 24 August 2020;

Published online: 24 September 2020

References

- Adler, B., Sattler, C. & Adler, H. Herpesviruses and their host cells: a successful liaison. *Trends Microbiol.* **25**, 229–241 (2017).
- MocarSKI, E. S. Jr. in *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunophylaxis* Ch. 4 (eds Arvin, A. et al.) (Cambridge Univ. Press, 2011).
- Gershburg, E. & Pagano, J. S. Conserved herpesvirus protein kinases. *Biochim. Biophys. Acta* **1784**, 203–212 (2008).
- Li, R. & Hayward, S. D. Potential of protein kinase inhibitors for treating herpesvirus-associated disease. *Trends Microbiol.* **21**, 286–295 (2013).
- Topalis, D., Gillemot, S., Snoeck, R. & Andrei, G. Thymidine kinase and protein kinase in drug-resistant herpesviruses: heads of a Lernaean Hydra. *Drug Resist. Updat.* **37**, 1–16 (2018).
- Jacob, T., Van den Broeke, C. & Favoreel, H. W. Viral serine/threonine protein kinases. *J. Virol.* **85**, 1158–1173 (2011).
- Li, R. et al. Conserved herpesvirus kinases target the DNA damage response pathway and TIP60 histone acetyltransferase to promote virus replication. *Cell Host Microbe* **10**, 390–400 (2011).
- Tarakanova, V. L. et al. Gamma-herpesvirus kinase actively initiates a DNA damage response by inducing phosphorylation of H2AX to foster viral replication. *Cell Host Microbe* **1**, 275–286 (2007).
- Kato, K. et al. Epstein–Barr virus-encoded protein kinase BGLF4 mediates hyperphosphorylation of cellular elongation factor 1 δ (EF-1 δ): EF-1 δ is universally modified by conserved protein kinases of herpesviruses in mammalian cells. *J. Gen. Virol.* **82**, 1457–1463 (2001).
- Hwang, S. et al. Conserved herpesviral kinase promotes viral persistence by inhibiting the IRF-3-mediated type I interferon response. *Cell Host Microbe* **5**, 166–178 (2009).
- Kawaguchi, Y. et al. Conserved protein kinases encoded by herpesviruses and cellular protein kinase cdc2 target the same phosphorylation site in eukaryotic elongation factor 1delta. *J. Virol.* **77**, 2359–2368 (2003).
- Oberstein, A., Perlman, D. H., Shenk, T. & Terry, L. J. Human cytomegalovirus pUL97 kinase induces global changes in the infected cell phosphoproteome. *Proteomics* **15**, 2006–2022 (2015).
- Kuny, C. V., Chinchilla, K., Culbertson, M. R. & Kalejta, R. F. Cyclin-dependent kinase-like function is shared by the beta- and gamma- subset of the conserved herpesvirus protein kinases. *PLoS Pathog.* **6**, e1001092 (2010).
- Hamirally, S. et al. Viral mimicry of Cdc2/cyclin-dependent kinase 1 mediates disruption of nuclear lamina during human cytomegalovirus nuclear egress. *PLoS Pathog.* **5**, e1000275 (2009).
- Romaker, D. et al. Analysis of the structure–activity relationship of four herpesviral UL97 subfamily protein kinases reveals partial but not full functional conservation. *J. Med. Chem.* **49**, 7044–7053 (2006).
- Lee, C.-P. et al. Epstein–Barr virus BGLF4 kinase induces premature chromosome condensation through activation of condensin and topoisomerase II. *J. Virol.* **81**, 5166–5180 (2007).
- Hume, A. J. et al. Phosphorylation of retinoblastoma protein by viral protein with cyclin-dependent kinase function. *Science* **320**, 797–799 (2008).
- Steingruber, M. et al. Cyclins B1, T1 and H differ in their molecular mode of interaction with cytomegalovirus protein kinase pUL97. *J. Biol. Chem.* **294**, 6188–6203 (2019).
