

Inhibition der NF- κ B-Aktivierung durch das murine Zytomegalievirus-Protein M45

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Patricia Manuela Fliß
aus Bielefeld

Dezember 2011

angefertigt am Robert-Koch-Institut und am Heinrich-Pette-Institut unter der
Leitung von Prof. Dr. Wolfram Brune

1. Gutachter: PD. Dr. Annette Mankertz
2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel

Disputation am 12.03.2012

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	I
SUMMARY	II
1. EINLEITUNG	1
1.1 Zytomegalieviren	1
1.1.1 Epidemiologie und Pathogenese.....	1
1.1.2 Klassifikation und Eigenschaften.....	1
1.1.3 Lytische Replikation.....	2
1.2 Die angeborene Immunantwort und virale Intervention.....	3
1.2.1 Pathogendetektion und Einleitung der Immunantwort durch NF- κ B	3
1.2.2 Virusdetektion durch Toll-Like-Rezeptoren.....	5
1.2.3 Virusdetektion durch zytoplasmatische Mustererkennungsrezeptoren	6
1.2.4 Signalweiterleitung von Toll-Like-Rezeptoren und Zytokinrezeptoren.....	7
1.2.5 Aktivierung von NF- κ B durch den IKK-Komplex	8
1.2.6 Virale Immunevasion.....	10
1.2.6.1 Immunevasion durch das MCMV-Protein M45.....	12
1.2.7 Zielsetzung.....	13
2. MATERIAL UND METHODEN.....	14
2.1 Material	14
2.1.1 Primärantikörper.....	14
2.1.2 Sekundärantikörper	14
2.1.3 Plasmide.....	15
2.1.4 Primer	16
2.1.5 Größenstandards	17
2.1.6 Rezeptoragonisten.....	17
2.1.7 Restriktionsendonukleasen	17
2.1.8 Enzyme.....	18
2.1.9 Kits	18
2.1.10 Zellen und Kulturmedien.....	18
2.1.11 Viren.....	19
2.1.12 Bakterien und Bakterienmedium	19
2.1.13 Chemikalien und Reagenzien	19
2.1.14 Puffer und Lösungen	20
2.1.15 Verbrauchsmaterialien	22
2.1.16 Geräte.....	23

2.2	Methoden.....	24
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	24
2.2.1.1	PCR zur Sequenzierung	24
2.2.1.2	Plasmid-DNA-Isolierung	24
2.2.1.3	Agarose-Gelelektrophorese.....	25
2.2.1.4	Aufreinigung von DNA	25
2.2.1.5	Bestimmung von DNA-Konzentrationen.....	25
2.2.1.6	Restriktionsverdau	26
2.2.1.7	Dephosphorylierung von Vektor-DNA	26
2.2.1.8	Auffüllen oder Entfernen von DNA-Überhängen	26
2.2.1.9	Ligation	27
2.2.1.10	Elektroporation.....	27
2.2.1.11	Herstellung elektrokompenter Bakterien	27
2.2.1.12	Langzeitlagerung von Bakterien	28
2.2.1.13	Klonierung von M45-Verkürzungsmutanten	28
2.2.2	Zellbiologische Methoden.....	29
2.2.2.1	Zellkultivierung.....	29
2.2.2.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen	29
2.2.2.3	Transfektion von Zellen	29
2.2.2.4	Viruspräparation	29
2.2.2.5	Bestimmung des Titers von Viruspräparationen	30
2.2.2.6	Infektion von Zellen.....	30
2.2.2.7	Anzucht von Retroviren	31
2.2.2.8	Retrovirale Transduktion	31
2.2.2.9	Herstellung stabiler Zelllinien.....	31
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden	32
2.2.3.1	Herstellung von Zelllysaten und Bestimmung der Proteinkonzentration.....	32
2.2.3.2	SDS-PAGE	33
2.2.3.3	Transfer von Proteinen auf eine Membran (Western Blot).....	33
2.2.3.4	Koimmunpräzipitation	34
2.2.3.5	Indirekte Immunfluoreszenzfärbung	35
2.2.3.6	Konfokale Laserscanning Mikroskopie (CLSM)	36
2.2.3.7	NF- κ B-Reporterassay	36
3.	ERGEBNISSE	38
3.1	Inhibition von TLR- und IL-1R-Signalwegen durch das MCMV-Protein M45.....	38
3.1.1	Inhibition der NF- κ B-Aktivierung.....	38
3.1.2	Analyse der p38 MAPK-Aktivierung.....	42
3.2	Mechanismus der M45-vermittelten Inhibition der NF-κB-Aktivierung.....	43
3.2.1	Interaktion von M45 mit dem IKK-Komplex.....	43
3.2.2	Einfluss von M45 auf die IKK-Proteinlevel	46
3.2.3	Mechanismus der NEMO-Degradation.....	48

3.2.4	Einfluss von M45 auf die intrazelluläre Lokalisation von NEMO.....	51
3.2.5	Charakterisierung der M45-induzierten punkt- und vesikelförmigen NEMO-Strukturen	55
3.2.6	Inhibition der NEMO-Degradation in Autophagie-defizienten Zellen	60
3.2.7	Funktionelle Charakterisierung von M45-Verkürzungsmutanten.....	60
4.	DISKUSSION	64
4.1	Inhibition der NF-κB-Aktivierung durch M45	64
4.2	Signalunterbrechung durch M45 auf der Ebene des IKK-Komplexes	68
4.2.1	Grundlage der Signalunterbrechung: Interaktion mit NEMO und dessen Degradation	68
4.2.2	NEMO-Abbau durch Autophagie	70
4.2.3	Rolle des N- bzw. C-Terminus von M45 für die Inhibition der NF- κ B-Aktivierung	73
4.3	Bedeutung des IKK-Komplexes als viraler Angriffspunkt	75
4.4	Modellerweiterung der M45-vermittelten Inhibition der RIP1-abhängigen NF-κB-Aktivierung	77
4.5	Schlussfolgerung	78
5.	LITERATURVERZEICHNIS	79
6.	ANHANG	93
6.1	Publikationen	93
6.2	Vorträge	93
6.3	Poster.....	94
6.4	Stipendien	94
6.5	Abkürzungsverzeichnis	95
6.6	Danksagung	98
6.7	Erklärung	99

Zusammenfassung

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B spielt eine wichtige Rolle bei der Einleitung der angeborenen Immunantwort. Im Zuge einer Virusinfektion wird NF- κ B unmittelbar als Folge der Virusdetektion durch Mustererkennungsrezeptoren, wie den Toll-Like-Rezeptoren (TLRs), aktiviert. NF- κ B induziert daraufhin die Bildung zahlreicher entzündungsfördernder Zytokine, Chemokine und Adhäsionsmoleküle, die anschließend die Immunantwort einleiten. Freigesetzte Zytokine, wie Interleukin (IL)-1 β und Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)- α können nach Rezeptorbindung ebenfalls NF- κ B aktivieren und hierdurch die initiale Zytokinproduktion verstärken.

Viren haben zahlreiche Mechanismen entwickelt, um der Immunantwort des Wirtes entgegenzuwirken. Das murine Zytomegalievirus (MCMV), ein Vertreter der β -Herpesviren, greift in verschiedene Signalwege der angeborenen Immunantwort ein. In einer früheren Studie wurde gezeigt, dass MCMV durch sein Protein M45 die NF- κ B-Aktivierung nach Stimulation des TNF-Rezeptors und des TLR3 inhibiert. Ob MCMV auch die NF- κ B-Aktivierung nach Stimulation anderer TLRs und Zytokinrezeptoren hemmt, war bisher unbekannt und sollte daher in dieser Arbeit untersucht werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen erstmals, dass MCMV durch M45 die TLR2-, TLR4- und IL-1R-induzierte NF- κ B-Aktivierung blockiert. Die Inhibition findet sowohl im Kontext der viralen Infektion als auch nach alleiniger Expression von M45 statt. M45 hemmt die NF- κ B-Aktivierung durch Interaktion mit NEMO (NF- κ B essential modulator), der regulatorischen Untereinheit des I κ B-Kinase (IKK)-Komplexes, welcher nach Rezeptorstimulation für die Aktivierung von NF- κ B verantwortlich ist. M45 induziert eine intrazelluläre Umverteilung von NEMO in Autophagosomen und die anschließende Degradation durch Lysosomen. Die katalytischen Untereinheiten des IKK-Komplexes, IKK α und IKK β , werden ebenfalls auf M45-abhängige Weise abgebaut. M45 interagiert mit diesen allerdings nur indirekt über NEMO. Mithilfe von M45-Verkürzungsmutanten wurde gezeigt, dass ein großer Bereich des C-Terminus von M45 für die Interaktion mit NEMO und die Hemmung der NF- κ B-Aktivierung essentiell ist, wohingegen ein Großteil des N-Terminus entbehrlich ist.

Der in der vorliegenden Arbeit beschriebene Mechanismus – die lysosomale Degradation eines essentiellen Regulators des NF- κ B-Signalweges – ist eine neu identifizierte, äußerst effiziente virale Strategie der Immunevasion. Es ist anzunehmen, dass neben MCMV weitere Viren auf diese Weise der Immunantwort des Wirtes entgegenwirken.

Summary

Transcription factor NF- κ B plays a crucial role for the induction of the innate immune response. During viral infections NF- κ B is activated as a result of virus detection by pattern recognition receptors such as the Toll-Like-Receptors (TLRs). The transcription factor subsequently induces the expression of numerous proinflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules, which initiate the immune response. Released cytokines such as interleukin (IL)-1 β and tumor necrosis factor (TNF)- α can also activate NF- κ B, thereby amplifying the initial cytokine production.

Viruses have evolved different strategies to counteract the induction of the host immune response. Murine cytomegalovirus (MCMV), a representative of β -herpesviruses, interferes with different pathways of the innate immune response. In a previous study it was shown that MCMV inhibits by its protein M45 the activation of NF- κ B after TNF receptor or TLR3 stimulation. Whether MCMV is also capable of blocking NF- κ B activation after stimulation of other TLRs or cytokine receptors was yet unknown and hence was investigated through the present study.

The results present here show for the first time that MCMV blocks TLR2, TLR4, and IL-1R induced NF- κ B activation. Inhibition occurs in the context of viral infection as well as after ectopic expression of M45. M45 blocks NF- κ B activation by interacting with NEMO (NF- κ B essential modulator), the regulatory subunit of the I κ B kinase (IKK) complex, which is responsible for NF- κ B activation after receptor stimulation. M45 induces an intracellular redistribution of NEMO to autophagosomes and the subsequent degradation by lysosomes. Moreover, the catalytic subunits of the IKK complex, IKK α and IKK β , are degraded in a M45 dependent manner. However, M45 interacts with these subunits only indirectly via NEMO. The analysis of M45 truncation mutants revealed that a large portion of the C-terminus of M45 is essential for the interaction with NEMO and the inhibition of NF- κ B activation, whereas a large N-terminal portion is dispensable.

The here described mechanism – the lysosomal degradation of an essential regulatory protein of the NF- κ B pathway – is a newly identified, highly efficient viral immune evasion strategy. It can be assumed that besides MCMV other viruses use this strategy to counteract the host immune response.

1. Einleitung

1.1 Zytomegalieviren

1.1.1 Epidemiologie und Pathogenese

Infektionen mit dem humanen Zytomegalievirus (HCMV) sind weltweit verbreitet. Die Seroprävalenz liegt in der erwachsenen Bevölkerung zwischen 50 % und nahezu 100 %, wobei die höchsten Durchseuchungsraten in Entwicklungsländern und die niedrigsten in Industrienationen zu finden sind [1]. Die Transmission von HCMV kann über verschiedene Körperflüssigkeiten, wie Speichel, Urin, Sperma oder Muttermilch, erfolgen. Ebenso ist die intrauterine Übertragung von der Mutter auf den Embryo oder Fötus möglich [2]. Primärinfektionen mit HCMV verlaufen in immunkompetenten Personen meist asymptomatisch; in immunsupprimierten oder immunologisch unreifen Individuen kann eine Infektion hingegen zu einer erheblichen Morbidität und/oder Mortalität führen. Besonders gefährdet sind Stammzell- bzw. Organtransplantatempfänger, in welchen die Infektion zu Pneumonien, gastrointestinalen Erkrankungen und Transplantatabstoßungen führen kann, und AIDS-Patienten, in denen HCMV beispielsweise Retinitiden hervorrufen kann [3-5]. Eine weitere gefährdete Gruppe stellen Ungeborene dar. Die Langzeitfolgen von kongenitalen Infektionen reichen von Hörverlust und Erblindung bis hin zu mentalen Retardierungen. In schweren Fällen können kongenitale Infektionen letal verlaufen [6].

1.1.2 Klassifikation und Eigenschaften

Das Zytomegalievirus (CMV) gehört zu der Familie der *Herpesviridae*. Aufgrund verschiedener biologischer Eigenschaften, wie Speziespezifität, Pathogenität und Replikationsverhalten, wird CMV zu der Unterfamilie der *Betaherpesvirinae* gezählt [2].

Wie alle Herpesviren besitzt CMV ein lineares, doppelsträngiges DNA-Genom, das im Virion von einem ikosaedrischen Kapsid mit einem Durchmesser von etwa 130 nm umschlossen ist [7]. Das Genom ist mit einer Länge von ca. 230 kbp eines der größten der Herpesvirusfamilie und umfasst mehr als 160 offene Leserraster [8,9]. Um das Kapsid lagert sich eine amorphe Struktur, die als Tegument bezeichnet wird und zu einem Großteil aus viralen Proteinen besteht. Zusätzlich sind auch zelluläre Proteine und einige virale und zelluläre RNAs eingelagert [10,11]. Schließlich besitzt das Virus noch eine Hüllmembran, die sich vom Wirt ableitet und mit viralen Glykoproteinen gespickt ist [12].

CMV zeichnet sich durch eine hohe Speziespezifität aus, welche dazu führt, dass das Virus nur in Zellen des natürlichen Wirtes oder einer nah verwandten Spezies produktiv replizieren kann [13-17]. Beispielsweise kann HCMV keine produktive Infektion in murinen Zellen

hervorrufen [13]. Da aufgrund dieser Beschränkung keine Untersuchung von HCMV im Kleintiermodell möglich sind, werden häufig Zytomegalieviren aus Nagetieren, wie beispielsweise das murine CMV (MCMV), als Modell für HCMV verwendet. MCMV und HCMV gleichen sich in vielen Aspekten der Infektion und Pathobiologie, jedoch wird MCMV, im Gegensatz zu HCMV, nicht über die Plazenta auf das Ungeborene übertragen [18,19]. *In vitro* unterscheiden sich beide Viren deutlich durch ihre Replikationsgeschwindigkeit. Während HCMV 48 - 72 Stunden für einen vollständigen Replikationszyklus benötigt, sind es bei MCMV etwa 24 Stunden [2].

Genauso wie alle anderen Herpesviren weist CMV einen biphasischen Lebenszyklus auf, der eine lytische, produktive Replikation und eine latente, ruhende Phase umfasst [20]. Die lytische Replikation findet in verschiedenen Zelltypen, wie Fibroblasten, Endothelzellen, Epithelzellen, Makrophagen und dendritischen Zellen, statt und ist durch die Produktion von Nachkommenviren und die Zerstörung der Wirtszelle gekennzeichnet [20,21]. In bestimmten Zelltypen, wie hämatopoetischen Vorläuferzellen und Monozyten, kann CMV in einen latenten Status übergehen [22,23]. Während dieser Zeit wird nur eine geringe Anzahl der viralen Gene exprimiert und es werden keine infektiösen Partikel gebildet. Das Virusgenom persistiert jedoch im Zellkern und kann unter bestimmten Bedingungen reaktiviert werden, wodurch ein Übergang in den lytischen Replikationszyklus verursacht wird [24]. Die eingeschränkte virale Genexpression und Persistenz des viralen Genoms während des Latenzstadiums ermöglicht es dem Virus, lebenslang im Wirt zu persistieren [21,25].

1.1.3 Lytische Replikation

Der Infektionszyklus beginnt mit dem Anheften des Viruspartikels an die Zelloberfläche. Dieser Schritt beinhaltet die Interaktion der viralen Glykoproteine gB, gH und gL mit zellulären Oberflächenmolekülen bzw. Rezeptoren, wobei bisher noch nicht hinreichend geklärt ist, welche Rezeptoren für die Bindung essentiell sind [26-30]. Das Virus wird anschließend durch Fusion mit der Wirtsmembran oder, wie für Endothelzellen und Epithelzellen beschrieben, durch Endozytose aufgenommen [31,32]. Eine kürzlich veröffentlichte Studie deutet darauf hin, dass die Aufnahme in Fibroblasten möglicherweise ebenso durch Endozytose stattfinden kann [33]. Die Verschmelzung der Virushülle mit der Plasma- oder Endosomenmembran führt zu der Freisetzung des Teguments und Kapsids in das Zytoplasma. Tegumentproteine übernehmen bereits zu diesem Zeitpunkt, vor Einsetzen der viralen Genexpression, wichtige Funktionen [34]. Das Kapsid wird über Mikrotubuli zum Nukleus transportiert [35], in welchen anschließend die virale DNA geschleust wird. Im Nukleus findet daraufhin die virale Genexpression und DNA-Replikation statt [2]. Die Expression der viralen Gene erfolgt hierbei kaskadenartig, wobei beide DNA-Stränge, zum Teil überlappend, virale Gene kodieren [2,9]. Zunächst wird die Gruppe der „sehr frühen“

(immediate-early, IE) Gene exprimiert. Einige der IE-Proteine transaktivieren im Anschluss die Expression der „frühen“ (early, E) Gene, welche unter anderem für Proteine kodieren, die an der DNA-Replikation beteiligt sind (z. B. UL54, DNA-Polymerase). Die „späten“ (late, L) Gene bilden die dritte und letzte Gen-Gruppe und kodieren überwiegend für strukturelle Proteine [2]. Einige von diesen wandern nach der Synthese zurück in den Zellkern und bilden dort das Viruskapsid, in welches die replizierte DNA eingelagert wird [2]. Das Kapsid wird anschließend durch die Kernmembran ins Zytoplasma geschleust und erhält dort seine finale Hüllmembran, die sich vermutlich vom Trans-Golgi-Netzwerk ableitet [36-38]. Die Tegumentproteine assoziieren zum größten Teil während des Umhüllungsprozesses im Zytoplasma mit dem Kapsid [10,39]. Es wird angenommen, dass die Viren anschließend durch Exozytose an der Plasmamembran freigesetzt werden.

1.2 Die angeborene Immunantwort und virale Intervention

1.2.1 Pathogendetektion und Einleitung der Immunantwort durch NF- κ B

Für die Bekämpfung von Infektionen verfügen Vertebraten über ein komplexes Abwehrsystem, welches aus zwei Teilen besteht: dem angeborenen und dem adaptiven (erworbenen) Immunsystem. Die angeborene Immunantwort wird unmittelbar nach Pathogenexposition eingeleitet und stellt die erste Abwehrlinie dar. Falls ein Erreger nicht hinreichend beseitigt werden kann, wird zusätzlich die adaptive Immunantwort aktiviert [40]. Die Einleitung der Immunantwort beginnt mit der Detektion der Pathogene. Im Rahmen der angeborenen Immunantwort erfolgt diese durch eine limitierte Anzahl von keimbahnkodierten Rezeptoren, den sogenannten Mustererkennungsrezeptoren (pattern recognition receptors, PRRs) [41,42]. PRRs erkennen konservierte strukturelle Bestandteile von Pathogenen, die als Pathogen-assoziierte molekulare Muster (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) bezeichnet werden. PAMPs umfassen diverse Molekülklassen. So werden beispielsweise mikrobielle Lipide, Proteine, Lipoproteine und Nukleinsäuren erkannt. Die Rezeptoren sind in unterschiedlichen zellulären Kompartimenten, wie der Plasmamembran, den Endosomen oder dem Zytosol, lokalisiert (Abb. 1.1). Einige werden auch in den extrazellulären Raum sezerniert [42-44]. Durch die vielfältige räumliche Verteilung der Rezeptoren und deren Fähigkeit, verschiedene mikrobielle Strukturen zu erkennen, können Erreger zu unterschiedlichen Replikationszeitpunkten detektiert werden.

Als Antwort auf die Pathogendetektion aktivieren PRRs intrazelluläre Signalkaskaden, die in der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren münden. Die Transkriptionsfaktoren induzieren im Zellkern die Transkription von Genen, die an der Einleitung der Immunantwort beteiligt sind.

Insbesondere wird die Bildung von Adhäsionsmolekülen, proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und Typ-I Interferonen induziert [45].

Die wichtigsten Transkriptionsfaktoren, die durch PRRs aktiviert werden, sind NF- κ B (nukleärer Faktor-kappaB), AP-1 (Aktivatorprotein-1) und IRFs (Interferon regulierende Faktoren) [46]. IRFs sind die Hauptregulatoren der Typ-I Interferone, zu welchen unter anderem Interferon (IFN) β und multiple IFN α -Varianten zählen [47]. Typ-I Interferone werden sezerniert und induzieren nach Rezeptorbindung die Produktion von antiviral wirkenden Proteinen, die in infizierten und uninfizierten Zellen einen antiviralen Status hervorrufen [48]. Während einer CMV-Infektion werden Typ-I Interferone früh gebildet und tragen entscheidend zu der Immunantwort bei [49-51].

Neben den IRFs spielt besonders NF- κ B eine wichtige Rolle für die Einleitung der Immunantwort. NF- κ B reguliert mehr als 150 Gene, darunter zahlreiche proinflammatorische Zytokine, Chemokine und Adhäsionsmoleküle sowie das Typ-I Interferon IFN β (Abb. 1.1) [52-54]. Viele dieser Faktoren werden zusätzlich auch durch den Transkriptionsfaktor AP-1 reguliert [55-58]. Früh während der MCMV-Infektion werden insbesondere die NF- κ B-induzierten proinflammatorischen Zytokine Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)- α , Interleukin (IL)-6 und IL-12 gebildet [59-61]. Die Zytokine werden zum größten Teil sezerniert, binden anschließend an Rezeptoren auf der eigenen Zelle (autokrine Wirkung) oder an Rezeptoren auf benachbarten Zellen (parakrine Wirkung) und rufen verschiedene Reaktionen hervor. IL-12 ist beispielsweise ein potenter Aktivator von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) [62], welche Virus-infizierte Zellen abtöten und dadurch einen wichtigen Beitrag zur Kontrolle von CMV-Infektionen leisten [63-65]. TNF α führt zur Aktivierung von Makrophagen [66], die infizierte Zellen phagozytieren und Antigene auf der Zelloberfläche präsentieren [40]. Eine weitere wichtige Funktion von TNF α ist die Induktion von Apoptose und programmierter Nekrose (zwei verschiedene Formen des programmierten Zelltodes), wodurch infizierte Zellen aus dem Organismus beseitigt werden [67,68]. TNF α und IL-1 sind ferner an der Einleitung einer Entzündungsreaktion beteiligt [69,70]. Die Entzündungsreaktion ist durch verschiedene Gewebeveränderungen gekennzeichnet und dient der Rekrutierung von Leukozyten, wie Makrophagen, dendritische Zellen und NK-Zellen, aus dem Blutstrom zum Infektionsherd und somit der Bekämpfung der Erreger [40]. Die Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche von Endothelzellen erlaubt hierbei das Anheften der Leukozyten an die Gefäßwand. Chemokine üben im extrazellulären Raum eine chemotaktische Aktivität aus, wodurch die Leukozyten angelockt werden [40]. Proinflammatorische Zytokine führen nach Rezeptorbindung in den Zielzellen zur Hochregulation von weiteren Adhäsionsmolekülen, Chemokinen und proinflammatorischen Zytokinen [71]. In einigen Fällen wird die Hochregulation über die Aktivierung von NF- κ B mediiert. Beispielsweise aktivieren TNF α und IL-1 β nach Rezeptorbindung NF- κ B und

induzieren eine Autoamplifikation [72-75] (Abb. 1.1). Somit mediiert NF- κ B nicht nur die initiale, PRR-induzierte Bildung von Zytokinen, sondern auch die anschließende Amplifikation der Produktion, die durch die Zytokine selbst hervorgerufen wird.

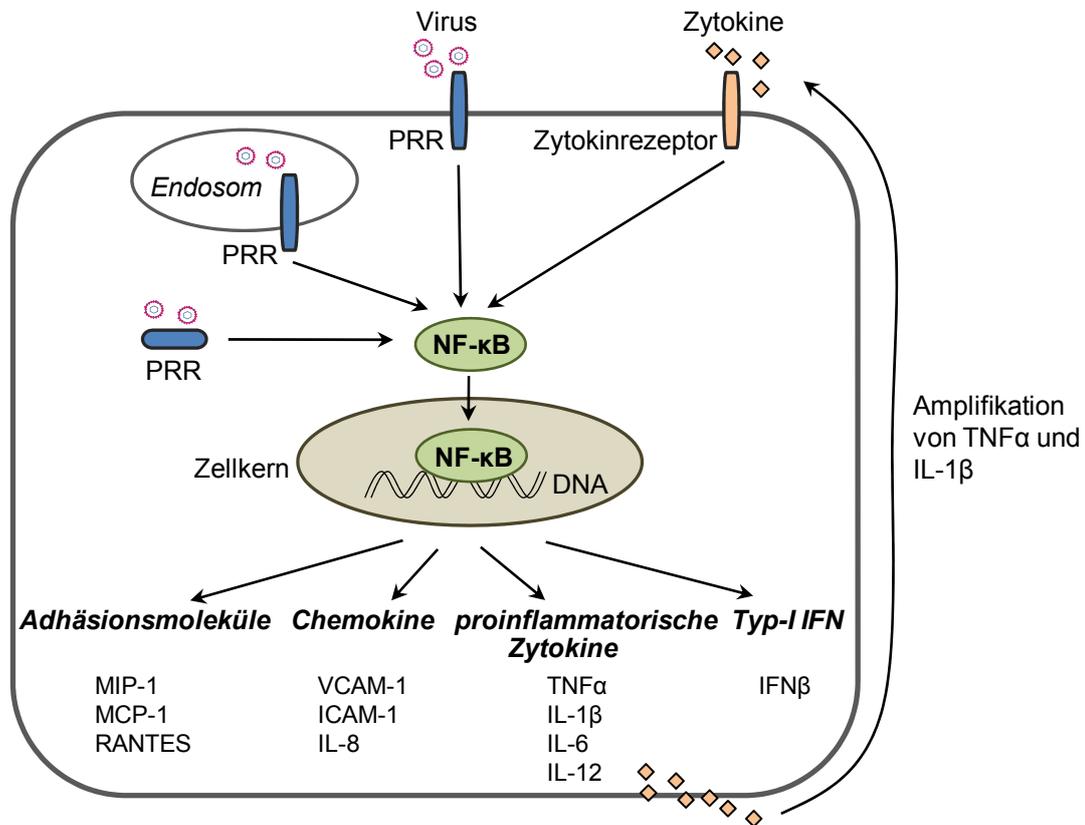


Abbildung 1.1: Einleitung der Immunantwort durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B. PRRs erkennen Pathogene im Extrazellulärraum, im Zytosol und in intrazellulären Vesikeln und aktivieren anschließend den Transkriptionsfaktor NF- κ B. NF- κ B induziert im Zellkern die Expression verschiedener Effektorgene, die für Proteine kodieren, die anschließend die Immunantwort einleiten. Neben den PRRs können auch proinflammatorische Zytokine, wie TNF α und IL-1 β , zur Aktivierung von NF- κ B führen, wodurch eine Amplifikation der initialen Zytokinproduktion hervorgerufen wird.

1.2.2 Virusdetektion durch Toll-Like-Rezeptoren

Die bekanntesten und am besten untersuchten PRRs sind die Toll-Like-Rezeptoren (TLRs). Es handelt sich um Typ-I Transmembranproteine mit einer Leucin-reichen Ektodomäne, über welche die Pathogendetektion erfolgt, und einer zytoplasmatischen Domäne, die für die Signalweiterleitung zuständig ist [76]. Die zytoplasmatische Domäne zeigt Homologie zu der zytoplasmatischen Domäne des IL-1-Rezeptors (IL-1R) und wird daher als Toll-IL-1R (TIR)-Domäne bezeichnet. Aufgrund dieser Homologie bilden die TLRs und der IL-1R eine gemeinsame Rezeptor-Superfamilie [76,77].

In Mäusen wurden bisher 13 und im Menschen 10 verschiedene TLRs identifiziert [44]. Basierend auf ihrer Lokalisation und PAMP-Spezifität können die Rezeptoren in zwei

Gruppen eingeteilt werden: TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 und TLR11 befinden sich in der Plasmamembran und erkennen hauptsächlich mikrobielle Membrankomponenten und Oberflächenstrukturen [78-84]. TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 sind in intrazellulären Vesikeln, wie Endosomen, lokalisiert und dienen als Sensoren für mikrobielle Nukleinsäuren [85]. Einzel- bzw. doppelsträngige RNA (ss- bzw. dsRNA) wird hierbei von TLR7 und TLR8 bzw. von TLR3 erkannt [86,87]. Als Sensor für doppelsträngige DNA (dsDNA) fungiert TLR9 [88,89].

Das Expressionsmuster der Rezeptoren variiert zwischen verschiedenen Gewebe- bzw. Zelltypen. Immunzellen verfügen über das umfassendste Rezeptor-Repertoire. Nicht-Immunzellen, wie Epithelzellen, Fibroblasten oder Endothelzellen, zeigen meist ein eingeschränktes Expressionsmuster, welches häufig durch das Fehlen der endosomalen TLRs gekennzeichnet ist [90,91].

An der Detektion und Immunkontrolle von CMV sind nach dem derzeitigen Kenntnisstand verschiedene TLRs beteiligt. Die Bindung von HCMV an die Zelloberfläche führt durch die Glykoproteine gB und gH *in vitro* zur Aktivierung von TLR2 und nachfolgend zur Aktivierung von NF- κ B [92-94]. Auch *in vivo* ist TLR2 an der Virusdetektion beteiligt. Es wurde gezeigt, dass Lebertransplantat-Empfänger, welche einen Polymorphismus in TLR2 besitzen, eine erhöhte Viruslast und ein höheres Risiko aufweisen, an HCMV zu erkranken [95]. In MCMV-infizierten TLR2-Knockout-Mäusen wurden zudem, im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen, erhöhte virale Titer und eine beeinträchtigte Aktivierung von NK-Zellen nachgewiesen [96]. Im Gegensatz zu HCMV ist der MCMV-Ligand für TLR2 jedoch noch unbekannt.

Neben dem Oberflächenrezeptor TLR2 wird CMV auch durch endosomale TLRs detektiert. Hierbei stellt das virale DNA-Genom ein immunstimulatorisches PAMP für TLR9 dar. So zeigen Mäuse, die einen mutierten TLR9 besitzen, im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen, nach MCMV-Infektion verminderte Zytokinlevel, stark erhöhte virale Titer und eine erhöhte Mortalität [97,98]. Darüber hinaus sind virale dsRNA, welche vermutlich während der bidirektionalen Transkription entsteht, und virale ssRNA wirkungsvolle PAMPs, da gezeigt wurde, dass TLR3 und TLR7 für die Immunantwort während MCMV-Infektionen *in vivo* von Bedeutung sind [97,99].

1.2.3 Virusdetektion durch zytoplasmatische Mustererkennungsrezeptoren

Neben den membranständigen, endosomalen TLRs verfügt die Zelle auch über zytoplasmatische Nukleinsäure-Sensoren. Die Detektion von ds- und ssRNA kann durch die RNA-Helikasen RIG-I (retinoic acid inducible gene-1) und MDA-5 (melanoma differentiation associated gene 5) erfolgen, welche zur Aktivierung von NF- κ B und IRFs führen [100-103]. Doppelsträngige DNA wird durch den Sensor AIM2 (absent in melanoma 2) erkannt, der

anschließend über die Aktivierung von Caspase-1 die intrazelluläre Prozessierung von Pro-IL-1 β und Pro-IL-18 zu biologisch aktiven Zytokinen induziert oder den Zelltod einleitet [104-106]. Als weiterer dsDNA-Sensor dient das Protein DAI (DNA-dependent activator of IRFs), welches über die Aktivierung von IRF3 und NF- κ B insbesondere zur Bildung von Typ-I Interferon führt [107,108]. Sowohl AIM2 als auch DAI sind an der Detektion von CMV beteiligt [105,109].

1.2.4 Signalweiterleitung von Toll-Like-Rezeptoren und Zytokinrezeptoren

Die intrazellulären Signalwege, die nach der Stimulation von TLRs oder Zytokinrezeptoren zur Aktivierung von NF- κ B und AP-1 führen, sind ähnlich und überlappend. Nach der Ligandenbindung rekrutieren die Rezeptoren zunächst Adapterproteine. Der IL-1R und alle TLRs, bis auf TLR3, verwenden das Adapterprotein MyD88 (myeloid differentiation primary response protein 88). Der Adapter TRIF (TIR domain-containing adaptor inducing IFN β) wird hingegen nur von TLR3 und TLR4 verwendet [44,70,110]. Somit kann die Signalweiterleitung der TLR/IL-1R-Familie in einen MyD88- und einen TRIF-abhängigen Signalweg unterteilt werden (Abb. 1.2). TLR4 ist der einzige Rezeptor, der beide Signalwege aktivieren kann. Die frühe TLR4-induzierte Aktivierung von NF- κ B findet hierbei über MyD88 statt; über TRIF wird eine verzögerte Aktivierung vermittelt [111,112].

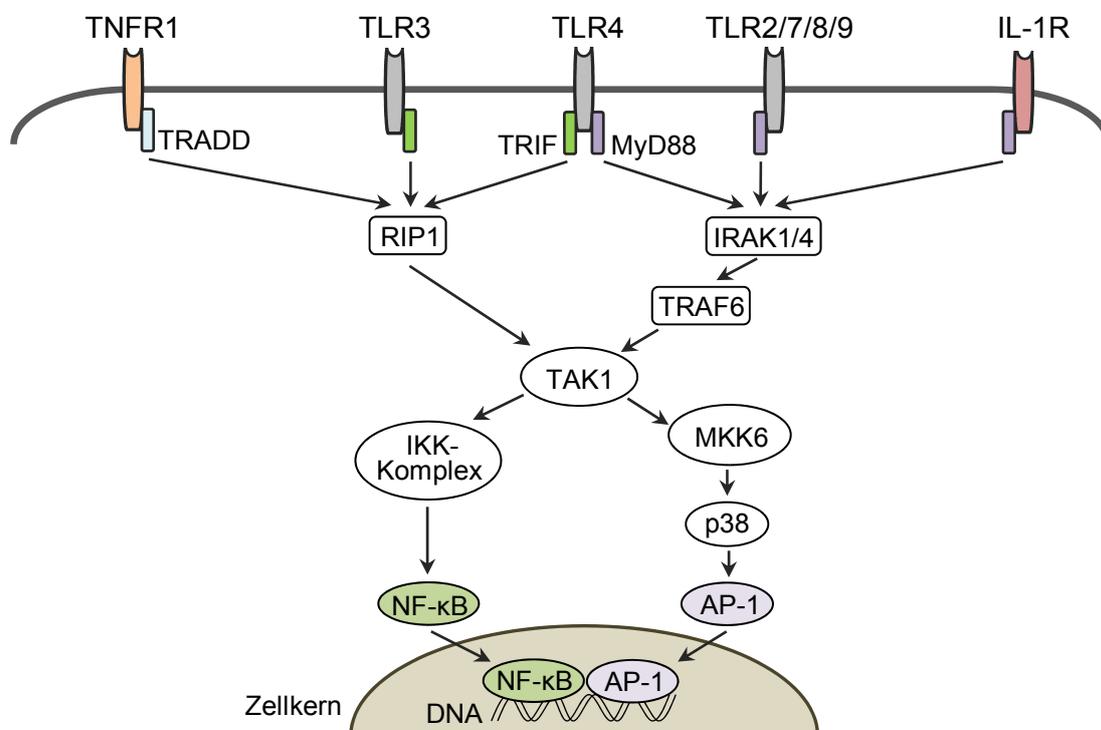


Abbildung 1.2: Vereinfachte Darstellung der intrazellulären Signalwege von Zytokinrezeptoren und TLRs. Dargestellt sind die Adapter- und Signalproteine, die nach Rezeptorstimulation die Signalweiterleitung zu NF- κ B und AP-1 medieren.

Im Anschluss an die Adapterbindung werden verschiedene Signalproteine zu den Rezeptoren rekrutiert. Im MyD88-abhängigen Signalweg sind dies die IL-1R-assoziierten Kinasen (IRAK)-1 und -4 sowie der TNF-Rezeptor-assoziierte Faktor (TRAF)-6 [44]. TRAF6 ist eine Ubiquitinligase, welche die Bildung von Polyubiquitinketten katalysiert, die über Lysin 63 (K63) in Ubiquitin verbunden sind. Auf diese Weise ubiquitiniert TRAF6 sich selbst und weitere Signalproteine [113,114]. Im Gegensatz zur Lysin 48 (K48)-Ubiquitinierung induziert die K63-Ubiquitinierung in der Regel nicht die proteasomale Degradation von Proteinen, sondern dient als Modifikation, über welche Signalproteine miteinander interagieren können. So bindet an die K63-Ubiquitinketten der TAK1 (TGF-activated kinase 1)-TAB2-TAB3-Komplex [115]. Die beiden regulatorischen Untereinheiten TAB2 und TAB3 aktivieren anschließend die Kinaseuntereinheit TAK1 [115]. Ebenso bindet der I κ B-Kinase (IKK)-Komplex an K63-Ubiquitinketten [116] und es wird vermutet, dass hierdurch beide Komplexe in räumliche Nähe gebracht werden. TAK1 phosphoryliert anschließend den IKK-Komplex [117], welcher nachfolgend die Aktivierung von NF- κ B induziert. Neben der Phosphorylierung des IKK-Komplexes kann TAK1 auch MKK6 (Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Kinase 6) phosphorylieren. MKK6 führt anschließend über die p38 MAPK zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 [117] (Abb. 1.2).

Im TRIF-abhängigen Signalweg wird die Kinase RIP1 (Rezeptor interagierendes Protein 1) über TRIF zum Rezeptor rekrutiert [118]. Ebenso kommt es zur Rekrutierung von TAK1 und Tab2 [119]. RIP1 wird anschließend ubiquitiniert und induziert, vermutlich über TAK1, die IKK-medierte Aktivierung von NF- κ B [118,120]. Neben der NF- κ B-Aktivierung kommt es im TRIF-abhängigen Signalweg auch zur Aktivierung der p38 MAPK [121] (Abb.1.2).

Die Signalweiterleitung nach TNF-Rezeptor 1 (TNFR1)-Stimulation erfolgt ähnlich wie im TRIF-abhängigen Rezeptorsignalweg (Abb. 1.2). Nach der Ligandenbindung und Rekrutierung des Adapters TRADD (TNFR associated death domain protein) wird RIP1 K63-ubiquitiniert [122,123]. Im nächsten Schritt rekrutiert RIP1 den TAK1- und IKK-Komplex, welche daraufhin zur Aktivierung von NF- κ B führen [124-126]. RIP1 kann auch die Aktivierung der MKK6 und p38 MAPK induzieren [127-129]. Ob diese Aktivierung auch über TAK1 vermittelt wird, ist aber nicht hinreichend bekannt [126].

1.2.5 Aktivierung von NF- κ B durch den IKK-Komplex

Die NF- κ B-Superfamilie umfasst fünf strukturell verwandte Mitglieder: p50, p52, p65 (RelA), RelB und c-Rel. Durch Homo- oder Heterodimerisierung bilden diese Proteine dimere Transkriptionsfaktoren, die zwischen dem Zytoplasma und Zellkern hin- und herpendeln können [130]. Der Prototyp der NF- κ B-Transkriptionsfaktoren, der in den meisten Zelltypen vorkommt, ist ein Heterodimer aus p50/p65. In unstimulierten Zellen werden die NF- κ B-Dimere von Mitgliedern der Inhibitor- κ B (I κ B)-Familie gebunden, wodurch die

Transkriptionsfaktoren im Zytoplasma sequestriert werden [131,132]. Der am besten untersuchte Vertreter der I κ B-Proteine ist I κ B α .

Es werden zwei NF- κ B-Aktivierungswege unterschieden: der klassische und der alternative Weg [133]. Alle PRRs, der IL-1R und TNFR1 aktivieren den klassischen Weg, welcher zu einer raschen Aktivierung von NF- κ B, insbesondere von p50/p65-Dimeren, führt [133,134].

Nach Rezeptorstimulation kommt es im klassischen Weg über verschiedene Signalkaskaden (siehe Kap. 3.2.4) zunächst zur Aktivierung des IKK-Komplexes. Dieser besteht aus den beiden katalytischen Untereinheiten IKK α und IKK β sowie der regulatorischen Untereinheit IKK γ , welche auch NEMO (NF- κ B essential modifier) genannt wird [135,136]. Das Verhältnis der IKK α -, IKK β - und NEMO-Untereinheiten im IKK-Komplex ist vermutlich 1:1:2 [137]. Die α - und β -Untereinheiten zeigen eine Sequenzidentität von etwa 50 %, haben strukturelle Gemeinsamkeiten und besitzen beide eine Kinaseaktivität [138]. NEMO zeigt zu den beiden Untereinheiten keine strukturelle Ähnlichkeit und agiert als Regulator- bzw. Gerüstprotein, über das der IKK-Komplex mit anderen Signalproteinen, wie RIP1 oder IRAK1, interagiert [116,139-141].

Die molekularen Mechanismen, durch welche die Aktivität des IKK-Komplexes reguliert wird, sind nicht genau geklärt. Bekannt ist, dass im Zuge der Signalweiterleitung verschiedene posttranslationale Modifikationen stattfinden. NEMO wird beispielsweise während der Signalweiterleitung durch lineare Polyubiquitinketten und durch K63-Polyubiquitinketten modifiziert [142-145]. Die IKK β -Untereinheit wird in der Aktivierungsschleife an zwei Serinresten durch TAK1 phosphoryliert und dadurch aktiviert [117]. Neben posttranslationalen Modifikationen scheint auch die Oligomerisierung des IKK-Komplexes ein Schritt zu sein, der zur Aktivierung des Komplexes führt [146].

Die Aufgabe des aktivierten IKK-Komplexes besteht in der Phosphorylierung der I κ B-Proteine, welche von den Kinaseuntereinheiten des Komplexes vorgenommen wird. I κ B α wird beispielsweise an den Serinresten 32 und 36 phosphoryliert [147]. Durch diese Modifikation wird die K48-Ubiquitinierung und anschließende proteasomale Degradation des Inhibitors veranlasst [147-149]. Das p50/p65-Dimer wird daraufhin freigesetzt und wandert in den Zellkern, wo es an spezifische DNA-Sequenzen bindet, die als κ B-Seiten bezeichnet werden, und die Genexpression von Zielgenen aktiviert [130] (Abb. 1.3). Eines dieser Gene ist der Inhibitor I κ B α selbst [150]. I κ B α gelangt nach der Synthese zurück in den Zellkern, löst den Transkriptionsfaktor von der DNA und transportiert ihn zurück in das Zytoplasma [151]. Durch diesen negativen Rückkopplungsmechanismus wird eine dauerhafte Aktivierung von NF- κ B verhindert.

