Die antiapoptotische Funktion des m41 Lokus des murinen Cytomegalievirus

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 Maren Çam, geborene Syta aus Bremerhaven

> > Januar 2009

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

Disputation am 04.05.2009

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Eidesstattliche Erklärung	4
Zusammenfassung	5
Summary	6
1. Einleitung	7
1.1 Herpesviren	7
1.2 Cytomegalieviren 1.2.1 Klinische Relevanz	8
1.3 Immunsystem 1.3.1 Adaptive Immunantwort	10 10
1.3.2 Angeborene Immunantwort	11 12
1.3.2.1.1 Rezeptor-vermittelte Apoptose 1.3.2.1.2 Mitochondrien-vermittelte Apoptose	14 16
1.4 Virale Apoptoseinhibition 1.4.1 Inhibition der Rezeptorvermittelten Apoptose durch vICA und vIRS 1.4.2 Inhibition der mitochondrialen Apoptose durch vMia	18 21 22
1.5 Zielsetzung	24
2. Material und Methoden	25
2.1 Materialien 2.1.1 Bakterien 2.1.2 Zellen 2.1.3 Viren 2.1.4 Primer 2.1.5 Plasmide	25 25 26 27 27 28
2.1.6 Antibiotika 2.1.7 Enzyme 2.1.8 Kits 2.1.9 Größenstandards 2.1.10 Primärantikörper	29 30 30 30 30 30 30 30
2.1.11 Sekundärantikörper	31 31 31 34 35
2.2 Methoden	35
2.2.1.1 DNA-Extraktion aus Bakterien (Miniprep) 2.2.1.2 DNA-Extraktion aus Bakterien (Midi-/Maxiprep) 2.2.1.3 Aufreinigung von DNA-Fragmenten 2.2.1.3.1 Nucleospin Extract II 2.2.1.3.2 Qiaquick	35 35 36 36 36 36 36 36
2.2.1.4 Besummung der DNA-Konzentration 2.2.1.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) 2.2.1.5.1 PCR zur Amplifizierung von DNA 2.2.1.5.2 PCR zur Sequenzierung 2.2.1.5.3 PCR zum Einfügen von Punktmutationen (Quikchange PCR) 2.2.1.6 Restriktionsverdau	37 37 37 38 38 39 39
2.2.1.7 Ligation 2.2.1.8 Elektroporation von DNA in elektrokompetente E. coli	39 39 39

2.2.1.9 Kompetente Bakterien	40
2.2.1.9.1 Elektrokompetente DH10B/BL21 Rosetta	40
2.2.1.9.2 Rekombinationskompetente DH10B mit pcp20	40
2.2.1.9.3 Rekombinations- und elektrokompetente DH10B mit pKD46	40
2.2.1.9.4 Rekombinatios- und elektrokompetente DY380	41
2 2 1 10 Herstellung von CMV-Mutanten	41
2.2.7.10 Herstending von ein v Nutanien	42
2.2.2 Zonkultur 2.2.2.1 Zellkultivierung	4 2
2.2.2.1 Zenkultvierung	4 2
	42
2.2.2.3 Auftauen von Zeilen $\frac{1}{1000}$	42
2.2.2.4 Transfection mittels PolyFect/SuperFect	42
2.2.2.5 Virusanzucht	43
2.2.2.5.1 Anzucht aus BAC	43
2.2.2.5.2 Anzucht aus Virus	43
2.2.2.6 Virustitration	44
2.2.2.7 Bestimmung der Replikationsfähigkeit von Viren mittels Wachstumskurven	44
2.2.2.8 Transfektion mittels Calciumphospat	45
2.2.2.9 Herstellung von Retroviren	45
2.2.2.10 Herstellung von stabilen Zelllinien	45
2.2.3 Proteinchemische Methoden	46
2.2.3.1 Proteinexpression in BL21 Rosetta	46
2.2.3.2 Extraktion und Aufreinigung von Proteinen aus Prokaryoten	
2.2.3.3 SDS-Page	46
2.2.3.4 Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen	47
2.2.3.5 Western Blot	47
2.2.4 Immunologische Methoden	47
2.2.4.1 Immunisierung von Mäusen	47
2.2.4.2 ELISA	
2.2.4.3 Herstellung von Hybridomen	48
2.2.4.4 Aufreinigung von Antikörnern aus Hybridomüberstand	48
2.2.4.5 Immunfluoreszenz	40
2.2.1.5 Ininiamatroseesenz	40
2.2.5 Apoptoscussuys	40
2.2.5.1 WITT Product	40
2.2.5.2 Cytochioni e Preiserungstest	50
2.2.5.5 Dak Ongomensierungs Assay	50
3. Ergebnisse	51
2.1 Untermedian and my Delement data with Dertains	51
3.1 Untersuchungen zur Relevanz des m41 Proteins	51
3.1.1 Konstruktion von Virusmutanten	51
3.1.2 Überprüfung der Funktionalität der m41 Virusmutanten	53
3.1.2.1 Wachstumskurven	53
3.1.2.2 Vitalitätstests	54
3.1.3 Herstellung eines monoklonalen anti-m41 Antikörpers	55
3.1.3.1 Herstellung des Antigens	55
3.1.3.2 Überprüfung von Hybridomen auf Sekretion von m41 spezifischen Antikörpern	56
3.1.4 Herstellung von m41 stabil exprimierenden Zellen	57
2.2 Untergrahum zen zun Delegenz des m.41.1 Dreteins	50
3.2 Untersuchungen zur Kelevanz des m41.1 Proteins	39
3.2.1 Konstruktion von Virusmutanten	59
3.2.2 Uberprutung der viralen m41.1 Expression	61
3.2.3 Überprüfung der m41.1 Lokalisation	62
3.2.4 Uberprüfung der Funktionalität der m41.1 Virusmutanten	63
3.2.4.1 Wachstumskurven	63
3.2.4.2 Vitalitätstests	64
3.2.5 Aufklärung des Wirkmechanismus von m41.1	66
3.2.5.1 Cytochrom c Freisetzungstest	66
3.2.5.2 Differenzierung zwischen Bax und Bak vermittelter Apoptose	67
3.2.5.3 Aufklärung des Mechanismus der m41.1 vermittelten Bak-Inhibition	69
3.2.5.4 Evolutionäre Konservierung des m41.1 Proteins	73
3.2.5.5 Koexpression von spezifischen Bax- und Bak-Inhibitoren zur Inhibition der Mitocho	ndrien-
vermittelten Apoptose	77

4.1 Organisation des m41 Lokus	
4.2 Bedeutung des m41 Proteins in der MCMV-Infektion	
4.3 Mögliche Funktion des m41 Proteins	
4.3.1 Mögliche Relevanz des m41 Proteins in Dissemination und Persistenz/Latenz	
4.3.2 Mögliche Relevanz des m41 Proteins auf Cytokine/TLRs	
4.4 Podoutung dog m41.1 Protoing in der MCMV Infoltion	
4.4 Bedeutung des m41.1 Proteins in der WUWIV-Intektion	
4.5 Antiapoptotische Funktion des m41.1 Proteins	
4.6 Konformationelle Aktivierung von Bak im Rahmen der MCMV-Infektion	
4.7 Inhibition von Bax und Bak durch zwei unterschiedliche MCMV Proteine	
4.8 Schlussfolgerung	
5. Literaturverzeichnis	
Danksagung	
Ahkürzungsverzeichnis	

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Maren Çam, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst und nur die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Diese Arbeit wurde bislang noch nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht oder veröffentlicht.

Berlin, den

Maren Çam

Zusammenfassung

Cytomegalieviren sind aufgrund ihres intrazellulären Replikationszyklus darauf angewiesen, die Apoptose infizierter Zellen zu unterdrücken, bis neue Viren produziert werden. Die Apoptose spielt eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunabwehr und wird über vielfältige Stimuli induziert. Mitochondrien sind für die Apoptose von großer Bedeutung, da hier die Signale mehrerer Apoptosewege zusammenführen. Hierbei entscheidet das Verhältnis von antiapoptotischen (Bcl-2, Bcl-x_L) zu proapoptotischen (z.B. Bak, Bax) Proteinen der Bcl-2 Familie über das Leben der Zelle. Um Mitochondrien-vermittelte Apoptose zu inhibieren exprimieren viele Viren Bcl-2-Homologe, die sowohl Bak- als auch Bax-mediierte Apoptose blockieren. Cytomegalieviren der Mäuse und Ratten exprimieren kein Bcl-2 Homolog, verfügen jedoch über einen Bax-spezifischen Inhibitor (vMIA).

Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass die Deletion der m41 Genregion aus dem MCMV-Genom zu Apoptose-Induktion in infizierten Zellen führt. Ziel dieser Studie war es herauszufinden, auf welche Art das verantwortliche Protein die Apoptose inhibiert, und ob es dazu weitere virale Proteine benötigt. Die Ergebnisse der Arbeit zeigten, dass der m41 Lokus zwei unterschiedliche Proteine kodiert. Das größere m41 Protein besitzt ein Molekulargewicht von etwa 20 kDa und ist im Golgi lokalisiert. Innerhalb des m41 Gens liegt in einem anderen Leserahmen das Gen für das m41.1 Protein. Dieses ist etwa 10 kDa groß und weist eine mitochondriale Lokalisierung auf. Durch Konstruktion von Virusmutanten, die nur eines der beiden Gene exprimieren, konnte gezeigt werden, dass m41 bei den hier untersuchten Bedingungen nur eine untergeordnete Rolle spielt. Lediglich in infizierten Makrophagen war ein Phänotyp zu beobachten Von größerer Relevanz erwies sich das mitochondrial lokalisierte m41.1 Protein. Es konnte nachgewiesen werden, dass m41.1 die Oligomerizierung des durch die Infektion aktivierten Bak verhindert und dadurch die Auslösung der Apoptose inhibiert. Die anti-apoptotische Funktion von m41.1 ist richtet sich spezifisch gegen Bak, ein Einfluss auf die Bax-vermittelte Apoptose war nicht nachzuweisen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass für die Funktion von m41.1 kein weiteres virales Protein benötigt wird, und dass dieser Apoptoseinhibitor in den Cytomegalieviren der Mäuse und Ratten konserviert ist.

Cytomegaloviren inhibieren Apoptose an der mitochondrialen Schaltstelle auf unkonventionelle Art und Weise. Im Gegensatz zu den meisten Viren exprimieren sie kein Bcl-2-Homolog, sondern inhibieren Bax und Bak mit zwei unterschiedlichen Proteinen (vMIA und m41.1). Dieser bemerkenswerte Mechanismus der Apoptose-Inhibition wurde bislang bei keinem anderen Pathogen beschrieben.

Summary

Due to their intracellular replication, cytomegaloviruses need to inhibit the induction of apoptosis in infected cells until progeny viruses are produced. Apoptosis is an important part of the innate immune system and can be induced by multiple stimuli. Since various pathways converge at mitochondria, these organelles are of major importance for apoptosis. The balance of antiapoptotic (Bcl-2, Bcl- x_L) and proapoptotic (Bak, Bax) Bcl-2 family proteins decides between death and survival of the cell. Many viruses express Bcl-2 homologues to inhibit mitochondria-mediated apoptosis via Bax and Bak. However, murine and rat cytomegaloviruses do not express such proteins. Instead they code for a Bax-specific inhibitor of apoptosis, which has been named vMIA

Previous studies identified an antiapoptotoc function of the m41 gene region because the deletion of this gene lead to apoptosis of infected cells. The aim of this work was to identify the mechanism of apoptosis inhibition used by the responsible proteins and to find out whether additional viral proteins are needed for this function. This study shows that the m41 locus codes for two separate proteins. The larger m41 protein has a molecular weight of approximately 20 kDa and localises to the Golgi. The smaller 10 kDa m41.1 protein is encoded within the m41 gene using a different reading frame and localises to mitochondria.By constructing virus mutants expressing only one of the two proteins it could be shown that m41 is of minor importance in the settings used. The only phenotype observed by a virus missing the m41 protein was a reduced viability of infected macrophages. Instead the mitochondrial localised m41.1 is of major importance. It could be demonstrated that m41.1 inhibits the oligomerisation of activated Bak thereby inhibiting the onset of apoptosis. Furthermore, the antiappoptotic function of m41.1 is Bak-dependent because an influence on Bax-mediated apoptosis is missing. Additionally, the function of m41.1 is independent of other viral proteins and homologous apoptosis inhibitors are conserved in murine and rat cytomegaloviruses.

Cytomegaloviruses inhibit apoptosis at the mitochondrial checkpoint in an unconventional manner. In contrast to most viruses they do not express a Bcl-2 homologue but inhibit Bax and Bak independently with two separate proteins (vMIA and m41.1) This striking mechanism has not been described for another pathogen so far.

1. Einleitung

1.1 Herpesviren

Vergleichende Analysen der Säugetier-Herpesviren konnten zeigen, dass Herpesviren sich vor etwa 80 Millionen Jahren in ihre spezifischen Vertreter aufteilten (McGeoch, Cook et al. 1995). Nicht nur in Säugetieren, sondern auch in Reptilien Vögeln und Fischen gibt es zahlreiche Vertreter dieser Virusfamilie (McGeoch, Rixon et al. 2006).

Durch klassische Kriterien, wie etwa Pathogenität, Tropismus und Replikationseigenschaften lassen sich die Herpesviren in drei Unterfamilien aufteilen, die Alpha-, Beta- und Gammaherpesviren. Verallgemeinert nimmt die Wirtsspezifität von den Alpha- über die Betazu den Gammaherpesviren zu (Weir 1998). Zudem besitzen die Alpha- verglichen mit den Betaherpesviren einen sehr schnellen Replikationszyklus. In Tabelle 1 sind die drei Unterfamilien mit ihren Genera und Krankheiten (beispielhaft) zusammengefasst.

Subfamilie	Genus	Assoziierte Krankheit (beispielhaft)
Alphaherpesvirinae	Simplexvirus	Herpes labialis
	Varicellovirus	Windpocken
	Mardivirus	Marek'sche Krankheit
	Iltovirus	Aviäre infektiöse Laryngotracheitis
Betaherpesvirinae	Cytomegalovirus	Cytomegalie bei Mensch und Primaten
	Muromegalovirus	Cytomegalie bei Maus und Ratte
	Roseolovirus	Drei-Tage-Fieber
Gammaherpesvirinae	Lymphocryptovirus	Infektiöse Mononukleose
	Rhadinovirus	Kaposi-Sarkom
	Percavirus	Respiratorische Erkrankung beim Pferd
	Macavirus	Bösartiges Katarrhalfieber beim Rind

Tabelle 1: Übersicht über die Genera in der Familie der Herpesviren (verändert nach (McGeoch, Rixon et al. 2006))

Allen Herpesviren gemein ist ihr doppelsträngiges DNA-Genom, welches ohne ein RNA-Intermediat repliziert wird. Die Virionen sind pleomorph und haben einen Durchmesser von etwa 200 nm. Das Genom befindet sich in einem ikosaedrischen Kapsid, welches von einer Matrix und einer Membran umgeben ist (siehe Abb.1).



Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Herpesviren (www.expasy.ch/viralzone/all_by_species/185.html). Das doppelsträngige DNA-Genom der Herpesviren ist von dem ikosaedrischen Kapsid umgeben. Beides liegt von dem Tegument umgeben in der pleomorphen Hülle, die mit Glykoproteinen gespickt ist.

Die Membran der Herpesviren ist gespickt mit Glykoproteinen, die unter anderem für die Bindung an den zellulären Rezeptor und die Fusion mit der Zellmembran verantwortlich sind.

Die das Kapsid umgebende Matrix, auch Tegument genannt, beinhaltet sowohl zelluläre als auch virale Proteine. Nach der Fusion des Virus mit der Wirtszelle werden diese Proteine in das Cytoplasma entlassen. Dort bewirken sie einen Transport des Nucleokapsids zum Zellkern und im Zellkern angekommen die Expression der Immediate-early Gene.

Das Herpesvirus-Kapsid hat einen Durchmesser von etwa 100 nm und besteht aus fünf konservierten Proteinen: pUL19, pUL18, pUL38, pUL35 und pUL6 (Mettenleiter, Klupp et al. 2006). Von diesem Kapsid umgeben liegt im Inneren des Virion die virale DNA, die je nach Vertreter bis zu etwa 230 kbp lang sein kann.

1.2 Cytomegalieviren

Cytomegalieviren sind typische Vertreter der Betaherpesviren und mit einer Durchseuchungsrate von 70-100% ubiquitär in der Bevölkerung vorhanden (Soderberg-Naucler 2006). Cytomegalieviren weisen einen sehr langsamen Replikationszyklus auf. So benötigt das humane Cytomegalievirus (HCMV) etwa 48 bis 72 Stunden und das murine Cytomegalievirus (MCMV) etwa 18 bis 24 Stunden von der Infektion bis zum Entstehen neuer infektiöser Nachkommen-Viren. Ein weiteres Merkmal bei diesen Viren ist die strikte Speziesspezifität. Durch diese Spezifität ist es nicht möglich, eine produktive Infektion von HCMV in Versuchstieren auszulösen. Da sich viele Zusammenhänge, wie etwa eine Immunantwort des Wirtes, oder die Dissemination des Virus nur in vivo untersuchen lassen, wird MCMV als Modell für das humane Virus verwendet.

Infektionen mit HCMV werden sexuell und über Bluttransfusionen, aber auch durch Organtransplantationen, von der Mutter auf das ungeborene Kind und über die Muttermilch vermittelt (Britt 2008).

Wie alle Herpesviren führt auch die Infektion mit dem Cytomegalievirus (CMV) zu einer lebenslangen Latenz/Persistenz, da das Immunsystem nicht in der Lage ist, den Organismus vollständig von den Viren zu befreien. Es folgt also nach der Primärinfektion ein Stadium, indem sich Immunantwort und Virusinfektion in einer Balance befinden und es zu keiner Symptomatik kommt. Von Bedeutung ist die CMV-Infektion jedoch in immunsupprimierten oder immuninkompetenten Individuen.

1.2.1 Klinische Relevanz

Eine klinische Relevanz besitzt CMV in Individuen, deren Immunsystem noch nicht vollkommen ausgereift ist, wie es zum Beispiel bei dem ungeborenen Kind der Fall ist, und in Fällen, in denen das Immunsystem supprimiert ist, wie etwa bei AIDS-Patienten und Transplantatempfängern.

Bei Transplantatempfängern kann es aufgrund der CMV-Infektion/Reaktivierung vor allem zu Hepatitiden und auch zur Lungenentzündung kommen. In Folge von chronischen Infektionen kann es sogar zu Abstoßungsreaktionen des Transplantates von dem Empfänger kommen (Britt 2008). AIDS-Patienten leiden dagegen meist unter CMV bedingten gastrointestinalen Erkrankungen, Retinitiden und Enzephalitiden.

Eine besondere Bedeutung kommt der primären HCMV-Infektion der Schwangeren zu. HCMV ist in der Lage, Zellen der Plazenta, die Cytotrophoblasten, zu infizieren und kann somit das ungeborene Kind im Mutterleib infizieren (Pereira and Maidji 2008). Die Infektion des ungeborenen Kindes führt in etwa 10 % der Fälle zu Erkrankungen, wie etwa einer Hepatitis. 5-15 % aller Kinder, bei denen es zu einer chronische Infektion kommt, leiden unter Hörverlust (Britt 2008). So zeigte eine Studie, in der nachträglich das Blut der Neugeborenen auf HCMV hin untersucht wurde, dass 34 % jener Patienten, die im frühesten Kindesalter gehörlos wurden, bei der Geburt seropositiv waren (Barbi, Binda et al. 2003).

Die Übertragung von der Mutter auf das ungeborene Kind ist ein Merkmal in dem sich HCMV von MCMV unterscheidet, da das murine Virus nicht in der Lage ist, das Ungeborene zu infizieren. Ein anderer Vertreter der Muromegaloviren der ALL-03 Stamm des RCMV ist dazu in der Lage und kann somit bei Untersuchungen bezüglich der in utero Infektion als Tiermodell herangezogen werden (Loh, Mohd-Lila et al. 2006).

1.3 Immunsystem

Wie bei jedem Pathogen, so ist auch bei Viren das Immunsystem für die Erkennung und die Bekämpfung des Erregers verantwortlich. Das Immunsystem setzt sich aus zwei Teilen zusammen: das angeborene Immunsystem und das adaptive Immunsystem. Die Aufgabe des Immunsystems ist nicht nur Pathogene aus dem Organismus zu eliminieren, sondern auch entartete Zellen zu erkennen und damit die Entstehung von Geschwüren zu verhindern. Wichtig ist hierbei jedoch die Fähigkeit eigene, gesunde Zellen von infizierten, oder entarteten Zellen unterscheiden zu können. Eine Störung in der Toleranz gegenüber gesunden Zellen kann zur Elimination dieser und damit zu Autoimmunerkrankungen, wie etwa Diabetes Typ I führen (Zipris 2008).

1.3.1 Adaptive Immunantwort

Die adaptive Immunantwort ist ein Teil des Immunsystems, der nur bei Gnathostomen, also Wirbeltieren mit Kiefer, zu finden ist (Du Pasquier 2004). Drei verschiedene Molekülklassen spielen hier eine große Rolle: "Major Histocompatibility Complex" (MHC), T-Zell Rezeptoren (TCR) und B-Zell Rezeptoren (BCR) oder Immunglobuline (Ig) (Klein 2004).

Die Präsentation von Antigenen ist der erste Schritt in der spezifischen Erkennung von Erregern und wird durch MHC-I und -II vermittelt. MHC-I ist im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert. Dort wird es mit Peptiden von proteasomal abgebauten Proteinen beladen und wandert anschließend über den Golgi zu der Cytoplasmamembran. MHC-II wird ausschließlich von professionell antigenpräsentierenden Zellen, wie etwa Dendritischen Zellen und Makrophagen exprimiert. Es ist in Endolysosomalen Kompartimenten lokalisiert und wird mit Peptiden aus Lysosomen und Autophagosomen beladen (Vyas, Van der Veen et al. 2008). Zusammengefasst repräsentieren Peptide, welche auf MHC-I geladen werden, die intrazellulär vorkommenden Proteine. MHC-II werden dagegen hauptsächlich mit Peptiden beladen, welche das extrazelluläre Millieu repräsentieren und durch z.B. Phagozytose in die Zelle aufgenommen wurden.

Die vom MHC präsentierten Antigene werden von T-Zellen über den T-Zell Rezeptor erkannt. T-Zellen gehen aus Vorläuferzellen hervor, die sich im Knochenmark befinden. Während der Differenzierung im Thymus werden solche Zellen eliminiert, die Antigene von gesunden Zellen erkennen, um eine mögliche Autoreaktivität zu verhindern. Im Thymus wird auch die unterschiedliche Entwicklung zu entweder CD4⁺ T-Helferzellen, oder CD8⁺ cytotoxischen T-Zellen induziert (Brenner, Krammer et al. 2008).

Auch B-Zellen erkennen mit ihrem B-Zell Rezeptor (BCR) Antigene. Im Unterschied zum TCR, welcher MHC gebundene Antigene erkennt, erkennt der BCR lösliche Antigene. Auch in der Differenzierung der B-Zellen werden solche eliminiert, die gesunde Zellen erkennen. Im Unterschied zu den T-Zellen geschieht die Differenzierung aber im Knochenmark. Reife B-Zellen reagieren auf Stimulation des BCR mit Differenzierung in entweder Plasmazellen, welche Immunglobuline (Ig) bilden und sezernieren, oder in Gedächstniszellen (LeBien and Tedder 2008).

Im Zusammenspiel dieser Moleküle können Pathogene spezifisch erkannt und nach Möglichkeit aus dem Körper eliminiert werden. Dadurch entwickelt sich nach einer Primärinfektion ein Immunologisches Gedächtnis, welches es dem Organismus erleichtert, einen bereits bekannten Erreger bei einer Folgeinfektion schneller zu bekämpfen.

1.3.2 Angeborene Immunantwort

Der evolutionär betrachtet ältere Teil des Immunsystems besteht aus dem angeborenen Immunsystem. So findet man selbst in einigen Pflanzen Merkmale des angeborenen Immunsystems, wie etwa die Fähigkeit zur Phagocytose, oder die Expression von Proteinen, welche TIR (Toll and interleukin-1 receptor) Domänen besitzen (Du Pasquier 2004).

Die hauptsächlichen Effektorzellen des angeborenen Immunsystems sind Makrophagen, Dendritische Zellen, natürliche Killerzellen (NK) und NK-T Zellen (Iannello, Debbeche et al. 2006).

Diese Effektorzellen können so genannte PAMPs ("pathogen-associated molecular patterns") erkennen, welches Muster sind, die ausschließlich von Pathogenen erzeugt werden (Medzhitov and Janeway 1997), wie z.B. doppelsträngige RNA von Viren, oder Flagellin von Bakterien.

Ein PAMP, welches auch von Cytomegalieviren generiert wird, ist die doppelsträngige RNA (dsRNA). Zwar besitzt CMV ein doppelsträngiges DNA-Genom, doch durch überlappende Kodierung von Genen auf den gegenüberliegenden DNA-Strängen, kommt es auch hier im Laufe der Infektion zur Bildung von dsRNA. Die Erkennung der dsRNA geschieht über Toll-like Rezeptor 3 (TLR3), Retinsäure induziertes Gen–I (RIG-I), Melanoma-differentiation-associated gene 5 (MDA5), Proteinkinase R (PKR) und Oligoadenylatsynthetase (OAS).

Der endolysosomal lokalisierte TLR3 besitzt eine TIR-Domäne, über welche die Interaktion mit TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β) vermittelt wird. TRIF wiederum führt bei Aktivierung zu einer RIP (receptor interacting protein)-abhängigen Aktivierung von NF κ B. Neben NF κ B kommt es zu einer Aktivierung von IRF-3 und zu einer Produktion von Interferon (Kawai and Akira 2006).

RIG-I und MDA5 sind cytoplasmatische Helikasen, welche nach Stimulation ebenfalls zu Produktion von Interferon führen (Seth, Sun et al. 2006). Interessanter Weise scheinen diese Helikasen verschiedene Viren unterschiedlich gut erkennen zu können. So konnte gezeigt werden, dass MDA5 Picornaviren und RIG-I unter anderem das Influenzavirus gut erkennen können (Kato, Takeuchi et al. 2006).

Die Aktivierung von PKR und OAS durch dsRNA führt nicht wie bei den vorher genannten Sensoren zur Produktion von Interferon, welches benachbarte Zellen in einen antiviralen Status bringt. Die Aktivierung dieser Sensoren wirkt sich direkt auf die infizierte Zelle aus und führt zum Arrest der Proteinsynthese durch PKR bzw. zu einem allgemeinen RNA-Abbau induziert durch OAS (Hovanessian 2007).

Die Aktivierung der angeborenen Immunantwort bewirkt keine Reaktion gegen einen spezifischen Erreger, sondern vielmehr gegen bestimmte Erregergruppen. Zusätzlich kann das angeborene Immunsystem durch Ausschüttung von Cytokinen mit den Effektoren des adaptiven Immunsystems interagieren.

1.3.2.1 Apoptose

Ein Teil des angeborenen Immunsystems wird durch die Apoptose repräsentiert. Das bemerkenswerte an der Apoptose ist, dass sie nicht nur für die Immunantwort wichtig ist, sondern auch eine große Rolle bei der Oogenese, Embryogenese und Cancerogenese spielt.

Apoptose wurde zuerst bei der Entwicklung von Nematoden (*Caenorhabditis elegans*) untersucht. Hierbei beobachtete man, dass für die normale Entwicklung des adulten Wurmes der Tod von invarianten Zellen wichtig war. Zudem viel auf, dass dieser Prozess im höchsten Maße reguliert war, weshalb man diesen Vorgang als programmierten Zelltod von der unkontrollierten Nekrose abgrenzte (Elmore 2007).

Heute ist bekannt, dass diese Prozesse energieabhängig sind und auf das Vorhandensein von so genannten Caspasen angewiesen sind.

Caspasen sind <u>Cystein und Aspartat sp</u>ezifische Proteasen und gehören zu der Familie der Interleukin 1 β konvertierenden Enzyme (Fan, Han et al. 2005). In der Zelle liegen sie als enzymatisch inaktive Procaspase vor und werden durch Spaltung aktiviert. Durch die Spaltung der Procaspase bilden sich Heterodimere, die sich aus einer kleinen und einer großen Untereinheit zusammensetzen. Jeweils zwei Heterodimere sind notwendig um das enzymatisch aktive Heterotetramer zu bilden (Launay, Hermine et al. 2005). Basierend auf Aminosäuresequenzhomologien können drei Klassen von Caspasen unterschieden werden: Initiator-, Entzündungs- und Effektorcaspasen (Fan, Han et al. 2005). Eine Zusammenstellung der Caspasen ist in Tabelle 2 zu sehen.

Tabelle 2: Übersicht über Caspasen, ihre Aktivierbarkeit und Substratspezifität (Verändert nach (Graf, Bode et al. 2007), (Festjens, Cornelis et al. 2006), (Nadiri, Wolinski et al. 2006), (Fan, Han et al. 2005) und (Denecker, Ovaere et al. 2008))

Klasse	Name	Aktivierbar durch	optimale Erken-
			nungssequenz
Gruppe I (Entzün-	Caspase 1	NALP-1 Inflammosom,	WEHD
dungscaspasen)		NALP-3 Inflammosom	
		NAIP-5 Inflammosom	
		IPAF Inflammosom	
	Caspase 4	ER-Stress	(W/L)EHD
	Caspase 5	NALP-1 Inflammosom	(W/L)EHD
	Caspase 12	ER-Stress	unbekannt
	Caspase 14	Verhornung von Epithel	WEHD
Gruppe II (Effektor-	Caspase 3	Caspases 1, 3, 8, 9, 10	DEVD
caspasen)		CPP32 activating protease	
		Granzym B	
	Caspase 6	Caspases 3, 7	VEHD
	Caspase 7	Caspases 3, 6, 9 Granzym B	DEVD
Gruppe III (Initiator-	Caspase 2	PIDDosom	DEHD
caspasen)	Caspase 8	DISC	LETD
	Caspase 9	Apoptosom	LEHD
	Caspase 10	DISC, Granzym B	LEXD

Mit Ausnahme von Caspase 14 besitzen Entzündungs- und Effektor-Procaspasen lange Prodomänen, durch die die Interaktion mit z.B. Rezeptorkomplexen vermittelt wird (Fan, Han et al. 2005). Je nach Stimulus werden unterschiedliche Initiator-Caspasen aktiviert, um Apoptose auszulösen, wobei es grundsätzlich nur drei verschiedene Wege gibt, die ein Stimulus auslösen kann (siehe Abb. 2).