- Prichard, M. N. et al. Human cytomegalovirus UL97 kinase activity is required for the hyperphosphorylation of retinoblastoma protein and inhibits the formation of nuclear aggresomes. *J. Virol.* **82**, 5054–5067 (2008).
- Zhang, K., Lv, D.-W. & Li, R. Conserved herpesvirus protein kinases target SAMHD1 to facilitate virus replication. *Cell Rep.* **28**, 449–459.e5 (2019).
- Businger, R. et al. Human cytomegalovirus overcomes SAMHD1 restriction in macrophages via pUL97. *Nat. Microbiol.* **4**, 2260–2272 (2019).
- Milbradt, J. et al. The prolyl isomerase Pin1 promotes the herpesvirus-induced phosphorylation-dependent disassembly of the nuclear lamina required for nucleocytoplasmic egress. *PLoS Pathog.* **12**, e1005825 (2016).
- Deuschmann, J. et al. A viral kinase counteracts in vivo restriction of murine cytomegalovirus by SAMHD1. *Nat. Microbiol.* **4**, 2273–2284 (2019).
- Iwahori, S., Hakki, M., Chou, S. & Kalejta, R. F. Molecular determinants for the inactivation of the retinoblastoma tumor suppressor by the viral cyclin-dependent kinase UL97. *J. Biol. Chem.* **290**, 19666–19680 (2015).
- Li, R. et al. SUMO binding by the Epstein–Barr virus protein kinase BGLF4 is crucial for BGLF4 function. *J. Virol.* **86**, 5412–5421 (2012).
- Avey, D. et al. Discovery of a coregulatory interaction between Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF45 and the viral protein kinase ORF36. *J. Virol.* **90**, 5953–5964 (2016).
- Uetz, P. et al. Herpesviral protein networks and their interaction with the human proteome. *Science* **311**, 239–242 (2006).
- Calderwood, M. A. et al. Epstein–Barr virus and virus human protein interaction maps. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **104**, 7606–7611 (2007).
- Li, R. et al. Phosphoproteomic profiling reveals Epstein–Barr virus protein kinase integration of DNA damage response and mitotic signaling. *PLoS Pathog.* **11**, e1005346 (2015).
- Umaña, A. C., Iwahori, S. & Kalejta, R. F. Direct substrate identification with an analog sensitive (AS) Viral Cyclin-dependent Kinase (v-Cdk). *ACS Chem. Biol.* **13**, 189–199 (2018).
- Iwahori, S., Umaña, A. C., VanDeusen, H. R. & Kalejta, R. F. Human cytomegalovirus-encoded viral cyclin-dependent kinase (v-CDK) UL97 phosphorylates and inactivates the retinoblastoma protein-related p107 and p130 proteins. *J. Biol. Chem.* **292**, 6583–6599 (2017).
- Taipale, M. et al. Quantitative analysis of HSP90-client interactions reveals principles of substrate recognition. *Cell* **150**, 987–1001 (2012).
- Sun, X. et al. Hsp90 inhibitor 17-DMAG decreases expression of conserved herpesvirus protein kinases and reduces virus production in Epstein–Barr virus-infected cells. *J. Virol.* **87**, 10126–10138 (2013).
- Schulman, B. A., Lindstrom, D. L. & Harlow, E. Substrate recruitment to cyclin-dependent kinase 2 by a multipurpose docking site on cyclin A. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **95**, 10453–10458 (1998).
- Isegawa, Y. et al. Characterization of the human herpesvirus 6 U69 gene product and identification of its nuclear localization signal. *J. Virol.* **82**, 710–718 (2008).
- Sorg, G. & Stamminger, T. Mapping of nuclear localization signals by simultaneous fusion to green fluorescent protein and to beta-galactosidase. *Biotechniques* **26**, 858–862 (1999).

