

AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR MEDIZINISCHE MIKROBIOLOGIE UND HYGIENE  
PROF. DR. DR. ANDRÉ GESSNER  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Kartierung immunmodulatorischer Funktionen  
im Zytomegalievirus IE1-Protein**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Marion Zenger

2014



AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR MEDIZINISCHE MIKROBIOLOGIE UND HYGIENE  
PROF. DR. DR. ANDRÉ GESSNER  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Kartierung immunmodulatorischer Funktionen  
im Zytomegalievirus IE1-Protein**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Marion Zenger

2014

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	PD Dr. Michael Nevels
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Bernd Salzberger
Tag der mündlichen Prüfung:	24. Februar 2015

# Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	1
2	Einleitung .....	3
2.1	Das humane Zytomegalievirus .....	3
2.1.1	Klassifizierung und Struktur .....	3
2.1.2	Viraler Infektionszyklus .....	3
2.1.3	Unterschiede zwischen klinischen und laboradaptierten hCMV-Stämmen .....	5
2.1.4	Epidemiologie und medizinische Bedeutung .....	6
2.1.5	Diagnostische Verfahren .....	7
2.1.6	Therapeutische Möglichkeiten.....	8
2.2	Eigenschaften des hCMV IE1-Proteins.....	9
2.2.1	Allgemeine Charakteristika .....	9
2.2.2	Interaktion von IE1 mit IFN-Signalkaskaden .....	10
2.2.2.1	IFN-Klassen und ihre Signalwege .....	10
2.2.2.2	Blockierung des Typ I-IFN-Signalweges durch Bindung von IE1 an STAT2.....	13
2.2.2.3	Induktion einer IFN- $\gamma$ -ähnlichen Genexpression durch IE1.....	13
2.2.3	Interaktion von IE1 mit PML-Körpern .....	14
2.3	Fragestellung .....	16
3	Material und Methoden .....	17
3.1	Nukleinsäuren.....	17
3.1.1	Oligonukleotide .....	17
3.1.2	Plasmide .....	18
3.1.3	Bacmide.....	20
3.2	Antikörper.....	20
3.2.1	Primäre Antikörper.....	20
3.2.2	Sekundäre Antikörper .....	21
3.3	Zellen .....	22
3.3.1	Bakterienstämme .....	22
3.3.2	Humane Zelllinien.....	22
3.4	Kultivierung von E. coli-Stämmen .....	23
3.4.1	Flüssigkulturen .....	23
3.4.2	Plattenkulturen .....	23
3.4.3	Glyzerinkulturen.....	24
3.5	Zellkulturmethoden .....	24
3.5.1	Kultivierung humaner Zelllinien .....	24
3.5.2	Bestimmung der Zellzahl .....	25
3.5.3	Produktion von hCMV TB40/E Virusstocks .....	26
3.5.4	Produktion rekombinanter Lentiviren.....	27
3.5.5	Charakterisierung von Virusstocks .....	29
3.5.6	Herstellung stabiler Zelllinien.....	30
3.5.7	Wachstumsanalysen von hCMV TB40/E(d//IE1) .....	31

<b>3.6</b>	<b>Nukleinsäuremethoden .....</b>	<b>32</b>
3.6.1	Konzentrationsbestimmung und qualitative Analyse von Nukleinsäuren.....	32
3.6.2	Agarosegelelektrophorese .....	32
3.6.3	PCR .....	33
3.6.4	Generierung von IE1 $\Delta$ AD2-AD3 über Fusions-PCR .....	34
3.6.5	Klonierung .....	36
3.6.5.1	DNA-Verdau mittels Restriktionsendonukleasen.....	36
3.6.5.2	DNA-Extraktion aus Agarosegelen .....	36
3.6.5.3	Ligation .....	36
3.6.5.4	Transformation von E. coli mit Hitzeschock.....	37
3.6.6	Reinigung von Plasmid- und Bacmid-DNA aus E. coli.....	37
3.6.7	Isolierung von Nukleinsäuren aus humanen Zellen und virushaltigen Kulturüberständen .....	38
3.6.8	qPCR .....	39
<b>3.7</b>	<b>Proteinmethoden.....</b>	<b>41</b>
3.7.1	Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie .....	41
3.7.2	Herstellung von Proteinextrakten.....	42
3.7.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	43
3.7.4	Western Blot-Analyse.....	44
3.7.5	Co-Immunpräzipitation .....	45
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>48</b>
<b>4.1</b>	<b>Kartierung immunmodulatorischer Funktionen im IE1-Protein.....</b>	<b>48</b>
4.1.1	Herstellung und Charakterisierung der IE1-Mutanten.....	48
4.1.1.1	Auswahl und Beschreibung der IE1-Mutanten .....	48
4.1.1.2	Herstellung von Zelllinien zur induzierbaren Expression der IE1-Mutanten .....	50
4.1.1.3	Analyse der Expression der IE1-Mutanten.....	52
4.1.2	Bedeutung verschiedener IE1-Abschnitte für IFN-abhängige Immunantworten .....	54
4.1.2.1	Definierte IE1-Abschnitte vermitteln eine Aktivierung von Typ II-ISG.....	54
4.1.2.2	Zusammenhang mit der Unterdrückung der SOCS3-Expression.....	56
4.1.2.3	Zusammenhang mit der Unterdrückung der OAS1-Aktivierung.....	58
4.1.3	Interaktion zwischen IE1 und STAT1 .....	60
4.1.3.1	Definierte IE1-Abschnitte sind essenziell für die Phosphorylierung von STAT1 .....	60
4.1.3.2	Definierte IE1-Abschnitte vermitteln eine nukleäre Akkumulation von STAT1.....	61
4.1.3.3	Kolokalisation von IE1 $\Delta$ CTD, IE1 $\Delta$ CBM und IE1-SUMO mit STAT1 an PML-Körpern .....	65
4.1.3.4	Hinweise auf eine Kolokalisation von STAT1 und bestimmten IE1-Varianten am..... mitotischen Chromatin.....	67
4.1.3.5	Nachweis einer Interaktion zwischen IE1 und STAT1 .....	70
4.1.4	Interaktion zwischen IE1, PML-Körpern und mitotischem Chromatin .....	72
4.1.4.1	Bindung und Auflösung von PML-Körpern durch IE1.....	72
4.1.4.2	Rekrutierung von PML an mitotisches Chromatin .....	77
<b>4.2</b>	<b>Charakterisierung IE1-deletierter Virusmutanten des klinischen .....</b>	<b>80</b>
	<b>hCMV-Isolats TB40/E .....</b>	<b>80</b>
4.2.1	Herstellung des TB40/E-Virus und IE1-deletierter Virusmutanten.....	80
4.2.2	IE1-abhängiges Replikationsverhalten von hCMV TB40/E.....	81
4.2.3	IE1-abhängige Resistenz von hCMV TB40/E gegenüber IFN.....	84

---

5	Diskussion .....	87
5.1	Molekularer Mechanismus der IE1-vermittelten Induktion von Typ II-ISG.....	87
5.1.1	Essenzielle Abschnitte im IE1-Protein .....	87
5.1.2	Zusammenhang mit der Suppression von SOCS3 .....	90
5.1.3	Zusammenhang mit der Unterdrückung von Typ I-ISG.....	91
5.1.4	Bedeutung der Interaktion zwischen IE1 und STAT1 .....	93
5.1.5	Rolle der PML-Körper .....	95
5.2	Schlussfolgerung und Ausblick .....	99
6	Anhang .....	100
	Abkürzungsverzeichnis.....	100
	Literaturverzeichnis.....	103
	Erklärung.....	109
	Danksagung.....	110

# 1 Zusammenfassung

Das humane Zytomegalievirus (hCMV), der größte Vertreter der humanpathogenen Herpesviren, verursacht lebensbedrohliche Krankheitsbilder bei Menschen mit geschwächtem Immunsystem, wie AIDS- oder Transplantationspatienten. Zudem kann es bei einer diaplazentaren Übertragung des Virus während der Schwangerschaft zu einer schweren Schädigung des ungeborenen Kindes kommen. Dagegen zeigen Immungesunde im Rahmen einer hCMV-Infektion nur sehr selten Anzeichen einer ernsthaften Erkrankung.

Die sogenannten immediate early- (IE-) Proteine sind die ersten viralen Genprodukte, die nach der Infektion in den Wirtszellen gebildet werden. Dazu gehört das IE1-Protein, das unter anderem als Transkriptionsaktivator für eine Vielzahl viraler Gene fungiert. Darüber hinaus ist dieses Protein in der Lage, die Genexpression der Wirtszelle zu beeinflussen. So schützt es hCMV unter anderem vor dem Zugriff des angeborenen Immunsystems, indem es in Typ I-Interferon- (IFN-) vermittelte Signalwege eingreift und über deren Blockierung die Transkription antiviral wirksamer Faktoren verhindert. Zusätzlich interagiert IE1 mit Proteinkomplexen des Zellkerns, den sogenannten PML-Körpern, für die ebenfalls eine Bedeutung bei der angeborenen Immunabwehr von Infektionen beschrieben ist. IE1 kann an PML-Körper binden und diese kurze Zeit später zerstören, sodass das virale Protein auch hier immunevasiv wirkt.

Neben diesen hemmenden Eigenschaften besitzt IE1 jedoch auch die Fähigkeit zur Aktivierung von Genen der Wirtszelle. So ist es in der Lage, die Expression einer Reihe von zellulären Zytokinen und anderen Proteinen zu stimulieren, die normalerweise durch IFN- $\gamma$  (Typ II-IFN) aktiviert werden. Für die IE1-vermittelte Aktivierung dieser Gene ist die Anwesenheit von Typ II-IFN jedoch nicht notwendig. Allerdings ist eine Phosphorylierung des signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) an Tyrosin 701 erforderlich, die zu dessen nukleärer Translokation und sequenzspezifischer DNA-Bindung und damit zur Aktivierung der Transkription führt.