Der extrinsische Apoptoseweg, auch Rezeptor-vermittelte Apoptose genannt, wird durch die Bindung eines spezifischen Liganden an einen Todesrezeptor ausgelöst. Die Perforin induzierte Apoptose wird durch Cytotoxische (CD8⁺) T-Zellen ausgelöst. Diese sezernieren Perforin, welches in der Membran Poren bildet. Durch diese Poren werden von den T-Zellen abgegebenes Granzym A und B in die Zelle geschleust und Apoptose ausgelöst (Elmore 2007).

Sowohl die Rezeptor-, als auch die Perforin-vermittelte Apoptose können in bestimmten Zellen zum Verstärken des Signals die intrinsische (Mitochondrien-vermittelte) Apoptose aktivieren.



Abbildung 2: Schematische Darstellung der verschiedenen Apoptosewege (verändert nach (Elmore 2007)). Der Extrinsische Apoptoseweg wird über die Bindung eines Liganden an seinen spezifischen Todesrezeptor ausgelöst. Programmierte Nekrose wird über RIP und Apoptose über Caspase 8 vermittelt. Perforin mediierte Apoptose wird durch die Sekretion von Perforin und Granzym A/B durch CD8 positive T-Zellen induziert. So-wohl der extrinsisch-, als auch Perforin-mediierte Apoptoseweg kann direkt zur Caspase 3-Aktivierung führen, oder den Umweg über den Intrinsischen Apoptoseweg gehen. Bei dem Intrinsischen Apoptoseweg kommt es durch Stresssignale, die innerhalb der Zelle ihren Ursprung haben, zur Auslösung des Zelltods. Es kommt zur Aktivierung von Bax und/oder Bak, zum Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und zur Aktivierung der Caspasen 9 und 3.

1.3.2.1.1 Rezeptor-vermittelte Apoptose

Effektorzellen der angeborenen Immunabwehr sind in der Lage verschiedenste Moleküle zu sezernieren. So sezernieren aktivierte T-Zellen (Suda, Okazaki et al. 1995) und NK-Zellen (Montel, Bochan et al. 1995) Fas Ligand (FasL), welcher an Fas bindet. Fas gehört zur TNF-Superfamilie, der auch TNF-Rezeptor 1 und die Trail Rezeptoren DR4 und DR5 angehören. Jeder Rezeptor wird durch seinen spezifischen Liganden aktiviert und besitzt eine konservierte cytoplasmatische Todesdomäne (DD). Von den verschiedenen Rezeptorwegen, ist die Apoptoseinduktion durch Bindung des FasL an Fas am besten untersucht und soll daher hier exemplarisch erklärt werden (siehe Abb. 3). Nach Bindung von FasL an Fas kommt es zur Rekrutierung von FADD (Fas associated protein with death domain), Procaspase 8/10 und cFLIP (cellular FLICE Inhibitory Protein) and die Todesdomäne von Fas. Diese Formation von Proteinen wird auch DISC (death inducing signaling complex) genannt (Kischkel, Hellbardt et al. 1995) und führt zur proteolytischen Spaltung und Aktivierung von Caspase 8 (Medema, Scaffidi et al. 1997). Nach Aktivierung von Caspase 8 kommt es je nach Zelltyp und Signalstärke zur unterschiedlichen Signalweiterleitung.



Abbildung 3: Übersicht über die Rezeptor vermittelte Apoptose am Beispiel von Fas/FasL (verändert nach (Park and Peter 2008) Die Bindung von FasL an den Fas-Rezeptor führt zu dessen Trimerisierung. Intrazellulär werden FADD und RIP über die Death Domäne an den Rezeptorkomplex rekrutiert. Die Aktivierung von RIP kann bei unterbundener Apoptose zur Induktion der programmierten Nekrose führen. Über die Death effector Domäne von FADD wird Procaspase8 an den Komplex rekrutiert und aktiviert. Die aktive Caspase 8 führt ent-weder direkt zu Caspase 3-Aktivierung, oder über Spaltung von Bid zu t-Bid und der Induktion der Mitochondrien vermittelten Apoptose zum Zelltod.

In so genannten Typ I Zellen kommt es durch die Stimulation von FasL zur Rekrutierung von Fas in lipid rafts, wonach es in endosomale Kompartimente internalisiert wird. Auch kommt es zu einer so starken Aktivierung von Caspase 8, dass diese direkt Caspase 3 aktivieren und zum Zelltod führen kann (Park and Peter 2008).

In Typ II Zellen kommt es nicht zur Internalisierung des Rezeptorkomplexes und auch nur zu einer geringen Bildung des death inducing signaling complex. Die damit einhergehende nur schwache Aktivierung von Caspase 8 reicht nicht aus, um direkt zur Aktivierung von Caspase 3 zu führen. Vielmehr kommt es in diesen Zellen zur Caspase 8-bedingten Spaltung von Bid (BH3-interacting domain death agonist) zu t-Bid, welches dann seinerseits zur Aktivierung der Mitochondrien-vermittelten Apoptose führt (Scaffidi, Schmitz et al. 1999).

Neben der Apoptose, kann Aktivierung von Fas auch zu einer Caspaseunabhängigen, programmierten Nekrose führen. Dieser besondere Zelltod wird allerdings nur dann induziert, wenn eine Aktivierung von Caspasen unterdrückt wird und geschieht in einer RIP-1 (receptor interacting protein) abhängigen Weise (Meylan and Tschopp 2005).

1.3.2.1.2 Mitochondrien-vermittelte Apoptose

Mitochondrien spielen eine zentrale Rolle in der Apoptose, da hier viele Wege zusammenführen. Wie schon vorher erwähnt, können Rezeptor- und Perforin-vermittelte Apoptose durch die Aktivierung der Mitochondrien-vermittelten Apoptose zum letztendlichen Tod der Zelle führen. Neben diesen Stimuli führt auch ER-Stress, DNA-Schädigung, Nährstoffund Cytokin-Entzug sowie Toxine zur Induktion des intrinsischen Apoptosewegs (Spierings, McStay et al. 2005).

Von zentraler Bedeutung sind hierbei Mitglieder der Bcl-2-Familie. Angehörige dieser Familie können in eine der drei folgenden Klassen eingeteilt werden: antiapoptotische, proapoptotische und "BH3-only" Proteine.

Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) und Bcl- x_L (Bcl-2 X protein large) sind die Prototypen der antiapoptotischen Bcl-2 Familie. Sie besitzen vier so genannte BH-Domänen (Bcl-2 homology domain) und eine C-Terminale Transmembrandomäne.

Die Prototypen der proapoptotischen Bcl-2 Familie sind Bax (Bcl-2–associated X protein) und Bak (Bcl-2 homologous antagonist killer). Auch sie besitzen BH-Domänen, jedoch fehlt ihnen die BH4 Domäne.

BH3-only Proteine besitzen, wie es der Name schon impliziert, lediglich die dritte BH-Domäne. Außer dem gemeinsamen Vorhandensein der BH3-Domäne sind die Mitglieder recht heterogen. So besitzen einige Mitglieder Transmembrandomänen, α -Helices oder eine Ubiquitin-Ligase Domäne, andere Proteine wiederum nicht eines dieser Merkmale (Youle and Strasser 2008).

BH3-only Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der Übertragung der Stress-Signale zu den Mitochondrien. So führt z.B. die Aktivierung der Rezeptorvermittelten Apoptose zur Abspaltung des C-Terminus von Bid. Daraufhin transloziert dieses zu den Mitochondrien und aktiviert die proapoptotischen Proteine Bax und Bak (Youle and Strasser 2008).

Bax und Bak unterscheiden sich in ihrer Lokalisierung in der gesunden Zelle. Während Bak von vornherein membrangebunden in den Mitochondrien, oder dem ER lokalisiert ist, ist Bax normalerweise im Cytosol zu finden. Die Aktivierung von Bax führt zu einer konformationellen Änderung, durch die eine C-Terminale Transmembrandomäne und eine N-Terminale proapoptotische Domäne freigelegt werden (Norris and Youle 2008). Durch diese Konformationsänderung wird Bax an die Mitochondrien rekrutiert, wo esoligomerisiert.

Auch Bak wird durch eine konformationelle Änderung aktiviert, durch die die proapoptotische N-terminale Domäne freigelegt wird. Für die Bildung von Bak/Bak Homo-Oligomeren ist die BH3-Domäne essentiell (Dewson, Kratina et al. 2008). Sowohl Bax, als auch Bak spielen eine Zentrale Rolle in der Induktion der Mitochondrial vermittelten Apoptose (siehe Abb. 4) und Zellen, welche diese Proteine nicht exprimieren sind resistent gegenüber einer Vielzahl von Apoptosestimuli, wie etwa Staurosporin-Behandlung und ER-Stress (Wei, Zong et al. 2001).

Die antiapoptotischen Bcl-2 Mitglieder interagieren mit Bax und Bak bevorzugt in dieser aktivierten Konformation (Ruffolo and Shore 2003), um deren Oligomerisierung zu verhindern. Ist der proapoptotische Stimulus jedoch sehr stark, sind Bcl-2 und Bcl- x_L nicht in der Lage die Oligomerisierung von Bax/Bak zu inhibieren. Dadurch kommt es zur Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran (MOMP) und zur Freisetzung von proapoptotischen Molekülen (Cytochrom c, AIF, HtrA2, Endonuklease G und Smac/DIABLO) in das Cytosol (Spierings, McStay et al. 2005).

Ein solches Molekül ist das Cytochrom c, welches in der gesunden Zelle ein Teil der Atmungskette ist, wo es Elektronen vom Komplex III zum Komplex IV transferiert (Hosler, Ferguson-Miller et al. 2006). In das Cytosol freigesetzt, führt es zu einer Konformationsänderung von APAF-1 (Apoptose Protease-aktivierender Faktor-1), woraufhin dieses oligomerisiert und zusammen mit Cytochrom c das Apoptosom bildet (Cain, Bratton et al. 2002). Im Anschluss wird Procaspase 9 an diesen Komplex rekrutiert und aktiviert, welche dann ihrerseits Procaspase 3 aktivieren und damit den Zelltod auslösen kann (Spierings, McStay et al. 2005).

Neben Cytochrom c kommt es auch zur Freisetzung von AIF (Apoptose-induzierender Faktor) aus den Mitochondrien in das Cytosol nach apoptotischen Stimuli. AIF ist eine NADH-Oxidase und ist damit wie Cytochrom c an der Atmungskette beteiligt (Miramar, Costantini et al. 2001). Sobald AIF aber aus den Mitochondrien ausgeschleust ist, wandert es in den Nukleus, wo es im Komplex mit Cyclophillin A zur Degradation der DNA führt (Cande, Vahsen et al. 2004). Der Abbau der nukleären DNA wird ebenso durch die freigesetzte Endonuklease G mediiert (Li, Luo et al. 2001). Ein weiteres mitochondrial lokalisiertes proapoptotisches Protein ist HtrA2. HtrA2 ist eine Serinprotease und führt nach Freisetzung in das Cytosol zu einer Spaltung von zellulären Apoptose-Inhibitoren (IAPs) (Suzuki, Imai et al. 2001). Da HtrA2 aber auch Proteine des Cytoskellets spaltet, fördert es nicht nur Caspase-abhängige, sondern auch –unabhängige Apoptose (Vande Walle, Van Damme et al. 2007). IAPs werden neben der Spaltung von HtrA2 auch über Sequestrierung durch das murine smac, sowie sein humanes Ortholog (DIABLO) inhibiert (Wu, Chai et al. 2000).



Abbildung 4: Übersicht über die Mitochondrien-vermittelte Apoptose (verändert nach (Spierings, McStay et al. 2005)). Stress-induzierte Aktivierung von BH3-only Proteinen führt zu einer konformationellen Aktivierung von Bax und Bak. Diese können oligomerisieren und Poren in der äußeren mitochondrialen Membran bilden, durch die proapoptotische Faktoren, wie z.B. Cytochrome c in das Cytosol gelangen. Cytochrome c bildet zu-sammen mit ATP und APAF-1 das Apoptosom, welches Caspse 9 aktiviert. Caspase 9 führt ihrerseits zur Aktivierung von Caspase 3 und zum Zelltod.

1.4 Virale Apoptoseinhibition

In den Jahrmillionen der Koevolution von Viren mit ihren Wirten, haben diese die unterschiedlichsten Strategien entwickelt um eine vorzeitige Apoptoseinduktion der Wirtszellen zu verhindern. Dabei kann man die Strategien in fünf Klassen unterteilen: Bcl-2-, IAP- und GAAP-Analoge, vFLIPs, Caspase-Inhibitoren und Apoptoseinhibition über micro RNAs.

Die wohl bekannteste Form der viralen Apoptoseinhibiton ist die Expression von Bel-2 Homologen bzw. Analogen (siehe Tab. 3). Diese Klasse der viralen Apoptoseinhibitoren ist vor allem bei Viren mit doppelsträngigem DNA-Genom vertreten. So kodieren viele Herpesund Pockenviren diese so genannten vBcl-2 (virales Bcl-2)

Tabelle 3: Virale Bcl-2 Homologe/Analoge (verändert nach (Galluzzi, Brenner et al. 2008). ADV: Adenovirus, ASFV: african swine fever virus, EBV: Epstein-Barr Virus, FPV: Fowlpoxvirus, MHV-68: Murine γ -herpesvirus 68, KSHV: Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, HPN: Herpesvirus pan, HPO: Herpesvirus papio, HVS: Herpesvirus saimiri, MXV: Myxomavirus, PPVO: Parapoxvirus ORF Virus, VACV: Vaccinia Virus, PTP: permability transition pore

Virus	Protein	Sequenzhomologie zu Bcl-2	Funktion
ADV	E1B19K	Ja	Inhibition von Bax-, Bak- und
		(Boyd, Malstrom et al. 1994)	p53-mediierter Apoptose
ASFV	A179L	Ja	Inhibition von CHX und Act D-,
	(5HL)	(Yanez, Rodriguez et al. 1995)	sowie Cytosin Arabinosid-
			induzierter Apoptose
EBV	BALF	Ja	Interaktion mit Bax und Bak;
		(Marshall, Yim et al. 1999)	Inhibition von FasL- und Camp-
			tothecin-induzierter Apoptose.
	BHRF1	Ja	Inhibition von $TNF-\alpha$ -, und
		(Henderson, Huen et al. 1993)	FasL-induzierter Apoptose; Blo-
			ckierung von Bax-Aktivierung.
FPV	FPV039	Ja	Inhibition von TNF-α-induzier-
		(Banadyga, Gerig et al. 2007)	ter und Bak-mediierter Apoptose
MHV-68	M11	Ja	Inhibition von TNF- α -, und
		(Wang, Garvey et al. 1999)	FasL-induzierter, sowie Bax-
			mediierter Apoptose
KSHV	KsBcl-2	Ja	Inhibition von Sindbisvirus-
		(Cheng, Nicholas et al. 1997)	induzierter Apoptose
HPN	hpnBHRF1	Ja	Inhibiton von UV- und Cispla-
		(Howell, Williams et al. 2005)	tin-induzierter Apoptose
HPO	hpoBHRF1	Ja	Inhibition von Cisplatin-indu-
		(Meseda, Arrand et al. 2000)	zierter Apoptose
HCMV	UL37x1	Nein	Inhibition von Bax-mediierter
		(Goldmacher, Bartle et al.	Apoptose, Interaktion mit Mit-
		1999)	gliedern der GADD45-Familie
HVS	ORF16	Nein	Interaktion mit Bcl-2, Bax und
		(Nava, Cheng et al. 1997)	Bak
MXV	M11L	Nein	Inhibition von Bax- und Bak-
		(Douglas, Corbett et al. 2007)	mediierte Apoptose; Interaktion
			mit Bestandteilen der PTP
PPVO	ORFV125	Ja	Inhibiton von UV-induzierter
		(Westphal, Ledgerwood et al.	Apoptose
		2007)	
VACV	F1L	Nein	Inhibition der Aktivierung und
		(Wasilenko, Stewart et al.	Oligomerisierung von Bax und
		2003)	Bak
	N1L	Nein	Interaktion mit Bid, Bad, Bak
		(Aoyagi, Zhai et al. 2007)	und Bax

Im Gegensatz zu vielen viralen Bcl-2 Homologen besitzt z.B. das Vaccinia Virus F1L Protein keine erkennbare Sequenzhomologie zum zellulären Bcl-2. In Kristallstrukturanalysen ließ sich jedoch eine Bcl-2 ähnliche Faltung des Proteins nachweisen (Kvansakul, Yang et al. 2008). Zusätzlich ergaben Bindungsstudien, dass F1L BH3 Peptide von Bim, Bak und Bax bindet. Wie dass zelluläre Bcl-2, so kann auch F1L die Oligomerisierung von Bax und Bak inhibieren. Zusätzlich ist es aber auch in der Lage bereits ihre konformationelle Aktivierung zu inhibieren (Taylor, Quilty et al. 2006).

Ein weiteres virales Bcl-2 Analog ist das vom Myxomavirus kodierte M11L. Wie das F1L Protein von Vaccinia Virus, so besitzt auch M11L keine Sequenzhomologie zum zellulären Bcl-2 Protein aber eine 3D-Struktur, die diesem Protein sehr ähnelt (Douglas, Corbett et al. 2007). M11L ist zudem in der Lage, die konformationelle Aktivierung von Bax zu inhibieren (Su, Wang et al. 2006). Neben der Bcl-2 analogen Funktion der Inhibition von Bax- und Bak-mediierter Apoptose interagiert M11L auch mit dem Benzodiazepin-Rezeptor, welcher Teil der "permability transition pore" (PTP) in der mitochondrialen Membran ist (Everett, Barry et al. 2002).

Neben diesen Bcl-2-Analogen der Familie der Poxviren gibt es noch viele weitere virale Bcl-2 Anologe/Homologe, die in Tabelle xy aufgeführt sind.

Eine weitere Strategie der viralen Apoptoseinhibition ist die Expression von Homologen des zellulären IAP (Apoptose-Inhibitor). Die Familie der Säugetier-IAPs besteht aus acht Mitgliedern (Chowdhury, Tharakan et al. 2008). Diesen Proteinen ist das Vorhandensein von ein bis drei N-terminalen, so genannten "baculovirus internal repeat" (BIR) Motiven gemein, welche für die antiapoptotische Funktion benötigt werden (Nogal, Gonzalez de Buitrago et al. 2001). Ein solches Protein wird auch vom "african swine fever virus" (ASFV) exprimiert. Das ASFV A224L Protein besitzt ein BIR Motiv im N-Terminus und eine Zink-Finger Sequenz im C-Terminus (Nogal, Gonzalez de Buitrago et al. 2001). Im Gegensatz zu den zellulären IAPs, welche die proteolytische Aktivierung der Procaspasen 3, 6, 7 und 9 inhibieren, konnte bisher nur eine Inhibition der Caspase 3 durch das A224L Protein gezeigt werden (Nogal, Gonzalez de Buitrago et al. 2001).

Die Expression von viralen Homologen der zellulären FLIPs, also vFLIPs, dient ebenfalls der indirekten Inhibition von Caspasen. Anders als bei den IAPs, inhibieren FLIPs nur die Aktivierung von Caspase 8 (FLICE) am DISC (death-inducing signaling complex) (Krueger, Schmitz et al. 2001). In der Zelle existieren zwei Formen von FLIP nebeneinander: zum einen das kürzere FLIP_s, zum anderen das längere FLIP_L. Beide Formen besitzen jeweils zwei DED (death effector domain) Domänen, über die sie Interaktionen von FADD (Fas assziierte Todesdomäne) mit Caspase 8 inhibieren (Guasparri, Keller et al. 2004). Das Wissen um die Existenz dieser Proteinfamilie verdankt man Studien über die Inhibition von Fasmediierter Apoptose durch doppelsträngige DNA-Viren (Thome, Schneider et al. 1997). Eines dieser vFLIP wird von KSHV kodiertes. Das K13 Protein, wird in der Latenz exprimiert und ähnelt eher FLIP_S als FLIP_L (Guasparri, Keller et al. 2004). Zusätzlich zur Caspase-Inhibition, wurde gezeigt, dass K13 den NF-*m*B Weg aktiviert und microvasculäre Endothelzellen vor Ablösung-induzierter Apoptose schützt (Efklidou, Bailey et al. 2008).

Einen direkten Weg der Caspase-Inhibition wurde durch Baculoviren entwickelt. Sie exprimieren das Protein p35, welches als Pan-Caspase-Inhibitor anzusehen ist. Es ist nicht nur in der Lage in seinem natürlichen Wirt, also in Insektenzellen, sondern auch in humanen Zellen, die Caspasen 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 und 10, aber nicht Caspase 9 zu inhibieren (Vier, Furmann et al. 2000).

Neuere Untersuchungen zeigten eine ganz neue Klasse von viralen Apoptoseinhibitoren: die GAAP (Golgi anti-apoptotisches Protein) Homologe. Endogenes GAAP wird von vielen Eukaryoten exprimiert, ist ein hydrophobes Multi-Transmembran-Protein, im Golgi lokalisiert und inhibiert sowohl intrinsisch, als auch extrinsisch induzierte Apoptose (Gubser, Bergamaschi et al. 2007). Die Existenz dieses Proteins wurde bei der Sequenzanalyse des Camelpox Virus 6L Proteins entdeckt. Dieses besitzt eine 73 prozentige Identität mit dem humanen, endogenem Protein (Gubser, Bergamaschi et al. 2007).

Dass Viren die Apoptose nicht nur durch die Expression von Proteinen inhibieren können, zeigt die nicht kodierende β 2.7 RNA von HCMV. β 2.7 RNA ist ein 2,7 kb großes Transkript, welches zu frühen Zeitpunkten der Infektion etwa 20% der totalen viralen Transkripte ausmacht (Reeves, Davies et al. 2007). Es konnte gezeigt werden, dass dieses Transkript nicht translatiert wird und in den Mitochondrien lokalisiert ist, wo es an den Komplex I der Atmungskette assoziiert. β 2.7 ist in der Lage vor Rotenon (Inhibitor des Komplex I) induzierter Apoptose zu schützen, indem es das mitochondriale Membranpotential stabilisiert und eine weitere ATP-Synthese gewährleistet (Reeves, Davies et al. 2007).

1.4.1 Inhibition der Rezeptorvermittelten Apoptose durch vICA und vIRS

Im Gegensatz zu den bisher genannten Strategien, haben Cytomegalieviren einen anderen Weg gefunden um Apoptose zu inhibieren. CMVs exprimieren einen so genannten viralen Inhibitor der Caspase 8 induzierten Apoptose (vICA), welcher durch das HCMV UL36 bzw. dem MCMV Homolog M36 repräsentiert wird. vICA ist in der Lage sowohl Fas als auch TNF- α induzierte Apoptose durch Bindung an die Prodomäne von Caspase 8 zu inhibieren (Skaletskaya, Bartle et al. 2001). Dieses erinnert stark an die Funktion der vFLIPs, jedoch besitzt vICA keine signifikante Sequenzhomologie mit FLIP. Untersuchungen mit M36 zeigten, dass eine Deletion des M36 Gen das Virus sowohl in vitro als auch in vivo stark attenuiert (Cicin-Sain, Ruzsics et al. 2008). Andererseits zeigten andere Studien, dass die Passagierungen von HCMV AD169 zu Mutationen im UL36 Gen führten, und dass die Deletion in HCMV Towne nicht zu einer Beeinträchtigung der viralen Replikation in vitro führt (McCormick 2008).

Die Funktion von vICA befähigt CMVs die Caspase-abhängige Apoptose nach Stimulation eines Todesrezeptors, wie etwa Fas zu inhibieren. In einigen Zellen führt jedoch die Stimulation des extrinsischen Apoptoseweges mit kombinierter Caspase-Inhibition zur Induktion der Caspase-unabhängigen Apoptose, auch programmierte Nekrose genannt. Um dieses zu verhindern kodiert MCMV für einen viralen Inhibitor der RIP-abhängigen Signalkaskade (vIRS), das M45. Das M45 Protein besteht aus einer N-terminalen Domäne, welche ein RHIM (RIP homotypic interaction motif) Motiv beherbergt (Upton, Kaiser et al. 2008). Der C-Terminus besteht aus einem Teil, welcher Sequenzhomologien zur großen Untereinheit der Ribonucleotid Reduktase aufweist, aber keine enzymatische Aktivität besitzt (Lembo, Donalisio et al. 2004). Es wurde gezeigt, dass M45 mit RIP interagiert, dessen Ubiquitinierung und eine Weiterleitung der Signale von TLR 3 und TNF-α über RIP inhibiert, wobei sich der C-Terminus als essentiell und der N-Terminus als überflüssig erwies (Mack, Sickmann et al. 2008). Eine andere Studie, die andere Versuchsansätze benutzte, zeigte, dass bei den von ihnen gewählten Bedingungen der N-Terminus, genauer gesagt das RHIM-Motiv, essentiell war (Upton, Kaiser et al. 2008). Bislang ist diese Funktion von vIRS einzigartig, da weder in anderen CMVs noch anderen Pathogenen ein Funktionshomolog gefunden werden konnte.

1.4.2 Inhibition der mitochondrialen Apoptose durch vMia

<u>V</u>irale <u>m</u>itochondriale <u>I</u>nhibitoren der <u>A</u>poptose (vMIA) werden sowohl von Viren des Genus Cytomegalovirus als auch des Genus Muromegalovirus exprimiert. Hierbei zeigt sich, dass vMIAs im jeweiligen Genus konserviert sind, aber die Sequenzen zwischen den beiden Genera keine Homologie aufweisen.

Der wohl bekannteste vMIA ist das HCMV kodierte UL37x1. UL37x1 besitzt keine Sequenzhomologie zum zellulären Bcl-2, aber eine antiapoptotische Domäne, die Interaktionen mit Proteinen der GADD45-Familie vermittelt. Trotz des Fehlens einer Sequenzhomologie zum Bcl-2 Protein konnten Studien zeigen, dass die Faltung des UL37x1 Proteins der von Bcl-x_L, einem Mitglied der Bcl-2 Familie, ähnelt (Pauleau, Larochette et al. 2007). Einzigartig ist UL37x1 deswegen, weil die Expression zur konformationellen Aktivierung und mitochondrialen Rekrutierung von Bax führt und auch dessen Oligomerisierung nicht gehemmt wird (McCormick, Roback et al. 2008). In initialen Studien wurde eine Interaktion von UL37x1 nur mit Bax nicht aber mit Bak gezeigt (Arnoult, Bartle et al. 2004), was aber in einer späteren Untersuchung in Frage gestellt wurde (Karbowski, Norris et al. 2006). Des Weiteren führt UL37x1 zur Störung des mitochondrialen Netzwerkes (McCormick, Smith et al. 2003). Interessanterweise inhibiert UL37x1 nicht nur intrinsische Apoptose durch Blockierung Bax/Bak-abhängiger Porenbildung in den Mitochondrien, sondern auch einen Caspase unabhängigen Zelltod, welcher über HtrA2 vermittelt wird (McCormick, Roback et al. 2008).

vMIAs der Muromegaloviren besitzen zwar keine Sequenzhomologie zu denen der Cytomegaloviren, sind aber an einer analogen Position im Genom lokalisiert. Das von ihnen bisher am besten untersuchte Protein ist das MCMV m38.5. Dieses Protein ist ein spezifischer Bax-Inhibitor. Mehrere Arbeitsgruppen kamen unabhängig zu diesem Schluss (Arnoult, Skaletskaya et al. 2008; Jurak, Schumacher et al. 2008; Norris and Youle 2008). Sie unterstützten ihre These, indem sie zeigten, dass m38.5 mit Bax, aber nicht mit Bak kopräzipitiert, und dass Apoptose-Inhibition und Störung des mitochondrialen Netzwerkes nur in Abwesenheit von Bak geschieht. Ineressanter Weise führt die Deletion des m38.5 ORF nur zu einer schwachen Attenuierung des Virus in vivo (Manzur, Fleming et al. 2008). Da aber auch gezeigt werden konnte, dass MCMV infizierte Zellen vor Bak-vermittelter Apoptose geschützt sind, ist zu erwarten, dass MCMV für einen weiteren, Bak-spezifischen Inhibitor kodiert.

1.5 Zielsetzung

In früheren Studien wurde durch zufällige Transposon-Insertionen MCMV-Mutanten erzeugt, die auf ihre Fähigkeit in Fibroblasten und Endothelzellen zu replizieren untersucht wurden. Dabei wurde eine Mutante entdeckt, die eine Insertion im m41 Genlokus beherbergt.

Die Deletion des m41 ORF führte zu einem attenuierten Phänotyp in Endothelzellen und löste vorzeitigen Zelltod sowohl in ihnen, als auch in Fibroblasten aus (Brune, Nevels et al. 2003). Dieser Zelltod konnte durch Behandlung mit einem Pan-Caspase-Inhibitor gehemmt werden, welches auf apoptotische Vorgänge hinweist.

Der m41 Genlokus hat das Potential für ein Protein mit 138 Aminosäuren und einem vorhergesagten Molekulargewicht von 15 kDa zu kodieren. Dieses Protein besitzt keine Homologie mit einem bekannten zellulären, oder viralen Protein. Allerdings kodieren sowohl RCMV Maastricht, als auch England für ein m41 Homolog. Humane und Primaten Cytomegaloviren besitzen kein offensichtliches Sequenzhomolog.

