

**CHARAKTERISIERUNG DER VIRALEN INHIBITION DES  
INTERFERON BETA – INDUKTIONSSYSTEMS  
UND IDENTIFIKATION INTERFERON-MODULIERENDER GENE  
DES MAUS-CYTOMEGALOVIRUS**

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

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

**vorgelegt von  
Le, Vu Thuy Khanh  
aus Saigon/Vietnam**

**März 2007**

1. Gutachter: Prof. Dr. Hartmut Hengel

2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel

Disputation am 14.06.2007

“La science se construit à partir de faits comme une maison se construit à partir de briques; mais une accumulation de faits ne constitue pas plus une science qu’une accumulation de briques ne constitue une maison.”

(Science is built of facts the way a house is built of bricks, but an accumulation of facts is no more science than a pile of bricks is a house.)

Henri Poincaré

## INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGEN.....	7
ZUSAMMENFASSUNG.....	10
SUMMARY.....	11
1. EINLEITUNG.....	12
1.1. Das Interferon – System.....	12
1.1.1. Typ I und Typ II - Interferone.....	13
1.1.2. Detektion fremder, pathogen-assoziiierter Elemente.....	14
1.1.3. Regulation der IFN-Genexpression.....	16
1.1.4. Jak/STAT-Signaltransduktionsweg.....	19
1.1.5. Antivirale IFN-Antwort.....	21
1.2. Cytomegaloviren.....	24
1.2.1. Das humane Cytomegalovirus.....	24
1.2.2. Klinische Bedeutung.....	26
1.2.3. Maus-CMV als Modellsystem.....	26
1.3. Virale Strategien der IFN-Evasion.....	27
1.3.1. Inhibition der IFN-Produktion.....	28
1.3.2. Inhibition der IFN-abhängigen Signalkaskade.....	29
1.3.3. Inhibition der IFN-induzierten antiviralen Proteine.....	30
1.3.4. Immunevasion durch Cytomegaloviren.....	31
1.4. Ziel dieser Arbeit.....	33
2. ERGEBNISSE.....	35
2.1. MCMV inhibiert die IFN $\alpha$ / $\beta$ -Expression nach einer initialen Induktionsphase.....	35
2.1.1. Evaluierung der Methoden durch Reproduktion bekannter HCMV-Daten.....	35
2.1.2. Die Induktion und Inhibition der IFN $\alpha$ / $\beta$ -Expression ist virusdosis-abhängig.....	37
2.1.3. Virale Genexpression ist notwendig für die Inhibition der IFN $\alpha$ / $\beta$ -Transkription.....	40
2.1.4. Die IRF3-Aktivierung ist ausreichend für die Initiation der IFN $\alpha$ / $\beta$ -Expression..	43
2.1.5. MCMV interferiert mit der Aktivierung von ATF-2/c-Jun.....	45
2.1.6. MCMV antagonisiert den NF- $\kappa$ B Signalweg auf mehreren Ebenen.....	47
2.2. Screening nach MCMV-kodierten Inhibitoren.....	50
2.2.1. Neun-segmentige rekombinante Influenza A – Viren als Screening-System?.....	51
2.2.2. Konstruktion und Screening von MCMV-Deletionsmutanten.....	55
2.2.3. $\Delta$ M43: Erste MCMV-Mutante mit IFN $\beta$ -Phänotyp.....	61
2.2.4. Identifizierung möglicher Kandidaten mit Hilfe von Wachstumskurven.....	63
2.3. Charakterisierung von $\Delta$ M43.....	64
2.3.1. Expressionsanalyse von <i>M43</i> und benachbarter ORFs.....	66
2.3.2. $\Delta$ M43 zeigt eine defiziente Inhibition der IFN $\beta$ -Genexpression.....	72
2.3.3. MCMV inhibiert die Aktivierung von IRF3 und ATF-2/c-Jun <i>M43</i> -unabhängig.....	78
2.3.4. Untersuchung der NF- $\kappa$ B Signalkaskade in $\Delta$ M43-infizierten Zellen.....	81
2.3.5. I $\kappa$ B $\alpha$ , das Target von <i>M43</i> ?.....	87
3. DISKUSSION.....	92
3.1. Aktivierung der IFN $\alpha$ / $\beta$ -induzierenden Signalwege.....	92
3.2. Inhibition der IFN $\alpha$ / $\beta$ -induzierenden Signalkaskaden.....	95
3.3. Suchstrategien für die Identifikation MCMV-kodierter IFN $\beta$ -Inhibitoren.....	99

