

## 2. ERGEBNISSE

Trotz des zur Zeit großen Interesses und der intensiven Forschung im Bereich der Interferone ist offensichtlich, dass bezüglich der Bedeutung und der Komplexität des IFN-Systems noch viele offene Fragen bestehen. Als zusätzliche molekulare Werkzeuge zur Aufklärung neuer zellulärer Funktionen und Wechselwirkungen sind virale Proteine von großem Nutzen, da aufgrund des Selektionsdruckes alle relevanten antiviralen Mechanismen der Zelle Ziel viraler Antagonisten geworden sind. In der vorliegenden Arbeit wurden die Interaktionen zwischen MCMV und der IFN $\alpha/\beta$ -Induktion untersucht und nach MCMV-kodierten Genprodukten gesucht, die in diese Interaktionen involviert sind, um sowohl wirts- als auch virusspezifische Aspekte zu betrachten. Hierbei ist die evolutionäre, hochselektive Anpassung der MCMV-kodierten Immunevasionsmechanismen an spezifische Zielmoleküle des Wirts von großem Vorteil.

### 2.1. MCMV inhibiert die IFN $\alpha/\beta$ -Expression nach einer initialen Induktionsphase

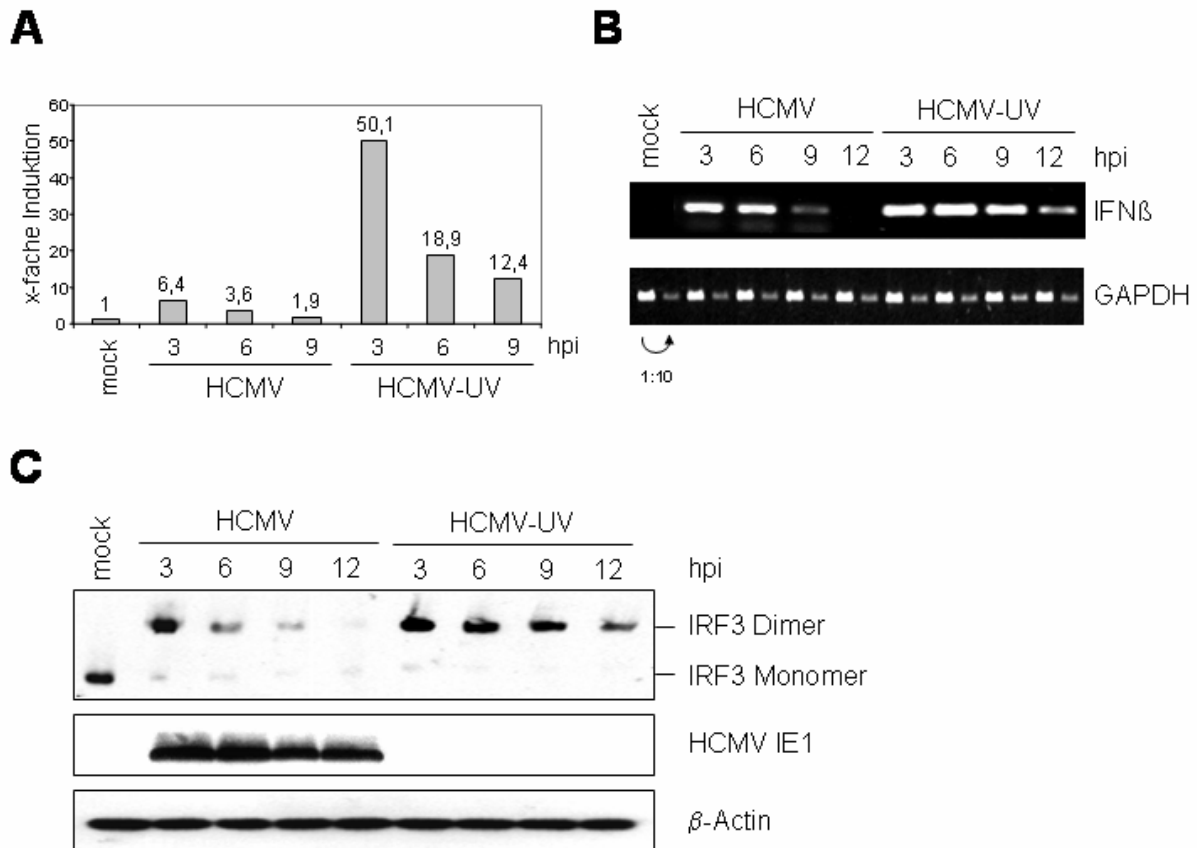
Bevor MCMV-kodierte Antagonisten gefunden werden konnten, mußte erst geklärt werden, inwiefern MCMV mit der IFN $\alpha/\beta$ -Induktion interferiert. Daher wurden systematisch sowohl die IFN $\alpha/\beta$ -Genexpression als auch die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren des IFN $\beta$ -Enhanceosoms nach Infektion mit MCMV untersucht. Hierbei wurden NIH3T3-Zellen für die biochemischen Analysen verwendet, da diese Fibroblasten-Zelllinie leicht zu kultivieren ist und sich gut mit MCMV infizieren lässt.

#### 2.1.1. Evaluierung der Methoden durch Reproduktion bekannter HCMV-Daten

Um die Methoden, die zur Analyse der MCMV-vermittelten Interaktionen mit der IFN $\alpha/\beta$ -Induktion verwendet werden sollten, auf ihre Eignung zu testen, wurden HCMV-Experimente durchgeführt, um bereits publizierte Ergebnisse zu reproduzieren. Es wurde gezeigt, dass nach Bindung von HCMV-Virionen an die Zelle IRF3 aktiviert und eine IFN $\beta$ -Antwort ausgelöst wird (Preston et al., 2001). Die IFN $\beta$ -Induktion ist in Zellen, die mit UV-inaktiviertem HCMV infiziert wurden, stärker als in Zellen, die mit replizierenden Viren infiziert wurden (Browne et al., 2001).

## ERGEBNISSE

Daher wurden für die Evaluierung der Methoden HCMV-infizierte Zellen verglichen mit Zellen, die mit UV-inaktivierten Virionen infiziert wurden.



**Abb. 2.1: Neu synthetisierte HCMV-Proteine inhibieren nach einer transienten Induktionsphase die IFN $\beta$ -Expression**

Humane Fibroblasten (MRC-5) wurden mock-behandelt oder mit dem HCMV-Laborstamm AD169 bzw. UV-inaktiviertem AD169 (MOI 3) infiziert. (A) Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion wurde Gesamt-RNA extrahiert. Mittels Real Time – PCR wurden die IFN $\beta$ -Transkripte quantifiziert und nach GAPDH-Abgleich in x-facher Induktion im Vergleich zum mock-Level aufgetragen. (B) Gesamt-RNA wurde mit Hilfe von semi-quantitativer RT-PCR auf IFN $\beta$ -mRNA untersucht. Die RNA-Mengen wurden anhand der GAPDH-Transkripte angeglichen. (C) Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion wurden Proteinlysate hergestellt. Mittels nativer PAGE und spezifischem Antikörper wurde die Dimerisierung von IRF3 nachgewiesen.  $\beta$ -Actin diente als Ladekontrolle, HCMV IE1 als Kontrolle für die HCMV-Infektion und Nachweis der erfolgreichen UV-Inaktivierung.

## ERGEBNISSE

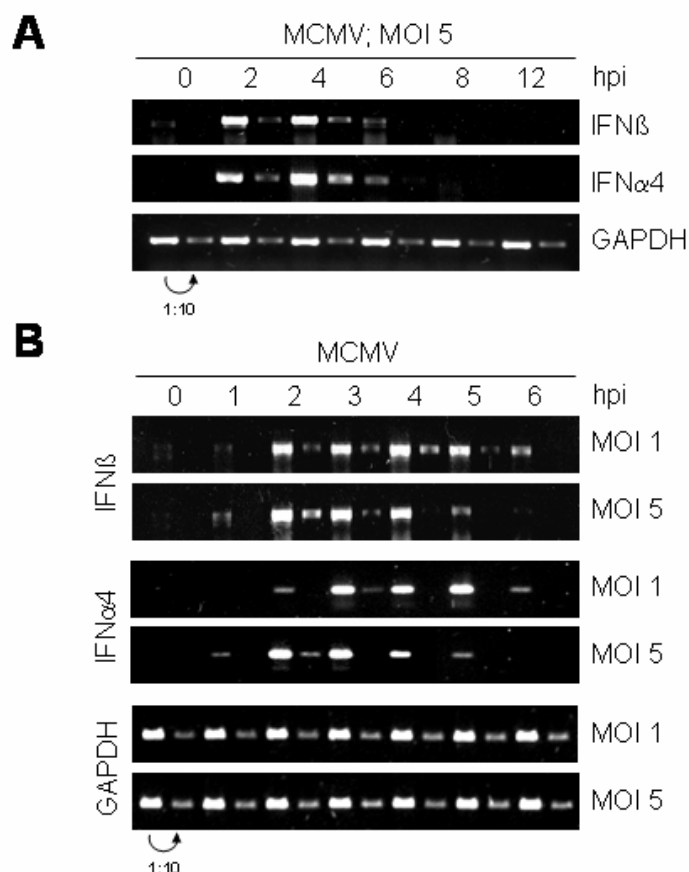
Die publizierten Daten bezüglich der IFN $\beta$ -Induktion in HCMV-infizierten Zellen konnten sowohl mittels quantitativer Real Time – PCR als auch mit semi-quantitativer RT-PCR reproduziert werden (Abb. 2.1 A und B). Dabei zeigten beide Methoden prinzipiell das gleiche Ergebnis. Der einzige Nachteil der semi-quantitativen RT-PCR ist, dass aufgrund der Sättigungsphase der PCR die Unterschiede nur in einem gewissen Fenster aufgelöst werden können. Dies ist auch der Grund, warum die GAPDH-Kontrollen immer mit zwei Verdünnungen durchgeführt wurden, wobei die zweite Verdünnung diejenige darstellt, in der die PCR-Reaktion nur in der exponentiellen Phase abläuft. Diese Problematik ist bei der Real time – PCR weniger gegeben, da diese Technik den Vorteil besitzt, dass das Fenster der zu auflösenden Unterschiede deutlich größer ist. Doch weil das Auflösungsvermögen der semi-quantitativen RT-PCR ausreicht und nun festgestellt wurde, dass die Aussagen beider Methoden vergleichbar sind, wurde die einfachere und kostengünstigere semi-quantitative Analyse ausgewählt.

Eine weitere Methode, die für die Durchführung dieser Arbeit benötigt, aber im Labor noch nicht standardisiert wurde, ist der Nachweis von Proteinkomplexen in nativen PAGE-Gelen. Daher wurden unter nativen Pufferbedingungen Proteinlysate von mock-behandelten bzw. infizierten Zellen hergestellt, um die Homodimerisierung des Transkriptionsfaktors IRF3 zu untersuchen. Wie Abb. 2.1 C zeigt, kann die Aktivierung von IRF3 durch die entstehenden Dimere deutlich dargestellt werden. Der Unterschied zwischen UV-inaktiviertem und replikationskompetentem HCMV ist auch hier gut reproduzierbar.

### **2.1.2. Die Induktion und Inhibition der IFN $\alpha$ / $\beta$ -Expression ist virusdosis-abhängig**

Obwohl bereits mehrfach Studien zur IFN-Expression und Stimulation interferon-abhängiger Gene nach CMV-Infektion gemacht wurden, gibt es keine detaillierten Daten zu der IFN-Induktion kurz nach einer MCMV-Infektion. Aber gerade dieses Zeitfenster ist interessant für die Untersuchung der viralen Interaktionen mit dem IFN-System, weil in diesem Rahmen entschieden wird, ob eine effektive antivirale Abwehr durch die infizierte Zelle angestoßen wird. Daher wurde mittels semi-quantitativer RT-PCR mit spezifischen Primern analysiert, ob kurz nach MCMV-Infektion in den Zellen IFN $\alpha$ / $\beta$ -Expression initiiert wird. Für diesen Zweck wurde die Menge der IFN $\beta$ - und IFN $\alpha$ 4-Transkripte gemessen. IFN $\beta$  und IFN $\alpha$ 4 wurden ausgewählt, da diese beiden Gene der Maus direkt, d.h. ohne sekundären *Feedback-Loop*, durch virale Infektionen induziert werden.

## ERGEBNISSE



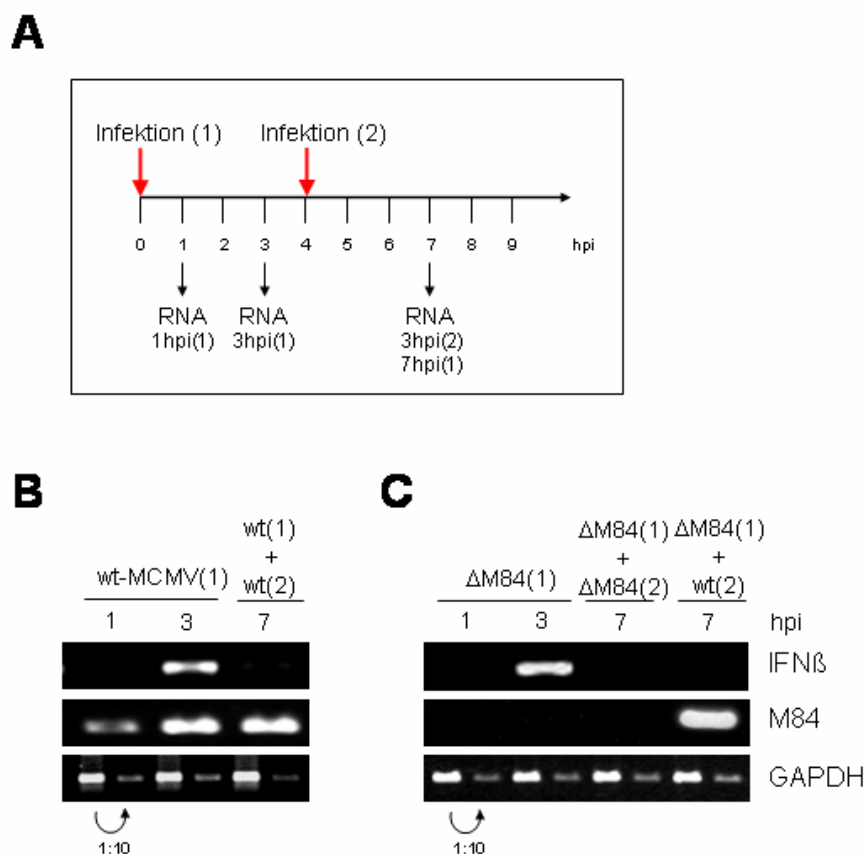
**Abb. 2.2: MCMV-Infektion führt zu einer transienten Expression von IFN $\alpha/\beta$**

NIH3T3-Zellen wurden mit MCMV infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion wurde Gesamt-RNA extrahiert. Die IFN $\beta$ - und IFN $\alpha$ 4-Genexpression wurde semi-quantitativ mittels RT-PCR analysiert. Die eingesetzte RNA-Menge wurde anhand der GAPDH-Transkripte abgeglichen. (A) Zeitabhängigkeit von Induktion und Inhibition der Genexpression von Typ I - Interferonen. (B) Virusdosis-Abhängigkeit von Induktion und Inhibition der Genexpression von Typ I - Interferonen.

Diese Experimente zeigten, dass in infizierten Zellen IFN $\alpha/\beta$  exprimiert wird; aber diese initiale Induktionsphase beträgt nur wenige Stunden (Abb. 2.2 A). Bereits 6 hpi ist so gut wie keine IFN-mRNA mehr detektierbar. Die Stärke und Dauer dieser initialen IFN $\alpha/\beta$ -Induktion wird zum Teil durch die Virusdosis bestimmt. Bei Infektion mit hoher MOI (*multiplicity of infection*, gleichbedeutend mit *plaque forming units* pro Zelle) wird eine etwas stärkere IFN-Expression induziert, die aber schneller abgeschaltet wird – beides im Vergleich zu einer Infektion mit niedrigerer MOI (Abb. 2.2 B). Daraus kann geschlossen werden, dass viel Virus gleichzeitig einhergeht mit einem starken Stimulus und einer starken Inhibition. Doch diese Ergebnisse belegten noch nicht, dass die beobachtete Abschaltung der IFN $\alpha/\beta$ -Transkription wirklich auf einer MCMV-vermittelten Inhibition beruht. Eine mögliche Erklärung könnte

## ERGEBNISSE

auch ein zelleigener Mechanismus zur Regulation der IFN-Transkription sein. Die Zelle könnte z.B. bei Fehlen eines anhaltenden Stimulus die Expression der Interferone herunterfahren. Um dies zu testen, wurden MCMV-Superinfektionsexperimente durchgeführt.



**Abb. 2.3: MCMV-infizierte Zellen sind nicht mehr responsiv für MCMV als Stimulus der IFN $\beta$ -Expression**

NIH3T3-Zellen wurden mit MCMV (MOI 5) infiziert. 4 hpi wurde eine Superinfektion der bereits infizierten Zellen (ebenfalls MOI 5) durchgeführt. 1, 3 und 7 h nach Primärinfektion wurde Gesamt-RNA isoliert und mittels semi-quantitativer RT-PCR mit genspezifischen Primern analysiert. Die GAPDH-Kontrolle wurde zur genaueren Quantifizierung mit 2 Verdünnungen durchgeführt. (A) Schematische Darstellung des Ablaufs der Experimente. (B) Sowohl für die Primär- als auch für die Superinfektion wurde wt-MCMV verwendet. *M84*-Transkripte dienen als Infektionskontrolle. (C) Für die Primärinfektion wurde  $\Delta$ M84-MCMV verwendet. Als zweites Virus wurde entweder  $\Delta$ M84-MCMV oder wt-MCMV eingesetzt. *M84*-Transkripte wurden nachgewiesen, um die Superinfektion zu überprüfen.

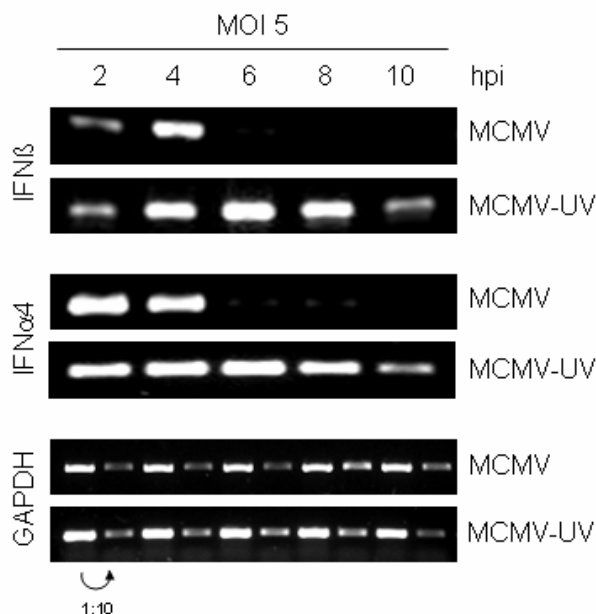
## ERGEBNISSE

Abb. 2.3 A zeigt schematisch den Versuchsaufbau der Superinfektionsexperimente. Da bereits gezeigt wurde, dass 3 hpi in infizierten Zellen eine deutlich messbare Menge an IFN $\beta$ -Transkripten vorhanden ist, wurde zu diesem Zeitpunkt sowohl nach der Primär- als auch nach der Superinfektion eine RNA-Probe genommen, um anschließend daraus die Menge an IFN $\beta$ -mRNA zu messen. Die Superinfektion wurde 5 h nach der ersten Infektion durchgeführt, um mit der RNA-Probe 3 h nach zweiter Infektion (gleichbedeutend mit 8 h nach erster Infektion) einen Zeitpunkt zu treffen, an dem die IFN $\beta$ -Expression nach der ersten MCMV-Infektion bereits abgeschaltet ist. Das Ergebnis dieser Experimente zeigte, dass MCMV aktiv die IFN $\beta$ -Induktion inhibiert, da die MCMV-Superinfektion keine IFN $\beta$ -Expression in den bereits infizierten Zellen auslöste (Abb. 2.3 B). Alle MCMV-relevanten IFN $\beta$ -induzierenden Signalwege scheinen durch MCMV blockiert zu werden, so dass die infizierten Zellen für einen erneuten MCMV-Stimulus nicht mehr responsiv sind. Diese Schlussfolgerung kann jedoch nur gezogen werden, wenn die Superinfektion wirklich in einem zweiten Viruseintritt resultiert. Sind die Viren der zweiten Infektion nicht in der Lage, in eine bereits infizierte Zelle einzudringen, ist das vorhandene Ergebnis kein Hinweis auf eine aktive Inhibition. Daher wurde überprüft, ob die Primärinfektion eine Superinfektion zulässt. Hierfür wurde für die Primärinfektion eine MCMV-Deletionsmutante eingesetzt, der das *M84*-ORF fehlt. Diese Mutante exprimiert nicht das M84-Protein, welches schon sehr früh nach Infektion nachweisbar ist. Wie in Abb. 2.3 C zu sehen ist, wurden *M84*-Transkripte nachgewiesen, wenn nach einer Infektion mit  $\Delta$ M84-MCMV eine Superinfektion mit wt-MCMV durchgeführt wurde. Dies bedeutet, dass die Primärinfektion nicht die Superinfektion verhindert. Mit dieser Kontrolle kann nun endgültig geschlussfolgert werden, dass MCMV aktiv die Induktion der IFN $\beta$ -Genexpression inhibiert.

### 2.1.3. Virale Genexpression ist notwendig für die Inhibition der IFN $\alpha/\beta$ -Transkription

Um zu testen, ob die Proteine, die für die Inhibition der IFN $\alpha/\beta$ -Expression in der infizierten Zelle notwendig sind, beim Eintritt des Viruspartikels bereits vorhanden sind, wurde die IFN-Induktion in MCMV-infizierten Zellen verglichen mit Zellen, die mit UV-inaktiviertem MCMV infiziert wurden.

## ERGEBNISSE



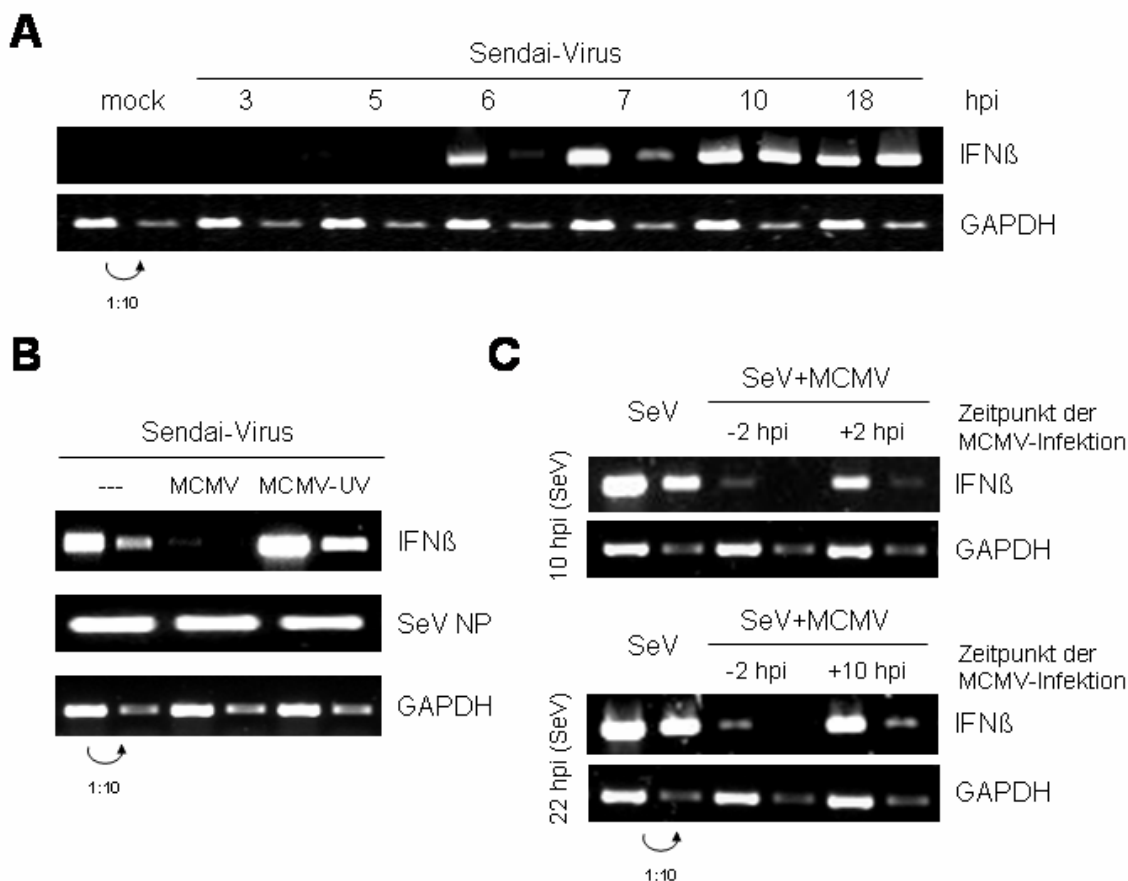
**Abb. 2.4: MCMV-Genexpression ist notwendig für das Abschalten der IFN $\alpha/\beta$ -Expression nach MCMV-Infektion**

NIH3T3-Zellen wurden mit MCMV oder UV-inaktiviertem MCMV (MOI 5) infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion wurde Gesamt-RNA extrahiert. Die IFN $\beta$ - und IFN $\alpha$ 4-Genexpression wurde semi-quantitativ mittels RT-PCR analysiert. Die eingesetzte RNA-Menge wurde anhand der GAPDH-Transkripte abgeglichen.