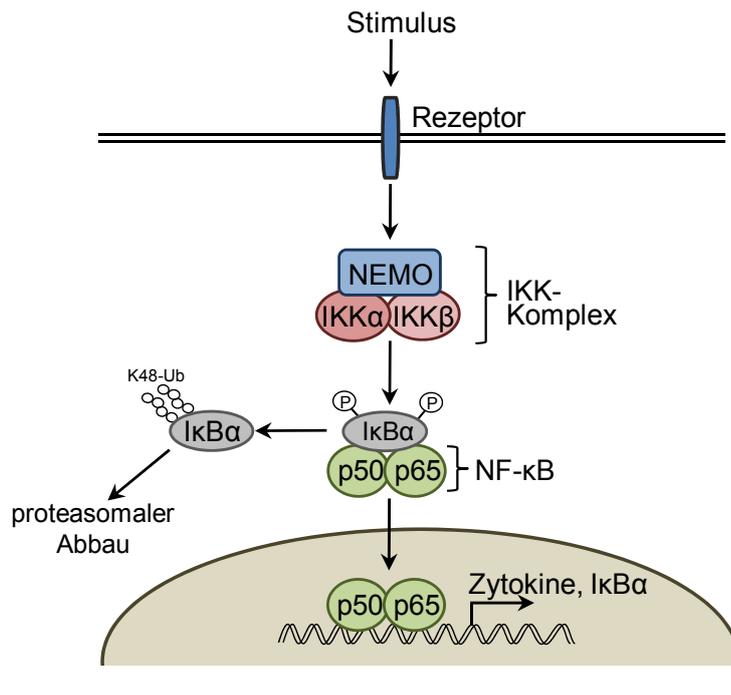


Abbildung 1.3: Klassischer Weg der NF-κB-Aktivierung. Nach Rezeptorstimulation wird der IKK-Komplex aktiviert. Der NF-κB-Inhibitor IκBα wird daraufhin von der IKK-Kinaseuntereinheit IKKβ bzw. in einigen Fällen von IKKα phosphoryliert. Anschließend wird IκBα K48-ubiquitiniert und proteasomal abgebaut. Das NF-κB-Dimer p50/p65 wird freigesetzt und wandert in den Zellkern, wo es Zielgene, darunter auch IκBα, transkriptionell aktiviert.

Die Signalweiterleitung ist im klassischen NF-κB-Aktivierungsweg von der NEMO-Untereinheit abhängig [134,152]. Die Phosphorylierung von IκBα erfolgt meist durch die IKKβ-Untereinheit. In einigen Fällen spielt jedoch auch IKKα eine Rolle [133,153,154]. Beispielsweise kann die Signalweiterleitung nach IL-1R-Stimulation über NEMO-IKKβ oder über NEMO-IKKα stattfinden [155].

Eine Untergruppe der TNFR-Familie, wie z. B. der Lymphotoxin-β-Rezeptor (LTβR), kann neben dem klassischen auch den alternativen NF-κB-Aktivierungsweg aktivieren [156,157]. Im alternativen Weg erfolgt die Signalweiterleitung über ein IKKα-Dimer und wird als NEMO/IKKβ-unabhängig angesehen. Der alternative Weg führt zu einer Translokation von p52/RelB-Dimeren und zeigt, im Vergleich zum klassischen Aktivierungsweg, eine verzögerte Kinetik und länger anhaltende Aktivierung [133,134,157,158].

1.2.6 Virale Immunevasion

Infektionen mit CMV lösen im Wirt eine angeborene und adaptive Immunantwort aus. Jedoch hat CMV zahlreiche Mechanismen entwickelt, um die Immunantwort des Wirtes gezielt zu blockieren bzw. zu modulieren. Hierfür exprimiert CMV eine große Anzahl von Proteinen, die eine Sequenz- und/oder Funktionshomologie zu zellulären Proteinen aufweisen oder die

zelluläre Proteine dysregulieren [159,160]. Im Laufe der Koevolution von Virus und Wirt hat sich ein Gleichgewicht zwischen der Wirtsimmunantwort und den Immunevasionsmechanismen des Virus gebildet, welches die Koexistenz beider ermöglicht. CMV inhibiert die angeborene Immunantwort auf verschiedenen Ebenen. Beispielsweise unterdrückt das Virus den programmierten Zelltod, der normalerweise unmittelbar nach der Infektion vom Wirt induziert wird, um infizierte Zellen aus dem Organismus zu beseitigen und somit die Replikation der Viren zu verhindern. MCMV kodiert mit M36, m38.5 und m41.1 gleich drei Proteine, die die Einleitung der Apoptose blockieren [161-163]. Wenn die Induktion der Apoptose blockiert wird, können einige Zelltypen eine alternative, Caspase-unabhängige Form des Zelltodes einleiten – die sogenannte programmierte Nekrose. Während der MCMV-Infektion wird diese durch das virale Protein M45 blockiert [164-166]. Neben der Inhibition des programmierten Zelltodes ist die Modulation der Zytokinantwort ein wichtiger Immunevasionsmechanismus. CMV verfolgt hierfür verschiedene Strategien. Beispielsweise induziert das MCMV-Protein M27 die proteasomale Degradation von STAT2 (signal transducer and activator of transcription 2), einem Signalprotein, das für die intrazelluläre Interferon-Signalkaskade essentiell ist, und inhibiert hierdurch die Interferonantwort [167,168]. Darüber hinaus exprimiert CMV Zytokin- und Chemokinhomologe [159]. HCMV kodiert zum Beispiel cmvIL-10, ein Homolog zu dem zellulären antiinflammatorischen Zytokin IL-10 [169]. MCMV besitzt zwar kein cmvIL-10, induziert aber die Expression von zellulärem IL-10 [170]. Des Weiteren wirkt CMV der Produktion von zellulären proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen entgegen [171-173]. Der Transkriptionsfaktor NF- κ B stellt hierbei einen attraktiven Angriffspunkt für das Virus dar, da er die Expression vieler dieser Proteine reguliert [54]. Es wurde mehrfach beschrieben, dass sowohl HCMV als auch MCMV die Aktivität von NF- κ B modulieren. Zunächst kommt es früh während der Infektion zu einer Aktivierung von NF- κ B und zur Freisetzung von Zytokinen. Die Aktivierung von NF- κ B erfolgt durch die Bindung des Virus an die Zelloberfläche und, nach Viruseintritt, zumindest teilweise, durch das virale Protein IE1 [92,174-177]. Es wird angenommen, dass eine frühe Aktivierung von NF- κ B vorteilhaft für das Virus ist, da der Enhancer des Major-IE-Promoters (MIEP) mehrere NF- κ B-Bindungsstellen enthält und NF- κ B somit die Expression der IE-Gene aktiviert [177-179]. Im Anschluss an die frühe Aktivierungsphase blockieren MCMV und HCMV jedoch die NF- κ B-Aktivierung [51,164,173,180]. Es wurden bisher zwei HCMV-Proteine identifiziert (pp65 und IE86), die die Aktivität von NF- κ B blockieren können, wobei die zugrunde liegenden Mechanismen der Signalinhibition noch unbekannt sind [181,182]. Für HCMV wurde zudem eine Blockierung der NF- κ B-Aktivierung nach IL-1 β -Stimulation nachgewiesen [180,183]. Die Grundlage der Signalinhibition ist jedoch ebenfalls unbekannt. Darüber hinaus wird die TNF α -induzierte NF- κ B-Aktivierung sowohl von HCMV als auch von

MCMV blockiert. In beiden Fällen wurde der Effekt auf die Herunterregulation des TNFR1 zurückgeführt. Die hierfür verantwortlichen viralen Proteine wurden aber noch nicht identifiziert [173,180,183,184]. Kürzlich wurde erstmalig beschrieben, dass das MCMV-Protein M45 in der Lage ist, die Aktivierung von NF- κ B nach PRR- und Zytokinrezeptorstimulation zu unterbinden [108,164].

1.2.6.1 Immunevasion durch das MCMV-Protein M45

Das MCMV-Protein M45 besteht aus 1174 Aminosäuren und besitzt eine C-terminale Sequenzhomologie zu der großen Untereinheit (R1) von Ribonukleotidreduktasen (RNR) [9] (Abb. 1.4). Da katalytisch wichtige Aminosäuren nicht konserviert sind, besitzt das Protein aber keine enzymatische Aktivität [185]. Neben der R1-Homologiedomäne besitzt M45 einen N-terminalen Bereich, der zwischen Aminosäure 61 und 69 ein RIP-homotypisches-Interaktionsmotiv (RHIM) enthält [165] (Abb. 1.4). Dieses Motiv ist auch in den zellulären Proteinen RIP1, RIP3, TRIF und DAI vorhanden [108,186,187]. Abgesehen vom RHIM weist der N-Terminus von M45 keine Ähnlichkeit zu einem Protein mit bekannter Funktion auf.

M45 wird früh während der viralen Infektion gebildet und zeigt eine größtenteils diffuse zytoplasmatische Lokalisation [185,188]. Das Protein wird proteolytisch nach Aminosäure 277 gespalten und liegt in ungespaltener und gespaltener Form in infizierten Zellen vor [185]. Während der Partikelbildung wird M45 ins Virion integriert, vermutlich in Form eines Tegumentproteins, und liegt somit direkt bei Infektionsbeginn in neu infizierten Zellen vor [185,189].



Abbildung 1.4: Schematische Darstellung von M45. Dargestellt ist die C-terminale R1-Homologiedomäne (dunkelgrau) und die N-terminale Domäne (hellgrau). Das RHIM ist als schwarzer Balken dargestellt.

M45 besitzt verschiedene immunmodulatorische Funktionen. Eine der Funktionen besteht in der Unterdrückung von Virus- bzw. TNF α -induzierter programmierter Nekrose [164,166,190]. Beide Formen des Zelltodes werden von M45 auf RHIM-abhängige Weise inhibiert [166]. Es wurde herausgefunden, dass das RHIM in M45 notwendig für dessen Interaktion mit dem Signalprotein RIP3 ist, welches die Einleitung der Virus-induzierten Nekrose mediiert [166]. Ebenso wird das RHIM in M45 benötigt, um die RIP1-RIP3-Komplexbildung zu blockieren, die für die Einleitung der TNF α -induzierten Nekrose erforderlich ist [166].

Die Zelltod-inhibierende Funktion von M45 ist für die Ausbreitung von MCMV in bestimmten Zelltypen essentiell. So wurde gezeigt, dass Viren, die ein inaktiviertes M45 besitzen, in Endothelzellen und Makrophagen nicht bzw. kaum replizieren und Zelltod auslösen [190].

Ferner zeigen die Virusmutanten ein stark eingeschränktes Replikationsvermögen *in vivo* und sind in SCID-Mäusen, die normalerweise an einer MCMV-Infektion sterben, apathogen [185].

Neben der Fähigkeit, Zelltod zu inhibieren, besitzt M45 auch die Fähigkeit, proinflammatorische Signalwege zu inhibieren. Es wurde herausgefunden, dass M45 die TNFR1- und TLR3-induzierte NF- κ B-Aktivierung sowie die TNFR1-induzierte Aktivierung der p38 MAPK unterbindet [164]. Zurückgeführt wurde die Inhibition auf die Interaktion von M45 mit dem Signalprotein RIP1, welches von beiden Rezeptoren für die Signalweiterleitung verwendet wird. Mechanistisch wurde gezeigt, dass M45-exprimierende Zellen, im Vergleich zu Kontrollzellen, geringere Mengen von K63-ubiquitiniertem RIP1 enthalten [164]. Der N-terminale Bereich von M45, einschließlich des RHIM-Motivs, ist für die Interaktion mit endogenem RIP1 und die Inhibition der NF- κ B-Aktivierung entbehrlich, wohingegen der C-Terminus essentiell ist [164].

M45 blockiert auch die DAI-induzierte NF- κ B-Aktivierung [108]. DAI rekrutiert für die Signalweiterleitung RIP1 und RIP3 und es wurde gezeigt, dass M45, auf RHIM-abhängige Weise, die Bindung von RIP1 und RIP3 an DAI inhibiert [108].

1.2.7 Zielsetzung

In einer früheren Arbeit wurde gezeigt, dass das MCMV-Protein M45 durch die Interaktion mit dem Signalprotein RIP1 die NF- κ B-Aktivierung nach Stimulation des TNFR1 bzw. TLR3 blockiert [164].

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war herauszufinden, ob M45 auch in der Lage ist, die NF- κ B-Aktivierung nach Stimulation von Rezeptoren zu blockieren, die unabhängig von RIP1 Signale intrazellulär weiterleiten. Falls eine Inhibition durch M45 erfolgt, sollte der Angriffspunkt von M45 in der NF- κ B-Signalkaskade identifiziert werden und der molekulare Mechanismus, welcher der Inhibition zugrunde liegt, aufgeklärt werden. Darüber hinaus war es von Interesse, zu ermitteln, welche Bereiche von M45 für die Funktion des Proteins erforderlich sind.

Die Ergebnisse der Arbeit sollen zu einem besseren Verständnis der Virus-Wirt-Interaktion beitragen. Insbesondere sollen hierbei neue Erkenntnisse über die Strategien erlangt werden, die Viren entwickelt haben, um die Immunantwort des Wirtes zu modulieren.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Primärantikörper

Antigen	Klon/ Bezeichnung	Quelle	Anwendung	Hersteller
Monoklonale Antikörper:				
Flag	M2	Maus	WB 1:2000 IF 1:500 IP 1:500	Sigma-Aldrich
HA	16B12	Maus	WB 1:2000 IP 1:250	Convance Inc.
HA	3F10	Ratte	IF 1:300	Roche
IE1	CROMA101	Maus	WB 1:2000	Stipan Jonjic (Univ. of Rijeka)
IKK β	2C8	Kaninchen	WB 1:1000	Cell Signaling Technology
LC3	4E12	Maus	IF 1:100	MBL International
NF- κ B p65	F-6	Maus	IF 1:50	Santa Cruz Biotechnology
Phospho-p38	3D7	Kaninchen	WB 1:1000	Cell Signaling Technology
RIP1	38	Maus	WB 1:1000	BD Transduction Laboratories
β Aktin	AC-74	Maus	WB 1:20000	Sigma-Aldrich
Polyklonale Antikörper:				
Flag		Kaninchen	IF 1:500	Sigma-Aldrich
HA		Kaninchen	IP 1:250 IF 1:200	Sigma-Aldrich
IKK α	M-204	Kaninchen	WB 1:3000	Santa Cruz Biotechnology
I κ B α	C-21	Kaninchen	WB 1:1000	Santa Cruz Biotechnology
M45	crude serum	Kaninchen	WB 1:1000	[185]
NEMO	FL-419	Kaninchen	WB 1:1000	Santa Cruz Biotechnology
p38	C-20	Kaninchen	WB 1:1000	Santa Cruz Biotechnology
p53	FL-393	Maus	WB 1:500	Santa Cruz Biotechnology

2.1.2 Sekundärantikörper

Bezeichnung	Konjugation	Quelle	Anwendung	Hersteller
Anti-Kaninchen IgG	HRP	Schwein	WB 1:3000	Dako Cytomation

Anti-Kaninchen IgG	HRP	Kaninchen	WB 1:2000	Cell Signaling Technology
Anti-Maus IgG	HRP	Ziege	WB 1:3000	Dako Cytomation
Anti-Maus IgG	Alexa Fluor 594	Ziege	IF 1:1000	Invitrogen
Anti-Maus IgG	Alexa Fluor 488	Ziege	IF 1:1000	Invitrogen
Anti-Kaninchen IgG	Alexa Fluor 594	Ziege	IF 1:1000	Invitrogen
Anti-Ratte IgG	Alexa Fluor 488	Ziege	IF 1:1000	Invitrogen

2.1.3 Plasmide

Bezeichnung	Beschreibung	Quelle
pcDNA3	Expressionsvektor, <i>amp^R</i> , <i>neo^R</i>	Invitrogen
pcDNA3-M45-HA	Expression von M45 (nt 1-3522) mit C-terminalem HA-Tag, <i>amp^R</i> , <i>neo^R</i>	Wolfram Brune
pcDNA3-Nt3-HA	Expression der M45-Verkürzung Nt3 (nt 1051-3522) mit C-terminalem HA-Tag, <i>amp^R</i> , <i>neo^R</i>	[164]
pcDNA3-Nt4-HA	Expression der M45-Verkürzung Nt4 (nt 1556-1174) mit C-terminalem HA-Tag, <i>amp^R</i> , <i>neo^R</i>	diese Arbeit
pcDNA3-Ct3	Expression der M45-Verkürzung Ct3 (nt 1-3463), <i>amp^R</i> , <i>neo^R</i>	diese Arbeit
pcDNA3-Ct3-HA	Expression der M45-Verkürzung Ct3 (nt 1-3463) mit C-terminalem HA-Tag, <i>amp^R</i> , <i>neo^R</i>	diese Arbeit
pcDNA3-Ct4	Expression der M45-Verkürzung Ct4 (nt 1-3411), <i>amp^R</i> , <i>neo^R</i>	diese Arbeit
pcDNA3-Ct4-HA	Expression der M45-Verkürzung Ct4 (nt 1-3411) C-terminalem HA-Tag, <i>amp^R</i> , <i>neo^R</i>	diese Arbeit
pcDNA3-Ct5	Expression der M45-Verkürzung Ct5 (nt 1-3465), <i>amp^R</i> , <i>neo^R</i>	diese Arbeit
pcDNA3-Ct6	Vektor zur Expression der M45-Verkürzung Ct6 (nt 1-3501), <i>amp^R</i> , <i>neo^R</i>	diese Arbeit
pRetro	Retroviraler Expressionsvektor, <i>amp^R</i>	Tom Shenk, Princeton University
pRetro-GFP	Retroviraler Expressionsvektor, exprimiert GFP, <i>amp^R</i>	Tom Shenk, Princeton University
pRetro-M45	Retroviraler Expressionsvektor, exprimiert M45, <i>amp^R</i>	[164]
pRetro-Nt3	Retroviraler Expressionsvektor, exprimiert die M45-Verkürzung Nt3 (nt 1051-3522), <i>amp^R</i>	[164]
pRetro-Nt4	Retroviraler Expressionsvektor, exprimiert die M45-Verkürzung Nt4 (nt 1556-1174), <i>amp^R</i>	diese Arbeit
pRetro-Ct3	Retroviraler Expressionsvektor, exprimiert die M45-Verkürzung Ct3 (nt 1-3463), <i>amp^R</i>	diese Arbeit
pRetro-Ct4	Retroviraler Expressionsvektor, exprimiert die M45-Verkürzung Ct4 (nt 1-3411), <i>amp^R</i>	diese Arbeit
pRetro-Ct5	Retroviraler Expressionsvektor, exprimiert die M45-Verkürzung Ct5 (nt 1-3465), <i>amp^R</i>	diese Arbeit
pRetro-Ct6	Retroviraler Expressionsvektor, exprimiert die	diese Arbeit

	M45-Verkürzung Ct6 (nt 1-3501), <i>amp</i> ^R	
pcDNA-m143-HA	Expression von m143 mit C-terminalem HA-Tag, <i>amp</i> ^R , <i>neo</i> ^R	[191]
pcDNA-m143-Flag	Expression von m143 mit C-terminalem Flag-Tag, <i>amp</i> ^R , <i>neo</i> ^R	[192]
pcDNA-m142-HA	Expression von m142 mit C-terminalem HA-Tag, <i>amp</i> ^R , <i>neo</i> ^R	[191]
pCR-Flag-IKK α	Expression von murinem IKK α mit N-terminalem Flag-Tag, <i>kan</i> ^R , <i>neo</i> ^R	Addgene (Plasmid 15467)
pCMV2-Flag-IKK β	Expression von humanem IKK β mit N-terminalem Flag-Tag, basiert <i>amp</i> ^R	Addgene (Plasmid 11103)
pCMVTAG-NEMO	Expression von humanem NEMO mit N-terminalem Flag-Tag, basiert auf pCMVTAG2B, <i>kan</i> ^R , <i>neo</i> ^R	Addgene (Plasmid 11970)
pMSCVpuro	Retroviraler Expressionsvektor zur Anzucht von Retroviren, <i>amp</i> ^R , <i>puro</i> ^R	Clontech Laboratories
pMSCVpuro-Flag-NEMO	Retroviraler Vektor, Expression von humanem NEMO mit N-terminalem Flag-Tag, <i>amp</i> ^R , <i>puro</i> ^R	diese Arbeit
pNiFty2-SEAP	NF- κ B Reporterplasmid, exprimiert sekretierte alkaline Phosphatase unter der Kontrolle eines gentechnisch modifizierten, NF- κ B-induzierbaren ELAM-1-Promoters, <i>zeo</i> ^R	InvivoGen
pEGFP-C1	Expressionsvektor zur Herstellung von GFP-Fusionsproteinen (C-terminales GFP), <i>kan</i> ^R , <i>neo</i> ^R	Clontech Laboratories
EGFP-LC3	Expression von EGFP-fusioniertem humanem LC3, basiert auf pEGFP-C3, <i>kan</i> ^R , <i>neo</i> ^R	Addgene (Plasmid 11546)
pBABE-puro-GFP-LC3	Retroviraler Vektor, Expression von GFP-fusioniertem LC3 aus der Ratte, <i>amp</i> ^R , <i>puro</i> ^R	Addgene (Plasmid 22405)
pcDNA3-EGFP-Rab5	Expression von EGFP-fusioniertem Rab5, <i>amp</i> ^R , <i>neo</i> ^R	Kira Gromova, Freie Universität Berlin
GFP-rab7 WT	Vektor zur Expression von EGFP-fusioniertem Rab7, basiert auf pEGFP-C1, <i>kan</i> ^R , <i>neo</i> ^R	Addgene (Plasmid 12605)
pcDNA3-EGFP-FYVE	Expression von EGFP-fusionierter FYVE Domäne, <i>amp</i> ^R , <i>neo</i> ^R	Kira Gromova, Freie Universität Berlin

amp^R, Ampicillinresistenz; *kan*^R, Kanamycinresistenz; *neo*^R, Neomycinresistenz; *puro*^R, Puromycinresistenz

2.1.4 Primer

Primernamen	Sequenz (5'-3') ^a	Anwendung
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	Sequenzierung
Sp6	ATTTAGGTGACACTATAG	Sequenzierung
pcDNA-Fwd	CGTGTACGGTGGGAGGTC	Sequenzierung
pcDNA-Rev	CAGGGTCAAGGAAGGCACG	Sequenzierung

M45-Ct3-Fwd	<u>GCCGCCTCAGGCAGATCTCGAAAGA</u>	Klonierung von M45-Verkürzungsmutanten Ct3, Ct3-HA, Ct4, Ct4-HA Ct5, Ct6 in pcDNA
M45-Ct3-Rev	GCGAG GGCCC <u>TCAGACGCACATCTTGAT</u> <u>GACCGCGTCG</u>	Klonierung von pcDNA-M45-Ct3
M45-Ct3-HA-Rev	GCGAG GGCCC <u>TC</u> Aagcgtagtctgggacgtcgat gggta <u>GACGCACATCTTGATGACCGCGTCG</u>	Klonierung von pcDNA-M45-Ct3-HA
M45-Ct4-Rev	GCGAG GGCCC <u>TCAGATGGCGACGGGCA</u> <u>GCGACTGCGCAT</u>	Klonierung von pcDNA-M45-Ct4
M45-Ct4-HA-Rev	GCGAG GGCCC <u>TC</u> Aagcgtagtctgggacgtcgat gggta <u>GATGGCGACGGGCAGCGACTGCGC</u> <u>AT</u>	Klonierung von pcDNA-M45-Ct4-HA
M45-Ct5-Rev	GCGAG GGCCC <u>TC</u> A <u>AGCGTTCCCTCGTCT</u> <u>CAGATGACGC</u>	Klonierung von pcDNA-M45-Ct5
M45-Ct6-Rev	GCGAG GGCCC <u>TCACATACTACATTTATAT</u> <u>ACTCCGACGGACAGTCC</u>	Klonierung von pcDNA-M45-Ct6
Nt4_BamHI-Fwd	GCGGATCCACCATGATGGATCGCTGCGG <u>AAACAG</u>	Klonierung von M45-Nt4 in pRetro
Nt4_EcoRI-Fwd	GCGAGAATTCTCAAGCGTAGTCTGGGAC GTCGT	Klonierung von M45-Nt4 in pRetro

^a Die unterstrichenen Bereiche geben M45-Homologien an; die fett gedruckten Buchstaben markieren eine *Apal*-Schnittstelle; die Kleinbuchstaben repräsentieren ein HA-Epitop; die kursiven Buchstaben geben ein Stop-Codon an; die unterstrichenen, fetten Buchstaben markieren eine *Bsu36I*-Schnittstelle.

2.1.5 Größenstandards

Precision Plus Protein Kaleidoscope Standard	Biorad
GeneRuler 1kb DNA Ladder	Fermentas

2.1.6 Rezeptoragonisten

LPS-EB ultrapure	InvivoGen
LTA-SA	InvivoGen
murines IL-1 β	Biomol
murines TNF α	Promocell
Pam ₃ CSK ₄	Biomol

2.1.7 Restriktionsendonukleasen

Alle verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von Fermentas oder New England Biolabs bezogen.

2.1.8 Enzyme

Klenow-Fragment	Fermentas
Pfu-DNA-Polymerase (rekombinant)	Fermentas
RNase A	Roth
Shrimp-Alkaline-Phosphatase	Fermentas
T4-DNA-Ligase	Fermentas
T4-DNA-Polymerase	Fermentas

2.1.9 Kits

BCA Protein Assay Kit	ThermoFisher
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
NucleoBond PC100 bzw. PC500	Machery-Nagel
NucleoSpin Extract II	Machery-Nagel

2.1.10 Zellen und Kulturmedien

Zelllinie	Beschreibung	Kulturmedium	Quelle
<i>nemo</i> ^{-/-}	Immortalisierte murine Fibroblasten aus NEMO-Knockout-Mäusen	B	Michael Karin
NIH3T3	Spontan immortalisierte murine Fibroblasten	A	ATCC (CRL-1658)
Phoenix ^a	retrovirale Verpackungszelllinie, basiert auf 293T Zellen, exprimiert stabil gag, pol und env	B	Nolan Labor, Stanford
<i>rip1</i> ^{-/-}	Spontan immortalisierte murine Fibroblasten aus RIP1-Knockout-Mäusen	B	Michelle Kelliher [193]
ts20	Mauszelllinie, die ein Temperatur sensitives E1 Ubiquitin aktivierendes Enzym enthält	C	Robert Kalejta [194]
10.1	Spontan immortalisierte embryonale Fibroblasten aus BALB/c Mäusen	B	[195]
293A	Humane embryonale Nierenzellen (HEK), selektioniert auf flache Morphologie	B	Invitrogen
<i>atg5</i> ^{-/-}	Immortalisierte murine Fibroblasten aus Atg5-Knockout-Mäusen	B	RIKEN BRC cell bank (RCB2711)
<i>atg5</i> ^{+/+}	Immortalisierte murine Fibroblasten aus Wildtyp-Mäusen	B	RIKEN BRC cell bank (RCB2710)

^aDie Zellen wurden regelmäßig mit 200 µg/ml Hygromycin B und 2 µg/ml Diphtheriatoxin selektioniert.

Kulturmedien:

Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM), L-Glutamin und Penicillin/Streptomycin (100X) wurden von PAA bezogen. Neugeborenes Kälberserum (NKS) und fötales Kälberserum (FKS) wurden von PAN Biotech bezogen. Vor dem Ansetzen der Kulturmedien wurde das

FKS bzw. NKS für 30 min bei 56 °C im Wasserbad inkubiert, um das Komplementsystem zu inaktivieren.

Kulturmedium A: DMEM + 5 % NKS + 1 % Penicillin/Streptomycin

Kulturmedium B: DMEM + 10 % FKS + 1 % Penicillin/Streptomycin

Kulturmedium C: DMEM + 10 % FKS + 2 mM L-Glutamin + 1 % Penicillin/Streptomycin

2.1.11 Viren

Virus	Beschreibung	Quelle
MCMV-WT	Rekombinantes MCMV, basiert auf dem Smith Stamm, als „bacterial artificial chromosome“ (BAC) kloniert	[196,197]
MCMV-GFP	Rekombinantes MCMV, basiert auf dem Smith Stamm, als BAC kloniert, exprimiert GFP	[190]
MCMV-ΔM45	Rekombinantes MCMV basierend auf MCMV-GFP, Deletion des M45-ORFs durch Insertion von Zeocin Resistenzgen	[198]
MCMV-RM45	Rekombinantes MCMV, basierend auf MCMV-ΔM45, die nicht-essentiellen Gene m02-m06 in MCMV-ΔM45 wurden durch HA-Epitop markiertes M45 ersetzt	[164]
Rm142	Rekombinantes MCMV, basierend auf MCMV-Δm142	[191]

2.1.12 Bakterien und Bakterienmedium

Bakterien	Beschreibung	Quelle
DH10B	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 endA1 recA1 deoR Δ(ara,leu)7697 araD139 galU GalK nupG rpsL λ-	Invitrogen

LB-Medium: 10 g/l Bactotrypton (Roth), 5 g/l Hefeextrakt (Roth), 5 g/l NaCl, pH 7,0

LB-Agar: LB-Medium + 15 g/l Agar-Agar

Die Antibiotikazugabe erfolgte nach dem Autoklavieren und Abkühlen (unter 50 °C) des Mediums bzw. Agars.

2.1.13 Chemikalien und Reagenzien

Standardchemikalien, Reagenzien, Lösungen und Lösungsmittel wurden von Roth, Merck, Sigma-Aldrich, AppliChem und Calbiochem bezogen. Nachfolgend sind besondere Substanzen und Reagenzien sowie die dazugehörigen Hersteller aufgeführt:

Aqua-Poly/Mount	Polysciences, Inc.
Bestatin-Hydrochlorid	AppliChem
E-64	AppliChem

ECL Advance Western Blotting Detection Kit	Amersham Biosciences
ECL Western Blotting Detection Reagents	Amersham Biosciences
Gelatine von Kaltwasserfisch	Sigma
Lactazystin	Calbiochem
Leupeptin-Hemisulfat	AppliChem
LysoTracker-Red DND-99	Invitrogen
Pepstatin A	AppliChem
Polybrene	Millipore
Polyfect	Qiagen
Protease Inhibitor Cocktail Complete Mini	Roche
Protein G Sepharose 4 Fast Flow	GE Healthcare
Quanti-Blue-Detektionsmedium	InvivoGen
Rotiphorese Gel 30	Roth
rpm Protein A Sepharose Fast Flow	GE Healthcare

2.1.14 Puffer und Lösungen

Lysepuffer

RIPA	20 mM Tris-HCl pH 7,5 300 mM NaCl 1 % Natriumdeoxycholat 1 % TritonX-100 0,1 % SDS Protease Inhibitor Cocktail
NP-40	50 mM Tris-HCl pH 7,5 150 mM NaCl 1 % NP-40 Protease Inhibitor Cocktail

SDS-PAGE

Laemmli-Laufpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycine 0,1 % SDS
2X Laemmli-Probenpuffer	125 mM Tris-HCl pH 6,8 4 % SDS 20 % Glycerin

10 % β -Mercaptoethanol

0,02 % Bromphenolblau

Western Blot

Semi-Dry Transferpuffer

50 mM Tris

40 mM Glycine

0,04 % SDS

20 % Methanol

TBS

10 mM Tris-HCL pH 7,4

150 mM NaCl

Ponceau S-Lösung

0,1 % Ponceau S in 5 % Essigsäure

Stripping-Puffer

62,5 mM Tris-HCl pH 7,5

2 % SDS

100 mM β -Mercaptoethanol

Blockierungspuffer

TBS + 5 % Milchpulver

Für Antikörper von Cell Signaling:

TBS + 5 % Milchpulver + 0,1 % Tween-20

Primärantikörper-

TBS + 5 % BSA + 0,1 % Tween-20

Verdünnungspuffer für Antikörper

von Cell Signaling

Waschpuffer

TBS + 0,1 % Tween-20

Koimmunpräzipitation

Waschpuffer B

1 mM Tris-HCL pH 7,6

150 mM NaCl

2 mM EDTA

0,2 % NP-40

Waschpuffer C

1 mM Tris-HCL pH 7,6

500 mM NaCl

2 mM EDTA

0,2 % NP-40

Waschpuffer D

10 mM Tris pH 7,6

Immunfluoreszenz

PBS

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

10 mM Na_2HPO_4

	2 mM KH_2PO_4
	pH 7,2
Fixierlösung	PBS + 4 % Paraformaldehyd
Aldehydblockierlösung	50 mM NH_4Cl
Permeabilisierungslösung	PBS + 0,3 % TritonX-100
Blockierungslösung	PBS + 0,2 % Gelatine

Plasmid-DNA Isolation (Mini)

S1	50 mM Tris-HCl pH 8,0
	10 mM EDTA
	0,1 mg/ml RNase A
S2	200 mM NaOH
	1 % SDS
S3	2,8 M Kaliumacetat pH 5,1
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl pH 7,5
	1 mM EDTA

Kalziumphosphat-Transfektion

2X HBS	50 mM Hepes pH 7,05
	10 mM KCl
	12 mM Dextrose (D+ Glukose)
	280 mM NaCl
	1,5 mM Na_2HPO_4
	pH mit NaOH auf 7,0 bzw. 7,05 bzw. 7,1 einstellen und auf Transfektionseffizienz austesten
Kalziumchloridlösung	2 M CaCl_2

Agarose-Gelelektrophorese

50X TAE	2 M Tris
	5,7 % Essigsäure
	50 mM EDTA pH 8,0

2.1.15 Verbrauchsmaterialien

0,45 μm Filter Minisart	Sartorius Stedim Biotech
Deckgläser, \varnothing 18 mm	Roth

Einmalspritzen, 10 ml	Braun
Elektroporationsküvetten, 2 mm	Eurogentec
Hybond ECL, 0,2 µm Nitrozellulosemembran	GE Healthcare
Objektträger, 76 x 26 mm	Roth
Pipettenspitzen	VWR
Reaktionsgefäße	VWR
Röntgenfilme	X-Ray Retina
Whatman Filterpapier, 3 mm	Roth
Zellkulturwaren	Greiner, Nunc, Sarstedt, TPP

2.1.16 Geräte

Electrophoresis Power Supply EPS 301	Amersham Biosciences
Fastblot B34	Biometra
FluoStar Omega Microplate Reader	BMG Labtech
GelDoc XR	Biorad
Gene Pulser XCell	Biorad
GeneAmp PCR System 2400	Applied Biosystems
Heraeus Biofuge Fresco	Heraeus
Heraeus Megafuge 2.OR	Heraeus
Hoefer HE 90x Submarine Electrophoresis Unit	Amersham Biosciences
Inverted Microscope Axiovert 200M	Carl Zeiss
Konfokal Laserscanning Microscope LSM-510 META	Carl Zeiss
Microliter Syringes Model 710	Hamilton
Mini-Protean 3 Cell	Biorad
NanoDrop-1000	Peqlab
Neubauer Zählkammer Improved	Roth
PerfectBlue Gelsystem Mini S	Peqlab
Plattformschüttler für Western Blots Duomax 1030	Heidolph
Röntgenfilmentwicklermaschine X-Omat	Kodak
SE 400 Vertical Unit	GE Healthcare
Sorvall RC-6 Plus	ThermoScientific
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Transblot SD Semi Dry Transfer Cell	Biorad
Überkopf-Rotator SB2	Stuart

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 PCR zur Sequenzierung

Sequenzierungen wurden mithilfe des „BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit“ durchgeführt. Die PCR wurde, wie unter Abbildung 2.1 beschrieben, durchgeführt. Alle weiteren Schritte der Sequenzierung wurden durch das institutseigene Sequenzierlabor des Robert Koch Institutes getätigt. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit der „Sequence Scanner-Software v1.0“ von Applied Biosystems.

PCR-Reaktion		PCR-Programm			
Reagenz	Volumen [µl]	Schritt	Temp. [°C]	Zeit [s]	Wiederholung
5X Puffer	1,5	Denaturierung	96	180	1 x
Primer (5 µM)	1	Denaturierung	96	10	} 25 x
BigDye 3.1	1	Annealing	T _m -5	5	
DNA (200 ng/µl)	1	Elongation	60	240	
H ₂ O	5,5	Kühlung	4	unendlich	

Abbildung 2.1: Zusammensetzung einer Sequenzierungs-PCR und PCR-Programm

2.2.1.2 Plasmid-DNA-Isolierung

Die Extraktion von Plasmid-DNA aus Bakterien erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse. Für die Extraktion kleiner DNA-Mengen („Mini“-Plasmid-Isolierung) wurden am Vortag 3 ml antibiotikahaltiges LB-Medium mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C in einem Schüttelinkubator inkubiert. Von der Übernachtskultur wurden am nächsten Tag 2 ml für die Plasmid-Isolierung eingesetzt. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation pelletiert (16000 g, 1 min), in 100 µl S1-Puffer resuspendiert und durch Zugabe von 100 µl S2-Puffer für 5 min lysiert. Die Lyse wurde durch Zugabe von 150 µl kaltem S3-Puffer gestoppt, das unlösliche Präzipitat durch Zentrifugation pelletiert (16000 g, 15 min, 4 °C) und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde durch Zugabe von 0,8 Volumenanteil Isopropanol und anschließender Zentrifugation (16000 g, 20 min, 4 °C) präzipitiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, zentrifugiert (16000 g, 5 min) und nach ausreichender Trocknung in 50 µl TE-Puffer resuspendiert.

Für die Präparation größerer Mengen von Plasmid-DNA wurde das NucleoBond PC100 („Midi“) Kit bzw. das NucleoBond PC500 („Maxi“) Kit benutzt. Hierfür wurden 100 bzw. 150 -

200 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C in einem Schüttelinkubator inkubiert. Die Isolation der DNA erfolgte gemäß dem Protokoll des Herstellers.

2.2.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurde ein 0,6 - 1,5 % Agarosegel hergestellt. Hierfür wurde die abgewogene Agarose in 1X TAE-Laufpuffer in der Mikrowelle aufgeköcht und anschließend mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid versetzt (0,5 µg/ml). Die Agarose wurde in Gelkammern gegossen und das Gel nach der Polymerisierung in eine Laufkammer gelegt und mit Proben beladen, die zuvor mit 6X Ladepuffer gemischt wurden. Um eine spätere Größenbestimmung der DNA-Fragmente zu ermöglichen, wurde gleichzeitig ein Marker aufgetragen, welcher DNA-Fragmente bekannter Größe enthielt. Die Elektrophorese erfolgte in 1X TAE-Laufpuffer bei 120 V bis zur benötigten Auftrennung der Fragmente. Anschließend wurde die DNA auf einem Transilluminator durch UV-Licht visualisiert.

2.2.1.4 Aufreinigung von DNA

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen sowie die direkte Aufreinigung von Restriktionsansätzen wurde mithilfe des „NukleoSpin Extrakt II Kit“ durchgeführt. Für die Extraktion wurden die gewünschten DNA-Banden zunächst auf einem UV-Transilluminator mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die Gelstücke wurden anschließend mit Bindepuffer versetzt und durch eine 10-minütige Inkubation bei 50 °C aufgelöst. Für die Aufreinigung von Restriktionsansätzen wurden diese ebenfalls mit Bindepuffer versetzt, jedoch nicht bei 50 °C erwärmt. Die weitere Aufreinigung der DNA erfolgte mithilfe von Silikamembransäulen gemäß dem Protokoll des Herstellers.

2.2.1.5 Bestimmung von DNA-Konzentrationen

Die Bestimmung von DNA-Konzentrationen geschah fotometrisch mit dem NanoDrop-1000-UV/Vis-Spektralfotometer. Pro Messung wurde 1 µl DNA eingesetzt und ein Spektrum von 230 - 300 nm aufgenommen. Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren bzw. Proteinen liegt bei 260 bzw. 280 nm. Die DNA-Konzentration errechnete sich aus folgender Formel:

Absorption bei 260 nm (OD_{260}) = 1,0 entspricht 50 µg/ml dsDNA

Der OD_{260}/OD_{280} -Quotient wurde als Indikator für potentielle (Protein-) Verunreinigungen herangezogen. Eine DNA-Präparation wird als „rein“ angesehen, wenn sie einen Quotienten von 1,8 - 2,0 besitzt.

2.2.1.6 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die doppelsträngige DNA sequenzspezifisch hydrolysieren. Die Enzyme erzeugen hierbei entweder glatte DNA-Enden oder kohäsive Enden mit einem einzelsträngigen 5'- oder 3'- DNA-Überhang.

Die Restriktionen wurden bei erforderlicher Temperatur in der Regel für 2 h in einem Gesamtvolumen von 30 µl durchgeführt. Der Ansatz enthielt dabei 3 µl 10X Puffer, 1 - 5 µg DNA und die erforderliche Menge von Enzym und H₂O. Abhängig von der eingesetzten DNA-Menge wurden die Restriktionen mit 2,5 - 5 Units Enzym durchgeführt, wobei beachtet wurde, dass das eingesetzte Enzymvolumen höchstens ein Zehntel des Gesamtvolumens betrug. Sofern zwei Enzyme die gleichen Puffer- und Inkubationsanforderungen besaßen, wurden sie bei einer Doppelrestriktion gleichzeitig zu dem Restriktionsansatz hinzugefügt. Ansonsten wurden die Restriktionen mit zwei Enzymen sequenziell durchgeführt.

2.2.1.7 Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Um eine Rezirkularisierung von Vektor-DNA während einer Ligation zu verhindern, wurden die DNA-Enden von geschnittener Vektor-DNA dephosphoryliert. Hierfür wurde direkt im Anschluss an die Restriktion 1 µl Shrimp-Alkaline-Phosphatase (SAP) zu dem Restriktionsansatz hinzugefügt; dieser wurde gemischt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 6X Probenpuffer gestoppt und die DNA durch Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt.

2.2.1.8 Auffüllen oder Entfernen von DNA-Überhängen

Bei einigen Klonierungen mussten die durch den Restriktionsverdau entstandenen DNA-Überhänge der DNA aufgefüllt oder entfernt werden, um glatte DNA-Enden zu erzeugen.