Um den Organismus nicht durch eine überschießende Reaktion des Immunsystems zu schädigen, unterliegen IFN-induzierte Prozesse einer negativen Rückkoppelung, an der unter anderem Proteine der suppressor of cytokine signaling- (SOCS-) Familie beteiligt sind. Über eine Repression der SOCS3-Transkription greift das IE1-Protein auch in diesen Mechanismus ein und verhindert damit offenbar eine effiziente Herunterregulierung IFN-induzierter Vorgänge.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene IE1-Mutanten hergestellt, die in einem induzierbaren Zellsystem außerhalb der komplexen Vorgänge einer Virusinfektion auf ihre Funktionalität bezüglich der beschriebenen immunmodulatorischen Abläufe untersucht wurden. Dabei stellte sich heraus, dass verschiedene carboxy-terminale Abschnitte im IE1-Protein, und zwar sowohl die acidic domain 2 (AD2) (Aminosäure 421 bis 445) als auch die benachbarten Sequenzen im Bereich der AD1 und Serin/Prolin- (S/P-) reichen Region (Aminosäure 373 bis 420), an der Hochregulierung Typ II-IFN-



stimulierter Gene sowie der Suppression von SOCS3 beteiligt sind. Während jedoch für die Induktion Typ II-IFN-stimulierter Gene beiden Domänen eine essenzielle Bedeutung zukommt, ist für die Unterdrückung der SOCS3-Expression im Wesentlichen der Abschnitt AD1-S/P wichtig, wohingegen AD2 nur eine unterstützende Rolle übernimmt. Ein vergleichbares Bild lieferte die Blockierung des Typ I-IFN-vermittelten Signalweges, die ebenfalls hauptsächlich über AD1-S/P und weniger stark über AD2 vermittelt wird, wie sich bereits in früher publizierten Arbeiten gezeigt hatte. Damit erscheint eine komplette Kopplung der drei untersuchten IE1-Funktionen (Inhibition der Typ I-IFN-Antwort, Aktivierung einer Typ II-IFN-ähnlichen Antwort, Inhibition der SOCS3-Expression) unwahrscheinlich, wenngleich es möglich ist, dass die jeweiligen Abschnitte sich in ihrer Funktion unterstützen.

Im Rahmen der Hochregulierung IFN- $\gamma$ -stimulierter Gene konnte zudem eine direkte oder indirekte Interaktion zwischen STAT1 und IE1 nachgewiesen werden, die ebenfalls über AD1-S/P und AD2 vermittelt wird und ein wesentlicher Bestandteil dieses Prozesses zu sein scheint. Neben der Wechselwirkung mit STAT1 ist möglicherweise auch eine Assoziation mit PML-Körpern, nicht jedoch deren Auflösung, an der Vermittlung der Typ II-IFN-ähnlichen Antwort durch IE1 beteiligt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde mittels IE1-defizienter Virusmutanten die Bedeutung dieses viralen Proteins für das klinische hCMV-Isolat TB40/E im Hinblick auf seine Replikation unter verschiedenen Infektionsbedingungen sowie die Resistenz gegenüber Typ I- und Typ II-IFN analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass IE1 vor allem bei niedriger Infektionsmultiplizität für TB40/E überaus wichtig ist und eine Abwesenheit dieses Proteins unter diesen Bedingungen zu keiner nennenswerten Virusreplikation führt. Für den Schutz vor IFN-vermittelten antiviralen Effekten ist IE1 im Kontext von TB40/E jedoch weitaus weniger bedeutsam als erwartet, sodass davon auszugehen ist, dass neben diesem Protein noch andere virale Faktoren für die effiziente Hemmung IFN-abhängiger Prozesse erforderlich sind.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass es sich bei der differentiellen Modulation verschiedener angeborener Immunprozesse durch das hCMV IE1-Protein um Funktionen handelt, die auf überlappenden Bereichen im carboxy-terminalen Abschnitt des viralen Proteins kodiert, aber wahrscheinlich nicht vollständig gekoppelt sind. Diese immunmodulatorischen Aktivitäten des IE1-Proteins spielen bei der Infektion in vivo vermutlich eine größere Rolle als in vitro und könnten künftig für verbesserte antivirale Therapiestrategien genutzt werden.

## 2 Einleitung

### 2.1 Das humane Zytomegalievirus

#### 2.1.1 Klassifizierung und Struktur

Das humane Zytomegalievirus (hCMV) gehört zur Familie der Herpesviridae und stellt das bekannteste Mitglied der Subgruppe der  $\beta$ -Herpesvirinae dar. Es zeichnet sich unter anderem durch eine strenge Wirtsspezifität und einen relativ langsamen Vermehrungszyklus aus. Die Virionstruktur besteht aus einem 125 Nanometer (nm) großen ikosaedrischen Nukleokapsid, das die lineare Doppelstrang-DNA im Inneren umgibt. Darauf folgt nach außen hin eine Matrix aus verschiedenen viralen Proteinen, die als Tegument bezeichnet wird. Das gesamte Gebilde wird schließlich von einer Lipid-Doppelmembran mit eingelagerten glykosylierten Oberflächenproteinen eingeschlossen (Mocarski, 2007; Gibson, 2008).

Das hCMV-Genom ist das größte innerhalb der Herpesviridae und besteht aus über 230 Kilobasen (kb), von denen mehr als 700 offene Leserahmen translatiert werden, und kann in verschiedene Abschnitte unterteilt werden. Es umfasst zwei Bereiche, die einmalig vorkommen und demzufolge, je nach ihrer Länge, als unique long ( $U_L$ ) oder unique short ( $U_S$ ) bezeichnet werden. Diese werden an beiden Seiten von repetitiven Sequenzen begrenzt, die im Außenbereich terminal repeat long bzw. short ( $TR_L$ ,  $TR_S$ ) und in den inneren Regionen internal repeat long oder short ( $IR_L$ ,  $IR_S$ ) genannt werden. Die entsprechenden Gene erhalten dann je nach ihrer Lage eine der oben beschriebenen Bezeichnungen mit einer Nummer, die ihre Position im Genom kennzeichnet. Dabei kodiert beispielsweise  $U_L54$  für die virale DNA-Polymerase (Mocarski, 2007; Stern-Ginossar et al., 2012).

#### 2.1.2 Viraler Infektionszyklus

Obwohl die Replikation von hCMV ausschließlich in humanen Zellen stattfindet, kann das Virus innerhalb des menschlichen Körpers eine große Bandbreite an Zellarten und Organen infizieren. Dazu gehören vor allem Epithel- und Endothelzellen, Fibroblasten und glatte Muskelzellen, die die Hauptreplikationsorte bilden. Daneben ist das Virus auch in der Lage, Zellen des hämatopoetischen Systems zu infizieren. Allerdings kann es sich dort nur in Makrophagen und dendritischen Zellen, aber nicht in deren Vorläuferzellen, Lymphozyten oder Granulozyten vermehren (Ibanez et al., 1991; Lathey und Spector, 1991; Grefte et al., 1994; Sinzger et al., 1995; Sinzger und Jahn, 1996; Riegler et al., 2000).

Um in die jeweilige Zelle einzudringen, bindet das Virus über bestimmte Glykoproteine seiner Hülle an Heparansulfatproteoglykane und spezifische Proteinrezeptoren auf der Zelloberfläche (Compton und Feire, 2007). Die Freisetzung des Nukleokapsids ins Zytoplasma kann über eine direkte, pH-unabhängige Verschmelzung der Virushülle mit der Zellmembran erfolgen, wie beispielsweise bei Fibroblasten (Compton et al., 1992). Eine weitere Möglichkeit stellt die rezeptorvermittelte Endozytose dar, die mit einer Fusion des Virions mit der endosomalen Membran unter niedrigen pH-Bedingungen einhergeht und hCMV Zutritt zu Epithel- und Endothelzellen verschafft (Ryckman et al., 2006). Neuere Forschungsergebnisse zeigten, dass die Aufnahme von hCMV in dendritische Zellen über einen Makropinozytose-ähnlichen Vorgang erfolgt, der zwar Aktin- und Cholesterin-, aber nicht pH-abhängig ist (Haspot et al., 2012).

Im Zytoplasma erfolgt durch eine Wechselwirkung des Kapsids mit Bestandteilen des Zytoskeletts der Transport zum Zellkern (Ogawa-Goto et al., 2003; Miller und Hertel, 2009). Dort bindet das hCMV-Kapsid, ähnlich wie bei Herpes simplex Typ I-Viren (HSV-1), an eine Kernpore und kann daraufhin das virale Genom ins Nukleoplasma freisetzen (Ojala et al., 2000).

Im Zellkern angekommen, nehmen Tegument-Proteine wie pp71 (U<sub>L</sub>82) Kontakt zum sogenannten viralen major immediate early (IE) Promotor (MIEP) auf und stimulieren dadurch die Expression der IE-Gene. Diese stehen unter der direkten Kontrolle dieser Promotorregion und werden bereits kurze Zeit nach dem Eindringen von hCMV in die Wirtszellen unabhängig von der Expression anderer viraler und zellulärer Proteine transkribiert. Sie führen unter anderem zu einer kaskadenartigen Aktivierung der early- (E-) und late- (L-) Gene. Die E-Gene werden bereits etwa sechs Stunden (h) nach Infektion transkribiert und kodieren für wichtige Faktoren der viralen DNA-Replikation, wie beispielsweise die katalytische Untereinheit der DNA-Polymerase (U<sub>L</sub>54) und ihren Prozessivitätsfaktor (U<sub>L</sub>44) (Mocarski, 2007). Etwa 24 h nach dem Einschleusen des Virus-Genoms in den Zellkern beginnt in den Wirtszellen die virale DNA-Replikation nach dem Mechanismus des „rolling circle“ (McVoy und Adler, 1994). Ab diesem Zeitpunkt setzt auch die Transkription der L-Gene ein, die für wichtige Bestandteile der Virionen wie Tegument, Nukleokapsid oder Glykoproteine kodieren. Nachfolgend wird zunächst das Kapsid produziert, in das anschließend die replizierte DNA verpackt wird. Beide Komponenten werden an der inneren Kernmembran von einer ersten Hülle umgeben, die jedoch nach dem Ausschleusen der unfertigen Virionen aus dem Zellkern wieder verloren geht, sodass nur Nukleokapsid und DNA im Zytoplasma ankommen. Dort werden sie in Golgi-Vesikel aufgenommen und erhalten ihre endgültige Hüllmembran, bevor sie nach der Verschmelzung von Transportvesikel und Zellmembran über Exozytose in den Extrazellularraum abgegeben werden. Die Freisetzung großer Mengen neu produzierter Viren setzt dabei ca. 72 bis 96 h nach Infektion ein (Mocarski, 2007; Gibson, 2008).

Neben dem oben beschriebenen produktiven („lytischen“) Infektionszyklus ist hCMV wie alle Herpesviren in der Lage, Zellen latent zu infizieren. Das bedeutet, dass es innerhalb der befallenen Zellen nur zu einer eingeschränkten Expression viraler Gene kommt, die zu keiner nachweisbaren Produktion von Viruspartikeln führt. Dadurch ist es hCMV möglich, eine lebenslange Persistenz im Organismus aufrecht zu erhalten. Aus diesem Stadium sind spontane Reaktivierungen möglich, die jedoch bei Gesunden schnell vom Immunsystem unter Kontrolle gebracht werden. Als Reservoir für die Ausbildung dieses Latenzzustandes wurden hämatopoetische Stammzellen wie CD34<sup>+</sup> und CD33<sup>+</sup> monozytäre Vorläuferzellen und Monozyten nachgewiesen, in denen jedoch im Zuge von Differenzierungsvorgängen ebenfalls ein lytischer Infektionszyklus ausgelöst werden kann. Vermutlich weisen jedoch auch andere Zelltypen diesen viralen Latenzzustand auf (Soderberg-Naucler und Nelson, 1999; Sinclair und Sissons, 2006; Sinclair, 2008).