Wie man in Abb. 2.4 sehen kann, ist UV-inaktiviertes MCMV nicht in der Lage, die IFN $\alpha/\beta$ -Genexpression so effizient und schnell abzuschalten wie replikationsfähiges MCMV. Da durch die UV-Behandlung die Expression viraler Gene verhindert wird, lässt sich aus diesem Experiment schließen, dass Virusproteine, die in der infizierten Zelle neu synthetisiert werden, notwendig sind für die Inhibition der IFN $\alpha/\beta$ -Transkription.

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob die beobachtete Inhibition der IFN-Genexpression nur nach MCMV-Stimulus stattfindet oder ob es sich um eine allgemeine Blockade der IFN $\alpha/\beta$ -induzierenden Signalwege handelt. Um dies zu prüfen, wurden Koinfektionen mit MCMV und Sendai-Virus durchgeführt. Sendai-Virus wurde ausgewählt, da eine Infektion mit diesem RNA-Virus eine massive IFN $\beta$ -Produktion auslöst (Wathelet et al., 1998).

## ERGEBNISSE



**Abb. 2.5: Neu synthetisierte MCMV-Proteine wirken als Inhibitoren der IFN $\beta$ -Induktion**

Aus NIH3T3-Zellen, die mit Sendai-Virus infiziert wurden (100 HA units/ml), wurde Gesamt-RNA isoliert, um die Expression von IFN $\beta$  mittels RT-PCR zu bestimmen. Die Menge der eingesetzten RNA wurde anhand der GAPDH-Transkripte abgeglichen. (A) Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Sendai-Infektion wurde die IFN $\beta$ -Genexpression gemessen. (B) Zellen, die mit replikationskompetentem MCMV oder UV-inaktiviertem MCMV infiziert waren, wurden zum Zeitpunkt 2 hpi mit Sendai-Virus koinfiziert. 10 h nach Sendai-Infektion wurde Gesamt-RNA isoliert und auf die Expression von IFN $\beta$  getestet. Die mRNA des Sendai Nukleo-Proteins (NP) diente als Nachweis der erfolgreichen Infektion mit Sendai-Virus. (C) Koinfektionen mit Sendai-Virus und MCMV wurden durchgeführt, um die Inhibition der IFN $\beta$ -Transkription zu untersuchen. Die MCMV-Infektion fand 2 h vor der Sendai-Infektion (-2 hpi) bzw. 2 oder 10 h nach der Sendai-Infektion (+2 hpi, +10 hpi) statt. 10 und 22 h nach der Sendai-Infektion wurde Gesamt-RNA für die RT-PCR Analysen extrahiert.

Um zu überprüfen, wann in den verwendeten NIH3T3-Zellen durch Infektion mit Sendai-Virus eine IFN $\beta$ -Antwort ausgelöst wird, wurde die IFN $\beta$ -mRNA in Sendai-infizierten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion gemessen. Abb. 2.5 A zeigt, dass ca. 6 h nach Sendai-Infektion die IFN $\beta$ -Transkription initiiert wird. Dieser Zeitpunkt entspricht dem Start



## ERGEBNISSE

der viralen Replikation. Dieses Ergebnis bestätigt, dass die virale dsRNA, die bei der Replikation in großen Mengen entsteht, ein potenter Induktor der IFN-Antwort ist. Testet man nun die Sendai-abhängige IFN $\beta$ -Induktion in MCMV-infizierten Zellen, sieht man, dass MCMV auch die Initiation der IFN-Expression durch dsRNA antagonisiert (Abb. 2.5 B). Für diese Inhibition benötigt MCMV ebenfalls neu synthetisierte virale Proteine, da UV-inaktiviertes MCMV nicht in der Lage war, die IFN $\beta$ -Produktion zu hemmen (Abb. 2.5 B). Als Kontrolle der Sendai-Infektion wurde die Expression des Sendai Nukleo-Proteins detektiert. Damit wurde nachgewiesen, dass Sendai-Virus in MCMV-infizierten Zellen replizieren kann. Die fehlende IFN $\beta$ -Induktion beruht also nicht auf der Abwesenheit von einem dsRNA-Stimulus, sondern auf einer aktiven Inhibition durch MCMV. Die Effizienz dieser MCMV-vermittelten Inhibition ist abhängig vom Zeitpunkt der Sendai-Koinfektion. Je mehr MCMV-Genprodukte bereits in den infizierten Zellen vorhanden sind (gleichbedeutend mit später Koinfektion mit Sendai-Virus), desto wirksamer ist die Inhibition der IFN $\beta$ -Transkription (Abb. 2.5 C).

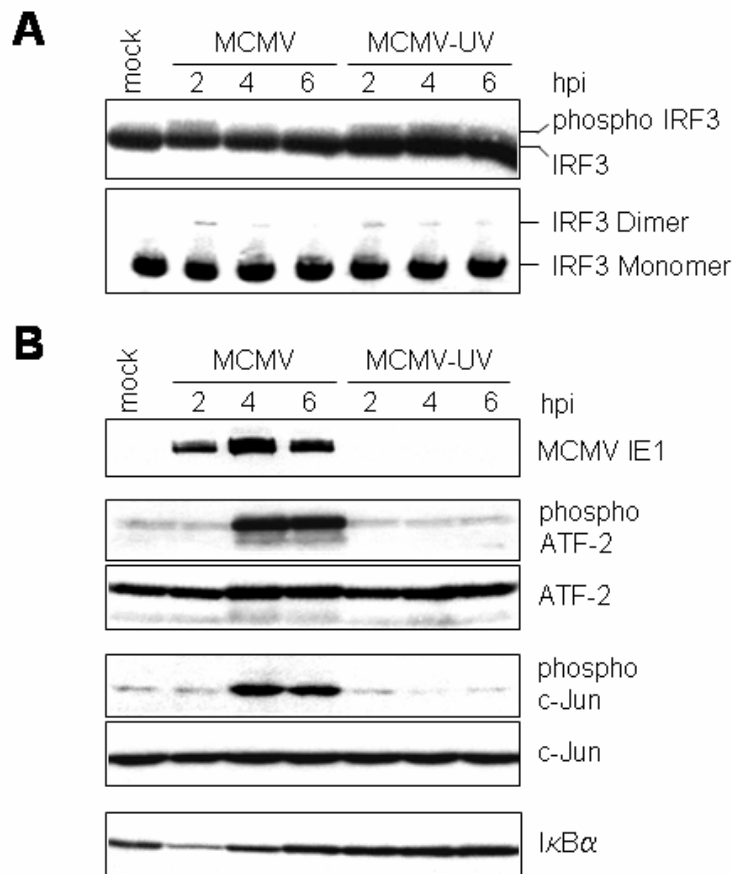
### **2.1.4. Die IRF3-Aktivierung ist ausreichend für die Initiation der IFN $\alpha/\beta$ -Expression**

Die Initiation der IFN $\beta$ -Expression ist relativ strikt reguliert, da die IFN $\beta$ -Produktion der erste Schritt einer sich selbst verstärkenden Signalkaskade mit weitreichenden Folgen für die betroffenen Zellen darstellt. Der komplexe Aufbau des IFN $\beta$ -Promotors mit den verschiedenen Bindestellen für die multiplen Transkriptionsfaktoren des IFN $\beta$ -Enhanceosoms macht deutlich, wie stark die IFN $\beta$ -Transkription kontrolliert wird. Vergleicht man die Promotoren von IFN $\alpha 4$  und IFN $\beta$ , sieht man, dass mit der Untersuchung der im IFN $\beta$ -Enhanceosom enthaltenen Komponenten die IFN $\alpha 4$ -relevanten Transkriptionsfaktoren (IRF3 und IRF7) bereits eingeschlossen sind (Civas et al., 2006). Daher wurde für die weiteren Analysen in Bezug auf die Initiation der IFN $\alpha/\beta$ -Expression der Fokus auf die IFN $\beta$ -Induktion gelegt.

Um den Aktivierungsstatus der Transkriptionsfaktoren zu untersuchen, wurden mittels Westernblot-Analysen die entsprechenden Aktivierungsmerkmale geprüft. Im Fall von IRF3 wurde die Phosphorylierung und Dimerisierung detektiert, da diese essentiell für die IRF3-Aktivierung sind. Bemerkenswert ist die Beobachtung, dass in humanen Zellen der Nachweis von IRF3-Dimeren mittels nativer PAGE wesentlich klarer ausfällt als in murinen Zellen. Diese Feststellung kann man nicht nur anhand der Experimente der vorliegenden Arbeit machen, sondern auch in publizierten Daten anderer Arbeitsgruppen sind humane IRF3-

## ERGEBNISSE

Dimere deutlich besser darzustellen als murine. Als Messparameter für eine Stimulation des NF- $\kappa$ B Signalweges wurde die Proteinmenge des NF- $\kappa$ B Inhibitors I $\kappa$ B $\alpha$  quantifiziert, weil die Anwesenheit von I $\kappa$ B $\alpha$  die nukleäre Translokation des NF- $\kappa$ B-Komplexes und damit die Initiation NF- $\kappa$ B-abhängiger Genexpression hemmt. Die Abwesenheit von I $\kappa$ B $\alpha$  ist demnach ein Indikator für aktives NF- $\kappa$ B. Für den heterodimeren Transkriptionsfaktor ATF-2/c-Jun wurde die Phosphorylierung von c-Jun und/oder ATF-2 detektiert, um die Aktivierung zu bestimmen.



**Abb. 2.6: Infektion mit replikationsfähigem MCMV stimuliert alle Komponenten des IFN $\beta$ -Enhanceosoms, während UV-behandeltes MCMV nur IRF3 aktiviert**

NIH3T3-Zellen wurden mit MCMV oder UV-inaktiviertem MCMV (MOI 5) infiziert. Nach 2, 4 bzw. 6 hpi wurden Proteinlysate hergestellt. Diese wurden mittels PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die angegebenen Proteine wurden mit Hilfe spezifischer Antikörper nachgewiesen. Nicht-infizierte Zellen dienten als mock-Kontrolle. (A) Die IRF3-Aktivierung wurde anhand der langsamer migrierenden phosphorylierten Form (10%iges SDS-Gel) und der Homodimere (natives Gel) nachgewiesen. (B) Die Aktivierung des heterodimeren Transkriptionsfaktors ATF-2/c-Jun wurde durch die Detektion der phosphorylierten Formen von ATF-2 und c-Jun dokumentiert. Der Aktivierungsstatus von NF- $\kappa$ B wurde anhand der I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteinmenge bestimmt. MCMV IE1 diente als Kontrolle der MCMV-Infektion und Nachweis der erfolgreichen UV-Behandlung.

## ERGEBNISSE

Wie in Abb. 2.6 A zu sehen ist, kommt es sowohl nach einer Infektion mit replikationskompetentem MCMV als auch nach Infektion mit UV-inaktiviertem MCMV zu einer Phosphorylierung und Dimerisierung von IRF3. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der RT-PCR Analysen der IFN $\alpha$ / $\beta$ -Transkripte wurde in Bezug auf die IRF3-Phosphorylierung und Dimerisierung nur eine transiente Aktivierung nach MCMV-Infektion beobachtet. Dieses schnelle Abschalten der IRF3-Aktivierung findet in Zellen, die mit UV-inaktiviertem MCMV infiziert wurden, nicht statt. Dieser Befund erklärt die längere IFN $\alpha$ 4- und IFN $\beta$ -Transkription (Abb. 2.4) in diesen Zellen.

Interessanterweise aktiviert replikationsfähiges MCMV alle Transkriptionsfaktoren des IFN $\beta$ -Enhanceosoms, während UV-behandeltes MCMV nicht die Aktivierung von ATF-2/c-Jun oder NF- $\kappa$ B stimuliert (Abb. 2.6 B), obwohl in Zellen, die mit UV-inaktiviertem MCMV infiziert wurden, eine stärkere IFN $\alpha$ / $\beta$ -Expression induziert wird. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die IRF3-Aktivierung ausreichend ist für die Induktion von IFN $\alpha$ 4 und IFN $\beta$ , auch wenn der synergistische Effekt eines komplett aktivierten Enhanceosoms sicherlich zu einer weitaus effizienteren Initiation der IFN $\beta$ -Genexpression führen würde. Außerdem ist auf den ersten Blick erstaunlich, dass replikationskompetentes MCMV keine starke IFN $\beta$ -Transkription auslöst, obwohl in den infizierten Zellen alle drei relevanten Transkriptionsfaktoren aktiviert werden. Sieht man aber genauer hin, fällt auf, dass diese Faktoren nicht gleichzeitig stimuliert werden. IRF3 und NF- $\kappa$ B sind bereits 2 hpi aktiviert, während ATF-2/c-Jun erst ab 4 hpi phosphoryliert sind (Abb. 2.6). Zu diesem Zeitpunkt wirken aber offensichtlich schon MCMV-kodierte Inhibitionsmechanismen, die zur Abschaltung der Aktivierung von IRF3 und NF- $\kappa$ B führen und den unstimulierten Zustand wiederherstellen, so dass es nicht zu einer Überschneidung von aktiviertem IRF3 und NF- $\kappa$ B mit phosphoryliertem ATF-2/c-Jun kommt. In MCMV-infizierten Zellen gibt es also keine Formation des gesamten IFN $\beta$ -Enhanceosoms, obwohl alle Komponenten aktiviert werden.

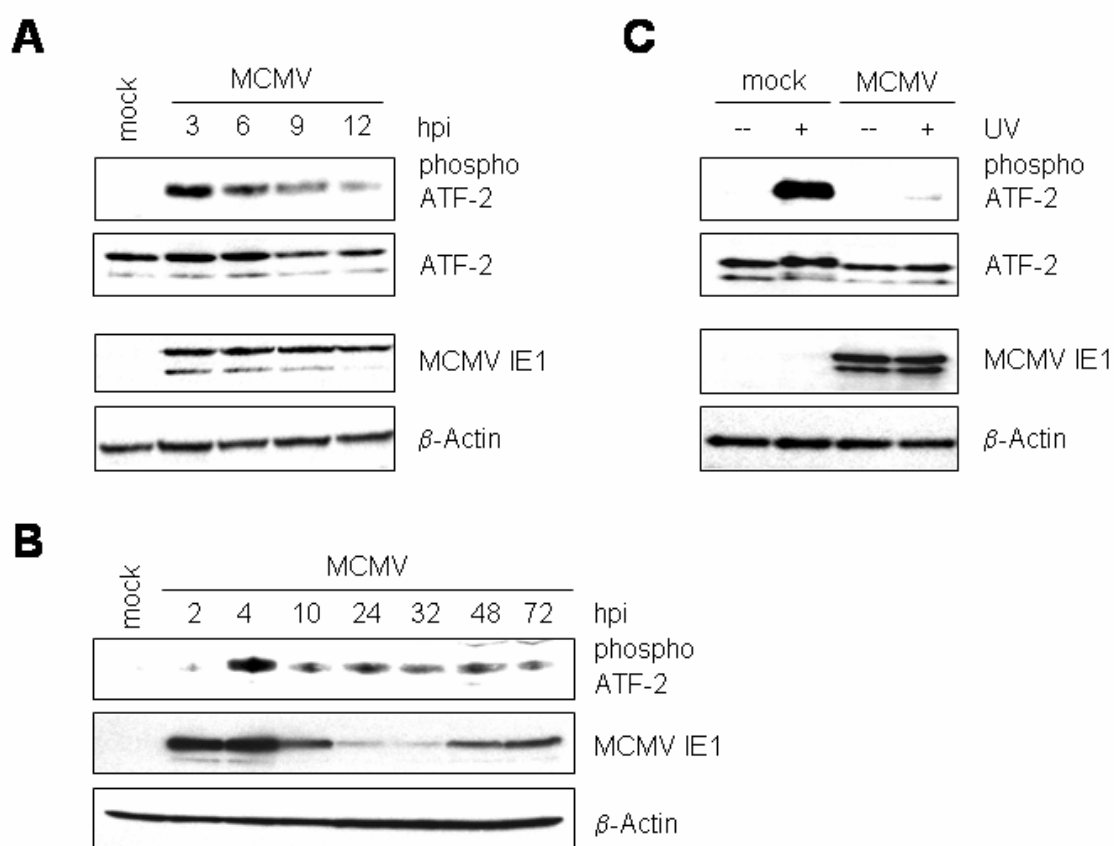
### **2.1.5. MCMV interferiert mit der Aktivierung von ATF-2/c-Jun**

Wie bereits gezeigt, induziert eine Infektion mit replikationskompetentem MCMV die Phosphorylierung von ATF-2 und c-Jun. Diese beiden Proteine binden als Heterodimer an PRD IV des IFN $\beta$ -Promotors. Da beide Proteine über ähnliche Signalwege aktiviert werden und die Verhinderung der Phosphorylierung eines der beiden Proteine ausreicht, um die

## ERGEBNISSE

Bildung dieses Transkriptionsfaktors zu hemmen, wurde in den weiteren Experimenten bezüglich ATF-2/c-Jun aus antikörper-technischen Gründen nur ATF-2 betrachtet.

Um Aufschluss darüber zu erhalten, ob die Aktivierung von ATF-2 nach Infektion länger andauert oder ähnlich transient ist wie die IRF3-Phosphorylierung und Dimerisierung, wurden Proteinlysate von späteren Zeitpunkten nach Infektion analysiert. Außerdem wurden nur die Proteine aus nukleären Extrakten untersucht, da phosphoryliertes ATF-2 laut Literatur (Liu et al., 2006) sich hauptsächlich im Kern befindet.



**Abb. 2.7: MCMV interferiert mit der Aktivierung von ATF-2**

Es wurden nukleäre Proteinlysate hergestellt, in einem SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Membran übertragen, um die zu untersuchenden Proteine mittels spezifischer Antikörper nachzuweisen. Als Infektionskontrolle diente MCMV IE1 und als Ladekontrolle  $\beta$ -Actin. (A) und (B) Aus mock- und MCMV-infizierten Zellen (MOI 5) wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Lysate hergestellt, um den Aktivierungsstatus von ATF-2 mit fortschreitender Infektion zu analysieren. (C) MCMV-infizierte (MOI 5) und mock-Zellen wurden zum Zeitpunkt 24 hpi mit UV-Licht ( $80 \text{ J/m}^2$ ) bestrahlt. 30 min nach der UV-Behandlung wurden Lysate hergestellt und die Phosphorylierung von ATF-2 nachgewiesen.

## ERGEBNISSE

Diese Experimente zeigten, dass die Menge an phosphoryliertem ATF-2 im Verlauf der Infektion zurückgeht, auch wenn der mock-Zustand weder 12 hpi (Abb.2.7 A) noch zu späteren Zeitpunkten (Abb.2.7 B) vollständig wieder hergestellt wird. Die Kinetik dieser Inhibition deutet darauf hin, dass die MCMV-vermittelte Interferenz mit dem ATF-2/c-Jun Signalweg merklich langsamer und weniger drastisch ist als die Inhibition der IRF3-Aktivierung. Untersucht man die Restimulation von ATF-2 durch einen starken externen Stimulus (wie Behandlung mit UV-Licht) zu späteren Zeitpunkten nach Infektion, wird deutlich, dass MCMV die Phosphorylierung von ATF-2 ebenfalls hemmt (Abb. 2.7 C). Aus diesen Ergebnissen lässt sich zusammenfassen, dass eine Infektion mit MCMV die Phosphorylierung von ATF-2 und c-Jun induziert. Dieser aktivierte Zustand wird im Laufe der Infektion zwar wieder herunter reguliert, doch dies geschieht nicht so effektiv wie im Falle von IRF3. Eine erneute heftige Restimulation durch einen externen Stimulus wird dagegen sehr nachhaltig gehemmt.

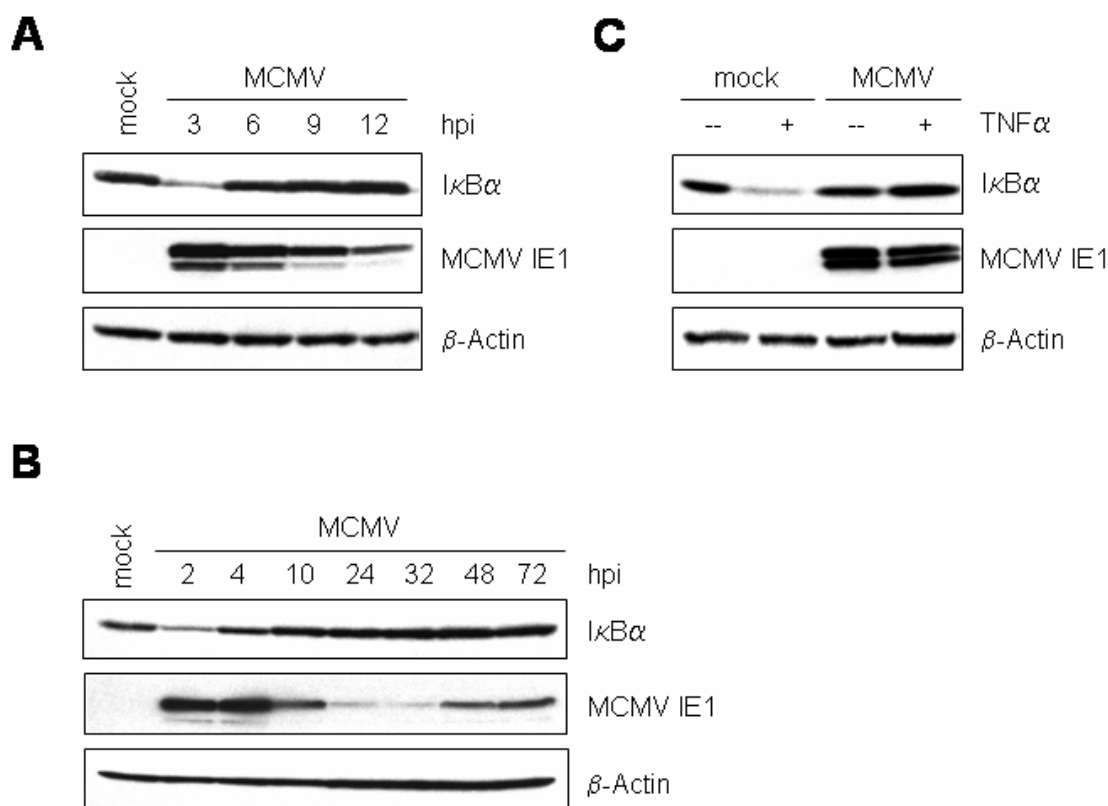
### **2.1.6. MCMV antagonisiert den NF- $\kappa$ B Signalweg auf mehreren Ebenen**

Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B reguliert die Expression diverser Gene, die in die Kontrolle von Apoptose, Inflammation und Immunantwort involviert sind. Eines dieser Gene ist IFN $\beta$ . In einer nicht-stimulierten Zelle wird der NF- $\kappa$ B-Komplex durch die Bindung eines inhibitorischen Proteins (hauptsächlich I $\kappa$ B $\alpha$ ) im Cytoplasma festgehalten, so dass die Funktion als Transkriptionsfaktor nicht ausgeübt werden kann. Wird NF- $\kappa$ B aktiviert, wird I $\kappa$ B $\alpha$  phosphoryliert und proteasomal degradiert. Als Folge transloziert der verbleibende NF- $\kappa$ B-Komplex in den Kern, um die Transkription NF- $\kappa$ -abhängiger Gene zu initiieren. Daher wurde als Maß für den zellulären NF- $\kappa$ B-Aktivierungsstatus die I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteinmenge gemessen.

Wie in Abb. 2.8 zu sehen ist, kontrolliert MCMV die NF- $\kappa$ B-abhängige Signaltransduktion sehr effektiv, da diese Regulation auf mehreren verschiedenen Ebenen stattfindet. Anhand der reduzierten Menge an I $\kappa$ B $\alpha$  2-3 hpi kann geschlossen werden, dass NF- $\kappa$ B zu diesem Zeitpunkt aktiviert ist. Doch diese Situation wird sehr schnell aufgehoben, indem die zelluläre I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteinmenge wiederhergestellt wird (Abb. 2.6 B und 2.8 A). Die Menge an I $\kappa$ B $\alpha$  bleibt nach der transienten Aktivierungsphase über den gesamten Replikationszyklus konstant (Abb. 2.8 B). Dies ist ein Hinweis darauf, dass MCMV diesen Zustand kontrolliert, nachdem

## ERGEBNISSE

das initiale Stadium einer noch nicht vollständig vorhandenen Ausstattung an viralen Proteinen in der Zelle überwunden ist.