DNA-Enden, die einen 5'- Überhang besaßen, wurden durch das Klenow-Fragment, welches eine 5'->3' Polymeraseaktivität besitzt, aufgefüllt. 3'- Überhänge wurden mithilfe der T4-DNA-Polymerase, welche eine 3'->5' Exonukleaseaktivität besitzt, entfernt. Die Reaktionen wurden folgendermaßen angesetzt und durchgeführt:

Auffüllen von 5'- DNA-Überhängen

30 µl Restriktionsansatz
1,0 µl Klenow-Fragment
3,4 µl dNTP-Mix (1 mM)
→ 15 min, 37 °C
→ 10 min, 75 °C (Inaktivierung)

Entfernen von 3'- DNA-Überhängen

30 µl Restriktionsansatz
1,0 µl T4-DNA-Polymerase
3,4 µl dNTP-Mix (1 mM)
→ 5 min, Raumtemperatur
→ 10 min, 75 °C (Inaktivierung)

2.2.1.9 Ligation

DNA-Ligasen sind Enzyme, die Phosphodiesterbindungen zwischen 5'-Phosphat und 3'-OH Enden von doppelsträngiger DNA oder RNA bilden. Mithilfe dieser Enzyme lassen sich geschnittene DNA-Fragmente mit komplementären DNA-Überhängen bzw. mit glatten Enden wieder zusammenfügen.

Ligationen wurde mit einem molaren Verhältnis Insert zu Vektor von 3:1 oder 6:1 durchgeführt. Pro Ligation wurden 100 ng Vektor-DNA eingesetzt. Die benötigte Menge an Insert-DNA errechnete sich anhand folgender Formel:

$$ng \text{ Insert} = \frac{\text{Vektor (ng)} \times \text{Größe von Insert (kb)}}{\text{Größe von Vektor (kb)}} \times \text{molares Verhältnis (Insert:Vektor)}$$

Die Ligation erfolgte in einem 20 µl Ansatz, welcher 1 µl T4-DNA-Ligase, 2 µl 10X Puffer, die benötigten Volumina von Vektor und Insert sowie H₂O enthielt. Der Ligationsansatz wurde für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend eingefroren oder direkt für die Elektroporation von DH10B-Bakterien verwendet.

2.2.1.10 Elektroporation

Elektrokompetente DH10B-Bakterien wurden auf Eis aufgetaut. Pro Elektroporation wurden 40 µl Bakteriensuspension in eine gekühlte Küvette überführt, 2 µl Ligationsansatz bzw. 2 µl Plasmid-DNA (0,5 ng/µl) hinzugefügt und durch leichtes Klopfen der Küvetten mit den Bakterien vermischt. Die Bakterien wurden in dem „Gene Pulser X Cell“ einem elektrischen Impuls ausgesetzt (2500 V, 25 µF, 200 Ω), anschließend in 0,6 ml vorgewärmtem LB-Medium (ohne Antibiotikum) aufgenommen und für 1 h bei 37 °C geschüttelt. Im Anschluss wurden 100 µl der Bakteriensuspension auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.1.11 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Zur Herstellung von elektrokompetenten DH10B-Bakterien wurden 500 ml LB-Medium mit einer 5 ml Übernachtskultur angeimpft und bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 - 0,6 bei 37 °C in einem Schüttelinkubator inkubiert. Die Bakterien wurden danach für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend durch Zentrifugation pelletiert (5000 g, 10 min, 4 °C). Das Bakterienpellet wurde auf Eis in 25 ml kaltem H₂O resuspendiert und anschließend zentrifugiert. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Im Anschluss wurde das Bakterienpellet auf Eis in 25 ml kaltem 10 % Glycerol aufgenommen. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde das Pellet in 2 ml 10 % Glycerol aufgenommen, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Bakterien wurden bei -80 °C gelagert.

2.2.1.12 Langzeitlagerung von Bakterien

Für die Langzeitlagerung von Bakterien wurden 0,6 ml einer dicht gewachsenen Bakterienkultur mit 0,8 ml 80 % Glycerol gemischt und bei -80 °C eingefroren. Für eine Rekultivierung wurde ein Teil der Glycerolkultur mit einer Impföse auf eine LB-Agarplatte ausgestrichen. Am nächsten Tag wurde eine einzelne Bakterienkolonie in LB-Medium überführt und in einem Schüttelinkubator angezogen.

2.2.1.13 Klonierung von M45-Verkürzungsmutanten

Für die Generierung der M45-Verkürzungsmutante Nt4 wurde das Plasmid pcDNA-M45-HA mit den Restriktionsenzymen *BoxI* und *KpnI* verdaut. Die DNA-Überhänge wurden anschließend aufgefüllt, der Vektor wurde durch Agarose-Gelelektrophorese gereinigt und anschließend religiert.

Für die Klonierung der M45-Verkürzungsmutanten Ct3, Ct4, Ct5 und Ct6 wurde das *Bsu36I* – *ApaI*-Fragment von pcDNA-M45-HA durch entsprechende PCR-Produkte ersetzt. Die PCR wurde folgendermaßen angesetzt und durchgeführt:

PCR-Reaktion		PCR-Programm			
Reagenz	Volumen [µl]	Schritt	Temp. [°C]	Zeit [s]	Wiederholung
10X Puffer	5,0	Denaturierung	95	180	1 x
dNTP-Mix (10 mM)	1,0	Denaturierung	95	60	} 35 x
Vorwärts-Primer (10 µM)	2,5	Annealing	Tm-5	60	
Rückwärts-Primer (10 µM)	2,5	Elongation	72	50	
Pfu-Polymerase (5 U/µl)	0,5	Elongation	72	60 s/kb	1 x
DNA-Template (pcDNA-M45-HA; 100 ng/µl)	1,0	Kühlung	4	unendlich	
H ₂ O	37,5				

Abbildung 2.2: Zusammensetzung von PCR-Reaktionen und PCR-Programm für die Amplifikation von C-terminalen M45-Bereichen bzw. für die Amplifikation von M45-Nt4.

Die Klonierung der M45-Verkürzungen in den Retrovirusvektor pRetro erfolgte folgendermaßen: Nt4 wurde PCR-amplifiziert (siehe Abbildung 2.2) und zwischen die *BamHI*- und *EcoRI*-Schnittstellen von pRetro ligiert. Die Verkürzungen Ct3, Ct4, Ct5 und Ct6 wurden mit *KpnI* und *ApaI* aus den entsprechenden pcDNA-Konstrukten freigesetzt, die DNA-Überhänge wurden entfernt und die Fragmente anschließend in die *PmlI*-Schnittstelle von pRetro ligiert.

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Zellkultivierung

Alle Zelllinien wurden in Zellkulturschalen bei 37 °C und 5 % CO₂ in humider Atmosphäre kultiviert, mit Ausnahme der ts20 Zellen, welche bei 35 °C inkubiert wurden. Zum Passagieren wurde das Medium von den Zellen abgenommen, die Zellen wurden mit PBS gewaschen und für 2 - 5 min mit Trypsin inkubiert. Das Trypsin wurde anschließend durch Zugabe von frischem Medium inaktiviert, die Zellen wurden resuspendiert und, abhängig von der jeweiligen Zelllinie, 1:3 bis 1:15 in neue Zellkulturschalen überführt. Falls erforderlich, wurde während des Passagierens die Zellzahl mit einer Neubauer Zählkammer bestimmt und die Zellen wurden mit definierter Anzahl ausgesät. Die Passagierung der Zellen erfolgte im Rhythmus von 2 bis 3 Tagen.

2.2.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Langzeitlagerung von Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff. Die Zellen wurden zunächst mit Trypsin von der Zellkulturschale abgelöst, in ein 15 ml Röhrchen mit Medium überführt und durch Zentrifugation pelletiert (1000 g, 2 min). Die Zellen wurden in FKS + 10 % DMSO resuspendiert, in Kryoröhrchen bei -80°C eingefroren und nach wenigen Tagen in flüssigen Stickstoff überführt.

Für die Reaktivierung wurden die Zellen in den Kryoröhrchen bei 37°C in einem Wasserbad aufgetaut, in ein 15 ml Röhrchen mit Medium überführt und pelletiert (1000 g, 2 min). Das Zellpellet wurde in frischem Medium aufgenommen und in eine Zellkulturschale überführt.

2.2.2.3 Transfektion von Zellen

Zellen wurden mittels Polyfect (NIH3T3, 293) oder Kalziumphosphat (Phoenix, 293) transfiziert. Die Transfektion mit Polyfect erfolgte gemäß dem Protokoll des Herstellers. Um Zellen in 10 cm Schalen mit Kalziumphosphat zu transfizieren, wurden 20 µg DNA in 1,168 µl H₂O vorgelegt und danach mit 162 µl 2 M CaCl₂ gemischt. Die Lösung wurde tropfenweise zu 1,33 ml 2X HBS gegeben, welches dabei auf einem Vortexer kontinuierlich vermenget wurde. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Transfektionsgemisch zu 70 - 80 % konfluenten Zellen gegeben. 6 - 15 h später wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 10 ml frischem Medium inkubiert.

2.2.2.4 Viruspräparation

Zur Herstellung von MCMV-Virusstocks wurden subkonfluente NIH3T3-Zellen in einer 15 cm Schale mit einer niedrigen MOI infiziert. Zwei Tage nach Infektion (ca. 2 – 3 % infizierte Zellen) wurden die Zellen trypsiniert, mit uninfizierten NIH3T3-Zellen einer weiteren 15 cm Schale gemischt und auf 13 neue Schalen aufgeteilt. Die Zellen wurden für 5 - 6 Tage im

Brutschrank inkubiert, bis sie konfluent und vollständig durchinfiziert waren. Zur Ernte wurde das Zellkulturmedium mit den darin enthaltenen Viren abgenommen und Zelltrümmer durch Zentrifugation (5000 g, 15 min, 4 °C) entfernt. Im Anschluss erfolgte durch einen 3-stündigen Zentrifugationsschritt (25000 g, 4 °C) die Viruspelletierung. Das Viruspellet wurde mit 2 ml Medium bedeckt, über Nacht auf Eis inkubiert und am nächsten Tag durch vorsichtiges Pipettieren resuspendiert. Nach der Beseitigung verbleibender Zelltrümmer durch einen weiteren Zentrifugationsschritt (1000 g, 10 min, 4 °C), wurde die Virussuspension aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

2.2.2.5 Bestimmung des Titers von Viruspräparationen

Als Maß für die Menge an infektiösen Viruspartikeln in einer Viruspräparation wurde die mittlere „tissue culture infective dose“ pro ml (TCID₅₀/ml) mittels Endpunktverdünnung bestimmt. Die TCID₅₀ ist definiert als die Verdünnung einer Viruspräparation, die benötigt wird, um 50 % einer gegebenen Anzahl von Zellen zu infizieren [199].

Am Tag vor der Titration wurden 3 x 10⁵ NIH3T3-Zellen pro 96-Well-Platte ausgesät. Von der zu titrierenden Viruspräparation wurde in 10er Potenzschritten eine Verdünnungsreihe von 10⁻³ bis 10⁻¹⁰ hergestellt. Pro Verdünnungsstufe wurden anschließend 12 Wells einer 96-Well-Platte mit 100 µl Virusverdünnung versetzt und die Zellen anschließend im Brutschrank inkubiert. Die Bestimmung erfolgte im dreifachen Ansatz (drei 96-Well-Platten). Um den Virustiter nach Durchführung einer zentrifugalen Verstärkung zu bestimmen („centrifugal enhancement“ [200]), wurden drei weitere 96-Well-Platten identisch angesetzt. Nach Viruszugabe wurden die Zellen für 30 min bei 1000 g zentrifugiert und anschließend im Brutschrank inkubiert.

Fünf bis sechs Tage nach Infektion erfolgte die Auswertung und Titerbestimmung. Hierfür wurde die Anzahl der Wells mit grünen Plaques bzw. zytotischem Effekt am Mikroskop ausgezählt und der Titer mit der Spearman-Kärber-Methode anhand nachstehender Formel berechnet:

$$\text{Titer} = \frac{10^N}{\text{Infektionsvolumen [ml]}} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$$

$$N = X - 0,5 + \frac{\text{Summe der Plaque-positiven Wells ab X}}{\text{Anzahl der Wells pro Verdünnung}}$$

X = höchste Verdünnung, bei der alle Wells Plaque-positiv sind (10⁻³ entspricht 3; 10⁻⁴ entspricht 4 usw.)

2.2.2.6 Infektion von Zellen

Die Zellen wurden mit einer „multiplicity of infection“ (MOI) von 3 - 6 TCID₅₀/Zelle infiziert. Die MOI gibt das zahlenmäßige Verhältnis von infektiösen Viruspartikeln zu den Zielzellen an.

Die Zellen wurden am Tag vor der Infektion mit definierter Zellzahl subkonfluent ausgesät. Die benötigte Virusmenge für eine festgesetzte MOI wurde anhand des Virustiters berechnet und in das Kulturmedium der Zellen pipettiert. Die Zellen wurden bis zur weiteren Verwendung im Brutschrank inkubiert. Wurden die Zellen mit Viren infiziert, deren Titer nach der Durchführung einer zentrifugalen Verstärkung bestimmt wurde, so wurden die Zellen nach Viruszugabe für 30 min bei 1000 g zentrifugiert und anschließend im Brutschrank inkubiert.

2.2.2.7 Anzucht von Retroviren

Retroviren wurden mithilfe der Phoenix-Verpackungszelllinie, welche die Retrovirusproteine gag, pol und env stabil exprimiert, angezogen. Die Transfektion der Zelllinie mit einem Retrovirusvektor, in den ein gewünschtes Fremdgen kloniert wird, führt zur Produktion von infektiösen, replikationsinkompetenten Retroviren, welche die RNA des Fremdgens enthalten. Nach Infektion von Zielzellen wird die RNA in DNA umgeschrieben, in die chromosomale Wirtszell-DNA integriert und von dort aus exprimiert.

Für die Herstellung von Retroviren wurden 80 % konfluente Phoenixzellen in 10 cm Schalen mittels Kalziumphosphat transfiziert. 48 h nach der Transfektion erfolgte die erste Ernte der Retroviren. Hierfür wurde das Zellkulturmedium (10 ml pro Schale) mit den darin befindlichen Retroviren durch einen 0,45 µm Filter filtriert, aliquotiert und bei -80 °C eingefroren. Die Phoenixzellen wurden mit frischem Medium versetzt und erneut im Brutschrank inkubiert. 24 h später erfolgte eine zweite Retrovirusernte.

2.2.2.8 Retrovirale Transduktion

Die retrovirale Transduktion dient dem Transfer eines gewünschten Gens in eine Zielzelle und der dortigen Expression. Der Vorteil gegenüber der Transfektion liegt in einer höheren Effizienz, der Integration des Gens in die Wirtszell-DNA sowie in einer moderateren Genexpression.

Die Transduktion wurde in 6-, 12- oder 96-Well-Platten durchgeführt. Die Zellen mussten hierfür subkonfluent sein. Für die Transduktion wurde das Zellkulturmedium abgesaugt, der pure Retrovirusüberstand wurde auf die Zellen gegeben (3 ml pro Well einer 6-Well-Platte) und mit 5 µg/ml Polybrene versetzt. Um die Effizienz der Transduktion zu erhöhen, wurden die Zellen anschließend für 30 min bei 1000 g zentrifugiert. Danach erfolgte die Inkubation im Brutschrank. 6 - 8 h nach Zentrifugation wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Bei Bedarf wurde die Transduktion am folgenden Tag wiederholt.

2.2.2.9 Herstellung stabiler Zelllinien

Für die Herstellung einer Zelllinie, die stabil Flag-NEMO exprimiert, wurden zunächst Retroviren mithilfe des Retrovirusvektors pMSCVpuro-Flag-NEMO hergestellt. Anschließend

wurden NIH3T3-Zellen mit den Retroviren transduziert und zwei Tage später einer Selektion mit 3 µg/ml Puromycin unterzogen. Die Selektion dauerte an bis alle Kontrollzellen (untransduzierte Zellen) abgetötet waren. Die Expression von Flag-NEMO wurde mittels SDS-PAGE und Western Blot bzw. Immunfluoreszenzanalyse überprüft.

Die Herstellung einer NIH3T3-Zelllinie, die stabil EGFP-LC3 exprimiert erfolgte analog zu der Herstellung der stabilen Flag-NEMO-Zelllinie

Für die Generierung einer Zelllinie, welche das NF-κB-Reporterplasmid pNiFty2-SEAP (Zeocin-selektierbar) stabil exprimiert, wurde das Reporterplasmid mit *NotI* linearisiert, aufgereinigt und anschließend mit Polyfect in NIH3T3-Zellen transfiziert. Die Zellen wurden zwei Tage später einer 14-tägigen Selektion mit Zeocin (500 µg/ml) unterzogen.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Herstellung von Zelllysaten und Bestimmung der Proteinkonzentration

Methode 1: Lyse mit Laemmli-Probenpuffer

Diese Methode wurde unter anderem für die Analyse der IκBα-Degradation nach Rezeptorstimulation angewandt, da sie eine schnelle und zeitgleiche Lyse der Zellen ermöglicht.

Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und anschließend durch Zugabe von kochendem 1X Laemmli-Probenpuffer lysiert (120 µl pro Well einer 12-Well-Platte). Die Lysate wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, für 5 min bei 100 °C inkubiert und anschließend bei -20 °C eingefroren oder direkt für die SDS-PAGE verwendet.

Methode 2: RIPA- bzw. NP-40-Lyse

Die Lyse nach Methode 1 war ungeeignet, falls im Anschluss die Proteinkonzentration gemessen werden sollte. In diesen Fällen wurden die Zellen mit RIPA-Puffer lysiert. Die Lyse mit NP-40-Puffer erfolgte, falls nachfolgend eine Koimmunpräzipitation durchgeführt werden sollte.

Die Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend mit Lysepuffer versetzt (1 ml pro 10 cm Schale bzw. ca. 300 µl pro Well einer 6-Well-Platte). Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis wurde das Lysat in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und unlösliche Bestandteile und/oder Zelltrümmer durch Zentrifugation pelletiert (16000 g, 20 min, 4 °C). Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und im Falle einer nachfolgenden Koimmunpräzipitation direkt für das „Preclearing“ eingesetzt. Für alle anderen Versuche war eine Lagerung bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung möglich.

Die Proteinkonzentration in Zelllysaten wurde mithilfe des BCA-Kits nach dem Protokoll des Herstellers bestimmt. Bei jeder Messung wurde eine BSA-Standardreihe mitgeführt, anhand welcher die Proteinkonzentration der Proben errechnet wurde.

Vor der Analyse mittels SDS-PAGE wurden die Lysate mit 2X Laemmli-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 100 °C inkubiert.

2.2.3.2 SDS-PAGE

Die SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE) dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe. Das Polyacrylamid bildet hierbei eine Matrix, welche als Molekularsieb dient. Das anionische Tensid SDS führt zur Denaturierung der Proteine und lagert an diese an, wodurch alle Proteine eine negative Ladung erhalten.

Für kleine Gele (10 Taschen) wurde das „Mini-Protean 3 Cell“-System verwendet, für große Gele (15 Taschen) das „SE400 Vertical Unit“-System. Die Gele wurden in Gießvorrichtung zwischen zwei Glasplatten gegossen. Hierfür wurde zunächst das Trenngel zwischen die Glasplatten gefüllt und mit Wasser überschichtet. Nach der Polymerisierung wurde das Wasser entfernt, das Trenngel mit einem Sammelgel überschichtet und die Taschen wurden mithilfe eines Kamms geformt. Die Gele wurden in die Laufvorrichtungen gespannt, die Taschen mit Puffer gespült und anschließend mit Proben und einem Proteinstandard beladen. Die Gelelektrophorese erfolgte in Laemmli-Laufpuffer bei 120 V für 1 - 1,5 h (kleine Gele) bzw. bei 15 - 30 mA über Nacht (große Gele).

Tabelle 2.1: Zusammensetzung von SDS-Polyacrylamid-Gelen. Angegeben sind die Volumina für die Herstellung ein kleines Gels.

	Trenngel (10 %) [ml]	Sammelgel (5 %) [ml]
Rotiphorese Gel 30	3,3	0,85
0,5 M Tris-HCL, pH 6,8	–	1,25
1,5 M Tris-HCL, pH 8,8	2,5	–
20 % SDS	0,05	0,025
H ₂ O	4,1	2,85
10 % APS	0,1	0,05
TEMED	0,02	0,01

2.2.3.3 Transfer von Proteinen auf eine Membran (Western Blot)

Nach der SDS-PAGE wurden die Proteine mit dem Semidry-Blotverfahren durch ein vertikal zum Gel angelegtes elektrisches Feld auf eine Nitrozellulosemembran transferiert.

Das Gel, die Membran und Whatman-Filterpapiere wurden für 5 min in Transferpuffer equilibriert und anschließend wurde die Blotapparatur nach folgendem Schema aufgebaut: Anode, 3 x Filterpapier, Membran, Gel, 3 x Filterpapier, Kathode. Der Transfer erfolgte bei 2 mA pro cm² für 60 bis 75 min. Im Anschluss wurde die Membran zur Kontrolle für 30 s mit

Ponceau-S inkubiert, welches Proteine unspezifisch rot anfärbt. Hierdurch konnte beurteilt werden, ob der Proteintransfer gleichmäßig stattgefunden hatte. Zur Entfärbung wurde die Membran mehrmals mit TBS gewaschen.

Der Nachweis der transferierten Proteine erfolgte durch eine spezifische Antigen-Antikörper Reaktion und die Detektion einer Chemilumineszenzreaktion. Zunächst wurde die Membran für 1 h in Blockierungspuffer inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Darauf folgte die Inkubation mit einem Primärantikörper (bei 4 °C über Nacht), der gegen das nachzuweisende Protein gerichtet war. Die Membran wurde am nächsten Tag dreimal für 5 min mit Waschpuffer gewaschen und danach für 1 h mit einem Meerrettich-Peroxidase (HRP)-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Im Anschluss folgten vier 10-minütige Waschschrte. Alle Inkubations- und Waschschrte wurden unter ständigem Schütteln auf einem Plattformschüttler durchgeführt. Mit Ausnahme der Primärantikörper von Cell Signaling Technology (siehe 2.1.14) wurden alle Antikörper in Blockierungslösung verdünnt.

Für die Visualisierung der Proteine wurde die Membran mit einem Chemilumineszenz-Substrat (ECL-Lösung) inkubiert, welches von der Peroxidase unter Emittierung von Licht umgesetzt wird. Die emittierten Lichtstrahlen wurden hierbei auf einem Röntgenfilm detektiert. Die Dauer der Filmexposition richtete sich nach der Stärke des Signals. Für den Nachweis von schwachen Signalen wurde die ECL-Lösung 10:1 mit Advance-ECL-Lösung gemischt.

Falls nach der ersten Proteinfärbung auf derselben Membran ein weiteres Protein mit der gleichen Größe detektiert werden sollte, mussten die Antikörper der ersten Anfärbung von der Membran entfernt („gestrippt“) werden. Hierfür wurde die Membran in Stripping-Puffer unter ständigem Schütteln inkubiert (30 min, 65 °C) und danach ausgiebig gewaschen (4 x 15 min mit PBS + 0,5 % Tween-20, Raumtemperatur). Im Anschluss erfolgte eine erneute Blockierung und die Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörpern.

2.2.3.4 Koimmunpräzipitation

Mithilfe der Koimmunpräzipitation können Proteininteraktionen in Zellen untersucht werden. Hierfür wird ein Protein mittels eines spezifischen Antikörpers aus einem Proteingemisch angereichert (präzipitiert) und die an das Protein gebundenen Interaktionspartner werden durch SDS-PAGE und Western Blot visualisiert.

Für die Koimmunpräzipitation wurden Zellen in 10 cm Schalen mittels Polyfect oder Kalziumphosphat transfiziert bzw. in 6-Well-Platten infiziert und 24 - 48 h später mit NP-40-Puffer lysiert. Die Zelllysate wurden einem „Preclearing“ unterzogen, um Proteine zu entfernen, die unspezifisch an Sepharose binden. Hierfür wurden die Lysate (1 ml) mit 20-

30 µl Protein-A-Sepharose bzw. Protein-G-Sepharose (PAS bzw. PGS) versetzt und bei 4 °C für 1 h auf einem Überkopf-Rotator inkubiert. Die Sepharose wurde anschließend durch Zentrifugation pelletiert (16000 g, 30 s) und 110 µl des Überstandes wurden als Lysatkontrolle in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 100 µl 2X Laemmli-Probenpuffer versetzt, aufgekocht und bei -20 °C eingefroren. Der Rest des Überstandes wurde mit einem gegen das zu präzipitierende Protein gerichteten Antikörper versetzt und über Nacht bei 4 °C auf einem Überkopf-Rotator inkubiert. Je nach verwendetem Antikörper wurden am nächsten Tag 60 µl PAS oder PGS hinzugefügt. Nach einer 2-stündigen Inkubation (4 °C, Überkopf-Rotator) wurde die Sepharose pelletiert (16000 g, 1 s) und dreimal mit Waschpuffer B, zweimal mit Waschpuffer C und einmal mit Waschpuffer D gewaschen. Hierfür wurde jeweils 1 ml Waschpuffer zu der pelletierten Sepharose gegeben, kurz auf einem Vortexer gemischt und danach zentrifugiert (16000 g, 1s). Nach dem letzten Waschschrift wurde die gesamte Flüssigkeit mit einer Hamiltonpipette entfernt und die Sepharose in 50 - 100 µl 2X Laemmli-Probenpuffer für 10 min bei 100 °C inkubiert, um die Proteine von der Sepharose zu lösen. Die Sepharose wurde danach durch Zentrifugation pelletiert und der Überstand bei -20 °C gelagert oder direkt mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

2.2.3.5 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenzfärbung ermöglicht die Analyse der subzellulären Verteilung von Proteinen. Bei der indirekten Färbung wird die Bindung von einem unmarkierten Primärantikörper an ein spezifisches Protein durch einen Fluoreszenzfarbstoff-markierten Sekundärantikörper nachgewiesen.

NIH3T3-Zellen wurden auf autoklavierte Deckgläschen, die in 12-Well-Platten gelegt wurden, subkonfluent ausgesät ($1 - 1,5 \times 10^5$ Zellen/Well). Am nächsten Tag wurden die Zellen transfiziert oder infiziert und bis zur Immunfluoreszenzfärbung im Brutschrank inkubiert. Zum gewünschten Zeitpunkt wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und für 20 min in Paraformaldehyd (4 % in PBS) fixiert. Um freie Aldehydgruppen abzusättigen, wurden die Zellen anschließend für 10 min mit Ammoniumchlorid (50 mM) inkubiert. Es folgte eine 10-minütige Permeabilisierung mit Triton-X100 (0,3 % in PBS) und eine Inkubation für mindestens 10 min in Blockierungspuffer (0,2 % Gelatine in PBS), um unspezifische Antikörperbindungsstellen abzusättigen. Zwischen allen Inkubationsschritten wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen.

Die Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörpern wurde in Blockierungspuffer für jeweils 1 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Eine Ausnahme bildete die Inkubation mit dem anti-NF-κB-p65-Antikörper, die über Nacht bei 4 °C erfolgte. Für die Antikörperinkubation wurden die Deckgläschen mit den fixierten Zellen in eine Feuchtkammer gelegt und mit 80 µl Primärantikörperlösung bedeckt. Nach der Inkubation wurden die Deckgläschen zurück in

die 12-Well-Platte überführt, zweimal mit PBS, einmal mit PBS + 0,1% Tween gewaschen und in der Feuchtkammer mit 80 µl Sekundärantikörperlösung versehen. Die Inkubation erfolgte hierbei im Dunkeln, um ein Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes zu vermeiden. Im Falle von Doppelfärbungen wurden beide Primär- bzw. Sekundärantikörper als Gemisch auf die Zellen gegeben. Nach der Inkubation mit Sekundärantikörpern wurden die Deckgläschen erneut in die 12-Well-Platte überführt, dreimal mit PBS gewaschen und die Zellkerne für 10 min mit DAPI angefärbt (0,25 µg/ml in PBS). Nach weiteren ausgiebigen Waschschritten (dreimal PBS, dreimal H₂O) wurden die Deckgläschen mit PolyMount-Mountingmedium auf Objektträgern befestigt (Zellen nach unten). Die Proben wurden über Nacht zum Aushärten des Mountingmediums im Dunkeln gelagert und nachfolgend mit einem konfokalen Laserscanning Mikroskop analysiert.

2.2.3.6 Konfokale Laserscanning Mikroskopie (CLSM)

Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden an einem konfokalen Laserscanning Mikroskop von Zeiss (Modell: LSM 510 Meta) analysiert. Im Gegensatz zu der konventionellen Mikroskopie wird bei der konfokalen Laserscanning Mikroskopie die Probe nicht vollständig, sondern mit einem fokussierten Laserstrahl punktwise beleuchtet. Das Gesamtbild entsteht durch das sequenzielle Abrastern der Probe und durch die Detektion der vom jeweils abgerasterten Probenort emittierten Fluoreszenzstrahlung. Die Messwerte werden anschließend digital zusammengesetzt. Die Besonderheit der konfokalen Mikroskopie liegt in der konfokalen Blende, welche das emittierte Licht von Objekten, die außerhalb der Fokusebene liegen, ausblendet, bevor es auf den Detektor fällt. Im Gegensatz zur konventionellen Mikroskopie kann somit eine einzelne Ebene aufgenommen werden.

Die Immunfluoreszenzfärbung der Zellen wurde, wie unter 2.2.3.5 beschrieben, durchgeführt. Für die mikroskopische Analyse wurde das Wasserimmersionsobjektiv C-Apochromat 63x/1.2 benutzt und die konfokale Blende auf 1 eingestellt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der „Zeiss LSM Image Browser“-Software.

2.2.3.7 NF-κB-Reporterassay

Der NF-κB-Reporterassay diente zur Bestimmung der relativen NF-κB-Aktivierung in Zellen nach der Stimulation mit TLR-Agonisten. Der Assay basiert auf dem pNiFty2-SEAP-Reporterplasmid, welches sekretierte embryonale alkaline Phosphatase (SEAP) unter der Kontrolle eines gentechnisch modifizierten, NF-κB-induzierbaren ELAM-1-Promoters exprimiert. Die enzymatische SEAP-Aktivität wurde kolorimetrisch im Zellkulturüberstand gemessen und diente als Maß der NF-κB-Aktivierung.

NIH3T3-Zellen, welche das Reporterplasmid stabil exprimierten (2.2.2.9), wurden in 96-Well-Platten gesät (6 x 10³ Zellen/Well) und 24 h später mit 120 µl Retrovirusüberstand transduziert. Drei Tage nach Transduktion wurden die Zellen für 15 h mit TLR-Agonisten

stimuliert bzw. mock behandelt. Der Zellkulturüberstand wurde anschließend in eine Spitzbodenplatte überführt, abgelöste Zellen wurden durch Zentrifugation (1000 g, 2 min) pelletiert und der Überstand wurde in eine neue 96-Well-Platte überführt. Nachdem die endogene alkaline Phosphatase, welche im Gegensatz zu SEAP hitzelabil ist, durch eine 30-minütige Inkubation der Proben bei 65 °C beseitigt wurde, erfolgte die Bestimmung der SEAP-Aktivität mithilfe des „Quanti-Blue“-Detektionsmediums. Hierfür wurden jeweils 20 µl der Proben mit 200 µl Detektionsmedium gemischt und anschließend bei 37 °C für 24 h im Brutschrank inkubiert. Der Farbumschlag des Detektionsmediums von pink zu blau wurde kolorimetrisch bei 615 nm mit einem Mikroplattenleser gemessen.

3. Ergebnisse

3.1 Inhibition von TLR- und IL-1R-Signalwegen durch das MCMV-Protein M45

3.1.1 Inhibition der NF- κ B-Aktivierung

Im Zuge einer Virusinfektion wird NF- κ B von Mustererkennungsrezeptoren, wie den TLRs, und von Zytokinrezeptoren aktiviert. Die Rezeptoren unterscheiden sich zum Teil in den Adapter- und Signalproteinen, über welche sie nach Rezeptorstimulation Signale intrazellulär weiterleiten. Der TNFR1 bzw. der TLR3 verwenden die Adapterproteine TRADD bzw. TRIF, welche anschließend RIP1 rekrutieren. Andere Rezeptoren nutzen das Adapterprotein MyD88, welches unabhängig von RIP1 Signale weiterleitet (Abb. 1.2). In einer früheren Arbeit wurde gezeigt, dass das MCMV-Protein M45 durch Interaktion mit RIP1 die TNFR1- und TLR3-induzierte NF- κ B-Aktivierung blockiert [164].

Um herauszufinden, ob M45 auch die RIP1-unabhängige NF- κ B-Aktivierung blockiert, wurde in der vorliegenden Arbeit die Signalweiterleitung des TLR2, des IL-1R und des TLR4 untersucht. Der TLR2 und IL-1R leiten Signale ausschließlich über den MyD88-abhängigen Signalweg weiter. TLR4 kann neben dem MyD88-abhängigen auch den TRIF-abhängigen Signalweg aktivieren, jedoch wurde beschrieben, dass die frühe Signalweiterleitung über MyD88 und somit RIP1-unabhängig stattfindet [111,112].

Als Maß der NF- κ B-Aktivierung wurde zunächst die Degradation des Inhibitors I κ B α untersucht. In unstimulierten Zellen bindet I κ B α an NF- κ B und sequestriert den Transkriptionsfaktor im Zytoplasma. Nach Rezeptorstimulation wird I κ B α jedoch proteasomal degradiert, wodurch NF- κ B freigesetzt wird und in den Zellkern wandert [134]. In Abbildung 3.1 wurde mittels Western Blot der kinetische Verlauf der I κ B α -Degradation nach Rezeptorstimulation in NIH3T3-Fibroblasten analysiert. Die Stimulation mit dem TLR4-Agonisten LPS führte in uninfizierten Zellen nach 15 Minuten zu einer fast vollständigen Degradation von I κ B α (Abb. 3.1 A). In Zellen, die für 5 Stunden mit Wildtyp-MCMV (wt) oder einer M45-Revertante (RM45) infiziert waren, wurde die Degradation hingegen vollständig blockiert. M45 war das hierfür verantwortliche virale Protein, da die Infektion mit einer M45-Deletionsmutante (Δ M45) keine Inhibition des I κ B α -Abbaus bewirkte. Der gleiche inhibierende Effekt von MCMV auf die I κ B α -Degradation wurde nach Stimulation des TLR2 mit Pam₃CSK₄ und des IL-1R mit IL-1 β beobachtet (Abb. 3.1 B und Abb. 3.1 C).

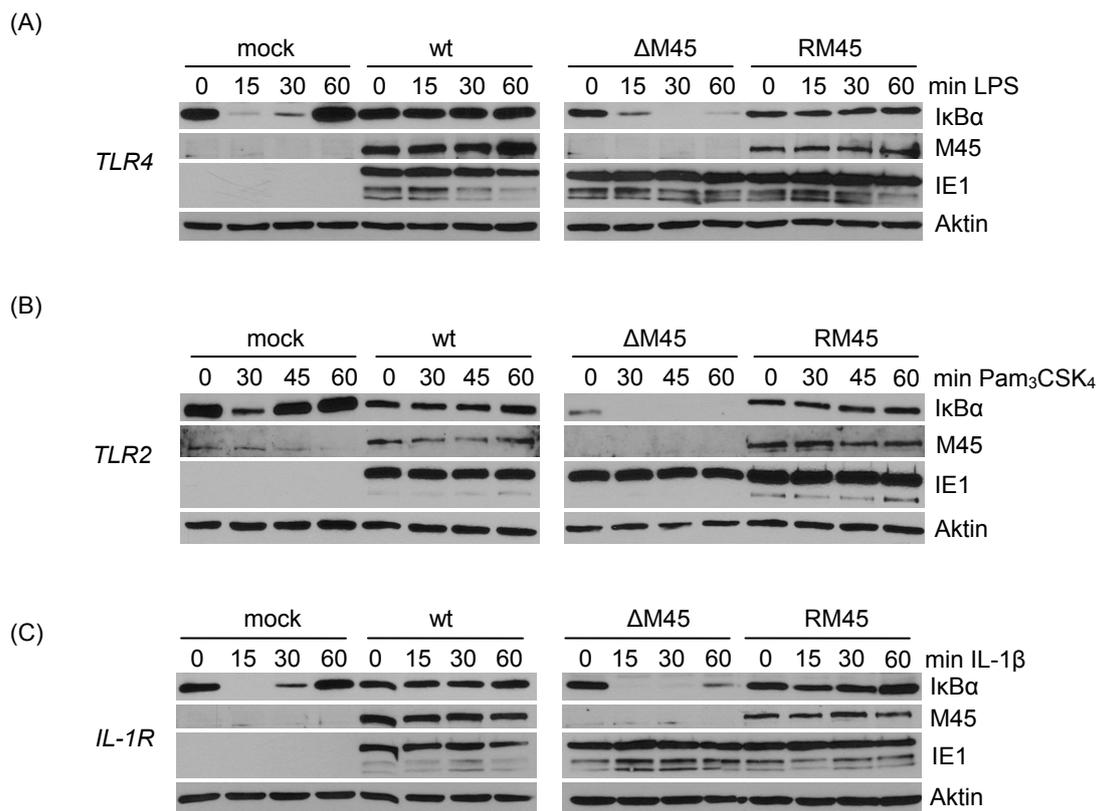


Abbildung 3.1: MCMV blockiert M45-abhängig die TLR- und IL-1R-induzierte IκBα-Degradation. NIH3T3- (IL-1R- und TLR4-Stimulation) bzw. 10.1- (TLR2-Stimulation) Fibroblasten wurden mit Wildtyp-MCMV (wt), einer M45-Deletionsmutante (ΔM45) oder einer M45-Revertante (RM45) infiziert (MOI von 5 TCID₅₀/Zelle). 5 hpi wurden die Zellen mit (A) 10 μg/ml LPS, (B) 100 ng/ml Pam₃CSK₄ oder (C) 20 ng/ml IL-1β für die angegebene Zeit behandelt. Die Zellen wurden mit kochendem Laemmli-Probenpuffer lysiert und im Western Blot unter Verwendung von spezifischen Antikörpern analysiert. Die Detektion von IE1 bzw. Aktin diente als Infektions- bzw. Ladekontrolle.

Um herauszufinden, ob M45 auch ohne die Hilfe anderer viraler Protein in der Lage ist, die IκBα-Degradation zu blockieren, wurde M45 oder GFP (als Kontrolle) durch retrovirale Transduktion isoliert in NIH3T3-Fibroblasten exprimiert. Die Zellen wurden anschließend mit Agonisten stimuliert und im Western Blot analysiert. Es zeigte sich, dass die alleinige Expression von M45 ausreichend war, um den Abbau von IκBα nach Stimulation des TLR4, TLR2 oder IL-1R zu blockieren (Abb. 3.2 A).

Die Unabhängigkeit der Agonisten-induzierten IκBα-Degradation vom TRIF/RIP1-medierten Signalweg wurde exemplarisch für IL-1β bestätigt, indem gezeigt wurde, dass die IL-1β-Behandlung in TRIF-defizienten Zellen unter den gleichen Bedingungen (gleiche Agonistenkonzentration und Stimulationsdauer) zum Abbau von IκBα führte, wie in den NIH3T3-Fibroblasten aus Abbildung 3.2 A (Abb. 3.2 B). Die Degradation von IκBα wurde in den TRIF-defizienten Zellen, genauso wie in den NIH3T3-Fibroblasten, durch M45 blockiert.

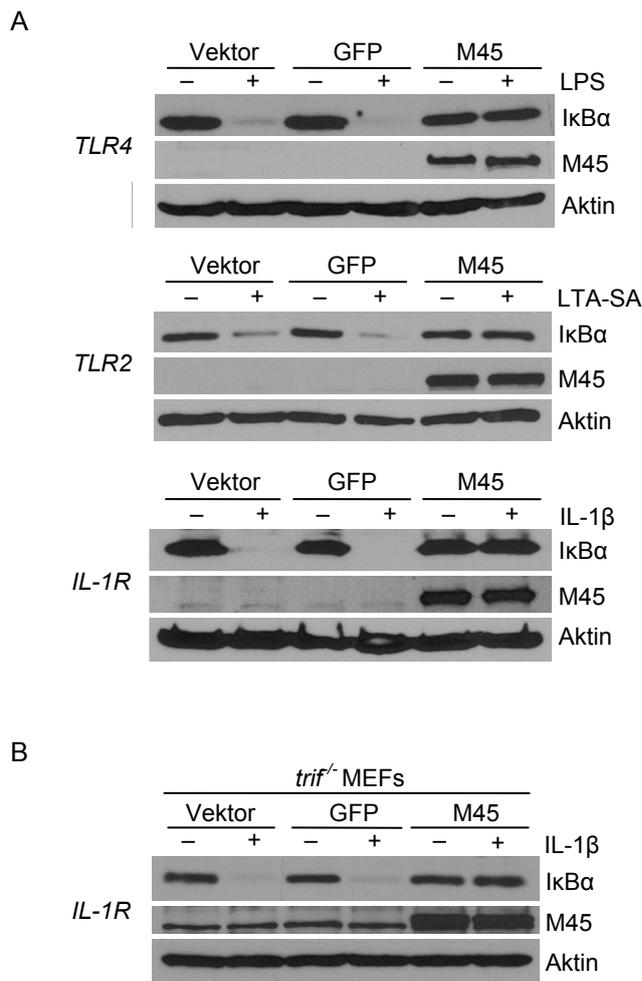


Abbildung 3.2: M45 alleine blockiert die TLR- und IL-1R-induzierte IkB α -Degradation.

(A) NIH3T3-Fibroblasten wurden mit M45- oder GFP-exprimierenden retroviralen Vektoren bzw. Leervektor transduziert. 48 h später wurden die Zellen mit LPS (10 μ g/ml, 15 min), LTA-SA (10 μ g/ml, 50 min) bzw. IL-1 β (20 ng/ml, 15 min) behandelt und mit kochendem Laemmli-Probenpuffer lysiert. Die Analyse erfolgte im Western Blot unter Verwendung von spezifischen Antikörpern. Die Detektion von Aktin diente als Ladekontrolle. (B) TRIF-defiziente murine embryonale Fibroblasten (*trif*^{-/-} MEFs) wurden wie unter (A) beschrieben transduziert. 72 h später wurden die Zellen mit IL-1 β (20 ng/ml, 15 min) behandelt und mit kochendem Laemmli-Probenpuffer lysiert. Die Analyse erfolgte im Western Blot wie unter (A) beschrieben.