### **2.1.3 Unterschiede zwischen klinischen und laboradaptierten hCMV-Stämmen**

Innerhalb der Virusspezies hCMV kann noch einmal zwischen verschiedenen Stämmen unterschieden werden, die mehr oder weniger stark in ihren Eigenschaften differieren. Am signifikantesten sind dabei die Abweichungen zwischen klinischen Isolaten und den sogenannten laboradaptierten Varianten wie AD169 und Towne. Bei letzteren kam es im Verlauf von häufigen Passagierungen in humanen Fibroblasten zu einer Deletion von 15 (AD169) bzw. 13 (Towne) kb in der U<sub>L</sub>-Region, einer inversen Duplikation von IR<sub>L</sub> 1 bis 14 sowie zu verschiedenen Punktmutationen. Diese Veränderungen betreffen unter anderem Bereiche, die für Glykoproteine der Virushülle kodieren. Daher können diese Stämme zwar sehr gut Fibroblasten, jedoch keine anderen humanen Zellen wie Epithel- und Endothel- oder glatte Muskelzellen und Makrophagen infizieren. Wegen ihrer guten Replikationsfähigkeit in Fibroblasten werden sie gerne zu Versuchszwecken im Labor verwendet, allerdings sind sie apathogen und nicht mehr in der Lage, einen Menschen persistent zu infizieren, wie dies bei klinischen Stämmen der Fall ist. Letztere entstammen der direkten Isolation aus verschiedenen Körperflüssigkeiten infizierter Patienten. Auch sie weisen untereinander kleine genetische Divergenzen auf, jedoch sind bei ihnen noch alle grundsätzlichen Eigenschaften erhalten (Murphy und Shenk, 2008).

### 2.1.4 Epidemiologie und medizinische Bedeutung

Die Seroprävalenz für hCMV liegt in Industrienationen wie den USA und Europa bei 30 bis 90%, in Entwicklungsländern sogar noch höher. Mit zunehmendem Alter zeigt sich dabei ein deutlicher Anstieg der Infektionsrate. Ebenso scheint der sozioökonomische Status eine Rolle zu spielen, da hCMV in höheren Gesellschaftsschichten seltener vorkommt als in niedrigen, was wahrscheinlich auf unterschiedliche Hygieneverhältnisse zurückzuführen ist (Staras et al., 2006; Ludwig und Hengel, 2009). Die Übertragung erfolgt über direkten Kontakt mit Körperflüssigkeiten wie Speichel, Blut, Urin, Sperma, Vaginalsekret und Tränenflüssigkeit. Dabei stellen vor allem Kleinkinder eine bedeutende Infektionsquelle dar, da sie das Virus nach erfolgter Infektion über Monate bis Jahre vor allem in Speichel und Urin ausscheiden können. Im Zuge von Schwangerschaft und Geburt findet eine Ansteckung des Feten bzw. Neugeborenen diaplazentar, über Zervixsekret im Geburtskanal oder bei stillenden Müttern über die Muttermilch statt (Mocarski, 2007).

In der breiten Öffentlichkeit ist hCMV trotz der hohen Durchseuchungsrate relativ wenig bekannt, da eine Infektion bei Gesunden meist inapparent verläuft und nur in seltenen Fällen zu einem Mononukleose-ähnlichen Krankheitsbild führt. Dieses geht einher mit Fieber, Myalgien, Lymphknotenschwellung und Hepatosplenomegalie und ähnelt daher sehr dem Bild einer akuten Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus (Crough und Khanna, 2009).

Für bestimmte Risikogruppen stellt hCMV jedoch eine erhebliche Gefahr dar. Dazu gehören seronegative Schwangere, bei denen nach Primärinfektion zu etwa 40% eine Transmission der Viren über die Plazenta stattfindet. Kommt es infolge dessen zu einer Infektion des Feten, kann dies erhebliche Schädigungen des zentralen Nervensystems mit Taubheit und geistiger Retardierung nach sich ziehen. Diese sogenannte kongenitale hCMV-Infektion betrifft ca. 0,3 bis 2,4% aller Neugeborenen, von denen jedoch direkt nach der Geburt nur etwa 10 bis 15% tatsächlich Symptome aufweisen. Dazu gehören Wachstumsretardierung, Hepatosplenomegalie, Ikterus, Pneumonie, Chorioretinitis, petechiale Einblutungen und Mikrozephalie mit intrazerebralen Kalzifizierungen als Ausdruck eines schweren Multiorganbefalls. Von den anfangs asymptomatischen Kindern zeigen weitere 5 bis 15% im Laufe ihrer Entwicklung neurologische Folgeschäden. Auch eine Reaktivierung von hCMV oder die Reinfektion mit einem anderen Virusstamm während der Schwangerschaft können dieses Krankheitsbild hervorrufen, allerdings ist hierbei eine Übertragung der Viren über die Plazenta und damit eine Infektion des ungeborenen Kindes wesentlich seltener (Ludwig und Hengel, 2009; Bonalumi et al., 2011).

Für Patienten mit einer Schwächung des Immunsystems, wie sie infolge von Organ- oder Stammzelltransplantationen sowie im Zuge einer Chemotherapie bei Krebspatienten auftritt, ist eine Infektion mit hCMV bzw. dessen Reaktivierung aus der Latenz ebenfalls sehr gefährlich, da hier die Immunantwort eine Ausbreitung der Viren nicht mehr ausreichend kontrollieren kann. Die Symptomatik

reicht dabei von leichten fieberhaften Infekten bis hin zur Ausbildung eines lebensgefährlichen hCMV-Syndroms, das sich mit Fieber, Leukopenie, Arthralgien und Hautausschlag präsentieren kann. Häufig kommt es bei diesen Patienten zu starken Entzündungsreaktionen im Gewebe, die prinzipiell fast jedes Organ betreffen können und sich beispielsweise als Pneumonie, Enterocolitis, Hepatitis oder Enzephalitis äußern. Darüber hinaus erhöht eine hCMV-Infektion nach Transplantation zusätzlich die Gefahr einer Abstoßung des Transplantats sowie das Risiko einer Superinfektion mit anderen opportunistischen Krankheitserregern (Crough und Khanna, 2009).

Auch HIV-Patienten sind durch ihre geschwächte Immunabwehr gefährdet. Vor Einführung der HAART (highly active antiretroviral therapy) waren etwa 40% von einer symptomatischen hCMV-Infektion betroffen, die hier vor allem in Form einer Retinitis auftrat, aber genauso auch alle anderen beschriebenen Symptome zeigen konnte. Durch die verbesserten Therapiemöglichkeiten, die einen zu starken Abfall der CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten über lange Zeit aufhalten können, ist die Inzidenz von hCMV in dieser Patientengruppe jedoch mittlerweile zurückgegangen (Crough und Khanna, 2009).

Neben den bekannten Folgen einer Infektion bei Hochrisikopatienten mehrten sich zudem Hinweise darauf, dass hCMV auch bei Gesunden die Entstehung von chronisch-entzündlichen Erkrankungen, Tumoren und Gefäßleiden wie Arteriosklerose begünstigen kann (Melnick et al., 1995; Cobbs et al., 2002; Cinatl et al., 2004; Soderberg-Naucler, 2008; Michaelis et al., 2009; Cobbs, 2011; Michaelis et al., 2011).

### **2.1.5 Diagnostische Verfahren**

Bei Immunkompetenten ist die Serologie mit Bestimmung von Immunglobulin (Ig) G- und IgM-Titern eine gängige Methode zur Detektion eines Kontaktes mit hCMV. Alternativ dazu kann mittels Antigenämietest auch eine quantitative Analyse des viralen Tegumentproteins pp65 in Leukozyten erfolgen (Gandhi und Khanna, 2004).

Auch während der Schwangerschaft kann über eine Serokonversion die Infektion mit dem Virus nachgewiesen werden. Allerdings ist hier oftmals kein Vergleichswert verfügbar und somit kein genauer Zeitpunkt der Ansteckung eruierbar, da IgM zum einen sehr lange im Blut persistieren und zum anderen bei einer Reaktivierung oder einer Reinfektion mit einem anderen hCMV-Stamm ebenfalls erhöht sein kann. Deshalb wird zusätzlich die Bindungsstärke (Avidität) der IgG bestimmt, die mit zunehmender Dauer der Infektion ansteigt. Hohes IgM und niedrige Avidität von IgG sind dabei relativ zuverlässige Parameter für eine akute Erstinfektion, lassen aber keine Rückschlüsse auf eine Übertragung der Viren auf den Fetus zu. Diese kann nur über eine Amniozentese mit anschließender Polymerasekettenreaktion (PCR) und Virusanzüchtung in Kultur nachgewiesen werden, da Ultraschallbefunde in den meisten Fällen entweder unauffällig sind oder nur sehr unspezifische Veränderungen zeigen (Bonalumi et al., 2011).

Weil die Ergebnisse der Serologie bei Immunsupprimierten aufgrund der mangelnden Funktionsfähigkeit des Immunsystems nicht aussagekräftig sind, ist auch hier die PCR die Methode der Wahl, um eine Virämie zu diagnostizieren. Zur Überprüfung des Ansprechens auf eine Therapie und zur frühzeitigen Erkennung einer Reaktivierung oder Neuinfektion kann die Viruslast im Blut mittels quantitativer PCR bestimmt werden, sodass bei einem Anstieg über einen gewissen Schwellenwert rechtzeitig Schritte zu einer adäquaten Behandlung eingeleitet werden können (Gandhi und Khanna, 2004).