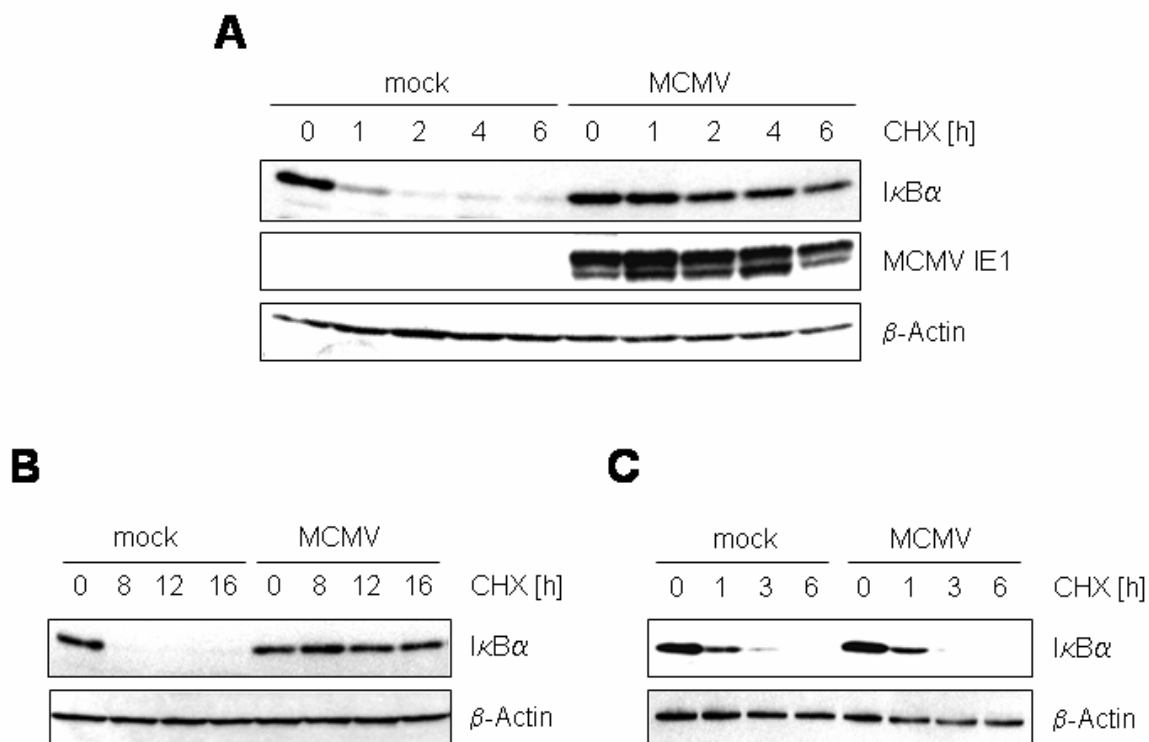


**Abb. 2.8: MCMV inhibiert den NF-κB Signalweg**

Aus mock- und MCMV-infizierten Zellen (MOI 5) wurden Proteinlysate hergestellt und mittels Westernblot auf IκBα-Proteinmenge untersucht. MCMV IE1 diente als Kontrolle der Infektion, β-Actin als Ladekontrolle. (A) und (B) Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion wurde die IκBα-Proteinmenge gemessen, um den Aktivierungsstatus von NF-κB zu analysieren. (C) mock- und MCMV-infizierte Zellen wurden 7 hpi für 30 min mit 20 ng/ml TNFα behandelt bzw. unbehandelt gelassen. Die TNFα-abhängige NF-κB-Stimulation wurde anhand der IκBα-Proteinmenge gemessen.

Als nächster Schritt wurde die Interferenz von MCMV mit dem NF-κB Signalweg in Bezug auf starke externe Stimuli untersucht, da ein solcher Stimulus klar aufzeigt, ob es sich tatsächlich um eine aktive Inhibition handelt. Abb. 2.8 C zeigt deutlich, dass MCMV grundlegend in die NF-κB-aktivierenden Signalkaskaden eingreift, da selbst durch eine Behandlung mit TNFα, welches einen sehr potenten Stimulus der NF-κB-Antwort darstellt, keine Degradation von IκBα induziert wird. In uninfizierten Zellen ist zu sehen, dass TNFα in der Lage ist, eine substantielle Reduktion der IκBα-Proteinmenge auszulösen.

## ERGEBNISSE



**Abb. 2.9: MCMV stabilisiert IκBα**

Die Halbwertszeit von IκBα in mock- und MCMV-infizierten Zellen wurde bestimmt, indem die Proteinsynthese durch Cycloheximid (CHX) – Behandlung inhibiert wurde. Mittels Westernblot-Analyse wurde auf vorhandenes IκBα-Protein getestet. MCMV IE1 diente als Infektionskontrolle, β-Actin als Ladekontrolle. (A) und (B) 5 hpi wurde 50 µg/ml CHX zu den Zellen gegeben und nach den angegebenen Zeiten der CHX-Behandlung Proteinlysate hergestellt. (C) 3 hpi wurde CHX zu den Zellen gegeben und nach den angegebenen Zeiten der CHX-Behandlung Proteinlysate hergestellt.

Ein MCMV-vermittelter Evasionsmechanismus, der (Mit-)Ursache für die in Abb. 2.8 gezeigten Beobachtungen sein könnte, ist die Stabilisierung der intrinsischen, aktivierungsunabhängigen Halbwertszeit von IκBα. Unter Verwendung des Translationsinhibitors Cycloheximid (CHX) wurde die Neusynthese von IκBα verhindert, so dass anhand einer Kinetik ermittelt werden konnte, wie lange das Protein ohne *de novo* – Synthese in den Zellen vorhanden ist. Durch dieses Experiment (Abb. 2.9 A) konnte nachgewiesen werden, dass in MCMV-infizierten Zellen die IκBα-Stabilität drastisch erhöht wird. Selbst nach 16 Stunden CHX-Behandlung ist unter Infektion noch keine wesentliche Reduktion an IκBα-Proteinmenge zu beobachten (Abb. 2.9 B). Dieser Effekt auf die IκBα-Stabilität wird wahrscheinlich durch ein oder mehrere virale Genprodukte verursacht, die erst nach der

## ERGEBNISSE

initialen NF- $\kappa$ B-Aktivierungsphase exprimiert werden, da 3 hpi die Halbwertszeit von I $\kappa$ B $\alpha$  durch MCMV noch nicht verändert wird (Abb. 2.9 C).

### **ZUSAMMENFASSUNG (1)**

**Neu synthetisierte MCMV-Genprodukte interferieren mit der Aktivierung aller Transkriptionsfaktoren, die Teil des IFN $\beta$ -Enhanceosoms sind (IRF3, ATF-2/c-Jun und NF- $\kappa$ B). Dadurch wird in MCMV-infizierten Zellen nach einer transienten Induktionsphase die IFN $\alpha/\beta$ -Expression effizient abgeschaltet.**

## **2.2. Screening nach MCMV-kodierten Inhibitoren**

Für die Untersuchung molekularer Virus-Wirt-Interaktionen ist es von großem Vorteil, wenn die Interaktionspartner auf Proteinebene bekannt sind. Da aber nur von einem kleinen Teil der CMV-Proteine bereits Funktionen beschrieben sind, müssen erst neue Interaktionen und Wechselwirkungen der viralen Proteine definiert werden, bevor die Möglichkeit besteht, detaillierte Analysen in Bezug auf das Zusammenspiel viraler und zellulärer Systeme zu machen. Grundsätzlich gibt es zwei generelle Ansätze, um die Funktion viraler Proteine aufzuklären. Die erste Möglichkeit ist die Vorgehensweise der „*Reverse Genetics*“. Hierbei untersucht man ein oder einige ausgewählte Genprodukte auf ihre mögliche Funktion. Problematisch ist, wenn die aufgestellten Hypothesen bezüglich der zu klärenden Funktionen sich nicht bewahrheiten. Mit einer Gen- bzw. Proteinsequenz allein ist es in den meisten Fällen sehr schwierig, die Funktion dieses Proteins aufzuklären, ohne wenigstens die grobe Richtung zu kennen. Aus diesem Grunde wurde der Ansatz der „*Forward Genetics*“ gewählt, um die Fragestellung der Interaktionen zwischen MCMV-kodierten Inhibitoren und der IFN $\alpha/\beta$ -Induktion zu analysieren. Bei dieser Vorgehensweise geht man von einer Funktion aus, für die systematisch nach involvierten Genprodukten gesucht wird („vom Phänotyp zum Genotyp“). Ein großer Vorteil ist hierbei, dass solch ein Screening-System Genprodukte identifizieren kann, deren Funktionen noch gänzlich unbekannt sind. Außerdem sind für die weiterführenden detaillierten Analysen der molekularen Mechanismen bereits durch den Ausgangsphänotyp gute Anhaltspunkte für die Richtung der Untersuchungen gegeben.



### 2.2.1. Neun-segmentige rekombinante Influenza A – Viren als Screening-System?

Cytomegaloviren besitzen ein Genom von über 200 kb und damit eine für Viren sehr große Kodierungskapazität (mind. 170 ORFs). Daher ist es kaum möglich, jedes einzelne Gen auf eine Beteiligung in der Inhibition der IFN $\beta$ -Induktion zu untersuchen. Um dieses Problem zu umgehen, sollte ein Screening-System aufgebaut werden, mit dem man alle Genprodukte (ganz gleich, ob für die Virusreplikation essentiell oder nicht essentiell) in einem Ansatz analysieren kann. Als Werkzeug für eine positive Selektion wurde die Influenza A – Deletionsmutante  $\Delta$ NS1 ausgewählt, da das NS1-Genprodukt (Nicht-Strukturprotein 1) ein gut untersuchter viraler Inhibitor der IFN $\beta$ -Induktion ist (Garcia-Sastre, 2001; Krug et al., 2003). Von Vorteil sind außerdem die Möglichkeiten einer rekombinanten Mutagenese von Influenza-Viren und ein bestehendes Zellkultursystem (Neumann et al., 1999). Für NS1 wurde gezeigt, dass es durch die Bindung an dsRNA die Induktion der IFN $\beta$ -Genexpression und die dsRNA-abhängige Aktivierung antiviraler Proteine (z.B. PKR, RNase L) hemmt. Diese inhibitorische Funktion ist in IFN-kompetenten Systemen essentiell für die Virus-Replikation. Aus diesem Grunde wächst die  $\Delta$ NS1-Mutante nicht auf Zellen mit funktionierendem IFN-System. Um  $\Delta$ NS1-Virus zu gewinnen, müssen IFN-inkompetente Systeme verwendet werden. So kann man diese Mutante z.B. in der Allantois von 6 Tage alten Hühnereiern anzüchten, da die Eier zu diesem Zeitpunkt noch kein vollständig entwickeltes IFN-System aufweisen.

Dieses Wachstumsdefizit sollte für eine positive Selektion von MCMV-Genen genutzt werden, die eine ähnliche Funktion wie NS1 besitzen. Das Grundkonzept dieser Suchstrategie beruhte darauf, dass man durch das Einsetzen eines MCMV-kodierten Proteins mit NS1-komplementierender Funktion die Replikationsfähigkeit von  $\Delta$ NS1 in IFN-kompetenten Zellen wiederherstellen kann. Dadurch könnten diese MCMV-Inhibitoren mit Hilfe des Replikationsvorteils der rekombinanten Viren identifiziert werden.  $\Delta$ NS1-Viren mit integriertem IFN-Inhibitor sollten auf IFN-kompetenten Zellen wachsen, während  $\Delta$ NS1-Viren ohne oder mit integriertem MCMV-Protein, welches nicht als Inhibitor der IFN $\beta$ -Induktion wirkt, sich nicht vermehren können. Auf diese Weise wird die IFN-inhibitorische Funktion positiv selektioniert und das relevante MCMV-Gen identifiziert.

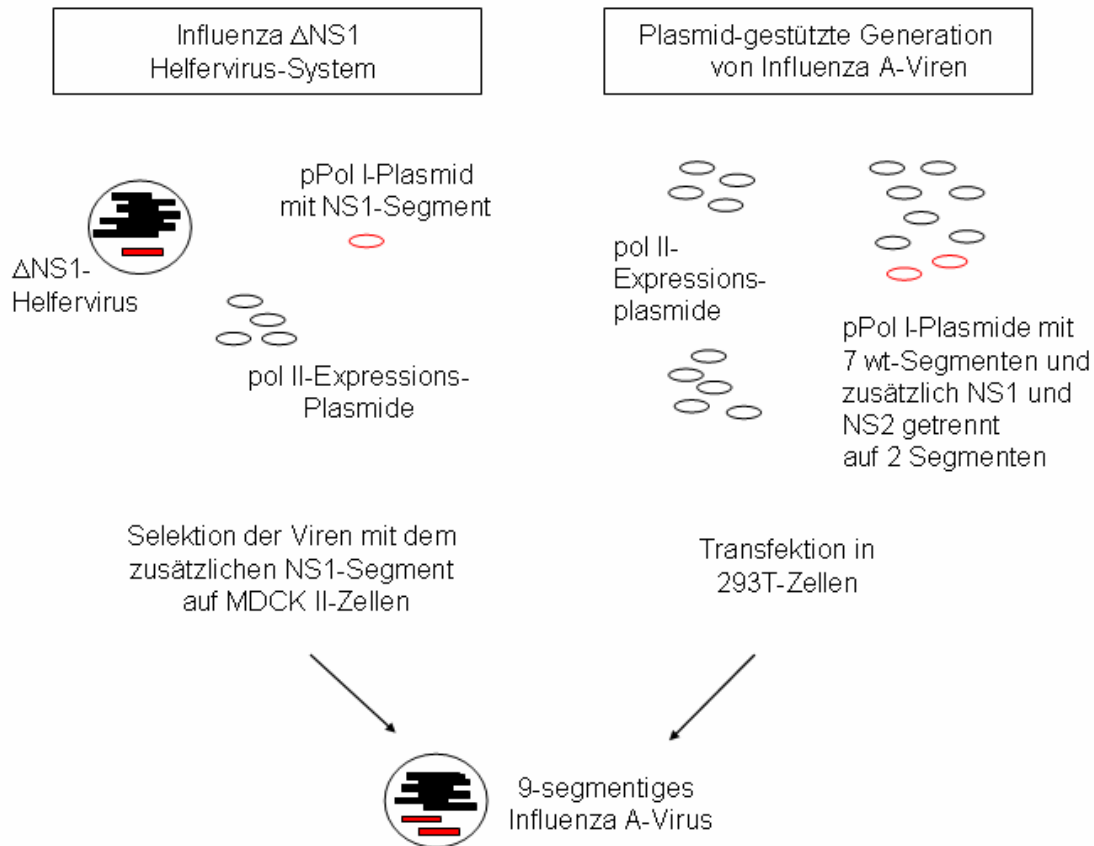
Neben den dargestellten Vorteilen enthält dieses Systems einen problematischen Aspekt: Die Genomorganisation der Influenza-Viren. Influenza A gehört zu der Familie der Orthomyxoviren und besitzt ein segmentiertes Genom aus negativ orientierter Einzelstrang-

## ERGEBNISSE

RNA. NS1 wird zusammen mit NS2 durch das kleinste der acht viralen RNA-Segmente kodiert. Da NS2 für die Virusreplikation essentiell ist (Neumann et al., 2000), kann dieses Influenza-Segment nicht als ganzes durch ein MCMV-Gen ersetzt werden. Um ein zusätzliches Gen in das Genom von  $\Delta$ NS1 einzufügen, gibt es zwei Möglichkeiten: die Klonierung eines synthetischen achten Influenza-Segmentes, das gleichzeitig für NS2 und eines der zu testenden MCMV-Gene kodiert, oder die Konstruktion eines neun-segmentigen Influenza A-Virus, welches auf dem achten Segment das NS2-Gen und auf dem neunten ein MCMV-Gen enthält. Aufgrund einer Publikation, die zeigte, dass es möglich ist, neun-segmentige Influenza A-Viren herzustellen (Enami et al., 1991), wurde dieser Weg ausgewählt. Ein zusätzlicher Vorteil dieser Strategie ist die technisch weniger anspruchsvolle Klonierung einer MCMV cDNA-Bibliothek auf ein neuntes Segment im Vergleich zu der Konstruktion von Segmenten, die gleichzeitig NS2 und eine der vielen MCMV cDNAs enthält. Außerdem war nicht geklärt, wie groß ein synthetisches achtes Influenza A – Segment sein durfte, ohne die Verpackung der Viruspartikel zu behindern. Die natürliche Größe liegt bei nur 0,9 kb. Um die Konstruktion neun-segmentiger Influenza A - Viren im Labor zu etablieren, wurden in Kooperation mit dem Influenza-Spezialisten Dr. Thorsten Wolff (Robert Koch-Institut, Berlin) zwei Methoden angewandt: das Influenza  $\Delta$ NS1 Helfervirus-System (abgeändert nach Enami et al., 1990) und die plasmid-gestützte Generation von rekombinanten Influenza A - Viren (Neumann et al., 1999). In Abb. 2.10 sind die Prinzipien dieser Techniken schematisch dargestellt. Bevor mit der Klonierung der MCMV cDNA-Bibliothek begonnen wurde, wurde erst experimentell getestet, ob sich in neun-segmentigen Influenza A-Viren die Funktion des fehlenden NS1-Gens komplementieren lässt. Zu diesem Zweck sollte als Positiv-Kontrolle NS1 als neuntes Segment in ein  $\Delta$ NS1-Genom wieder inseriert werden. Für das Helfervirus-System wurde das neunte Segment mit dem NS1-Gen in gut transfizierbaren 293T-Zellen mit Hilfe der kotransfizierten Untereinheiten der viralen RNA-Polymerase I exprimiert, bevor diese mit dem  $\Delta$ NS1-Virus infiziert wurden. Durch Kokultivierung mit MDCK II-Zellen, die sich nur schlecht transfizieren lassen, aber dafür gut permissiv für wt Influenza-Viren (nicht  $\Delta$ NS1) sind, sollten diejenigen Influenza-Viren selektioniert werden, die das neunte NS1-kodierende Segment in ihr Genom aufgenommen haben. Bei der plasmid-gestützten Generation wurden Influenza A - Viren nur durch die Transfektion von passenden Plasmiden ohne Einsatz von Helferviren ganz und gar rekombinant erzeugt. Für diese Methode werden verschiedene Konstrukte benötigt: vier Plasmide, welche die Untereinheiten der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase I

## ERGEBNISSE

exprimieren, fünf Plasmide, von denen die benötigten viralen Proteine exprimiert werden, und acht bzw. neun Plasmide, die die Sequenz der Influenza-Segmente enthalten. Nach der gleichzeitigen Transfektion dieser Konstrukte können in Zellen, die jedes der 17 bzw. 18 Plasmide mindestens einmal enthalten, replikationsfähige rekombinante Influenza A - Viren entstehen.

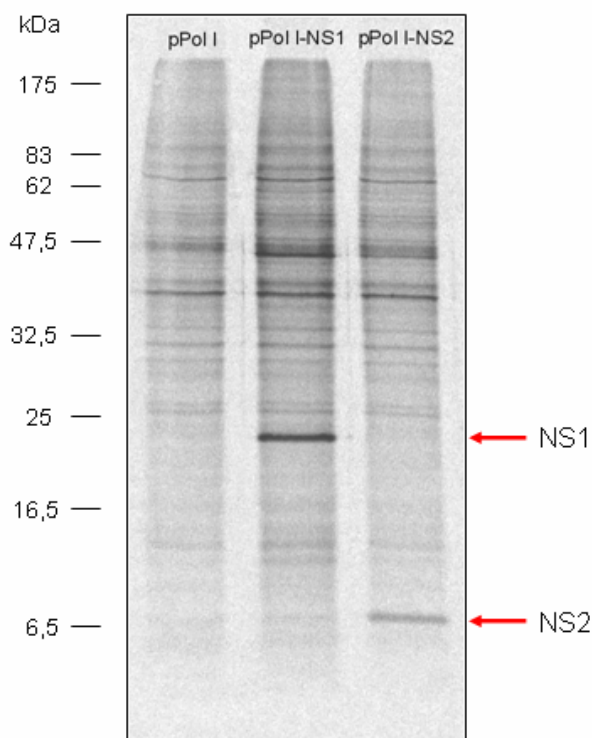


**Abb. 2.10: Konstruktion neun-segmentiger Influenza A – Viren**

Schematische Darstellung der beiden verwendeten Ansätze zur Konstruktion neun-segmentiger Influenza A-Viren. pPol I-Plasmide besitzen einen Promotor für die Expression durch die virale RNA-Polymerase I, während von pol II-Expressionsplasmiden Genprodukte mittels zellulärer RNA-Polymerase II exprimiert werden. Für die Helfervirus-basierte Methode wurden in 293T-Zellen die Untereinheiten der viralen RNA-Polymerase I synthetisiert, um das neunte virale Segment in den Zellen zu exprimieren. Diese Zellen wurden mit dem Helfervirus  $\Delta$ NS1 infiziert, um anschließend durch Kokultivierung mit MDCK II-Zellen auf NS1-enhaltende, neun-segmentige Influenza A-Viren zu selektieren. Bei der plasmid-gestützten Generation rekombinanter Viren wurden zusätzlich zu den Untereinheiten der viralen RNA-Polymerase I diejenigen Proteine exprimiert, die das Virus normalerweise in die infizierte Zelle mitbringt. Für die Expression der viralen RNA-Segmente wurden pPol I-Plasmide mit den Sequenzen der wt-Segmente 1 bis 7 transfiziert. NS1 und NS2 wurden getrennt von zwei Segmenten kodiert, so dass das rekombinante Influenza A-Virus neun Segmente besitzt.

## ERGEBNISSE

Da das rekombinante Influenza-System bereits besteht und die passenden Plasmide für die Generation von wt-Influenza A freundlicherweise von Dr. Thorsten Wolff (RKI, Berlin) zur Verfügung gestellt wurden, mussten nur die Konstrukte für NS1 und NS2 auf getrennten Segmenten hergestellt werden. Nach der erfolgreichen und durch Sequenzierung bestätigten Klonierung dieser beiden Gene in die pPol I-Vektoren wurde überprüft, ob die Proteine mit Hilfe der kotransfizierten RNA-Polymerase I tatsächlich in den verwendeten 293T-Zellen exprimiert wurden. Wie in Abb. 2.11 zu sehen ist, wurden nach Transfektion der entsprechenden Plasmide sowohl NS1 als auch NS2 in ausreichenden Mengen synthetisiert.



**Abb. 2.11: Expression von NS1 und NS2 in 293T-Zellen**

293T-Zellen wurden mit dem leeren Vektor pPol I, pPol I-NS1 oder pPol I-NS2 transfiziert. Zusätzlich zu dem betreffenden Konstrukt wurden in allen drei Ansätzen die Plasmide für die Untereinheiten der RNA-Polymerase I und das virale Nukleo-Protein kotransfiziert, um die pPol I – abhängige Expression von NS1 und NS2 zu ermöglichen. Ca. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen für 30 min mit [<sup>35</sup>S] metabolisch markiert. Die aus den Zellen hergestellten Proteinlysate wurden in einem SDS-Gel aufgetrennt. Nach der Fixierung des Gels wurden die markierten Proteine durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

## ERGEBNISSE

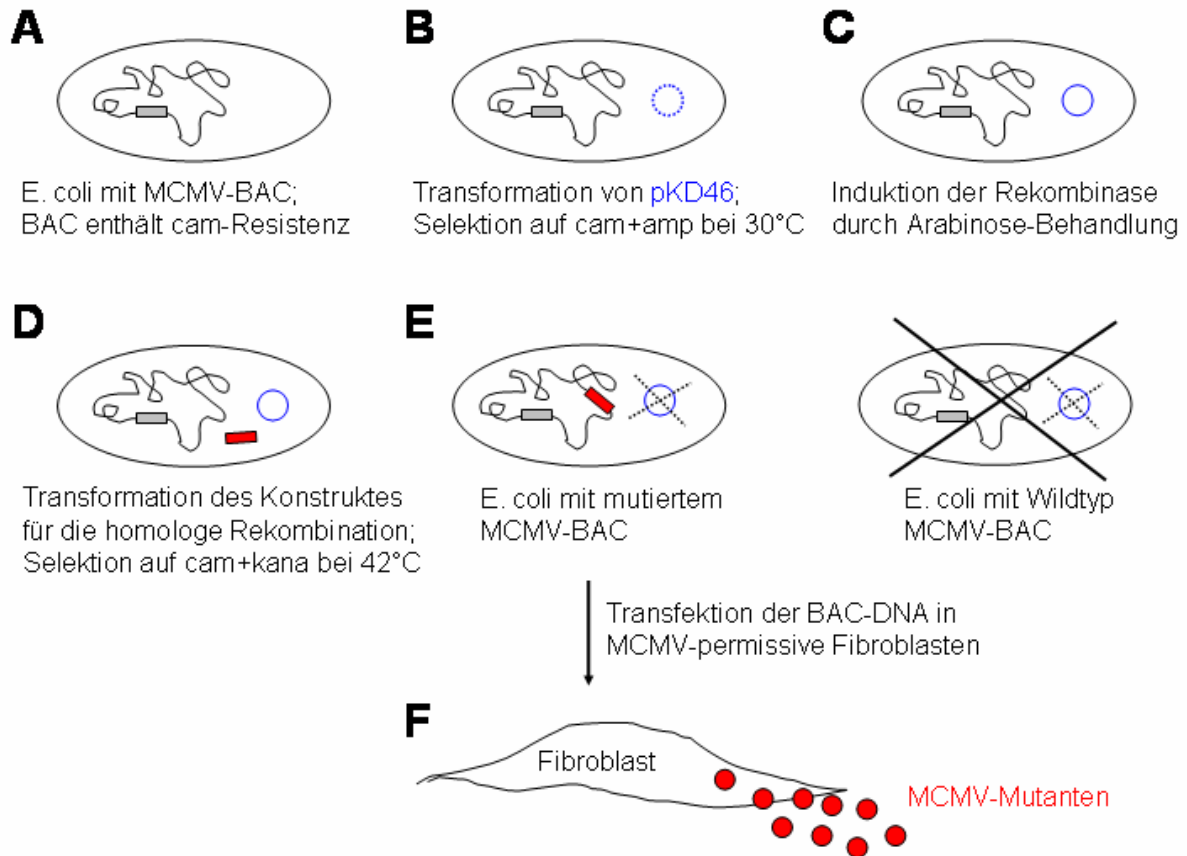
Mit den nun vorhandenen Werkzeugen sollten neun-segmentige Influenza A-Viren konstruiert werden, um sie als Screening-System für die Identifizierung MCMV-kodierter Inhibitoren der IFN $\beta$ -Induktion zu verwenden. Doch weder mit dem  $\Delta$ NS1 Helfervirus-System noch mit der plasmid-gestützten Methode konnten neun-segmentige Viren generiert werden. Bei den parallel durchgeführten Kontrollansätzen wurden wiederholt erfolgreich acht-segmentige Influenza A-Viren mit wt-Genom generiert, so dass davon ausgegangen werden kann, dass kein grundsätzliches technisches Problem vorlag. Es scheint, dass die Konstruktion replikationsfähiger neun-segmentiger Influenza A-Viren nicht ohne weiteres möglich ist, auch wenn es bereits Berichte darüber gab.