37. Muranyi, W., Haas, J., Wagner, M., Krohne, G. & Koszinowski, U. H. Cytomegalovirus recruitment of cellular kinases to dissolve the nuclear lamina. *Science* **297**, 854–857 (2002).
38. Marceau, A. H. et al. Structural basis for LIN54 recognition of CHR elements in cell cycle-regulated promoters. *Nat. Commun.* **7**, 12301 (2016).
39. Iwahori, S. & Kalejta, R. F. Phosphorylation of transcriptional regulators in the retinoblastoma protein pathway by UL97, the viral cyclin-dependent kinase encoded by human cytomegalovirus. *Virology* **512**, 95–103 (2017).
40. Girard, F., Strausfeld, U., Fernandez, A. & Lamb, N. J. Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. *Cell* **67**, 1169–1179 (1991).
41. Cardoso, M. C., Leonhardt, H. & Nadal-Ginard, B. Reversal of terminal differentiation and control of DNA replication: cyclin A and Cdk2 specifically localize at subnuclear sites of DNA replication. *Cell* **74**, 979–992 (1993).
42. Maridor, G., Gallant, P., Golsteyn, R. & Nigg, E. A. Nuclear localization of vertebrate cyclin A correlates with its ability to form complexes with cdk catalytic subunits. *J. Cell Sci.* **106**, 535–544 (1993).
43. Wiebusch, L., Neuwirth, A., Grabenhenrich, L., Voigt, S. & Hagemeyer, C. 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 (2008).
44. Wagner, M. et al. Comparison between human cytomegalovirus pUL97 and murine cytomegalovirus (MCMV) pM97 expressed by MCMV and vaccinia virus: pM97 does not confer ganciclovir sensitivity. *J. Virol.* **74**, 10729–10736 (2000).
45. Adams, P. D. et al. Identification of a cyclin-cdk2 recognition motif present in substrates and p21-like cyclin-dependent kinase inhibitors. *Mol. Cell Biol.* **16**, 6623–6633 (1996).
46. Eifler, M. et al. PUL21a-Cyclin A2 interaction is required to protect human cytomegalovirus-infected cells from the deleterious consequences of mitotic entry. *PLoS Pathog.* **10**, e1004514 (2014).
47. Caffarelli, N., Fehr, A. R. & Yu, D. Cyclin A degradation by primate cytomegalovirus protein pUL21a counters its innate restriction of virus replication. *PLoS Pathog.* **9**, e1003825 (2013).
48. Weibel, R. et al. Nuclear import of isoforms of the cytomegalovirus kinase pUL97 is mediated by differential activity of NLS1 and NLS2 both acting through classical importin- α binding. *J. Gen. Virol.* **93**, 1756–1768 (2012).
49. Chemes, L. B., de Prat-Gay, G. & Sánchez, I. E. Convergent evolution and mimicry of protein linear motifs in host-pathogen interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **32**, 91–101 (2015).
50. Davey, N. E., Travé, G. & Gibson, T. J. How viruses hijack cell regulation. *Trends Biochem. Sci.* **36**, 159–169 (2011).
51. Lange, A. et al. Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha. *J. Biol. Chem.* **282**, 5101–5105 (2007).
52. Christie, M. et al. Structural biology and regulation of protein import into the nucleus. *J. Mol. Biol.* **428**, 2060–2090 (2016).