Als nächstes wurde die intrazelluläre Verteilung der NF- κ B-Untereinheit p65 (NF- κ B-p65, RelA) mittels Immunfluoreszenzfärbung und konfokaler Mikroskopie untersucht. Wie die Verteilung der Fluoreszenzsignale in Abbildung 3.3 zeigt, war NF- κ B-p65 in unbehandelten Kontrollzellen (NIH3T3-Vektor) bzw. M45-exprimierenden Zellen (NIH3T3-M45-HA) fast ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert. Nach einer 30-minütigen Stimulation mit IL-1 β wurde in den Kontrollzellen eine zusätzliche nukleäre Lokalisation beobachtet. In den M45-exprimierenden Zellen wurde hingegen weiterhin nur ein zytoplasmatisches Signal detektiert. Die Inhibition der IkB α -Degradation durch M45 (Abb. 3.1 und Abb. 3.2) stimmte somit mit einer Blockierung der NF- κ B-p65-Translokation aus dem Zytoplasma in den Zellkern überein.

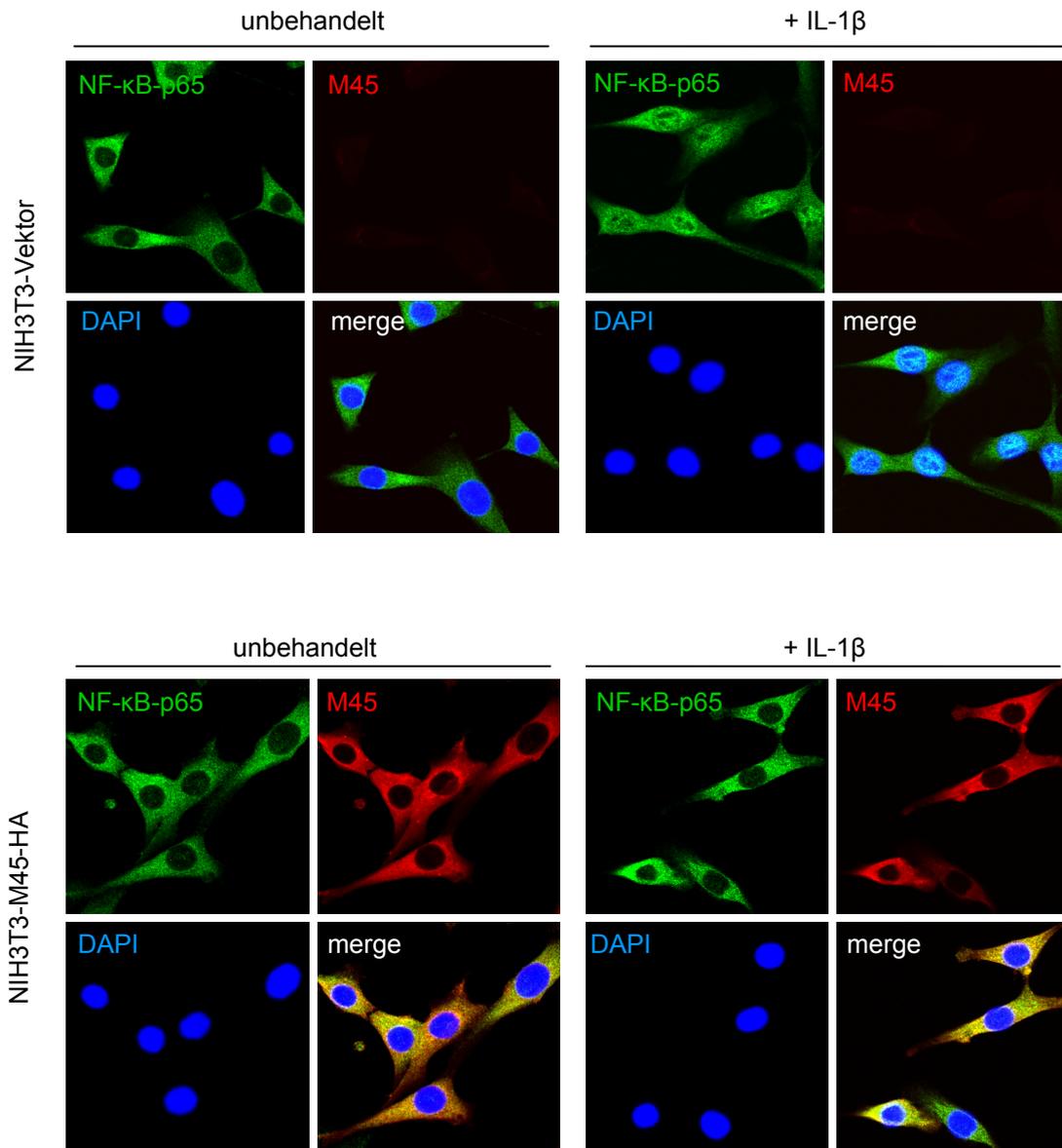


Abbildung 3.3: M45 blockiert die IL-1 β -induzierte nukleäre Translokation von NF- κ B-p65. NIH3T3-Zellen wurden mit retroviralen Vektoren, die HA-Epitop markiertes M45 exprimieren, bzw. mit Leervektor transduziert. Die Zellen wurden für 30 min mit IL-1 β (10 ng/ml) behandelt bzw. unbehandelt gelassen und anschließend fixiert. NF- κ B-p65 und M45 wurden in einer Immunfluoreszenz-Doppelfärbung mit anti-NF- κ B-p65- und anti-HA-Primärantikörpern und AlexaFluor488- und AlexaFluor594-gekoppelten Sekundärantikörpern angefärbt. Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Die Aufnahmen erfolgten an einem konfokalen Laserscanning Mikroskop. Durch Überlagerung der Fluoreszenzbilder entstanden die Merge-Abbildungen.

Zur Bestätigung, dass die Blockierung der I κ B α -Degradation und NF- κ B-p65-Translokation tatsächlich mit einer Inhibition der NF- κ B-Aktivierung korreliert, wurde als nächstes ein NF- κ B-Reporterassay durchgeführt. Hierfür wurde eine NF- κ B-Reporterzelllinie mit retroviralen Vektoren transduziert, die M45 bzw. GFP (als Kontrolle) exprimieren, und 72 Stunden später mit TLR4-, TLR2- bzw. IL-1R-Agonisten behandelt. Es zeigte sich, dass die Behandlung in den Kontrollzellen (GFP bzw. Vektor) zu einer ca. 9 - 13-fachen NF- κ B-Aktivierung führte,

wohingegen in M45-exprimierenden Zellen nur eine ca. 2,5-fache Aktivierung nachgewiesen wurde (Abb. 3.4).

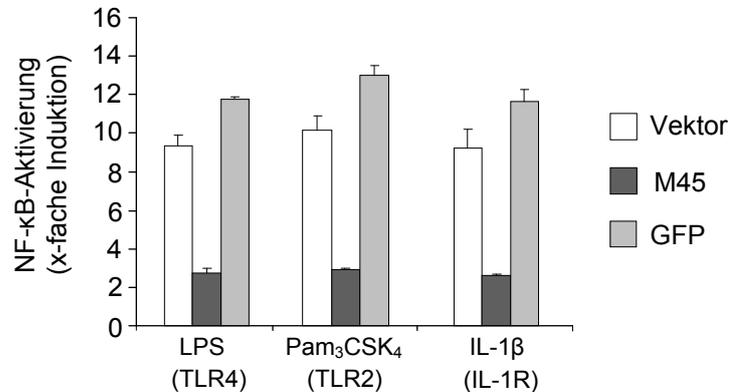


Abbildung 3.4: M45 inhibiert die TLR- und IL-1R-induzierte NF-κB-abhängige Reporterexpression. NIH3T3-Zellen, welche ein NF-κB-abhängiges Reporterplasmid stabil exprimieren, wurden mit M45- bzw. GFP-exprimierenden retroviralen Vektoren bzw. Leervektor transduziert. 78 h später wurden die Zellen für 15 h mit LPS (0,1 µg/ml), Pam₃CSK₄ (1 µg/ml) bzw. IL-1β (5 ng/ml) stimuliert. Im Zellkulturüberstand wurde die Menge von sekretierter embryonaler alkaliner Phosphatase (SEAP) gemessen, welche von dem Reporterplasmid unter der Kontrolle eines NF-κB-abhängigen Promoters exprimiert wurde. Die Transduktion und Behandlung erfolgte im dreifachen Ansatz. Als Maß der NF-κB-Aktivierung ist die Induktion der SEAP-Sekretion in behandelten Zellen bezogen auf unbehandelte Zellen, mit Standardabweichung der Triplikate, dargestellt. Das Ergebnis ist repräsentativ für zwei unabhängige Versuche.

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass M45 die Aktivierung von NF-κB nach Stimulation des TLR4, TLR2 und IL-1R inhibiert. Von Kooperationspartnern (T.P. Jowers und M.M Brinkmann) wurde zudem eine Inhibition der TLR7- bzw. TLR9-induzierten nukleären Translokation von NF-κB bzw. eine Inhibition der TNFα-Produktion in Makrophagen nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Beide Rezeptoren führen, genauso wie der TLR2 und der IL-1R, ausschließlich über den RIP1-unabhängigen MyD88-Signalweg zur Aktivierung von NF-κB (Abb. 1.2). Somit zeigen die Ergebnisse insgesamt, dass M45 in der Lage ist, die RIP1-unabhängige Aktivierung von NF-κB durch verschiedene Rezeptoren zu hemmen.

3.1.2 Analyse der p38 MAPK-Aktivierung

TLRs und der IL-1R aktivieren neben NF-κB auch die p38 MAPK [201]. Der Einfluss von M45 auf die Aktivierung von p38, welche durch Phosphorylierung erfolgt, wurde in transduzierten Zellen nach IL-1R-Stimulation untersucht. Wie der Western Blot in Abbildung 3.5 A zeigt, führte die 15-minütige Behandlung mit IL-1β in M45-exprimierenden Zellen zu einer gleich starken Phosphorylierung von p38 wie in den Kontrollzellen (Vektor bzw. GFP). M45 war folglich nicht in der Lage, diesen Signalweg zu inhibieren. Als Positivkontrolle wurde der Einfluss von M45 auf die TNFR1-induzierte p38-Phosphorylierung untersucht. In einer früheren Arbeit wurde gezeigt, dass dieser Signalweg im Kontext der MCMV-Infektion durch

M45 blockiert wird [164]. In Übereinstimmung hiermit konnte in M45-exprimierenden Zellen ebenfalls eine Inhibition der p38-Phosphorylierung nach Stimulation des TNFR1 mit TNF α beobachtet werden (Abb. 3.5 B).

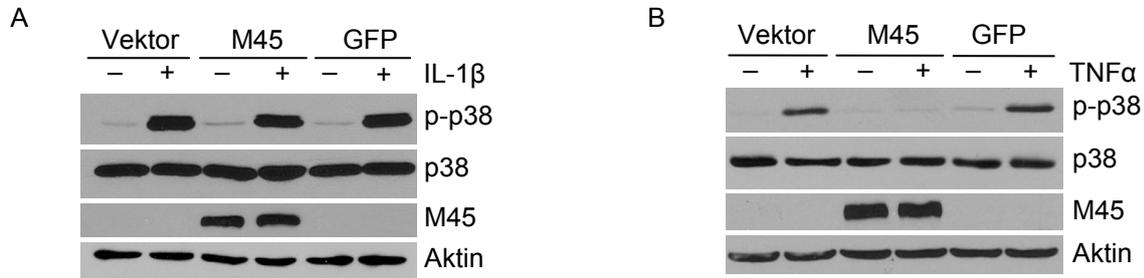


Abbildung 3.5: Die IL-1 β -induzierte Phosphorylierung der p38 MAPK wird durch M45 nicht gehemmt. NIH3T3-Zellen wurden mit M45- oder GFP-exprimierenden retroviralen Vektoren bzw. Leervektor transduziert und 2 Tage später mit (A) IL-1 β (20 ng/ml, 15 min) oder (B) TNF α (10 ng/ml, 5 min) stimuliert. Die Zellen wurden mit kochendem Laemmli-Probenpuffer lysiert und im Western Blot analysiert. Die phosphorylierte Form der p38 MAPK wurde mit einem phosphospezifischen p38-Antikörper angefärbt (p-p38). Zur Kontrolle wurden das gesamte p38, M45 und Aktin mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen.

3.2 Mechanismus der M45-vermittelten Inhibition der NF- κ B-Aktivierung

3.2.1 Interaktion von M45 mit dem IKK-Komplex

Nachdem gezeigt wurde, dass M45 die RIP1-unabhängige Aktivierung von NF- κ B blockiert, sollte im Folgenden untersucht werden, auf welcher Ebene M45 in die Rezeptorsignalwege eingreift. Die Signalkaskaden der RIP1-unabhängigen Rezeptoren, die zur Aktivierung von NF- κ B und p38 führen, sind zum Teil überlappend. Die ersten Schritte sind identisch, die Aufzweigung erfolgt auf der Ebene von TAK1 (Abb. 1.2). TAK1 kann zum einen den IKK-Komplex aktivieren, welcher den Inhibitor I κ B α phosphoryliert, wodurch dessen Ubiquitinierung und Degradation induziert wird. Zum anderen kann TAK1 auch die MAP-Kinase-Kinase 6 (MKK6) aktivieren, welche darauffolgend p38 phosphoryliert (Abb. 1.2).

Da M45 die IL-1R-induzierte Aktivierung von p38 nicht inhibiert (Abb. 3.5 A), wurde geschlossen, dass die Blockierung nicht auf der Ebene von TAK1 oder oberhalb davon stattfindet. Die Daten deuteten vielmehr darauf hin, dass der Angriffspunkt von M45 der IKK-Komplex sein könnte, da dieser Komplex essentiell für die NF- κ B-Aktivierung ist, jedoch nicht für die Aktivierung von p38 (Abb. 1.2). Eine potentielle Interaktion von M45 mit dem IKK-Komplex wurde mittels Koimmunpräzipitation untersucht. Die drei Untereinheiten des IKK-Komplexes IKK α , IKK β und NEMO wurden als Flag-Epitop markierte Versionen zusammen mit HA-Epitop markiertem M45 bzw. m143 (als Negativkontrolle) in HEK293-Zellen überexprimiert. M45 und m143 wurden mit einem anti-HA-Antikörper aus den Zelllysaten

präzipitiert und die Proben im Western Blot mit einem anti-Flag-Antikörper analysiert. Alle drei Untereinheiten kopräzipitierten mit M45, jedoch nicht mit m143 (Abb. 3.6 A). Es wurde ein großer Intensitätsunterschied zwischen den Western Blot Banden der drei kopräzipitierten Untereinheiten festgestellt: Ein starkes Signal wurde für kopräzipitiertes NEMO beobachtet. Die Signale für kopräzipitiertes IKK α bzw. IKK β waren im Vergleich dazu schwach. Die Ursache hierfür lag nicht in einer ungleichen Expression der Konstrukte, da in den Zelllysaten vergleichbare Proteinmengen detektiert wurden. Die Unterschiede deuteten somit darauf hin, dass M45 mit der NEMO-Untereinheit interagiert und dass die Bindung an IKK α bzw. IKK β nur indirekt über endogenes NEMO mediiert wird.

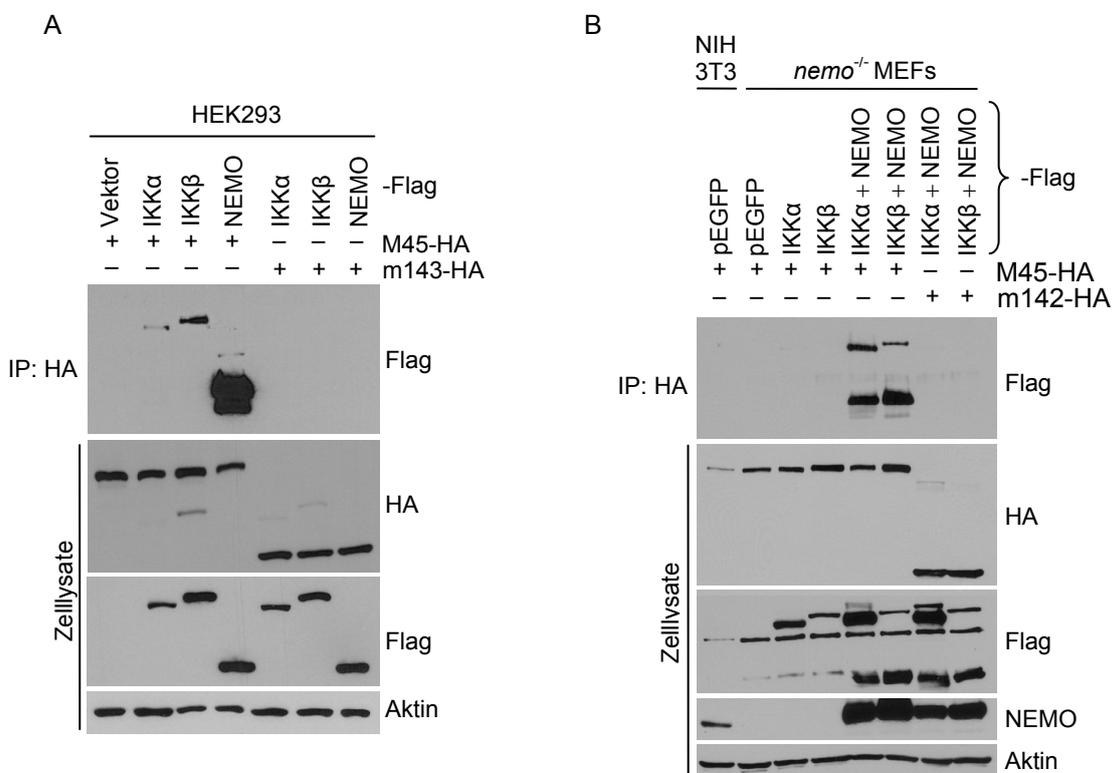


Abbildung 3.6: M45 interagiert mit der NEMO-Untereinheit des IKK-Komplexes. (A) Expressionsvektoren für HA-markiertes M45 bzw. -m143 wurden zusammen mit Expressionsvektoren für Flag-markiertes IKK α , -IKK β bzw. -NEMO wie angegeben in HEK293-Zellen transfiziert. 48 h später wurden die Zellen lysiert und einer Immunpräzipitation mit einem anti-HA-Antikörper unterzogen (IP: HA). Die Proben wurden im Western Blot mit einem anti-Flag-Antikörper analysiert. Die Expression der Konstrukte wurde in den Zelllysaten unter Verwendung von Antikörpern gegen das HA- bzw. Flag-Epitop überprüft. Die Detektion von Aktin diente als Ladekontrolle. (B) NIH3T3-Fibroblasten oder NEMO-defiziente embryonale Mausfibroblasten (*nemo*^{-/-} MEFs) wurden wie angegeben mit Expressionsvektoren transfiziert. 24 h später wurden die Zellen lysiert und einer anti-HA-Immunpräzipitation unterzogen (IP: HA). Die Proben wurden im Western Blot mit einem anti-Flag-Antikörper analysiert. In den Zelllysaten wurde die Expression der transfizierten Konstrukte mit Antikörpern gegen das HA- bzw. Flag-Epitop analysiert. Endogenes NEMO wurde mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen. Aktin diente als Ladekontrolle.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde eine Koimmunpräzipitation in NEMO-defizienten Zellen durchgeführt (Abb. 3.6 B). Bei alleiniger Überexpression von M45 mit IKK α bzw. IKK β

konnte keine Interaktion zwischen M45 und den beiden Untereinheiten festgestellt werden. Wurde jedoch zusätzlich NEMO überexprimiert, so wurde die IKK α - bzw. IKK β -Untereinheit mit M45 kopräzipitiert. Es wurde hingegen keine Interaktion mit dem Kontrollprotein m142 nachgewiesen. Somit zeigte dieser Versuch, dass M45 nur indirekt mit IKK α und IKK β interagiert.

Während der TNFR1-Signalweiterleitung bindet RIP1 an NEMO [125,140]. Da publiziert wurde, dass M45 ebenfalls an RIP1 bindet [164], wäre es denkbar, dass die Interaktion von M45 und NEMO nur indirekt, über RIP1 vermittelt, stattfindet. Die erfolgreiche Koimmunpräzipitation von überexprimiertem NEMO und M45 in RIP1-defizienten Zellen zeigte jedoch, dass für die Interaktion beider Proteine RIP1 nicht erforderlich ist (Abb. 3.7 A). Die Interaktion zwischen M45 und RIP1 wiederum ist unabhängig von NEMO, wie die erfolgreiche Koimmunpräzipitation von endogenem RIP1 mit überexprimiertem M45 in NEMO-defizienten Fibroblasten zeigte (Abb. 3.7 B).

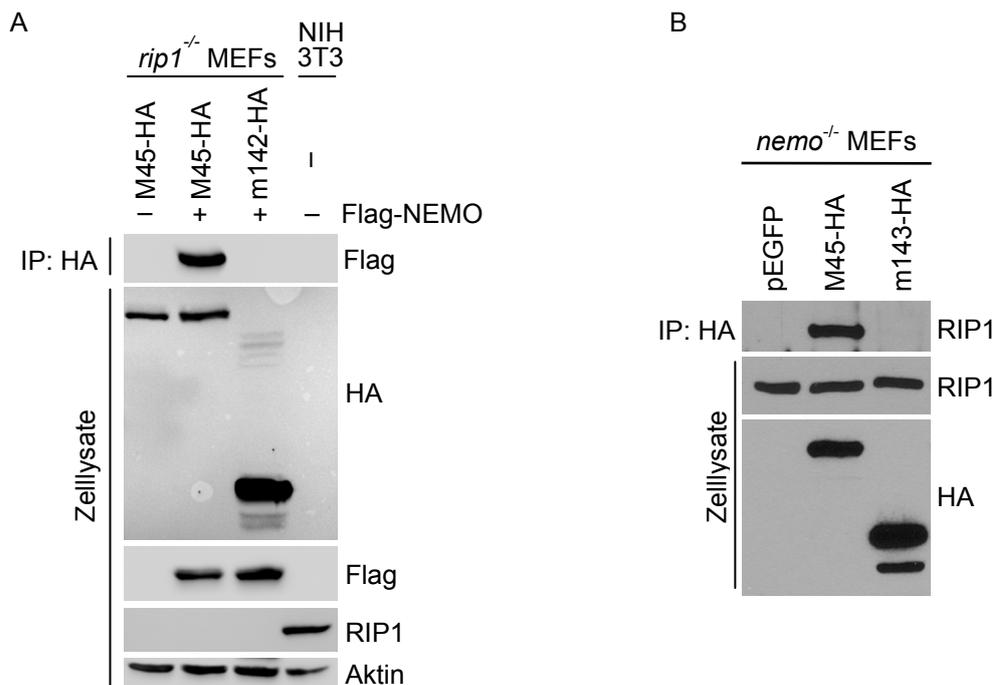


Abbildung 3.7: M45 interagiert RIP1-unabhängig mit NEMO und NEMO-unabhängig mit RIP1. (A) Expressionsvektoren für M45-HA bzw. m142-HA wurden zusammen mit Expressionsvektoren für Flag-NEMO in RIP1-defiziente murine embryonale Fibroblasten (*rip1*^{-/-} MEFs) transfiziert. 24 h später wurden die Zellen lysiert und einer Immunpräzipitation mit einem anti-HA-Antikörper unterzogen (IP: HA). Die Proben wurden im Western Blot mit einem anti-Flag-Antikörper analysiert. In den Zelllysaten wurde die Expression der Konstrukte mit Antikörpern gegen das HA- bzw. Flag-Epitop nachgewiesen. Die Anfärbung mit einem RIP1-spezifischen Antikörper diente zur Überprüfung der RIP1-Defizienz. Aktin diente als Ladekontrolle. (B) NEMO-defiziente murine embryonale Fibroblasten (*nemo*^{-/-} MEFs) wurden mit den angegebenen Expressionsvektoren transfiziert und 48 h später lysiert. Es folgte eine Immunpräzipitation mit einem anti-HA-Antikörper und die Analyse im Western Blot mit einem anti-RIP1-Antikörper. In den Zelllysaten wurde die Expression der Proteine mit anti-RIP1- bzw. anti-HA-Antikörpern überprüft.

Die bisherigen Nachweise der M45-NEMO-Interaktion erfolgten in transfizierten Zellen nach Überexpression beider Proteine. Als nächstes sollte die Interaktion unter physiologischeren Bedingungen untersucht werden. Hierfür wurde HA-markiertes M45 in HEK293-Zellen transfiziert und anschließend mit einem anti-HA-Antikörper präzipitiert. Die Anfärbung des Western Blots mit einem NEMO-spezifischen Antikörper zeigte, dass endogenes NEMO mit M45 kopräzipitierte (Abb. 3.8 A). Um die Interaktion auch im Viruskontext zu untersuchen, wurden Fibroblasten mit der Revertante RM45 bzw. Rm142 oder mit der Deletionsmutante Δ M45 infiziert. M45 und m142 wurden anschließend aus den Zelllysaten präzipitiert. Es zeigte sich, dass Virus-exprimiertes M45 mit endogenem NEMO interagiert. Es fand hingegen keine Interaktion von NEMO mit der Negativkontrolle m142 statt (Abb. 3.8 B). Interessanterweise waren die Proteinmengen von NEMO in den Zelllysaten der RM45- bzw. Rm142-infizierten Zellen geringer, als in den Lysaten der uninfizierten bzw. Δ M45-infizierten Zellen. Dies deutete darauf hin, dass MCMV auf eine M45-abhängige Weise eine Reduktion der NEMO-Proteinlevel verursacht.

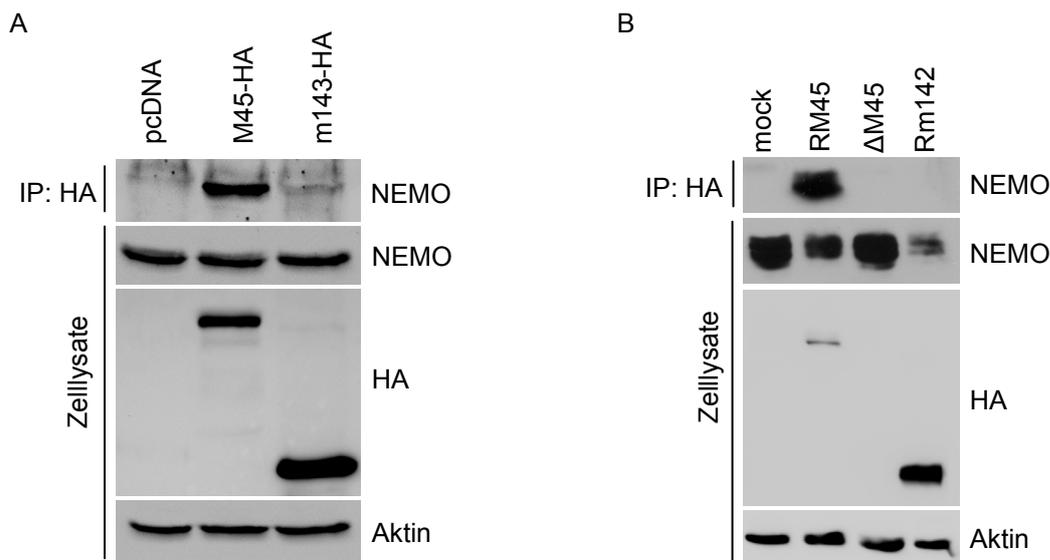


Abbildung 3.8: M45 interagiert in transfizierten bzw. infizierten Zellen mit endogenem NEMO. (A) HEK293-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für M45-HA oder m143-HA bzw. mit Leervektor (pcDNA) transfiziert. 24 Stunden später wurden die Zellen lysiert und einer anti-HA-Immunpräzipitation unterzogen (IP: HA). Die Proben wurden im Western Blot mit einem anti-NEMO-Antikörper analysiert. Die Zelllysate wurden mit den angegebenen Antikörpern analysiert. (B) NIH3T3-Fibroblasten wurden mit MCMV- Δ M45 (Δ M45) oder MCMV-Revertanten, die HA-markiertes M45 bzw. HA-markiertes m142 exprimieren infiziert (RM45 bzw. Rm142). 4 Stunden nach Infektion wurden die Zellen lysiert und es wurde eine Immunpräzipitation mit einem anti-HA-Antikörper durchgeführt (IP: HA). Der Western Blot wurde mit einem anti-NEMO-Antikörper angefärbt. Die Analyse der Zelllysate erfolgte mit anti-NEMO-, anti-HA- bzw. anti-Aktin-Antikörpern.

3.2.2 Einfluss von M45 auf die IKK-Proteinlevel

Die Koimmunpräzipitation in infizierten Fibroblasten (Abb. 3.8 B) wies darauf hin, dass M45 die Expression von NEMO reduziert bzw. dessen Degradation induziert. NEMO ist die regulatorische Untereinheit des IKK-Komplexes und als solche essentiell für die

Signalweiterleitung aller klassischen NF- κ B-Aktivierungswege. In NEMO-defizienten Zellen wird NF- κ B nach Simulation mit TNFR1-, IL-1R-, TLR4- oder TLR3-Agonisten nicht aktiviert [152]. Eine M45-induzierter Reduktion von NEMO könnte somit die Ursache für die Inhibition der NF- κ B-Aktivierung durch MCMV sein.

Um den Effekt auf die NEMO-Expression genauer zu untersuchen, wurde der zeitliche Verlauf der Proteinexpression in RM45- bzw. Δ M45-infizierten Fibroblasten analysiert. Untersucht wurde die Expression von allen drei endogenen IKK-Untereinheiten. Die Kinetik wurde über einen Zeitraum von 25,5 Stunden durchgeführt, um den vollen Replikationszyklus von MCMV betrachten zu können. Wie Abbildung 3.9 zeigt, führte die Infektion mit RM45 zu einer rapiden Abnahme der NEMO-Proteinlevel. Diese korrelierte mit dem Verlauf der M45-Expression: Bereits 3,5 Stunden nach Infektion war die NEMO-Proteinmenge stark reduziert. Zu diesem Zeitpunkt waren erstmals geringe Mengen von M45 nachweisbar. Zu späteren Zeitpunkten der viralen Replikation, als die M45-Expression stärker war (5 - 25,5 hpi), konnte NEMO kaum noch detektiert werden.

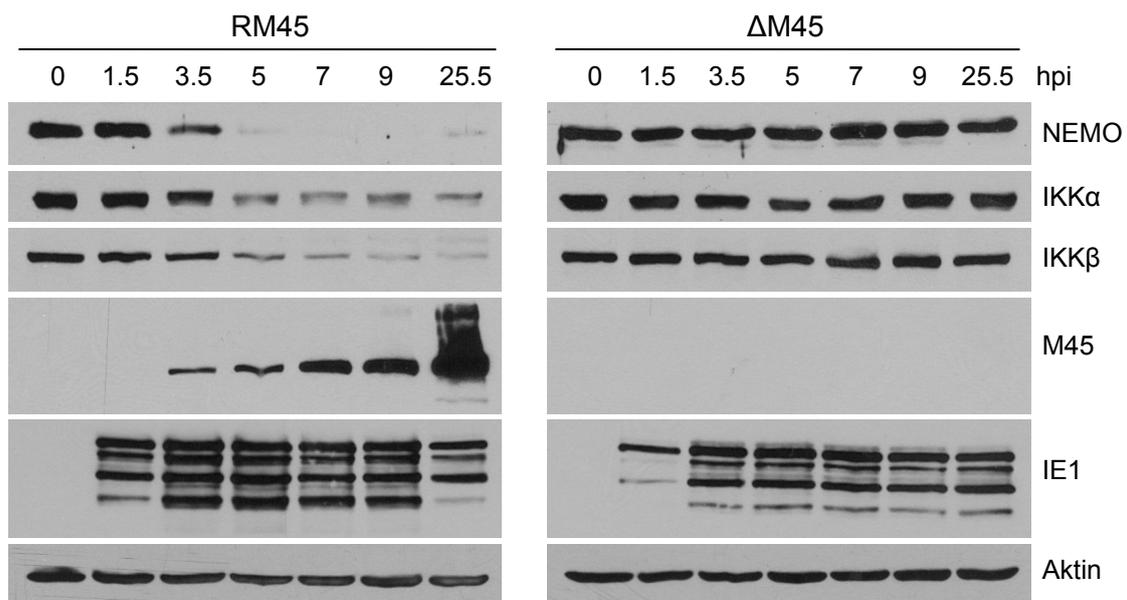


Abbildung 3.9: MCMV induziert M45-abhängig eine Reduktion der IKK-Proteinlevel. NIH3T3-Zellen wurden mit der Revertante RM45 oder mit Δ M45 infiziert (MOI von 3 TCID₅₀/Zelle) und zu den angegebenen Zeitpunkten mit RIPA-Puffer lysiert. Die Analyse der Proteinexpression erfolgte mittels Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen die endogene IKK α -, IKK β - bzw. NEMO-Untereinheit. M45 wurde mit einem anti-HA-Antikörper detektiert. Als Infektions- bzw. Ladekontrolle wurden IE1 bzw. Aktin nachgewiesen.

In RM45-infizierten Zellen wurde auch eine Abnahme der IKK α - und IKK β -Proteinlevel beobachtet. Dieser Effekt schien jedoch nicht so stark zu sein wie im Fall von NEMO, denn beide Untereinheiten konnten auch zu späteren Zeitpunkten (5 - 25,5 hpi) noch nachgewiesen werden. In Δ M45-infizierten Zellen wurde zu keinem Zeitpunkt eine wesentliche Änderung der Expression der drei IKK-Untereinheiten beobachtet. Dies zeigte,

dass die Regulation der IKK-Untereinheiten durch MCMV auf eine M45-abhängige Weise erfolgt.

Übereinstimmend mit der Analyse in infizierten Zellen wurden ebenfalls reduzierte NEMO-Level in Zellen festgestellt, in denen M45 isoliert exprimiert wurde (Abb. 3.10). Bereits 24 Stunden nach Transduktion mit M45-exprimierenden retroviralen Vektoren war NEMO im Western Blot nicht mehr nachweisbar, wohingegen die Kontrollzellen ein starkes NEMO-Signal aufwiesen. Die NEMO-Level waren auch 6 Tage nach Transduktion noch unter der Nachweisgrenze, woraus geschlossen werden kann, dass es sich nicht um einen transienten, sondern um einen dauerhaften Effekt handelt (Abb. 3.10 A).

Um herauszufinden, ob der beobachtete Effekt Zelllinien- bzw. Spezies-abhängig ist, wurde M45 durch retrovirale Transduktion in zwei murinen Fibroblastenzelllinien (NIH3T3 und 10.1) sowie in einer humanen Nierenzelllinie (HEK293) exprimiert. In allen drei Zelllinien führte die Expression von M45 zu einer Reduktion der NEMO-Level, wobei der Effekt in den murinen Fibroblasten stärker war, als in der humanen Zelllinie (Abb. 3.10 B). Ob dieser Unterschied auf die Speziesherkunft oder auf eine schlechtere Transduktionseffizienz der HEK293-Zellen zurückzuführen war, wurde nicht weiter untersucht.

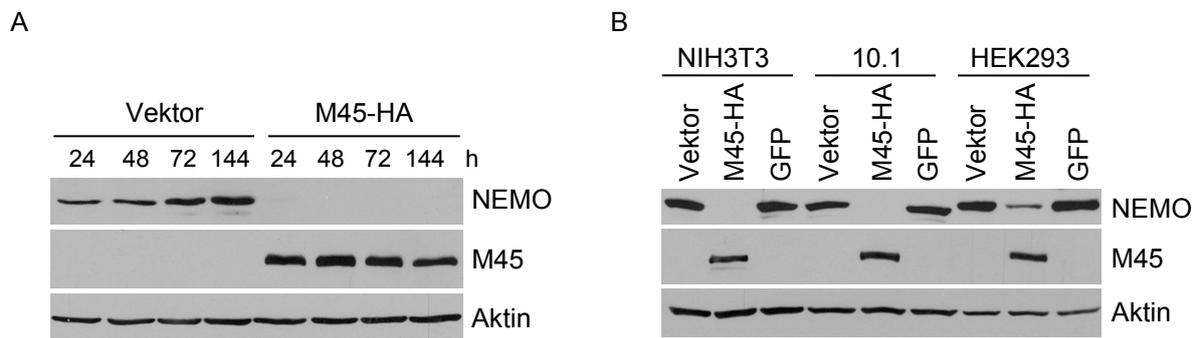


Abbildung 3.10: M45 alleine induziert eine Reduktion der NEMO-Proteinlevel. (A) NIH3T3-Fibroblasten wurden mit M45-HA-exprimierenden retroviralen Vektoren bzw. mit Leervektor transduziert. Nach der Transduktion wurden die Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten mit RIPA-Puffer lysiert und im Western Blot analysiert. Die Expression von endogenem NEMO wurde mit einem spezifischen Antikörper analysiert. M45 wurde mit einem anti-HA-Antikörper nachgewiesen. Aktin diente als Ladekontrolle. (B) Murine NIH3T3- bzw. 10.1-Fibroblasten und humane HEK293-Zellen wurden mit M45-HA- oder GFP-exprimierenden retroviralen Vektoren bzw. mit Leervektor transduziert und 72 h später mit RIPA-Puffer lysiert. Die Western Blot Analyse erfolgte wie unter (A) beschrieben.

3.2.3 Mechanismus der NEMO-Degradation

Reduzierte Proteinlevel können durch Regulationsmechanismen auf DNA-, RNA- oder Proteinebene verursacht werden. Aufgrund der nachgewiesenen Interaktion von M45 und NEMO (Abb. 3.6, Abb. 3.7, Abb. 3.8) wurde die Hypothese aufgestellt, dass die reduzierten NEMO-Level auf die Degradation des Proteins und nicht auf eine transkriptionelle Regulation zurückzuführen sind. Gestützt wurde diese Vermutung von der publizierten Beobachtung,

dass NEMO in humanen 293T-Zellen noch 9 Stunden nach Behandlung mit dem Translationsinhibitor Cycloheximid nachweisbar ist [202]. Falls die NEMO-Proteinhalbwertszeit im murinen System ähnlich lang ist, kann die Abnahme der NEMO-Level 3,5 Stunden nach MCMV-Infektion (Abb. 3.9) nicht durch eine transkriptionelle Regulation erklärt werden.

Proteine können hauptsächlich über zwei Wege innerhalb der Zellen degradiert werden. Dies ist zum einen der Abbau über das Proteasom und zum anderen der Abbau über Lysosomen. In beiden Fällen kann eine vorherige kovalente Verknüpfung der Proteine mit Ubiquitin erforderlich sein, welche als Markierung für den Degradationsprozess dient. Der proteasomale Abbau ist in den meisten Fällen ubiquitinabhängig, wohingegen für den lysosomalen Abbau eine Ubiquitinierung seltener erforderlich ist [203-206].

In der Literatur wurde für NEMO sowohl die ubiquitinabhängige proteasomale Degradation als auch die ubiquitinunabhängige lysosomale Degradation beschrieben [202,207]. Um im Falle der MCMV-Infektion die Abhängigkeit von dem Ubiquitinsystem zu untersuchen, wurde der NEMO-Abbau in ts20-Zellen untersucht (Abb. 3.11). Die ts20-Zelllinie ist eine temperatursensitive (ts) murine Zelllinie, die ein hitzelabiles E1-Enzym besitzt [208]. Das Enzym E1 leitet den ersten Schritt des dreistufigen Ubiquitinierungsprozesses ein und ist somit essentiell für diesen Vorgang [209]. In ts20-Zellen ist E1 bei permissiver Temperatur ($\leq 35\text{ }^{\circ}\text{C}$) aktiv, bei restriktiver Temperatur ($\geq 39\text{ }^{\circ}\text{C}$) hingegen inaktiv [208]. Dies hat zur Folge, dass bei restriktiver Temperatur keine Ubiquitinierung stattfinden kann.

Die Zellen wurden nach einer 14-stündigen Vorinkubation bei $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ bzw. $40,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit RM45 infiziert, weiterhin bei den entsprechenden Temperaturen inkubiert und nach 10 Stunden lysiert. Die Analyse der NEMO-Expression im Western Blot zeigte, dass NEMO auch bei $40,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ degradiert wurde (Abb. 3.11 A). Zur Überprüfung der Inaktivierung des Ubiquitinsystems wurde p53 angefärbt, welches ein äußerst kurzlebiges Protein ist, das ubiquitinabhängig abgebaut wird. Die starke Anreicherung von p53 in uninfizierten Zellen bei $40,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ bestätigte die Inaktivierung des Ubiquitinsystems (Abb. 3.11 A). Ebenfalls wurde p53 durch die MCMV-Infektion selbst angereichert (Abb. 3.11 A). Dieser Effekt wurde bereits in einer früheren Arbeit beschrieben; der zugrunde liegende Mechanismus ist allerdings unbekannt [210]. Die Inaktivierung des Ubiquitinsystems ließ sich darüber hinaus bestätigen, indem gezeigt werden konnte, dass in uninfizierten Zellen bei $40,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ die ubiquitinabhängige Degradation von I κ B α nach TNF α -Stimulation blockiert war (Abb. 3.11 B). Da mit diesem Versuch gezeigt wurde, dass das Ubiquitinsystem für den Degradationsprozess von NEMO keine Rolle spielt, war anzunehmen, dass der Abbau nicht über das Proteasom erfolgt. Als nächstes wurde daher untersucht, ob NEMO lysosomal abgebaut wird.

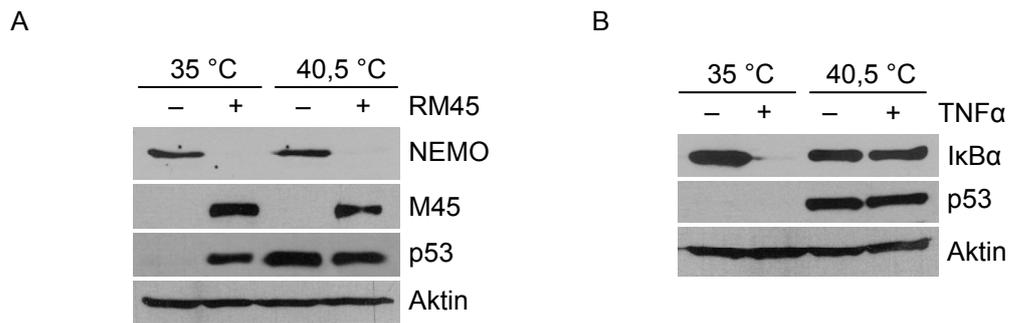


Abbildung 3.11: Die M45-induzierte Degradation von NEMO erfolgt unabhängig vom Ubiquitinsystem. (A) Die ts20-Zelllinie, welche ein temperatursensitives E1-Ubiquitin-aktivierendes Enzym besitzt, wurden für ca. 14 h bei permissiver (35 °C, aktives E1) oder restriktiver (40,5 °C, inaktives E1) Temperatur inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit RM45 infiziert bzw. uninfiziert gelassen und weiterhin bei der angegebenen Temperatur inkubiert. 10 hpi wurden die Zellen mit kochendem Laemmli-Probenpuffer lysiert und im Western Blot analysiert. Die Detektion von p53 diente zur Überprüfung der Inhibition des Ubiquitinsystems. (B) Uninfizierte Zellen aus Versuch (A) wurden mit TNFα behandelt (20 ng/ml, 15 min) und mit kochendem Laemmli-Probenpuffer lysiert. Die Analyse erfolgte im Western Blot mit den angegebenen Antikörpern.