### 2.2.2. Konstruktion und Screening von MCMV-Deletionsmutanten

Nachdem sich herausgestellt hatte, dass kein System für eine positive Selektion MCMV-kodierter Inhibitoren einsetzbar war, musste der mit weitaus mehr Arbeit verbundene Weg des Screenings nach „*loss of function*“-Mutanten eingeschlagen werden. Hierfür wurden MCMV-Deletionsmutanten verwendet, denen die Kodierungskapazität für eines oder mehrere Gene fehlte. Diese Deletionsmutanten waren zum Teil bereits vorhanden und wurden uns freundlicherweise von Dr. Markus Wagner und Prof. Ulrich Koszinowski (München) zur Verfügung gestellt, zum anderen wurden neue Mutanten für das Screening konstruiert.

Für die vereinfachte Herstellung rekombinanter Viren wurde das MCMV-Genom in ein BAC (*bacterial artificial chromosome*) kloniert (Messerle et al., 1997). Damit wurde es möglich, das MCMV-Genom auf Ebene der *E.coli* – Bakterien zu verändern. Basierend auf dem MCMV-BAC wurden mittels homologer Rekombination gezielt ORFs deletiert. Das Grundprinzip der verwendeten Mutagenese-Technik ist in Abb. 2.12 schematisch dargestellt. Die relativ einfache Rekonstitution infektiöser Viren aus dem MCMV-BAC beruht auf der Initiation der *immediate early*-Gene durch zelluläre Transkriptionsfaktoren. Da die *IE*-Genexpression unabhängig von MCMV-Proteinen abläuft, ist MCMV-DNA an sich bereits „infektiös“, so dass durch eine einfache Transfektion viraler DNA infektiöse Viruspartikel generiert werden können.

## ERGEBNISSE



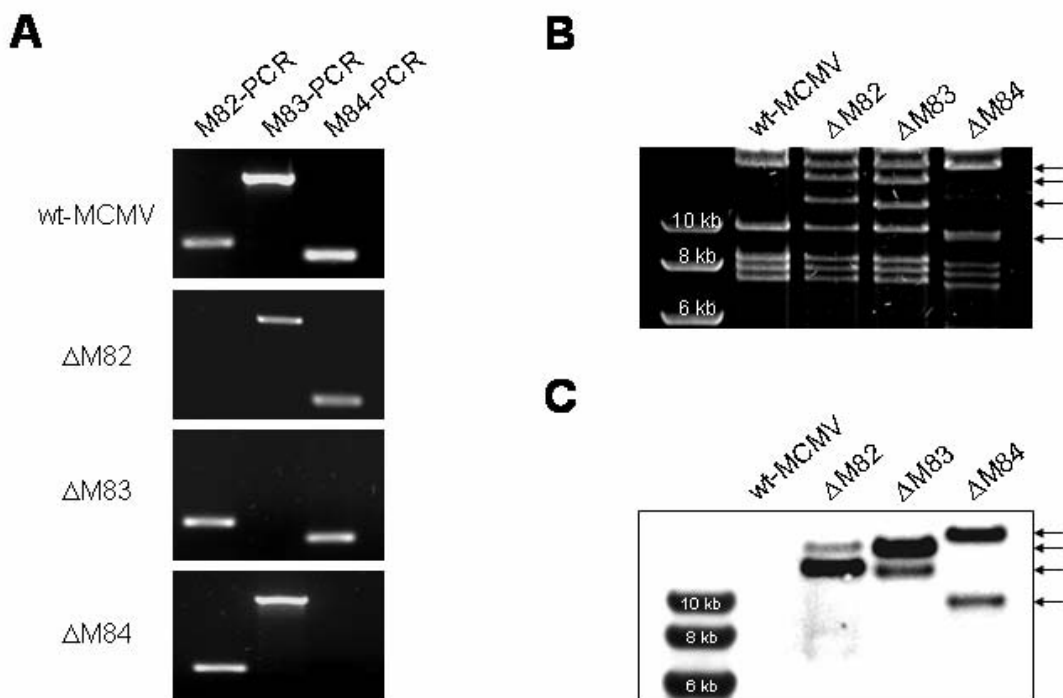
**Abb. 2.12: Schematische Darstellung der BAC-basierten Mutagenese des MCMV-Genoms**

Konstruktion rekombinanter MCMV-Mutanten mittels BAC-Mutagenese (A) BAC-Sequenz integriert in MCMV-Genom für Replikation in RecA – negativen *E.coli*; BAC-Sequenz enthält Chloramphenicol (cam) – Resistenzgen als Selektionsmarker. (B) Transformation von pKD46 in MCMV-BAC enthaltende *E.coli*; pKD46 enthält temperatur-sensitiven Origin, vermittelt Ampicillin-Resistenz und kodiert für benötigte Rekombinase. (C) Induktion der Expression der Rekombinase durch Arabinose-Behandlung (D) Herstellung des Konstruktes für die homologe Rekombination per PCR: Kanamycin (kana) – Kassetten mit flankierenden homologen Zielsequenzen. Transformation des Konstruktes in *E.coli* mit MCMV-BAC und arabinose-induziertem pKD46; Selektion auf Integration der kana-Kassette und gleichzeitige Temperatur-Inaktivierung von pKD46. (E) Erfolgreiche homologe Rekombination des kana-Konstruktes führt zu gezielter Mutagenese des MCMV-BACs. (F) Rekonstitution der rekombinanten Viren durch Transfektion der BAC-DNA in MCMV-permissive Fibroblasten.

Als Beispiel einer erfolgreichen Konstruktion rekombinanter Viren ist die Überprüfung der MCMV-Deletionsmutanten  $\Delta M82$ ,  $\Delta M83$  und  $\Delta M84$  in Abb. 2.13 dargestellt. Nach der homologen Rekombination wurde aus *E.coli* – Kolonien, die sowohl chloramphenicol- als auch kanamycin-resistent waren, BAC-DNA isoliert, um zu kontrollieren, ob die Insertion der Kanamycin-Kassette in die Zielsequenz korrekt erfolgt war. Die BAC-DNA des mutierten

## ERGEBNISSE

MCMV-Genoms wurde mittels PCR mit genspezifischen Primern auf die Deletion des betroffenen ORFs getestet (Abb. 2.13 A). Zusätzlich wurde die BAC-DNA einem Kontroll-Verdau unterzogen, um die Richtigkeit des Restriktionsmusters zu überprüfen (Abb. 2.13 B). Als Nachweis dafür, dass die Kanamycin-Kassette nicht mehrfach in das MCMV-Genom inseriert wurde, wurde mit Hilfe einer spezifischen Sonde, die gegen das Kanamycin-Resistenzgen gerichtet war, ein Southernblot durchgeführt. Da die Kanamycin-Kassette eine *HindIII*-Schnittstelle aufweist, bindet die Sonde an zwei Restriktionsfragmente (Abb. 2.13 C). Die unterschiedliche Signalstärke der beiden nachweisbaren Banden im Southernblot resultiert aus der Tatsache, dass durch den *HindIII*-Verdau die Kanamycin-Kassette in zwei verschieden große Teile geschnitten wird und die Sonde somit unterschiedlich stark bindet.

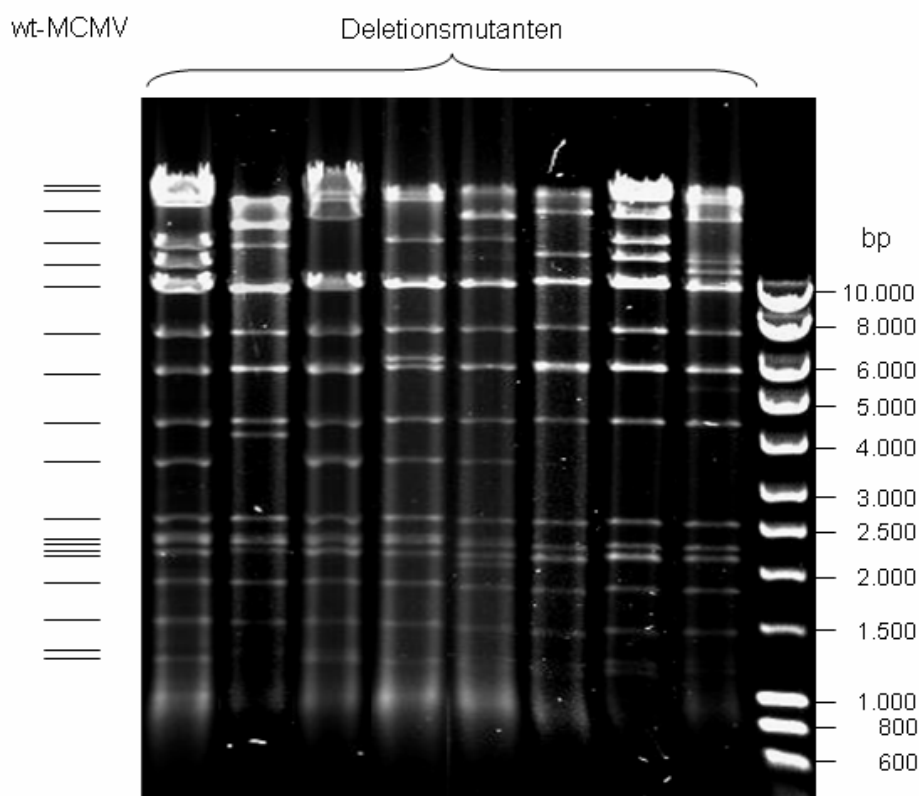


**Abb. 2.13: Überprüfung der MCMV-Mutanten  
 $\Delta$ M82,  $\Delta$ M83 und  $\Delta$ M84**

BAC-DNA aus *E.coli* nach homologer Rekombination wurde auf die Richtigkeit der Insertion der Kanamycin-Kassette und der daraus resultierenden Deletion der Zielgene überprüft. (A) BAC-DNA aus wt-MCMV,  $\Delta$ M82,  $\Delta$ M83 und  $\Delta$ M84-tragenden *E.coli* wurde als Template für eine PCR mit M82, M83 bzw. M84-spezifischen Primern eingesetzt. (B) BAC-DNA wurde mit *HindIII* verdaut und in einem 0,5%igem Agarosegel aufgetrennt, um das Muster der Restriktionsfragmente zu überprüfen. Die Pfeile markieren die in den Mutanten veränderten Banden. (C) Die DNA aus dem *HindIII* – Verdau wurde auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer spezifischen Sonde gegen die Kanamycin-Kassette hybridisiert.

## ERGEBNISSE

Mit den nun verfügbaren Deletionsmutanten war ein großer Teil des MCMV-Genoms abgedeckt. Nach der Rekonstitution der verschiedenen rekombinanten Viren wurden gereinigte MCMV-Stocks hergestellt, die von Zellresten befreit und mittels Zentrifugation durch ein Saccharose-Kissen aufkonzentriert wurden. Diese Reinigung der Virus-Stocks ist für die Untersuchung der IFN-Induktion von Bedeutung, da durch Bestandteile toter Zellen eine IFN-Antwort ausgelöst werden könnte, vor allem, wenn sie in relativ großen Mengen mit den zu infizierenden Zellen in Kontakt kommen.



**Abb. 2.14: Kontrolle der gereinigten Stocks von MCMV-Mutanten**

Gereinigte MCMV-Stocks wurden  $\ddot{U}$ N mit Proteinase K verdaut. Anschließend wurde die enthaltende DNA nach einer Phenol/Chloroform-Extraktion gefällt und in  $H_2O$  resuspendiert. Die Virus-DNA wurde mit *AseI* geschnitten und in einem 0,5%igen Agarosegel aufgetrennt.

Um zu kontrollieren, ob die verwendeten MCMV-Stocks keinen zu großen Anteil zellulärer Trümmer enthielten, wurde die DNA aus den gereinigten Stocks isoliert und einem Restriktionsverdau unterzogen. Hierfür eignen sich vor allem die Enzyme *HindIII* und *AseI*, weil sie eine übersichtliche Zahl unterscheidbarer Fragmente erzeugen. Nach der Auftrennung



## ERGEBNISSE

der Restriktionsfragmente im Agarosegel konnte man sehen, ob nur die MCMV-typischen Banden erschienen oder ob noch zusätzlich nicht-virale DNA in den Stocks vorhanden war. Außerdem konnte mittels der Bandenmuster überprüft werden, ob die rekonstituierten Viren die spezifischen Deletionen tatsächlich enthielten. Abb. 2.14 zeigt exemplarisch das Restriktionsmuster ausgewählter Virus-Stocks von Deletionsmutanten, mit denen im Folgenden nach MCMV-kodierten Inhibitoren der IFN $\beta$ -Induktion gesucht wurde. Ein großer Nachteil dieses Screening-Ansatzes ist der Ausschluss der essentiellen Gene. Alle Mutanten, denen ein essentielles Gen fehlt, können nicht als Virus rekonstituiert und somit auch nicht getestet werden. Dies war der Grund, warum versucht wurde, mittels neun-segmentiger Influenza A-Viren ein „*gain of function*“-System aufzubauen.

m01	m16	m130	m149	m164
m02	m17	m131	m150	m165
m03	m18	m132	m151	m166
m04	m19	m133	m152	m167
m05	m20	m134	m153	m168
m06	m21	m135	m154	m169
m07	m22	m136	m155	m170
m08	<b>M27</b>	m137	m156	
m09	<b>M35</b>	m138	m157	
m10	<b>M82</b>	m139	m158	
m11	<b>M83</b>	m144	m159	
m12	<b>M84</b>	m145	m160	
m13	<b>IE2</b>	m146	m161	
m14	m128	m147	m162	
m15	m129	m148	m163	

**Tabelle 2.1: MCMV-ORFs, die nicht in die Inhibition der IFN $\beta$ -Genexpression involviert sind**

Die Deletion der in dieser Tabelle aufgeführten Gene beeinflusst nicht die Induktion und Inhibition der IFN $\beta$ -Expression in MCMV-infizierten NIH3T3 in der Anfangsphase der Infektion. MCMV-ORFs, die ein Lagehomolog im HCMV-Genom besitzen, sind fett gedruckt.

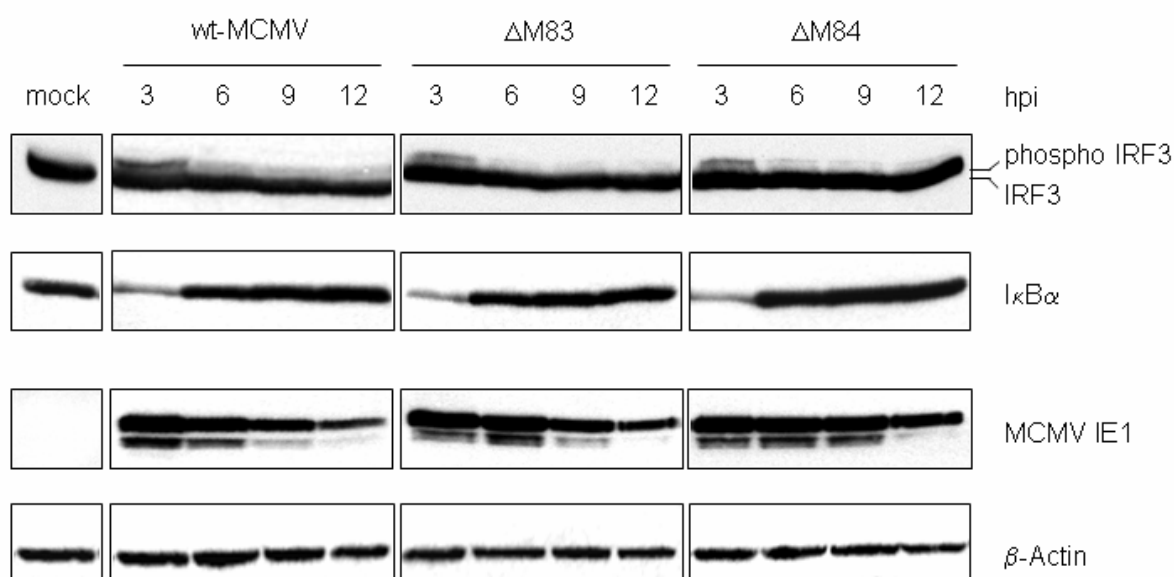
## ERGEBNISSE

Die Untersuchung der verfügbaren MCMV-Deletionsmutanten zeigte, dass ein Großteil der nicht-essentiellen Gene nicht an der Inhibition der IFN $\beta$ -Transkription in den verwendeten NIH3T3-Zellen beteiligt ist. In Tabelle 2.1 sind diese ORFs aufgelistet. *M83* und *M84* sind die Homologe des HCMV-Gens *UL83*, welches für das Phosphoprotein pp65 kodiert. Über die HCMV-Deletionsmutante, der *UL83* (pp65) fehlt, wurde publiziert, dass sie im Gegensatz zu wt-HCMV nicht mehr in der Lage ist, die IFN $\beta$ -Transkription in infizierten Fibroblasten zu inhibieren (Abate et al., 2004; Browne und Shenk, 2003). Auf Basis dieser Berichte waren die MCMV-Homologe *M83* und *M84* Kandidaten für MCMV-kodierte Antagonisten. Daher wurden Mutanten mit gezielter Deletion dieser ORFs konstruiert. Doch die Analyse von  $\Delta$ M83 und  $\Delta$ M84 zeigte keine Veränderung bezüglich Kinetik oder Stärke der IFN $\beta$ -Expression in den infizierten Zellen. Da in den Publikationen über die IFN $\beta$ -Inhibition durch *UL83* vorgeschlagen wurde, dass dieses HCMV-Protein möglicherweise mit dem NF- $\kappa$ B oder IRF3-abhängigen Signalweg interferiert, wurde die Aktivierung dieser Transkriptionsfaktoren auch in  $\Delta$ M83- und  $\Delta$ M84-infizierten Zellen genauer untersucht. Damit sollte sichergestellt werden, dass die MCMV-Homologe von *UL83* wirklich nicht die Funktionen besitzen, die über pp65 im Hinblick auf die Inhibition der IFN $\beta$ -Transkription beschrieben wurden.

Wie Abb. 2.15 zeigt, wird in  $\Delta$ M83- und  $\Delta$ M84- infizierten Zellen die Phosphorylierung von IRF3 genau so schnell abgeschaltet wie in Zellen, die mit wt-MCMV infiziert wurden. Daraus kann man schließen, dass weder *M83* noch *M84* in die Inhibition der IRF3-Aktivierung involviert sind. Betrachtet man die I $\kappa$ B $\alpha$ -abhängige Aktivierung von NF- $\kappa$ B, lässt sich kein Unterschied in der I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteinmenge in wt-MCMV oder  $\Delta$ M83- bzw.  $\Delta$ M84-infizierten Zellen feststellen. Der Verlust von *M83* oder *M84* hat demnach keinen Einfluss auf die MCMV-kodierte Fähigkeit, die zelluläre I $\kappa$ B $\alpha$ -Menge nach der initialen Phase der NF- $\kappa$ B Aktivierung auf den mock-Zustand zu bringen und den inaktiven Status wiederherzustellen.

Nimmt man alle Ergebnisse hinsichtlich *M83/M84* und IFN $\beta$ -Induktion zusammen, kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die MCMV-Homologe von HCMV-*UL83* scheinbar nicht die Expression von IFN $\beta$  inhibieren und weder die IRF3-Phosphorylierung noch die I $\kappa$ B $\alpha$ -abhängige Aktivierung von NF- $\kappa$ B beeinflussen.

## ERGEBNISSE



**Abb. 2.15: M83 und M84 interferieren nicht mit der Aktivierung von IRF3 und NF-κB**

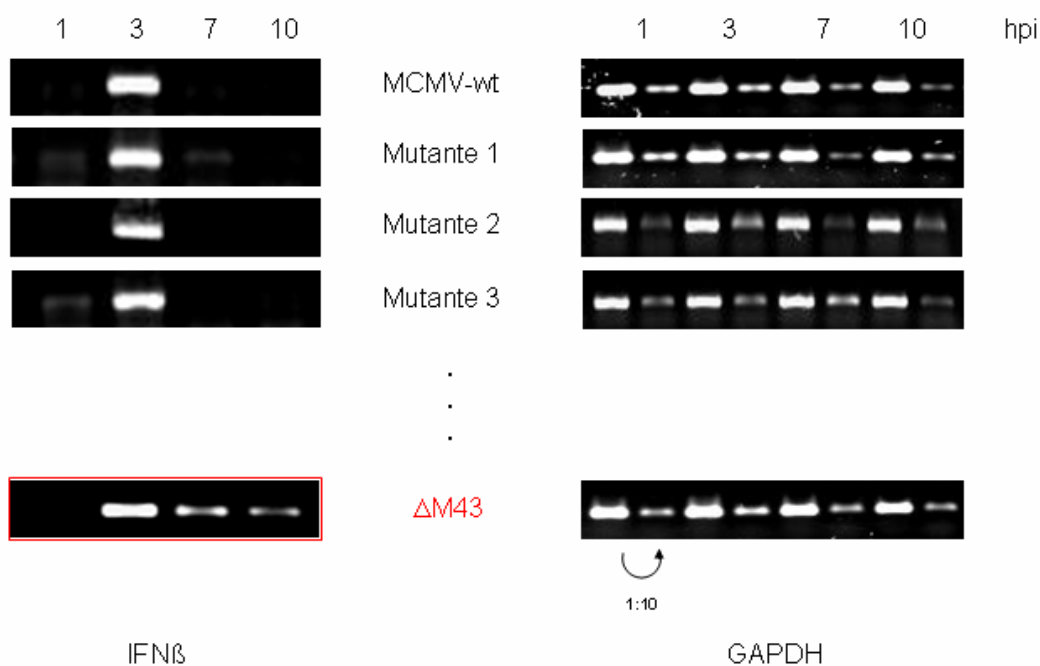
NIH3T3-Zellen wurden mock-behandelt, mit wt-MCMV, ΔM83 oder ΔM84 infiziert (MOI 5). Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion wurden Proteinlysate hergestellt. Diese wurden in einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Die Detektion der zu untersuchenden Proteine erfolgte mittels spezifischer Antikörper. MCMV IE1 diente als Kontrolle der Infektion, β-Actin als Ladekontrolle.

### 2.2.3. ΔM43: Erste MCMV-Mutante mit IFNβ-Phänotyp

Bei dem Screening auf „*loss of function*“ wurden viele MCMV-Gene ausgeschlossen, bevor ein Kandidat für einen Inhibitor der IFNβ-Expression gefunden wurde. Doch nachdem ein Großteil der nicht-essentiellen ORFs auf eine mögliche Beteiligung in der IFNβ-Inhibition geprüft wurde, konnte eine Deletionsmutante identifiziert werden, die einen Defekt in der Inhibition der IFNβ-Transkription aufweist. Für die Untersuchung der Deletionsmutanten wurden die Zeitpunkte 1, 3, 7 und 10 hpi ausgewählt, da mit der 3 hpi – Probe eine interne Positivkontrolle für die IFNβ RT-PCR vorhanden war und die 7 bzw. 10 hpi – Proben zeigten, ob die Inhibition der IFNβ-Expression ohne den betreffenden ORF mit der gleichen Effizienz wie in wt-MCMV-infizierten Zellen stattfindet. Abb. 2.16 zeigt die IFNβ-Expressionkinetik infizierter Zellen. Exemplarisch sind einige der nicht-auffälligen Mutanten dargestellt. Der mögliche Kandidat wurde anhand der unterschiedlichen IFNβ-Expressionskinetik gefunden.

## ERGEBNISSE

Die Deletionsmutante  $\Delta M43$  war im Gegensatz zu wt-MCMV nicht in der Lage, die IFN $\beta$ -Genexpression bereits 7 hpi abzuschalten (Abb. 2.16). Sogar 10 hpi war noch IFN $\beta$ -mRNA nachweisbar. Dies deutet darauf hin, dass durch die Deletion des ORFs *M43* die Inhibition der IFN $\beta$ -Transkription beeinflusst wird.



**Abb. 2.16:  $\Delta M43$  schaltet die IFN $\beta$ -Expression langsamer ab als wt-MCMV**

NIH3T3-Zellen wurden mit wt-MCMV oder einer Deletionsmutante infiziert (MOI 5). Nach den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion wurde Gesamt-RNA isoliert und mittels semi-quantitativer RT-PCR auf IFN $\beta$ -Expression analysiert. Zum Mengenabgleich wurde die Menge an GAPDH-mRNA bestimmt.