53. Zacksenhaus, E., Bremner, R., Phillips, R. A. & Gallie, B. L. A bipartite nuclear localization signal in the retinoblastoma gene product and its importance for biological activity. *Mol. Cell Biol.* **13**, 4588–4599 (1993).
54. Adams, P. D. et al. Retinoblastoma protein contains a C-terminal motif that targets it for phosphorylation by cyclin-cdk complexes. *Mol. Cell Biol.* **19**, 1068–1080 (1999).
55. Rodríguez-Vilarrupla, A. et al. Identification of the nuclear localization signal of p21cip1 and consequences of its mutation on cell proliferation. *FEBS Lett.* **531**, 319–323 (2002).
56. Krek, W. et al. Negative regulation of the growth-promoting transcription factor E2F-1 by a stably bound cyclin A-dependent protein kinase. *Cell* **78**, 161–172 (1994).
57. Müller, H. et al. Induction of S-phase entry by E2F transcription factors depends on their nuclear localization. *Mol. Cell Biol.* **17**, 5508–5520 (1997).
58. Sugimoto, N. et al. Cdt1 phosphorylation by cyclin A-dependent kinases negatively regulates its function without affecting geminin binding. *J. Biol. Chem.* **279**, 19691–19697 (2004).
59. Nishitani, H., Lygerou, Z. & Nishimoto, T. Proteolysis of DNA replication licensing factor Cdt1 in S-phase is performed independently of geminin through its N-terminal region. *J. Biol. Chem.* **279**, 30807–30816 (2004).
60. Jiao, W. et al. Aberrant nucleocytoplasmic localization of the retinoblastoma tumor suppressor protein in human cancer correlates with moderate/poor tumor differentiation. *Oncogene* **27**, 3156–3164 (2008).
61. Coqueret, O. New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *Trends Cell Biol.* **13**, 65–70 (2003).
62. Petersen, B. O., Lukas, J., Sorensen, C. S., Bartek, J. & Helin, K. Phosphorylation of mammalian CDC6 by cyclin A/CDK2 regulates its subcellular localization. *EMBO J.* **18**, 396–410 (1999).
63. Rauwel, B. et al. Release of human cytomegalovirus from latency by a KAP1/TRIM28 phosphorylation switch. *eLife* **4**, e06068 (2015).
64. Svrlanska, A. et al. A noncanonical function of polycomb repressive complexes promotes human cytomegalovirus lytic DNA replication and serves as a novel cellular target for antiviral intervention. *J. Virol.* **93**, e02143–18 (2019).
65. Rai, T. S. et al. Histone chaperone HIRA deposits histone H3.3 onto foreign viral DNA and contributes to anti-viral intrinsic immunity. *Nucleic Acids Res.* **45**, 11673–11683 (2017).
66. Jordan, S. et al. 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 (2011).
67. Tischer, B. K., Smith, G. A. & Osterrieder, N. En passant mutagenesis: a two step markerless red recombination system. *Methods Mol. Biol.* **634**, 421–430 (2010).
68. Cox, J. & Mann, M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat. Biotechnol.* **26**, 1367–1372 (2008).
69. Tyanova, S. et al. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat. Methods* **13**, 731–740 (2016).
70. Zhou, Y. et al. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. *Nat. Commun.* **10**, 1523 (2019).