Lysosomen sind kleine Membranvesikel mit saurem pH, welche Verdauungsenzyme für den Abbau von Proteinen, Polysacchariden, Nukleinsäuren und Lipiden enthalten. Lysosomale Proteasen stammen aus verschiedenen Proteasefamilien, wie den Serin-, Cystein-, Metallo- oder Aspartatproteasen. Sie erreichen nur im sauren Milieu der Lysosomen eine hohe Aktivität [211,212].

Um herauszufinden, ob NEMO durch lysosomale Prozesse abgebaut wird, wurde in infizierten Zellen die lysosomale Degradation durch Behandlung mit der Base Ammoniumchlorid (NH₄Cl) inhibiert, welche die Ansäuerung der Lysosomen unterbindet. Alternativ hierzu wurde die Degradation durch Behandlung mit Proteaseinhibitoren blockiert. Es wurde ein Gemisch aus verschiedenen Inhibitoren (PI-Mix) verwendet, welches alle vier Proteasefamilien abdeckt. Die Behandlung wurde jeweils erst zwei Stunden nach Infektion begonnen, um einen potentiell blockierenden Effekt auf den frühen Infektions- bzw. Replikationszyklus zu vermeiden. Wie der Western Blot in Abbildung 3.12 A zeigt, wurde die Degradation von NEMO durch beide Behandlungen blockiert. Ebenso wurden der Abbau von IKKα und IKKβ gehemmt. Die Substanzen schienen keinen Einfluss auf die virale Replikation zu haben, da die Expression von IE1 und M45 in unbehandelten und behandelten Zellen vergleichbar war. Somit zeigte dieser Versuch, dass NEMO sowie die IKK-Untereinheiten α und β durch Lysosomen abgebaut werden und bestätigte daher die Hypothese, dass die reduzierten Proteinlevel auf einen aktiven Degradationsprozess zurückzuführen sind.

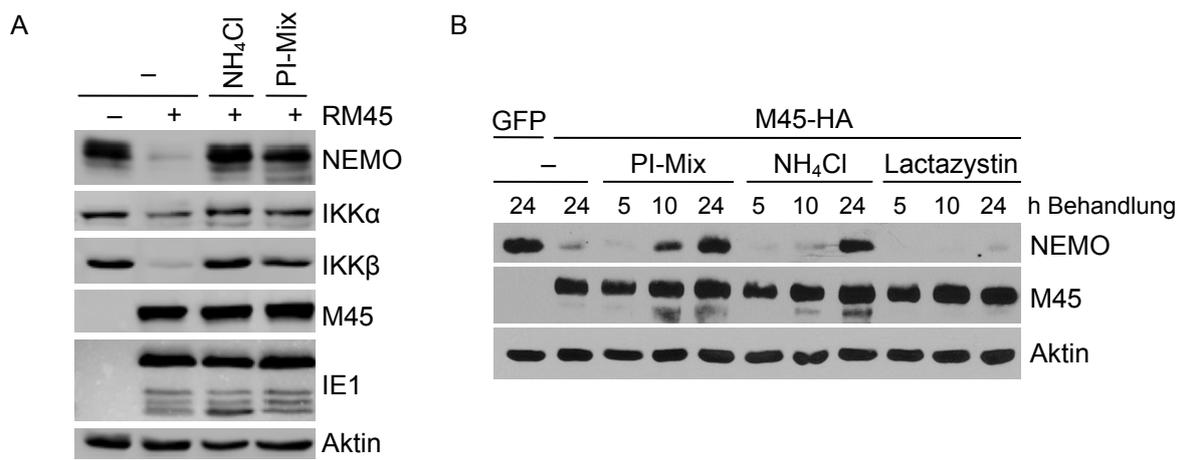


Abbildung 3.12: Die Degradation von NEMO erfolgt durch Lysosomen. (A) NIH3T3-Zellen wurden mit RM45 infiziert und nach 2 h mit Ammoniumchlorid (NH₄Cl; 10 mM) bzw. einem Gemisch aus Proteaseinhibitoren (PI-Mix; 3,64 μM Pepstatin, 100 μM Leupeptin, 72 μM Bestatin, 20 μM E-64) behandelt. 9 hpi wurden die Zellen mit kochendem Laemmli-Probenpuffer lysiert und im Western Blot mit NEMO-, IKKα-, bzw. IKKβ-spezifischen Antikörpern analysiert. Der Nachweis von IE1, M45 und Aktin diente als Infektions- bzw. Ladekontrolle. (B) NIH3T3-Zellen, welche durch retrovirale Transduktion M45-HA oder GFP stabil exprimierten, wurden mit einem Mix aus Proteaseinhibitoren (PI-Mix; Zusammensetzung siehe (A)), Ammoniumchlorid (NH₄Cl; 10 mM) oder Lactazystin (5 μM) behandelt. Die Zellen wurden nach der angegebenen Behandlungszeit mit kochendem Laemmli-Probenpuffer lysiert und im Western Blot mit einem anti-NEMO-Antikörper analysiert. M45 wurde mit einem anti-HA-Antikörper nachgewiesen. Die Detektion von Aktin diente als Ladekontrolle.

Um eine unwahrscheinliche, aber potentiell mögliche zusätzliche transkriptionelle Regulation von NEMO durch M45 auszuschließen, wurde untersucht, ob bereits abgebautes NEMO durch die Inhibition der Lysosomen wieder angereichert werden kann. Hierfür wurden Fibroblasten mit M45-exprimierenden Retroviren transduziert und einige Tage später für 5, 10 oder 24 Stunden mit Proteaseinhibitoren (PI-Mix) bzw. Ammoniumchlorid (NH₄Cl) behandelt (Abb. 3.12 B). Die 5-stündige Behandlung verursachte keine Anreicherung von NEMO. Jedoch wurde nach einer 10-stündigen Behandlung eine deutliche (PI-Mix) bzw. minimale (NH₄Cl) Anreicherung detektiert. 24 Stunden nach Behandlung waren die NEMO-Signale in beiden Fällen so stark, dass sie denen in GFP-exprimierenden Kontrollzellen entsprachen. Die Behandlung mit dem Proteasominhibitor Lactazystin hatte hingegen zu keinem Zeitpunkt einen deutlichen Effekt.

Falls auf transkriptioneller Ebene eine bedeutende Herunterregulation der NEMO-Expression stattgefunden hätte, wäre keine Neusynthese und folglich auch keine Anreicherung von NEMO auf Proteinebene zu erwarten gewesen. Somit zeigen die Daten indirekt, dass auf transkriptioneller Ebene keine bedeutende Regulation von NEMO stattfindet.

3.2.4 Einfluss von M45 auf die intrazelluläre Lokalisation von NEMO

NEMO ist ein zytoplasmatisch und nukleär lokalisiertes Protein. Seine Funktion als Bestandteil des IKK-Komplexes bei der klassischen NF-κB-Aktivierung führt NEMO im

Zytoplasma aus. Im Kern ist das Protein an der Induktion der NF- κ B-Aktivierung nach DNA-Schädigungen beteiligt [134,213].

Der Einfluss von M45 auf die intrazelluläre Verteilung von NEMO wurde im Folgenden mithilfe von Immunfluoreszenzfärbungen und anschließender konfokaler Laserscanning Mikroskopie analysiert. Der in dieser Arbeit verwendete spezifische NEMO-Antikörper war für die Detektion von endogenem NEMO in der Immunfluoreszenz nicht geeignet. Daher wurde zunächst eine NIH3T3-Zelllinie generiert, die Flag-markiertes NEMO stabil exprimiert (3T3-Flag-NEMO). Die Immunfluoreszenzfärbung mit einem anti-Flag-Antikörper zeigte, dass NEMO in der stabilen Zelllinie diffus im Zytoplasma und im Nukleus lokalisiert war. In wenigen Zellen waren zusätzlich vereinzelt kleine punktförmige Ansammlungen nachweisbar. In den Kontrollzellen (3T3-Vektor) wurde hingegen kein Signal detektiert (Abb. 3.13).

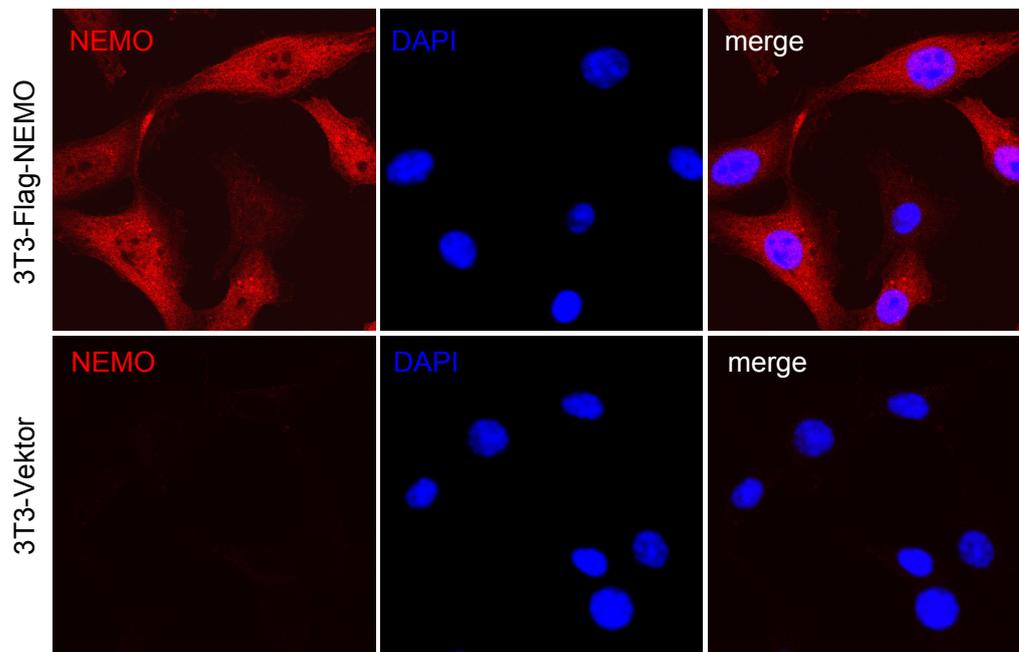


Abbildung 3.13: Stabil exprimiertes NEMO ist größtenteils diffus im Zytoplasma und im Zellkern lokalisiert. NIH3T3-Zellen wurden mit Leervektor bzw. Flag-NEMO-exprimierenden retroviralen Vektoren, welche ein Puromycin-Resistenzgen trugen, transduziert. 72 h später wurde eine 7-tägige Puromycinselektion durchgeführt. Die Expression von NEMO wurde anschließend durch Immunfluoreszenzfärbung mit einem anti-Flag-Antikörper und einem AlexaFluor488-gekoppelten Sekundärantikörper überprüft. Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Die Aufnahmen erfolgten an einem konfokalen Laserscanning Mikroskop (die grünen Fluoreszenzsignale wurden hier in rot dargestellt). Durch Überlagerung der NEMO- und DAPI-Bilder entstanden die Merge-Abbildungen.

Wurden die 3T3-Flag-NEMO Zellen für 7 Stunden mit GFP-exprimierendem MCMV (MCMV-GFP) infiziert, so wurde eine Veränderung der NEMO-Lokalisation festgestellt (Abb. 3.14). Die Detektion von GFP im grünen Kanal diente hierbei zur Verifizierung der Infektion. Neben

der diffusen zytoplasmatischen Verteilung war NEMO in MCMV-GFP-infizierten Zellen zusätzlich in kleinen punktförmigen Strukturen im Zytoplasma angeordnet (Abb. 3.14, zweite Reihe). Mengenmäßig waren in MCMV-GFP-infizierten Zellen deutlich mehr dieser Strukturen vorhanden als in uninfizierten Zellen, in welchen nur wenige Ansammlungen zu sehen waren. NEMO war auch in vesikelförmigen Strukturen angeordnet, welche sich durch ein ringförmiges Fluoreszenzsignal definierten (Abb. 3.14, dritte Reihe). Diese Strukturen waren allerdings äußerst selten detektierbar. In $\Delta M45$ -infizierten Zellen war NEMO, wie in den uninfizierten Zellen, größtenteils diffus verteilt, wodurch gezeigt wurde, dass die Virus-induzierte intrazelluläre Umverteilung von NEMO ein M45-abhängiger Prozess ist.

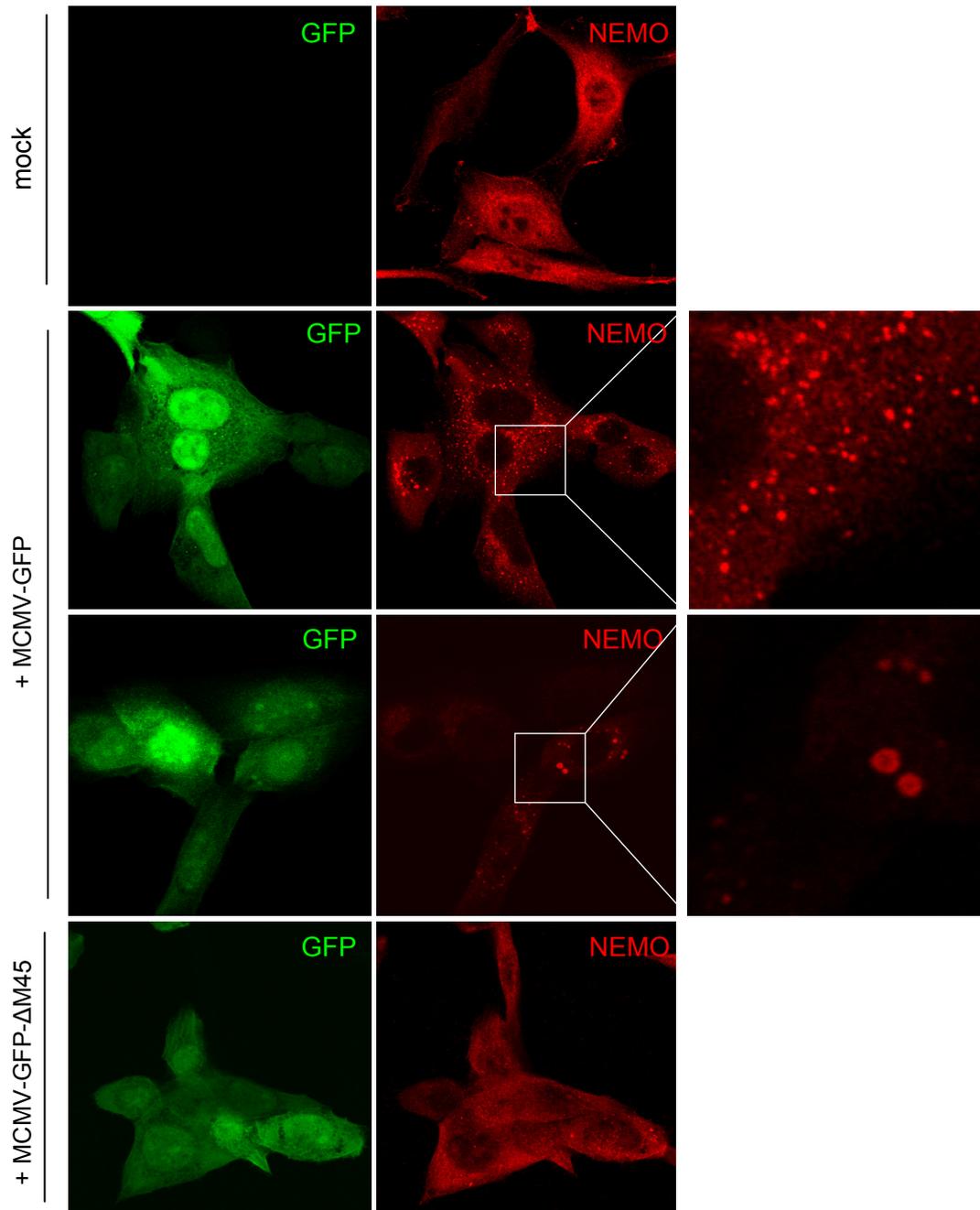


Abbildung 3.14: MCMV induziert M45-abhängig eine Änderung der intrazellulären NEMO-Lokalisation. NIH3T3-Zellen, welche stabil Flag-NEMO exprimieren, wurden mit GFP-exprimierendem MCMV-wt (MCMV-GFP) bzw. MCMV-ΔM45 (MCMV-GFP-ΔM45) infiziert oder mock infiziert und 7 hpi fixiert. NEMO wurde mit einem anti-Flag-Antikörper und einem AlexaFluor594-gekoppelten Sekundäntikörper angefärbt und die Zellen wurden mittels konfokaler Laserscanning Mikroskopie analysiert. Die GFP-Expression wurde im grünen Kanal detektiert und diente als Infektionskontrolle. Die weißen Boxen in den NEMO-Abbildungen sind rechts in höherer Vergrößerung dargestellt.

M45 induzierte auch außerhalb des viralen Kontextes eine Veränderung der NEMO-Lokalisation. Wurde Flag-markiertes NEMO alleine in NIH3T3-Zellen überexprimiert, so wurde eine diffuse Verteilung beobachtet (Abb. 3.15, obere Reihe). In Zellen, in denen gleichzeitig HA-markiertes M45 exprimiert wurde, war NEMO zum Teil in kleinen

punktförmigen Strukturen angeordnet, die denen in infizierten Zellen aus Abbildung 3.14 ähnelten (Abb. 3.15, untere Reihe). Sehr häufig zeigte NEMO auch vesikelförmige Anordnungen (siehe Pfeil und entsprechende Vergrößerung), welche in ihrer Größe stark variierten. Das diffuse NEMO-Signal war häufig deutlich reduziert. Im Vergleich zu stabil Flag-NEMO-exprimierenden Zellen, welche nach Infektion fast ausschließlich kleine NEMO-Punkte zeigten (Abb. 3.14), waren in NEMO/M45-transfizierten Zellen die vesikelförmigen Strukturen vorherrschend. Die Anfärbung von M45 zeigte neben einem diffusen Signal ebenfalls Ansammlungen in punkt- und vesikelförmigen Strukturen. Die Überlagerung der NEMO- und M45-Fluoreszenzbilder (merge) resultierte in einer Gelbfärbung, welche die Kolo-kalisation beider Proteine belegte.

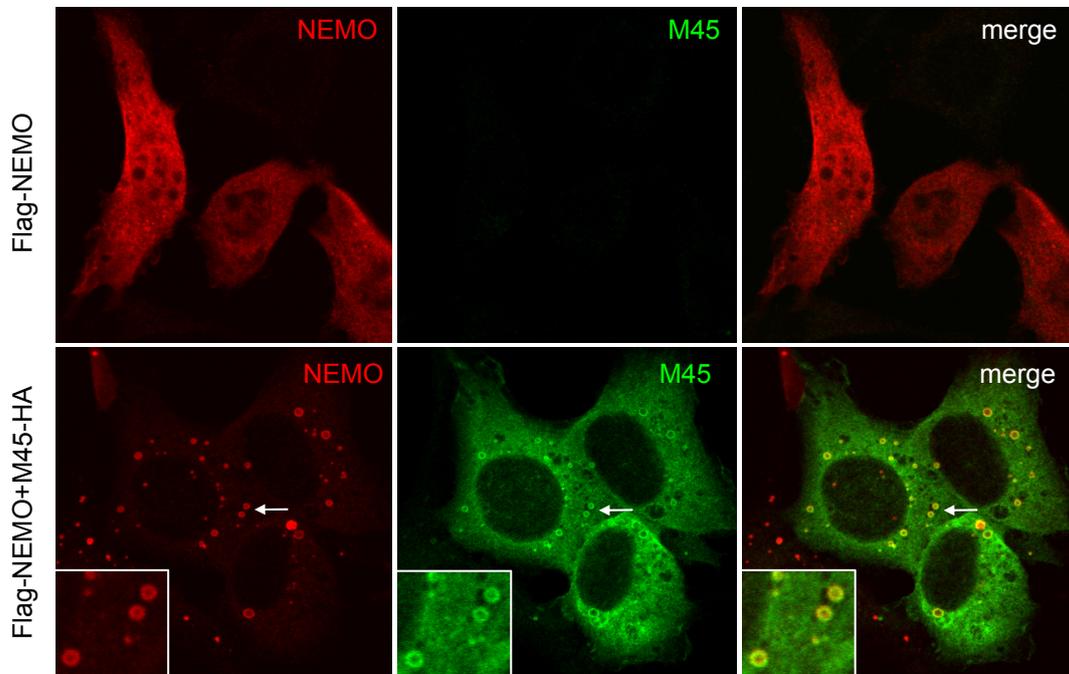


Abbildung 3.15: M45 induziert eine Umverteilung von NEMO in punkt- und vesikelförmige Strukturen und kolokalisiert mit diesen. NIH3T3-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für Flag-NEMO bzw. Flag-NEMO und M45-HA transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen fixiert und einer Immunfluoreszenz-Doppelfärbung mit anti-Flag- und anti-HA-Antikörpern unterzogen. Als Sekundärantikörper dienten AlexaFluor594- und AlexaFluor488-gekoppelte Antikörper. Die Bilder wurden an einem konfokalen Laserscanning Mikroskop aufgenommen. Die weißen Pfeile markieren Bereiche, die links unten im Bild in höherer Vergrößerung dargestellt sind. Durch Überlagerung der roten und grünen Fluoreszenzbilder resultieren die merge-Abbildungen.

3.2.5 Charakterisierung der M45-induzierten punkt- und vesikelförmigen NEMO-Strukturen

Der Abbau von zytoplasmatischen Proteinen durch Lysosomen wird als Autophagie bezeichnet. Autophagie beschreibt im Allgemeinen einen Prozess, durch welchen zelleigene Bestandteile, wie Zellorganelle, Proteinkomplexe oder einzelne Proteine, über Lysosomen

degradiert werden [206]. Es gibt drei Arten der Autophagie, die sich bezüglich des Aufnahmemechanismus des abzubauenen Materials in die Lysosomen unterscheiden. Bei der Chaperon-medierten Autophagie werden Proteine direkt über die Lysosomenmembran in die Lysosomen geschleust. Im Zuge der Mikroautophagie wird das abzubauenende Material durch Invagination der Lysosomenmembran aufgenommen. Bei der Makroautophagie werden Proteine zunächst in Vesikel eingeschlossen, sogenannte Autophagosomen, welche einen Reifungsprozess durchlaufen und schließlich mit Lysosomen fusionieren, um ihren Inhalt zur Degradation freizugeben [214]. Im Folgenden ist in dieser Arbeit mit dem Begriff Autophagie die Makroautophagie gemeint.

Zunächst wurde überprüft, ob die M45-induzierten NEMO-Strukturen mit Lysosomen kolokalisieren. Hierfür wurden Fibroblasten, in denen Flag-NEMO und M45-HA überexprimiert wurde, mit dem Farbstoff LysoTracker inkubiert, welcher die Eigenschaft besitzt, in saure Kompartimente einzulagern. Die Immunfluoreszenzfärbung zeigte keine Kolokalisation der NEMO-Punkte oder NEMO-Vesikel mit dem LysoTracker-Farbstoff (Abb. 3.16). Es war folglich anzunehmen, dass die NEMO-Strukturen keine sauren Kompartimente und somit keine Lysosomen darstellen.

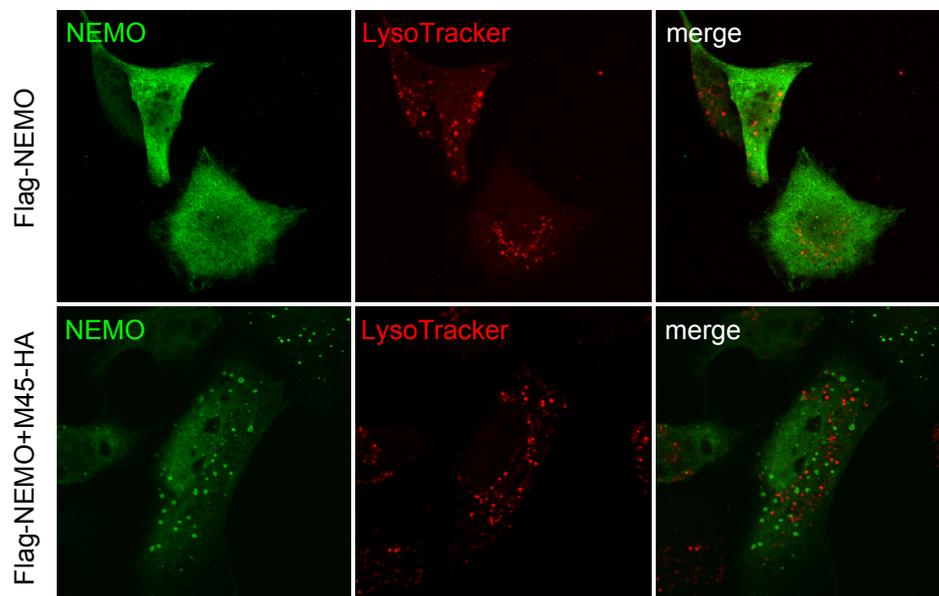


Abbildung 3.16: Die M45-induzierten NEMO-Punkte und -Vesikel kolokalisieren nicht mit sauren Kompartimenten. NIH3T3-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für Flag-NEMO bzw. Flag-NEMO und M45-HA transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen für 30 min mit dem acidotropischen Fluorophor-gekoppelten Farbstoff LysoTracker-Red DND-99 inkubiert (75 nM) und anschließend fixiert. Für den Nachweis von NEMO wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit einem anti-Flag-Antikörper und einem AlexaFluor488-gekoppelten Sekundäntikörper durchgeführt. Die Auswertung erfolgte an einem konfokalen Laserscanning Mikroskop. Der LysoTracker-Farbstoff wurde im roten Fluoreszenzkanal detektiert. Durch Überlagerung der roten und grünen Fluoreszenzbilder resultieren die merge-Abbildungen.

Aufgrund der fehlenden Kollokalisierung mit dem LysoTracker-Farbstoff wurde vermutet, dass die NEMO-Strukturen Autophagosomen repräsentieren, in welche NEMO vor dem lysosomalen Abbau rekrutiert wird. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde untersucht, ob eine Kollokalisierung mit dem Autophagosomenmarker LC3 nachzuweisen ist. LC3 ist ein diffus zytoplasmatisch verteiltes Protein, welches während der Autophagieinduktion seine Lokalisation ändert, indem es lipidiert und in die Autophagosomenmembran eingelagert wird [215]. Es wurde eine EGFP-fusionierte Version von LC3 verwendet, die ohne Antikörperfärbung direkt im grünen Fluoreszenzkanal detektiert werden konnte. Die Überexpression von EGFP-LC3 mit Flag-markiertem NEMO resultierte in einem diffusen Signal beider Proteine (Abb. 3.17, erste Spalte). Wurde EGFP-LC3 mit M45-HA überexprimiert, so war EGFP-LC3 nicht nur diffus, sondern auch in punktförmigen Strukturen angeordnet (Abb. 3.17, zweite Spalte). Bei der gemeinsamen Überexpression aller drei Proteine war eine deutliche Kollokalisierung zwischen den NEMO-Punkten/Vesikeln und den EGFP-LC3-Punkten zu beobachten (Abb. 3.17, dritte Spalte). Sowohl die kleinen als auch die großen NEMO-Strukturen überlagerten mit EGFP-LC3-Strukturen. Es wurde jedoch keine Kollokalisierung der NEMO-Strukturen mit EGFP-fusionierten Markern für frühe Endosomen (Rab5), späte Endosomen (Rab7) oder multivesikuläre Körper (FYVE) detektiert (Abb. 3.17, Spalte 4 - 6).

Die Ergebnisse dieses Versuches deuteten darauf hin, dass in M45-exprimierenden Zellen Autophagosomen gebildet werden und, dass NEMO zu diesen Autophagosomen transportiert wird.

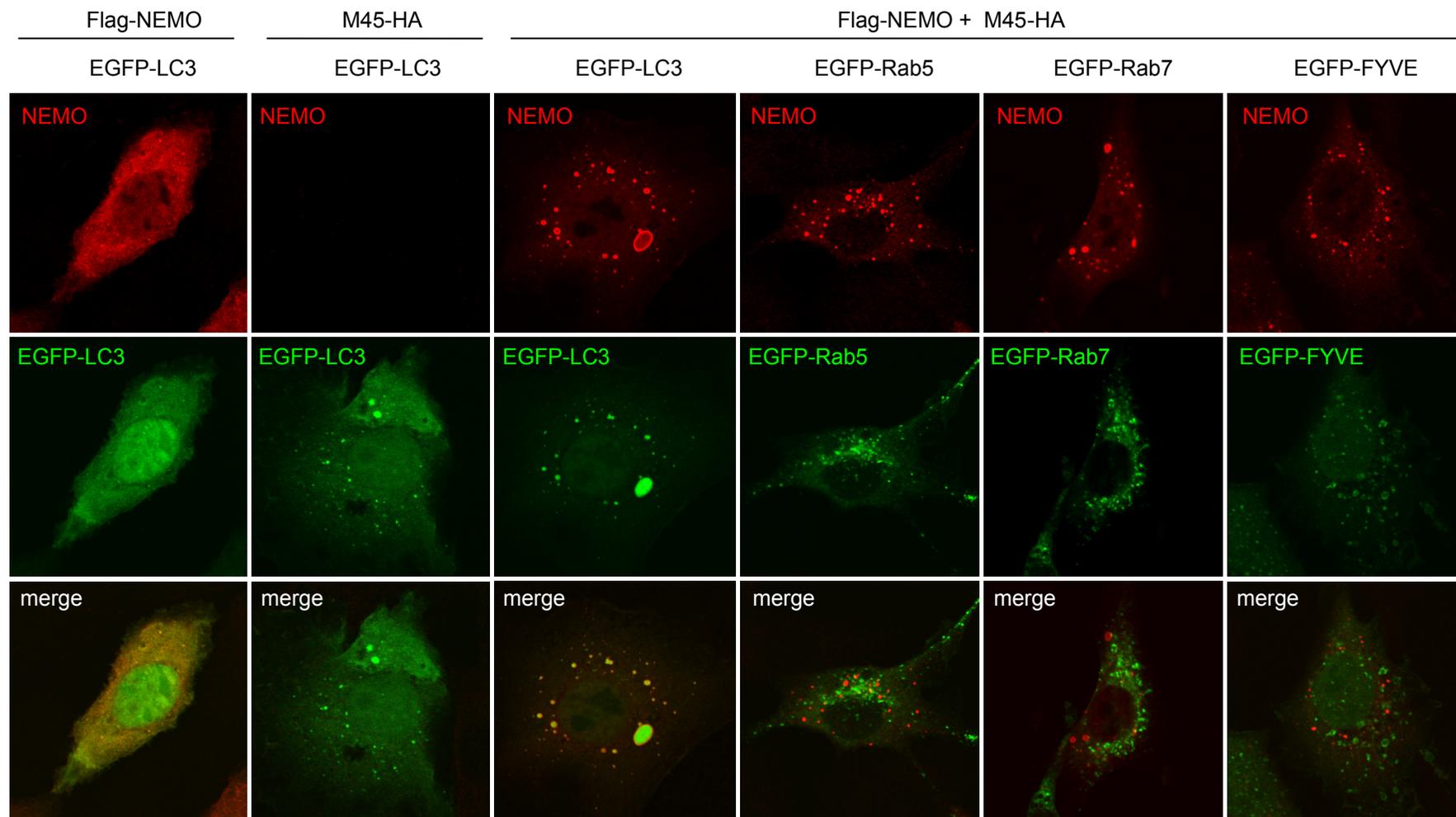


Abbildung 3.17: Die M45-induzierten punkt- und vesikelförmigen NEMO-Strukturen kolokalisieren mit dem Autophagosomenmarker LC3. NIH3T3-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für Flag-NEMO, M45-HA und EGFP-fusioniertem LC3 bzw. Rab5, Rab7 oder FYVE wie angegeben transfiziert. 24 h später wurden die Zellen fixiert und einer Immunfluoreszenzfärbung mit einem anti-Flag-Primärantikörper und einem AlexaFluor594-gekoppelten Sekundärantikörper unterzogen. Die EGFP-Fusionsproteine wurden durch die Detektion von EGFP im grünen Fluoreszenzkanal visualisiert. Durch Überlagerung der roten und grünen Fluoreszenzaufnahmen entstanden die merge-Abbildungen. Die Bilder wurden an einem konfokalen Laserscanning Mikroskop aufgenommen.

EGFP-LC3 ist ein häufig verwendeter Marker für die Visualisierung von Autophagosomen. Der Marker kann jedoch auch in Proteinaggregate einlagern, welche keine Autophagosomen repräsentieren [216]. Dies geschieht vor allem nach transienter Überexpression.

Um eine moderatere Expression von EGFP-LC3 zu erzielen, wurde eine NIH3T3-Zelllinie generiert, welche EGFP-LC3 stabil exprimiert. Mithilfe dieser Zelllinie wurde der Effekt von M45 auf die Autophagosomenbildung näher untersucht.

Die stabile Zelllinie wurde mit retroviralen Vektoren transduziert, welche M45 oder die nicht-funktionelle M45-Verkürzungsmutante Ct3 exprimierten, bzw. untransduziert gelassen (mock). Die Analyse mittels konfokaler Mikroskopie zeigte, dass M45 auch in der stabilen Zelllinie die Bildung von EGFP-LC3-Punkten induziert (Abb. 3.18 A). Zusätzlich zu den Punkten wurden in M45-exprimierenden Zellen auch große EGFP-LC3-Strukturen beobachtet (siehe weiße Pfeile), welche möglicherweise Proteinaggregate darstellten. Die Quantifizierung ergab, dass M45-exprimierende Zellen durchschnittlich 13 Punkte/Strukturen pro Zelle besaßen, die untransduzierten bzw. Ct3-exprimierenden Zellen jedoch nur 5 (Abb. 3.18 B).

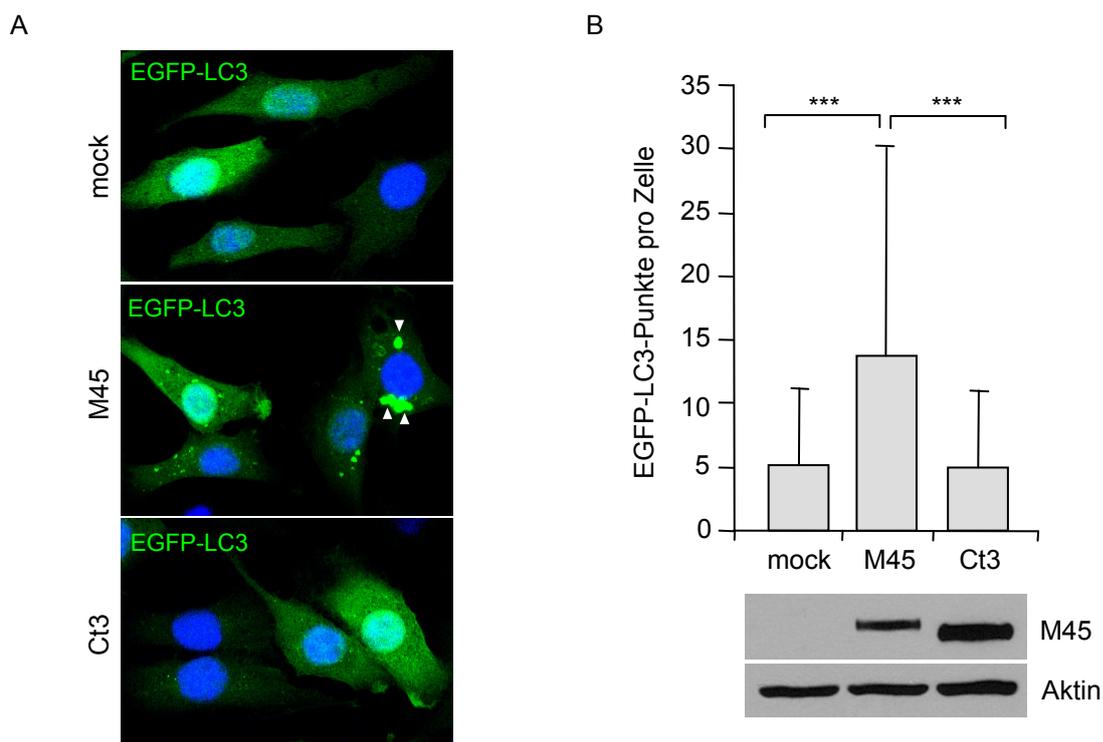


Abbildung 3.18: M45 induziert die Bildung von EGFP-LC3-Punkten und großen EGFP-LC3-Strukturen. NIH3T3-Zellen, welche stabil EGFP-LC3 exprimieren, wurden mock-transduziert oder mit M45- bzw. Ct3-exprimierenden Retroviren transduziert. Die Zellen wurden drei Tage später mittels konfokaler Mikroskopie und Western Blot analysiert. (A) Repräsentative Fluoreszenzaufnahmen, welche die Verteilung von EGFP-LC3 zeigt. Die weißen Pfeile markieren große EGFP-LC3-Strukturen. (B) Die Anzahl der EGFP-LC3-Punkte pro Zelle wurde in jeweils 50 Zellen ausgezählt. Für die Quantifizierung wurden sowohl kleine Punkte als auch große Strukturen berücksichtigt. Die Graphik zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen. Die Signifikanzen (***, $p < 0,001$) wurden mit ANOVA bestimmt. Im Western Blot wurde die Expression von M45 und Ct3 überprüft.

3.2.6 Inhibition der NEMO-Degradation in Autophagie-defizienten Zellen

Autophagie ist ein mehrstufiger Prozess, der mit der Bildung einer Isolationsmembran, auch „Phagophor“ genannt, beginnt. An die Isolationsmembran lagert das abzubauen Material an, die Membran wird elongiert und schließlich zu einem Autophagosom verschlossen [206]. Verschiedene sogenannte Atg (autophagy-related)-Proteine sind an dem Autophagieprozess beteiligt [206]. Atg5 spielt für die frühen Schritte der Autophagosomenbildung eine wichtige Rolle. Das Protein konjugiert mit Atg12 und lokalisiert an die Isolationsmembran [217]. Es wurde gezeigt, dass das Atg5-Atg12-Konjugat für die Rekrutierung von LC3 zu der Isolationsmembran benötigt wird, und dass die Bildung von Autophagosomen in Atg5-defizienten Zellen defekt ist [217].

Um zu belegen, dass NEMO durch (Makro-) Autophagie abgebaut wird, wurden die NEMO-Proteinlevel in infizierten Atg5-defizienten Zellen bzw. Kontrollzellen analysiert (Abb. 3.19). Es zeigte sich, dass NEMO acht Stunden nach Infektion mit der Revertante RM45 in den Kontrollzellen abgebaut wurde, in den Atg5-defizienten Zellen hingegen nicht. Dieses Ergebnis zeigt somit, dass die Bildung von Autophagosomen für den Abbau von NEMO erforderlich ist.

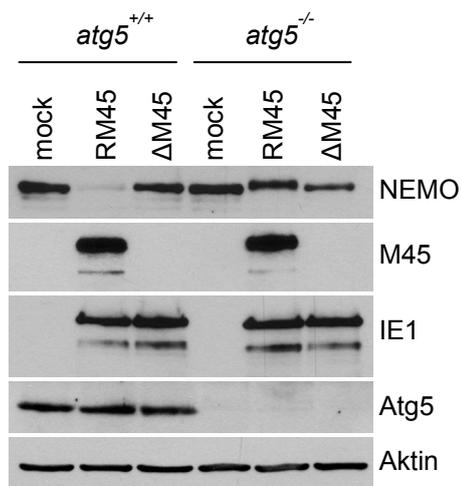


Abbildung 3.19: Die MCMV-induzierte Degradation von NEMO ist in Atg5-defizienten Zellen blockiert. Atg5-defiziente murine embryonale Fibroblasten (*atg5*^{-/-}) und Kontrollzellen (*atg5*^{+/+}) wurden mit der Revertante RM45 oder mit ΔM45 infiziert. Acht Stunden nach Infektion wurden die Zellen mit kochendem Laemmli-Probenpuffer lysiert und im Western Blot mit einem NEMO-spezifischen Antikörper analysiert. Zur Kontrolle wurden IE1, Atg5, M45 und Aktin detektiert.

3.2.7 Funktionelle Charakterisierung von M45-Verkürzungsmutanten

M45 ist ein 1174 Aminosäuren umfassendes Protein, welches eine Sequenzhomologie zu der R1-Untereinheit von Ribonukleotidreduktasen aufweist [190]. Katalytisch wichtige Aminosäuren sind in M45 jedoch nicht konserviert und das Protein besitzt keine katalytische Aktivität [185]. Im N-Terminus von M45 befindet sich zwischen Aminosäure 61 und 69 ein RIP-homotypisches-Interaktionsmotiv (RHIM), welches auch in den zellulären Proteinen RIP1, RIP3, TRIF und DAI zu finden ist [108,186,187]. In M45 ist dieses Motiv essentiell für die Blockierung der programmierten Nekrose und für die Inhibition der DAI-induzierten NF-

κ B-Aktivierung [108,166]. Für die Inhibition der TNF α -induzierten NF- κ B-Aktivierung ist das Motiv hingegen entbehrlich [164].

Zur Klärung, welcher Bereich von M45 für die in dieser Arbeit gefundenen Funktionen wichtig ist, wurden verschiedene Verkürzungsmutanten mit einem trunkierten N- bzw. C-Terminus in den Expressionsvektor pcDNA kloniert (Abb. 3.20 A).