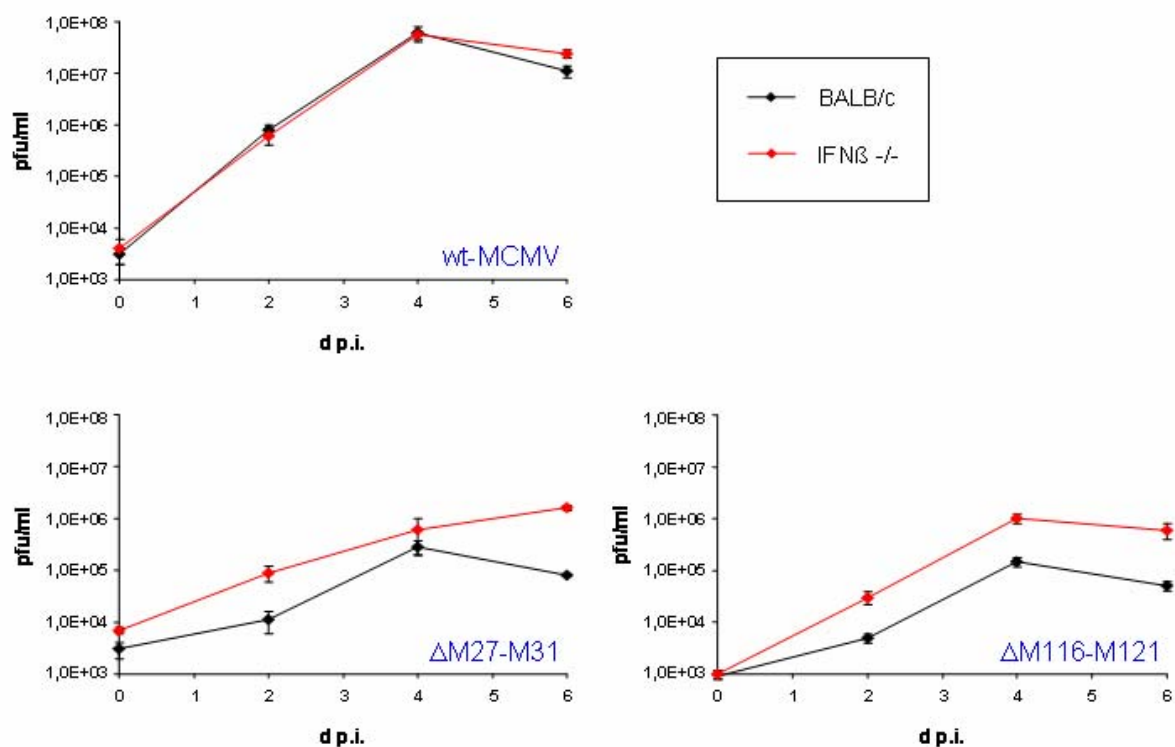
Auch wenn die verwendete Screening-Strategie mit den MCMV-Deletionsmutanten ein gewisses Risiko mit sich trug, wurde dieser Weg eingeschlagen, da gezeigt werden konnte (wie in 2.1 dargestellt), dass MCMV für verschiedene Inhibitoren der IFN $\beta$ -Induktion kodiert. Es bestand zwar die Möglichkeit, dass alle Inhibitoren essentiell für die Virusreplikation sein könnten, so dass sie mit Hilfe von MCMV-Deletionsmutanten nicht hätten gefunden werden können. Doch da die analysierten Fibroblasten nicht zu den Zellarten gehören, die in großen Mengen Interferone produzieren, war es wahrscheinlich, dass nur Mutanten mit sehr gravierendem Defekt in der IFN $\alpha/\beta$ -Inhibition nicht replizieren und somit nicht in diesem Screening-System untersucht werden konnten. Und wie sich herausstellte, hat sich diese

## ERGEBNISSE

Vermutung bewahrheitet: Die erste MCMV-Mutante, die einen IFN $\beta$ -Phänotyp aufweist, wurde gefunden.

### 2.2.4. Identifizierung möglicher Kandidaten mit Hilfe von Wachstumskurven

Um zu untersuchen, ob es gerechtfertigt ist, für die Testung der verbleibenden schlecht replizierenden Mutanten den unausweichlich großen Arbeitsaufwand zu investieren, wurden Wachstumsanalysen durchgeführt. Mit Hilfe dieser Replikationsstudien konnten Mutanten identifiziert werden, die auf wt-MEF ein Wachstumsdefizit aufweisen, welches auf IFN $\beta$  Knockout-MEF zum Teil aufgehoben ist (Abb. 2.17).



**Abb. 2.17: MCMV-Mutanten, die in IFN $\beta$  Knockout-Zellen besser replizieren als in wt-Zellen**

Primäre Fibroblasten aus Mäuseembryonen (MEF, *mouse embryonic fibroblasts*) wurden aus schwangeren wt und IFN $\beta$  -/- BALB/c-Mäusen präpariert. Die MEF wurden mit wt-MCMV oder der betreffenden Deletionsmutante infiziert (MOI 0,005). 2, 4 und 6 Tage nach Infektion wurden infizierte Zellen eingefroren. Für die Bestimmung der eingesetzten Virusmenge (0 d p.i.) und der Virusreplikation (2, 4, 6 d p.i.) wurden die Titer der Proben mittels Plaque-Assay in Triplikaten bestimmt.

## ERGEBNISSE

Die Identifizierung von MCMV-Deletionsmutanten, deren Wachstumsdefizit zumindest teilweise IFN $\beta$ -abhängig ist, führte zu vielversprechenden Kandidaten für weitere MCMV-kodierte IFN $\beta$ -Inhibitoren. Doch da den betreffenden Deletionsmutanten nicht nur ein ORF fehlt, ist die Zuordnung der putativen IFN $\beta$ -inhibitorischen Funktion zu einem viralen Genprodukt noch nicht möglich. Um definierte Genprodukte untersuchen zu können, müssen MCMV-Mutanten mit gezielter Deletion einzelner betreffender ORFs generiert werden. Dies wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt, doch die Weiterführung dieses Projekts beinhaltet die Analyse der weiteren Kandidaten-Gene.

### **ZUSAMMENFASSUNG (2)**

**Nach dem sich herausstellte, dass kein Screening-System mit neun-segmentigen Influenza A - Viren aufgebaut werden konnte, wurden MCMV-Deletionsmutanten auf einen IFN $\beta$ -Phänotyp untersucht. Auf diese Weise wurde  $\Delta$ M43 als erste MCMV-Mutante mit defizienter Inhibition der IFN $\beta$ -Genexpression identifiziert. Außerdem konnten mittels Replikationsanalysen weitere Kandidatengene gefunden werden.**

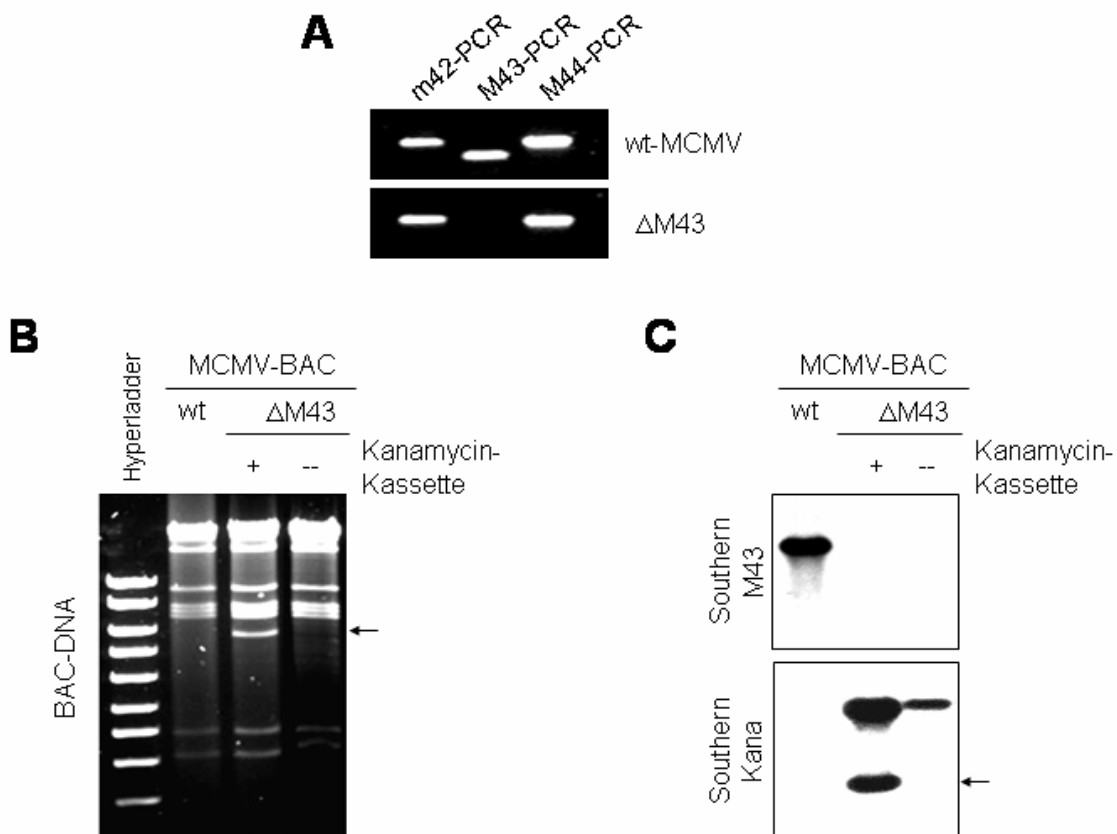
### **2.3. Charakterisierung von $\Delta$ M43**

Nachdem das Screening der MCMV-Mutanten einen ersten Hinweis auf eine mögliche Interferenz von *M43* mit der IFN $\beta$ -Genexpression erbrachte, wurde  $\Delta$ M43 eingehender analysiert, um die Folgen der Deletion für das Virus zu untersuchen und Einblicke in die Funktion von *M43* zu erhalten. Hierbei ist von Vorteil, dass *M43* Teil eines „*Forward Genetics*“ – Projekts ist und die Richtung der *M43*-Charakterisierung daher nicht willkürlich gewählt, sondern von dem gefundenen Phänotyp der Deletionsmutante abgeleitet wurde.

Bei der Konstruktion der Mutanten gibt es nach der gezielten Insertion der Kanamycin-Kassette durch homologe Rekombination die Möglichkeit der anschließenden Entfernung dieser Fremdsequenz aus dem MCMV-Genom. Diese Elimination der bakteriellen Resistenzkassette beruht auf *frt*-Sequenzen, welche die inserierte Fremdsequenz flankieren und bei Vorhandensein einer FLP-Rekombinase das Entfernen der Kanamycin-Kassette

## ERGEBNISSE

gestatten. Da diese Methode eine Verbesserung der Mutagenese-Technik darstellt und nicht bei der Konstruktion aller Mutanten zur Verfügung stand, enthielten einige der verwendeten Mutanten noch die Fremdsequenz. Bei der Konstruktion von  $\Delta M43$  wurde jedoch der Vorteil der *frt*-Rekombination verwendet und es wurden zwei unabhängige Viren hergestellt: eine Mutante, die anstelle des *M43*-ORF die Kanamycin-Kassette enthält, und eine Mutante, die weder *M43* noch die Resistenzkassette enthält.



**Abb. 2.18: Überprüfung der *M43*-Deletion**

BAC-DNA aus wt-MCMV oder  $\Delta M43$ -enthaltenden *E. coli* wurde extrahiert und auf die Richtigkeit der *M43* – Deletion überprüft. (A) wt-MCMV oder  $\Delta M43$  BAC-DNA wurde als Template für eine PCR mit m42, M43 bzw. M44-spezifischen Primern eingesetzt. (B) BAC-DNA wurde mit *HindIII* verdaut und in einem 0,5%igem Agarosegel aufgetrennt, um das Muster der Restriktionsfragmente zu überprüfen. Die prominentere der beiden durch die Insertion der Kanamycin-Kassette zusätzlich entstehenden Banden ist durch einen Pfeil markiert. (C) Die DNA aus dem *HindIII* – Verdau wurde auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer spezifischen Sonde gegen *M43* bzw. gegen die Kanamycin-Kassette hybridisiert.

## ERGEBNISSE

Wie man Abb. 2.18 entnehmen kann, ist in beiden  $\Delta M43$ -Mutanten *M43* deletiert. Während ohne *frt*-Rekombination die Kanamycin-Kassette im Southernblot als zwei *HindIII*-Fragmente detektierbar ist, ist sie nach einer *frt*-Rekombination nicht mehr enthalten. Aufgrund eines minimalen verbleibenden Restes der Fremdsequenz von ca. 100 Nukleotiden auch nach der Entfernung der Kanamycin-Kassette hybridisiert die verwendete Southernblot-Sonde, welche gegen die gesamte Fremdsequenz gerichtet ist, noch schwach mit dem betreffenden Fragment (Abb. 2.18 C).

### 2.3.1. Expressionsanalyse von *M43* und benachbarter ORFs

Nachdem *M43* als möglicher IFN $\beta$ -Antagonist mit Hilfe des Mutanten-Screenings identifiziert wurde, sollten die Eigenschaften des *M43*-Genprodukts näher charakterisiert werden, um Einblicke in die molekularen Auswirkungen der *M43*-Deletion zu gewinnen.

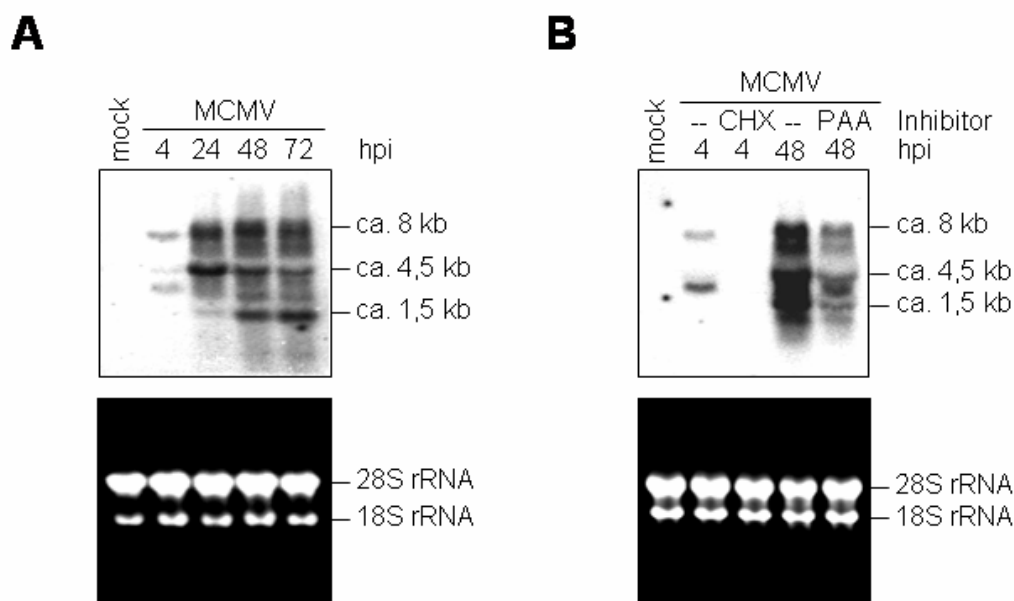
Als erstes wurden Experimente zur Einordnung der *M43*-Transkription in die sequentiellen viralen Expressionsphasen durchgeführt. Hierfür wurden Fibroblasten mit wt-MCMV infiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten der MCMV-Replikation wurde aus den infizierten Zellen Gesamt-RNA präpariert. Diese wurde anschließend mittels Northernblot untersucht. Wie man Abb. 2.19 entnehmen kann, hybridisiert eine *M43*-spezifische Sonde mit Transkripten unterschiedlicher Größe. Die Tatsache, dass mehrere verschiedene *M43*-Transkripte detektiert wurden, ist im MCMV-Kontext nicht ungewöhnlich, da viele virale mRNAs polycistronisch sind. Aus diesem Ergebnis lässt sich nicht schließen, von welcher mRNA das zu untersuchende Genprodukt translatiert wird. Die Northernblot-Analyse weist jedoch nach, dass virale Transkripte entstehen, die den vorausgesagten *M43*-ORF zumindest zum Teil enthalten.

Die Expressionsanalysen zeigten, dass schon kurz nach Infektion *M43*-Transkripte nachweisbar sind. Die Intensität der *M43*-spezifischen Signale nimmt mit zunehmender Infektionszeit zu (Abb. 2.19 A). Auch wenn diese Kinetik bereits auf eine *early/late* - Expression hinweist, wurde durch den Einsatz der Inhibitoren Cycloheximid (CHX) und Phosphonoessigsäure (PAA) die virale *immediate early*- bzw. *late*-Phase untersucht. Da die Expression der *immediate early*-Gene keiner viralen Proteine bedarf, entstehen *immediate early*-Transkripte auch in der Gegenwart von CHX, einem Inhibitor der Translation und *de novo*-Proteinsynthese. Analysiert man die *M43*-Transkripte unter den Bedingungen inhibierter Translation, können keine *M43*-enthaltenden mRNAs nachgewiesen werden (Abb. 2.19 B).



## ERGEBNISSE

Daraus lässt sich folgern, dass *M43* nicht *immediate early* exprimiert wird. Verhindert man mittels Verwendung von PAA die *late*-Genexpression durch Hemmung der viralen DNA-Polymerase, kann unter diesen Bedingungen eine reduzierte Menge an *M43*-Transkripten zu späten Zeitpunkten der Replikationsphase detektiert werden (Abb. 2.19 B). Diese Reduktion lässt darauf schließen, dass *M43* zu den *late*-exprimierten Genen gehört. Doch da die Expression nicht vollständig, sondern nur zum Teil durch PAA gehemmt wird, wird *M43* nicht als strikt *late*, sondern als *early/late* eingeordnet.



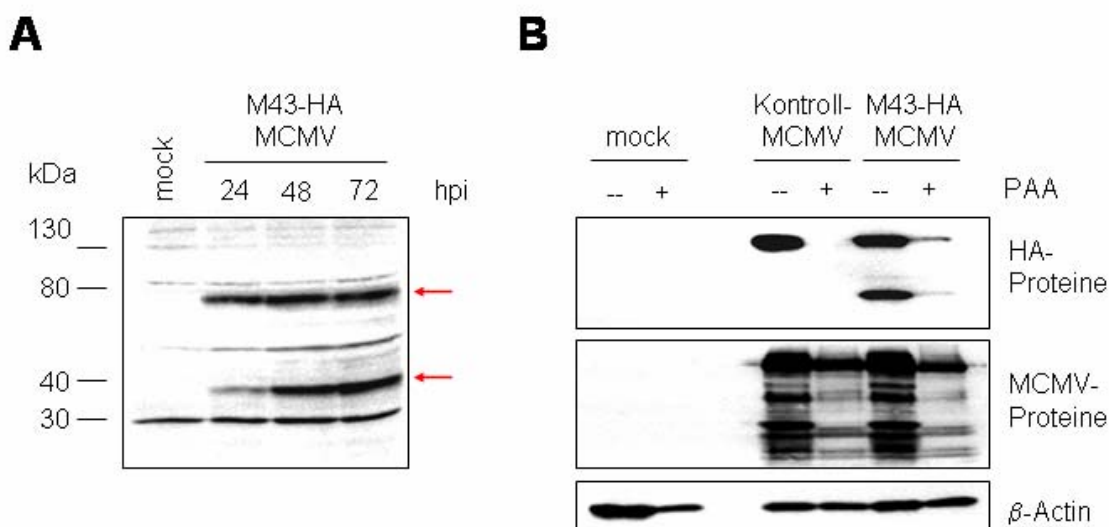
**Abb. 2.19: *M43*-mRNA ist *early/late* nachweisbar**

NIH3T3-Zellen wurden mock-behandelt oder mit wt-MCMV infiziert (MOI 5). Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion wurde Gesamt-RNA isoliert. Diese wurde in einem MOPS-Gel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Mittels einer spezifischen Sonde wurden *M43*-Transkripte im Northernblot nachgewiesen. (A) Die Kinetik der Expression von *M43*-Transkripten wurde anhand von RNA-Proben verschiedener Zeitpunkte im Replikationszyklus von MCMV dargestellt. (B) Die MCMV-Infektion wurde in Gegenwart der Inhibitoren Cycloheximid (CHX) bzw. Phosphonoessigsäure (*phosphono acetic acid*, PAA) durchgeführt, um *M43* auf *immediate early*- bzw. *late*-Expression zu untersuchen.

Die Northernblot-Analysen der *M43*-Transkripte deuten darauf hin, dass *M43*-Genprodukte entstehen. Aber da *in silico*-Voraussagen nicht immer mit der Wirklichkeit übereinstimmen, kann die Existenz von *M43*-Genprodukten nur auf Proteinebene nachgewiesen werden. Daher wurde von Dr. Albert Zimmermann (HHU, Düsseldorf) eine MCMV-Mutante konstruiert, die

## ERGEBNISSE

ein epitop-markiertes M43-HA exprimiert. Mit dieser Mutante war nun ein Werkzeug vorhanden, mit dem man ohne M43-spezifischen Antikörper die *M43*-Expression im MCMV-Kontext untersuchen konnte. Um die bereits vorhandenen Resultate aus den Northernblot-Analysen auch auf Proteinebene zu reproduzieren und damit eine Korrelation zwischen Transkripten und Proteinen herzustellen, wurde mittels Westernblot die Produktion von M43-HA in infizierten Zellen nachgewiesen.



**Abb. 2.20: Im MCMV-Kontext werden zwei verschiedene Formen von M43-HA *early/late* exprimiert**

NIH3T3-Zellen wurden mock-behandelt oder mit M43-HA exprimierendem MCMV infiziert (MOI 5). Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion wurden Proteinlysate hergestellt und in einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Membran wurden mit Hilfe eines HA-spezifischen Antikörpers die epitop-enhaltenden Proteine nachgewiesen. (A) Die Kinetik der Expression von M43-HA wurde anhand von Proteinlysaten verschiedener Zeitpunkte im Replikationszyklus von MCMV dargestellt. Die Pfeile markieren die spezifisch erkannten HA-enhaltenden *M43*-Genprodukte. (B) Die MCMV-Infektion wurde in Gegenwart des Inhibitors Phosphonoessigsäure (PAA) durchgeführt, um die *late* – Genexpression zum Zeitpunkt 48 hpi auf Proteinebene zu untersuchen. Als Kontrolle wurde eine MCMV-Mutante mitgeführt, die ein HA-markiertes *late* - Protein exprimiert. Zusätzlich wurde der Westernblot mit MCMV-Latenzserum detektiert, um zu zeigen, dass MCMV-Genexpression unter PAA-Behandlung stattgefunden hat.  $\beta$ -Actin diente als Ladekontrolle.

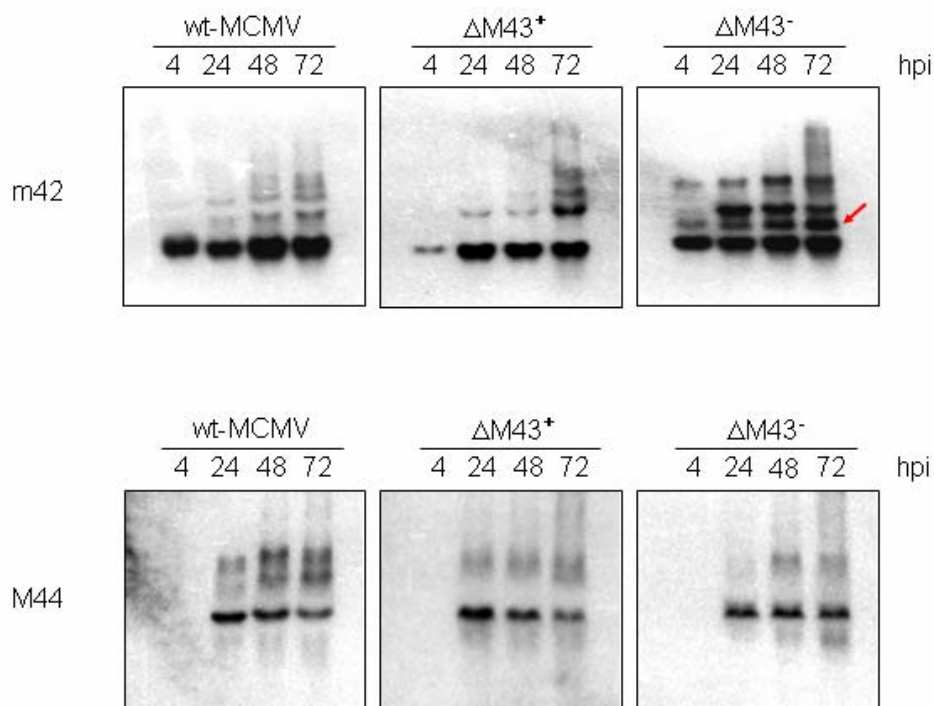
Die Ergebnisse der Westernblot-Analysen zeigten, dass in Zellen, die mit der MCMV-Mutante M43-HA infiziert wurden, HA-markierte Proteine exprimiert wurden. Aber interessanterweise entstehen im MCMV-Kontext zwei Formen von M43-HA, welche eine

## ERGEBNISSE

Größe von etwa 40 und 75 kDa aufweisen (Abb. 2.20). Die Expressionskinetik dieser beiden Proteine (Abb. 2.20 A) stimmt mit der in den Northernblot-Analysen beobachteten Kinetik der *M43*-Transkripte (Abb. 2.19 A) überein. Zum Nachweis der *early/late* – Expression auf Proteinebene wurde mittels PAA-Behandlung die virale *late*-Genexpression gehemmt. Als Kontrolle für das Funktionieren der PAA-Behandlung wurde eine MCMV-Mutante parallel mitgeführt, die ein HA-markiertes *late*-Protein exprimiert. Dieses Gen wurde im Rahmen dieser Arbeit als neues, strikt *late* exprimiertes Glykoprotein identifiziert. Doch da die Befunde bezüglich des neuen Gens nicht direkt mit dem Thema Interferon-System zusammenhängen, werden sie in dieser Dissertation nicht weiter ausgeführt. Der im Zusammenhang von *M43* wichtige Aspekt ist die Reduktion von beiden *M43*-Formen in Gegenwart von PAA (Abb. 2.20 B). Dies ist ein Hinweis darauf, dass beide *M43*-Formen *early/late* exprimiert werden, wobei es den Anschein hat, dass die kleinere Form zu einem größeren Teil *late* produziert wird als die größere Form. Als zusätzliche Kontrolle wurde mit Hilfe von MCMV-Latenzserum nachgewiesen, dass in den PAA-inkubierten Zellen MCMV-Genexpression stattgefunden hat. Da nach einer *in vivo* - Infektion mit MCMV Antikörper entstehen, die sowohl gegen *early*- als auch *late*-Proteine gerichtet sind, unterscheiden sich die Bandenmuster von Lysaten aus unbehandelten und PAA-behandelten Zellen. Der *late*-Anteil der Banden verschwindet, während der *early*-Anteil bleibt (Abb. 2.20 B). Die in Abb. 2.19 und 2.20 gezeigten Resultate stellen die Korrelationen zwischen *M43*-Transkripten und HA-markierten Proteinen dar. Daraus kann gefolgert werden, dass in MCMV-infizierten Zellen zwei verschiedene Formen von *M43*-Genprodukten entstehen. Die vorhandenen Ergebnisse klären jedoch noch nicht, ob die beiden *M43*-Genprodukte unterschiedliche Spleißformen von *M43* darstellen oder durch posttranslationelle Modifikationen (z.B. Proteolyse) auseinander hervorgehen. Auf jeden Fall war mit der *M43*-HA exprimierenden MCMV-Mutante die Möglichkeit vorhanden, eventuelle *M43*-abhängige Interferenzen und Interaktionen auf Proteinebene zu betrachten.