Lokalisationsstudien zeigten, dass m41 sowohl in transfizierten, als auch in infizierten Zellen mit einem Markerprotein für den Golgi kolokalisiert. Dieses erinnert an die vorher erwähnten GAAP-Homologe von Camelpox und Vaccinia Virus, jedoch besitzt m41 keine Sequenzhomologie zu dieser Proteinklasse.

In dieser Studie sollte nun untersucht werden, auf welche Weise die Deletion des m41 Genlokus im MCMV-Genom zu einem Caspase-abhängigen Zelltod im Rahmen der Infektion führt. Des Weiteren sollte überprüft werden, ob das m41 als Volllängen-Genprodukt des m41 Leserahmen für die Apoptoseinhibition verantwortlich ist, und ob weitere virale Proteine für diese Funktion benötigt werden. Zusätzlich sollte ermittelt werden, durch welchen Mechanismus der verantwortliche Apoptoseinhibitor die vom Virus induzierte Apoptose zu inhibieren vermag.

Neue Erkenntnisse über die molekularen Virus/Wirt Interaktionen ermöglichen es uns die zellulären Vorgänge nicht nur im Rahmen einer Infektion besser zu verstehen. Auch kann die Kenntnis über die Mechanismen der Apoptoseinhibition als Ansatz zur Entwicklung neuer medikamentöser Therapien dienen.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Bakterien

E. coli Stamm	Beschreibung	Hersteller/ Referenz
DH10B	F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15	Invitrogen
	∆lacX74 recA1 endA1 araD139	
	Δ (ara, leu)7697 galU galK λ - rpsL nupG	
DY380	DH10B [λcl857 (cro-bioA<>tet)]	(Lee, Yu et al. 2001)
BL21-Rosetta	<i>E. coli</i> B F ⁻ ompT hsdS _B mit DE3, ein λ Prophage	Novagen
	der das T7 RNA-Polymerasegen trägt und lacIQ,	
	zusätzlich das Plasmid pRARE2 tragend	

2.1.2 Zellen

Zelllinie	Beschreibung	Hersteller/Referenz
10.1	p53 defekte, spontan immortalisierte murine	(Harvey and Levine
	embryonale Fibroblasten	1991)
293A	Adenovirus transformierte humane embryonale	Invitrogen: R705-07
	Nierenzellen; exprimieren Adenovirus E1 Prote-	
	ine	
Hela	Humane Gebärmutterhalszellen aus einem Ade-	ATCC Nr. CCL-2
	nokarzinom	
HFF	Humane Vorhaut-Fibroblasten	ATCC Nr. Number:
		SCRC-1041
IC-21	SV-40 transformierte murine peritoneale	ATCC Nr. TIB-186
	Makrophagen	
J774A.1	Makrophagen isoliert aus einem murinem reti-	ATCC Nr. TIB-67
	kulären Zellsarkom; synthetisieren kontinuier-	
	lich Interleukin-1beta	
M2-10B4	murine Knochenmark-Stroma-Zellen	ATCC Nr. CRL-1972
MEF Bax +/-,	SV-40 transformierte murine embryonale	(Willis, Chen et al.
Bak +/-	Fibroblasten.	2005)
MEF Bax -/-,	SV-40 transformierte murine embryonale	(Willis, Chen et al.
Bak +/-	Fibroblasten, die Bax-negativ sind.	2005)
MEF Bax +/-,	SV-40 transformierte murine embryonale	(Willis, Chen et al.
Bak -/-	Fibroblasten, die Bak-negativ sind.	2005)
MEF Bax -/-,	SV-40 transformierte murine embryonale	(Willis, Chen et al.
Bak -/-	Fibroblasten, die negativ für Bax und Bak sind.	2005)
MRC-5	Humane Lungenfibroblasten	ATCC Nr. CCL-171
NIH 3T3	spontan immortalisierte murine embryonale	ATCC Nr. CRL-1658
	Fibroblasten	
Phoenix	basierend auf 293T Zellen, in die die MMULV	Nolan Labor, Stanford
	gag, pol und env Gene stabil eingebracht wur-	
	den	

RAW264.7	Ab-MLV transformierte murine Makrophagen	ATCC Nr. TIB-71
SP2/0-Ag14	Hybridoma-Zelllinie hervorgegangen aus einer	ECACNr. 85072401
_	Fusion von P3X63Ag8 Myelomzellen mit der	
	Milz einer Balb/c-Maus. Resistent gegen 8-	
	Azaguanine, sensitiv gegen HAT	
SVEC 4-10	SV-40 transformierte murine Endothelzellen	ATCC Nr. CRL-2181

Zellinie	Umsetzverhältnis	Medium	Besonderheit
10.1	1:10	DMEM, 10% FCS, P/S	
293A	1:10	DMEM, 10% FCS, P/S	
Hela	1:10	DMEM, 10% FCS, P/S	
HFF	1:3	DMEM, 10% FCS, P/S	
IC-21	1:6	RPMI, 10% FCS, P/S	ablösen durch abschaben
J774A.1	1:6	DMEM, 10% FCS, P/S	ablösen durch abschaben
M2-10B4	1:6	RPMI, 10% FCS, P/S	
MEF Bax +/-	1:10	DMEM, 10% FCS, P/S	
Bak +/-			
MEF Bax -/-	1:10	DMEM, 10% FCS, P/S	
Bak +/-			
MEF Bax +/-	1:10	DMEM, 10% FCS, P/S	
Bak -/-			
MEF Bax -/-	1:10	DMEM, 10% FCS, P/S	
Bak -/-			
MRC-5	1:3	DMEM, 10% FCS, P/S	
NIH 3T3	1:5	DMEM, 5% NCS, P/S	
Phoenix	1:10	DMEM, 10% FCS, P/S	regelmäßig selektionieren
			mit 200 µg/ml Hygromy-
			cin B und 2 µg/ml Diphte-
			riatoxin
RAW264.7	1:6	DMEM, 10% FCS, P/S	ablösen durch abschaben
SP2/0-Ag14	1:10	RPMI, 10% FCS, P/S	Suspensionszellen
SVEC 4-10	1:10	DMEM, 10% FCS, P/S	

2.1.3 Viren

Virus	Beschreibung	Referenz
Humanes Cytomega-	rekombinantes HCMV Stamm AD 169	(Borst, Hahn et al.
lievirus, Stamm		1999)
AD169		
Murines Cytome-	rekombinantes MCMV mit inserierter BAC-	(Messerle, Crnko-
galievirus; Smith	Kassette an der rechten terminalen Region	vic et al. 1997)
strain (MCMV-wt)		
MCMV-GFP	rekombinantes MCMV mit inseriertem Gen	(Brune, Menard et
	für das Grün fluoreszierende Protein in der	al. 2001)
	BAC-Kassette	

2.1.4 Primer

Name	Sequenz	Bestimmung
Sp6	5'-ATTTAGGTGACACTATAG-3`	Sequenzierung
T7	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'	Sequenzierung
M42dsseq	5'-GAGGTGGCGGAGACGATTAG-3'	Sequenzierung
KanSeq2	5'-AGGGCAACTTATACCGAGTA-3'	Sequenzierung
seq pMalC2	5'-GATGTCCGCTTTCTGGTATG-3'	Sequenzierung
BGH revers	5'-TAGAAGGCACATCGAGG-3'	Sequenzierung
pRetroSeqfwd	5'-CAGTCCTGCTGACCACCC-3'	Sequenzierung
pRetroSeqrev	5'-AAACCTACAGGTGGGGGTCTTTC-3'	Sequenzierung
m41.1ko fwd	5'-GATGGGAGACGACGATCGTCGCGGCGACG	Quickchange
	ACGGCGGCGTATACGGCTCTGGCTCTGC-3'	PCR
m41.1ko rev	5'-GCAGAGCCAGAGCCGTATACGCCGCCGTC	Quickchange
	GTCGCCGCGACGATCGTCGTCTCCCATC-3'	PCR
m41.1HA fwd	5'-AAAGGATCCATGATCGTCGCGGCGATGAC	Klonierung
	G-3'	
m41.1HA rev	5'-AAAGAATTCAAGCGTAGTCTGGGACGTCG	Klonierung
	TATGGGTAACGACGGCGTAGAGCCCC-3'	
HAm41.1fwd	5'-AAAGGATCCATGTACCCATACGACGTCCC	Klonierung
	AGACTACGCTATGATCGTCGCGGCGATGACG-	
	3'	
HAm41.1rev	5'-AAAGAATTCTAACGACGGCGTAGAGCCC-3'	Klonierung
MCMV	5'-CGGCCTCTTTACTATGCCTTACCGTGAGCT	Rekombination
m41.1HA fwd	CGGGGGCTCTACGCCGTCGTTACCCATACGAC	
	GTCCCAG-3'	
MCMV	5'-CGGGCATGATCTCCGACGAAGATGACGCC	Rekombination
m41.1HA rev	TTCCGAGGAAACGTTGTCTCCGGACGACGACG	
	ACAAGTAA-3'	
m39 Oligo-	5'-ATTGGGGGAGGAGGGGGGGGGGGGGGGGGG	Rekombination
linker fwd	CACGATCATCGGATGACTATT-3'	
m39 Oligo-	5'-GGCCAATAGTCATCCGATGATCGTGTCGCC	Rekombination
linker rev	GCCCGACCGCCCTCCTCCCCCAAT-3'	
m41 for ab fwd	5'-ATGGGAGACGATGATCGTCG-3'	Klonierung
m41 for ab rev	5'-GTAAGCTTTCAGTCGGGAGTGATTTTTTA	Klonierung
	CGTAC-3'	
m41 zeo fwd	5'-AATAGTCATCCGATGATCGTGTCGCCGCCC G	Rekombination
	ACCGCCCTCCTCCCCCAATTGTTGACAATT	
	AATCATCGGCAT-3'	
m41 zeo rev	5'-CGCCGT TTCCTCACATTCCGTTGTCGTGCG	Rekombination
	CAGGTTCCTCCGAACCTTTGTCAGTCCTGCTC	
	CICGGCCA-3'	D 1 1 1 1
m41 ko in situ	5'-CGCCGTTTCCTCACATTCCGTTGTCGTGCGC	Rekombination
fwd	AGGITCCTCCGAACCTITGATGATCGTCGCGGC	
	GAIGAC-3'	D 1 1 1
m41 ko in situ	5'-AATAGTCATCCGATGATCGTGTCGCCGCCCG	Rekombination
rev	ACCGCCCTCCTCCCCCAATTGATGGATATCTGC	
	AGAATT-3'	
HAe41.1 fwd	5'-AAAGGATCCACCATGTACCCATACGACGTC	Klonierung
	CCAGACTACGCTATGATTGTCACGTTGATG-3'	

HAe41.1 rev	5'-AAAGAATTCTCAGTGACGTATTCGACG-3'	Klonierung
e41.1HA fwd	5'-AAAGGATCCACCATGATTGTCACGTTGATG-	Klonierung
	3'	
e41.1HA rev	5'-AAAGAATTCAAGCGTAGTCTGGGACGTCGT	Klonierung
	ATGGGTGTGACGTATTCGACGTCC-3'	
UL41a fwd	5'-ACAGGATCCATGACACTCTTTTGCCGCAC-3'	Klonierung
UL41a rev	5'-ATAGAATTCTTAAAAGTCTGTATCCGACTCC	Klonierung
	-3'	
AD169 delta	5'-TACGCTACGACCTGGCCTGTGGTGTGTGTTG	Rekombination
UL41a fwd	TTTTTTGTGCACGCACGACATATGTTGACAATT	
	AATCATCGGCAT-3'	
AD169 delta	5'-CCCGTCATGAAGACGTAGGCAGGGGAATTC	Rekombination
UL41a rev	CCATATTTTTATGGCTTCTTCAGTCCTGCTCCTC	
	GGCCA-3'	

2.1.5 Plasmide

Name	Beschreibung	Hersteller/Referenz
pcDNA3	5446 bp; high copy; Expressionsvektor für Säu-	Invitrogen
	gerzellen; CMV IE Promotor; Resistenz: Ampi-	
	cillin, Neomycin	
pCGN71	high copy; CMV Promotor, exprimiert HCMV	(Kalejta, Bechtel et
	(Stamm AD169) Protein pp71; Resistenz: Am-	al. 2003)
	picillin, Hygromycin	
pEGFP C1	4731 bp; high copy; Expressionsvektor für	Clontech
	GFP-Fusionsproteine in Säugerzellen; CMV IE	
	Promotor; Resistenz: Kanamycin, Neomycin	
pLNCX2	6133 bp; low copy; retroviraler Vektor; CMV	Clontech
	Immideatly Early Promotor; Resistenz: Am-	
	picillin, Neomycin (G418)	
pMalC2	6646 bp; high copy; Expressionsvektor für Pro-	NEB
	karyoten; Ptac Promotor; Resistenz: Ampicillin	
pMSCVpuro	6295 bp; low copy; retroviraler Vektor; LTR	Clontech
	Promotor; Resistenz: Ampicillin, Puromycin	(* 1 1 *
pReplacer	4617 bp; high copy; Vektor zur Amplifikation	(Jurak and Brune
	von DNA zur Rekombination mit MCMV;	2006)
	PGK Promotor; Resistenz: Ampicillin, Kana-	
	mycin	.
pSL301	3264 bp; high copy; Superlinker Vektor; Resis-	Invitrogen
	tenz: Ampicillin	/*** 11 1 X 1
pRetroEBNA	11264 bp; low copy; retroviraler Vektor; LTR	(Kinsella and Nolan
	Promotor; Resistenz: Ampicillin	1996)
pRetroGFP	12,3 kbp; low copy; retroviraler Vektor; LTR	T. Shenk, Princeton
	Promotor; exprimiert GFP; Resistenz: Ampicil-	University, USA
pBabe-Bak-GFP	6959 bp; low copy; retroviraler Vektor; LTR	(Zong, L1 et al. 2003)
	Promotor; exprimiert murines Bak und GFP	
	unter dem selben Promotor getrennt durch	
	IRES; Resistenz: Ampicillin	
pSL FRT kan	4335 bp; high copy; Vektor zur Amplifikation	(Atalay, Zimmer-

	der FRT-Kan-Kassette; Resistenz: Ampicillin,	mann et al. 2002)
	Kanamycin	
pGA4 Myxoma-	3420 bp; high copy; Vektor zur Amplifikation	Geneart
Virus FlagM11L	des FlagM11L-Gens; Resistenz: Ampicillin	
pZeo	2,8 kb; high copy; Vektor zur Amplifikation des	Wade Bresnahan
	Zeozin-Resistenzgens; Resistenz: Ampicillin,	
	Zeozin	
pCP20	9,4 kb; low copy; Vektor zur hitzeinduzierbaren	(Datsenko and Wan-
	Expression der Flp-Rekombinase in Prokaryo-	ner 2000)
	ten; Resistenz: Ampicillin	
pKD46	6 kb; low copy; Vektor zur Arabinose induzier-	(Datsenko and Wan-
	baren Expression der λ Red Phagen gene:	ner 2000)
	bet, γ und exo	
pcDNA m41HA	5866 bp; Expression von C-terminal getagtem	Wolfram Brune
	m41	
pcDNA HAm41	5871 bp; Expression von N-terminal getagtem	Wolfram Brune
	m41	
pcDNA m42-	7583 bp; Expression von m42, m41 steht unter	Wolfram Brune
41HA	dem nativen Promotor	
pcDNA	5866 bp; Expression von N-terminal getagtem	Wolfram Brune
m41HAmut	m41 mit mutiertem Golgilokalisierungs-Motiv	
pReplacer	5348 bp; Amplifikation von N-terminal getag-	(Jurak and Brune
$HABcl-x_L$	tem Bcl-x _L zur Rekombination mit MCMV	2006)
pRetroHABcl-xL	12209bp; retrovirale Expression von N-terminal	Wolfram Brune
	getagtem Bcl-x _L	

2.1.6 Antibiotika

Name	eingesetzte Konzentration	Hersteller
Ampicillin	<i>E.coli</i> 100 µg/ml	Roth
Chloramphenicol	<i>E.coli</i> 15 µg/ml	Roth
Kanamycin	<i>E.coli</i> 50 µg/ml	Roth
Tetracyclin	<i>E.coli</i> 5 µg/ml	Applichem
Zeocin	<i>E.coli</i> 25 µg/ml	Invitrogen
Diphteriatoxin	Phoenix 2 µg/ml	Sigma
G418	M2-10B4 0,2 mg/ml	PAN
Hygromycin	Phoenix: 200 µg/ml	PAA
Puromycin	MEF: 4 µg/ml	Sigma
Penicillin	Zellkultur: 100 U/ml	PAA
Streptomycin	Zellkultur: 100 µg/ml	PAA
НАТ	Hybridome:	Invitrogen
	Hypoxantin:100 µM	
	Aminopterin: 0,4 µM	
	Thymidin: 16 μM	

2.1.7 Enzyme

Alle hier verwendeten Enzyme waren mit Ausnahme von RNaseA (Roth) von Fermentas bzw. New England Biolabs.

2.1.8 Kits

Name	Verwendung	Hersteller
Nucleobond PC100, PC500	Aufreinigung von Plasmid	Machery-Nagel
	DNA	
Nucleobond BAC 100	Aufreinigung von BAC-DNA	Machery-Nagel
Nucleospin Extract II	Aufreinigung von DNA	Clontech
	<500bp	
Qiaquick	Aufreinigung von DNA	Qiagen
	>500bp	
BigDye® Terminator v3.1	Sequenzierung	Applied Biosystems
Cycle Sequencing Kit		

2.1.9 Größenstandards

Name	Verwendung	lersteller
GeneRuler [™] 1kb	DNA-Leiter von 250 b bis 10 kb in 14 Fragmen-	Fermentas
	ten	
Precision Plus Protein TM	gefärbter Proteinmarker von 10 kD bis 250 kD in	Biorad
Kaleidoscope [™] Standard	10 Banden zur Kontrolle des Gellaufs und Blot-	
	tens	

2.1.10 Primärantikörper

Name	Quelle	Antigen	Anwendung	Hersteller
16B12	Maus	HA	WB: 1:100	Hiss Diagnostics
2E8	Maus	MCMV gB	WB: 1:1000	Lambert Loh, Univ. of
				Saskatchewan, Kanada
3B9	Maus	MCMV M44	WB: 1:2000	Lambert Loh, Univ. of
				Saskatchewan, Kanada
3F10	Ratte	HA	IF: 1:200	Roche
Flag M2	Maus	Flag	WB: 1:2500	Sigma
			IF: 1:500	
Ac74	Maus	β-Actin	WB:1:20000	Sigma
A8	Maus	Cytochrom c	WB:1:200	Santa Cruz
CROMA101	Maus	MCMV IE1	WB:1:2000	Stipan Jonjic,
				Univ. of Rijeka; Croa-
				tia
Croma 103	Maus	MCMV E1	WB: 1:1000	Stipan Jonjic,
				Univ. of Rijeka; Croa-
				tia
TC-102	Maus	Bak N-	IF: 1:20	Calbiochem
		Terminus		

HSP60/cl 24	Maus	HSP60	IF: 1:200	BD Biosciences

2.1.11 Sekundärantikörper

Name	Antigen	Anwendung	Hersteller
Anti mouse HRP	IgG aus Maus	WB:1:1000	Dako
anti rat Alexa Fluor 488	IgG aus der Ratte	IF:1:1000	Invitrogen
anti mouse Alexa Fluor 568	IgG aus Maus	IF:1:500	Invitrogen
(higly cross-adsorbed)			_
anti mouse Alexa Fluor 594	IgG aus Maus	IF:1:1000	Invitrogen

2.1.12 Chemikalien

Standard-Chemikalien für Puffer und Lösungen wurden von Roth, Applichem, Sigma und Calbiochem bezogen. Nur spezielle Chemikalien sollen hier aufgeführt werden.

Name	Hersteller	Katalognummer
MitoTracker	Invitrogen	M7512
LysoTracker	Invitrogen	L7528
1'-6'-Bismaleimidohexan	TCI Europe	B1787
Staurosporin	Sigma	S4400
Actinomycin D	Sigma	A1410
Gelred	Biotium	41002
Sequabrene	Sigma	S-2667
PolyFect	Qiagen	301105
SuperFect	Qiagen	301305
Complete, Mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche	11836153001
Rekonminantes murines TNF-α	Promokine	D-63720
TMB plus	Kem-En-Tec	4390L
purified anti mouse Fas	BD Pharmingen	554254
purified anti human Fas	Beckman Coulter	IM2387

2.1.13 Puffer und Lösungen

SDS-Page/Western Blot

5xPPP	550 mM Tris-HCl pH 6,7
	13 % SDS
	40 % Glycerol
	25 % 2-Mercaptoethanol
	0,1 % Bromphenolblau
	bei -20 °C lagern
Tricine Gel Puffer	3 M Tris-HCl pH 8,5
	0,3 % SDS
	bei 4 °C lagern
10x Anodenpuffer	2 M Tris-HCl pH 8,9
	bei RT lagern
5x Kathodenpuffer	0.5 M Tris

	0,5 M Tricine
	0,5 % SDS
	bei RT lagern
Transferpuffer (Nitrocellulose)	50 mM Tris
	40 mM Glycin
	0,04 % SDS
	20 % Methanol
	bei RT lagern
Transferpuffer (PVDF)	Anode I: 0,3 M Tris pH 10,4
	20 % Methanol
	Anode II: 25 mM Tris pH 10,4
	20 % Methanol
	Kathode: 25 mM Tris pH 9,4
	40 mM Glycine
	10 %Methanol
Ponceau S-Lösung	0,1 % Ponceau S
	5 % Essigsäure
	bei RT lagern
Waschpuffer	PBS mit Tween 0,1-0,5 %
· ·	bei RT lagern
Blockreagenz	5 % Milchpulver bzw. 10% BSA in PBS

MTT-Test

MTT-Stock	5 mg/ml Thiazolylblau in PBS
	steril filtrieren und bei 4 °C im Dunkeln lagern
	stern muleren und ber 4 °C im Dunkem lagern
0 - 1 - 1 - 1	DMSO/E4h = -1.1 + 1
Solubilisterungstosung	DMSO/Ethanol 1:1
6 6	
	l hei RT lagern

Minipräparation bakterieller Plasmid/BAC DNA

S1	50 mM Tris-HCl pH 8,0
	10 mM EDTA
	bei 4 °C lagern
S2	200 mM NaOH
	1 % SDS
	bei RT lagern
S3	2,8 M Kaliumacetat pH 5,1
	bei 4 °C lagern
RNAse Stocksolution	10 mg/ml RNAse
	10 mM Tris-HCl pH 7,5
	10 mM NaCl
	15 min bei 100°C
	anschließend Aliquots bei -20 °C lagern
TE/RNAse	10 mM Tris-HCl pH 7,5
	1 mM EDTA
	RNAse Stock 1:100 verdünnt
	Aliquots bei -20°C lagern

Immunfluoreszenz

Fixierlösung 3 9	% Paraformaldehyd in PBS

	bei -20 °C lagern
Aldehydblockierlösung	50 mM Ammoniumchlorid
	bei RT lagern
Permeabilisierungslösung	0,3 % Triton X-100 in PBS
	bei RT lagern
Blockreagenz	0,2 % Gelatine in PBS
	bei 4°C lagern

Proteinexpression

IPTG Stock	$0.1 \text{ M IPTG in H}_{2}$
II I G Stock	staril filtrioran Aliquata hai 20 °C lagarn
	stern multeren, Anquois dei -20°C lagern
Säulenpuffer	20 mM Tris-HCl pH 7,5
	200 mM NaCl
	1 mM EDTA pH 8,0
	10 mM β-Mercaptoethanol
	bei 4 °C lagern
Elutionspuffer	20 mM Tris-HCl pH 7,5
	200 mM NaCl
	1 mM EDTA pH 8,0
	10 mM β-Mercaptoethanol
	10 mM Maltose (D ⁺ -Monohydrat)
	frisch ansetzen
Lagerungspuffer	20 mM Tris-HCl pH 7,5
	200 mM NaCl
	1 mM EDTA pH 8,0
	10 mM β-Mercaptoethanol
	0,1 % Natriumazid
	bei 4 °C lagern

Coomassie Färbung und Geltrocknung

Coomassie-Stain	0,25 % Coomassie Brilliant Blau R250
	45 % Methanol
	10 % Essigsäure
	bei RT lagern
Coomassie-Destain	45 % Methanol
	10 % Essigsäure
	bei RT lagern
Trocknungslösung	20 % Ethanol
	10 % Glycerin
	bei RT lagern

<u>Gelelektrophorese</u>

50x TAE	2 M Tris Base
	5,7 % Essigsäure
	50 mM EDTA
	bei RT lagern
10x TBE	890 mM Tris Base
	890 mM Borsäure
	2 mM EDTA

	bei RT lagern
6x Orange Loading Dye	0,2 % Orange G
	60 mM EDTA
	60 % Glycerin
	Aliquots bei -20 °C lagern

<u>ELISA</u>

Beschichtungspuffer	50 mM Natriumhydrogencarbonat pH 9,0
	bei RT lagern
Blockierungsreagenz	5 % BSA in PBS
	Aliquots bei -20 °C lagern
Waschpuffer	PBS mit Tween 0,1 %
_	bei RT lagern

Transfektionsreagenzien

2xHBS pH7,05	50 mM Hepes pH 7,05
	10 mM KCl
	12 mM Dextrose (D+Glukose)
	280 mM NaCl
	$1,5 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$
	pH mit 1M NaOH einstellen
	steril filtrierte Aliquots bei -20 °C lagern
	2 M CaCl2
	steril filtrierte Aliquots bei -20 °C lagern

BAK-Oligomerisierung

HIM	200 mM Mannitol
111111	
(Ruffolo and Shore 2003)	70 mM Saccharose
	10 mM Hepes-KOH pH 7,5
	1 mM EGTA
	bei -20 °C lagern

Cytochrom c Freisetzungstest

Isotoner Lysepuffer	10 mM KCl
(Cheng, Sheiko et al. 2003)	5 mM MgCl ₂
	1 mM EDTA
	1 mM EGTA
	250 mM Sucrose
	20 mM Hepes pH 7,2
	vor Gebrauch Proteaseinhibitor zugeben
	steril filtrieren und bei RT lagern

2.1.14 Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
Nitrocellulosemembran (Hybond ECL)	GE Healtcare
PVDF Membran 0,2µm Porengröße	Millipore
Röntgenfilme	X-Ray Retina
-----------------------	--------------
Whatmanpapier 3mm Chr	Roth
Zellkulturplastik	Sarstedt/TPP
Zellkulturschaber	TPP

2.1.15 Geräte

Gerät	Hersteller
GeneAmp® PCR System 2400	Applied Biosystems
GelDoc XR	Biorad Laboratories
Genepulser XCell	Biorad Laboratories
HE 99X Max submarine unit	GE Healthcare
Inverted Microscope Axiovert 200M	Carl Zeiss
Zeiss Axioplan, Model LSM 510	Carl Zeiss
Mini-PROTEAN 3 Cell	Biorad Laboratories
Multiplate Absorbance Reader Spectrafluor Plus	Tecan
Nanodrop	Peqlab
PerfectBlue Gelsystem Mini S	Peqlab
SE 400 Vertical Unit	GE Healthcare
Transblot SD Semi Dry Transfer Cell	Biorad
Thermomixer comfort	Eppendorf
Vortex-Genie 2	Scientific Industries

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 DNA-Extraktion aus Bakterien (Miniprep)

Zur Extraktion kleinerer Mengen Plasmid (bzw. BAC) DNA aus Bakterien wurde am Vortag eine Flüssigkultur (mit entsprechendem Antibiotikum) mit Bakterien einer einzelnen Kolonie angeimpft und über Nacht bei 30 oder 37 °C im Schüttelinkubator inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Bakterien aus 1,5ml (bzw. 4 ml) abzentrifugiert (1 min, 16000 g, RT) und das Pellet in 100 µl (bzw. 200 µl) Puffer S1 resuspendiert. Die Lyse der Bakterien erfolgte für zwei bis fünf Minuten mit 150 µl (bzw. 300 µl) Puffer S2 und wurde anschließend mit 200µl (bzw. 400 µl) eiskaltem Puffer S3 gestoppt. Zum pelletieren der ausgefallenen Proteine wurde das Gemisch 20 min bei 4 °C und 16000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 0,8 Volumen Isopropanol versetzt. Zum pelletieren Der DNA erfolgte eine erneute Zentrifugation für 20 min bei 4 °C und 16000 g. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das DNA-Pellet mit 500 µl 70 prozentigem Ethanol gewaschen. Nach einer Zentrifugation für fünf Minuten bei 4 °C und 16000 g wurde der Ethanol sorgfältig entfernt und das Pellet bei 37 °C getrocknet. Danach

wurde es in 50μ l TE + RNase aufgenommen und für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die DNA anderweitig verwendet wurde.

2.2.1.2 DNA-Extraktion aus Bakterien (Midi-/Maxiprep)

Um größere Mengen Plasmid- oder BAC-DNA aus Bakterien zu isolieren wurde am Vortag eine Flüssigkultur von 100 ml bis 200 ml (je nach Bedarf) mit Bakterien aus Flüssigkultur (Rest von Miniprep) oder Glycerolstock angeimpft. Am nächsten Tag wurden die Bakterien für 15 min bei 5000 g und 4 °C abpelletiert. Des Weiteren wurde die DNA mit den Nucleobond Kits PC100 / PC500 / Bac100 extrahiert und aufgereinigt. Die Lyse erfolgt hierbei nach demselben Prinzip wie bei der Miniprep, wobei hier allerdings die RNase schon im S1 Puffer zu finden ist. Das ausgefallene Protein wird mittels Filter von der DNA-haltigen Lösung getrennt und verworfen. Die Aufreinigung der DNA erfolgte über eine Anionenaustausch-Matrix. Die eluierte DNA wurde mit Isopropanol gefällt und das abzentrifugierte Pellet mit 70 prozentigem Ethanol gewaschen. Nachdem das DNA-Pellet getrocknet war, wurde es in einer adäquaten Menge TE resuspendiert.