### **2.1.6 Therapeutische Möglichkeiten**

Für eine systemische Therapie von hCMV sind derzeit vier Medikamente offiziell zugelassen, die alle ihren Angriffspunkt im Bereich der DNA-Polymerase haben. Standardmäßig werden Ganciclovir oder sein erst im Darm aktiviertes Esterderivat Valganciclovir verwendet, die bei der DNA-Replikation anstelle von Desoxyguanosintriphosphat in den wachsenden DNA-Strang eingebaut werden und auf diese Weise die virale DNA-Polymerase hemmen und zum Kettenabbruch führen. Ähnlich verhält es sich bei Cidofovir, das eine analoge Struktur zu Desoxycytidinmonophosphat aufweist. Das Pyrophosphat-Analogon Foscarnet hingegen blockiert die Pyrophosphatbindestelle, sodass am DNA-Strang keine Phosphatgruppen mehr abgespalten werden können und eine weitere Replikation unterbleibt. Diese beiden Medikamente werden jedoch aufgrund ihrer Nephrotoxizität erst bei einem Nichtansprechen oder einer Unverträglichkeit gegenüber Ganciclovir eingesetzt. Wegen insgesamt starker Nebenwirkungen sind jedoch alle diese Medikamente nicht unproblematisch. Darüber hinaus zeigen sie, bis auf Valganciclovir, eine schlechte orale Bioverfügbarkeit und können deshalb nur intravenös verabreicht werden. Zusätzlich bildet hCMV zunehmend Resistenzen gegen diese Therapeutika aus, die infolge der ähnlichen Angriffspunkte häufig mehr als einen Wirkstoff betreffen. Angesichts dieser Komplikationen bleibt die prophylaktische und therapeutische Verwendung von Virostatika ausschließlich Hochrisikopatienten vorbehalten und erfordert dringend die Entwicklung neuer Medikamente mit verändertem Wirkmechanismus. Ein Beispiel dafür ist der Einsatz von Hyperimmunglobulinen im Sinne einer passiven Immunisierung bei Transplantationspatienten, die sich bereits in vielen Fällen als wirksam erwiesen hat (Gandhi und Khanna, 2004; Mercorelli et al., 2008; Crough und Khanna, 2009).

Allerdings ist keines dieser Medikamente für eine Anwendung in der Schwangerschaft zugelassen, sodass man in dieser Situation lange Zeit keine effektive Therapie zur Verfügung hatte. In Studien schien auch hier zunächst die Behandlung infizierter Frauen mit Hyperimmunglobulinen sowohl die Transmissionsrate als auch die fetale Schädigung zu verringern (Nigro et al., 2005; Nigro und Adler, 2013). Neuere klinische Studien zeigten jedoch eher nachteilige Effekte dieser Therapie. So führte die Hyperimmunglobulingabe bei den untersuchten Schwangeren zu keiner Verringerung der fetalen

Transmission von hCMV und verursachte zudem einen Anstieg geburtshilflicher Komplikationen wie intrauterine Wachstumsretardierung und Frühgeburtlichkeit (Revello et al., 2014).

Leider konnte bis jetzt trotz intensiver Forschung noch kein Impfstoff entwickelt werden, der eine hCMV-Infektion zuverlässig verhindert und die schwierige Behandlung dieser Patienten erst gar nicht erforderlich macht (Griffiths et al., 2013).

## 2.2 Eigenschaften des hCMV IE1-Proteins

### 2.2.1 Allgemeine Charakteristika

Wie bereits erwähnt, erfolgt kurze Zeit nach Infektion der Zellen mit hCMV die Expression von viralen IE-Genen. Besonders wichtig ist dabei die Genregion, die unter der Kontrolle des MIEP steht. Nach deren Transkription entstehen durch differenzielles Spleißen der messenger RNA (mRNA) verschiedene Genprodukte. Neben einigen kleineren Proteinen, deren Funktion noch kaum erforscht ist, stellen das 72 Kilodalton (kDa) schwere IE1 und das 86 kDa schwere IE2 die wichtigsten Produkte dieses Genlokus dar. Sie bestehen aus einem identischen Amino- (N-) terminalen Anteil, dessen genetische Information Exon 2 und 3 beinhalten, unterscheiden sich jedoch in ihrem Carboxy- (C-) Terminus. Dieser wird für IE1 von Exon 4 und für IE2 von Exon 5 kodiert. Die Hauptfunktion dieser Proteine besteht in der Aktivierung der Transkription der E- und L-Gene im lytischen Infektionszyklus. Obwohl sowohl IE1 als auch IE2 eine wichtige Rolle für die hCMV-Replikation spielen, ist zumindest bei laboradaptierten Stämmen nur IE2 unter allen Umständen dafür notwendig. IE1 scheint dagegen lediglich unter Bedingungen einer niedrigen Infektionsmultiplizität für das Viruswachstum gebraucht zu werden. Darüber hinaus haben beide Proteine möglicherweise auch einen nicht unerheblichen Anteil an der Reaktivierung von hCMV aus der Latenz (Mocarski, 2007; Paulus und Nevels, 2009).

IE1 wird nach dem Eindringen von hCMV in die Wirtszelle als erstes der IE-Gene exprimiert und anschließend durch Phosphorylierung und kovalente Bindung des small ubiquitin-like modifier 1 (SUMO-1) an Lysin 450 (K450) posttranslational modifiziert. Durch diese Vorgänge kann möglicherweise das Wirkspektrum dieses Proteins erweitert werden. Die Sumoylierung bewirkt eine Verbesserung der IE2-Expression und fördert damit in begrenztem Umfang die virale Replikation. Zudem führt diese Modifikation zu einer negativen Beeinflussung der IE1-STAT2-Bindung (siehe 2.2.2.2), hat darüber hinaus aber keine weitere bekannte Bedeutung (Xu et al., 2001; Spengler et al., 2002; Nevels et al., 2004; Mocarski, 2007; Huh et al., 2008). Das IE1-Protein akkumuliert im Zellkern, wo es Kontakt zu den promyelocytic leukemia (PML-) Körpern aufnimmt und diese kurz darauf auflöst. Da diese Strukturen im Verdacht stehen, eine antivirale Immunantwort gegen hCMV zu vermitteln, trägt dieser Prozess vermutlich dazu bei, das Virus vor dem Zugriff der zelleigenen



intrinsischen Immunabwehr zu schützen (siehe 2.2.3) (Korioth et al., 1996; Ahn und Hayward, 1997; Wilkinson et al., 1998; Tavalai et al., 2006).

Über einen 16 Aminosäuren langen Bereich am C-terminalen Ende, die sogenannte chromatin tethering domain (CTD), ist IE1 zudem in der Lage, an Chromatin, nicht jedoch an DNA zu binden (Lafemina et al., 1989; Wilkinson et al., 1998; Reinhardt et al., 2005). Diese Wechselwirkung wird innerhalb der CTD durch mehrere Aminosäuren vermittelt, unter anderem über Methionin an Position 483, Arginin 486 und Serin 487 (M483/R486/S487) (Mucke et al., 2014). Die CTD steht allerdings in keinem direkten Zusammenhang mit dem Einfluss von IE1 auf die hCMV-Replikation (Reinhardt et al., 2005).

Darüber hinaus befinden sich im C-terminalen Bereich weitere definierte Abschnitte, die für bestimmte Eigenschaften von IE1 bedeutend sind. Dazu gehören drei Domänen, die zu einem hohen Prozentsatz aus den sauren Aminosäuren Glutamat und Aspartat bestehen und daher als acidic domain 1 bis 3 (AD1-3) bezeichnet werden sowie eine Sequenz, die zu einem Großteil aus Serin und Prolin besteht (S/P). Diese Bereiche sind vor allem für die Interaktion mit Transkriptionsaktivatoren Interferon- (IFN-) vermittelter Signalwege wichtig (Paulus et al., 2006; Huh et al., 2008; Krauss et al., 2009) (siehe 2.2.2).

Abgesehen von diesen Charakteristika wurden für IE1 noch weitere Effekte auf die Wirtszellen beschrieben. Unter anderem konnte die Aktivierung verschiedener zellulärer Gene, die Förderung des Eintretens in die Mitosephase sowie eine antiapoptotische, mutagene und onkogene Wirkung nachgewiesen werden (Mocarski, 2007; Paulus und Nevels, 2009).

## **2.2.2 Interaktion von IE1 mit IFN-Signalkaskaden**

### **2.2.2.1 IFN-Klassen und ihre Signalwege**

Interferone (IFN) gehören zur großen Familie der Zytokine und stellen bei einer Infektion des Körpers eine erste Barriere der Immunabwehr dar. Sie lassen sich in drei Gruppen unterteilen: Typ I-IFN mit ihren beiden Hauptvertretern IFN- $\alpha$  und  $\beta$ , Typ II-IFN, denen IFN- $\gamma$  als einziges Mitglied zugeordnet werden kann und Typ III-IFN, die in ihrer Wirkung den Typ I-IFN sehr ähnlich sind. Typ I-IFN können von nahezu allen Körperzellen infolge einer Virusinfektion produziert werden, wohingegen IFN- $\gamma$  lediglich von Zellen des Immunsystems wie Makrophagen, Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und aktivierten T-Zellen sezerniert werden kann. IFN- $\alpha$  und  $\beta$  zeichnen sich vor allem durch eine antivirale Wirkung auf infizierte Zellen aus, das Typ II-IFN hat dagegen eher eine immunmodulierende und proinflammatorische Wirkung (Stark et al., 1998; Samuel, 2001).

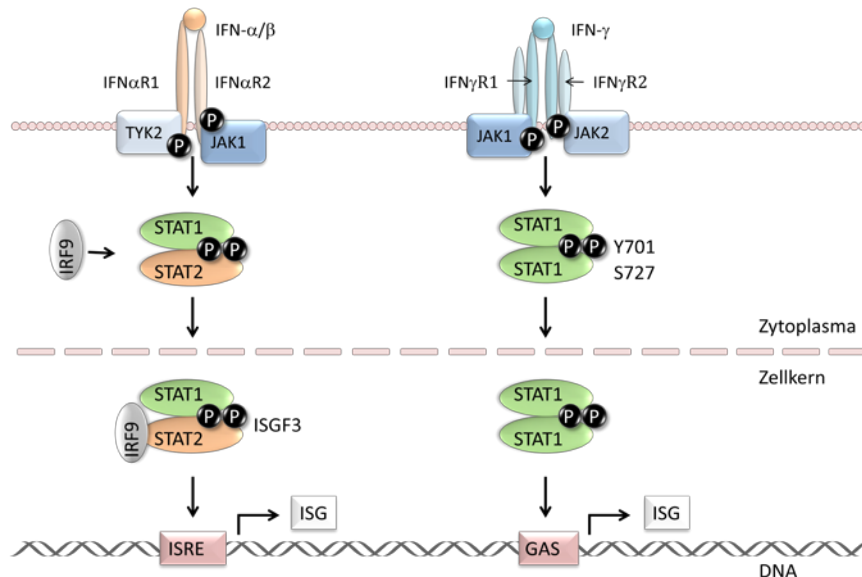
IFN- $\alpha/\beta$  binden an einen Rezeptor auf der Zelloberfläche, der aus zwei Untereinheiten besteht, die ihrerseits mit verschiedenen Janus-Kinasen (JAK), in diesem Fall JAK1 und Tyrosinkinase 2 (Tyk2), assoziiert sind. Das Andocken der Zytokine führt zu einer Phosphorylierung und damit Aktivierung

der Kinasen, die wiederum verantwortlich sind für eine Phosphorylierung der beiden Rezeptoruntereinheiten. Dies führt zu einer Bindung von zwei im Zytoplasma vorkommenden Transkriptionsaktivatoren, signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 und 2, an die dadurch ebenfalls Phosphatgruppen angehängt werden. Als Folge davon bildet sich ein Heterodimer aus STAT1 und STAT2, an das zusätzlich der IFN regulatory factor 9 (IRF9) angelagert wird. Dieser Komplex wird als IFN-stimulated gene factor 3 (ISGF3) bezeichnet und transloziert direkt nach seiner Entstehung in den Zellkern. Dort bindet er an eine spezifische DNA-Sequenz, IFN stimulated response element (ISRE) genannt, die sich in der Promotorregion derjenigen Gene befindet, die IFN-abhängig transkribiert werden (Abb. 2.1). Typ I-IFN stimulieren unter anderem die Expression der 2', 5'-Oligoadenylat-synthetasen (OAS), der RNase L und der Mx-Protein GTPasen, die alle in den Infektionszyklus von Viren eingreifen und dadurch die antivirale Wirkung der IFN vermitteln (Stark et al., 1998; Samuel, 2001; Schindler und Plumlee, 2008).