## INHALTSVERZEICHNIS

3.4. HCMV- <i>UL83</i> : Ein IFN $\beta$ -Antagonist? .....	102
3.5. Beteiligung der <i>M43</i> -Genregion an der IFN $\beta$ -Inhibition .....	103
3.6. MCMV-kodierte IFN-Inhibitoren als molekulare Wegweiser und Werkzeuge.....	107
3.7. Ausblick .....	108
4. MATERIAL UND METHODEN .....	111
4.1. Materialien .....	111
4.1.1. Geräte .....	111
4.1.2. Chemikalien und Biochemikalien .....	112
4.1.3. Kits .....	115
4.1.4. Oligonukleotide .....	116
4.1.5. Plasmide und BACs .....	117
4.1.6. Antikörper .....	117
4.1.7. Bakterienstämme .....	118
4.1.8. Zelllinien .....	118
4.1.9. Viren .....	118
4.1.10. Mäuse .....	119
4.1.11. Puffer und Lösungen .....	119
4.2. Konstruktion von Plasmiden und Arbeiten mit <i>E.coli</i> .....	123
4.2.1. Klonierung von NS1 und NS2 .....	123
4.2.2. Herstellung chemisch-kompetenter <i>E.coli</i> für Plasmid-Transformationen.....	124
4.2.3. Herstellung elektro-kompetenter <i>E.coli</i> für die BAC-Mutagenese.....	124
4.2.4. Transformation kompetenter <i>E.coli</i> .....	124
4.2.5. Glycerin-Dauerkulturen .....	125
4.3. Arbeiten mit eukaryontischen Zellen .....	125
4.3.1. Zellkultur .....	125
4.3.2. Lagerung von Zellen in flüssigem Stickstoff .....	126
4.3.3. Präparation von primären murinen embryonalen Fibroblasten (MEF).....	126
4.3.4. Transfektion .....	128
4.3.5. Inhibition der zellulären Transkription bzw. Translation.....	128
4.4. Virologische Arbeiten .....	128
4.4.1. Generation rekombinanter MCMV-Mutanten .....	128
4.4.2. Herstellung eines gereinigten MCMV-Stocks .....	129
4.4.3. Herstellung eines gereinigten HCMV-Stocks .....	129
4.4.4. Infektion mit MCMV und HCMV .....	130
4.4.5. Titration von MCMV und HCMV .....	130
4.4.6. UV-Inaktivierung von MCMV und HCMV.....	130
4.4.7. Herstellung von MCMV-Latenzserum.....	131
4.4.8. Infektion mit Influenza A .....	131
4.4.9. Herstellung rekombinanter Influenza A – Viren.....	131
4.4.10. Bestimmung des Hämagglutinations (HA) - Titors von Influenza A.....	132
4.4.11. Infektion mit Sendai Z.....	133
4.5. Molekularbiologische Methoden.....	133
4.5.1. Arbeiten mit Plasmid-DNA.....	133
4.5.2. Arbeiten mit BAC-DNA .....	133
4.5.3. Arbeiten mit RNA .....	134
4.5.4. Southernblot und Hybridisierung .....	134
4.5.5. Northernblot und Hybridisierung.....	135
4.5.6. Herstellung Digoxigenin (DIG)-markierter Sonden .....	135
4.5.7. DIG-Detektion.....	135

## INHALTSVERZEICHNIS

4.5.8. Semi-quantitative RT-PCR .....	136
4.5.9. Quantitative Realtime-PCR.....	137
4.5.10. Luciferase-Reportergenassay .....	137
4.6. Proteinanalytische Methoden .....	137
4.6.1. Herstellung von Gesamtzell-Proteinlysaten .....	137
4.6.2. Herstellung nativer nukleoplasmatischer und cytoplasmatischer Proteinlysate .	138
4.6.3. Diskontinuierliche SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese) .....	138
4.6.4. Native PAGE.....	139
4.6.5. Westernblot .....	139
4.6.6. EMSA ( <i>electro mobility shift assay</i> ).....	140
4.6.7. Metabolische Markierung mit [ <sup>35</sup> S]-Methionin und [ <sup>35</sup> S]-Cystein .....	141
4.6.8. Immunopräzipitation (IP).....	141
LITERATURVERZEICHNIS .....	143
ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	158
DANKSAGUNG.....	160
ANHANG.....	161