2.2.1.3 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

2.2.1.3.1 Nucleospin Extract II

Zur Aufreinigung (Entsalzung oder Gelextraktion) von DNA-Fragmenten größer als 500 Basenpaare wurde das Nucelospin Extract II Kit verwendet. Hierbei wird die DNA in Gegenwart von chaotropen Salzen an eine Silicamatrix gebunden, die sich in einem Spinröhrchen befindet und bei 11000 g zentrifugiert werden kann.

Hierfür wurden Gelstücke (mit der gewünschten DNA) durch Erhitzen auf 50 °C in Gegenwart von Puffer NT aufgelöst. Wenn nur eine Entsalzung von einem DNA-Gemisch gewünscht wurde, wurde die Lösung nicht erhitzt. Anschließend wurde das Gemisch über die Silicamembran gegeben und einmal mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend erfolgte eine Trocknung der Membran um Ethanolreste zu eliminieren. Zur Elution wurden 25-50 µl Elutionspuffer auf die Matrix gegeben und die DNA eluiert.

2.2.1.3.2 Qiaquick

Zur Aufreinigung (Entsalzung oder Gelextraktion) von DNA-Fragmenten kleiner als 500 Basenpaare wurde das Qiaquick Kit verwendet. Hierbei wird die DNA ebenfalls an eine Silicamatrix gebunden, die sich in einem Spinröhrchen befindet und bei 17000 g zentrifugiert werden kann.

Hierzu wurden Gelstücke (mit der gewünschten DNA) durch erhitzen auf 50 °C in Gegenwart von Puffer QG aufgelöst. Wenn nur eine Entsalzung von einem DNA-Gemisch gewünscht wurde, wurde die Lösung nicht erhitzt. Anschließend wurde dem Gemisch Isopropanol beigemengt und die gesamte Lösung über die Silicamembran gegeben. Im Anschluss erfolgte je ein Waschschritt mit Puffer QG und PE. Anschließend erfolgte eine Trocknung der Membran um Ethanolreste zu eliminieren. Zur Elution wurden 25 µl Elutionspuffer auf die Matrix gegeben und die DNA eluiert.

2.2.1.4 Bestimmung der DNA-Konzentration

Zur Bestimmung des DNA-Gehalts einer Lösung wurde ein Nanodrop verwendet. Hierbei wird das Spektrum von 230 nm bis 300 nm von 1,5 μ l DNA-Lösung gemessen. Da die DNA ein Absorptionsmaximum bei etwa 260 nm besitzt, kann man die DNA Konzentration durch den Messwert bei 260 nm errechnen. Hierbei entspricht eine optische Dichte 50 μ g/ml. Proteine besitzen ein Absorptionsmaximum bei 280 nm. Daher konnte die Reinheit der DNA-Lösung durch den Quotienten der sich bei Rechnung OD260 / OD280 ergab überprüft werden.

2.2.1.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

2.2.1.5.1 PCR zur Amplifizierung von DNA

Um eine gewünschte DNA zu amplifizieren, zum Beispiel um ein virales Gen zu klonieren, wurde eine PCR durchgeführt. Die PCR kann generell in drei Schritte unterteilt werden: Denaturierung, Anlagerung, Extension (siehe Abb.5).





Die Temperaturen von Denaturierung und Extension sind feste Größen, wohin dagegen die Temperatur für das Annealing von den Primern abhängt. Um eine optimale Anlagerung (annealing) von Primer zu Template zu gewährleisten, wird eine Temperatur gewählt, die 5 °C unter der theoretisch errechneten Schmelztemperatur (Tm) des Primers liegt. Des Weiteren ist zu beachten, dass die verwendete pfu-Polymerase laut Hersteller eine Extensionsrate von zwei Minuten pro Kilobase besitzt. Da es sich nicht um eine quantitative PCR handelt, lässt man 40 Zyklen von Denaturierung, Annealing und Extension laufen, um im Anschluss eine ausreichende Menge von DNA zur Klonierung zu besitzen.

2.2.1.5.2 PCR zur Sequenzierung

Der Ansatz der PCR zur anschließenden Sequenzierung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Das Pipettiermuster war wie folgt:

Tabene 4. Zusammensetzung eines bequenzier ungs-1 ein Ansatzes	Tabelle 4:	Zusammensetzung	eines Seque	nzierungs-PCR	Ansatzes
--	------------	-----------------	-------------	---------------	----------

	BAC-Ansatz	Plasmid-Ansatz
DNA	500 ng	100 ng
Primer (5 pmol /µl)	1 µl	1 µl
BigDye 3.1	4 µl	1 µl
5x Puffer	3 µl	1,5 µl
H ₂ O	ad 20 µl	ad 10 µl

Das PCR-Profil sah folgendermaßen aus:



Abbildung 6: Übersicht über den Ablauf einer Sequenzierungs-PCR

2.2.1.5.3 PCR zum Einfügen von Punktmutationen (Quikchange PCR)

Um Punktmutationen in plasmidkodierte Gene einzufügen, bedient man sich der Quikchange PCR. Hierbei wird die Mutation in 25 bis 45 Basen langen Primern eingefügt, die an derselben Sequenz auf den gegenüberliegenden Strängen annealen. So wird in jedem Extensionsschritt mit der pfu-Polymerse ein neuer Strang mit der gewünschten Mutation synthetisiert. Um die Template-DNA zu eliminieren, wird anschließend ein DpnI-Verdau durchgeführt. DpnI schneidet ausschließlich DNA, welche Dam-methyliert wurde, kann also demnach nur die Template-DNA, nicht aber das PCR-Produkt schneiden. Im Anschluß wurde die DNA aufgereinigt und in Bakterien elektroporiert. Die gewonnene DNA aus den Einzelklonen wurde anschließend zur Kontrolle sequenziert.

2.2.1.6 Restriktionsverdau

Um DNA zu analysieren oder bestimmte Bereiche auszuschneiden, wurde DNA mit Restriktionsenzymen verdaut. Je nach Applikation wurden 1-10 μ g DNA mit 10-30 Units pro Enzym für zwei bis vier Stunden bei optimaler Temperatur verdaut. Die Banden wurde in 0,6 bis 1,5 prozentigen Gelen aufgetrennt und bei Bedarf ausgeschnitten, wie in 2.2.1.3 beschrieben aufgereinigt und anschließend ligiert oder zur Rekombination in Bakterien elektroporiert.

2.2.1.7 Ligation

Um geschnittene Vektor-DNA mit Insert-DNA zu verbinden, wurde eine T4-DNA-Ligase verwendet. Bei Ligationen mit überhängenden Enden wurde eine Unit Ligase verwendet und der Reaktionsansatz für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Bei Ligationen mit glatten Enden wurden fünf Units Ligase verwendet und der Reaktionsansatz wurde über Nacht bei 16 °C inkubiert.

2.2.1.8 Elektroporation von DNA in elektrokompetente E. coli

Um Bakterien mit DNA zu transformieren, wurden elektrokompetente Bakterien (siehe 2.2.1.9) mit einer adäquaten Menge DNA gemischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (2 mm) gegeben. Danach erfolgte ein elektrischer Impuls (2500 V, 25 μ F, 200 Ω), wonach die Bakterien mit LB gemischt wurden und anschließend bei angemessener Temperatur für ein bis zwei Stunden geschüttelt wurden, bevor diese auf antibiotikahaltige LB-Agarplatten ausgestrichen wurden.

2.2.1.9 Kompetente Bakterien

2.2.1.9.1 Elektrokompetente DH10B/BL21 Rosetta

Eine Übertag-Kultur wurde mit einer Übernacht-Starterkulter 1:100 angeimpft. Die Bakterienkultur wurde solange bei 37 °C geschüttelt, bis eine OD₆₀₀ von etwa 0,6 erreicht wurde. Anschließend wurden die Bakterien abpelletiert und durch mehrfaches waschen mit Wasser entsalzt. Aufgenommen wurde das Pellet im letzten Schritt in 10 prozentigem Glycerin und in Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Aliquots erfolgte bei -80°C.

2.2.1.9.2 Rekombinationskompetente DH10B mit pcp20

Das pcp20 Plasmid kodiert für eine Hitze-induzierbare Flp-Rekombinase. Zusätzlich ist der Replikationsursprung hitzesensible. Um aus einem in DH10B befindlichen BAC eine FRT-Kan-Kassette auszuschneiden, wurden die elektrokompetenten Bakterien mit pcp20 elektroporiert, auf LB-Platten mit entsprechenden Antibiotika ausgestrichen und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden einzelne Kolonien auf LB-Platten ohne Kanamycin umgepickt und diese dann bei 42 °C über Nacht inkubiert. In dieser Zeit wurde die Expression der Flp-Rekombinase induziert, die Kanamycin-Kassette ausgeschnitten und gleichzeitig das pcp20 ausgedünnt, da sich bei dieser Temperatur das Plasmid nicht weiter vermehren konnte. Der Verlust der Kanamycin-Resistenz wurde anschließend durch Restriktionsverdau der BAC-DNA überprüft.

2.2.1.9.3 Rekombinations- und elektrokompetente DH10B mit pKD46

Um DH10B zur allgemeinen Rekombination zu befähigen, wurden in die Zellen das Plasmid pKD46 elektroporiert. pKD46 kodiert Arabinose-induzierbare Gene β , γ und exo des λ -Red Phagen und besitzt ebenfalls wie pcp20 einen hitzesensitiven Replikationsursprung.

Um die Bakterien elektrokompetent zu machen, wurde eine Übertag-Kultur mit einer Übernacht-Starterkulter 1:100 angeimpft. Die Bakterienkultur wurde solange bei 30 °C geschüttelt, bis eine OD_{600} von etwa 0,4 erreicht wurde. Danach wurde Arabinose in einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben (Induktion der Expression der Rekombinationsproteine). Bei dem Erreichen von einer OD_{600} von etwa 0,6 wurden die Bakterien abpelletiert und durch mehrfaches waschen mit Wasser entsalzt. Aufgenommen wurde das Pellet im letzten Schritt in 10 prozentigem Glycerin und in Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Aliquots erfolgte bei -80°C.

2.2.1.9.4 Rekombinatios- und elektrokompetente DY380

DY380 sind modifizierte DH10B und besitzen Hitze-induzierbare λ Red Rekombinationsproteine. Um diese elektro- und rekombinationskompetent zu machen, wurde eine Übertag-Kultur mit einer Übernacht-Starterkulter 1:100 angeimpft. Die Bakterienkultur wurde solange bei 30 °C geschüttelt, bis eine OD₆₀₀ von etwa 0,4 erreicht wurde. Danach wurden die Bakterien 15 min bei 42 °C geschüttelt (Induktion der Expression der Rekombinationsproteine) und anschließend im Eiswasserbad rasch heruntergekühlt. Im Anschluss wurden die Bakterien abpelletiert und durch mehrfaches waschen mit Wasser entsalzt. Aufgenommen wurden das Pellet im letzten Schritt in 10 prozentigem Glycerin und in Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Aliquots erfolgte bei -80°C.

2.2.1.10 Herstellung von CMV-Mutanten

Die DNA der hier erzeugten Virusmutanten wurde im BAC durch homologe Rekombination mutiert. Bei der homologen Rekombination werden zum Einbringen einer Ziel-DNA homologe Bereiche von etwa 50 Basenpaaren benötigt, die diese flankieren. Kommt die Zielregion des BACs mit dem Rekombinationsfragment in räumliche Nähe, so katalysieren die Rekombinationsproteine den Austausch den beiden DNAs (schematisch s.u.)

Um die mutierten BACs von den Wildtyp BACs zu unterscheiden, wurde immer eine Antibiotikaresistenz eingeführt, die es ermöglichte nur rekombinierte BACs wachsen zu lassen. Zur weiten Kontrolle wurden jeweils mehrere Klone im Restriktionsmuster untersucht und immer mindestens zwei Klone als Viren rekonstituiert um sicherzustellen, dass es sich bei einem beobachteten Phänotyp nicht um eine zufällige zusätzliche Mutation handelte.



Abbildung 7: Übersicht über die Abläufe bei der BAC-Rekombination

2.2.2 Zellkultur

2.2.2.1 Zellkultivierung

Alle Zellen wurden mit Ausnahme von Suspensionszellen in Zellkulturschalen gehalten. Sobald die Zellen konfluent waren, wurden sie abtrypsiniert bzw. abgeschabt und mit entsprechendem Medium aufgefüllt und gesplittet (siehe 2.1.2). Bei Bedarf wurden die Zellen vorher in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

2.2.2.2 Einfrieren von Zellen

Zellen wurden in 15 cm-Schalen kultiviert. Nach dem Erreichen einer etwa 90 prozentigen Konfluenz werden die Zellen abtrypsiniert bzw. abgeschabt und in ein mit Medium gefülltes Falcon-Röhrchen überführt. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und das Pellet in 4 ml einer Lösung aus 10 % DMSO in FCS resuspendiert und in vier Cryotubes zu je 1 ml aliquotiert. Die Aliquots wurden über Nacht bei -80 °C und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.2.3 Auftauen von Zellen

Zum Auftauen von Zellen, wurden diese aus dem flüssigen Stickstoff geholt, je eine Minute bei Raumtemperatur und bei 37 °C inkubiert und anschließend mit Medium in ein 50 ml Falcontube überführt. Danach wurden die Zellen bei 300 g fünf Minuten abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in neuem Medium resuspendiert und anschließend in eine 15 cm Schale überführt. Nach dem Anheften der Zellen, wurde deren Medium erneut gewechselt.

2.2.2.4 Transfektion mittels PolyFect/SuperFect

Zur Transfektion von 10.1 Zellen wurde PolyFect bzw. SuperFect verwendet. Die Struktur des PolyFects und SuperFects ist dendrimerisch. Es umgibt DNA und besitzt im Komplex eine positive Nettoladung, wodurch es an negativ geladene Rezeptoren binden kann. Zudem schützt es die DNA durch Neutralisierung des pH in den Lysosomen.

Für Transfektionen mit PolyFect wurde das Protokoll für NIH3T3 Zellen verwendet, wobei für ein 6 well 1,5 μ g DNA in einem Volumen von 100 μ l mit 10 μ l PolyFect gemischt werden. Nach der Formation der Komplexe wurde Medium mit Zusätzen zugegeben und das Gemisch auf die Zellen gegeben.

Für Transfektionen mit SuperFect wurden für ein 48 well 0,7 µg DNA in einem Volumen von 50 µl mit 4,5 µl SuperFect gemischt. Nach Bildung der Komplexe wurde Medium mit Zusätzen zugegeben und das Gemisch auf die Zellen gegeben. Nach einer 8 stündigen Inkubation mit den Komplexen, wurde dieses gegen frisches Medium ausgetauscht.

2.2.2.5 Virusanzucht

2.2.2.5.1 Anzucht aus BAC

Zum Anzüchten von MCMV aus BAC, wurde eine frische BAC-Präparation in 10.1 Zellen transfiziert (siehe 2.2.2.4). Im Anschluss wurden die Zellen immer wieder nach Bedarf expandiert. Nach der letzten Expansion wurde gewartet, bis alle Zellen einen CPE aufwiesen. Einen Tag später wurde der Überstand abgenommen, gepoolt, darin schwimmende Zellen (trümmer) abzentrifuigert (20 min, 5000 g, 4 °C) und anschließend in einen neuen Zentrifugenbecher überführt. Daraufhin wurde das Virus pelletiert (3 h, 25000 g, 4 °C) und der Überstand vollständig dekantiert. Das Pellet wurde mit 5 ml frischem Medium bedeckt und über Nacht auf Eis inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium durch auf- und abpipettieren homogenisiert und etwaiger Zellschrott abpelletiert. Danach wurde die Virussuspension je nach Bedarf auf 100 bis 250 µl aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Zum Anzüchten von HCMV aus BAC wurden MRC-5 Zellen aus drei konfluenten 15 cm Schale abgelöst und bei 200 g 10 Minuten abpelletiert. Das Zellpellet wurde in 265 μ l aus einem Ansatz von Komplettmedium mit 5 μ g BAC-DNA und 1 μ g pCGN71 resuspendiert. Anschließend erfolgte die Elektroporation (220-240 V, 950 μ F; Zeitkonstante nach Implus: 30-40 ms). Nach einer Inkubation von fünf Minuten bei Raumtemperatur wurden die Zellen in eine 15 cm Schale gegeben. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt und bei bedarf neue MRC-5 Zellen dazu gegeben. Bei Bedarf wurden die Zellen später expandiert. Das Virus wurde wie oben beschrieben geerntet.

2.2.2.5.2 Anzucht aus Virus

Zur Herstellung von Virusstocks aus MCMV, wurden $3*10^7$ 10.1 Zellen mit einer MOI von 0,025 infiziert und auf 13 15 cm Schalen aufgeteilt. Einen Tag nachdem alle Zellen einen CPE aufwiesen, wurde das Virus wie unter 2.2.2.5.1 beschrieben geerntet.

Zur Herstellung von Virusstocks aus HCMV, wurden 25 % konfluente MRC-5 Zellen in 15 cm Schalen mit jeweils 1*10⁵ Viren infiziert. 24 Stunden nachdem alle Zellen einen CPE aufwiesen, wurde das Virus wie unter 2.2.2.5.1 beschrieben geerntet.

2.2.2.6 Virustitration

Zur Bestimmung des Gehalts von infektiösen Viren in einer Lösung, wurde diese titriert. Dazu wurden am Vortag $1*10^4$ 10.1 Zellen in 96 well Platten ausgelegt. Am folgenden Tag wurde die Lösung logarithmisch verdünnt und von dieser Verdünnung jeweils 100 µl auf die Platten gegeben. Dabei wurden mit jeder Virusverdünnung auf jeweils zwei Platten 12 wells infiziert. Eine der Platten wurde ohne weitere Behandlung in den Brutschrank gegeben und die zweite Platte wurde vorher für 30 min bei 1000 g zentrifugiert, welches die Infektiösität von MCMV verbessert (Osborn and Walker 1968). Die Auswertung der Titration erfolgte bei GFP-exprimierenden MCMV nach fünf bei den anderen Viren (MCMV und HCMV) nach 10 Tagen. Am Tag der Auswertung wurden die wells gezählt, in denen sich Virus ausbreiten konnte und folgende Formel zur Ermittlung der TCID₅₀ nach Spearman-Kärber angewandt.

x =letzte Verdünnungsreihe, bei der alle wells positiv sind (1 = 1:10, 2 = 1:100 usw.) y =Summe alle positiven wells von Reihe x an, bis zur höchsten Verdünnung in der noch positive wells sind

2.2.2.7 Bestimmung der Replikationsfähigkeit von Viren mittels Wachstumskurven

Um die Replikationsfähigkeit der verschiedenen Viren auf unterschiedlichen Zellen zu ermitteln, wurden Wachstumskurven durchgeführt. Hierbei werden die Zellen mit einer niedrigen MOI infiziert, sodass man mehrere Replikationszyklen verfolgen werden können.

Dabei wurden die Zellen gleichzeitig mit dem Aussäen in 6 well Platten infiziert. 1*10⁵ 10.1 Fibroblasten wurden mit einer MOI von 0,05 infiziert. Bei den schwer infizierbaren Makrophagenzelllinien RAW264.7 und IC-21 wurden je 2*10⁵ Zellen mit einer MOI von 0,5 infiziert. Alle zwei Tage wurde das gesamte Medium abgenommen in zwei Proben aufgeteilt, diese bei -80 °C eingefroren und durch neues Medium ersetzt. Da Makrophagen viele Cytokine sezernieren können, wurde bei ihnen an jedem anderen Tag das Medium ebenfalls abgenommen, verworfen und durch neues Medium ersetzt.

Die Titerbestimmung erfolgte wie unter 2.2.2.6 beschrieben, wobei mit der unverdünnten Probe begonnen wurde. Zusätzlich wurde zur genauen Bestimmung der eingesetzten Virusmenge diese erneut titriert.

2.2.2.8 Transfektion mittels Calciumphospat

Die Methode der Calciumphosphat Transfektion von 293-Zellen und deren Derivaten ist eine der ältesten aber auch kostengünstigsten und eine gut funktionierende Methode. Hierbei bindet sich DNA an ausfallendes Calciumphosphat und wird von den Zellen mittels Endozytose aufgenommen (Bacchetti and Graham 1977; Wigler, Pellicer et al. 1978).

Da diese Methode einen großen Stress für die Zellen darstellt, konnten sie erst bei dem Erreichen einer minimalen Konfluenz von etwa 70% bis 80 % transfiziert werden.

Ein typisches Pipettierschema sah wie folgt aus:

Tabelle 5: Zusammensetzung eines Transfektions-Ansatzes

	6 well	10cm Schale
DNA	3,5 μg	20 µg
H ₂ O	ad 192 µl	ad 990µl
2M CaCl2	27 µl	140 µl
2xHBS pH7,05	219 µl	1130µl

2.2.2.9 Herstellung von Retroviren

Die zur Transduktion von eukaryotischen Zellen benötigten Retroviren wurden in Phoenix-Zellen hergestellt. Phoenix Zellen besitzen die Gene gag, pol und env des Moloney Murine Leukemia Virus (MMLV). Dabei stehen die Gene nicht unter MMLV-Promotoren und sind selektionierbar mit Hygromycin (gag-pol) bzw. Diphteriatoxin (env).

Die Phoenix Zellen wurden mittels Calciumphosphat transfiziert und der Retrovirus enthaltende Überstand 48 und 72 Stunden später geerntet. Die Retrovirus-Suspension wurde mittels Filtration von Phoenixzellen gereinigt, anschließend mit Sequabrene versetzt und auf die sich teilenden Zielzellen gegeben. Sequabrene ist ein kationisches Polymer, welches die Effizienz der retroviralen Infektion durch Neutralisation der abstoßenden Ladungen zwischen Zielzelle und Retrovirus erhöht.

2.2.2.10 Herstellung von stabilen Zelllinien

Um stabile Zelllinien herzustellen, wurden die Zielzellen mit einem selektionierbaren Konstrukt retroviral transduziert. Zwei Tage nach Transduktion wurde die Selektion mit Puromycin oder G418 begonnen und so lange durchgeführt, bis die Kontrollzellen komplett abgestorben waren. Der Erfolg der Transduktion wurde durch Überprüfen der Proteinexpression im Western Blot und/oder in der Immunfluoreszenz getestet. Bei Bedarf wurden einzeln Zellklone gepickt und analysiert.

2.2.3 Proteinchemische Methoden

2.2.3.1 Proteinexpression in BL21 Rosetta

Zur Proteinexpression in Prokaryoten wurde der pMalC2 Vektor verwendet, welcher eine induzierbare Proteinexpression ermöglicht. Hierfür wurde eine Übertag-Kultur mit einer Übernacht-Starterkultur angeimpft und mit den entsprechenden Antibiotika bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Bei erreichen einer $OD_{600} \sim 0,6$ wurde IPTG in einer Endkonzentration von 0,5 mM zugegeben und die Bakterien fünf Stunden bei Raumtemperatur weiter geschüttelt. Anschließend wurden die Bakterien abpelletiert, in Säulenpuffer resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.3.2 Extraktion und Aufreinigung von Proteinen aus Prokaryoten

Zur Extraktion der Proteine von Bakterien, wurden die bei 80 °C befindlichen Aliquots im kalten Wasserbad aufgetaut und anschließend durch Ultraschallbehandlung auf Eis lysiert. Eine Klärung des Lysats von ungelösten Proteinen erfolgte durch abzentrifugieren und anschließendem steril filtrieren. Alle nachfolgenden Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Die Aufreinigung des Maltosebinden Proteins gekoppeltem Protein, wurde das geklärte Lysat über eine Amylose Resin Säule gegeben. Die Säule wurde anschließend mit 15 Matrixvolumen Säulenpuffer gewaschen. Zum Eluieren des gekoppelten Proteins, wurde 25 ml Elutionspuffer auf die Säule gegeben, welcher dann in 1 ml Aliquots aufgefangen wurde. Je 50 μ l der einzelnen Aliquots wurden in der SDS-Page aufgetrennt, mit Coomassie angefärbt und die Aliquots mit der höchsten Menge gewünschten Proteins gepoolt.

2.2.3.3 SDS-Page

Zur Auftrennung von Proteinproben wurden Tris-Tricine Gele verwendet. Dieses System bietet gegenüber dem Laemmli-System den Vorteil der besseren Auftrennung bei kleinen Proteinen. Je nach Größe der Proteine wurden diese in 7,5 bis 15 prozentigen Gelen aufgetrennt. Die Zusammensetzung der Gele war wie folgt:

Chemikalie	Sammelgel	Trenngel
Rotiphorese gel 30 (37,5:1)	7 % (entspr. 4 %)	25-50 % (entspr. 7,5-15%)
Tricine Gel Puffer	33 %	33 %
Glycerol	-	1 0%
Wasser	60 %	7-32 %

 Tabelle 6: Zusammensetzung von Polyacrylamid-Gelen

2.2.3.4 Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen

Zum direkten Anfärben von Proteinen aus der SDS Page, wurde das Trenngel vom Sammelgel separiert und für 90 min in Coomassie Stain Lösung bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Zum Entfernen unspezifisch gebundenem Coomassie, wurde das gefärbte Gel für sechs Stunden in Coomassie Destain Lösung (mehrfach gewechselt) bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert.

Zum Konservieren der gefärbten Gele, wurden diese getrocknet. Dafür wurde das entfärbte Gel einmal mit Trocknungslösung gewaschen und anschließend für 30 min in Trocknungslösung auf dem Schüttler inkubiert. Das Gel wurde dann in einen Trocknungsrahmen gespannt und für zwei Tage horizontal bei Raumtemperatur gelagert.

2.2.3.5 Western Blot

Zum Nachweis von Proteinen aus der SDS-Page mittels Antikörper, wurden die Proteine auf Membranen geblottet. Proteine die ein Molekulargewicht von weniger als 15 kD besitzen, wurden für eine Stunde bei 0,8 mA/cm² auf PVDF-Membran übertragen. Größere Proteine wurden für 40 bis 80 min bei 2 mA/cm² auf Nitrocellulose übertragen. Zur Kontrolle der Übertragung der Proteine auf die jeweilige Membran, wurden diese mit Ponceau S angefärbt. Anschließend erfolgte eine einstündige Blockierung mit Magermilch oder BSA bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte entweder für zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C. Nach dem Waschen mit Tween-haltigem PBS erfolgte die Inkubation mit dem HRP-gekoppelten sekundären Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Exposition der Röntgenfilme erfolgte nach erneutem waschen. Hierbei wurde die Exposition des Films der Stärke des Signals angepasst.

2.2.4 Immunologische Methoden

2.2.4.1 Immunisierung von Mäusen

(durchgeführt von AG Nieswandt am Rudolf-Virchow Zentrum)

Mäuse wurden mit MBP/m41-Fusionsprotein immunisiert. Der Antikörpertiter der Seren der immunisierten Mäuse wurde regelmäßig mittels ELSIA bestimmt. Bei einem Antiköpertiter von <1:40000 wurde den Mäusen die Milz entnommen zur Herstellung von Hybridomen und das restliche Serum gewonnen, welches in den nachfolgenden ELISAs als Positivkontrolle genutzt wurde.

2.2.4.2 ELISA

Zum Nachweisen von spezifischen Antikörpern im Mäuseserum bzw. Hybridomüberstand, wurde das als Antigen verwendete Protein in einer Konzentration von 5 µg/ml auf ELISA Platten gegeben und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte ein blockieren des gecoateten Proteins mit BSA bei 37 °C für eine weitere Stunde. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Serum, oder Hybridomüberstand. Auch die anschließende Inkubation mit dem HRP-gekoppeltem Sekundärantikörper erfolgte für je eine Stunde bei 37 °C. Der Nachweis von gebundenen Antikörpern erfolgte mit TMB.

2.2.4.3 Herstellung von Hybridomen

Antikörperproduzierende B-Zellen haben nur eine geringe Lebensdauer. Um diese über längere Zeit in Zellkultur zu halten wurden sie mit Myelomazellen fusioniert. Dabei wurde die Milz einer positiven Maus (siehe 2.2.4.1) durch ein Zellsieb gedrückt und eine Hälfte zur späteren Verwendung mit FCS/DMSO (9:1) gemischt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die andere Hälfte wurde mit 3*10⁷ Ag14 Zellen gemischt. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 200 g bei Raumtemperatur zentrifugiert und zwei Mal mit RPMI ohne Zusätze gewaschen. Danach wurde sehr vorsichtig Polyethylenlycol zugegeben und die Suspension für eine Minute vorsichtig in der Hand geschwenkt. Im Anschluss wurde tropfenweise 10 ml RPMI zugegeben und die Suspension mit HAT-haltigem RPMI auf 100 ml aufgefüllt. Anschließend wurden die fusionierten Zellen auf die zwei Tage vorher ausgesäten Feederzellen in 96 well Platten verteilt. Sobald die Hybridome angemessen große Kolonien gebildet hatten, wurden die Überstände im ELSIA getestet. Positive Klone wurden in 24 well Platten mit Feederzellen gegeben. Bei weiteren Expansionen wurden keine Feederzellen mehr zugegeben. Auch wurde bei Erreichen von Zellkulturflaschen die HAT-Selektion ausgesetzt.

2.2.4.4 Aufreinigung von Antikörpern aus Hybridomüberstand

(durchgefürht von AG Nieswandt am Rudolf-Virchow Zentrum)

Hybridome wurden in aufrechten T 175 Flaschen im Brutschrank kultiviert und jeden Tag geschwenkt. Nach dem Erreichen der kritischen Zelldichte wurden die Flaschen einen weiteren Tag bei 4 °C inkubiert, woraufhin die Hybridome abpelletiert wurden. Der Überstand wurde zusätzlich über einen 0,45 Filter weiter von Zelltrümmern befreit und im Anschluss über eine Protein G Säule gegeben. Der Proteingehalt des aufgereinigten Antikörpers wurde bestimmt und Aliquots bei -20 °C gelagert.