Acknowledgements

The authors thank Jens von Einem, Tihana Lenac, Khan-Le Trilling, and Matthias Truss for sharing valuable reagents. This work was supported by a grant (#900005) from the Joachim-Herz-Stiftung to L.W. M.Sc. was funded by a MD student research stipend from the Berlin Institute of Health.

Author contributions

Conceptualization, B.B., M.Sc., L.W.; Methodology, B.B., M.Sc., H.W., K.I., E.O., M.Se., L.W.; Formal analysis, B.B., H.W., E.O., L.W.; Investigation, B.B., M.Sc., H.W., I.G., K.I., E.O., L.W.; Resources, M.Sc., I.G., B.V., M.Se., L.W.; Data curation, B.B.; Visualization, B.B., L.W.; Writing—original draft, B.B., M.Sc., L.W.; Writing—review and editing, B.B., L.W.; Funding acquisition, M.Sc., W.B., M.Se., C.H., L.W.; Supervision, W.B., M.Sc., C.H., L.W.

Funding

Open Access funding provided by Projekt DEAL.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18542-1>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to L.W.

Peer review information *Nature Communications* thanks Oliver Hantschel, Robert Kalejta and Renfeng Li for their contribution to the peer review of this work. Peer reviewer reports are available.

Reprints and permission information is available at <http://www.nature.com/reprints>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020

9) Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

10) Komplette Publikationsliste

Publikation

Boris Bogdanow*, **Max Schmidt***, Henry Weisbach, Iris Gruska, Barbara Vetter, Koshi Imami, Eleonore Ostermann, Wolfram Brune, Matthias Selbach, Christian Hagemeyer & Lüder Wiebusch: „Cross-regulation of viral kinases with cyclin A secures shutoff of host DNA synthesis“ Nat Commun 11, 4845 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18542-1>

*) Ko-Erstautoren: Boris Bogdanow, Max Schmidt

Journal impact factor (2018): 11,878

Vorträge

10th Mini-Herpesvirus Workshop, Hamburg, September 2015

Max Schmidt, Boris Bogdanow, Henry Weisbach, Iris Gruska, Barbara Vetter, Koshi Imami, Matthias Selbach, Christian Hagemeyer & Lüder Wiebusch: „*A cyclin A binding site in M97 is essential for the MCMV-induced G₁/S cell cycle arrest*“

41st International Herpesvirus Workshop, Madison (Wisconsin, USA), Juli 2016

Max Schmidt, Boris Bogdanow, Henry Weisbach, Iris Gruska, Barbara Vetter, Koshi Imami, Matthias Selbach, Christian Hagemeyer & Lüder Wiebusch: „*A bifunctional element in β -herpesviral kinases mediates cross-regulation with cyclin A and inhibition of cellular DNA-synthesis*“

Poster

BIH Symposium 2016 Exploring Systems Medicine, Berlin, Januar 2016

Max Schmidt, Boris Bogdanow, Henry Weisbach, Iris Gruska, Barbara Vetter, Koshi Imami, Matthias Selbach, Christian Hagemeyer & Lüder Wiebusch: „*A cyclin A binding site in M97 is essential for the MCMV-induced G₁/S cell cycle arrest*“

26th Annual Meeting of the Society for Virology, Münster, April 2016

Max Schmidt, Boris Bogdanow, Henry Weisbach, Iris Gruska, Barbara Vetter, Koshi Imami, Matthias Selbach, Christian Hagemeyer & Lüder Wiebusch: „*A bifunctional element in β -herpesviral kinases mediates cross-regulation with Cyclin A and inhibition of cellular DNA-synthesis*“

11) Danksagung

„Höre die Wahrheit, wer sie auch spricht.“

Moses Maimonides

Der Weg zu dieser Arbeit hatte viele Begleiter, Unterstützer und Förderer. An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken.

An erster Stelle gilt mein Dank Dr. Lüder Wiebusch und Prof. Dr. Christian Hagemeier für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die enge wissenschaftliche Betreuung und das fortwährende *Mentoring*. Durch ihre Expertise, Erfahrung und ihr Wohlwollen habe ich nicht nur die nötige fachliche und persönliche Unterstützung erfahren, sondern konnte ebenso Vertrauen in mein eigenes wissenschaftliches Arbeiten aufbauen.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei allen derzeitigen, aber auch ehemaligen Mitgliedern des Labors für Pädiatrische Molekularbiologie für die angenehme und konstruktive Zusammenarbeit. Insbesondere die technische Einarbeitung durch Ralf und der Austausch sowie die Unterstützung mit und von Iris, Barbara, Anneliese, Tincy und Henry möchte ich hervorheben. Dank gilt auch meinem Ko-Erstautoren Boris, der als Alumnus des Labors und Kooperationspartner das Projekt durch Beteiligung und Diskussion vielfältig bereichert hat.

Darüber hinaus bin ich sehr dankbar als Teil der ersten Kohorte mit einem Promotionsstipendium des *Berlin Institute of Health (BIH)* geehrt und gefördert worden zu sein.

Ein besonderer Dank gilt abschließend meinen Eltern, meiner Familie und meinem Freund, die mir immer in allen Belangen unterstützend zur Seite standen.