## ABKÜRZUNGEN

### ABKÜRZUNGEN

A	Ampere
Abb.	Abbildung
Act D	Actinomycin D
ATCC	<i>american type culture collection</i>
ATF	<i>activating transcription factor</i>
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celcius
CDP-Star	Chemilumineszenzsubstrat der alkalinen Phosphatase: Disodium 4-chloro-3-(methoxy{1,2 dioxetane-3,2'-(-5'-chloro) tricycle-decan}4-yl)phenyl phosphate
CHX	Cycloheximid
CPE	Cytopathischer Effekt infizierter Zellen
d	Tag(e)
DC	dendritische Zelle
DIG	Digoxigenin
DMEM	<i>Dulbeccos Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	2-Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	alle vier 2-Desoxy-Nukleotide (A, T, C, G)
ds	Doppelstrang/doppelsträngig
DTT	1,4- Dithiothreitol
E	<i>early</i>
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid (+Na <sub>2</sub> )
EGTA	Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
EMSA	<i>electro mobility shift assay</i>
FCS	Fötale Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
GAF	<i>gamma activated factor</i>
GAS	<i>gamma activated sequence</i>
gp	Glykoprotein
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HCMV	humanes Cytomegalovirus
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid
hpi	<i>hours post infection</i> , Stunden nach Infektion
IE	<i>immediatly early</i>
IFN	Interferon
IFNAR	IFN $\alpha$ -Rezeptorkette
IFNGR	IFN $\gamma$ -Rezeptorkette
I $\kappa$ B	Inhibitor von NF- $\kappa$ B
IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
IRF	<i>interferon regulatory factor</i>
ISGF3	<i>interferon stimulated gene factor 3</i>

## ABKÜRZUNGEN

ISRE	<i>interferon stimulated response element</i>
Jak	Janus-Kinase
k	Kilo (1000)
kDA	Kilo-Dalton
l	Liter
L	<i>late</i>
LPS	Lipopolysaccharid
m	Milli (1/1000)
μ	Mikro (1/10 <sup>6</sup> )
MCMV	Maus-Cytomegalovirus
MEF	<i>mouse embryonic fibroblast</i>
MEM	<i>Minimal Essential Medium</i>
MEN	Puffer mit MOPS, EDTA und Natriumacetat
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute
mock	“so tun, als ob”: uninferiert, aber gleich behandelt
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)propanesulfonic-Acid
mRNA	<i>messengerRNA</i>
NCS	Serum neugeborener Kälber
NF-κB	Nukleärer Faktor κB
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NP-40	Nonidet P-40 Detergenz
ORF	<i>open reading frame</i>
[ <sup>32</sup> P]	Radioaktives Phosphor mit der Kernzahl 32
PAA	Phosphonoessigsäure
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
pfu	<i>plaque forming units</i>
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
PMSF	Phenylmethan-Sulfonylflouride
poly(d)IC	(desoxy) Polyinosinic-Polycytidylic-Acid
pp	Phosphoprotein
PRD	<i>positive regulatory domain</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
[ <sup>35</sup> S]	Radioaktives Schwefel mit der Kernzahl 35
SDS	Sodium(Natrium)dodecylsulfate
sec	Sekunde
ss	Einzelstrang/einzelsträngig
SSC	Puffer mit Sodium(Natrium)-Chlorid und -Citrat
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TAE	Puffer: Tris, Acetat und EDTA in Wasser
TBE	Puffer: Tris, Borat und EDTA in Wasser



## ABKÜRZUNGEN

TNF	Tumor-Necrosis-Faktor
TBST	<i>tris buffered saline</i> + Tween-20
TEMED	N,N,N',N',Tetramethylethyldiamin
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)ammoniummethan
Tyk	Tyrosin-Kinase
ÜN	über Nacht
UTP	Uridin-Trisphosphat
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	<i>volume per volume</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

### ZUSAMMENFASSUNG

Die Untersuchungen bezüglich der Interaktionen zwischen MCMV und der IFN $\alpha/\beta$ -Induktion zeigten, dass in infizierten Zellen nach der Erkennung viraler Komponenten die IFN $\alpha/\beta$ -induzierenden Signalwege aktiviert werden, um die IFN-Produktion zu initiieren. Durch MCMV-kodierte Evasionsmechanismen wird die Expression der IFN $\alpha/\beta$ -Gene schnell und effizient abgeschaltet, so dass nur während einer transienten Phase die Synthese von Typ I – Interferonen stattfindet. Da die IFN-Produktion auf der Ebene der Transkription maßgeblich reguliert wird, antagonisiert MCMV die Aktivierung der involvierten Transkriptionsfaktoren IRF3, NF- $\kappa$ B und ATF-2/c-Jun. Die Inhibition beruht auf der Wirkung neu synthetisierter viraler Genprodukte, da die Infektion mit UV-inaktivierten Virionen nicht zu dem beobachteten inhibitorischen Effekt führt. Koinfektionsexperimente mit Sendai-Virus zeigten, dass dieser Evasionsmechanismus auf einer aktiven Inhibition durch MCMV basiert. Mit Hilfe der MCMV-Mutante  $\Delta$ M27, die nicht mehr in der Lage ist, die Jak/STAT-Kaskade zu inhibieren, wurde gezeigt, dass die initiale Phase der IFN $\beta$ -Induktion und die anschließende Inhibition unabhängig sind von der positiven Rückkopplungsschleife. Zusammengenommen lässt sich schlussfolgern, dass die MCMV-vermittelte Abschaltung der Expression von Typ I-Interferonen in Fibroblasten auf mehreren Inhibitionsmechanismen basiert, die alle bekannten Signalwege ausschalten, die an der Bildung des IFN $\beta$ -Enhanceosoms beteiligt sind.