2.2.4.5 Immunfluoreszenz

Zum Überprüfen der Expression bzw. der intrazellulären Lokalisation eines Proteins wurden Zellen am Tag vor der Infektion/Transfektion auf Deckgläschen umgesetzt. Zum gewünschten Zeitpunkt der Detektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend für zwanzig Minuten mit 3 prozentigem Paraformaldehyd bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Aldehydreste mit Ammoniumchlorid blockiert und die Zellen mit 0,3 % TritonX-100 permeabilisiert. Blockiert wurden die Zellen mit 0,2 % Gelatine. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte für zwei Stunden bei Raumtemperatur, oder bei 4 °C über Nacht und die mit dem sekundärem für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln. Bei Bedarf wurden die Zellkerne mit DAPI angefärbt und anschließend die Deckgläschen mit Mounting medium auf Objektträger fixiert.

2.2.5 Apoptoseassays

2.2.5.1 MTT-Assay

Zur Messung der Vitalität von Zellen wurden MTT-Tests durchgeführt (Mosmann 1983). MTT ist eine gelbliche, wasserlösliche Substanz, die durch mitochondriale und endoplasmatische Enzyme zu Formazan umgewandelt wird, welches violett und wasserunlöslich ist.

Da FCS und Antibiotika den Assay stören, wurde MTT in DMEM ohne Zusätze verdünnt und auf die zu untersuchenden Zellen gegeben. Nach einer Inkubation für vier Stunden im Brutschrank wurde das MTT-haltige Medium abgesogen und die Zellen solubilisiert. Die Auswertung erfolgte im ELISA-Reader durch die Messung der Absorption bei 670 nm (Absorptionsmaximum Formazan) und zur Kontrolle bei 570 nm (Absorptionsmaximum MTT).

2.2.5.2 Cytochrom c Freisetzungstest

Zum Nachweis der Induktion von mitochondrialer Apoptose wurde ein Cytochrom c release assay durchgeführt. Dieser beruht darauf, das Cytochrom c, welches normaler weise als Teil der Atmungskette in den Mitochondrien lokalisiert ist, nach apoptotischen Stimuli ins Zytoplasma übergeht. Durch vorsichtige Lyse von Zellen lassen sich mitochondriale Fraktionen von cytoplasmatischen Fraktionen trennen.

Dieses wurde wie folgt durchgeführt. 1*10⁶ 10.1 Fibroblasten wurden in 6 well Platten für fünf Stunden mit 450 nM Staurosporin behandelt und anschließend fünf Minuten in isotonem Lysepuffer auf Eis lysiert. Darauf folgte das abpelletieren der mitochondrialen Fraktion für eine Minute bei 16000 g. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, das Pellet in derselben Menge Lysepuffer resuspendiert und beide Fraktionen anschließend mit Probenpuffer aufgekocht und im Western Blot analysiert.

2.2.5.3 Bak-Oligomerisierungs Assay

Um zu überprüfen, ob sich das proapoptotische Bak in einem monomeren oder oligomeren Zustand befindet, wurde ein Bak-Oligomerisierungs Assay durchgeführt. Hierbei bedient man sich der Tatsache, dass chemische Quervernetzer, wie z.B. 1',6'bismaleimidohexan (BMH) die durch die Quartärstruktur bedingten wechselwirkenden Proteine kovalent über Sulfhydrylreste zu binden.

Hierbei wurden 5*10⁵ Zellen im 6 well (6 h. p.i.) für fünf Stunden mit 450 nM Staurosporin behandelt und anschließend wie unter 2.2.5.3 lysiert und geerntet. Die erhaltenen Pellets wurden in HIM Puffer resuspendiert und anschließend mit frisch in DMSO angesetztem BMH in einer Endkonzentration von 2 mM für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden anschließend mit Probenpuffer aufgekocht und im Western Blot analysiert.

Bei Transduzierten Zellen wurde ähnlich verfahren. Lediglich die Induktion der Bak-Oligomerisierung erfolgte für 15 anstelle von sechs Stunden.

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zur Relevanz des m41 Proteins

3.1.1 Konstruktion von Virusmutanten

Zur Klärung der Funktion des m41 Proteins, wurden Viren auf Basis der m41-Deletionsmutante mit Hilfe der Replacer Technologie (Jurak and Brune 2006) konstruiert, in denen die für die Zellkultur zu vernachlässigende m02-m06 Region durch Varianten des m41 Gens ersetzt wurden (Abb. 8).



Abbildung 8: Schematische Darstellung der hergestellten Virusmutanten. Resistentgene sind mit Kan (Kanamycinresistenz) und Zeo (Zeocinresistenz) abgekürzt. Die gestreiften Boxen symbolisieren den eingefügten HA-tag, schwarze Elipsen FRT-sites und PGKp symbolisiert den murinen Phosphoglycerat-Kinase-Promotor, unter dem die durch die Replacer-Technologie eingeführten Gene stehen.

Zum einen wurden solche Mutanten konstruiert, welche ein HA-getaggtes m41 Protein (N- bzw. C-Terminus) zur Folge haben. Des Weiteren wurde eine Mutante geschaffen, welche zusätzlich zum C-terminalen HA-tag ein mutiertes Golgilokalisierungs-Motiv enthielt (m41HAmut), um herauszufinden, ob die Golgilokalisierung für die Funktion des m41-Proteins essentiell ist. Als letztes wurde eine Mutante geschaffen, welche eine kurze intergenische Sequenz vor dem Startkodon des m41 Gens beinhaltet, da sich in dieser Region eine putative Splice-Donor-Stelle befindet (m41*HA). Diese Mutante ist auch die einzige, welche keine künstliche Kozak-Sequenz vor dem m41 Start-Kodon enthält. Durch die homologe Rekombination ändert sich das Restriktionsmuster im Virus, welches durch den Verdau des entsprechenden BACs überprüft werden kann (Abb. 9). Die zu erwartenden Änderungen im Bezug zum Wildtyp-Bac sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

BAC/Virus	EcoRI		SnaBI	
	fehlt	neu	fehlt	neu
MCMV Am41	-	-	4798	8158
			3399	
rep HAm41	22816	4181	4798	8158
			3399	2171
			1642	
rep m41HA	22816	4186	4798	8158
-			3399	2201
			1642	
rep m41HA mut	22816	4186	4798	8158
1			3399	2201
			1642	
rep m41*HA	22816	4153	4798	8158
		1046	3399	2170
			1642	

Tabelle 7. Unterschiede der Virusmutanten bezogen auf den wildtyp (GFP). Im BAC-Gel sichtbare Bandenveränderungen zum Wildtyp-BAC, bei entsprechendem Verdau sind in dieser Tabelle aufgelistet.



Abbildung 9: Überprüfung des Bandenmusters der m41 Virusmutanten. 1,5 µg BAC-DNA wurden mit EcoRI bzw. SnaBI verdaut und über Nacht im 0,6%igem Agarosegel aufgetrennt.

Die tatsächlichen Badenmuster im EcoRI und SnaBI Restriktionsverdau entsprechen den theoretisch errechneten, weshalb die BAC-Mutagenese als erfolgreich angesehen wurde und die BACs zur Rekonstitution der Viren in 10.1 Fibroblasten transfiziert wurden.

Nach erfolgter Rekonstitution wurde die virale Expression von m41 in infizierten Zellen mittels Western Blots überprüft. In Abbildung 10 ist zu erkennen, dass alle m41 kodierenden Viren das m41 Protein exprimieren, wobei das N-Terminal getaggte m41 etwas größer erscheint, als das C-Terminal getaggte.



Abbildung 10: Überprüfung der m41-Expression von verschiedenen MCMV-Mutanten. Proteine infizierter 10.1 Zellen wurden 24 Stunden nach Infektion mit dem entsprechenden Virus durch Lyse mit kochendem Probenpuffer geerntet. Die Proteine wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem mouse anti-HA und einem anti-mouse HRP-Antikörper detektiert.

3.1.2 Überprüfung der Funktionalität der m41 Virusmutanten

3.1.2.1 Wachstumskurven

Um die Replikationsfähigkeit der m41 Virusmutanten zu überprüfen wurden onestep (Abb. 11A) und multistep (Abb. 11B) Wachstumskurven auf 10.1 Fibroblasten und SVEC4-10 Endothelzellen durchgeführt, sowie eine onestep Wachstumskurve auf J774A.1 Makrophagen (Abb. 11C). Hier war zu beobachten, dass die Mutante mit dem N-Terminal getaggtem m41 sich wie die Deletionsmutante verhielt. Die einzige Mutante die sich vollkommen wie der Wildtyp verhielt war lediglich jene Mutante, welche den HA-tag am C-Terminus und zusätzlich dazu eine kurze intergenische Sequenz vor dem Startkodon enthielt. Die Insertion der Kozak-Sequenz, welche die Expression des m41 Proteins verstärken sollte führte demnach in diesem Fall nicht zur Reversion des Wildtyp-Phänotyps bezüglich der Replikationsfähigkeit auf murinen Fibroblasten und Endothelzellen. Des Weiteren war zu beobachten, dass die m41 Deletionsmutante auf den J774A.1 Makrophagen nicht zu einer produktiven Infektion führte.



Abbildung 11: Wachstumskurven der m41 Virusmutanten auf 10.1 Fibroblasten, SVEC4-10 Endothelzellen und J774A.1 Makrophagen. Die entsprechenden Zellen wurden entweder komplett infiziert (A) oder mit geringer Virusmenge infiziert um die Ausbreitung der Infektion mit einzubeziehen (B).Makrophagen wurden mit einer MOI von 5 infiziert (C). An den entsprechenden Tagen wurden Proben genommen und die Virustiter durch Titration ermittelt.

3.1.2.2 Vitalitätstests

Um herauszufinden, ob die hergestellten Mutanten die Virus-induzierte Apoptose inhibieren, wurden 10.1 Fibroblasten mit einer MOI von drei infiziert und die Viabilität mittels MTT-Test 96 h nach Infektion bestimmt (Abb. 12A). Um weiterhin den Mechanismus der Apoptose-Inhibiton zu ermitteln wurden infizierte 10.1 Fibroblasten sechs Stunden nach Infektion mehreren Apoptosestimuli ausgesetzt. 18 Stunden nach Inkubation mit der entsprechenden Chemikalie wurde die Vitalität bestimmt (Abb. 12B). Wie zuvor bei den Wachstumskurven, war auch hier zu beobachten, dass sich die HAm41 Mutante wie die Deletionsmutante verhielt. Weiterhin war zu beobachten, dass die m41 Deletionsmutante sensitiv gegenüber Staurosporin und Actinomycin D-induzierter Apoptose ist. TNF- α induzierte Apoptose, welche durch M36 und M45 inhibiert wird, führte hier erwartungsgemäß nicht zur Apoptoseinduktion.



Abbildung 12: Vitalität von mit m41-Mutanten infizierten Zellen. 10.1 Zellen wurden mit einer MOI von drei infiziert. (A) 96 Stunden nach Infektion wurde die Viabilität der infizierten Zellen mittels MTT bestimmt. (B) sechs Stunden nach Infektion wurden die Zellen mit 150 nM Staurosporin, 200 ng/ml Actinomycin D oder 25 ng/ml CHX mit 100 ng/ml TNF- α behandelt. 18 Stunden nach Behandlung wurde die Vitalität der infizierten Zellen mittels MTT bestimmt.

3.1.3 Herstellung eines monoklonalen anti-m41 Antikörpers

3.1.3.1 Herstellung des Antigens

Zur Herstellung des m41 Antigens wurde zunächst mittels PCR eine C-Terminal verkürzte Variante des m41 hergestellt. Diese Variante enthält die Transmembrandomäne nicht mehr, welche bei der Expression in *E. coli* zu Löslichkeitsproblemen führen könnte. Im Anschluss wurde das verkürzte m41 mit dem Maltosebindendem Protein (MBP) fusioniert. Das durch eine Amylose-Matrix-Säule aufgereinigte Protein wurde in Fraktionen gesammelt und Aliquots auf ein Coomassie-Gel gegeben (Abb. 13)



Abbildung 13: Überprüfung der relativen m41/MBP-Mengen in den Faktionen der Proteinaufreinigung. Aliquots der einzelnen Fraktionen aus der Proteinaufreinigung mittels Amylose-Matrix-Säule wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt. Im Anschluss an den Gellauf wurden die Proteine mittels Coomassie Brilliant Blau gefärbt.

Die Fraktionen 2 und 3, welche den höchsten relativen m41/MBP-Gehalt aufwiesen wurden gepoolt und der absolute Gehalt an m41/MBP durch vergleich mit verschiedenen BSA Konzentrationen auf einem Coomassie-Gel ermittelt (Abb. 14)



Abbildung 14: Überprüfung der m41/MBP-Konzentrationen in dem gepooltem Eluat der Proteinaufreinigung. Proben des m41/MBP-Lysats wurden in unterschiedlichen Verdünnungen in der SDS-PAGE aufgetrennt. Parallel dazu wurde als Referenz verschiedene Konzentration von BSA mit aufgetrennt. Nach dem Gellauf wurden die Proteine mit Coomassie angefärbt und die unterschiedlichen Konzentrationen miteinander verglichen.

3.1.3.2 Überprüfung von Hybridomen auf Sekretion von m41 spezifischen Antikörpern

Zwei Monate nach der ersten Immunisierung wurde der ersten Maus die Milz entfernt und die B-Lymphozyten mit den Myelomzellen fusioniert. Zwei Wochen später wurden dann die ersten Klone im ELISA auf m41 Spezifität überprüft. Tabelle 8 gibt eine Übersicht über die getesteten Klone und ihre Spezifität.

 Tabelle 8: Auflistung der getesteten Hybridome hinsichtlich ihrer Spezifität. Hybridomüberstände, wurde auf Reaktivität gegen m41 und MBP im ELISA getestet.

Klone getestet	anti-MBP	anti-m41	positiv nach Subklonierung
793	72	3	1

Der anti-m41-Antikörper wurde vom Überstand des einzigen m41-spezifischen Klons (2A6) mittels HPLC aufgereinigt.

3.1.4 Herstellung von m41 stabil exprimierenden Zellen

Da mittels Virusmutanten ein m41 bedingter Schutz vor Staurosporin und Actinomycin D-induzierter Apoptose gezeigt wurde, sollte untersucht werden, ob die isolierte Expression von m41 in Mauszellen ebenfalls zu diesem Phänotyp führen würde. Hierfür wurden murine M2-10B4 Zellen mit Retroviren transduziert und mit G418 selektioniert. Nach dem Tod der Kontrollzellen wurde die m41-Expression der mit m41 transduzierten Zellen mittels Immunfluoreszenz überprüft (Abb. 15)



Abbildung 15: m41-Expression in transduzierten M2-10B4 Zellen. Transduzierte M2-10B4 Zellen wurden auf einem Deckgläschen kultiviert. Vor der Detektion von m41 mit dem spezifischen m41 Antikörper wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert.

Da nur sehr wenige Zellen m41 schwach exprimierten wurden einzelne Klone durch limitierende Verdünnungen isoliert und diese erneut im Western Blot (Abb. 16A) und in der Immunfluoreszenz (Abb. 16B) getestet.

Zu beobachten war hier, dass die verschiedenen Klone sehr unterschiedliche Mengen an m41 produzieren und der m41 Antikörper im Western Blot eine zusätzliche Bande auf Höhe von etwa 100 kD detektiert. Im Anschluss wurden die verschiedenen Klone auf ihre Fähigkeit Staurosporin und Actinomycin D-induzierter Apoptose zu widerstehen hin untersucht. In Abbildung 17 ist zu sehen, dass die verschiedenen Klone sehr unterschiedliche Phänotypen aufweisen.



Abbildung 16: m41-Expression in Zellklonen von transduzierten M2-10B4 Zellen. Transduzierte M2-10B4 Klone wurden für die Proteindetektion im Western Blot in 6well Platten kultiviert und durch kochenden Probenpuffer lysiert. Die Proteine wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mit dem spezifischen m41 Antikörper nachgewiesen (A). Für die m41 Detektion in der Immunfluoreszenz wurden sie auf Deckgläschen kultiviert. Vor der Detektion von m41 mit dem spezifischen m41 Antikörper wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert (B).



Abbildung 17: Vitalität von apoptose-stimulierten, m41 transduzierten M2-10B4 Klonen. Die stabil m41 exprimierenden Zellklone wurden mit 125 nM Stauroporin oder 60 ng/ml Actinomycin D behandelt. 72 Stunden nach Behandlung wurde die Vitalität mittels MTT gemessen und in Bezug zur Vitalität zum Zeitpunkt der Behandlung gesetzt.

Da die m41 exprimierenden Zellklone einen recht heterogenen Phänotyp aufwiesen und nur die Virusmutante, welche einen kurzen intergenischen Bereich vor dem m41 Startkodon beinhaltet einen Wildtyp-Phänotyp aufwies, lag die Vermutung nahe, dass der von Brocchieri et al. (Brocchieri, Kledal et al. 2005) beschriebene m41.1 ORF für den Phänotyp des m41-Deletionsvirus verantwortlich sein können (Abb. 18). Daher wurde im weiteren Verlauf der Arbeit das m41.1 zur Untersuchung der Apoptoseinhibition herangezogen.



Abbildung 18: Theoretische Lokalisierung eines m41.1 ORF innerhalb des m41 ORF laut Brocchieri et al.

3.2 Untersuchungen zur Relevanz des m41.1 Proteins

3.2.1 Konstruktion von Virusmutanten

Um die Funktionen von m41 und m41.1 getrennt betrachten zu können wurde zunächst eine Mutante hergestellt, die ein C-terminal HA getaggtes m41.1 unter dem nativen Promotor exprimiert, um die theoretische Expression des ORF zu verifizieren. Zusätzlich wurden einzel-knockout Viren und Substitutionsmutanten mit Myxomavirus M11L (virales Bcl-2-Analog) und Bcl-x_L, durch Rekombination mit der oben beschriebenen m02-m06 Region, und eine zusätzliche Doppelknockout Mutante, bei der auch der m38.5 ORF deletiert wurde (Abb. 19), hergestellt.

Die veränderten Restriktionsmuster wurden durch den Verdau des entsprechenden BACs überprüft (Abb. 20). Die zu erwartenden Änderungen im Bezug zum Wildtyp-Bac sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9. Unterschiede der Virusmutanten bezogen auf den Wildtyp (MCMV GFP). Im BAC-Gel sichtbare Bandenveränderungen zum Wildtyp-BAC, bei entsprechendem Verdau sind in dieser Tabelle aufgelistet.

Virus	EcoRI		HindIII	
	fehlt	neu	fehlt	neu
MCMV Δm41	-	-	-	-
repHABclXl	22816	-	2158	-
repM11L	22816	1073	2158	-
repm41.1	22816	965	2158	1203
m41.1 in situ ko frt kan	-	8243	-	8797
		1071		
m41.1 in situ ko	-	8243	-	-
m41.1 in situ ko, m38.5ko		12000	-	-
		8243		
m41 in situ ko frt kan	-	8026	-	8787
		1071		
m41 in situ ko	-	8026	-	-
MCMV m41.1HA	-	8036	-	8584



Abbildung 19: Schematische Darstellung der hergestellten Virusmutanten. Resistenzgene sind mit Kan (Kanamyzinresistenz) und Zeo (Zeocinresistenz) abgekürzt. Die gestreiften Boxen symbolisieren den eingefügten HA- bzw. Flag-tag, schwarze Elipsen FRT-sites und PGKp symbolisiert den murinen Phosphoglycerat-Kinase-Promotor, unter dem die durch die Replacer-Technologie eingeführten Gene stehen.



Abbildung 20: Überprüfung des Bandenmusters der m41.1 Virusmutanten. 1,5 µg BAC-DNA wurden mit EcoRI bzw. HindIII verdaut und über Nacht im 0,6 prozentigem Agarosegel aufgetrennt.

Die tatsächlichen Badenmuster im EcoRI und HindIII Restriktionsverdau entsprechen den theoretisch errechneten, weshalb die BAC-Mutagenese als erfolgreich angesehen wurde und die BACs zur Rekonstitution der Viren in 10.1 Fibroblasten transfiziert wurden. Nach erfolgter Rekonstitution wurde dann noch zusätzlich die virale Expression der inserierten Proteine in infizierten Zellen mittels Western Blots überprüft. In Abbildung 21 ist zu erkennen, dass alle Viren die entsprechenden Proteine exprimieren.



Abbildung 21: Überprüfung der Expression von verschiedenen MCMV-Mutanten. Proteine infizierter 10.1 Zellen wurden 24 Stunden nach Infektion mit dem entsprechenden Virus durch Lyse mit kochendem Probenpuffer geerntet. Die Proteine wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem anti-HA bzw. anti-Flag Antikörper detektiert. Als Infektionsmarker wurde das virale immediately early 1 (IE1) detektiert.

3.2.2 Überprüfung der viralen m41.1 Expression

Um sicher zu stellen, dass der putative m41.1 ORF vom Virus genutzt wird, wurden Proteinlysate von MCMV-Wildtyp und MCMV m41.1HA infizierten Zellen im Western Blot untersucht.



Abbildung 22: Überprüfung der viralen m41.1 Expression. Infizierte Fibroblasten wurden mit einer MOI von fünf infiziert und die Proteine 24 Stunden nach Infektion geerntet. Zusätzlich wurden Fibroblasten mit pcDNA m41.1HA bzw. pcDNA (mock) transfiziert, als Positiv- bzw. Negativkontrolle.

Abbildung 22 zeigt eine klare Bande etwas unterhalb der 10 kD Markerbande sowohl in der Bahn mit dem MCMV m41.1HA Zell-Lysat als auch in jener mit Zell-Lysat aus m41.1HA transfizierten Zellen. Die theoretisch vorhergesagte Größe von m41.1 ist etwa 8 kD, was mit der beobachteten Größe übereinstimmt.

Da der putative ORF bestätigt war, sollte nun überprüft werden, mit welcher Kinetik das m41.1 Protein im Laufe der MCMV-Infektion exprimiert wird. In Abbildung 23 ist zu sehen, das m41.1 bereits nach fünf Stunden detektierbar ist, ein Zeitraum, in dem es bereits auch zur Expression der frühen (z.B. E1), aber noch nicht der späten MCMV-Gene (z.B. M44) kommt.



Abbildung 23: Überprüfung der m41.1 Expressionskinetik. Murine 10.1 Fibroblasten wurden mit einer MOI von fünf infiziert. Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurden die Proteine geerntet und im Western Blot untersucht. Als Kinetik-Marker dienen die MCMV Proteine: IE1 (immediate-early Expression). E1 (early Expression)

sucht. Als Kinetik-Marker dienen die MCMV Proteine: IE1 (immediate-early Expression), E1 (early Expression), M44 (early-late Expression) und gB (true-late Expression). Als Ladekontrolle dient das zelluläre Protein β -Aktin.

3.2.3 Überprüfung der m41.1 Lokalisation

Um die Funktion eines Proteins zu bestimmen ist es von Vorteil zu wissen in welchem Zellkompartiment das Protein lokalisiert ist. Da das m41.1 Protein ein noch völlig uncharakterisiertes Protein war, wurde hier die Lokalisation des Proteins durch Kolokalisations-Studien im Konfokalen-Laserscan-Mikroskop bestimmt.

Da webbasierte Programme eine mitochondriale Lokalisation dieses Protein vorhersagten, wurde überprüft, ob eine Kolokalisation von m41.1 mit mitochondrialen Markern vorliegt. Abbildung 24 zeigt in A (MitoTracker, Mitochondrien-spezifischer Farbstoff) und B (HSP 60, mitochondrial lokalisiertes Hitzeschock Protein) eine klare mitochondriale Lokalisation. Als negative Kontrolle dient die Anfärbung mit Lysotracker (Lysosomen-spezifischer Farbstoff). Wie in Abbildung 24 C zu sehen ist, liegt keine Kolokalisation von m41.1 mit Lysosomen.



Abbildung 24: Überprüfung der zellulären Lokalisation von m41.1. Fibroblasten wurden mit pcDNAm41.1HA transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen mit dem mitochondrialen Marker MitoTracker (300 nM, 30 min) gefärbt (A). Anschließend wurden die Zellen fixiert und m41.1 mit einem Ratte anti HA Antikörper und anschließend mit einem anti Ratte-A488 Antikörper angefärbt, wobei in B die Mitochondrien durch die Anfärbung mit einem anti HSP-60 Antikörper gefärbt wurden. In Abbildung C erfolgte die Anfärbung des zellulären Bestandteils mit dem Lysotracker (75 nM, 30 min). Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Laser-Scan-Mikroskopes.

3.2.4 Überprüfung der Funktionalität der m41.1 Virusmutanten

3.2.4.1 Wachstumskurven

Um die Replikationsfähigkeit der m41.1 Virusmutanten zu überprüfen wurden multistep Wachstumskurven sowohl auf 10.1 Fibroblasten (Abb. 25A), als auch auf IC-21 und RAW264.7 Makrophagen durchgeführt (Abb. 25B). Hier zeigte sich deutlich, dass jene Mutanten, welche kein m41.1 exprimieren einen deutlichen Wachstumsdefizit in Makrophagen



aufwiesen. Substitutions-Revertanten, welche ein Bcl-2 Homolog enthielten, zeigten einen Wildtyp-Phänotyp.

Abbildung 25: Wachstumskurven der m41.1 Virusmutanten. 10.1 Fibroblasten (A) und IC-21 bzw. RAW264.7 Makrophagen (B) wurden mit geringer Virusmenge infiziert, um die Ausbreitung der Infektion mit einzubeziehen. An den entsprechenden Tagen wurden Proben genommen und die Virustiter durch Titration ermittelt.

3.2.4.2 Vitalitätstests

Um herauszufinden, ob die hergestellten Mutanten die Virus-induzierte Apoptose inhibieren, wurden 10.1 Fibroblasten mit einer MOI von drei und die Makrophagen Zelllinen RAW264.7 und IC-21 mit einer MOI von 20 infiziert und die Vitalität mittels MTT-Test 18 (10.1 und Makrophagen) bzw. 72h (10.1) nach Infektion bestimmt (Abb. 26).

Es konnte beobachtet werden, dass in den Fibroblasten m41.1 für den Schutz gegenüber Virus-induziertem Zelltod genügt. Die Virusmutante, in der lediglich der m41 ORF deletiert war, verhielt sich annähernd wie der Wildtyp. Erstaunlicher Weise scheint m41 allerdings in Makrophagen genauso wichtig für den Schutz vor Virus-induziertem Zelltod zu sein



wie m41.1, da hier lediglich die Revertante mit M11L einen Phänotyp ähnlichen dem des Wildtyp aufwies.

Abbildung 26: Vitalitätstests von infizierten Zellen. 10.1 Fibroblasten (A) und die Makrophagen Zelllinien RAW264.7 bzw. IC-21(B) wurden mit hoher MOI infiziert. Die Vitalität wurde 18 bzw. 72 Stunden nach Infektion mittels MTT gemessen.

Bereits mit dem m41-Deletionsvirus wurde eine erhöhte Sensitivität gegenüber Staurosporin und Actinomycin D im Vergleich zum Wildtyp-Virus festgestellt. Es sollte nun näher differenziert werden, welches Protein (m41 oder m41.1) für den Schutz gegenüber diesen Apoptoseinduktoren verantwortlich ist.

10.1 Fibroblasten wurden mit einer MOI von drei infiziert und sechs Stunden nach Infektion mit dem jeweiligen Apoptoseinduktor behandelt. Nach weiteren 18 Stunden erfolgte die Auswertung mittels MTT (Abb. 27). Zu sehen war hierbei, dass der Knockout von m41.1 allein genügte, um den m41-Deletions-Phänotyp zu erreichen. Zellen, die mit dem m41 Knockout Virus infiziert wurden, zeigten einen Wildtyp-Phänotyp.



Abbildung 27: Vitalität von mit m41.1-Mutanten infizierten Zellen. 10.1 Zellen wurden mit einer MOI von drei infiziert. Sechs Stunden nach Infektion wurden die Zellen mit 200 nM Staurosporin oder 250 ng/ml Actinomycin D behandelt. 18 Stunden nach Behandlung wurde die Viabilität der infizierten Zellen mittels MTT bestimmt.

3.2.5 Aufklärung des Wirkmechanismus von m41.1

3.2.5.1 Cytochrom c Freisetzungstest

Wie bereits erwähnt sind Fibroblasten, welche mit MCMV-m41.1 Knockout-Viren infiziert sind, im Vergleich zu den mit MCMV-Wildtyp infizierten Zellen, nicht mehr vor Staurosporin- und Actinomycin D-induzierten Zelltod geschützt. Da die Messung der Vitalität mittels MTT nicht zwischen Apoptose und anderweitigem Zelltod (z.B. Apoptose) unterscheiden kann bedurfte es weiterer Untersuchungen.

Ein wichtiger Schritt in der Mitochondrien-vermittelten Apoptose ist die Freisetzung von proapoptotische Proteinen, wie z.B. Cytochrom c aus den Mitochondrien in das sie umgebende Cytosol, welches unter anderem zur Aktivierung der Caspase-Kaskade führt.

Aus diesem Grund wurde die Cytochrom c-Freisetzung in murinen 10.1 Fibroblasten (Abb. 28) untersucht. Hierbei wurden infizierte bzw. mock-infizierte Zellen mit Staurosporin stimuliert, worauf die Freisetzung von Cytochrom c folgt. Anschließend wurden die Zellen mit isotonem Lysepuffer lysiert, wodurch die eine Aufteilung von Cytosol und Mitochondrien angereichertem Pellet ermöglicht wird.

Es war zu beobachten, das infizierte Zellen ohne m41.1 eine Cytochrom c Freisetzung nicht verhindern konnten. Lediglich die Viren, welche m41.1 oder ein Bcl-2 Homolog, wie z.B. Bcl- x_L oder M11L exprimieren konnten diese Freisetzung verhindern.