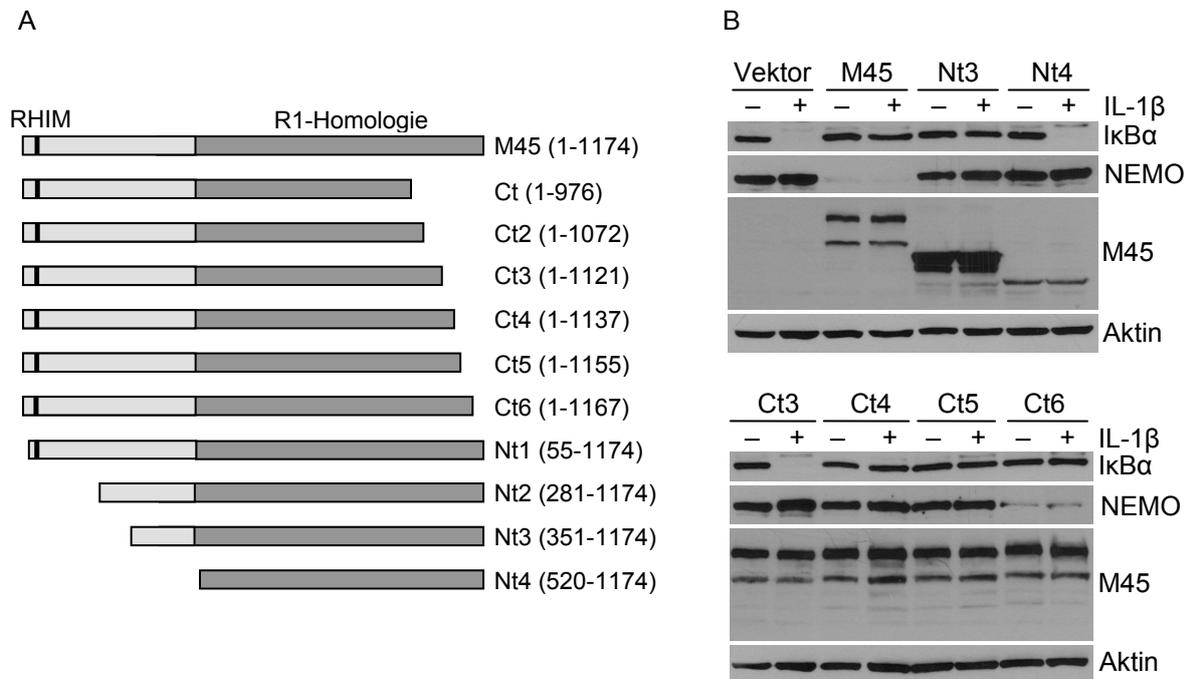


Abbildung 3.20: Funktionelle Charakterisierung von M45-Verkürzungen. (A) Schematische Darstellung des M45-Volllängenproteins und N- bzw. C-terminaler Verkürzungsmutanten. Die Verkürzungen Nt1 - Nt3 und Ct sind publiziert [164] und waren vorhanden. Die Verkürzungen Ct2 - Ct6 und Nt4 wurden in dieser Arbeit kloniert. In Klammern sind die Aminosäuren angegeben. Der schwarze Balken im N-Terminus repräsentiert das RHIM. Der dunkelgraue Bereich repräsentiert die R1-Ribonukleotidreduktase-Homologiedomäne. Alle Verkürzungsmutanten wurden in den Expressionsvektor pcDNA kloniert. Die Mutanten Nt3, Nt4 und Ct3 - Ct6 wurden zusätzlich in den Retrovirusvektor pRetro kloniert. (B) NIH3T3-Zellen wurden mit Retroviren transduziert, welche die entsprechenden M45-Verkürzungen exprimieren. 48 h nach Transduktion wurden die Zellen mit IL-1 β (20 ng/ml, 15 min) behandelt und in kochendem Laemmli-Probenpuffer lysiert. Die Analyse erfolgte im Western Blot mit spezifischen Antikörpern. Die Detektion von Aktin diente als Ladekontrolle.

Einige Verkürzungen wurden anschließend in retrovirale Expressionsvektoren kloniert und für die Anzucht von Retroviren verwendet. Mithilfe der Retroviren wurden die Verkürzungen in NIH3T3-Zellen exprimiert und hinsichtlich ihrer Fähigkeit untersucht, die IL-1R-induzierte I κ B α -Degradation zu blockieren. Wie der Western Blot in Abbildung 3.20 B zeigt, war ein großer Bereich von 350 Aminosäuren im N-Terminus für die Blockierung der I κ B α -Degradation entbehrlich (siehe Verkürzung Nt3). Im C-Terminus führte bereits eine Trunkierung von 53 Aminosäuren zu einem Funktionsverlust (siehe Verkürzung Ct3). Die Detektion von NEMO zeigte, dass die Fähigkeit, die I κ B α -Degradation zu blockieren, nicht mit der Fähigkeit korrelierte, den Abbau von NEMO zu induzieren. Dies wurde anhand der

Verkürzungsmutanten Nt3, Ct4 und Ct5 deutlich, welche die I κ B α -Degradation blockierten, jedoch nicht zur Degradation von NEMO führten. Nur das Volllängenprotein und die Verkürzung Ct6, der nur 7 Aminosäuren fehlen, waren hierzu in der Lage.

Mittels Koimmunpräzipitation wurden die Verkürzungsmutanten hinsichtlich ihrer Fähigkeit untersucht, mit NEMO zu interagieren. Es zeigte sich, dass die Verkürzungen, die in der Lage waren, die I κ B α -Degradation zu blockieren (Nt3, Ct4, Ct5; siehe Abb. 3.20 B), mit NEMO interagierten. Verkürzungen, welche die Degradation nicht inhibieren konnten (Nt4, Ct3, siehe Abb. 3.20 B), interagierten hingegen nicht mit NEMO (Abb. 3.21). Die Verkürzung Ct6 wurde in den Koimmunpräzipitationen nicht getestet, jedoch kann geschlossen werden, dass diese ebenso an NEMO bindet, da eine Interaktion zwischen der stärker trunktierten Mutante Ct5 und NEMO nachgewiesen wurde.

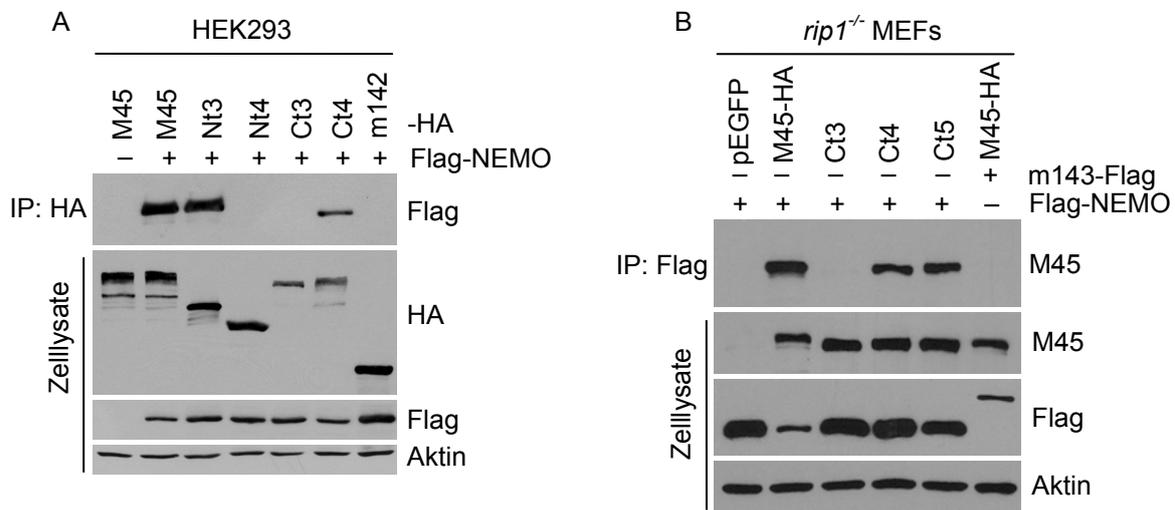
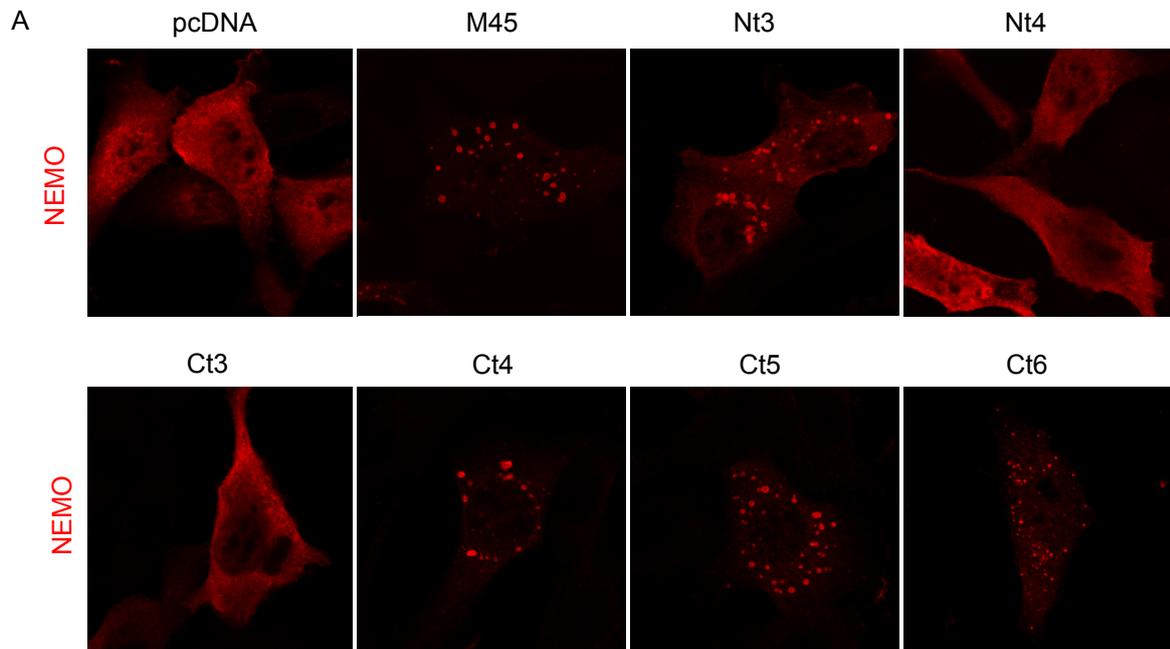


Abbildung 3.21: Der C-Terminus von M45 ist wichtig für die Interaktion mit NEMO. (A) Expressionsvektoren für HA-markierte M45-Verkürzungen bzw. für Flag-markiertes NEMO wurden in HEK293-Zellen transfiziert. 45 h später wurden Zelllysate hergestellt und einer Koimmunpräzipitation mit einem anti-HA-Antikörper unterzogen (IP: HA). Die Proben wurden im Western Blot mit einem anti-Flag-Antikörper analysiert. Die Zelllysate wurden mit anti-HA-, anti-Flag-, bzw. anti-Aktin-Antikörpern angefärbt. Die Detektion von Aktin diente als Ladekontrolle. (B) Expressionsvektoren für M45-Verkürzungen, m143-Flag oder Flag-NEMO wurden wie angegeben in *rip1*^{-/-} MEFs transfiziert. 52 h später wurde eine Koimmunpräzipitation mit einem anti-Flag-Antikörper durchgeführt (IP: Flag). Die Analyse erfolgte im Western Blot mit einem anti-M45-Antikörper. Die Zelllysate wurden mit den angegebenen Antikörpern analysiert.

Schließlich wurde mithilfe einer Immunfluoreszenzfärbung noch untersucht, welche Verkürzungsmutanten in der Lage waren, NEMO in punkt- und vesikelförmige Strukturen umzuverteilen. Hierbei zeigten alle Mutanten, die die I κ B α -Degradation blockieren konnten (Abb. 3.20 B) und mit NEMO interagierten (Abb. 3.21), auch die Fähigkeit, eine Umverteilung von NEMO zu induzieren (Abb. 3.22 A).

Die Charakterisierung der Verkürzungsmutanten zeigte insgesamt (Abb. 3.22 B), dass die Bindung an NEMO und dessen Umverteilung notwendig und ausreichend ist, um die

Degradation von I κ B α zu blockieren. Wichtig für diese Funktionen ist nicht der N-Terminus mit dem darin gelegenen RHIM, sondern ein großer Bereich der C-terminalen R1-Homologiedomäne. Um zusätzlich zur Umverteilung auch die Degradation von NEMO zu induzieren, sind fast der gesamte C-Terminus und Bereiche aus dem N-Terminus erforderlich.



B

	Interaktion mit NEMO	Umverteilung von NEMO	Degradation von NEMO	Blockierung der IL-1 β -induzierten I κ B α -Degradation
M45 (1-1174)	+	+	+	+
Nt3 (351-1174)	+	+	-	+
Nt4 (520-1174)	-	-	-	-
Ct3 (1-1121)	-	-	-	-
Ct4 (1-1137)	+	+	-	+
Ct5 (1-1155)	+	+	-	+
Ct6 (1-1167)	(+)	+	+	+

Abbildung 3.22: Der C-Terminus von M45 ist wichtig für die intrazelluläre Umverteilung von NEMO. (A) NIH3T3-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für die angegebenen M45-Verknüpfungen und Flag-markiertem NEMO transfiziert. 24 h später wurden die Zellen fixiert und einer Immunfluoreszenzfärbung mit einem anti-Flag-Antikörper und einem AlexaFluor594-gekoppelten Sekundärantikörper unterzogen. Die Analyse erfolgte an einem konfokalen Mikroskop. (B) Tabellarische Zusammenfassung der Eigenschaften von M45 und M45-Verknüpfungsmutanten aus Abb. 3.20 - Abb. 3.22. '+' steht für das Vorhandensein der getesteten Aktivität. '(+)' bedeutet, dass die Aktivität zu erwarten ist, jedoch nicht getestet wurde. '-' steht dafür, dass die getestete Aktivität nicht vorhanden war.

4. Diskussion

Infektionen mit dem Zytomegalievirus rufen im Wirt eine komplexe Immunantwort hervor, welche von dem Virus jedoch durch diverse Mechanismen antagonisiert wird. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass MCMV die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B nach TLR- und Zytokinrezeptorstimulation auf der Ebene des IKK-Komplexes inhibiert – einem Proteinkomplex, der nach Rezeptorstimulation die Degradation von NF- κ B-Inhibitoren einleitet. Die Blockierung erfolgt durch das virale Protein M45. Dieses interagiert mit der regulatorischen IKK-Untereinheit NEMO und induziert deren lysosomalen Abbau. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen erstmals, dass MCMV in den NF- κ B-Signalweg eingreift, indem es die Degradation eines essentiellen Signalproteins induziert.

4.1 Inhibition der NF- κ B-Aktivierung durch M45

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B reguliert mehr als 150 Gene, die unterschiedliche biologische Vorgänge steuern. Insbesondere für die Einleitung der angeborenen Immunantwort spielt der Transkriptionsfaktor eine bedeutende Rolle, da er als direkte Folge der Pathogendetektion durch PRRs (z. B. TLRs) und durch Zytokinrezeptoren aktiviert wird und anschließend die Expression zahlreicher Chemokine, Adhäsionsmoleküle und proinflammatorischer Zytokine aktiviert [54,218,219]. Zu den NF- κ B-regulierten Zytokinen, die für die Immunabwehr von CMV-Infektionen von Bedeutung sind und früh während der Infektion gebildet werden, zählen beispielsweise TNF α , IL-12 und IFN β [59-61]. Microarray-Daten haben gezeigt, dass die Transkription von NF- κ B-abhängigen Genen in HCMV-infizierten Zellen verstärkt ist, wenn die virale Genexpression blockiert ist [171], woraus geschlossen werden kann, dass virale Proteine die Zytokinproduktion während der Infektion aktiv antagonisieren. Im Falle von MCMV wurde in einer früheren Arbeit demonstriert, dass das Virus durch sein Protein M45 die TNFR1- und TLR3-induzierte NF- κ B-Aktivierung auf der Ebene des Signalproteins RIP1 blockiert, welches von beiden Rezeptoren nach Ligandenbindung rekrutiert wird [164] (Abb. 4.1). M45 interagiert mit RIP1 und unterbindet dessen K63-Ubiquitinierung. Hierdurch wird auch die TNFR1-induzierte Aktivierung der p38 MAPK inhibiert [164]. Ferner wirkt M45 der NF- κ B-Aktivierung durch den Mustererkennungsrezeptor DAI entgegen, der virale DNA detektiert (Abb. 4.1). M45 interagiert mit DAI, RIP3 und RIP1 und blockiert die Komplexbildung der drei Proteine [108]. Somit konnte bisher gezeigt werden, dass M45 RIP1-abhängige NF- κ B-Aktivierungswege blockiert. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen nun erstmals, dass M45 die NF- κ B-Aktivierung nach Stimulation von Rezeptoren unterbindet, die unabhängig von RIP1 Signale intrazellulär weiterleiten. So wurde eine Inhibition nach Stimulation des RIP1-unabhängigen TLR2 bzw. IL-1R nachgewiesen (Kap. 3.1). Ferner wird der TLR4-Signalweg durch M45 blockiert (Kap. 3.1), dessen frühe

Phase der Signalweiterleitung über den RIP1-unabhängigen MyD88-Signalweg erfolgt [111,112]. Ersichtlich wurde die Inhibition der NF- κ B-Aktivierung durch (i) eine Blockierung der Degradation des NF- κ B-Inhibitors I κ B α , (ii) die Inhibition der Translokation von NF- κ B aus dem Zytoplasma in den Zellkern und (iii) die Blockierung der Expression eines NF- κ B-abhängigen Reportergens. Die Inhibition findet sowohl im Kontext der Virusinfektion als auch nach alleiniger Expression von M45 statt (Kap. 3.1).

M45 interferiert mit der Signalweiterleitung der Rezeptoren auf der Ebene des IKK-Komplexes (Abb. 4.1 und Kap.3.2). Unter der Voraussetzung, dass keine Inhibition auf zusätzlichen Ebenen stattfindet, werden die Rezeptoren von MCMV also nicht Rezeptor-spezifisch gehemmt, sondern an einem zentralen Punkt, der den Rezeptorsignalwegen gemein ist.

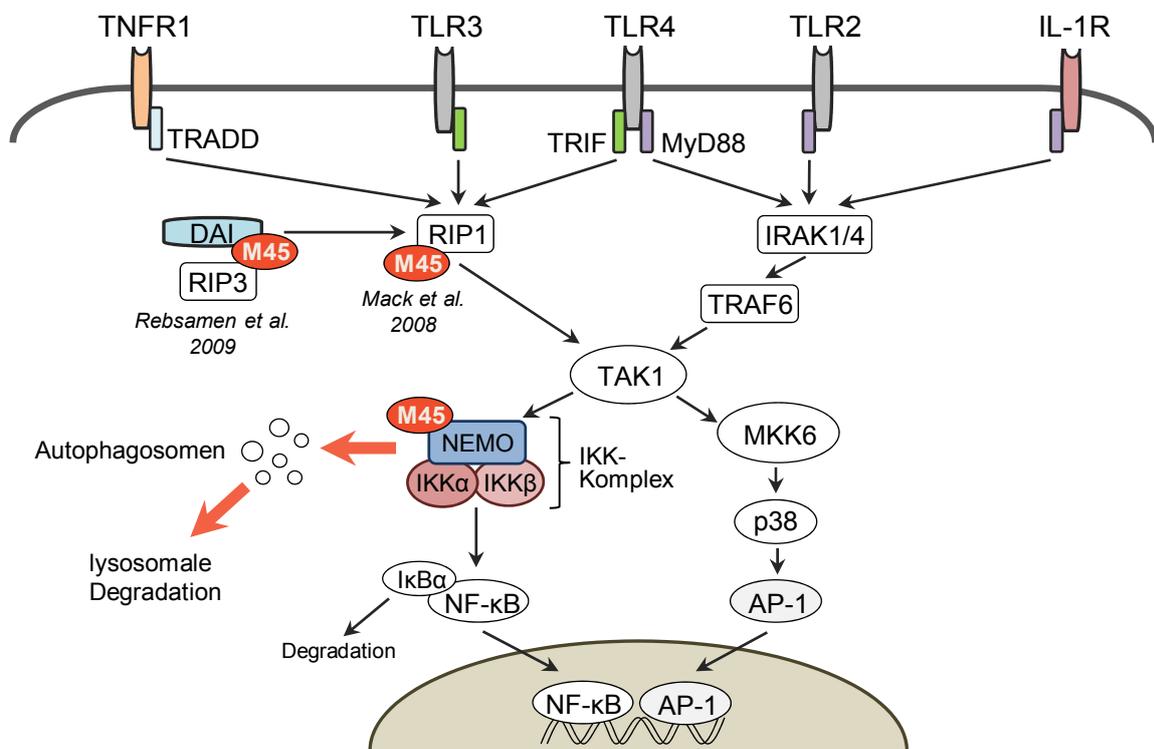


Abbildung 4.1: Inhibition der NF- κ B-Aktivierung durch das MCMV-Protein M45. Vereinfachte schematische Darstellung der Signalwege, die nach TLR-, IL-1R- bzw. TNFR1-Stimulation zur Aktivierung von NF- κ B und AP-1 führen, und der Ebenen, auf denen M45 in die Signalweiterleitung eingreift.

In einer früheren Arbeit wurde gezeigt, dass der Mustererkennungsrezeptor TLR2 an der Detektion von MCMV beteiligt ist [96]. Die in dieser Arbeit demonstrierte Inhibition der TLR2-induzierten NF- κ B-Aktivierung durch M45 beschreibt eine virale Maßnahme, mit derer das Virus der Detektion durch TLR2 und der daraus resultierenden Immunantwort entgegenwirken kann. Auch ein anderes Herpesvirus, das durch TLR2 erkannt wird, nämlich das Herpes-Simplex-Virus (HSV)-1, blockiert die TLR2-induzierte Immunantwort [220]. So

wurde gezeigt, dass die HSV-1-Infektion auf eine größtenteils TLR2-abhängige Weise zur Sekretion von IL-6 führt. Zellen, die mit einer HSV-1-Mutante infiziert waren, die ein mutiertes ICP0 trug, zeigten eine signifikant erhöhte NF- κ B-Aktivierung und eine ca. 2,5-fach verstärkte IL-6-Sekretion. Interessanterweise wurde als Grundlage der Signalinhibition die ICP0-induzierte Reduktion der MyD88-Proteinlevel postuliert [220]. Der Mechanismus der Signalinhibition bei HSV-1 und MCMV ist somit ähnlich, jedoch greift HSV-1 auf einer frühen und MCMV auf einer späten Ebene in die Signalkaskade ein.

Der Mustererkennungsrezeptor TLR4 ist vor allem für seine Funktion als Sensor von bakteriellen Zellwandkomponenten bekannt. Darüber hinaus ist TLR4 auch an der Detektion von Viren, wie dem Vaccinia-Virus oder dem Respiratorischen Synzytial-Virus, beteiligt [221,222]. Für die Kontrolle der MCMV-Infektion scheint TLR4 keine Rolle zu spielen [96,98,223]. Lediglich in einer Arbeit wurde erwähnt, dass in MCMV-infizierten TLR4-Knockout-Mäusen, im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen, die Level von IFN α erhöht sind [98]. Interessanterweise wurde in der vorliegenden Arbeit beobachtet, dass die Degradation von I κ B α nach TLR4-Stimulation in Δ M45-infizierten Zellen später einsetzt als in uninfizierten Zellen (Abb. 3.1 A). Der Effekt war zwar gering, wurde aber wiederholt beobachtet. Nach TLR2- bzw. IL-1R-Stimulation war in Δ M45-infizierten Zellen hingegen keine Verzögerung der I κ B α -Degradation nachweisbar (Abb. 3.1 B und C), woraus zu schließen ist, dass es sich nicht um einen Rezeptor-unspezifischen Nebeneffekt der Infektion handelt. Nach TLR4-Stimulation führt der MyD88-abhängige Signalweg zu einer frühen, und der TRIF-abhängige Signalweg zu einer späten Phase der NF- κ B-Aktivierung [111,112]. Die Ursache für die verzögerte I κ B α -Degradation in Δ M45-infizierten Zellen könnte somit sein, dass in infizierten Zellen präferenziell der TRIF-abhängige Signalweg aktiviert wird. Eine andere Erklärung wäre, dass TLR4 neben M45 noch durch einen M45-unabhängigen Mechanismus moduliert wird. Beispielsweise wäre es vorstellbar, dass das Virus eine Herunterregulation von TLR4 von der Zelloberfläche induziert. Ein entsprechender Effekt wurde in MCMV-infizierten Makrophagen in der Dissertation von S. Kaulfuß beschrieben [224]. Die Herunterregulation von TLR4 fand allerdings nicht bereits 5 Stunden nach Infektion statt – zu diesem Zeitpunkt wurde die I κ B α -Degradation in der vorliegenden Arbeit untersucht – sondern erst zu späten Infektionszeitpunkten [224]. Ob in infizierten Fibroblasten eine ähnliche Regulation stattfindet und falls ja, mit welcher Kinetik, müsste in weiteren Experimenten geklärt werden.

Die Vermutung, dass der TLR4-Signalweg neben M45 durch einen zweiten Mechanismus spezifisch moduliert wird, weist darauf hin, dass dieser Rezeptor, im Gegensatz zu den bisherigen Annahmen, für die Detektion von MCMV eine Rolle spielen könnte.

Neben der TLR-induzierten NF- κ B-Aktivierung inhibiert M45 auch die NF- κ B-Aktivierung nach Stimulation mit dem proinflammatorischen Zytokin IL-1 β (Kap. 3.1). MCMV teilt diese Eigenschaft mit HCMV, von dem bereits beschrieben wurde, dass es die IL-1R-vermittelte

NF- κ B-Aktivierung blockiert, wobei der zugrunde liegende Mechanismus noch weitestgehend unbekannt ist [180]. Die Daten zeigen somit, dass MCMV durch M45 in der Lage ist, neben der PAMP-induzierten, auch die Zytokin-induzierte Aktivierung von NF- κ B durch den IL-1R und den TNFR1 [164] zu blockieren.

Da M45 Bestandteil des Viruspartikels ist, liegt das Protein direkt zu Beginn der Infektion in neu infizierten Zellen vor. Sofern die im Virion integrierten Mengen an M45 ausreichend sind, sollte das Protein theoretisch in der Lage sein, die NF- κ B-Aktivierung unmittelbar nach Viruseintritt zu inhibieren. Verschiedene Studien zeigen aber, dass CMV sehr früh während der Infektion zu einer Aktivierung von NF- κ B führt. In HCMV-infizierten Zellen erfolgt die Aktivierung replikationsunabhängig schon 15 - 30 Minuten nach Infektion [176,225]. Für MCMV wurde 2 - 3 Stunden nach Infektion eine replikationsabhängige Degradation von I κ B α nachgewiesen [226]. Daher ist zu vermuten, dass das Virion-assoziierte M45 die NF- κ B-Aktivierung zu Beginn der Infektion nicht bedeutend blockiert. Gestützt wird diese Vermutung von der Beobachtung, dass MCMV zwei Stunden nach Infektion (vor dem Einsetzen der M45-Expression) noch nicht in der Lage ist, die TNFR1-induzierte I κ B α -Degradation zu blockieren [188]. Ferner ist auch anzunehmen, dass eine Aktivierung von NF- κ B zu sehr frühen Zeitpunkten von Vorteil für das Virus ist, da sich im Enhancer des MIEP-Promoters NF- κ B-Bindungsstellen befinden und der Transkriptionsfaktor somit als Aktivator der viralen IE-Gene agiert [177-179].

Die Virus-induzierte NF- κ B-Aktivierung findet in MCMV-infizierten Zellen nur kurzzeitig statt, denn bereits 4 - 5 Stunden nach Infektion sind die I κ B α -Level wieder auf dem Ausgangsniveau [226]. Dieser Zeitpunkt korreliert mit dem Beginn der M45-Expression und mit der Inhibition der Agonisten-induzierten I κ B α -Degradation, die bereits 5 Stunden nach Infektion nachgewiesen wurde (Abb. 3.1 und Abb. 3.9). Insgesamt ist daher zu vermuten, dass im Kontext der Virusinfektion die Blockierung der NF- κ B-Aktivierung nicht durch das Virion-assoziierte M45 erfolgt, sondern erst ab 4 - 5 Stunden nach Infektion durch das neu synthetisierte M45.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die Kenntnisse über M45 als Inhibitor der NF- κ B-Aktivierung bedeutend erweitern. Sie zeigen erstmals, dass M45 die Aktivierung von NF- κ B durch den TLR4, TLR2 und IL-1R unterbindet. Somit ist MCMV durch M45 in der Lage, nicht nur die RIP1-abhängige, sondern auch RIP1-unabhängige NF- κ B-Aktivierung durch Mustererkennungs- und Zytokinrezeptoren zu blockieren und hierdurch die Immunantwort des Wirtes umfassend zu antagonisieren.

4.2 Signalunterbrechung durch M45 auf der Ebene des IKK-Komplexes

4.2.1 Grundlage der Signalunterbrechung: Interaktion mit NEMO und dessen Degradation

Auf der Suche nach dem Angriffspunkt von M45 in den RIP1-unabhängigen NF- κ B-Signalwegen wurde in der vorliegenden Arbeit ein neuer zellulärer Interaktionspartner von M45 identifiziert. Mittels Koimmunpräzipitation wurde in transfizierten und infizierten Zellen gezeigt, dass M45 mit NEMO, der regulatorischen Untereinheit des IKK-Komplexes, interagiert (Kap. 3.2.1). Dieser Proteinkomplex besteht zusätzlich noch aus den beiden katalytischen Kinaseuntereinheiten IKK α und IKK β , mit welchen M45 aber nur indirekt über NEMO interagiert (Abb. 3.6).

Nach Rezeptorstimulation besteht die Aufgabe des IKK-Komplexes in der Phosphorylierung von I κ B-Proteinen, welche daraufhin ubiquitiniert und degradiert werden. In Folge der Degradation wird NF- κ B freigesetzt, wandert in den Zellkern und aktiviert die Transkription verschiedener Zielgene [138].

Mittels Western Blot Analyse wurde gezeigt, dass M45 im Viruskontext oder nach ektopischer Expression die lysosomale Degradation von endogenem NEMO induziert. IKK α und IKK β sind ebenfalls von dem Abbau betroffen (Abb. 3.9 und Abb. 3.12). NEMO ist für die Signalweiterleitung im klassischen NF- κ B-Signalweg essentiell. Dies wird anhand von Versuchen mit NEMO-Knockout-Zellen deutlich, in denen nach Behandlung mit TNF α , IL-1, LPS (TLR4-Agonist) oder mit Poly(I:C) (TLR3-Agonist) keine Degradation von I κ B α , keine nukleäre Translokation von NF- κ B und keine Bindung des Transkriptionsfaktors an DNA stattfindet [152]. Der Abbau von NEMO setzt in Zellen, die mit einer M45-Revertante infiziert wurden, bereits 3,5 Stunden nach Infektion ein; ab 5 Stunden nach Infektion ist NEMO auf Proteinebene fast nicht mehr detektierbar (Abb. 3.9). Dieser zeitliche Verlauf korreliert mit der M45-Expression, die erstmals 3,5 Stunden nach Infektion nachweisbar ist (Abb. 3.9) und mit der Fähigkeit von MCMV, bereits 5 Stunden nach Infektion die Agonisten-induzierte Degradation von I κ B α zu inhibieren (Abb. 3.1). Es konnte zudem gezeigt werden, dass M45-Verkürzungsmutanten, die NEMO nicht mehr binden können, auch nicht mehr in der Lage sind, die I κ B α -Degradation zu blockieren (Kap. 3.2.7). Somit sprechen die Daten eindeutig dafür, dass die Interaktion von M45 mit NEMO und die Degradation des Proteins die Ursache für die Inhibition der NF- κ B-Aktivierung ist. Leider war eine Revertierung des Phänotyps durch die stabile Expression von NEMO nicht möglich, da ein hoher Expressionslevel von NEMO dazu führt, dass die NF- κ B-Aktivierung in Zellen dauerhaft blockiert ist ([140] und eigene Beobachtung).

Abgesehen von MCMV sind bislang keine anderen Viren bekannt, die den NF- κ B-Signalweg durch den Abbau von NEMO blockieren. Interessanterweise induziert aber das Bakterium

Shigella flexneri durch sein Protein IpaH9.8 die Ubiquitinierung und proteasomale Degradation von NEMO und blockiert auf diese Weise die Aktivierung von NF- κ B [202]. MCMV und *Shigella flexneri* interferieren somit beide durch die Degradation von NEMO mit der Signalweiterleitung, jedoch sind die Mechanismen der NEMO-Degradation verschieden.

MCMV und HCMV verfolgen häufig die gleichen Immunevasionsstrategien und führen diese zum Teil durch homologe Proteine aus. Das HCMV-Protein UL45 weist, genauso wie M45, im C-terminalen Bereich Homologie zu der R1-Untereinheit von Ribonukleotidreduktasen auf und ist daher das Sequenzhomolog zu M45 [227]. Genauso wie MCMV blockiert auch HCMV die TNFR1- und IL-1R-induzierte NF- κ B-Aktivierung [180,183]. Während MCMV beide Signalwege bereits zu frühen Zeitpunkten durch M45 inhibiert, erfolgt eine vollständige Inhibition durch HCMV erst spät während der Infektion [180,183]. HCMV scheint für die Inhibition der NF- κ B-Aktivierung nicht nur eine andere Kinetik als HCMV zu verfolgen, sondern auch eine andere Strategie. So gibt es Hinweise darauf, dass die Blockierung durch HCMV oberhalb des IKK-Komplexes stattfindet [180]. Zudem werden die drei IKK-Untereinheiten in HCMV-infizierten Zellen während des gesamten Replikationszyklus nicht degradiert, sondern zeitweise angereichert [228]. Somit gibt es bisher keine Indizien dafür, dass UL45 oder ein funktionshomologes Protein von HCMV die gleiche Funktion wie M45 besitzen. Daher bleibt zu klären, durch welchen Mechanismus HCMV die NF- κ B-Aktivierung unterbindet und welche Funktion UL45 während der HCMV-Infektion besitzt.

Neben MCMV exprimieren noch andere DNA-Viren R1-Homologe und es kann angenommen werden, dass einige dieser Proteine auch in der Lage sind, die NF- κ B-Aktivierung durch die Induktion der NEMO-Degradation zu blockieren. Dies könnte insbesondere für die R1-Homologe von HSV-1 bzw. -2 (ICP6 bzw. ICP10) zutreffen, da beiden Proteinen bereits eine funktionelle Ähnlichkeit zu M45 nachgewiesen wurde. So interagieren beide Proteine mit endogenem RIP1 und blockieren dadurch die RIP1-abhängige Apoptose [229]. Für ICP10 wurde gezeigt, dass hierfür die C-terminale R1-Domäne essentiell ist, nicht aber der N-terminale Bereich des Proteins [229]. Diese Eigenschaft teilt ICP10 mit M45 [164], woraus geschlossen werden kann, dass die C-Termini von M45 und ICP10 stark konserviert sind. Da der C-Terminus von M45 auch die Interaktion mit NEMO vermittelt (Abb. 3.21), ist es vorstellbar, dass ICP10 und möglicherweise ICP6 gleichfalls in der Lage sind, mit NEMO zu interagieren.

Neben MCMV kodieren mindestens drei weitere Viren NEMO-Interaktionspartner. Dies sind das humane T-lymphotrope Virus (HTLV) mit seinem Protein Tax, das Kaposi-Sarkom-assoziierte Herpesvirus mit seinem Protein vFLIP und das equine Herpesvirus-2, dessen Protein vCLAP mit NEMO interagiert. Alle drei Virusproteine führen allerdings nicht zu einer

Inhibition, sondern zu einer Aktivierung von NF- κ B [230-234]. Interessanterweise gibt es in Bezug auf M45 auch einen Hinweis auf eine NF- κ B-aktivierende Eigenschaft. In der Arbeit von Rebsamen et al. wurde beschrieben, dass überexprimiertes M45 in einem Reporterassay NF- κ B aktiviert; der zugrunde liegende Mechanismus wurde aber nicht untersucht [108]. Zwei M45-Verkürzungsmutanten (Aminosäuren 1 - 277 bzw. 1 - 976), von denen aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit anzunehmen ist, dass sie nicht mit NEMO interagieren, induzierten keine Aktivierung von NF- κ B ([108] bzw. Kap. 3.2.7). Dies indiziert, dass die NF- κ B-Aktivierung durch M45 von dessen Interaktion mit NEMO abhängen könnte. Als Grundlage der vCLAP- und Tax-induzierten NF- κ B-Aktivierung wird deren Eigenschaft angesehen, eine Oligomerisierung von NEMO hervorzurufen [231,232]. Ein ähnlicher Mechanismus wäre auch für die M45-induzierte NF- κ B-Aktivierung denkbar.

Während Rebsamen et al. die NF- κ B-Aktivität 24 Stunden nach Transfektion gemessen haben, wurde in der vorliegenden Arbeit der NF- κ B-Reporterassay 78 Stunden nach Transduktion von Zellen durchgeführt. Unter diesen Bedingungen wurde keine Aktivierung von NF- κ B durch M45 nachgewiesen. Vermutlich findet die NF- κ B-Aktivierung nur transient statt, und daher stehen die Daten dieser Arbeit nicht zwingend im Widerspruch zu denen von Rebsamen et al..

Falls die Hypothese bestätigt werden kann, dass M45 durch die Interaktion mit NEMO zu einer transienten NF- κ B-Aktivierung führt, könnte ein Modell aufgestellt werden, in welchem M45 eine duale Funktion als NF- κ B-Regulator besitzt. In diesem Modell induziert M45 durch die Interaktion mit NEMO initial eine Aktivierung des IKK-Komplexes und damit eine Aktivierung von NF- κ B. Sobald die Degradation von NEMO einsetzt, wird die NF- κ B-Aktivierung jedoch dauerhaft unterbunden. Durch diese Strategie der Feinregulation wäre MCMV in der Lage, einerseits durch eine geringe bzw. kurzzeitige Aktivierung von NF- κ B eigene Promotoren zu aktivieren oder die Expression von zellulären antiapoptotischen Proteinen zu induzieren, andererseits aber die durch Mustererkennungs- und Zytokinrezeptoren hervorgerufene NF- κ B-Aktivierung zu inhibieren.

4.2.2 NEMO-Abbau durch Autophagie

In der vorliegenden Arbeit konnte keine Abhängigkeit des NEMO-Abbaus vom Ubiquitinsystem und dem Proteasom nachgewiesen werden (Abb. 3.11 und Abb. 3.12 B). Mittels Western Blot Analyse wurde vielmehr gezeigt, dass NEMO durch M45 dem lysosomalen Abbauweg zugeführt wird. Dies wurde anhand der Anreicherung von NEMO nach der Inhibition von lysosomalen Proteasen bzw. nach der Inhibition der Lysosomenansäuerung deutlich (Abb. 3.12).

Die Degradation von zellulären zytoplasmatischen Proteinen durch Lysosomen wird als Autophagie bezeichnet. Die am besten untersuchte Form von Autophagie ist die Makroautophagie (im Folgenden nur als Autophagie bezeichnet). Während dieses Prozesses

werden Bereiche des Zytosols zunächst in Doppelmembranvesikel, sogenannte Autophagosomen, eingeschlossen. Diese fusionieren anschließend mit Lysosomen, um ihren Inhalt zur Degradation freizugeben [206,235]. Durch Immunfluoreszenzfärbungen von transfizierten Zellen wurde festgestellt, dass das normalerweise diffus verteilte NEMO durch M45 in punkt- und vesikelförmige Strukturen umverteilt wird, und dass diese Strukturen mit einer GFP-fusionierten Version des Autophagosomenmarkers LC3 kolokalisieren (Abb. 3.17). Die Umverteilung von NEMO wurde auch unter physiologischeren Bedingungen, nämlich nach MCMV-Infektion von Zellen, die stabil NEMO exprimieren, beobachtet (Abb. 3.14). M45 wies zu einem Großteil eine diffuse zytoplasmatische Verteilung auf, kolokalisierte zusätzlich aber auch mit NEMO-Punkten und -Vesikeln (Abb. 3.15). Unerwarteterweise konnte keine Überlagerung der NEMO-Strukturen mit Lysosomen festgestellt werden (Abb. 3.16). Eine Überlagerung wäre zumindest in einer Subfraktion der Strukturen zu erwarten gewesen. Die Ursache hierfür könnte sein, dass NEMO in Lysosomen schnell degradiert wird und daher nicht nachweisbar war. Möglicherweise wäre es erforderlich gewesen, während des Versuches den lysosomalen Abbau chemisch zu inhibieren.

Insgesamt weisen die Immunfluoreszenzanalysen und Western Blot Daten darauf hin, dass NEMO während der Infektion zunächst in Autophagosomen aufgenommen wird, welche anschließend mit Lysosomen fusionieren, wodurch es schließlich zur Degradation von NEMO kommt. Unterstützt wird dieses Degradationsmodell von dem Befund, dass NEMO in Zellen, in denen die Autophagosomenbildung defekt ist (Atg5-defiziente Zellen), nach MCMV-Infektion nicht degradiert wird (Abb. 3.19).

Ursprünglich wurde Autophagie als ein recht unspezifischer Recycling-Mechanismus angesehen, der unter nährstoffarmen Bedingungen hochreguliert wird und durch den Abbau von Proteinen, Proteinkomplexen oder Zellorganellen die Versorgung der Zelle mit Bausteinen wie Aminosäuren gewährleistet [236]. Inzwischen ist bekannt, dass die Degradation durch Autophagie häufig auf eine selektive Weise erfolgt [237,238]. Bisher gibt es allerdings keine Studie, die beschreibt, dass die selektive Degradation von NEMO durch Autophagie ein zellulärer Mechanismus ist, um den NF- κ B-Signalweg negativ zu regulieren. Es wurde aber kürzlich gezeigt, dass das zelluläre Protein KEAP1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) die Degradation von IKK β durch Autophagie induziert und dadurch die TNF α -induzierte NF- κ B-Aktivierung negativ reguliert [239]. Darüber hinaus scheint die Degradation von phosphoryliertem IKK β durch Autophagie ein Mechanismus zu sein, um der Aktivierung von IKK β durch das HTLV-1 Onkoprotein Tax entgegenzuwirken [240]. Folglich stellt der selektive Abbau von Signalproteinen durch Autophagie prinzipiell eine zelluläre Strategie dar, um die Signalweiterleitung im NF- κ B-Signalweg zu regulieren. Falls dies auch

für NEMO der Fall ist, wäre es vorstellbar, dass M45 einen bereits bestehenden Regulationsmechanismus „missbraucht“ bzw. dauerhaft induziert. Alternativ wäre es auch denkbar, dass die Degradation von NEMO ein ausschließlich Pathogen-induzierter Mechanismus ist.