Durch die systematische Analyse von Deletionsmutanten wurde die erste MCMV-Mutante mit defekter IFN $\beta$ -Inhibition identifiziert.  $\Delta$ M43-MCMV wies einen selektiven Defekt der IFN $\beta$ -Inhibition bei intakter IFN $\alpha$ -Inhibition auf. Um Einblicke in den Mechanismus dieser Inhibition zu erhalten, wurde die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren des IFN $\beta$ -Enhanceosoms analysiert.  $\Delta$ M43-MCMV war nicht beeinträchtigt in der Hemmung der IRF3- oder ATF-2/c-Jun Aktivierung. Die Infektion mit der Mutante führte jedoch zu einer verringerten I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteinmenge und einem veränderten Profil von NF- $\kappa$ B p65 unter Bedingungen inhibierter Proteinsynthese. Diese Befunde weisen auf eine Rolle von *M43* in der Feinregulation der NF- $\kappa$ B Signalwege hin. Darüber hinaus wurde durch die Generation einer *M43*-HA exprimierenden Mutante nachgewiesen, dass zwei verschiedene *M43*-Proteine exprimiert werden. Unter Verwendung dieser Mutante konnte die Interaktion von pM43 mit dem NF- $\kappa$ B Inhibitor I $\kappa$ B $\alpha$  gezeigt werden. Dies unterstützt die Schlussfolgerung, dass *M43* an der NF- $\kappa$ B-Feinregulation partizipiert.

## SUMMARY

### SUMMARY

To investigate the interaction between mouse cytomegalovirus (MCMV) and the type I interferon (IFN) system IFN $\beta$  and IFN $\alpha$ 4 gene transcription and activation of related transcription factors in MCMV-infected fibroblasts was monitored. mRNA analysis demonstrated sustained MCMV inhibition of IFN gene expression after an initial phase of induction. The induction of IFN transcription was due to the activation of the components of the IFN $\beta$  enhanceosome, i.e. IRF3, NF- $\kappa$ B and ATF-2/c-Jun. These transcription factors became activated upon MCMV infection in a sequential order, but their activation lasted only transient. As a consequence, IFN $\alpha$ / $\beta$  gene expression became undetectable 6 hours post infection. The underlying mechanism is based on an active inhibition by MCMV since IFN restimulation by further external stimuli (e.g. Sendai virus infection) was also abolished. This inhibition required viral gene expression and was not observed in cells infected with UV-inactivated MCMV virions. By using an MCMV mutant lacking the gene encoding for the Jak/STAT-inhibitor *M27* it was shown that the initial phase of IFN $\beta$  induction and the subsequent inhibition is independent from the positive feedback loop. These findings indicate that MCMV-mediated downregulation of type I IFN transcription in fibroblasts relies on a large arsenal of inhibitory mechanisms targeting each pathway contributing to the multiprotein enhanceosome complex.

Systematic mutational analysis of the MCMV genome and phenotypic screening of virus mutants led to the identification of the first MCMV mutant defective in inhibition of IFN $\beta$  transcription.  $\Delta$ M43-MCMV was selectively impaired in downregulating IFN $\beta$  gene expression whereas inhibition of IFN $\alpha$ 4 was not affected. To gain insight into the underlying mechanism the activation of the transcription factors forming the IFN $\beta$  enhanceosome was analyzed.  $\Delta$ M43-MCMV was not impaired in disrupting IRF3 or ATF-2/c-Jun activation, but exhibited a decreased I $\kappa$ B $\alpha$  level and an altered pattern of NF- $\kappa$ B p65 under conditions of inhibited protein synthesis, pointing to a role of *M43* in the finetuning of NF- $\kappa$ B mediated signal transduction. Furthermore, the generation of an MCMV mutant expression M43-HA revealed that two different *M43* gene products are expressed. Using this mutant the interaction of pM43 with the NF- $\kappa$ B inhibitory protein I $\kappa$ B $\alpha$  was detected, supporting the conclusion that *M43* participates in NF- $\kappa$ B fineregulation.