Abbildung 28: Cytochrome c Freisetzungstest. 10.1 Fibroblasten wurden mit einer MOI von drei infiziert. 15 Stunden nach Infektion wurden die Zellen für fünf Stunden mit 450 nM Staurosporin behandelt und mit isotonem Lysepuffer für fünf Minuten lysiert. Im Anschluss daran wurden die Lysate abzentrifugiert und das Cytosol vom Mitochondrien angereichertem Pellet getrennt. Die Proben wurden mit Lysepuffer aufgekocht und im Western Blot analysiert. IE1 dient als Infektions- und β-Aktin als Ladekontrolle.

3.2.5.2 Differenzierung zwischen Bax und Bak vermittelter Apoptose

Da nun gesichert war, dass es sich bei dem vorher beobachteten Zelltod um Apoptose handelte, sollte nun näher untersucht werden, in welchem Weg m41.1 eingreift. Wie weiter oben gezeigt konnte m41.1 im viralen Kontext vor Staurosporin induzierter Apoptose schützen. Wie Wei et al. (Wei, Zong et al. 2001) bereits zeigten sind Zellen, welche weder Bax noch Bak exprimieren geschützt vor Staurosporin-induzierter Apoptose. Da MCMV das Protein m38.5 exprimiert, welches ein Inhibitor der Bax-mediierten Apoptose ist, sollte nun überprüft werde, ob es sich beim m41.1 Protein um einen Inhibitor der Bak-mediierten Apoptose handelt.

Immortalisierte murine embryonale Fibroblasten, die sich bezüglich ihrer Expression von Bax und Bak unterschieden, wurden mit den entsprechenden Mutanten infiziert. Anschließend wurde ein Ansatz mit 450 nM Staurosporin behandelt bzw. mock-bahndelt. Ein weiterer Ansatz blieb unbehandelt. 30 Stunden nach Infektion (Abb. 29A) bzw. 18 Stunden nach Behandlung (Abb. 29B) erfolgte die Auswertung mittels MTT. Hierbei war zu beobachten, dass die Vitalität der mit m41.1 fehlenden Mutanten infizierten Zellen nur dann beeinträchtigt war, wenn diese Bak exprimierten. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass auch eben solche Zellen nicht vor Staurosporin-induzierter Apoptose geschützt waren. Ledig-



lich Zellen, welche Bax, aber nicht Bak exprimieren waren trotz des Fehlens von m41.1 geschützt vor Staurosporin-induzierter Apoptose (Abb. 29B).

Abbildung 29: Vitalität von mit m41.1-Mutanten in Abhängigkeit von Bax und Bak Expression der Zellen. MEFs wurden mit einer MOI von fünf infiziert. (A) 30 Stunden nach Infektion wurde die Vitalität bezogen auf MCMV-GFP infizierte Zellen mittels MTT bestimmt. (B) Sechs Stunden nach Infektion wurden die Zellen mit 450 nM Staurosporin behandelt. 18 Stunden nach Behandlung wurde die Vitalität der infizierten Zellen mittels MTT bestimmt.

Da bekannter Weise virale Proteine miteinander kooperieren, sollte nun herausgefunden werden, ob m41.1 seine Bak-inhibierende Funktion nur im viralen Kontext, also mit Hilfe anderer viralen Proteine, ausüben kann, oder ob m41.1 alleine Bak-mediierte Apoptose inhibieren kann. Des Weiteren sollte sichergestellt werden, dass die Apoptose-inhibierende Funktion strickt Bak und nicht zusätzlich Bax abhängig ist. Zu diesem Zweck wurden murine embryonale Fibroblasten (MEFs), die entweder nur Bax oder nur Bak exprimieren, retroviral transduziert. Die mit dem jeweiligen Konstrukt transduzierten Zellen wurden anschließend mit Staurosporin oder Actinomycin D behandelt und daraufhin die Vitalität gemessen (Abb. 30). Hierbei ließ sich bestätigen, dass die Apoptose inhibierende Funktion strikt Bak-abhängig war. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass m41.1 alleine, ohne weitere virale Proteine in der Lage ist den Bak-mediierten Zelltod zu inhibieren.



Abbildung 30: Apoptose-inhibition in transduzierten murinen embryonalen Fibroblasten. Bax ko bzw. Bak ko MEFs wurden mit Retrovirus transduziert. 24 h nach Transduktion erfolgte die Apoptose-induktion mittels Staurosporin oder Actinomycin D. 48 h nach Behandlung erfolgte die Messung der Vitalität mittels MTT-Test.

3.2.5.3 Aufklärung des Mechanismus der m41.1 vermittelten Bak-Inhibition

Da nun sicher gestellt war, dass die Apoptose Inhibition von m41.1 strikt Bak abhängig ist, sollte nun herausgefunden werden, wie die Inhibition zustande kommt, also ob m41.1 vor oder nach der Aktivierung von Bak eingreift.

Bei der Induktion der Mitochondrien-vermittelten Apoptose kommt es über BH3-only Proteine zu einer Aktivierung von Bak, welche letztendlich eine Porenformation zur Folge, und damit das Ausströmen von proapoptotischen Faktoren von den Mitochondrien in das Cytosol zur Folge hat. Sobald Bak aktiviert wird kommt es zu einer Konformationsänderung im N-terminus und einer anschließenden Bak-Oligomerisierung.

Um den Bak-Oligomerisierungsstatus festzustellen, wurden Bax/Bak defiziente MEFs mit Flag-getaggtem Bak transduziert und auf stabile Expression dieses Proteins mit Puromycin selektioniert. Nach Infektion dieser Zellen mit der jeweiligen Virusmutante erfolgte der Bak-Oligomersierung-Stimulus durch Staurosporin. Im Anschluss wurden die Zellen lysiert und mit dem chemischen Quervernetzer, BMH behandelt. Durch dieses Quervernetzen wird bewirkt, dass alle Proteine, die sich in unmittelbarer Nähe zueinander befinden, kovalent über Schwefelreste der entsprechenden Aminosäure (Cystein) gebunden werden.

In diesem Experiment konnten klar gezeigt werden, dass MCMV-Wildtyp die Bak-Oligomerisierung inhibieren kann. Fehlt m41.1 im Virus, so kann die Oligomerisierung nicht mehr inhibiert werden. Der Wildtyp-Phänotyp kann lediglich mit der Substitutionsrevertante mit $Bcl-x_L$ wieder erreicht werden (Abb. 31).



Abbildung 31: Inhibition der Bak-Oligomerisation durch m41.1 im viralen Kontext. Flag-Bak exprimierende, Bax negative MEFs wurden mit einer MOI von fünf infiziert. 15 h nach Infektion wurde die Bak-Oligomerisierung durch fünfstündige Inkubation mit 450 nM Staurosporin (STS) stimuliert. Bak-Oligomere wurden durch Inkubation mit 1',6'-bismaleimidohexane (BMH) für 30 Minuten kovalent gebunden.

Um zu untersuchen, ob die Inhibition der Bak-Oligomersierung auch von dem m41.1 Protein allein ermöglicht wird, wurden die oben erwähnten Bax-defizienten, Flag-Bak exprimierenden Zellen retroviral transduziert. Die Bak-Oligomerisierung wurde 48 Stunden nach Transduktion durch Inkubation mit 450 nM Staurosporin für 15 Stunden induziert. Die Oligomere wurden anschließend durch Inkubation mit BMH kovalent gebunden und im Western Blot analysiert.

In Abbildung 32 ist zu sehen, dass die Bak-Oligomerisierung in den mit m41.1 transduzierten im Vergleich zu den mock-Zellen oder jenen mit dem leeren Vektor eindeutig reduziert ist. Gleichzeitig ist zu beobachten, dass die Inhibition der Bak-Oligomerisierung durch m41.1 so effizient ist wie jene, die durch Bcl- x_L -Transduktion zu beobachten ist. Allerdings wurde Effizienz der Transduktion nicht getestet. Daher könnte es sein, dass die Transduktion mit Bcl- x_L wirksamer als die mit m41.1 war, also mehr Zellen transduziert wurden, oder die Expression in den Zellen höher war.


Abbildung 32: Inhibition der Bak-Oligomerisation durch m41.1. Flag-Bak exprimierende, Bax negative MEFs wurden retroviral Transduziert. 48 h nach Transduktion wurde die Bak-Oligomerisierung durch 15 stündige Inkubation mit 450 nM Staurosporin (STS) stimuliert. Bak Oligomere wurden durch Inkubation mit 1',6'- bismaleimidohexane (BMH) für 30 Minuten kovalent gebunden.

Da nun gezeigt war, dass m41.1 die Bak-Oligomerisierung sowohl im viralen Kontext, als auch bei alleiniger Expression in Bax knockout Zellen inhibiert sollte abschließend geklärt werden, ob auch die vor der Oligomerisierung gelegene konformationale Aktivierung von Bak inhibiert werden kann. Bei dieser Konformationsänderung wird die N-terminale apoptotische Domäne freigelegt, welche dann als Epitop mit einem spezifischen anti Bak N-Terminus Antikörper unter nicht denaturierenden Bedingungen detektiert werden kann

Um die konformationale Aktivierung von Bak darzustellen wurden 10.1 Fibroblasten infiziert und nach sechs bzw. 16 h fixiert (Abb. 33). Zusätzlich wurden mock-Zellen als Negativkontrolle und Staurosporin (fünf Stunden 0,5 μ M) behandelte mock-Zellen als Positivkontrolle verwendet. Anschließend erfolgte der Nachweis von aktivem Bak mit einem spezifischen anti Bak N-Terminus Antikörper. Die Auswertung erfolgte am konfokalen Laserscan-Mikroskop.

Wie in Abbildung 33 zu sehen ist, führt die Infektion von MCMV in 10.1 Fibroblasten zur konformationalen Aktivierung von Bak, ohne dass ein weiterer Stimulus von Außen zugegeben werden muss. Weder m41.1 noch Bcl- x_L sind in der Lage diese Aktivierung zu Inhibieren. Die Frage stellt sich allerdings, ob m41.1 aktiv zu einer konformationalen Aktivierung von Bak führt. Das Bak auch in Zellen in der aktiven Konformation vorliegt, die mit repBcl-



 x_L infiziert waren legt nahe, dass dieses nicht der Fall ist, da in dieser Mutante kein m41.1 exprimiert wird.

Abbildung 33: Untersuchungen zur konformationalen Aktivierung von Bak im Rahmen der MCMV-Infektion. 10.1 Zellen wurden mit einer MOI von drei infiziert und nach der angegebenen Zeit fixiert. DNA wurde durch anfärben mit DAPI und aktives Bak durch Färbung mit Antikörper sichtbar gemacht, der spezifisch den N-Terminus von Bak erkennt. Infizierte Zellen wurden zudem durch das vom Virus exprimierten GFP von den uninfizierten Zellen unterschieden. Die Aktivierung von Bak wurde in uninfizierten Zellen durch Inkubation mit 0,5 µM Staurosporin induziert.

Um sicher zu gehen, dass Bak nicht aktiv durch m41.1 aktiviert wird, wurden Bax- defiziente Zellen mit m41.1 transfiziert und in der Immunfluoreszenz die Aktivierung von Bak untersucht (Abb. 34).



Abbildung 34: Untersuchungen zur konformationalen Aktivierung durch Expression von m41.1. Bax ko Zellen wurden mit PolyFect transfiziert und 32 h später fixiert. DNA wurde durch Anfärben mit DAPI und aktives Bak durch Färbung mit einem Antikörper sichtbar gemacht, der spezifisch den N-Terminus von Bak erkennt. Die Aktivierung von Bak in mock Zellen wurde durch Inkubation für drei Stunden mit 0,5 μ M Staurosporin induziert.

In Abbildung 34 ist zu sehen, dass die Expression von m41.1 allein in Bax-defizienten Zellen nicht zu einer Aktivierung von Bak führt. Die Bak-Aktivierung im Rahmen der Infektion würde demnach nicht aktiv vom Virus ausgehen sondern eine allgemeine Apoptoseauslösung durch die Infektion zeigen.

3.2.5.4 Evolutionäre Konservierung des m41.1 Proteins

Da der Wirkmechanismus von m41.1 nun geklärt war, sollte überprüft werden, ob die spezifische Bak-Inhibition durch MCMV auch in anderen Viren zu finden ist. Dazu wurde die

Proteinsequenz von m41.1 mit alle verfügbaren CMV-Sequenzen verglichen. In humanen und Primaten CMVs konnten keine Sequenzhomologe gefunden werden.

Da der Bax spezifische Apoptoseinhibitor von MCMV (m38.5) allerdings auch keine Homologie zum HCMV Apoptoseinhibitor (UL37x1) besitzt, es jedoch an der entsprechenden Position im Genom zu finden und auch in seiner Funktion homolog ist, kann vermuten werden, dass es im Fall von m41.1 ähnlich ist.

Aus diesem Grund wurde das Positionshomolog von m41.1, das UL41a aus BAC-DNA des HCMV Stamm AD169 kloniert und mit der Replacer-Technologie in das MCMV Δm41 eingebracht. Das rekonstituierte Virus (repUL41a) wurde nunmehr auf die Fähigkeit, Staurosporin-induzierte Apoptose zu inhibieren untersucht. Wie in Abb xy zu sehen ist, besitzt diese Mutante weiterhin den m41.1ko-Phänotyp. Weder die Virus-induzierte Apoptose, noch Staurosporin-induzierte Apoptose können durch die Expression von UL41a im MCMV-Kontext auf murinen Fibroblasten inhibiert werden (Abb 35).



Abbildung 35: Vitalitätstests von infizierten Zellen. 10.1 Fibroblasten wurden mit einer MOI von 3 infiziert. Sechs Stunden nach Infektion erfolgte die Behandlung mit Staurosporin bzw. DMSO als Kontrolle. Die Vitalität der Zellen wurde 18 Stunden nach Behandlung mittels MTT gemessen.

Die Unfähigkeit des UL41a Proteins Apoptose im MCMV Kontext zu inhibieren muss allerdings nicht zwangsläufig bedeuten, dass es sich nicht um einen Apoptoseinhibitor handelt. Da UL41a ein Protein aus dem humanen CMV ist, könnte es sein, dass es seine antiapoptotische Funktion nur in humanen, nicht aber in murinen Zellen ausüben kann. Da humane Zellen für MCMV nicht permessiv sind, wurde überprüft, ob die Expression von UL41a in Kombination mit dem bekannten Bax-spezifischen Apoptoseinhibitor aus HCMV (UL37x1) in transfizierten Hela-Zellen zu einem Schutz gegenüber Fas-induzierter Apoptose führt.



Abbildung 36: Vitalität von transfizierten Hela-Zellen. Hela-Zellen wurden mit PolyFect transfiziert. 24 h später erfolgte die Behandlung der Zellen mit humanem Fas (1:5000) und/oder 5 μ g/ml CHX. Die Vitälität der Zellen wurde nach 18 h durch einen MTT-Test ermittelt, wobei die Vitalität relativ auf den Wert der jeweiligen CHX-behandelten Zellen bezogen wurde.

In Abbildung 36 ist eindeutig zu sehen, das UL41a auch nicht nach Transfektion in humanen Zellen vor Apoptose schützen kann. In den humanen Hela-Zellen reicht die Expression des Bax-spezifischen Apoptoseinhibitors aus um Fas-induzierte Apoptose fast vollständig zu inhibieren. Die Koexpression von UL41a scheint, wenn überhaupt, hier nur einen nachteiligen Effekt zu haben. Die Apoptoseinhibition sowohl in den UL37x1, als auch der Bcl-x_L exprimierenden Zellen nimmt bei einer Koexpression von UL41a ab.

Viele virale Proteine benötigen zur Ausübung ihrer Funktion weitere virale Proteine. Daher sollte nun untersucht werden, ob UL41a im Rahmen der HCMV-Infektion Apoptose inhibiert. Hierzu wurde das UL41a Gen des HCMV-Stamm AD169 durch ein Zeocin-Resistenzgen ersetzt. Die resultierende Deletionsmutante wurde in MRC-5 Zellen rekonstituiert. Um eine antiapoptotische Funktion von UL41a ermitteln zu können, wurden die humanen Fibroblasten-Linien HFF und MRC-5 jeweils mit dem Wildtyp (AD169) und der Deletionsmutante (AD169 Δ UL41a) infiziert. Da HCMV langsamer repliziert als MCMV, wurde 48 Stunden bis zur Apoptose-Induktion durch Staurosporin bzw. anti-humanen Fas Antikörper gewartet.

In Abbildung 37 ist zu sehen, dass die Deletion von UL41a in dem HCMV-Stamm AD169 nicht zu einem ausgeprägten Phänotyp bezüglich der Apoptoseinhibition führt. HCMV schützt in den untersuchten Zell-Linien sowohl vor Fas-, als auch Staurosporininduzierter Apoptose in einer UL41a-unabhängigen Weise. Weshalb UL41a höchstwahrscheinlich kein Funktionshomolog von m41.1 ist.



Abbildung 37: Vitalität von HCMV infizierten humanen Fibroblasten. Humane Fibroblasten wurden in 96well Platten mit hoher MOI infiziert. 48h nach Infektion wurden diese mit 150 nM Staurosporin (bzw. DMSO), oder mit anti- humanem Fas Antikörper (1:5000) und/oder 5 µg/ml Cycloheximid (CHX) behandelt. 20 Stunden nach Behandlung wurde ein MTT-Test durchgeführt und die Vitalität auf die jeweilige mock Kontrolle (DMSO bzw. CHX) relativiert.

Da die Sequenzen der Cytomegalieviren von Mäusen und Ratten gut konserviert sind, wurde nun ein m41.1-Homolog in den Ratten Cytomegalieviren gesucht. In Abbildung 38 ist zu sehen, dass eine m41.1 homologe Sequenz in den Muromegaloviren RCMV-Maastricht (RCMV-M) und RCMV-England (RCMV-E) an homologer Position im Genom zu finden ist.

BAD A	<mark>A</mark> VG	G	OOD																										
MCMV RCMV-	E	1 1	MIV MIV	A A T L	M T M V	A A A A	YMA YTI		P' R	тv 	RRI GRI	L P I	L P L P	R T E W	F R E K	R A R A	L R L R	ED		GVA AGI	LA AV	AS		C L Y A	TV	S S S S	GA GR	LR R R RI R H	57 55
cons	- 14	1	M T ∨ * * *	:	:.	· *	*	* *	P E		G K 1	κ.G.	:.	U W	Е К :	ΤŲ	ьк * *	:	· : :	GA	.GA	*	* *	RF	• A	:.	IA	*	55

Abbildung 38: Sequenzvergleich der m41.1 Proteine von MCMV, RCMV-E und RCMV-M. Proteinsequenzen der jeweiligen Viren wurden mittels T-Coffee alignt (www.tcoffee.org).

Da eine Sequenzhomologie nicht unbedingt eine Funktionshomologie bedeutet, wurde das m41.1 Homolog aus RCMV-E, dass e41.1 aus Virion-DNA (zur Verfügung gestellt von AG Voigt, RKI, Berlin) kloniert und zu Detektionszwecken mit einem HA-tag versehen.

In Abbildung 39 ist in der Überlagerung (merge) der Signale für e41.1 und HSP60 eine deutliche Kolokalisation zu sehen, e41.1 ist also wie m41.1 mitochondrial lokalisiert.

Die mitochondriale Lokalisierung von e41.1 war schon ein erster Hinweis auf die funktionale Homologie zwischen m41.1 und e41.1. Abschließend sollte überprüft werden, ob die ektopische Expression von e41.1 in Bax-defizienten Zellen diese vor Induktion der intrinsischen Apoptose schützt.



Abbildung 39: Überprüfung der zellulären Lokalisation von e41.1. Fibroblasten wurden mit pcDNAe41.1HA transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen fixiert und e41.1 mit einem Ratte anti HA Antikörper und anschließend mit einem anti Ratte-A488 Antikörper angefärbt. Mitochondrien wurden durch die Anfärbung mit einem anti HSP-60 Antikörper gefärbt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Laser-Scan-Mikroskopes.

In Abbildung 40 ist zu sehen, dass e41.1 in der Lage ist die Bax-defizienten Zellen vor Actinomycin D-induziertem Zelltod zu schützen, und zwar in etwa demselben Maße, wie es $Bcl-x_L$ gelingt. Dies bedeutet, dass m41.1 nicht nur Sequenzhomologe in Ratten CMVs besitzt, sondern, dass diese auch in ihrer Funktion homolog sind.



Abbildung 40: Apoptose-Inhibition in transduzierten murinen embryonalen Fibroblasten. Bax-defiziente MEFs wurden mit Retrovirus transduziert, um e41.1, als Positivkontrolle Bcl- x_L und als Negativkontrollen m38.5 oder GFP zu exprimieren. 24 h nach Transduktion erfolgte die Apoptoseinduktion mittels Actinomycin D (2 µg/ml). 45 h nach Behandlung erfolgte die Messung der Vitalität mittels MTT-Test.

3.2.5.5 Koexpression von spezifischen Bax- und Bak-Inhibitoren zur Inhibition der Mitochondrien-vermittelten Apoptose

Viele Viren haben im Laufe der Evolution Bcl-2 Homologe, bzw. Analoge in ihr Genom aufgenommen, inhibieren also sowohl Bax als auch Bak mit einem Protein. In dieser Arbeit konnte bislang gezeigt werden, das m41.1 von MCMV bzw. e41.1 von RCMV-E Bakspezifische Inhibitoren sind. Des Weiteren ist bekannt, dass sowohl MCMV, als auch HCMV Bax-spezifische Inhibitoren exprimieren, die so genannten vMIAs (m38.5 bzw. UL37x1). Es sollte nun abschließend geklärt werden, ob die Bak-spezifischen Inhibitoren zusammen mit den Bax-spezifischen Inhibitoren exprimiert, eine Bcl-2 ähnliche Funktion ausüben können.

Hierzu wurden zuerst murine Fibroblasten mit den entsprechenden Konstrukten transfiziert. In Abbildung 41 ist zu sehen, dass die alleinige Expression eines Bax- oder Bakspezifischen Inhibitors nicht ausreicht um die Fibroblasten vor Fas-induzierter Apoptose zu schützen. Die Kombination eines Bax-spezifischen Inhibitors aus HCMV (UL37x1) oder MCMV (m38.5) mit einem Bak-spezifischen Inhibitor aus MCMV (m41.1) oder RCMV (e41.1) bewirkt einen vollständig Schutz der Zellen vor Apoptose, ähnlich wie Bcl-x_L, ein Mitglied der Bcl-2 Familie.



Abbildung 41: Vitalität von transfizierten NIH 3T3-Zellen. NIH 3T3-Zellen wurden mit SuperFect transfiziert. 25 Stunden nach Transfektion erfolgte die Behandlung mit anti-murinem Fas Antikörper (1:2000) und/oder 2,5 µg/ml Cycloheximid (CHX). 45 Stunden nach Behandlung wurde die Vitalität durch einen MTT gemessen und in Relation zur Negativkontrolle (CHX) gesetzt.

Da gezeigt werden konnte, dass in murinen Zellen die Kombination von Bax- und Bak-spezifischen Inhibitor vor Fas-induzierter Apoptose schützt, sollte abschließend geklärt werden, ob dieses auch in humanen Zellen möglich ist. Hierfür wurden humane Hela-Zellen mit den entsprechenden Konstrukten transfiziert und anschließend anti-humanem Fas Antikörper behandelt.

In Abbildung 42 ist zu sehen, dass die Expression des Apoptose-Inhibitors von HCMV (UL37x1), welcher in murinen Fibroblasten ein Bax-spezifischer Inhibitor ist, in humanen Zellen ausreicht, um diese vor Fas-induzierter Apoptose zu schützen. Die Koexpression von UL37x1 mit dem Bak-spezifischen Inhibitor m41.1 führt eher zu einem verminderten Schutz vor Apoptose im Vergleich zu der alleinigen Expression von UL37x1.



Abbildung 42: Vitalität von transfizierten Hela Zellen. Hela-Zellen wurden mit PolyFect transfiziert. 24 h später erfolgte die Behandlung der Zellen mit humanem Fas (1:5000) und/oder 5 μ g/ml CHX. Die Vitälität der Zellen wurde nach 18 h durch einen MTT-Test ermittelt, wobei die Vitalität relativ auf den Wert der jeweiligen CHX-behandelten Zellen bezogen wurde.

Interessanterweise bewirkt die Koexpression der Bax- und Bak-spezifischen Apoptose-Inhibitoren von MCMV (m38.5, m41.1) keinen erkennbaren Schutz vor Fas-induzierter Apoptose in den humanen Hela-Zellen. Die Inhibition des intrinsischen Apoptosewegs über m38.5 und m41.1 könnte demnach ein Faktor der Spezies-Spezifität von MCMV sein, da dieses in murinen, nicht aber in humanen Zellen gelingt.

4. Diskussion

4.1 Organisation des m41 Lokus

Gene, die sich innerhalb eines anderen Gens befinden werden auch als verschachtelte Gene bezeichnet. Solche Gene lassen sich in vielen viralen Genomen aber auch im menschlichen (Yu, Ma et al. 2005) Genom finden.

Die Entdeckung der verschachtelten Gene gelang der Arbeitsgruppe um Fristrom (Henikoff, Keene et al. 1986). Sie bewiesen im Drosophila Genom die Existenz eines Gens innerhalb eines Introns eines anderen Genes. Wie hier gezeigt, so befinden sich verschachtelte Gene in höheren Eukaryoten normalerweise in einem Intron eines gespleißten, größeren Gens, auf dem gegenüberliegenden Strang.

Auch von Cytomegalieviren ist die Existenz solcher Gene bekannt. So konnte von Welch et al. gezeigt werden, dass sowohl humane, als auch Affen-Cytomegalieviren in der Region, die für das assembly Protein kodiert, vier verschachtelte Gene innerhalb desselben Leserahmens organisiert sind (Welch, McNally et al. 1991). Interessant ist hierbei, dass sich die verschachtelten Gene nicht in einem Intron eines anderen Gens befinden. Des Weiteren sind sie auch auf demselben Strang kodiert und besitzen dasselbe 3' Ende.

Um putative Gene vorher zu sagen, werden in der Regel zur Vereinfachung bestimmte minimale Vorraussetzungen festgelegt. Zum Beispiel werden meistens nur solche Gene berücksichtigt, welche ein minimales Potential für 100 Aminosäuren aufweisen und zu höchstens 60 % mit anderen Genen überlappen. Unter diesen Umständen wurden bei der initialen Analyse des MCMV Genoms von Rawlinson et al. (Rawlinson, Farrell et al. 1996) mehrere Gene nicht berücksichtigt. Eine Reevaluierung des Genoms von Brocchieri et al. (Brocchieri, Kledal et al. 2005) zeigte die mögliche Existenz von mehreren auffällig kleinen und überlappenden Genen im MCMV Genom. Eines dieser neuen Gene ist das m41.1 Gen, welches vollständig in dem größeren m41 Gen 10 Nucleotide nach dessen Startkodon beginnt.



Abbildung 43: Lokalisierung des m41.1 ORF innerhalb des m41 ORF

m41 und m41.1 liegen auf demselben Strang und werden höchstwahrscheinlich von derselben RNA translatiert (siehe Abb. 43) (Cam, Picard-Maureau et al. 2009 submitted to PLOS Pathogens). Sie stehen demnach unter demselben Promotor und weisen dieselbe Expressionskinetik auf, welches eine differenzierte Regulierung der beiden Gene unmöglich macht.

Es ist überraschend zu sehen, dass MCMV verschachtelte Gene entwickelt hat, da es eine Kapazität von etwa 230 kbp aufweist, also bei weitem genug DNA, um alle Gene auf klassische Art und Weise zu kodieren. Auch ist zu sehen, dass in dem Beispiel von m41/m41.1 nicht ein Intron des größeren Gens, sondern ein anderer Leserahmen zum Kodieren des kleineren Gens genutzt wird. Dieses lässt die Vermutung zu, dass es bei de beiden Genen zu einer Koevolution kam. Anscheinend sind beide Proteine für das Virus so wichtig, dass der Verlust eines der Gene zu einem Wachstumsdefizit führen würde.

Die Kodierung des verschachtelten Gens auf demselben Strang bietet für das Virus auch den Vorteil, dass es nicht zu einer Unterdrückung der Translation kommt, wie es der Fall wäre, wenn die Gene auf den gegenüberliegenden Strängen kodiert wären. Bei gleichzeitiger Transkription würde hier die Formation von doppelsträniger RNA zu einer Behinderung in der Anlagerung der ribosomalen Untereinheiten führen.

Ein weiterer Punkt der für die Kodierung beider Gene auf demselben Strang spricht, ist die Vermeidung von dopelsträngiger RNA, durch die die angeborene Immunantwort aktiviert wird. Doppelsträngige RNA wird in eukaryotischen Zellen durch Proteinkinase R (PKR) erkannt (Samuel, Duncan et al. 1984). Nach Aktivierung von PKR phosphoryliert diese die Alpha-Untereinheit des eukaryotischen Initiationfaktors 2 (eIF2 α), welches die Translation neuer Proteine verhindert (de Haro, Mendez et al. 1996). Zusätzlich aktiviert doppelsträngige RNA die Oligoadenylatsynthetase (OAS), welche durch Bildung von 2'-5'-Oligoadenylaten ihrerseits die RNAse L aktiviert, die sowohl virale als auch zelluläre RNAs degradiert (Castelli, Wood et al. 1998).

Cytomegalieviren kodieren allerdings für überlappende Gene auf gegenüberliegenden Strängen, in Folge dessen es auch im Rahmen der Infektion zur Bildung von doppelsträngiger RNA kommt. Die Aktivierung der angeborene Immunantwort gegen doppelsträngige RNA wird allerdings hierbei durch den m142/m143-Komplex bei MCMV (Budt, Niederstadt et al. 2008) bzw. TRS1/IRS1 bei HCMV inhibiert (Child, Hakki et al. 2004).