Einer ähnlichen Signalweiterleitung bedient sich auch IFN- $\gamma$ . Dessen Rezeptor unterscheidet sich jedoch sowohl in seinen beiden Untereinheiten als auch in den damit assoziierten JAK von dem der Typ I-IFN. Eine Bindung von Typ II-IFN führt hier zu einer Phosphorylierung von JAK1 und JAK2, die in diesem Zustand eine Phosphorylierung von STAT1 an Tyrosin 701 (Y701) und damit die Ausbildung eines STAT1-Homodimers und dessen verstärkte Translokation in den Zellkern bewirken. STAT1-Proteine werden darüber hinaus zusätzlich an Serin 727 (S727) phosphoryliert, was für die nukleäre Akkumulation zwar nicht unbedingt notwendig, für eine optimale Wirkung von IFN- $\gamma$  jedoch wichtig ist. Im Zellkern angekommen, bindet der Komplex an DNA-Abschnitte, die sogenannten  $\gamma$ -activated sequences (GAS), und aktiviert dadurch die Transkription von Genen, die für Proteine wie die C-X-C-Motiv-Chemokine CXCL9 und 10 und die Guanylatbindeproteine (GBP) kodieren. Die entsprechenden Genregionen werden dabei auch als IFN-stimulierte Gene (ISG) bezeichnet (Abb. 2.1). Diese Faktoren spielen eine große Rolle bei der Vermittlung der immunmodulatorischen Funktionen von IFN- $\gamma$ , die vor allem die Stimulierung von Teilen des angeborenen sowie des erworbenen Immunsystems betreffen. So induziert das Typ II-IFN z.B. die Aktivierung von Makrophagen und CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten der Th<sub>1</sub>-Subpopulation, die die zellvermittelte Immunantwort unterstützen und dadurch einen wesentlichen Beitrag zur Bekämpfung viraler Infektionen leisten (Schroder et al., 2004; Saha et al., 2010).

Obwohl dieser klassische Weg der Signalweiterleitung für IFN- $\gamma$  schon seit langem bekannt ist, wurden erst in letzter Zeit einige wichtige Details entdeckt, die zu einer teilweisen Revision des oben Beschriebenen geführt haben. Neuere Untersuchungen zeigten, dass STAT1 auch im nicht aktivierten Zustand als Dimer vorliegt und zu einem gewissen Prozentsatz zwischen Zytoplasma und Zellkern hin- und herpendelt (Braunstein et al., 2003; Meyer und Vinkemeier, 2004; Reich und Liu, 2006; Sehgal, 2008). Unter diesen Umständen weisen die beiden Monomere eine antiparallele Anordnung

zueinander auf, die durch die Phosphorylierung an Y701 in eine parallele umgewandelt wird und so zu einer verstärkten Akkumulation im Zellkern und zur Transkription der relevanten Gene führt (Wenta et al., 2008).



**Abb. 2.1: IFN-induzierte Signalwege**

IFN- $\alpha/\beta$  bewirken durch eine Bindung an ihre beiden Rezeptoruntereinheiten IFN $\alpha$ R1 und IFN $\alpha$ R2 deren Konformationsänderung und damit eine Aktivierung von JAK, in diesem Fall Tyk2 und JAK1, durch Phosphorylierung. Dies führt nachfolgend zu einer Bindung von STAT1 und STAT2, an die ebenfalls Phosphatgruppen angehängt werden. Dadurch entsteht ein Heterodimer aus STAT1 und STAT2, das unmittelbar nach Anlagerung des IRF9 in den Zellkern transloziert. Dieser als ISGF3 bezeichnete Komplex bindet an spezifische DNA-Sequenzen, die ISRE, und bewirkt dort die Transkription von Typ I-ISG (linke Seite).

IFN- $\gamma$  bindet an seine beiden Rezeptoruntereinheiten IFN $\gamma$ R1 und IFN $\gamma$ R2 und führt dadurch ebenfalls zu einer Aktivierung von JAK, in diesem Fall JAK1 und JAK2. In der Folge kommt es zu einer Phosphorylierung von STAT1 an Y701 und S727. Das auf diese Weise entstandene, parallel angeordnete Homodimer transloziert in den Zellkern und bewirkt durch eine Bindung an die entsprechenden DNA-Sequenzen (GAS) eine Transkription der Typ II-ISG (rechte Seite).

Um eine überschießende Reaktion des Immunsystems zu vermeiden, unterliegen IFN-induzierte Prozesse einer negativen Regulierung. Daher werden durch IFN nicht nur Gene aktiviert, deren Produkte für eine Bekämpfung der Infektion wichtig sind, sondern auch solche, die der Stimulation durch IFN entgegenwirken. Dazu gehören Mitglieder der suppressor of cytokine signaling- (SOCS-) Familie, die unter anderem über eine direkte Interaktion mit JAK deren Funktion unterbinden und so den JAK-STAT-Signalweg blockieren. So verhindert beispielsweise das Protein SOCS3 die Phosphorylierung von STAT1 und damit dessen Akkumulation im Zellkern (Song und Shuai, 1998; Alexander und Hilton, 2004).

Im Zuge der Aktivierung von SOCS3 kommt es normalerweise am Interleukin-6 (IL-) Rezeptor zu einer Phosphorylierung von STAT3 mit nachfolgender Akkumulation von STAT3-Dimeren im Zellkern, die dort an den SOCS3-Promotor binden und dadurch die Transkription von SOCS3 ermöglichen (Xu et

al., 2008; Aggarwal et al., 2009; Yu et al., 2009). Im Gegensatz zu den IFN unterdrückt das IE1-Protein im Rahmen einer hCMV-Infektion jedoch die Expression von SOCS3 anstatt sie zu fördern, indem es unphosphoryliertes STAT3 im Zellkern sequestriert, sodass eine Phosphorylierung am IL-6-Rezeptor nicht mehr stattfinden kann. Damit unterbleibt in der Folge auch die Aktivierung der Transkription am SOCS3-Promotor (Knoblach, 2010; Reitsma et al., 2013).

### **2.2.2.2 Blockierung des Typ I-IFN-Signalweges durch Bindung von IE1 an STAT2**

Viren haben im Laufe der Evolution Strategien entwickelt, um dem menschlichen Immunsystem zu entgehen und damit ihr Überleben zu sichern. Viele davon greifen in die oben beschriebenen IFN-Signalkaskaden ein und blockieren damit die Expression der ISG. Auch für hCMV wurden Mechanismen gefunden, die für eine Immunevasion von großer Bedeutung sind. Dabei spielt das IE1-Protein eine essenzielle Rolle, da es über eine Interaktion mit Komponenten der JAK-STAT-Kaskade eine Expression von Typ I-ISG verhindert. Durch eine direkte Bindung von STAT2 im Zellkern macht IE1 eine Interaktion des ISGF3 mit DNA-Sequenzen und damit die Transkription von IFN- $\alpha/\beta$ -stimulierten Genen unmöglich und unterdrückt so die antivirale Wirkung der Typ I-IFN. Dieser Prozess wird hauptsächlich über den Abschnitt AD1-S/P (AS 373-420) in der C-terminalen Region des Proteins vermittelt, wobei auch die angrenzende AD2 eine gewisse, wenn auch untergeordnete Bedeutung zu haben scheint. Auch eine Assoziation von IE1 mit STAT1 wurde nachgewiesen, allerdings in einer deutlich schwächeren Ausprägung als bei STAT2 (Paulus et al., 2006; Huh et al., 2008; Krauss et al., 2009).

### **2.2.2.3 Induktion einer IFN- $\gamma$ -ähnlichen Genexpression durch IE1**

Neuere Versuchsergebnisse zeigten zudem, dass IE1 nicht nur die Wirkung von Typ I-IFN beeinflusst, sondern auch Auswirkungen auf Effekte des Typ II-IFN hat. So ist das Protein in der Lage, die Transkription von Genen zu aktivieren, die normalerweise nur nach Stimulation mit IFN- $\gamma$  exprimiert werden. Eine Anwesenheit des Typ II-IFN ist dazu nicht notwendig. Dabei induziert IE1 eine Phosphorylierung von STAT1 an Y701, die zu einer Akkumulation der aktivierten STAT1-Homodimere im Zellkern führt. Zudem fördert es die Phosphorylierung von STAT1 an S727, wobei diese Modifikation für die IE1-vermittelte IFN- $\gamma$ -ähnliche Antwort höchstens eine unterstützende Rolle spielt. Schließlich vermittelt IE1 auch die Interaktion von STAT1 mit Promotorregionen der ISG, die zu einer gesteigerten Transkription von Genen wie CXCL10 und GBP4 führt. Welche Abschnitte von IE1 dazu benötigt werden und wie es genau zu einer IFN-unabhängigen Aktivierung von STAT1 kommt, ist derzeit nicht bekannt. Wahrscheinlich induziert IE1 die Synthese eines oder mehrerer löslicher Faktoren, die nach Bindung an einen spezifischen Rezeptor diese Effekte auslösen. Dafür spricht, dass eine Hochregulierung von Typ II-ISG mit einer zeitlichen Verzögerung von ca. 48 h nach Expression von IE1 zu sehen ist und erst nach 72 bis 96 h ihr Maximum erreicht, sodass vorher eventuell weitere

Reaktionsschritte stattfinden müssen. Darüber hinaus könnte auch eine direkte Interaktion zwischen STAT1 und dem IE1-Protein für die Auslösung dieser Prozesse von Bedeutung sein. Welchen Nutzen die Typ II-IFN-ähnliche Antwort für hCMV hat, ist ebenfalls noch nicht geklärt (Knoblach et al., 2011).

### 2.2.3 Interaktion von IE1 mit PML-Körpern

Neben der Interaktion mit Elementen der JAK-STAT-Signalkaskade weist IE1 eine zweite Strategie auf, um den antiviralen Mechanismen der angeborenen Immunantwort zu entkommen. Diese beruht auf einer Wechselwirkung mit den sogenannten PML-Körpern im Zellkern.