Die Untersuchungen bezüglich der *M43*-HA exprimierenden Mutante haben gezeigt, dass durch die Deletion des vorausgesagten *M43*-ORFs mindestens zwei virale Proteine betroffen sind. Um zu überprüfen, ob die durchgeführte Mutation eventuell auch die Expression der benachbarten Gene beeinflusst, wurden Northernblot-Analysen mit *m42*- und *M44*-spezifischen Sonden durchgeführt.

## ERGEBNISSE



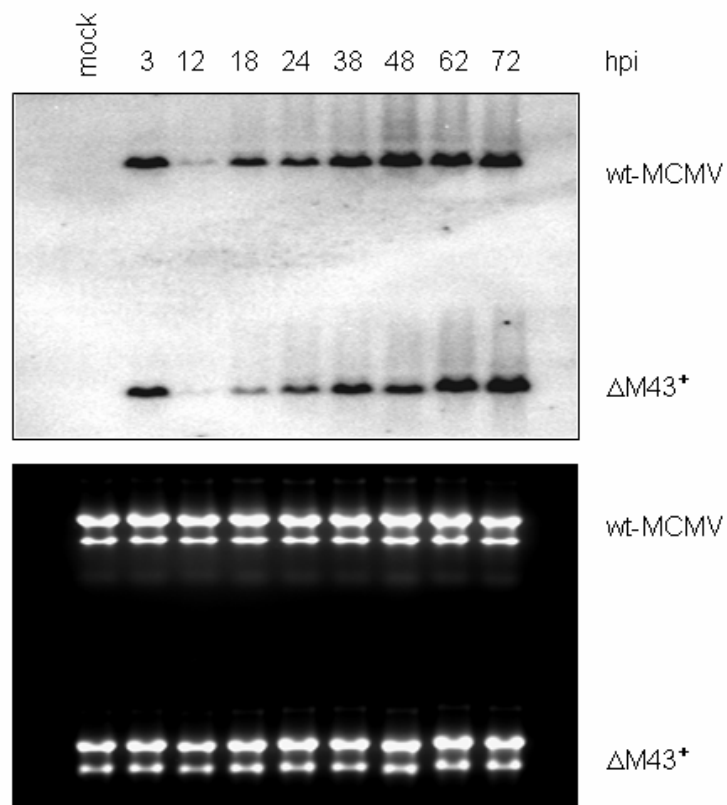
**Abb. 2.21:  $\Delta M43$  weist nach Entfernung der Kanamycin-Kassette ein zusätzliches *m42*-Transkript auf**

NIH3T3-Zellen wurden mit wt-MCMV, der Kanamycin-Kassette enthaltenden Mutante ( $\Delta M43^+$ ) oder der Mutante ohne Kanamycin-Kassette ( $\Delta M43^-$ ) infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion wurde Gesamt-RNA für Northernblot-Analysen extrahiert. Für die Hybridisierung wurde eine *m42*- bzw. eine *M44*-spezifische Sonde verwendet.

Wie man Abb. 2.21 entnehmen kann, wird durch das Ersetzen der *M43*-Sequenz durch die Kanamycin-Kassette die Expression von *m42*- und *M44*-Transkripten nicht gravierend beeinflusst. Doch die Entfernung der Kanamycin-Kassette verursacht eine drastische Veränderung: Es entsteht ein zusätzliches *m42*-Transkript (Abb. 2.21, markiert durch einen roten Pfeil). Dies bedeutet, dass in dieser Mutante wahrscheinlich weitere sekundäre, nicht gewollte Effekte aufgetreten sind. Daher wurde für alle weiteren Analysen die Kanamycin-Kassette enthaltende  $\Delta M43$ -Mutante verwendet, die bereits für das Screening der MCMV-Mutanten eingesetzt wurde. Auch wenn nicht ausgeschlossen werden kann, dass auch diese Mutation sekundäre Effekte mit sich bringt, scheint sie weniger Veränderungen zu verursachen als die Entfernung der Kanamycin-Kassette.

## ERGEBNISSE

Um sicher zu gehen, dass die Deletion von *M43* nicht zu einer generellen Beeinflussung der viralen Genexpression führt, wurde ein MCMV-Gen untersucht, welches im Laufe der viralen Replikation stark reguliert wird. Hierfür wurden die *immediate early 1* - Transkripte ausgewählt.



**Abb. 2.22: Die Deletion von *M43* führt nicht zu einer generellen Störung der viralen Genexpression**

NIH3T3-Zellen wurden mit wt-MCMV oder  $\Delta M43$  infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion wurde Gesamt-RNA extrahiert, um mit Hilfe einer MCMV-IE1 spezifischen Sonde eine Northernblot-Analyse durchzuführen.

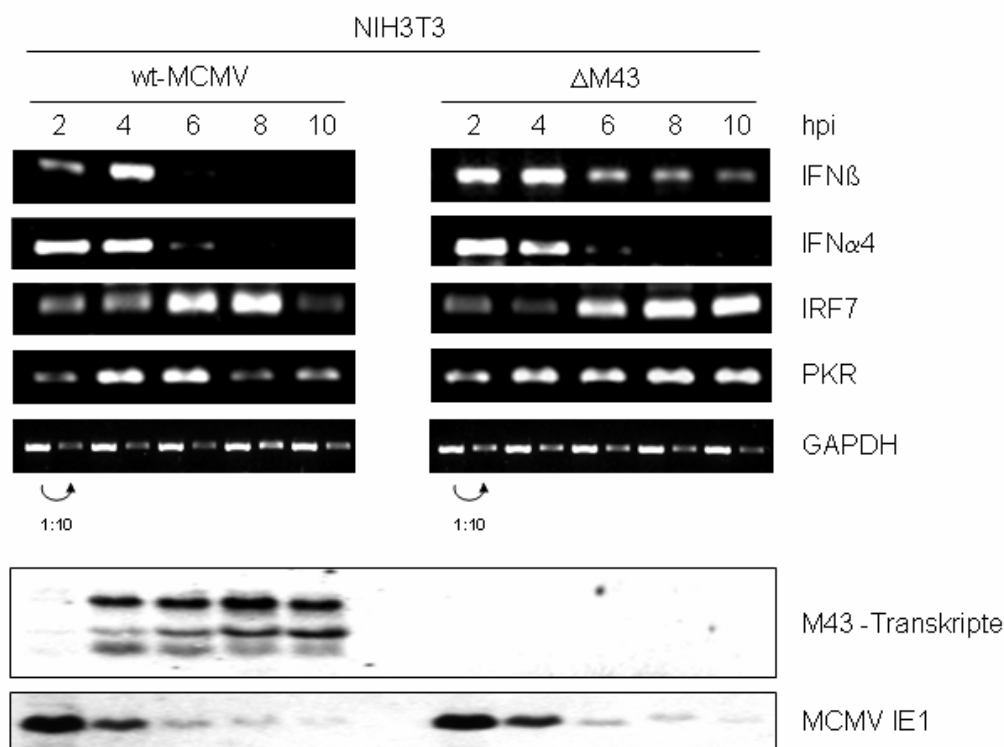
Die Northernblot-Analyse der viralen *immediate early 1* -Transkription zeigte keine auffällige generelle Störung der MCMV-Genexpression (Abb. 2.22). Der einzige Unterschied ist ein etwas schwächeres Signal bei 48 hpi. Dies könnte bedeuten, dass ein Replikationszyklus von  $\Delta M43$  ein bisschen länger ist als von wt-MCMV.

### 2.3.2. $\Delta$ M43 zeigt eine defiziente Inhibition der IFN $\beta$ -Genexpression

Für eine eingehendere Analyse des IFN $\beta$ -Phänotyps wurden mittels einer detaillierten Kinetik kurz nach Infektion die Unterschiede zwischen wt-MCMV und  $\Delta$ M43 hinsichtlich der IFN- und IFN-abhängigen Genexpression untersucht. Hierfür wurden NIH3T3-Zellen mit wt-MCMV oder  $\Delta$ M43 infiziert und alle zwei Stunden (bis 10 hpi) Gesamt-RNA präpariert, um anschließend mittels semi-quantitativer RT-PCR die Expression der Typ I – Interferone und IFN $\alpha/\beta$ -abhängiger Gene zu bestimmen (Abb. 2.23). Das Resultat dieses Experiments bestätigte das Ergebnis des Mutanten-Screenings:  $\Delta$ M43 schaltet die IFN $\beta$ -Transkription langsamer ab als wt-MCMV.

Da IFN $\beta$  und IFN $\alpha$ 4 direkt durch virale Infektionen induzierbar sind und transkriptionell zum Teil ähnlich reguliert werden, wurde zusätzlich zu der IFN $\beta$ - auch die IFN $\alpha$ 4-Expression untersucht. Interessanterweise stellte sich heraus, dass die Abschaltung der IFN $\alpha$ 4-Transkription in  $\Delta$ M43-infizierten Zellen nicht beeinträchtigt ist (Abb. 2.23).  $\Delta$ M43 scheint demnach ein selektives Defizit bezüglich der Inhibition der IFN $\beta$ -Genexpression aufzuweisen. Betrachtet man die Kinetik der IFN $\beta$ - und IFN $\alpha$ 4-Expression nur in Zellen, die mit wt-MCMV infiziert wurden, könnte man zu der Schlussfolgerung kommen, dass die MCMV-vermittelte transkriptionelle Inhibition dieser beiden IFN-Gene über den gleichen Mechanismus abläuft. Die Analyse der  $\Delta$ M43-abhängigen IFN-Induktion zeigt aber, dass es zusätzlich zu einem möglichen MCMV-Inhibitor, der die Transkription beider IFN-Gene beeinflusst, noch mindestens einen Mechanismus geben muss, der einen IFN $\beta$ -, aber nicht IFN $\alpha$ 4-induzierenden Signalweg antagonisiert. Diese Selektivität der IFN-Inhibition ist bereits ein erster Hinweis auf die Signalwege, die Ziel dieses spezifischen Inhibitionsmechanismus sind, da der IFN $\alpha$ 4-Promotor sich grundsätzlich vom IFN $\beta$ -Promotor in der Abwesenheit von ATF-2/c-Jun und NF- $\kappa$ B Bindungssequenzen unterscheidet (Civas et al., 2006).

## ERGEBNISSE



**Abb. 2.23: Die Deletion von *M43* beeinträchtigt die Fähigkeit zur effizienten Abschaltung der IFN $\beta$ -Produktion**

Aus wt-MCMV oder  $\Delta$ M43-infizierten Fibroblasten (MOI 5) wurde zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion Gesamt-RNA präpariert und mittels semi-quantitativer RT-PCR mit genspezifischen Primern auf IFN- und IFN-abhängige Genexpression untersucht. Als Maß für die eingesetzte Menge an RNA dienten die GAPDH-Transkripte. Für die Northernblot – Analyse viraler Genprodukte wurde Gesamt-RNA in einem MOPS-Gel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Die Membran wurde anschließend mit genspezifischen Sonden hybridisiert. Die Kontrolle der eingesetzten Infektionsdosis wurde anhand des Nachweises der *immediate early 1* – mRNA via Northernblot durchgeführt. Die Detektion von *M43*-Transkripten erfolgte ebenfalls mittels Northernblot.

Neben der Expression der Typ I – Interferone wurden auch IFN $\beta$ -abhängige Gene untersucht, um die Bedeutung einer verlangsamten Abschaltung der IFN $\beta$ -Produktion einzuschätzen. Für diesen Zweck wurden die prototypischen IFN $\beta$ -induzierten Gene IRF7 und PKR ausgewählt. Wie man Abb. 2.23 entnehmen kann, ist nach Infektion mit  $\Delta$ M43 die mRNA dieser Gene ebenfalls länger detektierbar als nach einer Infektion mit wt-MCMV. Die Kinetiken der IFN $\beta$ -Expression und der Transkription IFN $\beta$ -abhängiger Gene deutet darauf hin, dass die beobachtete verlängerte Expression von IRF7 und PKR eine Folge der verlangsamten

## ERGEBNISSE

Abschaltung der IFN $\beta$ -Produktion in diesen Zellen ist. Zu späteren Zeitpunkten nach Infektion sind in  $\Delta M43$ -infizierten Zellen weder IFN $\beta$ -mRNA noch ein erhöhtes Level an IFN $\beta$ -abhängigen Transkripten zu messen.

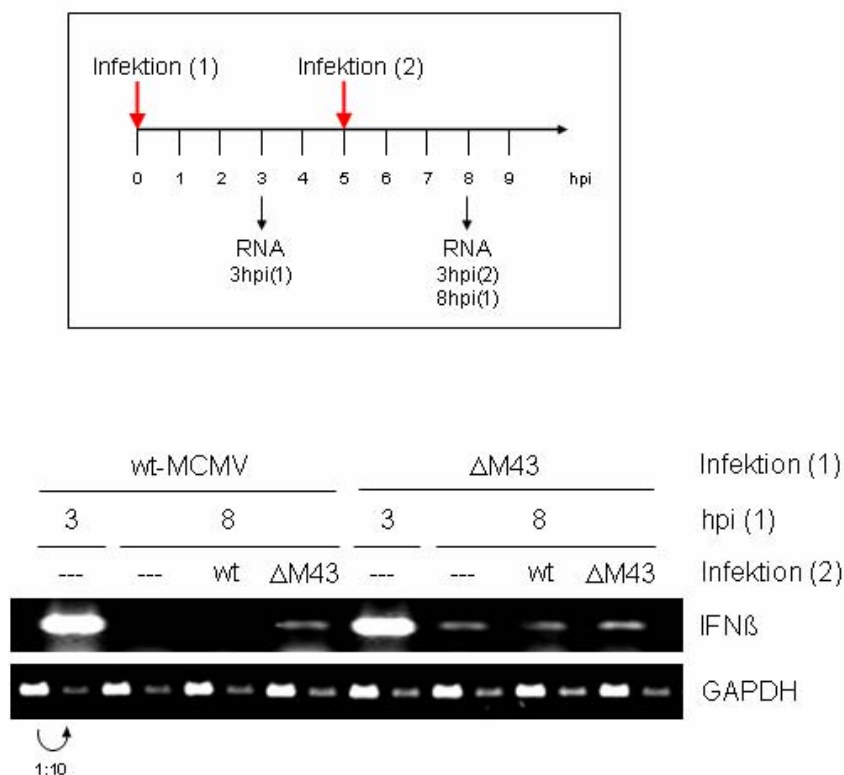
Mit Hilfe einer *M43*-spezifischen Sonde wurde getestet, ob in dem Zeitraum des beobachteten IFN $\beta$ -Phänotyps *M43* überhaupt exprimiert wird. Das Ergebnis dieser Northernblot-Analyse (Abb. 2.23) zeigte, dass *M43*-Transkripte zu diesen frühen Zeitpunkten nach Infektion vorhanden sind. Mit der verwendeten Sonde, die gegen einen Sequenzabschnitt gerichtet ist, der in  $\Delta M43$  deletiert ist, ließ sich auch zeigen, dass die verwendete Mutante wirklich *M43*-defizient war.

Wie in 2.1.2. bereits gezeigt wurde, ist die Stärke der Induktion und Inhibition der IFN $\beta$ -Expression virusdosis-abhängig. Um sicher zu gehen, dass nicht eine unterschiedliche Dosis eingesetzter Viren den IFN $\beta$ -Phänotyp verursacht, wurde mittels Nachweis von *immediate early 1* – Transkripten die virale Genexpression kontrolliert. Die in etwa gleiche Intensität und die so gut wie identische Kinetik der *IE1*-Expression (Abb. 2.23) lässt darauf schließen, dass die gleiche Dosis infektiöser Viren eingesetzt wurde. Außerdem zeigt dieses Ergebnis, dass die möglicherweise längere Dauer eines  $\Delta M43$ -Replikationszyklus (Abb. 2.22) zu den Zeitpunkten des beobachteten IFN $\beta$ -Phänotyps wahrscheinlich nicht relevant ist.

Als weitere Bestätigung des IFN $\beta$ -Phänotyps von  $\Delta M43$  wurden Superinfektionsexperimente mit wt-MCMV und  $\Delta M43$  durchgeführt. Der Versuchsaufbau wurde angelehnt an die Experimente aus 2.1.2. (Abb. 2.3), da diese Bedingungen belegten, dass MCMV aktiv die IFN $\beta$ -Genexpression inhibiert. Die einzige Abweichung zu den ersten Superinfektionsexperimenten ist der Zeitpunkt der zweiten Infektion. Um in einen Zeitrahmen zu gelangen, in dem bereits Unterschiede zwischen wt-MCMV und  $\Delta M43$  bestehen, wurde nicht 4 h, sondern erst 5 h nach Primärinfektion die Superinfektion durchgeführt. Dementsprechend änderte sich der Zeitpunkt der letzten Probe auf 8 h nach Primärinfektion, wodurch der Zeitpunkt 3 h nach Superinfektion beibehalten wurde (schematische Darstellung des Versuchsaufbaus siehe Abb. 2.24). Der 3 hpi – Wert ist für dieses Experiment wichtig, weil dies der Zeitpunkt der maximalen IFN $\beta$ -Induktion nach MCMV-Infektion ist.



## ERGEBNISSE



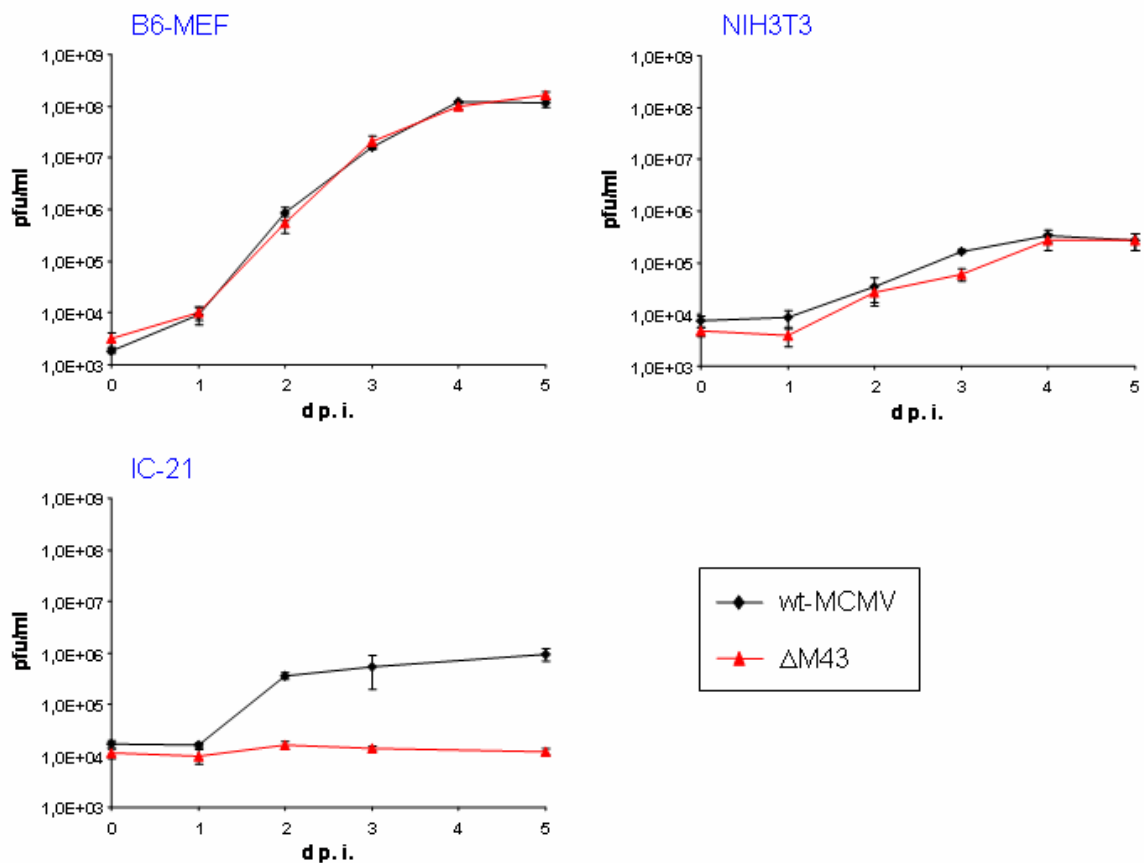
**Abb. 2.24:  $\Delta M43$  inhibiert nicht vollständig die IFN $\beta$ -Induktion bei Superinfektion**

NIH3T3-Zellen wurden mit wt-MCMV oder  $\Delta M43$  (MOI 5) infiziert. 5 hpi wurde eine Superinfektion der bereits infizierten Zellen mit dem angegebenen Virus (ebenfalls MOI 5) durchgeführt. 3 und 8 h nach Primärinfektion wurde Gesamt-RNA isoliert und mittels semi-quantitativer RT-PCR auf die Induktion der IFN $\beta$ -Transkription untersucht. Die Menge der GAPDH-Transkripte diente als Normierungsgröße.

Das Ergebnis der Superinfektionsexperimente untermauert den IFN $\beta$ -Phänotyp von  $\Delta M43$ . Verwendete man sowohl für die Primär- als auch für die Superinfektion wt-MCMV, wurde 3 h nach der zweiten Infektion keine IFN $\beta$ -mRNA nachgewiesen (Abb. 2.3 und 2.24). Doch wenn  $\Delta M43$  bei der ersten oder zweiten Infektion eingesetzt wurde, wurde eine nicht allzu große, aber signifikante Menge an IFN $\beta$ -Transkripten detektiert (Abb. 2.24). Daraus lässt sich schließen, dass die Deletion von *M43* zu einem partiellen Verlust der Inhibitionsfähigkeit führt.

## ERGEBNISSE

Nachdem nun unter verschiedenen Bedingungen gezeigt wurde, dass  $\Delta M43$  Defizite bezüglich der Inhibition der IFN $\beta$ -Genexpression aufweist, wurden Replikationsanalysen durchgeführt, um die Relevanz der verlangsamten Abschaltung der IFN $\beta$ -Produktion in Zellkultur zu untersuchen. Hierfür wurde das Wachstumsverhalten von wt-MCMV und  $\Delta M43$  in MCMV-permissiven Zellen verglichen. Da infizierte Fibroblasten viel Virus produzieren und somit wichtige Replikationsorte für MCMV darstellen, wurden primäre Maus-Fibroblasten und eine Fibroblasten-Zelllinie untersucht. Zusätzlich wurde das Wachstum der Viren auf der Makrophagen-Zelllinie IC-21 bestimmt, weil bereits beschrieben ist, dass eine MCMV-Mutante, die eine Transposon-Insertion im ORF *M43* enthält, auf diesen Zellen ein Wachstumsdefizit aufweist (Menard et al., 2003). Die Ursache für diesen Defekt ist aber nicht bekannt.



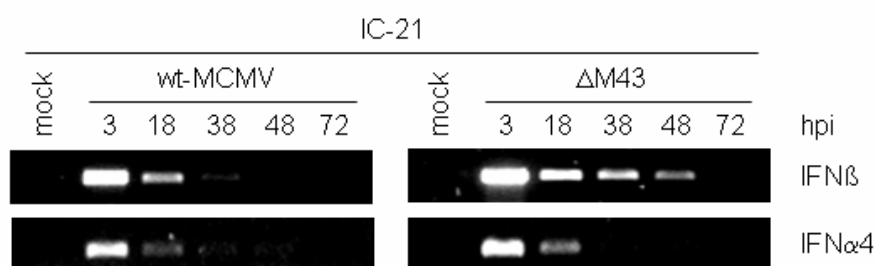
**Abb. 2.25:  $\Delta M43$  besitzt ein Wachstumsdefizit auf IC-21 Makrophagen**

Für Replikationsanalysen wurden primäre Fibroblasten aus Mäuseembryonen (MEF, *mouse embryonic fibroblasts*), NIH3T3-Fibroblasten bzw. IC-21 Makrophagen mit wt-MCMV oder  $\Delta M43$  infiziert (niedrige MOI). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden infizierte Zellen eingefroren. Für die Bestimmung der eingesetzten Virusmenge (0 d p.i.) und der Virusreplikation wurden die Titer der Proben mittels Plaque-Assay in Triplikaten gemessen.

## ERGEBNISSE

Die Wachstumsanalysen ergaben, dass  $\Delta M43$  in primären Fibroblasten genauso gut repliziert wie wt-MCMV (Abb. 2.25). Auch auf der Fibroblasten-Zelllinie NIH3T3 zeigte  $\Delta M43$  keinen gravierenden Wachstumsdefekt (Abb. 2.25). Aber auf der Makrophagen-Zelllinie IC-21 ist ein deutlicher Unterschied in der Replikationsfähigkeit zu sehen (Abb. 2.25). Dieses Ergebnis ist konsistent mit den Daten von Menard et al. (2003). Der Vergleich aller Kurven zeigt, dass MCMV in primären Fibroblasten am besten repliziert und die höchsten Titer erreicht, während die Virusvermehrung in Makrophagen selbst bei wt-MCMV nur gering ausfällt.