4.2 Bedeutung des m41 Proteins in der MCMV-Infektion

In den initialen Studien bezüglich des m41 konnte gezeigt werden, dass die Deletion des Gens zur Apoptoseinduktion in Fibroblasten und zu einem Wachstumsdefizit in Endothelzellen führt (Brune, Nevels et al. 2003). Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurden mehrere Mutanten auf Grundlage der Deletionsmutante hergestellt. Hierbei wurde der m41 ORF mit einem zusätzlichen HA-tag zur Detektion in den m02-m06 Lokus eingeführt.

Der m02-m06 Lokus beherbergt Gene der m02 Familie, welche für putative Typ I Transmembran Glykoproteine kodieren (Oliveira, Park et al. 2002). Proteine dieser Familie sind für die virale Replikation in der Zellkultur, also in vitro, nicht notwendig und können daher deletiert werden ohne einen Phänotyp zu verursachen. In vivo führt die Deletion dieser Region jedoch zu einer starken Attenuierung des Virus. Dieses ist vermutlich in der Immunregulatorischen Funktion dieser Proteine begründet, da gezeigt werden konnte, dass die Deletion des Lokus bei Infektion von immunodefizienten γ_c /Rag2 Mäusen, welche unter anderem nicht in der Lage sind NK-Zellen zu produzieren, nicht zu einem Wachstumsdefizit führt.

Da das m41 Protein im Golgi-Apparat lokalisiert ist, sollte überprüft werden, ob die Golgi-Lokalisierung für die Funktion des Proteins essentiell ist. Hierfür wurde eine Mutante hergestellt, in der das Golgilokalisierungs-Motiv durch Nukleotidaustausch mutiert war.

In den ersten Untersuchungen mit den hergestellten Mutanten konnte nun gezeigt werden, dass die Deletion des m41 ORF zu einem Replikationsverlust in Makrophagen. Das Vorhandensein des m41 ORF ist also essentiell für die Vermehrung von MCMV in Makrophagen. Des Weiteren war zu beobachten, dass infizierte Fibroblasten im Gegensatz zu dem Wildtyp-Virus nicht mehr vor der Induktion der Mitochondrien vermittelten Apoptose mittels Staurosporin und Actinomycin D-Behandlung geschützt waren.

Bei dem Vergleich der hergestellten Mutanten zeigte sich nun aber, dass nur jene Variante ohne Kozak-Sequenz den Wildtyp-Phenotyp erreichte. Alle anderen Varianten, ob nun N- oder C-terminal mit einem HA-tag versehen, verhielten sich wie die Deletionsmutante.

Durch die erneute Sequenzanalyse des MCMV Genoms (Brocchieri, Kledal et al. 2005) wurde die Anwesenheit eines vorher unbekannten, zusätzlichen Gens innerhalb des m41 ORF bekannt, das m41.1 Gen. Die Expression dieses Gens ist nur in jener Mutante möglich, welche keine künstliche Kozak-Sequenz vor dem m41 Startkodon enthält. Zu diesem Zeitpunkt war es also sehr wahrscheinlich, dass der vorhergesagte m41.1 ORF die dominante Funktion ausübt. Dieses bestätigte sich bei Untersuchungen mit spezifischen Knockout-Viren, die entweder m41 oder m41.1 allein exprimierten. Überraschender Weise zeigte sich jedoch, dass die Expression des m41 Proteins bei einer Infektion von Makrophagen mit hoher MOI essentiell ist. Makrophagen, die mit Viren infiziert waren, die nur m41.1, aber nicht m41 exprimierten zeigten eine stark reduzierte Vitalität auf. Da auch die Expression von m41.1 in diesen Zellen für die Vitalität wichtig ist, konnte nicht geklärt werden, ob die Golgi-Lokalisierung für die Funktion des m41 Proteins essentiell wichtig ist.

4.3 Mögliche Funktion des m41 Proteins

Die anfänglichen Indizien bezüglich der Inhibition der Mitochondrien vermittelten Apoptose durch das m41 Protein konnten im weiteren Verlauf dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Es stellte sich vielmehr heraus, dass dem m41.1 Protein diese Aufgabe zukommt. Allerdings konnte die Relevanz der Expression des m41 Proteins bei der Infektion von Makrophagen gesehen werden. In Wachstumskurven war zunächst kein Phänotyp zu sehen. Die Infektion der Makrophagen mit hoher MOI führte jedoch bei einem Fehlen des m41 Proteins zu einer drastischen Reduzierung der Vitalität.

4.3.1 Mögliche Relevanz des m41 Proteins in Dissemination und Persistenz/Latenz

Makrophagen spielen eine große Rolle bei der Dissemination von CMVs in vivo, da sie sich im Organismus frei bewegen können (Stoddart, Cardin et al. 1994). Zusätzlich bilden sie das Reservoir für die persistente Infektion nach der Primärinfektion des Wirtes.

Da die Expression von m41 die Vitalität infizierter Makrophagen positiv beeinflusst ist anzunehmen, dass obwohl kein dominanter Phänotyp des m41 Deletions-Virus in vitro zu sehen war, dieses Virus in vivo stark attenuiert ist.

Es wäre zum einen anzunehmen, dass ein m41ko Virus weniger gut in seinem Wirt sich ausbreiten kann, da die infizierten Makrophagen sterben, bevor Nachkommenviren aus diesen Zellen produziert werden. Hiergegen spricht, dass in den untersuchten Bedingungen kein Wachstumsdefizit auf den Makrophagen-Zelllinien RAW 264.7 und IC-21 zu beobachten war.

Eine andere Möglichkeit der Attenuierung wäre die Unfähigkeit eines m41ko Virus in seinem Wirt zu persistieren, oder in Latenz zu bleiben, womit eine Reaktivierung des Virus und die Infektion von neuen Wirten unmöglich wären.

Da im Rahmen dieser Studie nur in vitro Untersuchungen durchgeführt wurden, wäre die Aufklärung der Relevanz des m41 Proteins bezüglich der Dissemination bzw. Persistenz/Latenz in nachfolgenden Studien zu untersuchen.

4.3.2 Mögliche Relevanz des m41 Proteins auf Cytokine/TLRs

Die Aufgabe der Cytokine besteht in der Kommunikation zwischen Zellen, ähnlich wie dieses bei Neurotransmittern und Hormonen der Fall ist. Anders aber als bei Hormonen und Neurotransmittern, die nur von spezifischen Zelltypen bzw. Organen sekretiert werden können, werden Cytokine von einer ganzen Reihe von Zellen sezerniert. Cytokinen kommt eine essentielle Rolle in der Embryogenese (Robertson 2007) aber auch in der adaptiven und angeborenen Immunantwort zu.

Sowohl Cytokine, als auch ihre spezifischen Rezeptoren gelangen während des Reifeprozesses in den Golgi-Apparat, um zur Plasmamembran zu gelangen, bzw. sezerniert werden zu können. Da m41 ist ein Transmembranprotein ist, welches im Cis-Golgi lokalisiert ist, wäre denkbar, das m41 Cytokine oder deren Rezeptoren im Golgi bindet und an einem weiteren Transport hindert (siehe Abb. 44). Auf diese Weise wäre auch der Makrophagen-spezifische Phänotyp zu erklären, da diese im besonderen Maße große Mengen von Cytokinen sezernieren.

Ein analoger Mechnaismus wäre für die Bindung und Inhibition von TLRs durch m41 denkbar. Da TLRs zur Erkennung von Pathogenen dienen und nach Erkennung dieser zum einen die Cytokinexpression initiieren und zum anderen Caspase-unabhängigen Zelltod (programmierte Nekrose) über RIP aktivieren (Kaiser and Offermann 2005), wäre dieses eine effektive Art diesen Teil der angeborenen Immunantwort auszuschalten.

4.3.3 Mögliche Relevanz des m41 Proteins in der Inhibition des programmiertem Zelltods

Programmierter Zelltod (Apoptose) ist ein Bestandteil des angeborenen Immunsystems. Er spielt eine wichtige Rolle nicht nur bei der Entfernung von infizierten, oder beschädigten Zellen, sondern auch bei der Differenzierung von Hematopoetischen Zellen und vielen anderen Prozessen (Opferman 2007).

Ein essentieller Bestandteil der Initiation und Exekution der Apoptose ist die Aktivierung der Caspase-Kaskade, die durch Aktivierung von Initiator-Caspasen eingeleitet wird. Eine dieser Initiator-Caspasen ist Caspase-2, welche neben dem Cytosol auch im Nukleus und im Golgi zu finden ist (Mancini, Machamer et al. 2000) (siehe Abb.44).

Die Aktivierung von Caspase-2 geschieht über eine autokatalytische Spaltung dieser, welche theoretisch durch eine Interaktion mit dem 41 Protein inhibiert werden könnte.

Eine andere Möglichkeit Apoptose zu blockieren wäre die Inhibition der GD3-Synthase. Diese Synthase wird zu frühen Zeitpunkten der Ceramid- und Fas-induzierten Apoptose aktiviert und synthetisiert im Golgi GD3-Ganglioside (Kristal and Brown 1999; Tomassini, Malisan et al. 2004). Nach der Synthese wird dieses Lipid aus dem Golgi ausgeschleust und induziert Apoptose durch Induktion von reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS), Porenformation in den Mitochondrien und Cytochrom c Freisetzung (Garcia-Ruiz, Colell et al. 2000). Zusätzlich inhibiert es den antiapoptotischen NFκB-Weg, welcher bei Fasmediierter Apoptose gleichzeitig aktiviert wird (Colell, Garcia-Ruiz et al. 2001).



Abbildung 44: Darstellung der möglichen Funktion des m41 Proteins. Durch die Golgi-Lokalisierung des m41 Proteins ist der Einfluss auf mehrere Wege denkbar. GD3 Synthase wird durch Ceramid und Todesezeptoren aktiviert. Die durch sie synthetisierten Ganglioside (GD3) inhibieren NFkB und aktivieren proapoptotische Reaktionen in den Mitochondrien, wie z.B. die Synthese von reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS). Caspase 2 ist wie die GD3 Synthase im Golgi lokalisiert und wird unter anderem durch p53 nach DNA-damage aktiviert und führt zur Apoptose. Cytokine, sowie deren Rezeptoren und TLRs gelangen auf ihren Wegen zur Cytoplasmamembran bzw. Endolysosomen durch den Golgi. Bei all diesen Molekülen ist eine inhibitorische Wirkung von m41 denkbar.

4.4 Bedeutung des m41.1 Proteins in der MCMV-Infektion

Ein dominanter Phänotyp des m41.1 Knockout-Virus im Rahmen der Infektion konnte sowohl auf Fibroblasten, als auch auf Makrophagen beobachtet werden, welches einen stark attenuierten Phänotyp bei einer Infektion in vivo vermuten lässt.

Es konnte durch Wachstumskurven gezeigt werden, dass das m41.1 Protein essentiell für die Replikation von MCMV auf Makrophagen ist. Die Infektion mit diesem Virus führt nicht zu einer Produktion von Nachkommen-Viren bei den untersuchten Makrophagenzelllinien (RAW264.7 und IC-21). Vermutlich ist dieses begründet in dem Vitalitätsverlust der infizierten Zellen, da bereits 18 Stunden nach Infektion mit dem m41.1 Knockout-Virus die meisten Zellen eine drastische Reduzierung des Stoffwechsels, gemessen am Umsatz von MTT, aufweisen. Es ist also denkbar, dass die infizierten Makrophagen sterben, noch bevor das Virus in der Lage ist einen vollständigen Replikationszyklus zu durchlaufen.

Ein Wachstumsdefizit des m41.1 Knockout-Virus auf 10.1 Fibroblasten konnte bei einer onestep Wachstumskurve jedoch nicht gesehen werden, was daran liegen könnte, das Fibroblasten allgemein unempfindlicher gegenüber apoptotischen Stimuli sind. Eine Infektion dieser Zelllinie mit hoher MOI zeigte jedoch, dass auch hier die Vitalität der Zellen im Vergleich zur Infektion mit dem Wildtyp-Virus stark reduziert war. Im Unterschied zu den Makrophagenzelllinien war der Phänotyp hier jedoch nicht bereits nach 18 sondern erst nach 72 Stunden zu beobachten, was für die relative Unempfindlichkeit der Zellen gegenüber virus-induzierter Apoptose spricht.

4.5 Antiapoptotische Funktion des m41.1 Proteins

Durch Versuche von sowohl infizierten, aber auch von transduzierten Zellen konnte gezeigt werden, dass das m41.1 Protein ein spezifischer Bak-Inhibitor ist. Zur Ausübung seiner Funktion bedarf es keiner weiteren viralen Proteine, es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass im Rahmen der Infektion solche die Wirkung von m41.1 verstärken, oder es stabilisieren und damit vor Abbau schützen, also dessen Halbwertszeit verlängern.

Von großem Nutzen war das Vorhandensein von Knockout-Zellen, denen entweder Bak, oder Bax fehlte. In zellulären Prozessen scheinen Bax und Bak oftmals redundant und in der Regel werden in der Mitochondrien-vermittelten Apoptose beide proapoptotischen Proteine aktiviert. Die Bak-spezifische anti-apoptotische Funktion von m41.1 hätte in normalen Fibroblasten nicht ohne weiteres untersucht werden können.

Der Phänotyp des m41.1 Knockout-Virus sowohl auf Fibroblasten, als auch auf Makrophagen ist durch die Inhibition von Bak durch m41.1 zu erklären. Durch Oligomerisations-Assays, bei denen Bak-Oligomere induziert und anschließend durch einen chemischen Crosslinker kovalent gebunden wurden, konnte weiterhin ermittelt werden, dass m41.1 die Oligomerisierung von Bak unterdrücken kann.

Der nächste Schritt vor der Oligmerisierung von Bak ist dessen konformationelle Aktivierung, bei der der N-Terminus des Proteins exponiert wird. Eine inhibitorische Wirkung auf diesen Schritt durch das m41.1 Protein konnte nicht gezeigt werden. m41.1 ist also in der Lage die Oligomerisierung, nicht aber die Aktivierung von Bak zu verhindern.

Da m41.1 ein stark hydrophobes Protein ist und eine Transmembrandomäne besitzt,

wäre es denkbar, dass es mit Bak im Transmembranbreich interagiert. Die Bindung von m41.1 an Bak könnte über dieselbe Domäne geschehen, die zur Bindung eines weiteren Bak und damit zur Bildung der initialen Bak-Homodimere benötigt wird. m41.1 würde also ein Konkurrent für die Bak-Bindestelle sein. Angenommen, m41.1 würde eine höhere Affinität zu dieser Stelle aufweisen, als Bak, so wäre ein Bak-m41.1 Dimer stabiler als ein Bak-Bak Homodimer, welches bei einem Überschuss von m41.1 zu einer vollständigen Verhinderung der Bak-Oligomerisierung führen würde.

Eine weitere Möglichkeit die Bildung von Bak-Oligmerisierung zu verhindern, wäre eine durch die Bindung von Bak an m41.1 induzierte Konformationsänderung. Durch eine solche theoretische Konformationsänderung könnte unter Umständen die Bindestelle für Bak maskiert sein, und so würde trotz Aktivierung von Bak dessen Oligomerisierung verhindert werden.

In nachfolgenden Studien könnte eine eventuelle Bindung von m41.1 an Bak über Immunopräcipitationen untersucht werden. Eine andere Möglichkeit eine Interaktion der Proteine nachzuweisen wäre eine Quervernetzung, wie es in dieser Arbeit auch für den Nachweis von Bak-Oligomeren geschehen ist. Der hierbei verwendete Quervernetzer BMH sollte allerdings nicht verwendet werden, da dieser die Quervernetzung über Sulfhydryle, also Schwefelreste der Aminosäure Cystein vermittelt. Das m41.1 Protein besitzt lediglich ein Cystein, welches die Quervernetzung unter Umständen erschweren könnte. Möglicherweise wäre eine UV-aktivierte, unspezifische Quervernetzung, wie sie BASED vermittel, die bessere Alternative.

Da sich herausstellte, dass die HA-getagte Variante des m41.1 Proteins in seiner Funktion stark beeinträchtigt ist, wäre es sinnvoll einen spezifischen Antikörper herzustellen. Da es sich allerdings um ein stark hydrophobes Protein handelt könnte die Expression in Bakterien zu Löslichkeitsproblemen führen weshalb die Herstellung und Immunisierung mit einem, oder mehreren m41.1 Peptiden die bessere Strategie sein könnte.

4.6 Konformationelle Aktivierung von Bak im Rahmen der MCMV-Infektion

Durch einen konformationsabhängigen Bak Antikörper konnte gezeigt werden, dass die Infektion von Fibroblasten mit MCMV zur konformationellen Aktivierung von Bak führt. Es wäre denkbar, dass m41.1 aktiv zu einer konformationellen Aktivierung von Bak führt. Da aber die Infektion mit dem m41.1knockout Virus auch zu einer Aktivierung führt, die alleinige m41.1 Expression durch Transfektion dieses nicht auslöst, ist eine Auslösung der Konformationsänderung durch m41.1 unwahrscheinlich.

Die virus-induzierte Konformationsänderung von Bak konnte auch nicht durch die Überexpression von Bcl- x_L in der repBcl- x_L -Mutante inhibiert werden. Für das Bcl-2 Protein wurde bereits gezeigt, dass es die Konformationsänderung von Bak nicht inhibiert, und präferentiell mit Bak in der aktiven Konformation interagiert (Ruffolo and Shore 2003). Da Bcl-2 und Bcl- x_L sowohl in ihrer Sequenz als auch in ihrer Funktion sehr homolog sind, kann davon ausgegangen werden, dass sich Bcl- x_L ähnlich verhält, also die Konformationsänderung von Bak nicht inhibieren kann.

Die Unfähigkeit eines viralen Bak-Inhibitor die Konformationsänderung zu verhindern ist nicht ungewöhnlich, da bislang nur von den Bcl-2-Homologen von Vaccinia Virus (F1L) und Fowlpox Virus (FPV039) eine Inhibition der konformationellen Aktivierung von Bak bekannt ist (Taylor, Quilty et al. 2006; Banadyga, Gerig et al. 2007).

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, durch die die Infektion mit MCMV zur Aktivierung von Bak führen könnte: Erkennung des Virus durch TLRs, aber auch die Induktion von ER-Stress und DNA-damage.

Ein früher Zeitpunkt der Virus-Erkennung und Bak-Aktivierung, ist die virus-bedingte Aktivierung von TLRs. Es ist bekannt, dass die Aktivierung bestimmter TLRs zur Phosphorylierung und damit Aktivierung von dem BH3-only Protein Bim führt (Hacker, Suttner et al. 2006), welches seinerseits Bak aktivieren und damit Mitochondrien-vermittelte Apoptose induzieren kann. Die Erkennung von CMVs durch bestimmte TLRs ist bereits bekannt. So werden die Glycoproteine gB und gH vom humanen Cytomegalovirus, welche in der Virushülle eingelagert sind, von TLR 1/2 und führen zu deren Aktivierung (Boehme, Guerrero et al. 2006). Des Weiteren konnte von einer anderen Arbeitsgruppe gezeigt werden, das murine Cytomegalovirus von natürlichen Interferon-produzierenden Zellen und dendritischen Zellen über TLR 9 erkannt wird (Krug, French et al. 2004). Auch eine Beteiligung von TLR3 an der Erkennung von MCMV wird diskutiert (Tabeta, Georgel et al. 2004).

Da Cytomegalieviren, anders als alpha-Herpesviren, nicht für so genannte virus-hostshutoff Proteine kodiert, kommt es im Laufe der Infektion nicht nur zur Synthese der zellulären, sondern auch der viralen Proteine. Diese zusätzliche Belastung des Systems mit Proteinen kann zur fehlerhaften bzw. unvollständige Faltung dieser führen. Sensoren im Endoplasmatischen Retikulum erkennen fehlgefaltete Proteine und führen zur Aktivierung der so genannten "unfolded protein response" (UPR). Die Aktivierung und Regulation des UPR konnte bereits im Rahmen der HCMV-Infektion gezeigt werden (Isler, Skalet et al. 2005). Im Laufe des UPR kommt es neben einer Hemmung der Translations und Transkription von Chaperonen, auch zu einer Aktivierung von Bim mit anschließender Aktivierung von Bak (siehe Abb. 45) (Szegezdi, Logue et al. 2006).



Abbildung 45: Mögliche Ursachen der Bak-Aktivierung durch die Infektion mit MCMV. Die Bak Aktivierung durch eine MCMV-Infektion ist durch mehrere Mechanismen erklärbar. Die Erkennung der viralen Glykoproteine, die sich in der Virushülle befinden können durch TLR1/2 erkannt werden. Dieses führt zur Spaltung des BH-3-only Proteins Bid in t-Bid, welches Bak aktiviert. Die Erkennung der CpG-Methylierung der viralen DNA in den Endolysosomen durch TLR9 würde ebenfalls über Aktivierung eines BH3-only Proteins, Bim zur Aktivierung von Bak führen. Die Erkennung der freien DNA-Enden des viralen Genoms im Zellkern kann zum einen über p53 direkt, zum anderen durch Transkription von BH3-only Proteinen ebenfalls zur Aktivierung von Bak führen. Zusätzlich ist dieses ebenso denkbar durch die Induktion der "unfolded protein response" (UPR) im Endoplasmatischen Retikulum bedingt durch die übermäßige Synthese neuer Proteine mit anschließender Aktivierung von Bim ebenso möglich.

Da MCMV im Nucleus repliziert, kann es bei Erkennung der Enden des viralen Genoms als Bruch in der doppelsträngigen DNA zur Aktivierung der DNA-damage Antwort kommen. Die Induktion dieser Antwort konnte bereits bei der Infektion von Zellen mit dem Herspes simplex (Shirata, Kudoh et al. 2005) und dem Epstein-Barr Virus (Kudoh, Fujita et al. 2005) nachgewiesen werden. Diese führt zur Aktivierung von p53, welches zum einen die Expression von BH3-only Proteinen induziert, welche ihrerseits Bak aktivieren können. Zum anderen kann p53 selbst aus den Zellkern geschleust werden und zu den Mitochondrien gelangen, wo es zur Aktivierung von Bax und Bak führt (Ferri and Kroemer 2001).

Welcher dieser vorgestellten Prozesse (Übersicht siehe Abb. 45) für die konformatio-

nelle Aktiverung von Bak verantwortlich ist, oder ob es sich um ein Zusammenspiel mehrerer Prozesse handelt kann in dieser Arbeit nicht beantwortet werden und Bedarf weiterer Untersuchungen.

4.7 Inhibition von Bax und Bak durch zwei unterschiedliche MCMV Proteine

Im Laufe der Koevolution von Virus und Wirt haben viele Viren Bcl-2 Homologe, wahrscheinlich zum Teil durch Aufnahme des zellulären Bcl-2 Gens in das virale Genom entwickelt. Muromegaloviren sind die bisher einzigen bekannten Pathogene, welche einen anderen Weg beschritten.

MCMV, als Vertreter der Muromegaloviren, exprimiert zwei einzelne Proteine unabhängig voneinander um spezifisch Bax durch m38.5 und Bak durch m41.1 zu inhibieren (siehe Abb. 46).



Abbildung 46: Inhibition der mitochondrial vermittelten Apoptose durch die MCMV Proteine m38.5 und m41.1. Die Konformationelle Aktivierung von Bax und Bak kann durch vielfältige Arten von Stress, wie z.B. DNA-Damage induziert werden. Bax wird daraufhin an die Mitochondrien rekrutiert, wo es zur Bildung von Homo-Oligomeren und zur Ausschüttung von proapoptotischen Faktoren, wie z.B. Cytochrom c kommt. Bak dissoziiert nach Stimuli von antiapoptotischen Proteinen, wie z.B. Bcl-x_L und bildet anschließend, wie Bax Homo-Oligomere. Auch hier kommt es zur Ausschüttung von proapoptotischen Proteinen, die Apoptose auslösen. Das m41.1 Protein inhibiert die Formation von Bak-Oligomeren und damit die Auschüttung von proapoptotischen Proteinen. m38.5 inhibiert Bax-mediierte Apoptose, der genaue Mechanismus ist noch nicht geklärt, aber die Inhibition der Bax-Oligomerisierung ist denkbar.

Das humane Cytomegalovirus, als Vertreter der Cytomegalieviren, exprimiert das UL37x1 Protein. Dieses besitzt keine Sequenzhomologie zu Bcl-2 oder zu den MCMV-Proteinen m38.5 und m41.1. Trotz der fehlenden Sequenzhomologie besitzt das UL37x1 jedoch eine dreidimensionale Faltung, die der des Bcl-2 Proteins ähnelt (Pauleau, Larochette et al. 2007).

Zu Beginn seiner Entdeckung wurde UL37x1, oder auch vMia genannt, als ein Baxspezifischer Apoptose-Inhibitor beschrieben. Spätere Untersuchungen in humanen Zellen zeigten, dass es zusätzlich in der Lage ist auch Bak zu inhibieren (Karbowski, Norris et al. 2006). Die unterschiedlichen Ergebnisse der beiden Studien könnte damit erklärt werden, dass UL37x1 möglicherweise nur in humanen Zellen in der Lage ist Bak zu inhibieren. Eine andere Möglichkeit wäre eine untergeordnete Rolle von Bak in der Apoptose von humanen Zellen sein, welches bislang nicht abschließend geklärt ist. Es bedarf also weiterer Studien um nachzuweisen, ob es sich bei diesem Protein um ein funktionelles Bcl-2 Homolog handelt.

Muromegaloviren kodieren nicht für ein Bcl-2 Homolg und sind bislang die einzigigen bekannten Pathogene, welche zwei unterschiedliche Proteine zur Inhibition von Bax und Bak entwickelt haben.

Viele der zellulären antiapoptotischen Bcl-2 Familienmitglieder hemmen sowohl Bax, als auch Bak. Die einzige Mitglieder, die hauptsächlich, aber nicht ausschließlich Bax bzw. Bak hemmen sind Bcl-B bzw. Mcl-1 (Zhai, Jin et al. 2008). Es besteht also für die Zelle die Möglichkeit, Bax und Bak differenziell zu regulieren, was eine nicht-redundante Funktion dieser Proteine impliziert. Tatsächlich konnte in Versuchen mit Cisplatin und *Neisseria gonorrhoeae* induzierter Apoptose diese nicht-redundante Funktion von Bax und Bak gezeigt werden (Kepp, Rajalingam et al. 2007).

Neuere Untersuchungen konnten zeigen, dass eine Zellzyklusfunktion von Bcl-2/Bcl- x_L -induziert wird, welche auf die Anwesenheit von Bax und Bak angewisen ist und wahrscheinlich unabhängig von der antiapoptotischen Wirkung der Proteine ist (Janumyan, Cui et al. 2008). Es wäre auch hier denkbar, dass die Funktion von Bak und Bax hier nicht redundant sind und MCMV möglicher Weise auf diese Art Einfluß auf den Zellzyklus der Wirtszelle nehmen könnte.

Die Einzigartigkeit in Sequenz und Funktion der MCMV-Proteine m41.1 und m38.5 kann in Zukunft ein Mittel sein, weitere nicht-redundante Funktionen von Bax und Bak aufzuklären.

4.8 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Infektion von Fibroblasten mit MCMV zu einer konformationellen Aktivierung von Bak führt. Dessen Oligomerisierung und anschließende Auslösung der Apoptose wird dabei durch den Bak-spezifischen Inhibitor m41.1 inhibiert. Virusmutanten, welche kein m41.1 exprimieren, sind nicht in der Lage, in Makrophagen eine produktive Infektion auszulösen. Da Makrophagen eine entscheidende Rolle bei der Dissemination von MCMV haben, ist anzunehmen, dass m41.1 für die Pathogenität des Virus von großer Bedeutung ist. Der Stellenwert von m41.1 wird zusätzlich durch die Tatsache verdeutlicht, dass dieser viraler Inhibitor der Bak-Oligomerisierung (vIBO) in verschiedenen Cytomeaglieviren konserviert ist.

MCMV und RCMV sind bislang die einzigen Pathogene bei denen eine Inhibition der Mitochondrien-vermittelten Apoptose über Bax/Bak durch zwei unterschiedliche Proteine nachgewiesen werden konnte. Diese Form der Inhibition könnte darauf hinweisen, dass Bax und Bak im Rahmen der CMV-Infektion nicht-redundante Funktionen ausüben und die individuelle Inhibition für das Virus von Vorteil ist.

5. Literaturverzeichnis

- Aoyagi, M., D. Zhai, et al. (2007). "Vaccinia virus N1L protein resembles a B cell lymphoma-2 (Bcl-2) family protein." <u>Protein Sci</u> **16**(1): 118-24.
- Arnoult, D., L. M. Bartle, et al. (2004). "Cytomegalovirus cell death suppressor vMIA blocks Bax- but not Bak-mediated apoptosis by binding and sequestering Bax at mitochondria." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 101(21): 7988-93.
- Arnoult, D., A. Skaletskaya, et al. (2008). "The murine cytomegalovirus cell death suppressor m38.5 binds Bax and blocks Bax-mediated mitochondrial outer membrane permeabilization." <u>Apoptosis</u> 13(9): 1100-10.
- Atalay, R., A. Zimmermann, et al. (2002). "Identification and expression of human cytomegalovirus transcription units coding for two distinct Fcgamma receptor homologs." <u>J Virol</u> 76(17): 8596-608.
- Bacchetti, S. and F. L. Graham (1977). "Transfer of the gene for thymidine kinase to thymidine kinase-deficient human cells by purified herpes simplex viral DNA." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **74**(4): 1590-4.
- Banadyga, L., J. Gerig, et al. (2007). "Fowlpox virus encodes a Bcl-2 homologue that protects cells from apoptotic death through interaction with the proapoptotic protein Bak." J <u>Virol</u> **81**(20): 11032-45.
- Barbi, M., S. Binda, et al. (2003). "A wider role for congenital cytomegalovirus infection in sensorineural hearing loss." Pediatr Infect Dis J 22(1): 39-42.
- Boehme, K. W., M. Guerrero, et al. (2006). "Human cytomegalovirus envelope glycoproteins B and H are necessary for TLR2 activation in permissive cells." J Immunol **177**(10): 7094-102.
- Borst, E. M., G. Hahn, et al. (1999). "Cloning of the human cytomegalovirus (HCMV) genome as an infectious bacterial artificial chromosome in Escherichia coli: a new approach for construction of HCMV mutants." J Virol **73**(10): 8320-9.
- Boyd, J. M., S. Malstrom, et al. (1994). "Adenovirus E1B 19 kDa and Bcl-2 proteins interact with a common set of cellular proteins." <u>Cell</u> **79**(2): 341-51.
- Brenner, D., P. H. Krammer, et al. (2008). "Concepts of activated T cell death." <u>Crit Rev On-col Hematol</u> **66**(1): 52-64.
- Britt, W. (2008). "Manifestations of human cytomegalovirus infection: proposed mechanisms of acute and chronic disease." <u>Curr Top Microbiol Immunol</u> **325**: 417-70.
- Brocchieri, L., T. N. Kledal, et al. (2005). "Predicting coding potential from genome sequence: application to betaherpesviruses infecting rats and mice." J Virol **79**(12): 7570-96.
- Brune, W., C. Menard, et al. (2001). "A ribonucleotide reductase homolog of cytomegalovirus and endothelial cell tropism." <u>Science</u> **291**(5502): 303-5.