Interessanterweise wurde in der vorliegenden Arbeit beobachtet, dass IKK α und IKK β in infizierten Zellen ebenfalls auf M45-abhängige Weise lysosomal abgebaut werden (Abb. 3.9 und Abb. 3.12), obwohl M45 nur indirekt über NEMO mit diesen Untereinheiten interagiert (Abb. 3.6 B). Dieser Befund gibt wichtige Hinweise auf den Abbaumechanismus. Es kann angenommen werden, dass die drei IKK-Untereinheiten nach der Interaktion von M45 mit NEMO aneinander gebunden bleiben, so dass der gesamte IKK-Komplex der Degradation zugeführt wird. Der Nachweis, dass IKK α und IKK β über NEMO mit M45 kopräzipitieren (Abb. 3.6 B) spricht jedenfalls dafür, dass der IKK-Komplex zumindest teilweise intakt bleibt. Andererseits sind die Proteinlevel von IKK α und IKK β 3,5 Stunden nach Infektion erst leicht reduziert – zu diesem Zeitpunkt ist die Degradation von NEMO aber bereits deutlich nachweisbar (Abb. 3.9). Erst 5 Stunden nach Infektion – zu diesem Zeitpunkt ist NEMO kaum mehr detektierbar – sind die IKK α - und IKK β -Proteinlevel stark reduziert. Diese Beobachtung spricht für eine leicht verzögerte Degradation von IKK α und IKK β im Vergleich zu NEMO. Möglicherweise wird NEMO doch aus dem IKK-Komplex gelöst und direkt der Autophagie zugeführt. Dies könnte zur Folge haben, dass die Kinaseuntereinheiten freigesetzt werden, instabil und anschließend ebenfalls degradiert werden.

Bisher ist unbekannt, durch welchen Mechanismus M45 die Aufnahme von NEMO in Autophagosomen einleitet. Die selektive Aufnahme von Proteinen in Autophagosomen wurde insbesondere im Rahmen der Beseitigung von Proteinaggregaten beschrieben [237]. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist das Proteinprodukt des mutierten Huntingtin-Gens, welches Aggregate bildet, die durch Autophagie abgebaut werden [241]. Eine Hypothese wäre daher, dass M45 in einem ersten Schritt die Aggregierung von NEMO verursacht. Die großen GFP-LC3-Strukturen, die in M45-exprimierenden Zellen beobachtet wurden (Abb. 3.18), weisen zumindest darauf hin, dass M45 die Bildung von Aggregaten induzieren kann. Als Mechanismus der Aggregatbildung wäre vorstellbar, dass M45 die dreidimensionale Struktur von NEMO beeinträchtigt, wodurch das Protein unlöslich wird und anschließend aggregiert. Einen Einfluss auf die Proteinlöslichkeit übt M45 zumindest auf den Interaktionspartner RIP1 aus. Es wurde nachgewiesen, dass M45 den Übergang von RIP1 von der Detergenzlöslichen in die Detergenz-unlösliche Fraktion hervorruft [188]. Ob dieser Übergang auch zu einer lysosomalen Degradation von RIP1 führt, wurde aber nicht untersucht.

M45 könnte auch indirekt eine Aggregation von NEMO hervorrufen, indem es das Protein aus wichtigen Chaperon-Interaktionen verdrängt. Die Faltung und Konformation vieler Proteine ist von Mitgliedern der Hsp90 (Hitzeschock-Protein-90)-Familie abhängig, die als molekulare Chaperone agieren [242]. Es wurde gezeigt, dass Hsp90 mit dem IKK-Komplex assoziiert [243,244], und dass die Behandlung von Zellen mit dem Hsp90-Inhibitor Geldanamycin dazu führt, dass die drei IKK-Untereinheiten unlöslich und degradiert werden [207,245]. Es wäre somit vorstellbar, dass die Interaktion von M45 mit NEMO den IKK-Komplex aus seiner Bindung mit Hsp90 verdrängt, wodurch es zum Abbau des gesamten Komplexes kommt.

Die Beobachtung, dass M45 zu einem geringen Anteil mit den NEMO-Vesikeln kolokalisiert (Abb. 3.15) weist darauf hin, dass M45 während des Umverteilungsprozesses an NEMO gebunden bleibt. Möglicherweise interagiert M45 neben NEMO auch mit Proteinen der Autophagiemaschinerie und agiert somit als Adapter, durch welchen NEMO zu der Autophagosomenmembran rekrutiert wird. Würde dies zutreffen, so hätte M45 eine ähnliche Funktion wie die zellulären Adapter p62 oder NBR1, die einerseits ubiquitinierte Autophagiesubstrate über ihre Ubiquitin-Bindungsdomäne binden und andererseits über ihre LC3-Interaktionsregion mit LC3 interagieren [246-248].

4.2.3 Rolle des N- bzw. C-Terminus von M45 für die Inhibition der NF- κ B-Aktivierung

Die funktionelle Analyse von M45-Verkürzungsmutanten zeigte, dass der C-Terminus von M45 für die Bindung, Umverteilung und Degradation von NEMO sowie für die Blockierung der NF- κ B-Aktivierung essentiell ist (Kap. 3.2.7). Bereits eine Deletion von 53 Aminosäuren im C-Terminus von M45 führte zum Verlust dieser Funktionen. Eine weniger trunkierte M45-Verkürzungsmutante (Ct4), der nur 37 Aminosäuren im C-Terminus fehlten, war hingegen wieder in der Lage, NEMO zu binden, umzuverteilen und die NF- κ B-Aktivierung zu blockieren. Überraschenderweise induzierte diese Verkürzungsmutante aber nicht die Degradation von NEMO. Somit reicht die Fähigkeit von M45, NEMO zu binden und dessen Umverteilung zu induzieren nicht aus, um auch die Degradation des Proteins zu veranlassen. Hierzu waren nur das M45-Vollängenprotein und eine C-terminale Verkürzungsmutante in der Lage, der lediglich sechs Aminosäuren fehlten. Die Ursache für diesen Befund könnte sein, dass im äußersten C-Terminus Motive liegen, über die M45 Proteine rekrutiert, die an dem Degradationsprozess beteiligt und dafür erforderlich sind.

Funktionell gesehen reichte die Umverteilung von NEMO bereits aus, um die Aktivierung von NF- κ B zu blockieren (Abb. 3.20 und Abb. 3.22). Vermutlich wird durch die Umverteilung die Interaktion von NEMO bzw. des IKK-Komplexes mit „Upstream“-Signalproteinen unterbunden. Alternativ wäre es auch denkbar, dass nicht die Umverteilung selbst, sondern

eine strukturelle oder posttranslationale Modifikation des Komplexes, die mit der Umverteilung einhergeht, zu einer Inaktivierung der Signalweiterleitung führt.

Interessanterweise ist der C-Terminus von M45 nicht nur für die Interaktion mit NEMO, sondern auch für die Interaktion mit endogenem RIP1 essentiell [164]. Die für die RIP1-Interaktion notwendige Region wurde bisher aber nicht so detailliert eingegrenzt, wie im Falle der Interaktion mit NEMO. Daher kann bislang keine Aussage gemacht werden, ob bzw. wie stark die Bereiche, die für die Interaktion mit RIP1 und NEMO notwendig sind, überlappen.

Der C-Terminus ist Teil der R1-Homologiedomäne von M45 [9]. R1 ist die große Untereinheit der Ribonukleotidreduktase, eines Enzyms, das an der dNTP-Synthese beteiligt ist. Da katalytisch wichtige Aminosäuren in der R1-Domäne von M45 nicht konserviert sind, besitzt das Protein aber keine katalytische Aktivität [185]. MCMV induziert aber die Expression der zellulären R1- und R2-Untereinheit und versorgt dadurch die virale DNA-Polymerase mit dNTPs [185]. Durch diese Strategie der dNTP-Versorgung konnte M45 im Laufe der Evolution mutieren und neue Genfunktionen erlangen. Die Inhibition der NF- κ B-Aktivierung durch die Interaktion mit NEMO ist die zweite identifizierte Funktion der M45-R1-Domäne.

Der N-Terminus von M45 besitzt ein RIP homotypisches Interaktionsmotiv (RHIM), zeigt ansonsten aber keine Ähnlichkeiten zu anderen Proteinen [165]. Für die Interaktion mit NEMO und dessen intrazelluläre Umverteilung sind weite Teile des N-Terminus (mindestens 350 Aminosäuren), einschließlich des RHIMs (Aminosäure 61 - 69) entbehrlich (Abb. 3.21 und Abb. 3.22). Diese Eigenschaft besitzt M45 auch in Bezug auf die Fähigkeit, mit endogenem RIP1 zu interagieren [164]. Es wurde beobachtet, dass M45 durch eine Trunkierung von 350 Aminosäuren des N-Terminus die Fähigkeit verliert, die Degradation von NEMO zu induzieren. Möglicherweise liegen in dem deletierten Stück Bereiche, die für Interaktion mit weiteren Proteinen erforderlich sind. Durchaus vorstellbar wäre aber auch, dass die Trunkierung von 350 Aminosäuren zu einer Konformationsänderung von M45 führt, die einen Funktionsverlust in Bezug auf die Induktion der NEMO-Degradation zu Folge hat, aber dem Protein noch ermöglicht, mit NEMO zu interagieren und es umzuverteilen.

Insgesamt führte die Analyse der Verkürzungsmutanten zu der Erkenntnis, dass verschiedene Bereiche von M45 für den Abbauprozess von NEMO erforderlich sind: Für die Bindung und Umverteilung ist der C-Terminus bis auf mindestens 37 Aminosäuren essentiell. Um zusätzlich zur Umverteilung die Degradation von NEMO zu induzieren, ist fast der gesamte C-Terminus, bis auf 6 Aminosäuren erforderlich. Während die Deletion von 350 Aminosäuren des N-Terminus zwar keinen Einfluss auf Fähigkeit hatte, NEMO zu binden und dessen Umverteilung zu veranlassen, führte diese Deletion zu einem Funktionsverlust in Bezug auf Fähigkeit, die Degradation von NEMO zu induzieren.

4.3 Bedeutung des IKK-Komplexes als viraler Angriffspunkt

Der IKK-Komplex hat als viraler Angriffspunkt eine besondere Bedeutung. Der Komplex ist zentraler Bestandteil des klassischen NF- κ B-Aktivierungsweges, welcher nicht nur von dem TLR4, dem TLR2 und dem IL-1R aktiviert wird, sondern auch von allen anderen PRRs [134]. Die Phosphorylierung der I κ B-Proteine erfolgt im klassischen Weg meist durch die IKK β -Untereinheit. In einigen Fällen kann aber auch IKK α diese Funktion übernehmen [153,154]. Die Phosphorylierung nach IL-1R-Stimulation kann zudem durch beide Kinaseuntereinheiten erfolgen [155]. In einigen Fällen scheint somit eine Redundanz zwischen den Kinaseuntereinheiten vorzuliegen. NEMO ist hingegen für den klassischen NF- κ B-Aktivierungsweg essentiell [134,152]. Daher ist anzunehmen, dass MCMV durch die Entfernung von NEMO in der Lage ist, nicht nur die NF- κ B-Aktivierung nach Stimulation der in dieser Arbeit getesteten Rezeptoren zu blockieren, sondern auch nach Stimulation weiterer Mustererkennungs- und Zytokinrezeptoren. Eine M45-vermittelte Inhibition der TLR7- und TLR9-induzierten nukleären Translokation von NF- κ B bzw. TNF α -Produktion wurde von Kooperationspartnern (T.P. Jowers und M.M Brinkmann) bereits nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Diese ist vermutlich für das Virus *in vivo* von Bedeutung, da beide Rezeptoren für die Immunantwort gegenüber MCMV von Bedeutung sind [97,98,223,249]. Darüber hinaus könnte die Inhibition zytoplasmatischer Rezeptoren wie RIG-I und MDA-5 wichtig sein. Diese RNA-Helikasen detektieren dsRNA im Zytoplasma und induzieren die Aktivierung von IRFs und NF- κ B [103]. Es ist bekannt, dass während der Infektion mit MCMV dsRNA im Zytoplasma von infizierten Fibroblasten akkumuliert [192], welche vermutlich durch die virale bidirektionale Transkription entsteht, und ein potentielles PAMP für die RNA-Helikasen darstellt. Interessanterweise wurde kürzlich im Kontext der Infektion mit RNA-Viren beschrieben, dass NEMO nicht nur für die RIG-I-induzierte Aktivierung von NF- κ B, sondern auch für die Aktivierung von IRF3 und IRF7 essentiell ist [250]. Falls RIG-I eine Rolle bei der Detektion von MCMV spielt, wäre M45 vermutlich in der Lage, neben der NF- κ B-Aktivierung auch die Aktivierung von IRF3 und IRF7 zu blockieren und hierdurch die Hauptregulatoren der Typ-I IFN-Produktion zu inhibieren. Der kinetische Verlauf der M45-Expression korreliert zumindest mit publizierten Daten bezüglich der Inhibition der Typ-I IFN-Produktion durch MCMV. So wurde *in vitro* gezeigt, dass MCMV zunächst die Produktion von IFN induziert, ab 5 Stunden nach Infektion jedoch aktiv blockiert [51]. Ab diesem Zeitpunkt ist auch eine Inhibition der IRF3-Phosphorylierung durch MCMV [51] und die Expression von M45 nachweisbar (Abb. 3.1 und Abb. 3.9).

Neben den Zytokin- und Mustererkennungsrezeptoren führen auch DNA-Schädigungen auf NEMO- und zum Teil RIP1-abhängige Weise zur Aktivierung von NF- κ B. Nach einem kürzlich vorgeschlagenen Modell dient die NF- κ B-Aktivierung bei einem geringen Ausmaß der Schädigung vor allem der Produktion von anti-apoptischen Proteinen und somit dem

Überleben der Zelle [251]. Bei starker DNA-Schädigung kommt es durch eine starke Zytokinproduktion oder auf intrinsischem Wege zur Induktion von programmiertem Zelltod [251,252]. Da beschrieben wurde, dass die MCMV-Infektion zu einer Induktion der DNA-Schädigungsantwort führt [253,254], wäre es vorstellbar, dass M45 die RIP1- und NEMO-abhängigen Wege dieser Wirtsantwort inhibiert.

Die IKK α -Proteinlevel sind in MCMV-infizierten Zellen ab ca. 5 Stunden stark reduziert (Abb. 3.9), obwohl M45 nicht direkt mit dieser Untereinheit interagiert (Abb. 3.6 B). Diese Beobachtung weist darauf hin, dass M45 indirekt auch den alternativen NF- κ B-Aktivierungsweg blockieren kann, welcher von IKK α abhängt, aber NEMO- und IKK β -unabhängig ist [134]. Der alternative NF- κ B-Aktivierungsweg kann von einer Untergruppe der TNFR-Familie aktiviert werden, wie beispielsweise von dem Lymphotoxin- β -Rezeptor (LT β R) [156,157]. Interessanterweise ist dieser Rezeptor während der MCMV-Infektion für die Einleitung der Immunantwort von Relevanz. Es wurde beschrieben, dass die frühe Phase der IFN α/β -Produktion nach MCMV-Infektion *in vivo* (Maximum bei ~8 Stunden nach Infektion) von dem LT β R abhängt und durch Bindegewebezellen in der Milz erfolgt, welche von MCMV zu frühen Infektionszeitpunkten infiziert werden. Die Produktion ist abhängig von NIK (NF- κ B-induzierende Kinase), einer Kinase, die im alternativen NF- κ B-Aktivierungsweg IKK α aktiviert [255,256]. Die Abhängigkeit von NIK deutet darauf hin, dass die LT β R-induzierte IFN-Produktion die Aktivierung von NF- κ B erfordert; für HCMV-infizierte Zellen wurde dies bereits nachgewiesen [257]. Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit kann die Hypothese aufgestellt werden, dass M45 durch die IKK α -Degradation die LT β R-induzierte NF- κ B-Aktivierung inhibiert und hierdurch der IFN α/β -Produktion entgegenwirkt. Für diese Annahme spricht die Beobachtung, dass die IFN-Produktion ab 8 Stunden nach Infektion wieder abnimmt und 24 nach Infektion einen Tiefpunkt erlangt [256].

IKK α ist auch für die TLR9-induzierte Produktion von IFN β in konventionellen dendritischen Zellen wichtig. Zurückgeführt wird diese Funktion auf die Interaktion von IKK α mit IRF1 [258]. Da TLR9 eine wichtige Rolle für die Immunantwort gegenüber MCMV spielt [98] und in konventionellen dendritischen Zellen eine produktive Infektion von MCMV stattfindet, ist anzunehmen, dass M45 durch die Degradation von IKK α eine Inhibition der IRF1-Aktivierung verursacht und hierdurch der IFN β -Produktion entgegenwirkt.

Insgesamt ist festzustellen, dass die M45-induzierte Degradation des IKK-Komplexes eine äußerst effiziente Immunevasionsstrategie darstellt. Sie ermöglicht es MCMV, durch ein einziges virales Protein, die NF- κ B-Aktivierung nach Stimulation einer ganzen Bandbreite von Mustererkennungs- und Zytokinrezeptoren zu blockieren. Neue Daten bezüglich der

Involvierung von NEMO bzw. IKK α in der Aktivierung von IRFs lassen zudem vermuten, dass M45 die Aktivierung dieser Transkriptionsfaktoren ebenso hemmen kann.

4.4 Modellerweiterung der M45-vermittelten Inhibition der RIP1-abhängigen NF- κ B-Aktivierung

In einer früheren Studie wurde gezeigt, dass M45 die TNFR1- und TLR3-induzierte NF- κ B-Aktivierung durch Interaktion mit RIP1 blockiert ([164] und Abb. 4.1). NEMO ist essentieller Bestandteil der TNFR1- und TLR3-aktivierten NF- κ B-Signalkaskade. Das Protein liegt in der Signalkaskade unterhalb von RIP1 (Abb. 4.1). Nach Rezeptorstimulation kommt es aber zur Interaktion beider Proteine [125]. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Interaktion von M45 mit NEMO nicht von RIP1 abhängt (Abb. 3.7 A). Umgekehrt ist die Bindung von M45 an RIP1 unabhängig von NEMO (Abb. 3.7 B). Dies weist darauf hin, dass M45 auf zwei Ebenen in den RIP1-abhängigen NF- κ B-Signalweg eingreift. Daher ist auch zu vermuten, dass die Inhibition der TNFR1- und TLR3-induzierten NF- κ B-Aktivierung [164] nicht nur auf der M45-RIP1-Interaktion beruht, wie bisher angenommen, sondern zusätzlich auf der Interaktion von M45 mit NEMO und der darauffolgende Degradation von NEMO. Die virale Inhibition der Signalweiterleitung auf verschiedenen Ebenen ist nicht ungewöhnlich. Insbesondere von großen DNA-Viren ist dieses Phänomen bekannt. Das Vaccinia-Virus kodiert beispielsweise sieben verschiedene Proteine mit inhibierender Funktion [259].

Es ist vorstellbar, dass die Inhibition der Signalweiterleitung auf der Ebene von RIP1 bzw. NEMO in Abhängigkeit des infizierten Zelltyps, der Infektionsdauer oder der Stärke des Stimulus sequenziell oder zeitgleich stattfindet. Der TNFR1-Agonist TNF α wird in großen Mengen während der Infektion gebildet und hat sowohl direkte als auch indirekte antivirale Eigenschaften [171,260-262]. Möglicherweise ist eine doppelte Inhibition des TNFR1-Signalweges erforderlich, um dem starken TNF α -Stimulus hinreichend entgegenzuwirken.

Die Blockierung der TNFR1-induzierten NF- κ B-Aktivierung auf NEMO-Ebene ist noch vor einem weiteren Hintergrund von Bedeutung. Bisher wurde angenommen, dass RIP1 für die Signalweiterleitung nach TNFR1-Stimulation essentiell ist [164,263,264]. Im Widerspruch hierzu wurde vor einiger Zeit beschrieben, dass in murinen embryonalen Fibroblasten von RIP1-Knockout-Mäusen NF- κ B nach TNF-Behandlung aktiviert wird. Die Autoren stellten durch diesen Befund das bisher akzeptierte Modell der Signalweiterleitung in Frage [265]. Falls in MCMV-infizierten Zellen unter bestimmten Bedingungen die Signalweiterleitung ebenfalls RIP1-unabhängig erfolgt, sollte M45 durch die Degradation von NEMO die Aktivierung von NF- κ B trotzdem blockieren können.

Welchen Beitrag die Interaktion von M45 mit RIP1 bzw. NEMO im Einzelnen bei der Inhibition der TNFR1- und TLR3-induzierten NF- κ B-Aktivierung leistet, sollte in weiteren

Studien untersucht werden. Hierfür ist es erforderlich, M45-Verkürzungsmutanten zu generieren, die nur mit RIP1 oder nur mit NEMO interagieren können.

Der dsDNA-Sensor DAI rekrutiert für die Signalweiterleitung RIP1 und RIP3 und es wurde gezeigt, dass M45 mit allen drei Proteinen interagiert, deren Komplexbildung und die Aktivierung von NF- κ B blockiert [108]. Da die DAI-induzierte NF- κ B-Aktivierung ebenfalls von NEMO mediiert wird, ist anzunehmen, dass M45 die Signalweiterleitung dieses Mustererkennungsrezeptors auch auf zwei Ebenen inhibieren kann.

4.5 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit wurde ein neuer viraler Angriffspunkt von MCMV in der NF- κ B-Signalkaskade identifiziert und ein neuer viraler Mechanismus der Unterbrechung der Signalweiterleitung beschrieben.

Die hier gewonnen Erkenntnisse erweitern das Verständnis über die Strategien, die MCMV entwickelt hat, um die Immunantwort des Wirtes zu regulieren. Zusammen mit einer vorherigen Studie zeigen die Ergebnisse, dass M45 auf komplexe Weise die Signalweiterleitung im NF- κ B-Signalweg hemmt. M45 greift hierfür zwei verschiedene Proteine an – RIP1 und die IKK-Untereinheit NEMO. NEMO hat als Angriffspunkt eine besondere Bedeutung, da dieses Protein essentiell für den klassischen NF- κ B-Aktivierungsweg ist, der von allen PRRs- und den meisten Zytokinrezeptoren aktiviert wird. Die Aufdeckung dieses Angriffspunktes identifiziert NEMO als einen wichtigen Bestandteil bzw. Mediator der antiviralen Immunantwort gegenüber MCMV.

Die gezielte Degradation von NEMO durch Autophagie stellt einen bisher unbekanntem viralen Mechanismus der Immunevasion dar. Es ist anzunehmen, dass neben MCMV noch weitere Viren diese äußerst effiziente Strategie entwickelt haben, um der Immunantwort des Wirtes entgegenzuwirken.

5. Literaturverzeichnis

1. **Ho M.** Epidemiology of cytomegalovirus infections. *Rev Infect Dis.* 1990; 12 Suppl 7: S701-10.
2. **Mocarski ES, Shenk T, Pass RF.** Cytomegaloviruses. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. 5. ed: Lippincott Williams & Wilkins, 2007.
3. **Ljungman P, Hakki M, Boeckh M.** Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Infect Dis Clin North Am.* 2010; 24: 319-37.
4. **Streblow DN, Orloff SL, Nelson JA.** Acceleration of allograft failure by cytomegalovirus. *Curr Opin Immunol.* 2007; 19: 577-82.
5. **Steininger C.** Clinical relevance of cytomegalovirus infection in patients with disorders of the immune system. *Clin Microbiol Infect.* 2007; 13: 953-63.
6. **Yinon Y, Farine D, Yudin MH.** Screening, diagnosis, and management of cytomegalovirus infection in pregnancy. *Obstet Gynecol Surv.* 2010; 65: 736-43.
7. **Chen DH, Jiang H, Lee M, Liu F, Zhou ZH.** Three-dimensional visualization of tegument/capsid interactions in the intact human cytomegalovirus. *Virology.* 1999; 260: 10-6.
8. **Dolan A, Cunningham C, Hector RD, Hassan-Walker AF, Lee L, Addison C, Dargan DJ, McGeoch DJ, Gatherer D, Emery VC, Griffiths PD, Sinzger C, McSharry BP, Wilkinson GW, Davison AJ.** Genetic content of wild-type human cytomegalovirus. *J Gen Virol.* 2004; 85: 1301-12.
9. **Rawlinson WD, Farrell HE, Barrell BG.** Analysis of the complete DNA sequence of murine cytomegalovirus. *J Virol.* 1996; 70: 8833-49.
10. **Kalejta RF.** Tegument proteins of human cytomegalovirus. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2008; 72: 249-65, table of contents.
11. **Terhune SS, Schroer J, Shenk T.** RNAs are packaged into human cytomegalovirus virions in proportion to their intracellular concentration. *J Virol.* 2004; 78: 10390-8.
12. **Gibson W.** Structure and formation of the cytomegalovirus virion. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008; 325: 187-204.
13. **Lafemina RL, Hayward GS.** Differences in cell-type-specific blocks to immediate early gene expression and DNA replication of human, simian and murine cytomegalovirus. *J Gen Virol.* 1988; 69 (Pt 2): 355-74.
14. **Perot K, Walker CM, Spaete RR.** Primary chimpanzee skin fibroblast cells are fully permissive for human cytomegalovirus replication. *J Gen Virol.* 1992; 73 (Pt 12): 3281-4.
15. **Bruggeman CA, Meijer H, Dormans PH, Debie WM, Grauls GE, van Boven CP.** Isolation of a cytomegalovirus-like agent from wild rats. *Arch Virol.* 1982; 73: 231-41.
16. **Kim KS, Carp RI.** Abortive infection of human diploid cells by murine cytomegalovirus. *Infect Immun.* 1972; 6: 793-7.
17. **Fioretti A, Furukawa T, Santoli D, Plotkin SA.** Nonproductive infection of guinea pig cells with human cytomegalovirus. *J Virol.* 1973; 11: 998-1003.
18. **Johnson KP.** Mouse cytomegalovirus: placental infection. *J Infect Dis.* 1969; 120: 445-50.
19. **Krmpotic A, Bubic I, Polic B, Lucin P, Jonjic S.** Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection. *Microbes Infect.* 2003; 5: 1263-77.
20. **Modrow S, Dietrich F, Truyen U, Schätzl H.** *Molekulare Virologie*. 3. ed: Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg; 2010.
21. **Penkert RR, Kalejta RF.** Tegument protein control of latent herpesvirus establishment and animation. *Herpesviridae.* 2011; 2: 3.
22. **Taylor-Wiedeman J, Sissons JG, Borysiewicz LK, Sinclair JH.** Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells. *J Gen Virol.* 1991; 72 (Pt 9): 2059-64.
23. **Hahn G, Jores R, Mocarski ES.** Cytomegalovirus remains latent in a common precursor of dendritic and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95: 3937-42.

24. **Sinclair J, Sissons P.** Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *J Gen Virol.* 2006; 87: 1763-79.
25. **Pellett PP, Roizman B.** The Family Herpesviridae: A Brief Introduction. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*: Lippincott Williams & Wilkins, 2007.
26. **Ryckman BJ, Rainish BL, Chase MC, Borton JA, Nelson JA, Jarvis MA, Johnson DC.** Characterization of the human cytomegalovirus gH/gL/UL128-131 complex that mediates entry into epithelial and endothelial cells. *J Virol.* 2008; 82: 60-70.
27. **Feire AL, Koss H, Compton T.** Cellular integrins function as entry receptors for human cytomegalovirus via a highly conserved disintegrin-like domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101: 15470-5.
28. **Wang X, Huong SM, Chiu ML, Raab-Traub N, Huang ES.** Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus. *Nature.* 2003; 424: 456-61.
29. **Isaacson MK, Feire AL, Compton T.** Epidermal growth factor receptor is not required for human cytomegalovirus entry or signaling. *J Virol.* 2007; 81: 6241-7.
30. **Wang X, Huang DY, Huong SM, Huang ES.** Integrin alphavbeta3 is a coreceptor for human cytomegalovirus. *Nat Med.* 2005; 11: 515-21.
31. **Compton T, Nepomuceno RR, Nowlin DM.** Human cytomegalovirus penetrates host cells by pH-independent fusion at the cell surface. *Virology.* 1992; 191: 387-95.
32. **Ryckman BJ, Jarvis MA, Drummond DD, Nelson JA, Johnson DC.** Human cytomegalovirus entry into epithelial and endothelial cells depends on genes UL128 to UL150 and occurs by endocytosis and low-pH fusion. *J Virol.* 2006; 80: 710-22.
33. **Scrivano L, Esterlechner J, Muhlbach H, Ettischer N, Hagen C, Grunewald K, Mohr CA, Ruzsics Z, Koszinowski U, Adler B.** The m74 gene product of murine cytomegalovirus (MCMV) is a functional homolog of human CMV gO and determines the entry pathway of MCMV. *J Virol.* 2010; 84: 4469-80.
34. **Kalejta RF.** Functions of human cytomegalovirus tegument proteins prior to immediate early gene expression. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008; 325: 101-15.
35. **Ogawa-Goto K, Tanaka K, Gibson W, Moriishi E, Miura Y, Kurata T, Irie S, Sata T.** Microtubule network facilitates nuclear targeting of human cytomegalovirus capsid. *J Virol.* 2003; 77: 8541-7.
36. **Homman-Loudiyi M, Hultenby K, Britt W, Soderberg-Naucler C.** Envelopment of human cytomegalovirus occurs by budding into Golgi-derived vacuole compartments positive for gB, Rab 3, trans-golgi network 46, and mannosidase II. *J Virol.* 2003; 77: 3191-203.
37. **Cepeda V, Esteban M, Fraile-Ramos A.** Human cytomegalovirus final envelopment on membranes containing both trans-Golgi network and endosomal markers. *Cell Microbiol.* 2010; 12: 386-404.
38. **Milbradt J, Auerochs S, Sticht H, Marschall M.** Cytomegaloviral proteins that associate with the nuclear lamina: components of a postulated nuclear egress complex. *J Gen Virol.* 2009; 90: 579-90.
39. **Sanchez V, Greis KD, Sztul E, Britt WJ.** Accumulation of virion tegument and envelope proteins in a stable cytoplasmic compartment during human cytomegalovirus replication: characterization of a potential site of virus assembly. *J Virol.* 2000; 74: 975-86.
40. **Murphy K, Travers P, Walport M.** *Janeway's Immunobiology.* 7 ed: Garland Science; 2007.
41. **Thompson MR, Kaminski JJ, Kurt-Jones EA, Fitzgerald KA.** Pattern recognition receptors and the innate immune response to viral infection. *Viruses.* 2011; 3: 920-40.
42. **Kumar H, Kawai T, Akira S.** Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol.* 2011; 30: 16-34.
43. **Janeway CA, Jr., Medzhitov R.** Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2002; 20: 197-216.
44. **Kawai T, Akira S.** The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol.* 2010; 11: 373-84.

45. **Medzhitov R.** Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*. 2007; 449: 819-26.
46. **Kawai T, Akira S.** TLR signaling. *Cell Death Differ*. 2006; 13: 816-25.
47. **Honda K, Takaoka A, Taniguchi T.** Type I interferon [corrected] gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors. *Immunity*. 2006; 25: 349-60.
48. **Garcia-Sastre A, Biron CA.** Type 1 interferons and the virus-host relationship: a lesson in detente. *Science*. 2006; 312: 879-82.
49. **Grundy JE, Trapman J, Allan JE, Shellam GR, Melief CJ.** Evidence for a protective role of interferon in resistance to murine cytomegalovirus and its control by non-H-2-linked genes. *Infect Immun*. 1982; 37: 143-50.
50. **Sainz B, Jr., LaMarca HL, Garry RF, Morris CA.** Synergistic inhibition of human cytomegalovirus replication by interferon-alpha/beta and interferon-gamma. *Virology*. 2005; 2: 14.
51. **Le VT, Trilling M, Zimmermann A, Hengel H.** Mouse cytomegalovirus inhibits beta interferon (IFN-beta) gene expression and controls activation pathways of the IFN-beta enhanceosome. *J Gen Virol*. 2008; 89: 1131-41.
52. **Apostolou E, Thanos D.** Virus Infection Induces NF-kappaB-dependent interchromosomal associations mediating monoallelic IFN-beta gene expression. *Cell*. 2008; 134: 85-96.
53. **Merika M, Williams AJ, Chen G, Collins T, Thanos D.** Recruitment of CBP/p300 by the IFN beta enhanceosome is required for synergistic activation of transcription. *Mol Cell*. 1998; 1: 277-87.
54. **Pahl HL.** Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*. 1999; 18: 6853-66.
55. **Martin T, Cardarelli PM, Parry GC, Felts KA, Cobb RR.** Cytokine induction of monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in human endothelial cells depends on the cooperative action of NF-kappa B and AP-1. *Eur J Immunol*. 1997; 27: 1091-7.
56. **Yao J, Mackman N, Edgington TS, Fan ST.** Lipopolysaccharide induction of the tumor necrosis factor-alpha promoter in human monocytic cells. Regulation by Egr-1, c-Jun, and NF-kappaB transcription factors. *J Biol Chem*. 1997; 272: 17795-801.
57. **Wathelet MG, Lin CH, Parekh BS, Ronco LV, Howley PM, Maniatis T.** Virus infection induces the assembly of coordinately activated transcription factors on the IFN-beta enhancer in vivo. *Mol Cell*. 1998; 1: 507-18.
58. **Henriquet C, Gougat C, Combes A, Lazennec G, Mathieu M.** Differential regulation of RANTES and IL-8 expression in lung adenocarcinoma cells. *Lung Cancer*. 2007; 56: 167-74.
59. **Ruzek MC, Miller AH, Opal SM, Pearce BD, Biron CA.** Characterization of early cytokine responses and an interleukin (IL)-6-dependent pathway of endogenous glucocorticoid induction during murine cytomegalovirus infection. *J Exp Med*. 1997; 185: 1185-92.
60. **Yerkovich ST, Oliver SD, Lenzo JC, Peacock CD, Price P.** The roles of tumour necrosis factor-alpha, interleukin-1 and interleukin-12 in murine cytomegalovirus infection. *Immunology*. 1997; 91: 45-52.
61. **Orange JS, Biron CA.** Characterization of early IL-12, IFN- α , and TNF effects on antiviral state and NK cell responses during murine cytomegalovirus infection. *J Immunol*. 1996; 156: 4746-56.
62. **Trinchieri G.** Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol*. 1995; 13: 251-76.
63. **Bukowski JF, Warner JF, Dennert G, Welsh RM.** Adoptive transfer studies demonstrating the antiviral effect of natural killer cells in vivo. *J Exp Med*. 1985; 161: 40-52.

64. **Venema H, van den Berg AP, van Zanten C, van Son WJ, van der Giessen M, The TH.** Natural killer cell responses in renal transplant patients with cytomegalovirus infection. *J Med Virol.* 1994; 42: 188-92.
65. **Bukowski JF, Woda BA, Welsh RM.** Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection in natural killer cell-depleted mice. *J Virol.* 1984; 52: 119-28.
66. **Kiyotaki C.** [Mechanisms of macrophage activation and macrophage-mediated tumoricidal activity]. *Gan To Kagaku Ryoho.* 1989; 16: 3386-91.
67. **Fiers W, Beyaert R, Boone E, Cornelis S, Declercq W, Decoster E, Denecker G, Depuydt B, De Valck D, De Wilde G, Goossens V, Grooten J, Haegeman G, Heyninck K, Penning L, Plaisance S, Vancompernelle K, Van Criekinge W, Vandenaabeele P, Vanden Berghe W, Van de Craen M, Vandevoorde V, Vercammen D.** TNF-induced intracellular signaling leading to gene induction or to cytotoxicity by necrosis or by apoptosis. *J Inflamm.* 1995; 47: 67-75.
68. **Cho YS, Park SY, Shin HS, Chan FK.** Physiological consequences of programmed necrosis, an alternative form of cell demise. *Mol Cells.* 2010; 29: 327-32.
69. **Movat HZ, Burrowes CE, Cybulsky MI, Dinarello CA.** Acute inflammation and a Shwartzman-like reaction induced by interleukin-1 and tumor necrosis factor. Synergistic action of the cytokines in the induction of inflammation and microvascular injury. *Am J Pathol.* 1987; 129: 463-76.
70. **Dinarello CA.** Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol.* 2009; 27: 519-50.
71. **Tosi MF.** Innate immune responses to infection. *J Allergy Clin Immunol.* 2005; 116: 241-9; quiz 50.
72. **Warner SJ, Auger KR, Libby P.** Interleukin 1 induces interleukin 1. II. Recombinant human interleukin 1 induces interleukin 1 production by adult human vascular endothelial cells. *J Immunol.* 1987; 139: 1911-7.
73. **Howells GL, Chantry D, Feldmann M.** Interleukin 1 (IL-1) and tumour necrosis factor synergise in the induction of IL-1 synthesis by human vascular endothelial cells. *Immunol Lett.* 1988; 19: 169-73.
74. **Neels JG, Pandey M, Hotamisligil GS, Samad F.** Autoamplification of tumor necrosis factor-alpha: a potential mechanism for the maintenance of elevated tumor necrosis factor-alpha in male but not female obese mice. *Am J Pathol.* 2006; 168: 435-44.
75. **Osborn L, Kunkel S, Nabel GJ.** Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989; 86: 2336-40.
76. **Akira S, Takeda K.** Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 2004; 4: 499-511.
77. **O'Neill LA, Dinarello CA.** The IL-1 receptor/toll-like receptor superfamily: crucial receptors for inflammation and host defense. *Immunol Today.* 2000; 21: 206-9.
78. **Yang RB, Mark MR, Gray A, Huang A, Xie MH, Zhang M, Goddard A, Wood WI, Gurney AL, Godowski PJ.** Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature.* 1998; 395: 284-8.
79. **Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning CJ.** Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem.* 1999; 274: 17406-9.
80. **Chow JC, Young DW, Golenbock DT, Christ WJ, Gusovsky F.** Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem.* 1999; 274: 10689-92.
81. **Takeuchi O, Kawai T, Muhlradt PF, Morr M, Radolf JD, Zychlinsky A, Takeda K, Akira S.** Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol.* 2001; 13: 933-40.
82. **Wyllie DH, Kiss-Toth E, Visintin A, Smith SC, Boussouf S, Segal DM, Duff GW, Dower SK.** Evidence for an accessory protein function for Toll-like receptor 1 in anti-bacterial responses. *J Immunol.* 2000; 165: 7125-32.

83. **Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A.** The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*. 2001; 410: 1099-103.
84. **Yarovinsky F, Zhang D, Andersen JF, Bannenberg GL, Serhan CN, Hayden MS, Hieny S, Sutterwala FS, Flavell RA, Ghosh S, Sher A.** TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science*. 2005; 308: 1626-9.
85. **Blasius AL, Beutler B.** Intracellular toll-like receptors. *Immunity*. 2010; 32: 305-15.
86. **Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S.** Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science*. 2004; 303: 1526-9.
87. **Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA.** Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*. 2001; 413: 732-8.
88. **Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S.** A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*. 2000; 408: 740-5.
89. **Bauer S, Kirschning CJ, Hacker H, Redecke V, Hausmann S, Akira S, Wagner H, Lipford GB.** Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98: 9237-42.
90. **Sandor F, Buc M.** Toll-like receptors. II. Distribution and pathways involved in TLR signalling. *Folia Biol (Praha)*. 2005; 51: 188-97.
91. **Ospelt C, Gay S.** TLRs and chronic inflammation. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010; 42: 495-505.
92. **Compton T, Kurt-Jones EA, Boehme KW, Belko J, Latz E, Golenbock DT, Finberg RW.** Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. *J Virol*. 2003; 77: 4588-96.
93. **Boehme KW, Guerrero M, Compton T.** Human cytomegalovirus envelope glycoproteins B and H are necessary for TLR2 activation in permissive cells. *J Immunol*. 2006; 177: 7094-102.
94. **Juckem LK, Boehme KW, Feire AL, Compton T.** Differential initiation of innate immune responses induced by human cytomegalovirus entry into fibroblast cells. *J Immunol*. 2008; 180: 4965-77.
95. **Kijpittayarit S, Eid AJ, Brown RA, Paya CV, Razonable RR.** Relationship between Toll-like receptor 2 polymorphism and cytomegalovirus disease after liver transplantation. *Clin Infect Dis*. 2007; 44: 1315-20.
96. **Szomolanyi-Tsuda E, Liang X, Welsh RM, Kurt-Jones EA, Finberg RW.** Role for TLR2 in NK cell-mediated control of murine cytomegalovirus in vivo. *J Virol*. 2006; 80: 4286-91.
97. **Tabeta K, Georgel P, Janssen E, Du X, Hoebe K, Crozat K, Mudd S, Shamel L, Sovath S, Goode J, Alexopoulou L, Flavell RA, Beutler B.** Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101: 3516-21.
98. **Delale T, Paquin A, Asselin-Paturel C, Dalod M, Brizard G, Bates EE, Kastner P, Chan S, Akira S, Vicari A, Biron CA, Trinchieri G, Briere F.** MyD88-dependent and -independent murine cytomegalovirus sensing for IFN-alpha release and initiation of immune responses in vivo. *J Immunol*. 2005; 175: 6723-32.
99. **Hoebe K, Du X, Georgel P, Janssen E, Tabeta K, Kim SO, Goode J, Lin P, Mann N, Mudd S, Crozat K, Sovath S, Han J, Beutler B.** Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature*. 2003; 424: 743-8.
100. **Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Akira S, Fujita T.** The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol*. 2004; 5: 730-7.
101. **Kato H, Takeuchi O, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Matsui K, Uematsu S, Jung A, Kawai T, Ishii KJ, Yamaguchi O, Otsu K, Tsujimura T, Koh CS, Reis e Sousa C, Matsuura Y, Fujita T, Akira S.** Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature*. 2006; 441: 101-5.