Diese Multiproteinkomplexe, auch als Nukleäre Domäne 10 (ND10) bezeichnet, sind 0,2 bis 1 µm groß und vor allem im Interchromatinraum des Zellkerns in Assoziation mit der nukleären Matrix zu finden. Sie bestehen unter anderem aus dem PML-Protein, das durch posttranslationale Sumoylierung die Fähigkeit erhält, an andere Komponenten der PML-Körper zu binden und diese dadurch in ihrer Struktur zusammenzuhalten. Weitere permanente Bestandteile sind Sp100 (speckled protein of 100 kDa) und das Todesdomänen-assoziierte Protein (Daxx). Daneben können weitere Proteine transient daran binden und zu den Funktionen der PML-Körper beitragen. Diesen werden die verschiedensten Aufgaben im Zusammenhang mit zellulären Prozessen zugeschrieben, wie beispielsweise die Induktion von Seneszenz und Apoptose, ein Mitwirken bei der DNA-Schadensantwort über eine Interaktion mit dem Tumorsuppressor-Protein p53, die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität und die Regulation der Genexpression über eine Reorganisation von Interphase-Chromatin sowie über eine Beeinflussung von Co-Faktoren der Transkription (Bernardi und Pandolfi, 2007; Tavalai und Stamminger, 2008; Tavalai und Stamminger, 2009).

Darüber hinaus scheinen die PML-Körper und/oder ihre einzelnen Komponenten über eine antivirale Wirkung zu verfügen. So führt eine Stimulation sowohl mit Typ I- als auch mit Typ II-IFN, ebenso wie eine Virusinfektion, zu einer vermehrten Expression von Bestandteilen der ND10 wie PML und Sp100. Eine Überexpression dieser Komponenten bewirkt zudem eine verminderte Transkription viraler IE-Gene, die im Gegensatz dazu bei einem Knockdown von PML oder anderen Elementen der PML-Körper stark ansteigt (Everett und Chelbi-Alix, 2007; Saffert und Kalejta, 2008; Tavalai et al., 2008; Tavalai und Stamminger, 2008; Tavalai und Stamminger, 2009). Obwohl PML lange im Verdacht stand, vor allem IFN- $\gamma$ -vermittelte Signale negativ zu regulieren (Choi et al., 2006), konnte später gezeigt werden, dass eher das Gegenteil der Fall ist und die Anwesenheit von sumoyliertem PML im Zellkern eine unterstützende Funktion auf den durch IFN- $\gamma$  induzierten Signalweg hat. In den relevanten Versuchen führte eine Abwesenheit von PML zu einer verminderten Phosphorylierung und DNA-Bindung von STAT1 und damit zu einer schwächeren Hochregulierung von Typ II-ISG (El Bougrini et al., 2011). Dazu kommt, dass DNA-Viren wie hCMV oder HSV-1 Strategien entwickelt haben, um sich gegen diese Zellbestandteile zu wehren und damit deren antivirale Wirkung außer Kraft zu

setzen (Everett und Chelbi-Alix, 2007; Saffert und Kalejta, 2008; Tavalai et al., 2008; Tavalai und Stamminger, 2008; Tavalai und Stamminger, 2009; Tavalai und Stamminger, 2010). So ist IE1 in der Lage, kurze Zeit nach Infektion an das PML-Protein zu binden, es zu desumoylieren und eine Auflösung der ND10 zu erreichen (Korioth et al., 1996; Ahn und Hayward, 1997; Ahn et al., 1998; Wilkinson et al., 1998; Muller und Dejean, 1999).

Andererseits werden die PML-Körper unter Umständen für eine effiziente Expression der hCMV-Gene sogar gebraucht, da sie eine erste „Anlaufstelle“ für das nach der Infektion in den Zellkern eingeschleuste genetische Material darstellen. Dabei wurde die aktive Transkription viraler Gene nur in unmittelbarer Nähe zu den PML-Körpern beobachtet, sodass man davon ausgeht, dass hier eine Umgebung geschaffen wird, die diese Prozesse erst ermöglicht (Ishov et al., 1997). Allerdings liegen dazu wenige Ergebnisse vor, sodass der genaue Mechanismus hinter dieser Beobachtung nicht bekannt ist. Daneben ist die bereits beschriebene Induktion der IFN- $\gamma$ -ähnlichen Antwort durch IE1 zwingend an die Anwesenheit von PML gebunden. Versuche der eigenen Arbeitsgruppe konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass eine Transkription von CXCL10 und GBP4 in Abwesenheit von PML nicht stattfindet (Knoblach, 2010).

## 2.3 Fragestellung

Für die Entwicklung dringend erforderlicher neuer Behandlungsstrategien gegen hCMV ist es unerlässlich, zentrale Virus-Wirt-Wechselwirkungen auf molekularer Ebene zu verstehen. Dabei ist es wichtig zu wissen, welche Bedeutung diese für das Überleben und die Vermehrung des Virus haben.

Vorherige Untersuchungen hatten bereits gezeigt, dass das hCMV IE1-Protein in der Lage ist, die Regulation des humanen Transkriptoms derartig zu beeinflussen, dass es eine IFN- $\gamma$ -ähnliche Antwort induzieren und somit eine Expression von als Typ II-ISG bekannten Genen bewirken kann. Das Ziel dieser Arbeit war, mit Hilfe von gezielt konstruierten Mutanten die dafür verantwortlichen Abschnitte in der IE1-Sequenz zu lokalisieren und genauere Erkenntnisse zum molekularen Mechanismus der IE1-vermittelten Antwort zu gewinnen. Dabei stand vor allem die Frage im Mittelpunkt, welche Rolle STAT1, PML und die Interaktion von IE1 mit ND10 und (mitotischem) Chromatin bei diesen Vorgängen spielen und inwieweit dabei eine Sumoylierung von IE1 von Bedeutung ist.

Bisherige Analysen der IE1-Funktion im Viruskontext beschränkten sich weitgehend auf laboradaptierte hCMV-Stämme, die sich in bestimmten Eigenschaften deutlich von klinischen Isolaten unterscheiden. Daher wurde im zweiten Teil dieser Arbeit ermittelt, welche Bedeutung IE1 für die Vermehrung des klinischen hCMV-Stammes TB40/E hat und wie sich ein Fehlen dieses Proteins auf die Sensibilität des Virus gegenüber IFN- $\alpha$  und  $\gamma$  auswirkt. Das Verhalten des klinischen Isolats ist in diesem Zusammenhang deshalb von großem Interesse, da es im Vergleich zu laboradaptierten Stämmen vermutlich eher den Abläufen einer Virusinfektion im menschlichen Körper gleichkommt und man daraus bessere Rückschlüsse auf das Verhalten von hCMV in vivo ziehen kann.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Nukleinsäuren

#### 3.1.1 Oligonukleotide

Die in den folgenden Tabellen aufgeführten Oligonukleotide wurden von den Firmen Biomers und Metabion sowie der Synseq-Abteilung der Universität Princeton/USA hergestellt und über Hochleistungsflüssigkeitschromatographie bzw. Entsalzung gereinigt. Sie wurden für Klonierungen, Überprüfung der Plasmid-DNA durch Sequenzierung sowie für die Quantifizierung von DNA mittels PCR verwendet. Für Klonierungen wurden in die dafür verwendeten Starteroligonukleotide Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen eingefügt. Diese sind in Tab. 3.1 fett gedruckt dargestellt (GAATTC/CTTAAG = EcoRI; AAGCTT/TTCGAA = HindIII; CCCGGG/GGGCCC = SmaI).

Tab. 3.1: Oligonukleotide für Klonierungen

Nr.*	Bezeichnung	Sequenz in 5'→3'-Richtung	Orientierung
483	HindIII_IE1	TTGCAA <b>AAGCTT</b> ATGGAGTCTCTGCCAAGAGAAAG	vw
693	IE1minus- Stopp_SmaI/ EcoRI	GATACT <b>GAATTC</b> CCCGGGCTGGTCAGCCTTGCTTCTAGTCAC	rw
694	IE1_EcoRI	GATACT <b>GAATTC</b> TACTGGTCAGCCTTGCTTCTAGT	rw
695	IE1ΔCTD_ EcoRI	GATACT <b>GAATTC</b> TAAAGAGGCGGTGGGTTCTCAGCACC	rw
696	IE1M483A/ R486A/S487A_ EcoRI	GATACT <b>GAATTC</b> TACTGGTCAGCCTTGGCGGCAGTCACGGC AGGGTGGGTGCTCTTGCCCTCCAGA	rw
697	SUMO-1	P-TCTGACCAGGAGGCAAAACCTTCA	vw
698	SUMO-1	P-CTAAACTGTTGAATGACCCCCCGT	rw
699	IE1ΔAD2-AD3	CATAGGGTGGGTGCTCTTGCCCTCCAGCCACAATTACTGAGG ACAGAGG	rw
700	IE1ΔAD2-AD3	CCTCTGTCCTCAGTAATTGTGGCTGGAGGCAAGAGCACCCAC CCTATG	vw

\* laufende Nummer in der Oligonukleotid-Datenbank der Arbeitsgruppe

P: Phosphatgruppe am 5'-Ende der Desoxyribose

vw: vorwärts, rw: rückwärts

Tab. 3.2: Oligonukleotide für Sequenzierungen

Nr.*	Bezeichnung	Sequenz in 5'→3'-Richtung	Orientierung
149	IE1-INT1	GGTGCGGCATAGAATCAAGG	vw
150	IE1-INT2	CTAAGACCACCAATGGCTGC	vw
151	IE1-INT3	CTCTCCTAGTGTGGATGACC	vw
491	pLKO.1	CGATACAAGGCTGTTAGAGAGAT	vw
701	pLKO.CMV	CAGAGCTCTCCCTATCAGT	vw
702	pLKO.1	GTGGATGAATACTGCCATTTG	rw

\* laufende Nummer in der Oligonukleotid-Datenbank der Arbeitsgruppe

vw: vorwärts, rw: rückwärts



**Tab. 3.3: Oligonukleotide für die quantitative PCR<sup>^</sup>**

Nr.*	Bezeichnung	Sequenz in 5' → 3'-Richtung	Orientierung	Zeit [s] <sup>°</sup>
294	UL54	CACCAAAGACACGTCGTT	vw	8
295	UL54	GTCCTTTGCGACCAGAAT	rw	8
363	TUBB	TATCAGCAGTACCAGGATGC	vw	8
364	TUBB	TGAGAAGCCTGAGGTGATG	rw	8
471	IE1	TCCCTAAGACCACCAATG	vw	8
472	IE1	GAGCACTGAGGCAAGTTC	rw	8
533	CXCL10	TCCACGTGTTGAGATCATTGC	vw	8
534	CXCL10	TCTTGATGGCCTTCGATTCTG	rw	8
537	GBP4	GCTCCAAGCAGTCCTTTCAC	vw	12
538	GBP4	GTGGTGGCTCATGCCTAAAT	rw	12
688	OAS1	CTGGCGGCTATAAACCTAACC	vw	8
689	OAS1	GTTCTGTGAAGCAGGTGGAGA	rw	8
739	GAG	GGTTGTAGCTGTCCCAGTATTTGTC	vw	8
740	GAG	GGAGCTAGAACGATTTCGAGTTA	rw	8
749	SOCS3	GGCCACTCTTCAGCATCTC	vw	8
750	SOCS3	ATCGTACTGGTCCAGGAATC	rw	8

<sup>^</sup> Primerpaare sind durch gleiche Schattierung gekennzeichnet

<sup>+</sup> Touch down-PCR mit Absenkung der Annealingtemperatur in 0,5°C-Schritten von 66°C auf 56°C

<sup>\*</sup> laufende Nummer in der Oligonukleotid-Datenbank der Arbeitsgruppe

<sup>°</sup> Polymerisationszeit

vw: vorwärts, rw: rückwärts

### 3.1.2 Plasmide

Die im Folgenden aufgelisteten Plasmide (Tab. 3.4) wurden zum Zweck der Klonierung für die Transformation von *Escherichia coli* (*E. coli*) sowie zur Transfektion von HEK 293T-Zellen für die Herstellung rekombinanter Lentiviren verwendet (3.6.5, 3.5.4). Das Plasmid pCGN-pp71 wurde bei der Rekonstitution von TB40/E-Viren aus Bacmiden co-transfiziert (3.5.3).