- Brune, W., M. Nevels, et al. (2003). "Murine cytomegalovirus m41 open reading frame encodes a Golgi-localized antiapoptotic protein." J Virol **77**(21): 11633-43.
- Budt, M., L. Niederstadt, et al. (2008). "Specific inhibition of the PKR-mediated antiviral response by the murine cytomegalovirus proteins m142 and m143." J Virol.
- Cain, K., S. B. Bratton, et al. (2002). "The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex." <u>Biochimie</u> 84(2-3): 203-14.
- Cande, C., N. Vahsen, et al. (2004). "AIF and cyclophilin A cooperate in apoptosis-associated chromatinolysis." <u>Oncogene</u> 23(8): 1514-21.
- Castelli, J., K. A. Wood, et al. (1998). "The 2-5A system in viral infection and apoptosis." <u>Biomed Pharmacother</u> **52**(9): 386-90.
- Cheng, E. H., J. Nicholas, et al. (1997). "A Bcl-2 homolog encoded by Kaposi sarcomaassociated virus, human herpesvirus 8, inhibits apoptosis but does not heterodimerize with Bax or Bak." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **94**(2): 690-4.
- Cheng, E. H., T. V. Sheiko, et al. (2003). "VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis." <u>Science</u> **301**(5632): 513-7.
- Child, S. J., M. Hakki, et al. (2004). "Evasion of cellular antiviral responses by human cytomegalovirus TRS1 and IRS1." J Virol **78**(1): 197-205.
- Chowdhury, I., B. Tharakan, et al. (2008). "Caspases an update." <u>Comp Biochem Physiol B</u> <u>Biochem Mol Biol</u> 151(1): 10-27.
- Cicin-Sain, L., Z. Ruzsics, et al. (2008). "Dominant-negative FADD rescues the in vivo fitness of a cytomegalovirus lacking an antiapoptotic viral gene." J Virol 82(5): 2056-64.
- Colell, A., C. Garcia-Ruiz, et al. (2001). "Ganglioside GD3 enhances apoptosis by suppressing the nuclear factor-kappa B-dependent survival pathway." <u>Faseb J</u> **15**(6): 1068-70.
- Datsenko, K. A. and B. L. Wanner (2000). "One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **97**(12): 6640-5.
- de Haro, C., R. Mendez, et al. (1996). "The eIF-2alpha kinases and the control of protein synthesis." <u>Faseb J</u> **10**(12): 1378-87.
- Denecker, G., P. Ovaere, et al. (2008). "Caspase-14 reveals its secrets." J Cell Biol 180(3): 451-8.
- Dewson, G., T. Kratina, et al. (2008). "To trigger apoptosis, Bak exposes its BH3 domain and homodimerizes via BH3:groove interactions." <u>Mol Cell</u> **30**(3): 369-80.
- Douglas, A. E., K. D. Corbett, et al. (2007). "Structure of M11L: A myxoma virus structural homolog of the apoptosis inhibitor, Bcl-2." Protein Sci 16(4): 695-703.
- Du Pasquier, L. (2004). "Speculations on the origin of the vertebrate immune system." <u>Immunol Lett</u> **92**(1-2): 3-9.

- Efklidou, S., R. Bailey, et al. (2008). "vFLIP from KSHV inhibits anoikis of primary endothelial cells." J Cell Sci 121(Pt 4): 450-7.
- Elmore, S. (2007). "Apoptosis: a review of programmed cell death." <u>Toxicol Pathol</u> **35**(4): 495-516.
- Everett, H., M. Barry, et al. (2002). "The myxoma poxvirus protein, M11L, prevents apoptosis by direct interaction with the mitochondrial permeability transition pore." J Exp Med **196**(9): 1127-39.
- Fan, T. J., L. H. Han, et al. (2005). "Caspase family proteases and apoptosis." <u>Acta Biochim</u> <u>Biophys Sin (Shanghai)</u> 37(11): 719-27.
- Ferri, K. F. and G. Kroemer (2001). "Organelle-specific initiation of cell death pathways." <u>Nat Cell Biol</u> **3**(11): E255-63.
- Festjens, N., S. Cornelis, et al. (2006). "Caspase-containing complexes in the regulation of cell death and inflammation." <u>Biol Chem</u> 387(8): 1005-16.
- Galluzzi, L., C. Brenner, et al. (2008). "Viral control of mitochondrial apoptosis." <u>PLoS Pa-thog</u> **4**(5): e1000018.
- Garcia-Ruiz, C., A. Colell, et al. (2000). "Direct interaction of GD3 ganglioside with mitochondria generates reactive oxygen species followed by mitochondrial permeability transition, cytochrome c release, and caspase activation." <u>Faseb J</u> **14**(7): 847-58.
- Goldmacher, V. S., L. M. Bartle, et al. (1999). "A cytomegalovirus-encoded mitochondrialocalized inhibitor of apoptosis structurally unrelated to Bcl-2." <u>Proc Natl Acad Sci U</u> <u>S A 96(22)</u>: 12536-41.
- Graf, D., J. G. Bode, et al. (2007). "Caspases and receptor cleavage." <u>Arch Biochem Biophys</u> 462(2): 162-70.
- Guasparri, I., S. A. Keller, et al. (2004). "KSHV vFLIP is essential for the survival of infected lymphoma cells." J Exp Med **199**(7): 993-1003.
- Gubser, C., D. Bergamaschi, et al. (2007). "A new inhibitor of apoptosis from vaccinia virus and eukaryotes." <u>PLoS Pathog</u> **3**(2): e17.
- Hacker, G., K. Suttner, et al. (2006). "TLR-dependent Bim phosphorylation in macrophages is mediated by ERK and is connected to proteasomal degradation of the protein." Int Immunol **18**(12): 1749-57.
- Harvey, D. M. and A. J. Levine (1991). "p53 alteration is a common event in the spontaneous immortalization of primary BALB/c murine embryo fibroblasts." <u>Genes Dev</u> 5(12B): 2375-85.
- Henderson, S., D. Huen, et al. (1993). "Epstein-Barr virus-coded BHRF1 protein, a viral homologue of Bcl-2, protects human B cells from programmed cell death." <u>Proc Natl</u> <u>Acad Sci U S A</u> 90(18): 8479-83.
- Henikoff, S., M. A. Keene, et al. (1986). "Gene within a gene: nested Drosophila genes encode unrelated proteins on opposite DNA strands." <u>Cell</u> **44**(1): 33-42.

- Hosler, J. P., S. Ferguson-Miller, et al. (2006). "Energy transduction: proton transfer through the respiratory complexes." <u>Annu Rev Biochem</u> **75**: 165-87.
- Hovanessian, A. G. (2007). "On the discovery of interferon-inducible, double-stranded RNA activated enzymes: the 2'-5'oligoadenylate synthetases and the protein kinase PKR." <u>Cytokine Growth Factor Rev</u> **18**(5-6): 351-61.
- Howell, M., T. Williams, et al. (2005). "Herpesvirus pan encodes a functional homologue of BHRF1, the Epstein-Barr virus v-Bcl-2." <u>BMC Microbiol</u> **5**: 6.
- Iannello, A., O. Debbeche, et al. (2006). "Viral strategies for evading antiviral cellular immune responses of the host." J Leukoc Biol **79**(1): 16-35.
- Isler, J. A., A. H. Skalet, et al. (2005). "Human cytomegalovirus infection activates and regulates the unfolded protein response." J Virol **79**(11): 6890-9.
- Janumyan, Y., Q. Cui, et al. (2008). "G0 Function of BCL2 and BCL-xL Requires BAX, BAK, and p27 Phosphorylation by Mirk, Revealing a Novel Role of BAX and BAK in Quiescence Regulation." J Biol Chem 283(49): 34108-20.
- Jurak, I. and W. Brune (2006). "Induction of apoptosis limits cytomegalovirus cross-species infection." Embo J 25(11): 2634-42.
- Jurak, I., U. Schumacher, et al. (2008). "Murine cytomegalovirus m38.5 protein inhibits Baxmediated cell death." J Virol 82(10): 4812-22.
- Kaiser, W. J. and M. K. Offermann (2005). "Apoptosis induced by the toll-like receptor adaptor TRIF is dependent on its receptor interacting protein homotypic interaction motif." <u>J Immunol</u> 174(8): 4942-52.
- Kalejta, R. F., J. T. Bechtel, et al. (2003). "Human cytomegalovirus pp71 stimulates cell cycle progression by inducing the proteasome-dependent degradation of the retinoblastoma family of tumor suppressors." <u>Mol Cell Biol</u> 23(6): 1885-95.
- Karbowski, M., K. L. Norris, et al. (2006). "Role of Bax and Bak in mitochondrial morphogenesis." <u>Nature</u> **443**(7112): 658-62.
- Kato, H., O. Takeuchi, et al. (2006). "Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses." <u>Nature</u> **441**(7089): 101-5.
- Kawai, T. and S. Akira (2006). "TLR signaling." Cell Death Differ 13(5): 816-25.
- Kepp, O., K. Rajalingam, et al. (2007). "Bak and Bax are non-redundant during infection- and DNA damage-induced apoptosis." Embo J **26**(3): 825-34.
- Kinsella, T. M. and G. P. Nolan (1996). "Episomal vectors rapidly and stably produce hightiter recombinant retrovirus." <u>Hum Gene Ther</u> 7(12): 1405-13.
- Kischkel, F. C., S. Hellbardt, et al. (1995). "Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor." <u>Embo J</u> 14(22): 5579-88.

- Klein, J. (2004). "Did viruses play a part in the origin of the adaptive immune system?" <u>Folia</u> <u>Biol (Praha)</u> **50**(3-4): 87-92.
- Kristal, B. S. and A. M. Brown (1999). "Apoptogenic ganglioside GD3 directly induces the mitochondrial permeability transition." J Biol Chem 274(33): 23169-75.
- Krueger, A., I. Schmitz, et al. (2001). "Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex." J Biol Chem 276(23): 20633-40.
- Krug, A., A. R. French, et al. (2004). "TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function." <u>Immunity</u> 21(1): 107-19.
- Kudoh, A., M. Fujita, et al. (2005). "Epstein-Barr virus lytic replication elicits ATM checkpoint signal transduction while providing an S-phase-like cellular environment." <u>J Biol</u> <u>Chem</u> 280(9): 8156-63.
- Kvansakul, M., H. Yang, et al. (2008). "Vaccinia virus anti-apoptotic F1L is a novel Bcl-2like domain-swapped dimer that binds a highly selective subset of BH3-containing death ligands." <u>Cell Death Differ</u> **15**(10): 1564-71.
- Launay, S., O. Hermine, et al. (2005). "Vital functions for lethal caspases." <u>Oncogene</u> **24**(33): 5137-48.
- LeBien, T. W. and T. F. Tedder (2008). "B lymphocytes: how they develop and function." <u>Blood</u> **112**(5): 1570-80.
- Lee, E. C., D. Yu, et al. (2001). "A highly efficient Escherichia coli-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA." <u>Genomics</u> 73(1): 56-65.
- Lembo, D., M. Donalisio, et al. (2004). "The ribonucleotide reductase R1 homolog of murine cytomegalovirus is not a functional enzyme subunit but is required for pathogenesis." <u>J Virol</u> 78(8): 4278-88.
- Li, L. Y., X. Luo, et al. (2001). "Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria." <u>Nature</u> **412**(6842): 95-9.
- Loh, H. S., M. A. Mohd-Lila, et al. (2006). "Pathogenesis and vertical transmission of a transplacental rat cytomegalovirus." <u>Virol J</u> **3**: 42.
- Mack, C., A. Sickmann, et al. (2008). "Inhibition of proinflammatory and innate immune signaling pathways by a cytomegalovirus RIP1-interacting protein." <u>Proc Natl Acad Sci</u> <u>U S A</u> 105(8): 3094-9.
- Mancini, M., C. E. Machamer, et al. (2000). "Caspase-2 is localized at the Golgi complex and cleaves golgin-160 during apoptosis." J Cell Biol **149**(3): 603-12.
- Manzur, M., P. Fleming, et al. (2008). "Virally mediated inhibition of Bax in leukocytes promotes dissemination of murine cytomegalovirus." <u>Cell Death Differ</u>.

- Marshall, W. L., C. Yim, et al. (1999). "Epstein-Barr virus encodes a novel homolog of the bcl-2 oncogene that inhibits apoptosis and associates with Bax and Bak." J Virol **73**(6): 5181-5.
- McCormick, A. L. (2008). "Control of apoptosis by human cytomegalovirus." <u>Curr Top Microbiol Immunol</u> **325**: 281-95.
- McCormick, A. L., L. Roback, et al. (2008). "HtrA2/Omi terminates cytomegalovirus infection and is controlled by the viral mitochondrial inhibitor of apoptosis (vMIA)." <u>PLoS</u> <u>Pathog</u> **4**(5): e1000063.
- McCormick, A. L., V. L. Smith, et al. (2003). "Disruption of mitochondrial networks by the human cytomegalovirus UL37 gene product viral mitochondrion-localized inhibitor of apoptosis." J Virol **77**(1): 631-41.
- McGeoch, D. J., S. Cook, et al. (1995). "Molecular phylogeny and evolutionary timescale for the family of mammalian herpesviruses." J Mol Biol 247(3): 443-58.
- McGeoch, D. J., F. J. Rixon, et al. (2006). "Topics in herpesvirus genomics and evolution." <u>Virus Res</u> **117**(1): 90-104.
- Medema, J. P., C. Scaffidi, et al. (1997). "FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC)." Embo J 16(10): 2794-804.
- Medzhitov, R. and C. A. Janeway, Jr. (1997). "Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition." <u>Cell</u> **91**(3): 295-8.
- Meseda, C. A., J. R. Arrand, et al. (2000). "Herpesvirus papio encodes a functional homologue of the Epstein-Barr virus apoptosis suppressor, BHRF1." J Gen Virol **81**(Pt 7): 1801-5.
- Messerle, M., I. Crnkovic, et al. (1997). "Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(26): 14759-63.
- Mettenleiter, T. C., B. G. Klupp, et al. (2006). "Herpesvirus assembly: a tale of two membranes." <u>Curr Opin Microbiol</u> **9**(4): 423-9.
- Meylan, E. and J. Tschopp (2005). "The RIP kinases: crucial integrators of cellular stress." <u>Trends Biochem Sci</u> **30**(3): 151-9.
- Miramar, M. D., P. Costantini, et al. (2001). "NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor." J Biol Chem 276(19): 16391-8.
- Montel, A. H., M. R. Bochan, et al. (1995). "Fas involvement in cytotoxicity mediated by human NK cells." Cell Immunol **166**(2): 236-46.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." J Immunol Methods **65**(1-2): 55-63.
- Nadiri, A., M. K. Wolinski, et al. (2006). "The inflammatory caspases: key players in the host response to pathogenic invasion and sepsis." J Immunol **177**(7): 4239-45.

- Nava, V. E., E. H. Cheng, et al. (1997). "Herpesvirus saimiri encodes a functional homolog of the human bcl-2 oncogene." J Virol **71**(5): 4118-22.
- Nogal, M. L., G. Gonzalez de Buitrago, et al. (2001). "African swine fever virus IAP homologue inhibits caspase activation and promotes cell survival in mammalian cells." <u>J Vi-</u> <u>rol</u> **75**(6): 2535-43.
- Norris, K. L. and R. J. Youle (2008). "Cytomegalovirus proteins vMIA and m38.5 link mitochondrial morphogenesis to Bcl-2 family proteins." J Virol **82**(13): 6232-43.
- Oliveira, S. A., S. H. Park, et al. (2002). "Murine cytomegalovirus m02 gene family protects against natural killer cell-mediated immune surveillance." J Virol **76**(2): 885-94.
- Opferman, J. T. (2007). "Life and death during hematopoietic differentiation." <u>Curr Opin Im-</u> <u>munol</u> **19**(5): 497-502.
- Osborn, J. E. and D. L. Walker (1968). "Enhancement of infectivity of murine cytomegalovirus in vitro by centrifugal inoculation." J Virol 2(9): 853-8.
- Park, S. M. and M. E. Peter (2008). "microRNAs and death receptors." Cytokine Growth Factor Rev 19(3-4): 303-11.
- Pauleau, A. L., N. Larochette, et al. (2007). "Structure-function analysis of the interaction between Bax and the cytomegalovirus-encoded protein vMIA." <u>Oncogene</u> 26(50): 7067-80.
- Pereira, L. and E. Maidji (2008). "Cytomegalovirus infection in the human placenta: maternal immunity and developmentally regulated receptors on trophoblasts converge." <u>Curr</u> <u>Top Microbiol Immunol</u> **325**: 383-95.
- Rawlinson, W. D., H. E. Farrell, et al. (1996). "Analysis of the complete DNA sequence of murine cytomegalovirus." J Virol 70(12): 8833-49.
- Reeves, M. B., A. A. Davies, et al. (2007). "Complex I binding by a virally encoded RNA regulates mitochondria-induced cell death." <u>Science</u> **316**(5829): 1345-8.
- Robertson, S. A. (2007). "GM-CSF regulation of embryo development and pregnancy." <u>Cyto-kine Growth Factor Rev</u> **18**(3-4): 287-98.
- Ruffolo, S. C. and G. C. Shore (2003). "BCL-2 selectively interacts with the BID-induced open conformer of BAK, inhibiting BAK auto-oligomerization." J Biol Chem 278(27): 25039-45.
- Samuel, C. E., R. Duncan, et al. (1984). "Mechanism of interferon action. Increased phosphorylation of protein synthesis initiation factor eIF-2 alpha in interferon-treated, reovirus-infected mouse L929 fibroblasts in vitro and in vivo." J Biol Chem 259(21): 13451-7.
- Scaffidi, C., I. Schmitz, et al. (1999). "Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells." J Biol Chem **274**(32): 22532-8.
- Seth, R. B., L. Sun, et al. (2006). "Antiviral innate immunity pathways." <u>Cell Res</u> **16**(2): 141-7.

- Shirata, N., A. Kudoh, et al. (2005). "Activation of ataxia telangiectasia-mutated DNA damage checkpoint signal transduction elicited by herpes simplex virus infection." J Biol Chem 280(34): 30336-41.
- Skaletskaya, A., L. M. Bartle, et al. (2001). "A cytomegalovirus-encoded inhibitor of apoptosis that suppresses caspase-8 activation." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 98(14): 7829-34.
- Soderberg-Naucler, C. (2006). "Does cytomegalovirus play a causative role in the development of various inflammatory diseases and cancer?" J Intern Med **259**(3): 219-46.
- Spierings, D., G. McStay, et al. (2005). "Connected to death: the (unexpurgated) mitochondrial pathway of apoptosis." <u>Science</u> **310**(5745): 66-7.
- Stoddart, C. A., R. D. Cardin, et al. (1994). "Peripheral blood mononuclear phagocytes mediate dissemination of murine cytomegalovirus." J Virol **68**(10): 6243-53.
- Su, J., G. Wang, et al. (2006). "Myxoma virus M11L blocks apoptosis through inhibition of conformational activation of Bax at the mitochondria." J Virol **80**(3): 1140-51.
- Suda, T., T. Okazaki, et al. (1995). "Expression of the Fas ligand in cells of T cell lineage." J Immunol **154**(8): 3806-13.
- Suzuki, Y., Y. Imai, et al. (2001). "A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death." Mol Cell 8(3): 613-21.
- Szegezdi, E., S. E. Logue, et al. (2006). "Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis." <u>EMBO Rep</u> 7(9): 880-5.
- Tabeta, K., P. Georgel, et al. (2004). "Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection." <u>Proc Natl Acad Sci</u> <u>U S A</u> 101(10): 3516-21.
- Taylor, J. M., D. Quilty, et al. (2006). "The vaccinia virus protein F1L interacts with Bim and inhibits activation of the pro-apoptotic protein Bax." J Biol Chem **281**(51): 39728-39.
- Thome, M., P. Schneider, et al. (1997). "Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors." <u>Nature</u> **386**(6624): 517-21.
- Tomassini, B., F. Malisan, et al. (2004). "Calnexin suppresses GD3 synthase-induced apoptosis." <u>Faseb J</u> 18(13): 1553-5.
- Upton, J. W., W. J. Kaiser, et al. (2008). "Cytomegalovirus M45 cell death suppression requires receptor-interacting protein (RIP) homotypic interaction motif (RHIM)dependent interaction with RIP1." J Biol Chem **283**(25): 16966-70.
- Vande Walle, L., P. Van Damme, et al. (2007). "Proteome-wide Identification of HtrA2/Omi Substrates." J Proteome Res **6**(3): 1006-15.
- Vier, J., C. Furmann, et al. (2000). "Baculovirus P35 protein does not inhibit caspase-9 in a cell-free system of apoptosis." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> **276**(3): 855-61.

- Vyas, J. M., A. G. Van der Veen, et al. (2008). "The known unknowns of antigen processing and presentation." <u>Nat Rev Immunol</u> 8(8): 607-18.
- Wang, G. H., T. L. Garvey, et al. (1999). "The murine gammaherpesvirus-68 M11 protein inhibits Fas- and TNF-induced apoptosis." J Gen Virol 80 (Pt 10): 2737-40.
- Wasilenko, S. T., T. L. Stewart, et al. (2003). "Vaccinia virus encodes a previously uncharacterized mitochondrial-associated inhibitor of apoptosis." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 100(24): 14345-50.
- Wei, M. C., W. X. Zong, et al. (2001). "Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death." <u>Science</u> 292(5517): 727-30.
- Weir, J. P. (1998). "Genomic organization and evolution of the human herpesviruses." <u>Virus</u> <u>Genes</u> **16**(1): 85-93.
- Welch, A. R., L. M. McNally, et al. (1991). "Cytomegalovirus assembly protein nested gene family: four 3'-coterminal transcripts encode four in-frame, overlapping proteins." J <u>Virol</u> 65(8): 4091-100.
- Westphal, D., E. C. Ledgerwood, et al. (2007). "A novel Bcl-2-like inhibitor of apoptosis is encoded by the parapoxvirus ORF virus." J Virol **81**(13): 7178-88.
- Wigler, M., A. Pellicer, et al. (1978). "Biochemical transfer of single-copy eucaryotic genes using total cellular DNA as donor." <u>Cell</u> **14**(3): 725-31.
- Willis, S. N., L. Chen, et al. (2005). "Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins." <u>Genes Dev</u> **19**(11): 1294-305.
- Wu, G., J. Chai, et al. (2000). "Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO." <u>Na-ture</u> **408**(6815): 1008-12.
- Yanez, R. J., J. M. Rodriguez, et al. (1995). "Analysis of the complete nucleotide sequence of African swine fever virus." <u>Virology</u> **208**(1): 249-78.
- Youle, R. J. and A. Strasser (2008). "The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death." <u>Nat Rev Mol Cell Biol</u> **9**(1): 47-59.
- Yu, P., D. Ma, et al. (2005). "Nested genes in the human genome." Genomics 86(4): 414-22.
- Zhai, D., C. Jin, et al. (2008). "Differential regulation of Bax and Bak by anti-apoptotic Bcl-2 family proteins Bcl-B and Mcl-1." J Biol Chem **283**(15): 9580-6.
- Zipris, D. (2008). "Innate immunity and its role in type 1 diabetes." <u>Curr Opin Endocrinol</u> <u>Diabetes Obes</u> **15**(4): 326-31.
- Zong, W. X., C. Li, et al. (2003). "Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis." J Cell Biol 162(1): 59-69.

Danksagung

Zuerst möchte ich Herrn Priv. Doz. Wolfram Brune für die Überlassung dieses spannenden Themas danken. Durch seine Denkanstöße, kritischen Anmerkungen und Hilfsbereitschaft bei Problemen wurde die Entdeckung dieses interessanten Mechanismus erst möglich.

Ein großer Dank gilt auch Frau Priv. Doz. Annette Mankertz für die Betreuung meiner Doktorarbeit.

Für die Übernahme des Zweitgutachtens bin ich Herrn Prof. Rupert Mutzel sehr dankbar.

Meinen Kollegen möchte ich nicht nur für die fachliche Hilfe danken, sondern auch dafür, dass es Spaß gemacht hat während und nach der Arbeit die Zeit mit ihnen zu verbringen. Vor allem sind hierbei alle aktuellen und ehemaligen Mädels aus Raum 226 und besonders Claudia Mack gemeint. DANKE!

Der größte Dank gilt allerdings meiner Familie. Meiner Mama Elvira Syta, ohne die mein Studium schon nicht möglich gewesen wäre. Auch meiner Schwester Aileen Syta und meinem Opa Erwin Borschke möchte ich danken. Diese Menschen haben mich mit ihrem festen Glauben an mich immer unterstützt und mich ermutigt weiter zu machen, auch wenn es mal nicht so gut lief. Der größte Dank gilt aber meinem Ehemann Hakan Çam, der mich nicht nur immer unterstüzte, sondern auch durch sein fachliches Wissen helfend zur Seite stand.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ActD	Actinomycin D
ADV	Adenovirus
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
AIF	Apoptosis Inducing Factor
APAF-1	Apoptotic Protease Activating Factor-1
ASFV	African Swine Fever Virus
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
Bak	Bcl-2 homologous Antagonist Killer
BASED	Bis-[β -(4azidosalicylamindo)ethyl] disulfid
Bax	Bcl-2-Associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bcl-x _L	Bcl-2 like X protein large
BCR	B-cell Receptor
BH	Bcl-2 homology domain
Bid	BH3-interacting domain death agonist
BIR	baculovirus internes repeat
BMH	1',6'-Bismaleimidohexan
BSA	Bovine Serumalbumin
Casp	Caspase
cFLIP	cellular FLICE Inhibitory Protein
CMV	Cytomegalovirus
cyt c	Cytochrom c
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol
DED	death effector domain
DIABLO	direct IAP-binding protein with a low pI
DISC	death inducing signaling complex
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
dsRNA	doublestranded Ribonucleic acid
EBV	Epstein-Barr Virus

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylen-Glyceroltetraessigsäure
eIF2a	eukaryotic Initiation factor 2α
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FADD	Fas-associated protein with death domain
FCS	Fetal Calf Serum
FLICE	FADD-like IL-1 β -converting enzyme (= Caspase 8)
FPV	Fowlpoxvirus
FRT	flp-recombinase target
GADD	Growth Arrest and DNA Damage
GFP	Green Fluorescent Protein
HCMV	Humanes Cytomegalovirus
HPN	Herpesvirus pan
НРО	Herpesvirus papio
HRP	horseradish peroxidase
HtrA2	high-temperature requirement factor A2
HVS	Herpesvirus saimiri
IAP	Inhibitor of Apoptosis
Ig	Immunglobulin
IPAF	ICE-protease activating factor
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IRF3	Interferon Regulatory Factor 3
Kan	Kanamycin
KSHV	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus
MBP	Maltosebindendes Protein
MCMV	Murine Cytomegalovirus
MDA5	Melanoma-differentiation-associated gene 5
MEF	Murine Embryonic Fibroblasts
МНС	Major Histocompatibility Complex
MHV-68	Murine γ-herpesvirus 68
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus
MOI	Multiplicity of infection
MOMP	mitochondrial outer membrane permeabilization

MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MXV	Myxomavirus
NALP	NACHT, LRR, and pyrindomain. containing proteins
NK	Natürliche Killerzellen
OAS	Oligoadenylatsynthetase
OD	Optische Dichte
ORF	openreading frame
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaktion
PIDD	death domain-containing protein
P/S	Penicillin/Streptomycin
PKR	Proteinkinase R
PPVO	Parapoxvirus ORF Virus
PTP	permability transition pore
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RCMV	Rat Cytomegalovirus
RCMV-E	Rat Cytomegalovirus strain England
RCMV-M	Rat Cytomegalovirus strain Maastricht
RIG-I	Retinsäure induziertes Gen-I
RIP	receptor interacting protein
RNA	Ribonucleic acid
ROS	Reactiv Oxygen Species
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
smac	second mitochondria-derived activator of caspase
STS	Staurosporin
SV-40	Simian Virus 40
Tab.	Tabelle
t-Bid	truncated Bid
TCID	tissue culture infectious dose
TCR	T-cell Receptor
TIR	Toll and interleukin-1 receptor

Tm	Schmelztemperatur
TMB	3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidin
TNF	Tumor necrosis factor
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β
UPR	unfolded protein response
VACV	Vaccinia Virus
vFLIP	virales FLICE-inhibierendes Protein
vIBO	viraler Inhibitor der Bak-Oligomerisierung
vICA	viraler Caspase 8-Inhibitor
vIRS	viral Inhibitor of RIP-Signalling
vMIA	viraler Inhibitor der Mitochondrien vermittelten Apoptose