Um zu analysieren, ob der drastische Replikationsdefekt von  $\Delta M43$  in IC-21 Makrophagen mit dem IFN $\beta$ -Phänotyp zusammen hängen könnte, wurde die IFN $\alpha/\beta$ -Expression in diesen Zellen nach Infektion gemessen. Da Makrophagen Immunzellen darstellen und IFN-kompetenter sind als Fibroblasten, sind sie deutlich weniger permissiv für eine MCMV-Infektion. Aus diesem Grunde wurde eine relativ hohe Virusdosis für die Infektion der IC-21 Makrophagen verwendet. So wurde sichergestellt, dass alle Zellen gleichzeitig infiziert wurden und genug virale Genexpression und Replikation stattfindet, um biochemische Analysen durchführen zu können. Dies ist vor allem bei Analysen des IFN-Systems wichtig, da nicht infizierte Zellen auf sekretiertes IFN reagieren und die Resultate verfälschen können.



**Abb. 2.26: Der IFN $\beta$ -Phänotyp von  $\Delta M43$  ist in IC-21 Makrophagen verstärkt**

IC-21 Makrophagen wurden mit wt-MCMV oder  $\Delta M43$  infiziert (MOI 20). Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion wurde Gesamt-RNA extrahiert und mittels semi-quantitativer RT-PCR auf Expression von Typ I – Interferonen untersucht.

## ERGEBNISSE

Das Ergebnis der IFN $\alpha$ / $\beta$ -Expressionsanalyse in infizierten IC-21 Makrophagen bestätigte den bereits in NIH3T3-Zellen beobachteten Phänotyp von  $\Delta M43$ . Die verlangsamte Abschaltung der IFN $\beta$ -Produktion nach  $\Delta M43$ -Infektion ist in IC-21 Zellen offensichtlicher als in Fibroblasten (Abb. 2.26). Die Kinetik der IFN $\beta$ -Expression weist darauf hin, dass auch wt-MCMV in diesen Immunzellen länger braucht, um das zelluläre Abwehrsystem zu antagonisieren. Dies ist wahrscheinlich unter anderem ein Grund, weshalb Makrophagen weniger permissiv sind für MCMV als Fibroblasten.

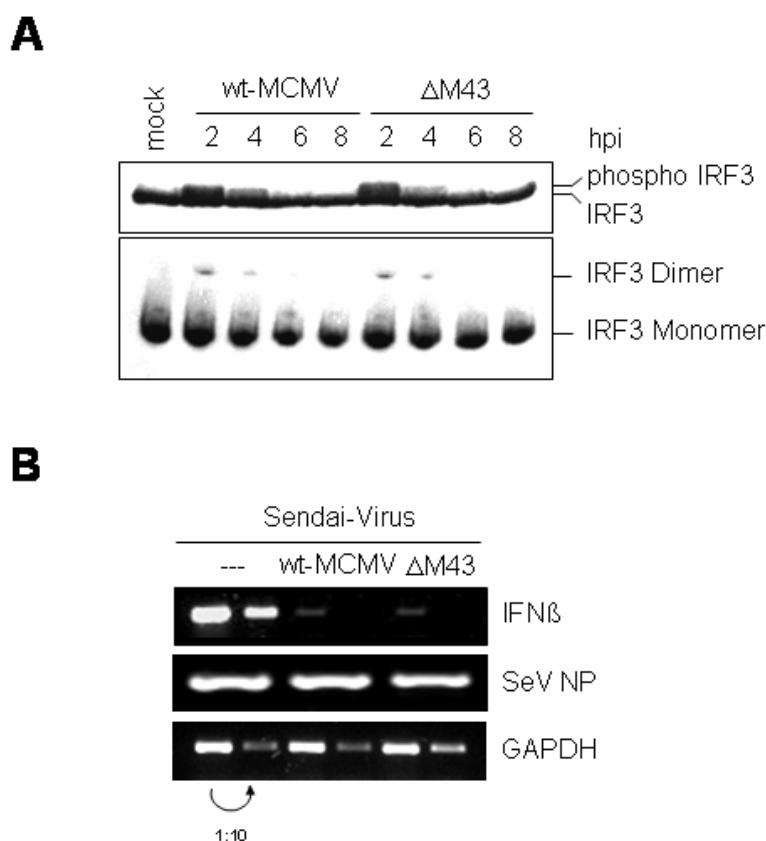
Die Deletion von *M43* führt zu einer bedeutsamen Beeinträchtigung der IFN $\beta$ -Inhibitionsfähigkeit von MCMV in IC-21 Makrophagen. Selbst 48 hpi produzieren die infizierten Zellen noch IFN $\beta$  (Abb. 2.26). Der verstärkte IFN $\beta$ -Phänotyp könnte den gravierenden Wachstumsdefekt von  $\Delta M43$  auf diesen Zellen erklären. Die Korrelation von IFN $\beta$ -Expression und Replikationsdefizit ist ein Hinweis darauf, wie wichtig es für ein Virus ist, Antagonisten des IFN-Systems zu besitzen und die zellulären Abwehrmechanismen zu umgehen. Die Quantifizierung der IFN $\alpha 4$ -Transkripte in IC-21 Zellen brachte das gleiche Ergebnis wie in NIH3T3-Fibroblasten:  $\Delta M43$  schaltet die IFN $\alpha 4$ -Produktion mit der gleichen Effizienz ab wie wt-MCMV (Abb. 2.26). Die Deletion von *M43* hat also keine Auswirkungen auf die Inhibition der IFN $\alpha 4$ -Expression. Dies unterstützt erneut die Hypothese, dass MCMV für verschiedene, zumindest zum Teil unabhängige Antagonisten des Typ I – Interferonsystems kodiert.

### **2.3.3. MCMV inhibiert die Aktivierung von IRF3 und ATF-2/c-Jun *M43*-unabhängig**

Um erste Einblicke in den Inhibitionsmechanismus zu erhalten, wurde als nächstes die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren untersucht, die Teil des IFN $\beta$ -Enhanceosoms sind. Obwohl die Ergebnisse hinsichtlich der unveränderten Inhibition der IFN $\alpha 4$ -Genexpression (Abb. 2.23 und 2.26) bereits gute Hinweise darauf sind, dass IRF3 und IRF7 nicht das Ziel der zu untersuchenden Inhibition sind, wurde die Aktivierung von IRF3 genauer betrachtet, weil IRF3 der wichtigste Faktor der IFN $\beta$ -Induktion ist. Hierfür wurde in wt-MCMV oder  $\Delta M43$ -infizierten Zellen der Aktivierungsstatus von IRF3 mittels Nachweis von Phosphorylierung bzw. Dimerisierung untersucht. Es wurden NIH3T3-Zellen mit wt-MCMV oder  $\Delta M43$  infiziert und alle 2 h nach Infektion (2 bis 8 hpi) native Proteinlysate hergestellt. Abb. 2.27 A zeigt die Ergebnisse dieser IRF3-Experimente. In nicht-infizierten Zellen ist

## ERGEBNISSE

erwartungsgemäß weder Phosphorylierung noch Dimerisierung von IRF3 nachweisbar. Nach MCMV-Infektion kommt es zu der in 2.1.4 bereits beschriebenen transienten IRF3-Aktivierung. Die MCMV-vermittelte Inhibition dieser initialen Aktivierung ist durch die Deletion von *M43* nicht beeinträchtigt. Daraus lässt sich schließen, dass IRF3 nicht das Ziel der *M43*-Wirkung ist. Dies ist konsistent mit den bereits erwähnten Ergebnissen bezüglich der IFN $\alpha$ 4-Inhibition, die darauf hinweisen, dass IRF3 und IRF7 nicht durch die Deletion von *M43* beeinflusst werden.

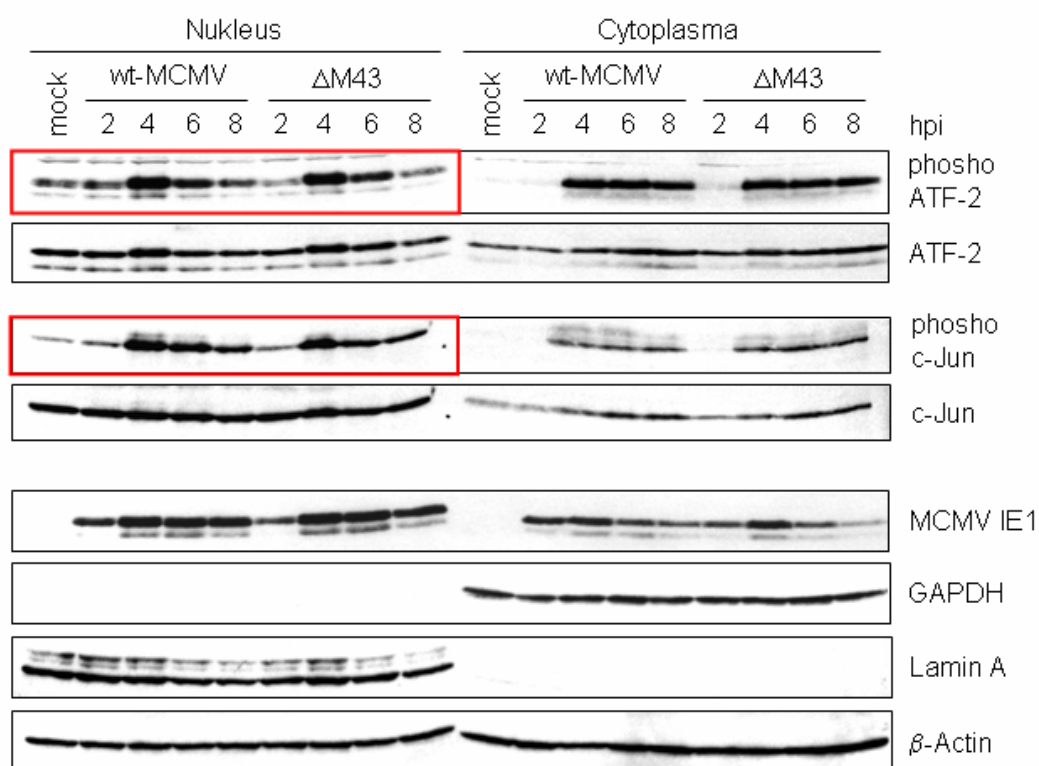


**Abb. 2.27: Die Deletion von *M43* hat keinen Einfluss auf die Inhibition der IRF3-Aktivierung**

NIH3T3-Zellen wurden mock-behandelt oder mit wt-MCMV bzw.  $\Delta$ M43 infiziert (MOI 5). (A) Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion wurden native Proteinlysate hergestellt. Diese wurden mittels SDS-PAGE oder nativer PAGE aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers wurde IRF3 auf die Aktivierungsmerkmale Phosphorylierung und Dimerisierung untersucht. (B) wt-MCMV oder  $\Delta$ M43-infizierte Zellen wurden 2 hpi mit Sendai-Virus koinfiziert. 18 h nach Sendai-Infektion wurde Gesamt-RNA isoliert und auf die Expression von IFN $\beta$  getestet. Die mRNA des Sendai Nukleo-Proteins (NP) diente als Nachweis der erfolgreichen Infektion mit Sendai-Virus. Die eingesetzte RNA-Menge wurde anhand der GAPDH-Transkripte normiert.

## ERGEBNISSE

Für zusätzliche Hinweise auf eine funktionierende IRF3-Inhibition nach Infektion mit  $\Delta$ M43 wurden Koinfektionsexperimente mit Sendai-Virus durchgeführt. Wie in Abb. 2.27 B zu sehen ist, wird auch in  $\Delta$ M43-infizierten Zellen die IFN $\beta$ -Induktion nach Koinfektion mit Sendai-Virus gehemmt. Dies ist ein Indikator dafür, dass auch zu späteren Zeitpunkten als in den in Abb. 2.27 A gezeigten die Phosphorylierung und Dimerisierung von IRF3 inhibiert wird, da eine Sendai-Infektion sehr stark die IRF3-Aktivierung hervorruft.



**Abb. 2.28:  $\Delta$ M43 zeigt keinen Defekt in der Antagonisierung der nukleären ATF-2/c-Jun Phosphorylierung**

NIH3T3-Zellen wurden mock-behandelt oder mit wt-MCMV bzw.  $\Delta$ M43 infiziert (MOI 5). Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion wurden nukleäre bzw. cytoplasmatische Proteinlysate hergestellt. Diese wurden in einem SDS-Gel aufgetrennt und mittels Westernblot auf Phosphorylierung von ATF-2 und c-Jun analysiert. MCMV IE1 diente als Infektionskontrolle, GAPDH als cytoplasmatischer Marker, Lamin A als nukleärer Marker und  $\beta$ -Actin als Ladekontrolle.

## ERGEBNISSE

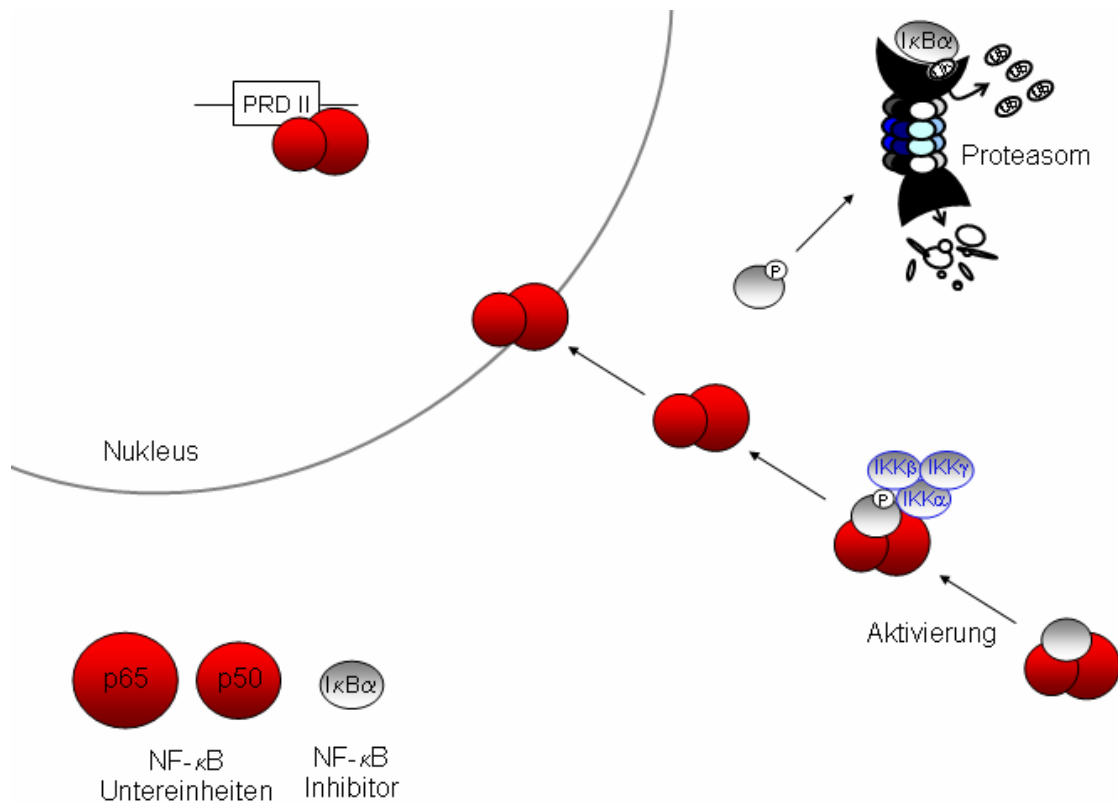
Als nächstes wurde die Aktivierung des heterodimeren Transkriptionsfaktors ATF-2/c-Jun untersucht, indem die Phosphorylierung von ATF-2 und c-Jun detektiert wurde. Hierfür wurden sowohl nukleäre als auch cytoplasmatische Proteinlysate hergestellt, um erste Informationen über die Lokalisation der Proteine zu erhalten. Nach MCMV-Infektion kommt es zum Zeitpunkt 4 hpi zu einer Phosphorylierung von ATF-2 und c-Jun. Da beide Proteine über die gleichen Signalwege aktiviert werden, ist es nicht verwunderlich, dass die Kinetik der Aktivierung für beide Faktoren gleich ist. Die Phase der ATF-2/c-Jun Aktivierung ist wie schon für IRF3 beobachtet in infizierten Zellen nur vorübergehend (Abb. 2.28, rote Markierung). MCMV ist demnach in der Lage, mit der Aktivierung von ATF-2/c-Jun zu interferieren. Doch die Deletion von *M43* hat keinen Effekt auf diese Fähigkeit zur Antagonisierung.

Interessanterweise wird nur in den nukleären Lysaten eine Abnahme der Phosphorylierung von ATF-2 und c-Jun beobachtet. Die cytoplasmatischen Mengen an phosphoryliertem ATF-2 und c-Jun bleiben auch 8 hpi unverändert hoch (Abb. 2.28). Als Kontrollen für die Reinheit der nukleären und cytoplasmatischen Lysate wurden Lamin A als nukleärer und GAPDH als cytoplasmatischer Marker detektiert. Die Überprüfung der Lysate ergab, dass die Auftrennung der beiden Kompartimente gut gelungen ist. Dieser Befund bezüglich der Lokalisation der phosphorylierten Proteine ist ein erster Hinweis auf den Mechanismus der MCMV-vermittelten Interaktion mit ATF-2/c-Jun. Zu frühen Zeitpunkten nach Infektion scheint es sich nicht um eine Hemmung der Phosphorylierung zu handeln, sondern möglicherweise um eine Inhibition der richtigen Lokalisation von phosphoryliertem ATF-2 und c-Jun.

### **2.3.4. Untersuchung der NF- $\kappa$ B Signalkaskade in $\Delta$ M43-infizierten Zellen**

Der verbleibende noch zu untersuchende Signalweg, der in die Induktion der IFN $\beta$ -Genexpression involviert ist, ist die NF- $\kappa$ B-abhängige Signaltransduktion. Wie in 2.1.6 bereits gezeigt, interferiert MCMV auf mehreren Ebenen mit dem NF- $\kappa$ B Signalweg. Um die Auswirkungen der untersuchten Faktoren auf die Signaltransduktion besser einordnen zu können, ist in Abb. 2.29 die I $\kappa$ B $\alpha$ -abhängige Aktivierung von NF- $\kappa$ B schematisch zusammengefasst.

## ERGEBNISSE



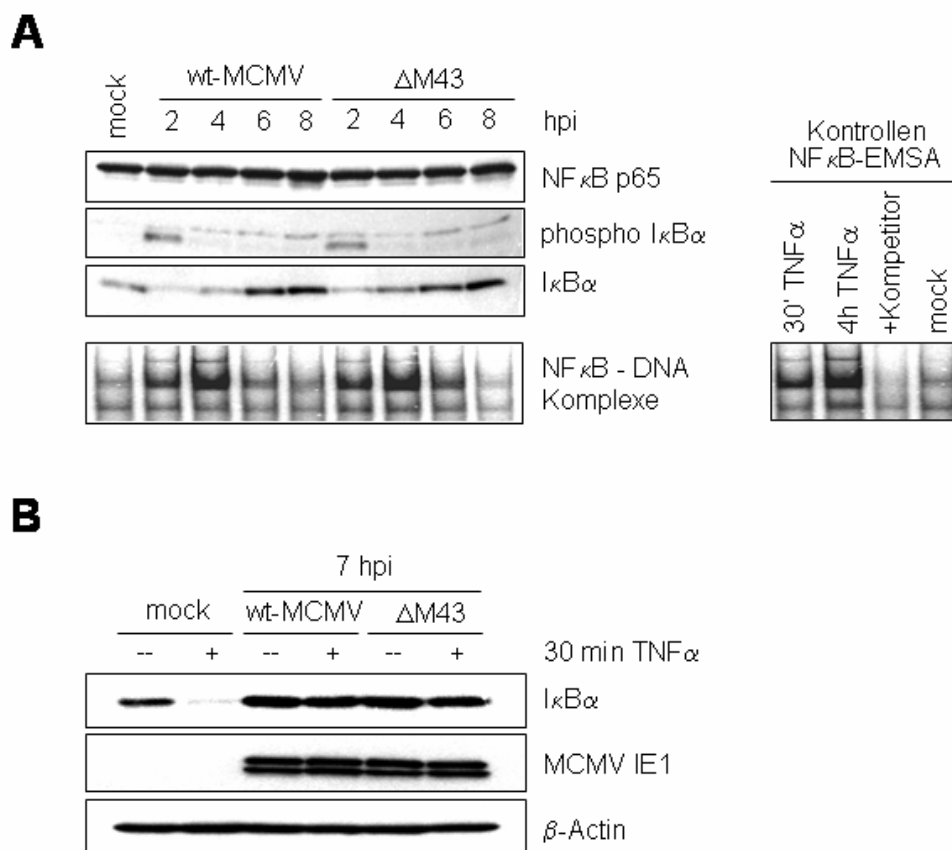
**Abb. 2.29: IκBα-abhängige Aktivierung von NF-κB**

Schematische Darstellung der IκBα-abhängigen Aktivierung des NF-κB Signalweges. Im nicht-aktivierten Zustand befindet sich der Transkriptionsfaktor NF-κB im Komplex mit dem inhibitorischen Protein IκBα. Dadurch wird die Kernlokalisation verhindert. Erfolgt eine Stimulation, wird IκBα durch die IκB-Kinase (IKK) phosphoryliert und für den proteasomalen Abbau markiert, so dass die verbleibenden NF-κB Untereinheiten in den Kern translokieren und transkriptionell aktiverend wirken können.

Für die Analyse möglicher Interferenzen mit dem NF-κB Signalweg wurden die unterschiedlichen Ebenen der MCMV-vermittelten Inhibition in ΔM43-infizierten Zellen betrachtet. Diese Untersuchungen zeigten, dass die Deletion von *M43* die Abschaltung der initialen NF-κB-Aktivierung weder auf Ebene der IκBα-Phosphorylierung noch auf Ebene der IκBα-Degradation beeinträchtigt (Abb. 2.30 A). Auch die Detektion von Komplexen aus NF-κB und DNA (κB *consensus site*) mittels EMSA-Analysen (*electro mobility shift assay*) wies keinen Unterschied zwischen wt-MCMV und ΔM43-infizierten Zellen auf (Abb. 2.30 A). Als Spezifitätskontrolle für die EMSA-Signale wurde TNFα als potenter Induktor einer NF-κB-Antwort verwendet. Zusätzlich wurde die Bindung an die radioaktiv-markierte Sonde mittels Zugabe überschüssiger nicht-markierter Oligonukleotide (Sequenz des IFNβ-Promotors) kompetitiert.



## ERGEBNISSE



**Abb. 2.30: MCMV interferiert mit dem NF- $\kappa$ B Signalweg  
in *M43*-unabhängiger Weise**

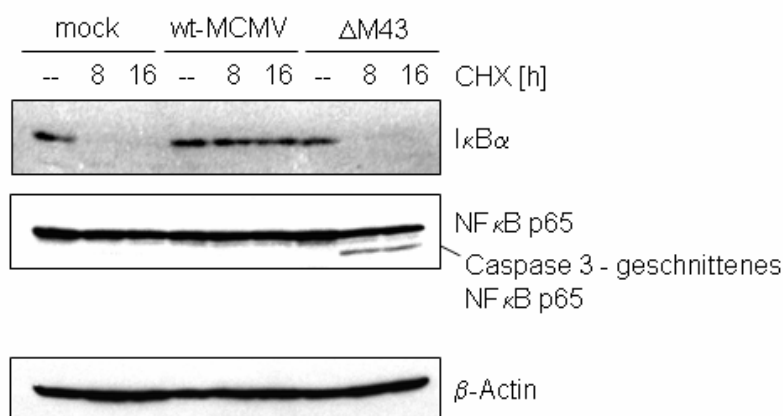
NIH3T3-Zellen wurden mock-behandelt oder mit wt-MCMV bzw.  $\Delta$ M43 infiziert (MOI 5). Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion wurden Proteinlysate hergestellt, um den Aktivierungsstatus von NF- $\kappa$ B zu untersuchen. (A) Die Lysate wurden in einem SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Mit Hilfe spezifischer Antikörper wurde die Phosphorylierung und die daraus resultierende Degradation von I $\kappa$ B $\alpha$  detektiert. Der Nachweis der NF- $\kappa$ B Untereinheit p65 diente als Ladekontrolle, da sich die Proteinmenge bei Aktivierung nicht verändert. Zusätzlich wurden mit nativen nukleären Proteinlysaten EMSA-Analysen durchgeführt, um die DNA-Bindung aktivierter NF- $\kappa$ B Transkriptionsfaktoren zu visualisieren. Die Spezifitätskontrollen der EMSA-Signale sind rechts dargestellt. (B) Die mock-behandelten und wt-MCMV bzw.  $\Delta$ M43-infizierten Zellen wurden zum Zeitpunkt 7 hpi für 30 min mit 20 ng/ml TNF $\alpha$  behandelt. Aus diesen Zellen wurden Proteinlysate hergestellt und mittels Westernblot auf Degradation von I $\kappa$ B $\alpha$  untersucht. MCMV IE1 diente als Infektionskontrolle,  $\beta$ -Actin als Ladekontrolle.

Da gezeigt wurde, dass wt-MCMV nicht nur mit der durch Infektion induzierten NF- $\kappa$ B Aktivierung interferiert, sondern auch die Stimulation nach externer Zugabe von TNF $\alpha$  verhindert, wurde  $\Delta$ M43 ebenfalls auf diese inhibitorische Fähigkeit untersucht. Wie Abb. 2.30 B zeigt, kommt es in MCMV-infizierten Zellen nicht zu einer TNF $\alpha$ -induzierten

## ERGEBNISSE

Degradation von I $\kappa$ B $\alpha$ . Dieser Effekt hängt jedoch nicht von *M43* ab, da die Inhibition auch in  $\Delta$ M43-infizierten Zellen zu beobachten ist.