**Tab. 3.4: Verwendete Plasmide**

Nr.*	Bezeichnung	Verwendung	Quelle
238	pcDNA-SUMO1	Herstellung der pCMV.TetO.cIE1-Plasmide	Nevels et al., 2004
473	pEGFP-IE1		
575	pEGFP-IE1-L174P		S. Meinel, unveröffentlicht
579	pEGFP-IE1-K450R		Nevels et al., 2004
612	pEGFP-IE1Δ373-386		Krauss et al., 2009
613	pEGFP-IE1Δ395-409		
614	pEGFP-IE1Δ421-445		
615	pEGFP-IE1Δ451-475		
616	pEGFP-IE1Δ373-420		
724	pSG5-HA-IE1Δ290-320		Huh et al., 2008
695	pCMV.TetO.cIE1	Klonierungsvektor für pCMV.TetO.cIE1-Mutanten	Knoblach et al., 2011
696	pLKO.DCMV.TetO.cIE1	Klonierungsvektor für pLKO.DCMV.TetO.cIE1-Mutanten	

810	pCMV.TetO.cIE1minusStopp	Klonierung von pLKO.DCMV.TetO.cIE1-Mutanten	Diese Arbeit	
811	pCMV.TetO.cIE1Δ291-320			
812	pCMV.TetO.cIE1ΔAD1			
813	pCMV.TetO.cIE1ΔS/P			
814	pCMV.TetO.cIE1ΔAD2			
815	pCMV.TetO.cIE1ΔAD3			
816	pCMV.TetO.cIE1ΔAD1-S/P			
817	pCMV.TetO.cIE1ΔCTD			
818	pCMV.TetO.cIE1-K450R			
819	pCMV.TetO.cIE1-L174P			
820	pCMV.TetO.cIE1-M483A/R486A/S487A			
821	pCMV.TetO.cIE1ΔAD2-AD3			
822	pLKO.DCMV.TetO.cIE1-L174P			Lentivirale Vektoren zur Herstellung von induzierbaren Zelllinien, in denen mutierte IE1-Varianten exprimiert werden
824	pLKO.DCMV.TetO.cIE1Δ291-320			
825	pLKO.DCMV.TetO.cIE1ΔAD1			
826	pLKO.DCMV.TetO.cIE1ΔS/P			
827	pLKO.DCMV.TetO.cIE1ΔAD2			
828	pLKO.DCMV.TetO.cIE1ΔAD3			
829	pLKO.DCMV.TetO.cIE1ΔAD1-S/P			
830	pLKO.DCMV.TetO.cIE1ΔAD2-AD3			
831	pLKO.DCMV.TetO.cIE1ΔCTD			
832	pLKO.DCMV.TetO.cIE1 M483A/R486A/S487A			
833	pLKO.DCMV.TetO.cIE1-K450R			
834	pLKO.DCMV.TetO.cIE1-SUMO1			
879	pLKO.DCMV.TetO.cIE1minusStopp	Herstellung von pLKO.DCMV.TetO.cIE1-SUMO1		
689	pLKOneo.CMV.EGFPnlsTetR	Herstellung von Zelllinien, die stabil TetR exprimieren		Everett et al., 2009
691	pMD2.G	Verpackungsplasmide zur Herstellung rekombinanter Lentiviren		Addgene, Nr. 12259
693	psPAX2			Addgene, Nr. 12260
694	pLKO.1puro	Herstellung einer IE1-negativen TetR-Kontrollzelllinie		Addgene, Nr. 8453
117	pCGN-pp71	Rekonstitution von TB40/E(d//IE1)		Baldick et al., 1997

\* laufende Nummer in der Plasmid-Datenbank der Arbeitsgruppe

### 3.1.3 Bacmide

Die in Tab. 3.5 beschriebenen Bacmide wurden durch Elektroporation in TetR- bzw. TetR-IE1-Zellen eingebracht, um daraus Stocks des hCMV TB40/E-Wildtypvirus sowie IE1-defizienter Mutanten zu gewinnen.

**Tab. 3.5: Verwendete Bacmide**

Nr.*	Bezeichnung	Verwendung	Quelle
223	pTB4	Rekonstitution von hCMV TB40/E-Wildtypviren	Sinzger et al., 2008
241	pTB4d/IE1_1	Rekonstitution von IE1-negativen hCMV TB40/E-Virusmutanten	Zalckvar et al., 2013
242	pTB4d/IE1_2		
243	pTB4d/IE1_3		

\* laufende Nummer in der Bacmid-Datenbank der Arbeitsgruppe

## 3.2 Antikörper

### 3.2.1 Primäre Antikörper

Die in Tab. 3.6 aufgeführten Primärantikörper wurden verwendet, um durch eine Immunreaktion Proteine im Western Blot (WB) und in der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie (IF) nachzuweisen (3.7.4, 3.7.1). Dazu wurden sie im unten angegebenen Verhältnis in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (phosphate buffered saline, PBS) verdünnt. Darüber hinaus fanden sie Anwendung bei der Co-Immunpräzipitation (Co-IP) (3.7.5).

**Tab. 3.6: Verwendete Primärantikörper**

Bezeichnung/Beschreibung	Quelle	Verdünnung/Menge
MAB810R, monoklonale Antikörper aus der Maus gegen hCMV IE1/IE2	Merck Millipore, MAB810R	1:1000 (IF) 1:2000-1:3000 (WB) 5 µg (Co-IP)
1B12, monoklonale Antikörper aus der Maus gegen hCMV IE1	Zhu et al., 1995	1:10 (WB)
GST-IE1ΔN, polyklonale Antikörper aus dem Kaninchen gegen hCMV IE1	Krauss et al., 2009	1:200 (IF)
GFP-antibody, polyklonale Antikörper aus dem Kaninchen gegen EGFP	Abcam, ab290	1:2500 (IF)
PML, polyklonale Antikörper aus dem Kaninchen gegen PML	Abcam, ab72137	1:1000 (IF)
5E10, monoklonale Antikörper aus der Maus gegen PML	Stuurman et al., 1992	1:3 (IF)

STAT1 p84/p91 (E-23), polyklonale Antikörper aus dem Kaninchen gegen STAT1	Santa Cruz Biotechnology, sc-346 X	1:1000 (IF) 1:2000 (WB)
STAT1 p84/p91 (C-136), monoklonale Antikörper aus der Maus gegen STAT1	Santa Cruz Biotechnology, sc-464	1:500 (WB)
STAT1 $\alpha$ p91 (C-24), polyklonale Antikörper aus dem Kaninchen gegen die $\alpha$ -Form von STAT1	Santa Cruz Biotechnology, sc-345 X	1:2000 (WB)
Phospho-STAT1 (Tyr701), polyklonale Antikörper aus dem Kaninchen gegen an Y701 phosphoryliertes STAT1	Cell Signaling Technology, 9171S	1:1000 (WB)
Phospho-STAT1 (S727), polyklonale Antikörper aus dem Kaninchen gegen an S727 phosphoryliertes STAT1	Cell Signaling Technology, 9177S	1:1000 (WB)
GAPDH, polyklonale Antikörper aus dem Kaninchen gegen GAPDH	Abcam, ab9485	1:4000 (WB)

### 3.2.2 Sekundäre Antikörper

Alexa Fluor-konjugierte Sekundäntikörper dienen der indirekten farblichen Fluoreszenzmarkierung von zuvor durch Primäntikörper gebundenen Proteinen in der IF (3.7.1). Dazu wurden sie im angegebenen Verhältnis in PBS verdünnt (Tab. 3.7).

Meerrettichperoxidase- (horseradish peroxidase-, HRP-) konjugierte Antikörper wurden für die Detektion der gebundenen Primäntikörper im Western Blot verwendet (3.7.4). Für die Reaktion mit dem Chemilumineszenz-Substrat Super Signal West Pico wurden sie 1:10000-fach verdünnt eingesetzt, wohingegen das sensitivere Substrat Super Signal West Femto eine 1:50000-fache Verdünnung erforderte. Dazu wurde eine PBS-Lösung verwendet, die einen 3%-igen [w/v] Anteil an Magermilchpulver enthielt.

**Tab. 3.7: Verwendete Sekundäntikörper**

Beschreibung	Quelle	Verdünnung
Alexa Fluor 594-konjugierte Antikörper gegen Kaninchen-IgG aus der Ziege	Life Technologies, A11037	1:1000 (IF)
Alexa Fluor 594-konjugierte Antikörper gegen Maus-IgG aus der Ziege	Life Technologies, A11032	1:1000 (IF)
Alexa Fluor 488-konjugierte Antikörper gegen Kaninchen-IgG aus der Ziege	Life Technologies, A11008	1:1000 (IF)

Alexa Fluor 488-konjugierte Antikörper gegen Maus-IgG aus der Ziege	Life Technologies, A11001	1:1000 (IF)
HRP-konjugierte Antikörper gegen Kaninchen-IgG aus der Ziege	Merck Millipore, AP156P	1:10000 bzw. 1:50000 (WB)
HRP-konjugierte Antikörper gegen Maus-IgG aus der Ziege	Dianova, 115-036-003	1:10000 bzw. 1:50000(WB)

### 3.3 Zellen

#### 3.3.1 Bakterienstämme

Für alle Klonierungsarbeiten sowie für die Produktion von Plasmid-DNA für Transfektionen wurde der Dam-Methylase negative *E. coli*-Stamm GM169 (McGraw und Marinus, 1980) verwendet.