102. **Paz S, Sun Q, Nakhaei P, Romieu-Mourez R, Goubau D, Julkunen I, Lin R, Hiscott J.** Induction of IRF-3 and IRF-7 phosphorylation following activation of the RIG-I pathway. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2006; 52: 17-28.
103. **Kawai T, Akira S.** Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Ann N Y Acad Sci*. 2008; 1143: 1-20.
104. **Hornung V, Ablasser A, Charrel-Dennis M, Bauernfeind F, Horvath G, Caffrey DR, Latz E, Fitzgerald KA.** AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature*. 2009; 458: 514-8.
105. **Rathinam VA, Jiang Z, Waggoner SN, Sharma S, Cole LE, Waggoner L, Vanaja SK, Monks BG, Ganesan S, Latz E, Hornung V, Vogel SN, Szomolanyi-Tsuda E, Fitzgerald KA.** The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses. *Nat Immunol*. 2010; 11: 395-402.
106. **Fernandes-Alnemri T, Yu JW, Datta P, Wu J, Alnemri ES.** AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature*. 2009; 458: 509-13.
107. **Takaoka A, Wang Z, Choi MK, Yanai H, Negishi H, Ban T, Lu Y, Miyagishi M, Kodama T, Honda K, Ohba Y, Taniguchi T.** DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature*. 2007; 448: 501-5.
108. **Rebsamen M, Heinz LX, Meylan E, Michallet MC, Schroder K, Hofmann K, Vazquez J, Benedict CA, Tschopp J.** DAI/ZBP1 recruits RIP1 and RIP3 through RIP homotypic interaction motifs to activate NF-kappaB. *EMBO Rep*. 2009; 10: 916-22.
109. **DeFilippis VR, Alvarado D, Sali T, Rothenburg S, Fruh K.** Human cytomegalovirus induces the interferon response via the DNA sensor ZBP1. *J Virol*. 2010; 84: 585-98.
110. **Brikos C, O'Neill LA.** Signalling of toll-like receptors. *Handb Exp Pharmacol*. 2008: 21-50.
111. **Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, Takeuchi O, Sugiyama M, Okabe M, Takeda K, Akira S.** Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science*. 2003; 301: 640-3.
112. **Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S.** Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity*. 1999; 11: 115-22.
113. **Ishitani T, Takaesu G, Ninomiya-Tsuji J, Shibuya H, Gaynor RB, Matsumoto K.** Role of the TAB2-related protein TAB3 in IL-1 and TNF signaling. *Embo J*. 2003; 22: 6277-88.
114. **Deng L, Wang C, Spencer E, Yang L, Braun A, You J, Slaughter C, Pickart C, Chen ZJ.** Activation of the I kappa B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell*. 2000; 103: 351-61.
115. **Kanayama A, Seth RB, Sun L, Ea CK, Hong M, Shaito A, Chiu YH, Deng L, Chen ZJ.** TAB2 and TAB3 activate the NF-kappaB pathway through binding to polyubiquitin chains. *Mol Cell*. 2004; 15: 535-48.
116. **Wu CJ, Conze DB, Li T, Srinivasula SM, Ashwell JD.** Sensing of Lys 63-linked polyubiquitination by NEMO is a key event in NF-kappaB activation [corrected]. *Nat Cell Biol*. 2006; 8: 398-406.
117. **Wang C, Deng L, Hong M, Akkaraju GR, Inoue J, Chen ZJ.** TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature*. 2001; 412: 346-51.
118. **Meylan E, Burns K, Hofmann K, Blancheteau V, Martinon F, Kelliher M, Tschopp J.** RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation. *Nat Immunol*. 2004; 5: 503-7.
119. **Jiang Z, Mak TW, Sen G, Li X.** Toll-like receptor 3-mediated activation of NF-kappaB and IRF3 diverges at Toll-IL-1 receptor domain-containing adapter inducing IFN-beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101: 3533-8.
120. **Cusson-Hermance N, Khurana S, Lee TH, Fitzgerald KA, Kelliher MA.** Rip1 mediates the Trif-dependent toll-like receptor 3- and 4-induced NF-kappaB activation but does not contribute to interferon regulatory factor 3 activation. *J Biol Chem*. 2005; 280: 36560-6.

121. **Jiang Z, Zamanian-Daryoush M, Nie H, Silva AM, Williams BR, Li X.** Poly(I-C)-induced Toll-like receptor 3 (TLR3)-mediated activation of NFkappa B and MAP kinase is through an interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK)-independent pathway employing the signaling components TLR3-TRAF6-TAK1-TAB2-PKR. *J Biol Chem.* 2003; 278: 16713-9.
122. **Bertrand MJ, Milutinovic S, Dickson KM, Ho WC, Boudreault A, Durkin J, Gillard JW, Jaquith JB, Morris SJ, Barker PA.** cIAP1 and cIAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ligases that promote RIP1 ubiquitination. *Mol Cell.* 2008; 30: 689-700.
123. **Hsu H, Xiong J, Goeddel DV.** The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell.* 1995; 81: 495-504.
124. **Lee TH, Shank J, Cusson N, Kelliher MA.** The kinase activity of Rip1 is not required for tumor necrosis factor-alpha-induced IkappaB kinase or p38 MAP kinase activation or for the ubiquitination of Rip1 by Traf2. *J Biol Chem.* 2004; 279: 33185-91.
125. **Ea CK, Deng L, Xia ZP, Pineda G, Chen ZJ.** Activation of IKK by TNFalpha requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO. *Mol Cell.* 2006; 22: 245-57.
126. **Shim JH, Xiao C, Paschal AE, Bailey ST, Rao P, Hayden MS, Lee KY, Bussey C, Steckel M, Tanaka N, Yamada G, Akira S, Matsumoto K, Ghosh S.** TAK1, but not TAB1 or TAB2, plays an essential role in multiple signaling pathways in vivo. *Genes Dev.* 2005; 19: 2668-81.
127. **Devin A, Lin Y, Liu ZG.** The role of the death-domain kinase RIP in tumour-necrosis-factor-induced activation of mitogen-activated protein kinases. *EMBO reports.* 2003; 4: 623-7.
128. **Lee TH, Huang Q, Oikemus S, Shank J, Ventura JJ, Cusson N, Vaillancourt RR, Su B, Davis RJ, Kelliher MA.** The death domain kinase RIP1 is essential for tumor necrosis factor alpha signaling to p38 mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Biol.* 2003; 23: 8377-85.
129. **Yuasa T, Ohno S, Kehrl JH, Kyriakis JM.** Tumor necrosis factor signaling to stress-activated protein kinase (SAPK)/Jun NH2-terminal kinase (JNK) and p38. Germinal center kinase couples TRAF2 to mitogen-activated protein kinase/ERK kinase 1 and SAPK while receptor interacting protein associates with a mitogen-activated protein kinase kinase kinase upstream of MKK6 and p38. *J Biol Chem.* 1998; 273: 22681-92.
130. **Hayden MS, Ghosh S.** NF-kappaB in immunobiology. *Cell Res.* 2011; 21: 223-44.
131. **Malek S, Huxford T, Ghosh G.** Ikappa Balpha functions through direct contacts with the nuclear localization signals and the DNA binding sequences of NF-kappaB. *J Biol Chem.* 1998; 273: 25427-35.
132. **Simeonidis S, Stauber D, Chen G, Hendrickson WA, Thanos D.** Mechanisms by which IkappaB proteins control NF-kappaB activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96: 49-54.
133. **Bonizzi G, Karin M.** The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* 2004; 25: 280-8.
134. **Wegener E, Krappmann D.** Dynamic protein complexes regulate NF-kappaB signaling. *Handb Exp Pharmacol.* 2008; 186: 237-59.
135. **Zandi E, Rothwarf DM, Delhase M, Hayakawa M, Karin M.** The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. *Cell.* 1997; 91: 243-52.
136. **Yamaoka S, Courtois G, Bessia C, Whiteside ST, Weil R, Agou F, Kirk HE, Kay RJ, Israel A.** Complementation cloning of NEMO, a component of the IkappaB kinase complex essential for NF-kappaB activation. *Cell.* 1998; 93: 1231-40.
137. **Miller BS, Zandi E.** Complete reconstitution of human IkappaB kinase (IKK) complex in yeast. Assessment of its stoichiometry and the role of IKKgammagamma on the complex activity in the absence of stimulation. *J Biol Chem.* 2001; 276: 36320-6.
138. **Solt LA, May MJ.** The IkappaB kinase complex: master regulator of NF-kappaB signaling. *Immunol Res.* 2008; 42: 3-18.

139. **Windheim M, Stafford M, Peggie M, Cohen P.** Interleukin-1 (IL-1) induces the Lys63-linked polyubiquitination of IL-1 receptor-associated kinase 1 to facilitate NEMO binding and the activation of I κ B kinase. *Mol Cell Biol.* 2008; 28: 1783-91.
140. **Zhang SQ, Kovalenko A, Cantarella G, Wallach D.** Recruitment of the IKK signalosome to the p55 TNF receptor: RIP and A20 bind to NEMO (IKK γ) upon receptor stimulation. *Immunity.* 2000; 12: 301-11.
141. **Li Y, Kang J, Friedman J, Tarassishin L, Ye J, Kovalenko A, Wallach D, Horwitz MS.** Identification of a cell protein (FIP-3) as a modulator of NF- κ B activity and as a target of an adenovirus inhibitor of tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96: 1042-7.
142. **Gautheron J, Courtois G.** "Without Ub I am nothing": NEMO as a multifunctional player in ubiquitin-mediated control of NF- κ B activation. *Cell Mol Life Sci.* 2010; 67: 3101-13.
143. **Tokunaga F, Sakata S, Saeki Y, Satomi Y, Kirisako T, Kamei K, Nakagawa T, Kato M, Murata S, Yamaoka S, Yamamoto M, Akira S, Takao T, Tanaka K, Iwai K.** Involvement of linear polyubiquitylation of NEMO in NF- κ B activation. *Nat Cell Biol.* 2009; 11: 123-32.
144. **Zhou H, Wertz I, O'Rourke K, Ultsch M, Seshagiri S, Eby M, Xiao W, Dixit VM.** Bcl10 activates the NF- κ B pathway through ubiquitination of NEMO. *Nature.* 2004; 427: 167-71.
145. **Sebban-Benin H, Pescatore A, Fusco F, Pascuale V, Gautheron J, Yamaoka S, Moncla A, Ursini MV, Courtois G.** Identification of TRAF6-dependent NEMO polyubiquitination sites through analysis of a new NEMO mutation causing incontinentia pigmenti. *Hum Mol Genet.* 2007; 16: 2805-15.
146. **Poyet JL, Srinivasula SM, Lin JH, Fernandes-Alnemri T, Yamaoka S, Tsichlis PN, Alnemri ES.** Activation of the I κ B kinases by RIP via IKK γ /NEMO-mediated oligomerization. *J Biol Chem.* 2000; 275: 37966-77.
147. **DiDonato J, Mercurio F, Rosette C, Wu-Li J, Suyang H, Ghosh S, Karin M.** Mapping of the inducible I κ B phosphorylation sites that signal its ubiquitination and degradation. *Molecular and cellular biology.* 1996; 16: 1295-304.
148. **Mercurio F, Zhu H, Murray BW, Shevchenko A, Bennett BL, Li J, Young DB, Barbosa M, Mann M, Manning A, Rao A.** IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated I κ B kinases essential for NF- κ B activation. *Science.* 1997; 278: 860-6.
149. **Scherer DC, Brockman JA, Chen Z, Maniatis T, Ballard DW.** Signal-induced degradation of I κ B requires site-specific ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92: 11259-63.
150. **Sun SC, Ganchi PA, Ballard DW, Greene WC.** NF- κ B controls expression of inhibitor I κ B: evidence for an inducible autoregulatory pathway. *Science.* 1993; 259: 1912-5.
151. **Zabel U, Baeuerle PA.** Purified human I κ B can rapidly dissociate the complex of the NF- κ B transcription factor with its cognate DNA. *Cell.* 1990; 61: 255-65.
152. **Rudolph D, Yeh WC, Wakeham A, Rudolph B, Nallainathan D, Potter J, Elia AJ, Mak TW.** Severe liver degeneration and lack of NF- κ B activation in NEMO/IKK γ -deficient mice. *Genes Dev.* 2000; 14: 854-62.
153. **Li X, Massa PE, Hanidu A, Peet GW, Aro P, Savitt A, Mische S, Li J, Marcu KB.** IKK α , IKK β , and NEMO/IKK γ are each required for the NF- κ B-mediated inflammatory response program. *J Biol Chem.* 2002; 277: 45129-40.
154. **Adli M, Merkhofer E, Cogswell P, Baldwin AS.** IKK α and IKK β each function to regulate NF- κ B activation in the TNF-induced/canonical pathway. *PLoS One.* 2010; 5: e9428.
155. **Solt LA, Madge LA, Orange JS, May MJ.** Interleukin-1-induced NF- κ B activation is NEMO-dependent but does not require IKK β . *J Biol Chem.* 2007; 282: 8724-33.

156. **Muller JR, Siebenlist U.** Lymphotoxin beta receptor induces sequential activation of distinct NF-kappa B factors via separate signaling pathways. *J Biol Chem.* 2003; 278: 12006-12.
157. **Dejardin E, Droin NM, Delhase M, Haas E, Cao Y, Makris C, Li ZW, Karin M, Ware CF, Green DR.** The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways. *Immunity.* 2002; 17: 525-35.
158. **Senftleben U, Cao Y, Xiao G, Greten FR, Krahn G, Bonizzi G, Chen Y, Hu Y, Fong A, Sun SC, Karin M.** Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science.* 2001; 293: 1495-9.
159. **Miller-Kittrell M, Sparer TE.** Feeling manipulated: cytomegalovirus immune manipulation. *Virology.* 2009; 6: 4.
160. **Mocarski ES, Jr.** Immunomodulation by cytomegaloviruses: manipulative strategies beyond evasion. *Trends Microbiol.* 2002; 10: 332-9.
161. **Cicin-Sain L, Ruzsics Z, Podlech J, Bubic I, Menard C, Jonjic S, Reddehase MJ, Koszinowski UH.** Dominant-negative FADD rescues the in vivo fitness of a cytomegalovirus lacking an antiapoptotic viral gene. *J Virol.* 2008; 82: 2056-64.
162. **Cam M, Handke W, Picard-Maureau M, Brune W.** Cytomegaloviruses inhibit Bak- and Bax-mediated apoptosis with two separate viral proteins. *Cell Death Differ.* 2010; 17: 655-65.
163. **Jurak I, Schumacher U, Simic H, Voigt S, Brune W.** Murine cytomegalovirus m38.5 protein inhibits Bax-mediated cell death. *J Virol.* 2008; 82: 4812-22.
164. **Mack C, Sickmann A, Lembo D, Brune W.** Inhibition of proinflammatory and innate immune signaling pathways by a cytomegalovirus RIP1-interacting protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105: 3094-9.
165. **Upton JW, Kaiser WJ, Mocarski ES.** Cytomegalovirus M45 cell death suppression requires receptor-interacting protein (RIP) homotypic interaction motif (RHIM)-dependent interaction with RIP1. *J Biol Chem.* 2008; 283: 16966-70.
166. **Upton JW, Kaiser WJ, Mocarski ES.** Virus inhibition of RIP3-dependent necrosis. *Cell Host Microbe.* 2010; 7: 302-13.
167. **Trilling M, Le VT, Fiedler M, Zimmermann A, Bleifuss E, Hengel H.** Identification of DNA-damage DNA-binding protein 1 as a conditional essential factor for cytomegalovirus replication in interferon-gamma-stimulated cells. *PLoS Pathog.* 2011; 7: e1002069.
168. **Zimmermann A, Trilling M, Wagner M, Wilborn M, Bubic I, Jonjic S, Koszinowski U, Hengel H.** A cytomegaloviral protein reveals a dual role for STAT2 in IFN- γ signaling and antiviral responses. *J Exp Med.* 2005; 201: 1543-53.
169. **Kotenko SV, Sacconi S, Izotova LS, Mirochnitchenko OV, Pestka S.** Human cytomegalovirus harbors its own unique IL-10 homolog (cmvIL-10). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97: 1695-700.
170. **Redpath S, Angulo A, Gascoigne NR, Ghazal P.** Murine cytomegalovirus infection down-regulates MHC class II expression on macrophages by induction of IL-10. *J Immunol.* 1999; 162: 6701-7.
171. **Browne EP, Wing B, Coleman D, Shenk T.** Altered cellular mRNA levels in human cytomegalovirus-infected fibroblasts: viral block to the accumulation of antiviral mRNAs. *J Virol.* 2001; 75: 12319-30.
172. **Hirsch AJ, Shenk T.** Human cytomegalovirus inhibits transcription of the CC chemokine MCP-1 gene. *J Virol.* 1999; 73: 404-10.
173. **Popkin DL, Virgin HWt.** Murine cytomegalovirus infection inhibits tumor necrosis factor alpha responses in primary macrophages. *J Virol.* 2003; 77: 10125-30.
174. **Gribaudo G, Ravaglia S, Guandalini L, Cavallo R, Gariglio M, Landolfo S.** The murine cytomegalovirus immediate-early 1 protein stimulates NF-kappa B activity by transactivating the NF-kappa B p105/p50 promoter. *Virus Res.* 1996; 45: 15-27.
175. **Yurochko AD, Kowalik TF, Huong SM, Huang ES.** Human cytomegalovirus upregulates NF-kappa B activity by transactivating the NF-kappa B p105/p50 and p65 promoters. *J Virol.* 1995; 69: 5391-400.

176. **Yurochko AD, Hwang ES, Rasmussen L, Key S, Pereira L, Huang ES.** The human cytomegalovirus UL55 (gB) and UL75 (gH) glycoprotein ligands initiate the rapid activation of Sp1 and NF-kappaB during infection. *J Virol.* 1997; 71: 5051-9.
177. **Sambucetti LC, Cherrington JM, Wilkinson GW, Mocarski ES.** NF-kappa B activation of the cytomegalovirus enhancer is mediated by a viral transactivator and by T cell stimulation. *Embo J.* 1989; 8: 4251-8.
178. **Cherrington JM, Mocarski ES.** Human cytomegalovirus ie1 transactivates the alpha promoter-enhancer via an 18-base-pair repeat element. *J Virol.* 1989; 63: 1435-40.
179. **Dorsch-Hasler K, Keil GM, Weber F, Jasin M, Schaffner W, Koszinowski UH.** A long and complex enhancer activates transcription of the gene coding for the highly abundant immediate early mRNA in murine cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985; 82: 8325-9.
180. **Montag C, Wagner J, Gruska I, Hagemeyer C.** Human cytomegalovirus blocks tumor necrosis factor alpha- and interleukin-1beta-mediated NF-kappaB signaling. *J Virol.* 2006; 80: 11686-98.
181. **Browne EP, Shenk T.** Human cytomegalovirus UL83-coded pp65 virion protein inhibits antiviral gene expression in infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100: 11439-44.
182. **Taylor RT, Bresnahan WA.** Human cytomegalovirus IE86 attenuates virus- and tumor necrosis factor alpha-induced NFkappaB-dependent gene expression. *J Virol.* 2006; 80: 10763-71.
183. **Jarvis MA, Borton JA, Keech AM, Wong J, Britt WJ, Magun BE, Nelson JA.** Human cytomegalovirus attenuates interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha proinflammatory signaling by inhibition of NF-kappaB activation. *J Virol.* 2006; 80: 5588-98.
184. **Baillie J, Sahlender DA, Sinclair JH.** Human cytomegalovirus infection inhibits tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) signaling by targeting the 55-kilodalton TNF-alpha receptor. *J Virol.* 2003; 77: 7007-16.
185. **Lembo D, Donalizio M, Hofer A, Cornaglia M, Brune W, Koszinowski U, Thelander L, Landolfo S.** The ribonucleotide reductase R1 homolog of murine cytomegalovirus is not a functional enzyme subunit but is required for pathogenesis. *J Virol.* 2004; 78: 4278-88.
186. **Sun X, Yin J, Starovasnik MA, Fairbrother WJ, Dixit VM.** Identification of a novel homotypic interaction motif required for the phosphorylation of receptor-interacting protein (RIP) by RIP3. *J Biol Chem.* 2002; 277: 9505-11.
187. **Kaiser WJ, Offermann MK.** Apoptosis induced by the toll-like receptor adaptor TRIF is dependent on its receptor interacting protein homotypic interaction motif. *J Immunol.* 2005; 174: 4942-52.
188. **Mack C.** Inhibition des programmierten Zelltodes und proinflammatorischer Signale durch das Cytomegalovirus-Protein M45 [Disseration]: Universität Würzburg, 2008.
189. **Kattenhorn LM, Mills R, Wagner M, Lomsadze A, Makeev V, Borodovsky M, Ploegh HL, Kessler BM.** Identification of proteins associated with murine cytomegalovirus virions. *J Virol.* 2004; 78: 11187-97.
190. **Brune W, Menard C, Heesemann J, Koszinowski UH.** A ribonucleotide reductase homolog of cytomegalovirus and endothelial cell tropism. *Science.* 2001; 291: 303-5.
191. **Valchanova RS, Picard-Maureau M, Budt M, Brune W.** Murine cytomegalovirus m142 and m143 are both required to block protein kinase R-mediated shutdown of protein synthesis. *J Virol.* 2006; 80: 10181-90.
192. **Budt M, Niederstadt L, Valchanova RS, Jonjic S, Brune W.** Specific inhibition of the PKR-mediated antiviral response by the murine cytomegalovirus proteins m142 and m143. *J Virol.* 2009; 83: 1260-70.
193. **Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA.** The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell.* 1996; 86: 973-83.
194. **Beutler BA.** TLRs and innate immunity. *Blood.* 2009; 113: 1399-407.

195. **Hashimoto C, Hudson KL, Anderson KV.** The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell*. 1988; 52: 269-79.
196. **Wagner M, Jonjic S, Koszinowski UH, Messerle M.** Systematic excision of vector sequences from the BAC-cloned herpesvirus genome during virus reconstitution. *J Virol*. 1999; 73: 7056-60.
197. **Messerle M, Crnkovic I, Hammerschmidt W, Ziegler H, Koszinowski UH.** Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94: 14759-63.
198. **Brune W, Nevels M, Shenk T.** Murine cytomegalovirus m41 open reading frame encodes a Golgi-localized antiapoptotic protein. *J Virol*. 2003; 77: 11633-43.
199. **Mahy BWJ, Kangro HO.** Virology methods manual. *Academic Press, San Diego, CA*. 1996.
200. **Osborn JE, Walker DL.** Enhancement of infectivity of murine cytomegalovirus in vitro by centrifugal inoculation. *J Virol*. 1968; 2: 853-8.
201. **Cargnello M, Roux PP.** Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2011; 75: 50-83.
202. **Ashida H, Kim M, Schmidt-Supprian M, Ma A, Ogawa M, Sasakawa C.** A bacterial E3 ubiquitin ligase IpaH9.8 targets NEMO/IKKgamma to dampen the host NF-kappaB-mediated inflammatory response. *Nat Cell Biol*. 2010; 12: 66-73; sup pp 1-9.
203. **Knecht E, Aguado C, Carcel J, Esteban I, Esteve JM, Ghislat G, Moruno JF, Vidal JM, Saez R.** Intracellular protein degradation in mammalian cells: recent developments. *Cell Mol Life Sci*. 2009; 66: 2427-43.
204. **Kirkin V, McEwan DG, Novak I, Dikic I.** A role for ubiquitin in selective autophagy. *Mol Cell*. 2009; 34: 259-69.
205. **Jariel-Encontre I, Bossis G, Piechaczyk M.** Ubiquitin-independent degradation of proteins by the proteasome. *Biochim Biophys Acta*. 2008; 1786: 153-77.
206. **Glick D, Barth S, Macleod KF.** Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol*. 2010; 221: 3-12.
207. **Qing G, Yan P, Xiao G.** Hsp90 inhibition results in autophagy-mediated proteasome-independent degradation of I kappa B kinase (IKK). *Cell Res*. 2006; 16: 895-901.
208. **Chowdary DR, Dermody JJ, Jha KK, Ozer HL.** Accumulation of p53 in a mutant cell line defective in the ubiquitin pathway. *Mol Cell Biol*. 1994; 14: 1997-2003.
209. **Hershko A, Ciechanover A.** The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*. 1998; 67: 425-79.
210. **Chen Z, Knutson E, Wang S, Martinez LA, Albrecht T.** Stabilization of p53 in human cytomegalovirus-initiated cells is associated with sequestration of HDM2 and decreased p53 ubiquitination. *J Biol Chem*. 2007; 282: 29284-95.
211. **Hideshima T, Bradner JE, Chauhan D, Anderson KC.** Intracellular protein degradation and its therapeutic implications. *Clin Cancer Res*. 2005; 11: 8530-3.
212. **Dice JF.** Lysosomal Pathways of Protein Degradation: Landes Bioscience; 2000.
213. **Gloire G, Dejardin E, Piette J.** Extending the nuclear roles of I kappa B kinase subunits. *Biochem Pharmacol*. 2006; 72: 1081-9.
214. **Yin XM, Ding WX, Gao W.** Autophagy in the liver. *Hepatology*. 2008; 47: 1773-85.
215. **Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T.** LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *Embo J*. 2000; 19: 5720-8.
216. **Kuma A, Matsui M, Mizushima N.** LC3, an autophagosomal marker, can be incorporated into protein aggregates independent of autophagy: caution in the interpretation of LC3 localization. *Autophagy*. 2007; 3: 323-8.
217. **Mizushima N, Yamamoto A, Hatano M, Kobayashi Y, Kabeya Y, Suzuki K, Tokuhashi T, Ohsumi Y, Yoshimori T.** Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J Cell Biol*. 2001; 152: 657-68.
218. **Tripathi P, Aggarwal A.** NF-kB transcription factor: a key player in the generation of immune response. *Current Science*. 2006; 90: 519-31.

219. **Medzhitov R.** Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2001; 1: 135-45.
220. **van Lint AL, Murawski MR, Goodbody RE, Severa M, Fitzgerald KA, Finberg RW, Knipe DM, Kurt-Jones EA.** Herpes simplex virus immediate-early ICP0 protein inhibits Toll-like receptor 2-dependent inflammatory responses and NF-kappaB signaling. *J Virol.* 2010; 84: 10802-11.
221. **Hutchens MA, Luker KE, Sonstein J, Nunez G, Curtis JL, Luker GD.** Protective effect of Toll-like receptor 4 in pulmonary vaccinia infection. *PLoS Pathog.* 2008; 4: e1000153.
222. **Kurt-Jones EA, Popova L, Kwinn L, Haynes LM, Jones LP, Tripp RA, Walsh EE, Freeman MW, Golenbock DT, Anderson LJ, Finberg RW.** Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol.* 2000; 1: 398-401.
223. **Zucchini N, Bessou G, Traub S, Robbins SH, Uematsu S, Akira S, Alexopoulou L, Dalod M.** Cutting edge: Overlapping functions of TLR7 and TLR9 for innate defense against a herpesvirus infection. *J Immunol.* 2008; 180: 5799-803.
224. **Kaulfuß S.** Modulation von Makrophagenfunktionen durch das Murine Zytomegalievirus (MCMV): Freie Universität Berlin, 2009.
225. **Yurochko AD, Huang ES.** Human cytomegalovirus binding to human monocytes induces immunoregulatory gene expression. *J Immunol.* 1999; 162: 4806-16.
226. **Le VTK.** Charakterisierung der viralen Inhibition des Interferon beta-Induktionssystems und Identifikation interferon-modulierender Gene des Maus-Cytomegalovirus: Freie Universität Berlin, 2007.
227. **Hahn G, Khan H, Baldanti F, Koszinowski UH, Revello MG, Gerna G.** The human cytomegalovirus ribonucleotide reductase homolog UL45 is dispensable for growth in endothelial cells, as determined by a BAC-cloned clinical isolate of human cytomegalovirus with preserved wild-type characteristics. *J Virol.* 2002; 76: 9551-5.
228. **DeMeritt IB, Milford LE, Yurochko AD.** Activation of the NF-kappaB pathway in human cytomegalovirus-infected cells is necessary for efficient transactivation of the major immediate-early promoter. *J Virol.* 2004; 78: 4498-507.
229. **Dufour F, Bertrand L, Pearson A, Grandvaux N, Langelier Y.** The Ribonucleotide Reductase R1 Subunits of Herpes Simplex Virus 1 and 2 Protect Cells against Poly(I {middle dot} C)-Induced Apoptosis. *J Virol.* 2011; 85: 8689-701.
230. **Harhaj EW, Sun SC.** IKKgamma serves as a docking subunit of the IkappaB kinase (IKK) and mediates interaction of IKK with the human T-cell leukemia virus Tax protein. *J Biol Chem.* 1999; 274: 22911-4.
231. **Poyet JL, Srinivasula SM, Alnemri ES.** vCLAP, a caspase-recruitment domain-containing protein of equine Herpesvirus-2, persistently activates the Ikappa B kinases through oligomerization of IKKgamma. *J Biol Chem.* 2001; 276: 3183-7.
232. **Huang GJ, Zhang ZQ, Jin DY.** Stimulation of IKK-gamma oligomerization by the human T-cell leukemia virus oncoprotein Tax. *FEBS Lett.* 2002; 531: 494-8.
233. **Field N, Low W, Daniels M, Howell S, Daviet L, Boshoff C, Collins M.** KSHV vFLIP binds to IKK-gamma to activate IKK. *J Cell Sci.* 2003; 116: 3721-8.
234. **Liu L, Eby MT, Rathore N, Sinha SK, Kumar A, Chaudhary PM.** The human herpes virus 8-encoded viral FLICE inhibitory protein physically associates with and persistently activates the Ikappa B kinase complex. *J Biol Chem.* 2002; 277: 13745-51.
235. **Klionsky DJ, Emr SD.** Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science.* 2000; 290: 1717-21.
236. **Meijer AJ, Codogno P.** Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004; 36: 2445-62.
237. **Kraft C, Peter M, Hofmann K.** Selective autophagy: ubiquitin-mediated recognition and beyond. *Nat Cell Biol.* 2010; 12: 836-41.
238. **Johansen T, Lamark T.** Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy.* 2011; 7: 279-96.

239. **Kim JE, You DJ, Lee C, Ahn C, Seong JY, Hwang JI.** Suppression of NF-kappaB signaling by KEAP1 regulation of IKKbeta activity through autophagic degradation and inhibition of phosphorylation. *Cell Signal.* 2010; 22: 1645-54.
240. **Niida M, Tanaka M, Kamitani T.** Downregulation of active IKK beta by Ro52-mediated autophagy. *Mol Immunol.* 2010; 47: 2378-87.
241. **Sarkar S, Rubinsztein DC.** Huntington's disease: degradation of mutant huntingtin by autophagy. *FEBS J.* 2008; 275: 4263-70.
242. **Zuehlke A, Johnson JL.** Hsp90 and co-chaperones twist the functions of diverse client proteins. *Biopolymers.* 2010; 93: 211-7.
243. **Chen G, Cao P, Goeddel DV.** TNF-induced recruitment and activation of the IKK complex require Cdc37 and Hsp90. *Mol Cell.* 2002; 9: 401-10.
244. **Park KA, Byun HS, Won M, Yang KJ, Shin S, Piao L, Kim JM, Yoon WH, Junn E, Park J, Seok JH, Hur GM.** Sustained activation of protein kinase C downregulates nuclear factor-kappaB signaling by dissociation of IKK-gamma and Hsp90 complex in human colonic epithelial cells. *Carcinogenesis.* 2007; 28: 71-80.
245. **Pittet JF, Lee H, Pespeni M, O'Mahony A, Roux J, Welch WJ.** Stress-induced inhibition of the NF-kappaB signaling pathway results from the insolubilization of the IkappaB kinase complex following its dissociation from heat shock protein 90. *J Immunol.* 2005; 174: 384-94.
246. **Waters S, Marchbank K, Solomon E, Whitehouse C, Gautel M.** Interactions with LC3 and polyubiquitin chains link nbr1 to autophagic protein turnover. *FEBS Lett.* 2009; 583: 1846-52.
247. **Seibenhener ML, Babu JR, Geetha T, Wong HC, Krishna NR, Wooten MW.** Sequestosome 1/p62 is a polyubiquitin chain binding protein involved in ubiquitin proteasome degradation. *Mol Cell Biol.* 2004; 24: 8055-68.
248. **Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, Overvatn A, Bjorkoy G, Johansen T.** p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem.* 2007; 282: 24131-45.
249. **Krug A, French AR, Barchet W, Fischer JA, Dzionek A, Pingel JT, Orihuela MM, Akira S, Yokoyama WM, Colonna M.** TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. *Immunity.* 2004; 21: 107-19.
250. **Zhao T, Yang L, Sun Q, Arguello M, Ballard DW, Hiscott J, Lin R.** The NEMO adaptor bridges the nuclear factor-kappaB and interferon regulatory factor signaling pathways. *Nat Immunol.* 2007; 8: 592-600.
251. **Biton S, Ashkenazi A.** NEMO and RIP1 control cell fate in response to extensive DNA damage via TNF-alpha feedforward signaling. *Cell.* 2011; 145: 92-103.
252. **Janssens S, Tinel A, Lippens S, Tschopp J.** PIDD mediates NF-kappaB activation in response to DNA damage. *Cell.* 2005; 123: 1079-92.
253. **Gaspar M, Shenk T.** Human cytomegalovirus inhibits a DNA damage response by mislocalizing checkpoint proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103: 2821-6.
254. **Castillo JP, Frame FM, Rogoff HA, Pickering MT, Yurochko AD, Kowalik TF.** Human cytomegalovirus IE1-72 activates ataxia telangiectasia mutated kinase and a p53/p21-mediated growth arrest response. *J Virol.* 2005; 79: 11467-75.
255. **Hsu KM, Pratt JR, Akers WJ, Achilefu SI, Yokoyama WM.** Murine cytomegalovirus displays selective infection of cells within hours after systemic administration. *J Gen Virol.* 2009; 90: 33-43.
256. **Schneider K, Loewendorf A, De Trez C, Fulton J, Rhode A, Shumway H, Ha S, Patterson G, Pfeiffer K, Nedospasov SA, Ware CF, Benedict CA.** Lymphotoxin-mediated crosstalk between B cells and splenic stroma promotes the initial type I interferon response to cytomegalovirus. *Cell Host Microbe.* 2008; 3: 67-76.
257. **Benedict CA, Banks TA, Senderowicz L, Ko M, Britt WJ, Angulo A, Ghazal P, Ware CF.** Lymphotoxins and cytomegalovirus cooperatively induce interferon-beta, establishing host-virus detente. *Immunity.* 2001; 15: 617-26.

258. **Hoshino K, Sasaki I, Sugiyama T, Yano T, Yamazaki C, Yasui T, Kikutani H, Kaisho T.** Critical role of IkappaB Kinase alpha in TLR7/9-induced type I IFN production by conventional dendritic cells. *J Immunol.* 2010; 184: 3341-5.
259. **Rahman MM, McFadden G.** Modulation of NF-kappaB signalling by microbial pathogens. *Nat Rev Microbiol.* 2011; 9: 291-306.
260. **Pavic I, Polic B, Crnkovic I, Lucin P, Jonjic S, Koszinowski UH.** Participation of endogenous tumour necrosis factor alpha in host resistance to cytomegalovirus infection. *J Gen Virol.* 1993; 74 (Pt 10): 2215-23.
261. **Wong GH, Goeddel DV.** Tumour necrosis factors alpha and beta inhibit virus replication and synergize with interferons. *Nature.* 1986; 323: 819-22.
262. **Lucin P, Jonjic S, Messerle M, Polic B, Hengel H, Koszinowski UH.** Late phase inhibition of murine cytomegalovirus replication by synergistic action of interferon-gamma and tumour necrosis factor. *J Gen Virol.* 1994; 75 (Pt 1): 101-10.
263. **Kelliher MA, Grimm S, Ishida Y, Kuo F, Stanger BZ, Leder P.** The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF-kappaB signal. *Immunity.* 1998; 8: 297-303.
264. **Ting AT, Pimentel-Muinos FX, Seed B.** RIP mediates tumor necrosis factor receptor 1 activation of NF-kappaB but not Fas/APO-1-initiated apoptosis. *Embo J.* 1996; 15: 6189-96.
265. **Wong WW, Gentle IE, Nachbur U, Anderton H, Vaux DL, Silke J.** RIPK1 is not essential for TNFR1-induced activation of NF-kappaB. *Cell Death Differ.* 2010; 17: 482-7.

6. Anhang

6.1 Publikationen

P. M. Fliss, T. P. Jowers, M. M. Brinkmann, B. Holstermann, C. Mack, P. Dickinson, H. Hohenberg, P. Ghazal, W. Brune; Viral mediated redirection of NEMO/IKK γ to autophagosomes curtails the inflammatory cascade, akzeptiert zur Publikation bei PLoS Pathogens, Dezember 2011

6.2 Vorträge

P.M. Fliss, T. Pechenick Jowers, M.M. Brinkmann, B. Holstermann, C. Mack, H. Hohenberg, P. Ghazal, W. Brune; A Cytomegalovirus Protein Blocks the Host NF-kappaB-Mediated Inflammatory Response by Targeting NEMO to Autophagosomes
36th Annual International Herpesvirus Workshop, Danzig, Polen, Juli 2011

P. Fließ, C. Mack, W. Brune; Inhibition of Toll-like receptor and Interleukin-1 receptor signalling by the cytomegalovirus protein M45
Joint Scientific Retreat, Heinrich-Pette Institute, Hamburg, November 2010

P. Fliss, C. Mack, W. Brune; Murine cytomegalovirus M45 blocks Toll-like receptor and Interleukin-1 receptor-dependent NF-kappaB activation by targeting NEMO for degradation.
9th Workshop of the study group "Immunobiology of Viral Infections", Deidesheim, Oktober 2010

P. Fliss, C. Mack, W. Brune; Murine cytomegalovirus M45 blocks Toll-like receptor and Interleukin-1 receptor-dependent NF-kappaB activation by targeting NEMO for degradation.
5th Mini-Herpesvirus Workshop, Berlin, Oktober 2010

P. Fliss, C. Mack, W. Brune; Inhibition of Toll-like receptor and Interleukin-1 receptor signaling pathways by the murine cytomegalovirus protein M45
4th European Congress of Virology, Cernobbio, Italien, April 2010

P. Fliss, C. Mack, W. Brune

Murine cytomegalovirus M45 blocks Toll-like receptor and Interleukin-1 receptor-dependent NF-kappaB activation by targeting NEMO for degradation
35th Annual International Herpesvirus Workshop, Salt Lake City, Utah, USA, Juli 2010

C. Mack, P. Fliß, A. Sickmann, D. Lembo, W. Brune; Inhibition of proinflammatory and innate immune signalling pathways by a cytomegalovirus RIP1-interacting protein
7th Workshop of the study group "Immunobiology of Viral Infections", Deidesheim, Oktober 2008

6.3 Poster

P.M. Fliss, T. Pechenick Jowers, M.M. Brinkmann, B. Holstermann, C. Mack, H. Hohenberg, P. Ghazal, W. Brune; A Cytomegalovirus Protein Blocks the Host NF-kappaB-Mediated Inflammatory Response by Targeting NEMO to Autophagosomes

- Joint Scientific Retreat, Heinrich-Pette-Institut, Leibniz-Institut für Experimentelle Virologie, Oktober 2011
- 36th Annual International Herpesvirus Workshop, Danzig, Polen, Juli 2011
- International Symposium on Structural and Infection Biology, Hamburg, Jul, 2011

P. Fliss, C. Mack, W. Brune; Inhibition of Toll-like receptor and Interleukin-1 receptor signaling pathways by the murine cytomegalovirus protein M45
4th European Congress of Virology, Cernobbio, Italien, April 2010

C. Mack, P. Fliß, A. Sickmann, D. Lembo, W. Brune
Inhibition of proinflammatory and innate immune signaling pathways by a cytomegalovirus RIP-interacting protein
Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie (GfV), Leipzig, März 2009

M. Syta, P. Fliß, W. Brune
Inhibition of Bak-mediated apoptosis by murine cytomegalovirus
Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie (GfV), Heidelberg, März 2008

6.4 Stipendien

"Young scientists travel award" von der Gesellschaft für Virologie für die Teilnahme am vierten europäischen Kongress für Virologie, Cernobbio, Italien, April 2010

6.5 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
AIM2	absent in melanoma 2
Amp	Ampicillin
AP-1	Aktivatorprotein-1
AS	Aminosäure
Atg	autophagy related gene
CMV	Zytomegalievirus
CpG	Cytidin-Phosphatguanosin
DAI	DNA-abhängiger Aktivator von IRFs
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Deoxynukleosidtriphosphate
dsDNA	doppelsträngige DNA
dsRNA	doppelsträngige RNA
E	early, früh
ERGIC	endoplasmatisches Retikulum Golgi intermediates Kompartiment
g	Konstante der Schwerebeschleunigung
gB	Glykoprotein B
GFP	grün fluoreszierendes Protein
HA	Hämagglutinin
HCMV	humanes Zytomegalievirus
hpi	hours post infection
HSP	Hitzeschockprotein
HSV	Herpes-Simplex-Virus
HTLV	humanes T lymphotropes Virus
IE	immediate early
IFN	Interferon
IKK	I κ B-Kinase Komplex
IL	Interleukin
IL-1R	Interleukin-1 Rezeptor
IRAK	IL-1R-assoziierten Kinasen
IRF	Interferon regulatorischer Faktor
I κ B	Inhibitor-kappaB
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen

kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
L	Late
LPS	Lipopolysaccharid
LTA-SA	Lipoteichonsäure von Staphylococcus Aureus
LT β	Lymphotoxin- β
LT β R	Lymphotoxin- β Rezeptor
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCMV	murines Zytomegalievirus
MDA-5	melanoma differentiation associated gene 5
MIEP	major-IE-promoter
MKK6	MAPK-Kinase-Kinase 6
MOI	Multiplicity of infection
MyD88	myeloid differentiation primary response protein 88
NBR1	neighbor of BRCA1 gene 1
NEMO	NF- κ B essential modulator
NF- κ B	Nuclear factor-kappaB
nt	Nukleotid
ORF	Open reading frame
PAMP	Pathogen associated molecular pattern, Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PAS	Protein-A-Sepharose
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PGS	Protein-G-Sepharose
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PRR	Pattern recognition receptor, Mustererkennungsrezeptor
Puro	Puromycin
R1	Ribonukleotidreduktase, große Untereinheit
RHIM	RIP homotypisches Interaktionsmotiv
RIG-I	retinoic acid inducible gene-I
RIP	Rezeptor interagierendes Protein
Rm142	MCMV-m142-Revertante
RM45	MCMV-M45-Revertante
RNA	Ribonukleinsäure
ssRNA	einzelsträngige RNA
STAT	signal transducer and activator of transcription
TAB	TAK binding protein
TAK1	TGF-activated kinase 1

TCID	Tissue culture infective dose
TLR	Toll-Like-Rezeptor
T _m	Schmelztemperatur (von Primern)
TNFR	Tumor-Nekrose-Faktor Rezeptor
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor α
TRADD	TNFR associated death domain protein
TRIF	TIR domain-containing adapter inducing IFN β
U	Enzymeinheit
UV	Ultraviolett
vCLAP	viral CARD-like apoptotic proteins
vFLIP	viral fllice like inhibitory protein
wt	Wildtyp
Zeo	Zeocin
Δ	Delta (indiziert eine deletierten Bereich)
Δ M45	MCMV-M45-Deletionsmutante

6.6 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Wolfram Brune danke ich für die Überlassung des Forschungsthemas sowie für die wissenschaftliche Unterstützung, sein großes Interesse und stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Frau PD Dr. Annette Mankertz danke ich für die Betreuung dieser Arbeit von Seiten der Freien Universität Berlin und für die Erstellung des Gutachtens. Herrn Prof. Dr. Rupert Mutzel möchte ich für Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Gedankt sei auch meinen ehemaligen und jetzigen Kollegen, insbesondere Wiebke, Claudia, Maren, Sebastian, Uwe, Eva, Jette und Etti, für das gute Arbeitsklima, die fachlichen sowie nicht fachlichen Diskussionen und eine Menge Spass.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für die grenzenlose Hilfe und Unterstützung bedanken.

6.7 Erklärung

gem. § 7 Abs. 4 der Promotionsordnung:

Hierdurch versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel: „Inhibition der NF- κ B-Aktivierung durch das murine Zytomegalievirus-Protein M45“ selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe. Die Arbeit wurde bislang noch nicht anderweitig als Dissertation eingereicht oder veröffentlicht.

Hamburg, Dezember 2011

Patricia Fliß