Ein weiterer MCMV-vermittelter Mechanismus zur Antagonisierung des NF- $\kappa$ B Signalweges ist die Stabilisierung von I $\kappa$ B $\alpha$ . wt-MCMV verlängert die intrinsische Halbwertszeit von I $\kappa$ B $\alpha$  um ein Vielfaches (Abb. 2.8 und 2.31), wodurch der NF- $\kappa$ B-Komplex effektiver im Cytoplasma festgehalten werden kann. Diese Stabilisierung ist in  $\Delta$ M43-infizierten Zellen, die mit CHX behandelt wurden, nicht zu sehen. Nach 8 und 16 h inhibierter Proteinsynthese ist in  $\Delta$ M43-infizierten Zellen kein I $\kappa$ B $\alpha$  nachweisbar, während in wt-MCMV infizierten Zellen die I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteinmenge kaum abnimmt (Abb. 2.31). Die Deletion von *M43* scheint demnach einen Einfluss auf die Stabilisierung von I $\kappa$ B $\alpha$  zu besitzen.



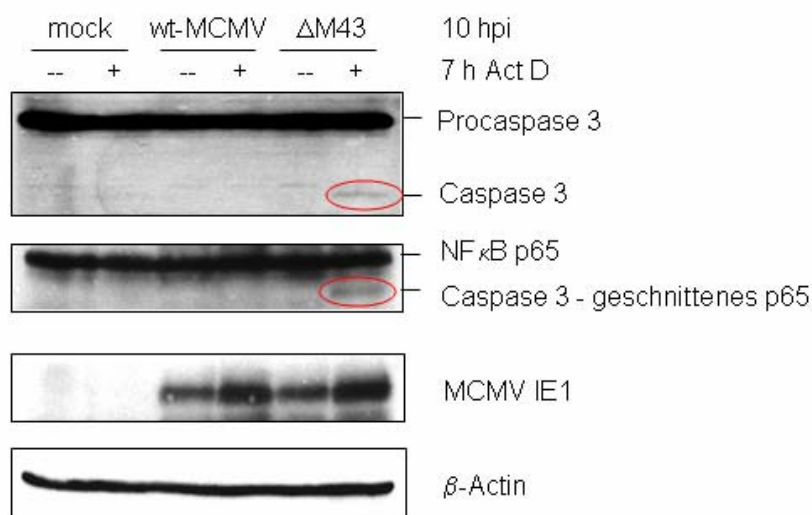
**Abb. 2.31:  $\Delta$ M43 ist nicht in der Lage, I $\kappa$ B $\alpha$  unter Bedingungen inhibierter Proteinsynthese zu stabilisieren**

NIH3T3-Zellen wurden mock-behandelt oder mit wt-MCMV bzw.  $\Delta$ M43 infiziert (MOI 5). Zum Zeitpunkt 5 hpi wurden die Zellen für 8 bzw. 16 h mit 50  $\mu$ g/ml CHX behandelt. Die hergestellten Proteinlysate wurden mittels Westernblot auf I $\kappa$ B $\alpha$  und NF- $\kappa$ B p65 untersucht.  $\beta$ -Actin diente als Ladekontrolle.

Nachdem in  $\Delta$ M43-infizierten Zellen ein Effekt auf ein NF- $\kappa$ B-relevantes Protein nach CHX-Behandlung gefunden wurde, wurde zusätzlich zu I $\kappa$ B $\alpha$  auch die NF- $\kappa$ B Untereinheit p65 unter diesen Bedingungen untersucht. Dieses Experiment zeigte interessanterweise ebenfalls eine Veränderung in  $\Delta$ M43-infizierten Zellen. Neben der erwarteten Bande bei 65 kDa wurde eine weitere Bande von dem p65-spezifischen Antikörper erkannt, die nur in  $\Delta$ M43-infizierten Zellen unter Inhibition der Proteinsynthese auftritt (Abb. 2.31). Es wurde

## ERGEBNISSE

beschrieben, dass NF- $\kappa$ B p65 von Caspase 3 am Asparagin 97 geschnitten wird und anschließend Apoptose auslöst (Kang et al., 2001). Da die CHX-behandelten  $\Delta$ M43-infizierten Zellen mikroskopische Anzeichen von Apoptose zeigten (*“Blebbing”*), war diese Möglichkeit eine Überprüfung wert. Hierfür wurde getestet, ob unter diesen Bedingungen Caspase 3 nachweisbar ist.



**Abb. 2.32: Die Inhibition der Transkription induziert in  $\Delta$ M43-infizierten Zellen**

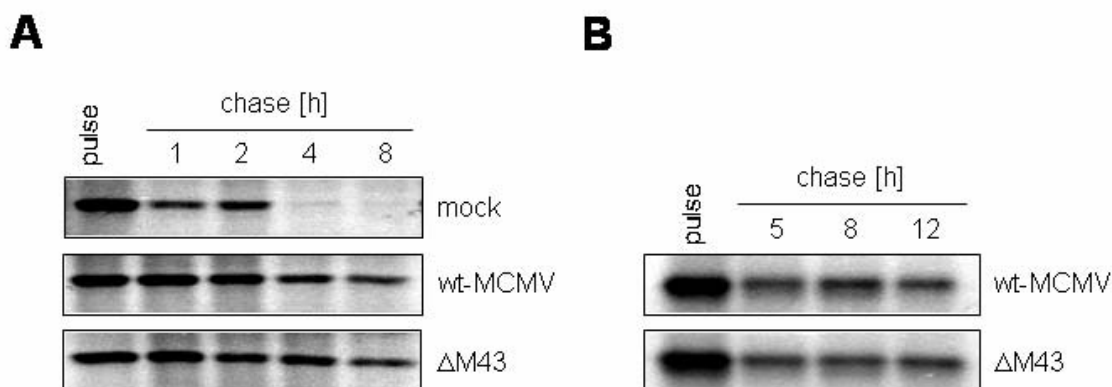
### **Apoptose, die durch Caspase 3 - Aktivität nachgewiesen werden kann**

NIH3T3-Zellen wurden mock-behandelt oder mit wt-MCMV bzw.  $\Delta$ M43 infiziert (MOI 5). Zum Zeitpunkt 3 hpi wurden die Zellen für 7 h mit 5  $\mu$ g/ml Actinomycin D (ActD) behandelt. Aus diesen Zellen wurden Proteinlysate hergestellt und mittels Westernblot auf Caspase 3 und NF- $\kappa$ B p65 untersucht. MCMV IE1 diente als Infektionskontrolle,  $\beta$ -Actin als Ladekontrolle.

Der Nachweis von Procaspase 3 und aktiver Caspase 3 wurde mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers durchgeführt. Für das in Abb. 2.32 dargestellte Experiment wurde die Synthese neuer Genprodukte durch Actinomycin D, einem Inhibitor der Transkription, gehemmt. Ohne die Produktion neuer Proteine wurden in  $\Delta$ M43-infizierten Zellen sowohl aktive Caspase 3 als auch die Caspase 3 - geschnittene Form von NF- $\kappa$ B p65 detektiert, während dies weder in mock-behandelten noch in wt-MCMV infizierten Zellen der Fall war (Abb. 2.32). Dadurch konnte gezeigt werden, dass unter Bedingungen inhibierter Proteinsynthese in  $\Delta$ M43-infizierten Zellen Apoptose ausgelöst wurde, ganz gleich, ob die Inhibition auf Ebene der Transkription oder Translation durchgeführt wurde.

## ERGEBNISSE

Nachdem sich herausgestellt hatte, dass  $\Delta M43$  bei inhibierter Proteinsynthese einen Apoptosephänotyp aufweist, stellte sich die Frage, ob die fehlende Stabilisierung von  $I\kappa B\alpha$  (Abb. 2.31) den Inhibitionsmechanismus widerspiegelt oder ob dieser Effekt eine Folge der stattfindenden Apoptose ist. Aus diesem Grund wurde die  $I\kappa B\alpha$ -Halbwertszeit in wt-MCMV und  $\Delta M43$ -infizierten Zellen ohne den Einsatz von CHX bestimmt.



**Abb. 2.33: Die Halbwertszeit von  $I\kappa B\alpha$  ist bei intakter Proteinsynthese auch in  $\Delta M43$ -infizierten Zellen verlängert**

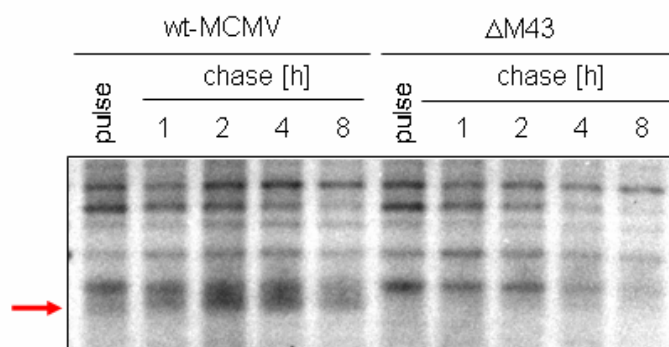
NIH3T3-Zellen wurden mock-behandelt oder mit wt-MCMV bzw.  $\Delta M43$  infiziert (MOI 5). Zum Zeitpunkt 5 hpi wurden die Zellen für 1 h in Cystein/Methionin-freiem Medium gehungert, bevor sie für 30 min mit  $[^{35}S]$  metabolisch markiert wurden (*pulse*). Nachdem das Markierungsmedium entfernt und durch Cystein/Methionin (nicht-markiert) – enthaltendes Medium ersetzt wurde, wurden nach verschiedenen Zeiträumen Proteinlysate hergestellt (*chase*-Proben). Aus den *pulse/chase*-Proben wurde mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers  $I\kappa B\alpha$  präzipitiert. Dieses Präzipitat wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht. (A)  $I\kappa B\alpha$ -Stabilität nach kurzen *chase*-Zeiten. (B)  $I\kappa B\alpha$ -Stabilität nach längeren *chase*-Zeiten.

Das Ergebnis des *Pulse-Chase*-Experimentes zeigte, dass die  $I\kappa B\alpha$ -Halbwertszeit auch in  $\Delta M43$ -infizierten Zellen verlängert wird (Abb. 2.33). Dies deutet darauf hin, dass der beobachtete Unterschied zwischen wt-MCMV und  $\Delta M43$  nach CHX-Behandlung wahrscheinlich eine Auswirkung der auftretenden Apoptose ist. Nichtsdestotrotz wurde ersichtlich, dass die Deletion von *M43* einen NF- $\kappa$ B und Apoptose-relevanten Signalweg beeinflusst, der besonders zur Geltung kommt, wenn die Neusynthese von Proteinen inhibiert wird.

## ERGEBNISSE

### 2.3.5. I $\kappa$ B $\alpha$ , das Target von *M43*?

Die in Abb. 2.33 gezeigten Banden stellen die im Lysat vorhandenen I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteine dar, die von dem Antikörper direkt gebunden und präzipitiert werden. Zusätzlich zu dieser primären Immunopräzipitation werden eine Reihe weiterer Proteine kopräzipitiert. Da das Experiment mit metabolisch markierten Proteinen durchgeführt wurde, sind die kopräzipitierten Proteine ebenfalls sichtbar. Betrachtet man das I $\kappa$ B $\alpha$ -Kopräzipitationsmuster genauer, ist ein Unterschied zwischen Lysaten aus wt-MCMV und  $\Delta$ M43-infizierten Zellen zu erkennen. In wt-MCMV infizierten Zellen wird ein Protein kopräzipitiert, welches im Bandenmuster von  $\Delta$ M43-infizierten Zellen fehlt (Abb. 2.34). Diese Bande stellt den einzigen Unterschied beider Kopräzipitationsmuster dar.



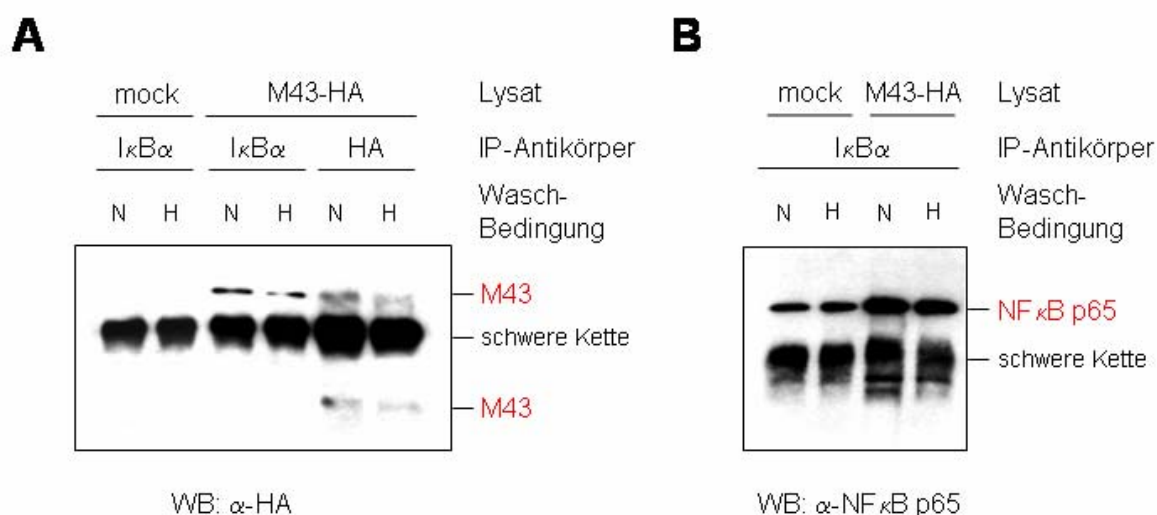
**Abb. 2.34: Das I $\kappa$ B $\alpha$  -Kopräzipitationsmuster  $\Delta$ M43-infizierter Zellen unterscheidet sich von dem wt-MCMV infizierter Zellen**

NIH3T3-Zellen wurden mit wt-MCMV oder  $\Delta$ M43 infiziert (MOI 5). Zum Zeitpunkt 5 hpi wurden die Zellen für 1 h in Cystein/Methionin-freiem Medium gehungert, bevor sie für 30 min mit [ $^{35}$ S] metabolisch markiert wurden (*pulse*). Nachdem das Markierungsmedium entfernt und durch Cystein/Methionin (nicht-markiert) – enthaltendes Medium ersetzt wurde, wurden nach verschiedenen Zeiträumen Proteinlysate hergestellt (*chase*-Proben). Aus den *pulse/chase* - Proben wurde mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers I $\kappa$ B $\alpha$  präzipitiert. Dieses Präzipitat wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Der gewählte Ausschnitt des Gels zeigt kopräzipitierte Proteine der Größen 50-90 kDa.

Aufgrund dieses Ergebnisses wurde die Vermutung aufgestellt, dass das *M43*-Genprodukt mit I $\kappa$ B $\alpha$  interagieren könnte. Die Deletion von *M43* könnte dann zur Folge haben, dass ein Protein, welches das *M43*-Genprodukt braucht, um vom I $\kappa$ B $\alpha$ -Antikörper kopräzipitiert

## ERGEBNISSE

werden zu können, nicht mehr im Kopräzipitationsmuster erscheint. Bei diesem Protein könnte es sich natürlich auch um pM43 selbst handeln. Für die Klärung solcher Fragestellungen verwendet man normalerweise spezifische Antikörper gegen beide zu untersuchenden Interaktionspartner. Da nur eine sehr begrenzte Anzahl CMV-spezifischer Antikörper verfügbar ist, wurde die in 2.3.1. bereits beschriebene MCMV-Mutante M43-HA konstruiert. Mit diesem molekularen Werkzeug konnte das Problem der Antikörper umgangen und M43-Analysen auch auf Proteinebene und im MCMV-Kontext durchgeführt werden.



**Abb. 2.35: Die größere Form von M43-HA interagiert mit IκBα**

NIH3T3-Zellen wurden mock-behandelt oder mit M43-HA MCMV infiziert (MOI 5). 48 hpi wurden die Zellen lysiert. Aus diesen Lysaten wurde mit spezifischen Antikörpern gegen IκBα oder HA präzipitiert. Als Washkonditionen wurden Niedrigsalz- (N; 150mM) bzw. Hochsalz-Bedingungen (H; 500mM) gewählt. (A) Die Präzipitate wurden mittels Westernblot auf M43-HA getestet. (B) Als Kontrolle einer erfolgreichen Kopräzipitation mit dem IκBα-Antikörper wurde NF-κB p65 detektiert.

Mit Hilfe der M43-HA exprimierenden MCMV-Mutante wurde untersucht, ob eine Interaktion zwischen IκBα und M43-HA nachweisbar ist. Hierfür wurden Immunopräzipitationen (IP) mit IκBα- und HA-spezifischen Antikörpern durchgeführt. Wie in Abb. 2.35 A zu erkennen ist, konnte mit dem verwendeten IκBα-spezifischen Antikörper die größere der beiden Formen von M43-HA kopräzipitiert werden. Die direkte IP mit einem

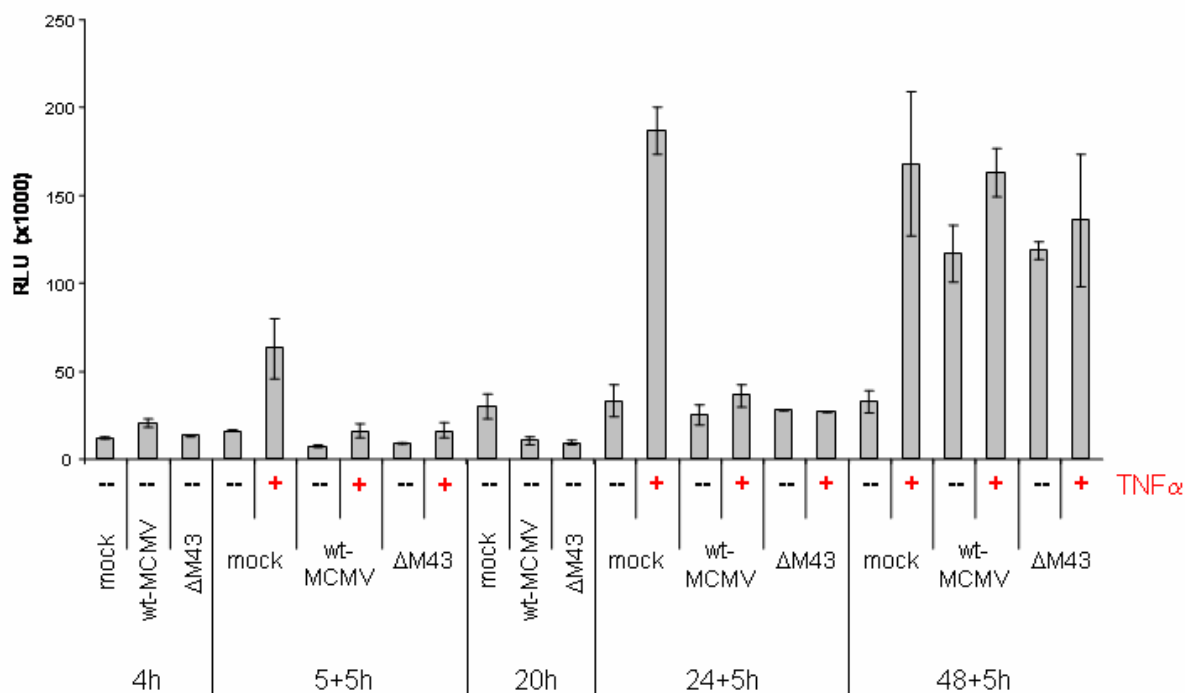
## ERGEBNISSE

HA-spezifischen Antikörper wurde für den Größenvergleich in die benachbarten Spuren aufgetragen. Die Spezifität dieser Interaktion wird durch die nicht vorhandene Kopräzipitation der kleinen Form von M43-HA definiert. Dies stellt somit eine interne Spezifitätskontrolle dar. Der Nachweis des bekannten I $\kappa$ B $\alpha$ -Interaktionspartners NF- $\kappa$ B p65 sollte als Positivkontrolle einer erfolgreichen Kopräzipitation dienen. Mit dem Ergebnis dieser Kontrolle wird aber die zusätzliche Information erhalten, dass in MCMV-infizierten Zellen I $\kappa$ B $\alpha$  und NF- $\kappa$ B p65 enthaltende Komplexe scheinbar stabiler sind als in nicht-infizierten Zellen (Abb. 2.35 B). Diese mögliche Stabilisierung inaktiver NF- $\kappa$ B-Komplexe könnte eine Erklärung für die in MCMV-infizierten Zellen beobachtete Inhibition des NF- $\kappa$ B Signalweges sein. Da die größere Form von M43-HA mit I $\kappa$ B $\alpha$  kopräzipitierbar ist, kann gefolgert werden, dass dieses *M43*-Genprodukt physikalisch direkt oder indirekt mit I $\kappa$ B $\alpha$  interagiert.

Aufgrund der Tatsache, dass ohne Inhibition der Proteinsynthese bisher kein Effekt der *M43*-Deletion auf die NF- $\kappa$ B Signaltransduktion nachgewiesen werden konnte, wurde als nächstes die unterste Ebene dieses Signalweges untersucht: die NF- $\kappa$ B-abhängige Genexpression. Auf dieser Ebene sollten alle Veränderungen sichtbar sein, die die vorgeschaltete Signalkaskade beeinflussen. Für diese Analysen wurden Fibroblasten mit einem NF- $\kappa$ B-Reporterkonstrukt transfiziert, welches sechs hintereinander geschaltete  $\kappa$ B-Sequenzen enthält. In Abhängigkeit von zellulärer NF- $\kappa$ B-Aktivierung wird das Luciferase-Reportergen exprimiert, so dass durch die Quantifizierung der Luciferase-Aktivität auf die NF- $\kappa$ B-induzierte Genexpression geschlossen werden kann.

Das Ergebnis dieses Experimentes besagte, dass zu den untersuchten Zeitpunkten nach Infektion NF- $\kappa$ B in wt-MCMV und  $\Delta$ M43-infizierten Zellen in gleichen Maßen unstimuliert bzw. nicht stimulierbar ist (Abb. 2.36). Interessanterweise kann man einen aktivierten Status von NF- $\kappa$ B zu späten Zeitpunkten nach MCMV-Infektion (48 hpi) beobachten. In dieser späten Replikationsphase scheint NF- $\kappa$ B-Aktivität für MCMV von Vorteil zu sein und einige der viralen Inhibitionsmechanismen sind anscheinend ausgesetzt. Der Anstieg der basalen und induzierten Aktivität in den späteren mock-Proben wird durch das Weiterwachsen der Zellen verursacht. Da die infizierten Zellen nicht mehr wachsen, kann man diesen Effekt hier nicht beobachten. Zusammenfassend kann aus diesen Reporter-gen-Daten geschlossen werden, dass die NF- $\kappa$ B-abhängige Expression in  $\Delta$ M43-infizierten Zellen sich nicht offensichtlich von wt-MCMV infizierten Zellen unterscheidet.

## ERGEBNISSE



**Abb. 2.36: Die Deletion von *M43* verändert nicht die basale oder TNF $\alpha$ -induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivität in MCMV-infizierten Zellen**

Primäre Fibroblasten aus Mäuseembryonen (MEF, *mouse embryonic fibroblasts*) wurden transient mit dem Reporterkonstrukt  $\kappa$ B-luc transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen mock-behandelt oder mit wt-MCMV bzw.  $\Delta$ M43 infiziert (MOI 5). Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion wurden die Zellen für 5 h mit TNF $\alpha$  stimuliert bzw. unstimuliert gelassen. Für die Bestimmung der Luciferase-Aktivität wurden die Zellen lysiert und nach Zugabe des Substrats im Luminometer vermessen.

Nach den durchgeführten Schritten zur Charakterisierung von  $\Delta$ M43 wurden erste Einblicke in den betroffenen molekularen Mechanismus erhalten. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Deletion von *M43* die Inhibition der IFN $\beta$ -Expression beeinträchtigt wird, während die Abschaltung der IFN $\alpha$ 4-Transkription nicht beeinflusst wird. Dieser Effekt beruht nicht auf der Hemmung von ATF-2/c-Jun oder der IRF3-Aktivierung. Auch wenn in wt-MCMV und  $\Delta$ M43-infizierten Zellen kein offensichtlicher Unterschied bezüglich des NF- $\kappa$ B Signalweges nachweisbar war, scheint *M43* Einfluss auf die Feinregulierung von NF- $\kappa$ B zu nehmen, da eine Interaktion zwischen I $\kappa$ B $\alpha$  und M43-HA detektiert wurde. Die Bedeutung einer durch *M43*-Deletion gestörten NF- $\kappa$ B-Feinregulation nimmt in Abwesenheit einer intakten



## ERGEBNISSE

Proteinsynthese zu, so dass unter diesen Bedingungen deutliche Veränderungen hinsichtlich NF- $\kappa$ B-relevanter Proteine zu beobachten sind und die gravierendste aller antiviralen Gegenmaßnahmen in  $\Delta$ M43-infizierten Zellen stattfindet: Es kommt zur Apoptose.

### **ZUSAMMENFASSUNG (3)**

**$\Delta$ M43 ist hinsichtlich der Inhibition der IFN $\beta$ -Expression beeinträchtigt, während die Abschaltung der IFN $\alpha$ 4-Transkription nicht verändert ist. Die Deletion von *M43* beeinflusst nicht die Inhibition der Aktivierung von IRF3 oder ATF-2/c-Jun. Auch für die Interferenz mit dem NF- $\kappa$ B Signalweg besitzt MCMV *M43*-unabhängige Mechanismen. Dennoch kommt es in  $\Delta$ M43-infizierten Zellen bei inhibierter Proteinsynthese zur Apoptose und einer Veränderung der NF- $\kappa$ B-relevanten Proteine I $\kappa$ B $\alpha$  und NF- $\kappa$ B p65. Darüber hinaus konnte eine Interaktion von M43-HA mit I $\kappa$ B $\alpha$  nachgewiesen werden.**