Das hCMV Bacmid pTB4 und die davon abgeleiteten Klone pTB4d/IE1\_1-3 (Tab. 3.5) wurden aus dem *E. coli*-Stamm GS1783 (Tischer et al., 2010) isoliert.

#### 3.3.2 Humane Zelllinien

Die primären humanen Lungenfibroblasten MRC-5 (European Collection of Cell Cultures) wurden zum einen für die Quantifizierung von Virusstocks verwendet, um die Konzentration an Lentiviren bzw. dem klinischen hCMV-Stamm TB40 und dessen IE1-Deletionsmutanten zu ermitteln (3.5.5). Darüber hinaus wurden sie zur Durchführung von vergleichenden Wachstumsstudien mit TB40 und seinen Mutanten eingesetzt (4.2.2, 4.2.3).

MRC-5-Zellen bildeten auch die Grundlage für die TetR-IE1-Zellen. Diese besitzen einen Tetrazyklin-Repressor (TetR), der im aktiven Zustand durch eine Bindung an den Tandem-Tetrazyklin-Operator (TetO) vor der Gensequenz von IE1 dessen Expression verhindert. Durch Induktion der Zellen mit Doxycyclin ändert der TetR seine Konformation und dissoziiert vom TetO ab, sodass die DNA von IE1 transkribiert werden kann. Zellen, die sowohl den TetR als auch IE1 bzw. seine verschiedenen mutierten Formen enthalten (im Folgenden als TetR-IE1-Zellen bezeichnet), wurden im Rahmen dieser Arbeit hergestellt. Daneben fanden auch TetR-Zellen Verwendung, die zwar den TetR enthalten, aber nicht mit einem cIE1-tragenden Lentivirus infiziert wurden. Diese und Zellen, die sowohl den TetR als auch ein leeres, also nicht für IE1-kodierendes Lentivirusgenom (pLKO.1puro) enthalten, wurden als Negativkontrolle verwendet. All diese Zellen bildeten die Basis für Versuche, die zur genaueren Charakterisierung der IE1-Mutanten durchgeführt wurden.

Für die Produktion von Lentiviren wurden sogenannte HEK 293T-Zellen (GenHunter Corporation, 401) verwendet, die mittels Kalziumphosphatpräzipitation mit einem lentiviralen Vektor und zwei Verpackungsplasmiden co-transfiziert wurden (3.5.4). Bei den HEK 293T-Zellen handelt es sich

um Adenovirus 5-transformierte humane embryonale Nierenzellen, die das große T-Antigen des Simian Virus 40 (SV40) exprimieren. Dadurch wird die Vermehrung von Plasmiden ermöglicht, die einen SV40-Replikationsursprung tragen. Auf diese Weise wird unter anderem die Produktion von Retroviren wie den hier eingesetzten Lentiviren gefördert (DuBridge et al., 1987).

## 3.4 Kultivierung von E. coli-Stämmen

### 3.4.1 Flüssigkulturen

Flüssigkulturen wurden zur Vermehrung von Bakterien eingesetzt. Dazu wurde ein bestimmtes Volumen an Luria-Bertani- (LB-) Medium (10 g Bacto-Hefeextrakt/l, 10 g Bacto-Trypton/l, 10 g NaCl/l in bidestilliertem Wasser = H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>) mit einer Bakterienkolonie von einer Plattenkultur oder mit einem kleinen Anteil aus einer Glycerinkultur versehen. Gleichzeitig wurde der Lösung ein an die Resistenzlage der Bakterien angepasstes Antibiotikum (20 µg Chloramphenicol/ml, AppliChem, A1806; 25 µg Kanamycin/ml, AppliChem, A1493 oder 50 µg Ampicillin/ml, AppliChem, A0839) zugesetzt, um die relevanten Klone zu selektionieren. Im Anschluss daran wurde der gesamte Ansatz unter Schütteln bei 220 Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute = rpm) auf einem Orbital Shaker der Firma Thermo Forma über Nacht je nach Verwendungszweck bei 30°C oder 37°C inkubiert. Eine Absenkung der Temperatur auf 30°C sollte die Rekombination von genetischem Material verringern und wurde hauptsächlich bei großen Ansätzen durchgeführt. Allerdings musste wegen des langsamen Wachstums die Temperatur am nächsten Morgen auf 37°C erhöht werden. Während dieser Zeit wurde in regelmäßigen Abständen die Zunahme an Bakterienzellen mit Hilfe eines Photometers (SmartSpec Plus Spectrophotometer, Bio-Rad) bestimmt. Dazu wurde die optische Dichte (OD) der Kultur bei 600 nm gegen LB-Medium gemessen (1 OD<sub>600</sub> = 5 x 10<sup>8</sup> Zellen/ml). Die Zellen wurden geerntet, bevor sie die stationäre Phase erreicht hatten.

### 3.4.2 Plattenkulturen

Zum Anlegen einer Plattenkultur wurde mit einer sterilen Impföse (VWR, 612-9354) Bakterienmaterial aus einer Glycerinkultur oder eine Einzelkolonie von einer anderen Plattenkultur entnommen und mittels 3-Ösen-Ausstrich auf eine Agarplatte (LB-Medium mit 1,5% [w/v] Bacto-Agar) ausgebracht. Um eine Selektion der gewünschten Klone zu gewährleisten, wurden Nährmedien verwendet, denen bereits Kanamycin (50 µg/ml) oder Ampicillin (100 µg/ml) zugesetzt war.

Bei Plattenkulturen im Anschluss an eine Transformation (3.6.5.4) wurden 200 µl Bakterien-suspension auf die Agarplatte aufgetragen und mit einer sterilen Glaspipette unter Drehen gleichmäßig verteilt.

Alle Kulturen wurden über Nacht bei 37°C in einem Brutschrank der Firma Heraeus inkubiert. Wenn die dort gewachsenen Einzelkolonien nicht sofort weiterverarbeitet wurden, konnten die Platten mit Parafilm verschlossen einige Tage bei 4°C gelagert werden.

### 3.4.3 Glyzerinkulturen

Um Bakterienstämme dauerhaft lagern zu können, wurden von einer Plattenkultur Einzelkolonien entnommen und in flüssiges LB-Medium, dem das entsprechende Antibiotikum zugesetzt worden war (3.4.1), überführt. Anschließend wurde die Lösung für ca. 8 h bei 37°C und 220 rpm auf einem Bakterenschüttler (Orbital Shaker, Thermo Forma) inkubiert. Durch Zentrifugation für 10 Minuten (min) bei 4°C und 3000 x g wurden die Bakterienzellen aus der Nährlösung isoliert, um sie dann in 1,5 ml Einfriermedium (LB-Medium mit 30% [v/v] Glyzerin) zu resuspendieren und in Cryotubes (Thermo Scientific, 377224) bei -80°C zu lagern.

## 3.5 Zellkulturmethoden

### 3.5.1 Kultivierung humaner Zelllinien

Für die Kultivierung der in 3.3.2 beschriebenen Zellen wurden Zellkulturschalen aus Polystyrol in verschiedenen Größen verwendet (15 cm Durchmesser, 734-0013; 10 cm Durchmesser, 734-0006; 6-Loch-Platten, 734-0019; 12-Loch-Platten, 391-0006; alle VWR). Als Nährmedium zur Anzucht diente Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; 4,5 g Glucose/L, L-Glutamin, Pyruvat; Life Technologies, 41966-029), welches mit 10% [v/v] fötalem Kälberserum (FKS; Life Technologies, 10270-106) und 1% [v/v] Penicillin/Streptomycin-Lösung (10000 U Penicillin/ml, 10 mg Streptomycin/ml; PAN Biotech, P06-07100) versetzt wurde. Als Standardvolumina wurden für 15 cm-Schalen 25 ml Nährmedium verwendet, für 10 cm-Schalen 10 ml und für 6-Loch- bzw. 12-Loch-Platten 3 bzw. 1 ml pro Vertiefung.

Alle Zellen wurden bei einer Temperatur von 37°C und einer CO<sub>2</sub>-Konzentration von 5% in wasserdampfgesättigter Atmosphäre in einem HERAcell 240 Inkubator (Heraeus) bebrütet.

Da MRC-5-, TetR- und TetR-IE1-Zellen relativ langsam wachsen, war es ausreichend, die Kulturen alle drei Tage mit frischem Medium zu versehen und einmal pro Woche auf neue Schalen zu verteilen. Dazu wurde der Zellrasen zunächst mit sterilem PBS gewaschen und anschließend mit einer Trypsin/EDTA-Lösung (0,05/0,02% [w/v] in PBS; PAN Biotech, P10-023500) bei 37°C inkubiert, um ein Ablösen der Zellen vom Schalenboden zu erreichen. Dieser Prozess wurde nach 3 min durch die Zugabe von Nährmedium unterbrochen, um eine Schädigung der Zellen zu verhindern. Im Anschluss daran wurden die Zellen durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt und die Zellsuspension im Verhältnis von 1:3 auf neue Kulturgefäße verteilt.

Um TetR-Zellen zu selektionieren, wurde das Medium mit G418 (200 µg/ml; Merck Millipore, 345810) versetzt, da diese Zellen nicht nur das TetR-, sondern auch ein Neomycin-Resistenzgen tragen. Bei den TetR-IE1-Zellen, die zusätzlich zu TetR- auch mit IE1-tragenden rekombinanten Lentiviren infiziert worden waren und daher neben dem (mutierten) IE1-Gen auch über ein Puromycin-Resistenzgen verfügen, wurde Puromycin (1 µg/ml; Sigma-Aldrich, P-8833) als weiteres Selektionsmittel eingesetzt.

Für funktionelle Analysen mussten die TetR- und die TetR-IE1-Zellen in der G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus arretiert werden. Im Zuge dessen wurden die Kulturen drei Tage nach der letzten Subkultivierung mit frischer Nährlösung versorgt und anschließend für sieben Tage in diesem Medium belassen, sodass die Zellen infolge der Kontaktinhibition aufhörten sich zu teilen. Erst dann wurde mit der Induktion der IE1-Expression begonnen. Dazu wurden die Schalen über einen Zeitraum von 72 bzw. 96 h im Abstand von je 24 h mit insgesamt 1 µg Doxycyclin/ml (Clontech Laboratories, 631311) versetzt, bevor die Zellen geerntet wurden.

Im Gegensatz zu den primären MRC-5-Zellen und ihren Derivaten teilen sich die transformierten HEK 293T-Zellen sehr schnell. Aus diesem Grund wurden sie jeden zweiten Tag mit frischem Medium versorgt und alle drei Tage im Verhältnis 1:10 auf neue Schalen verteilt. Darüber hinaus haften diese Zellen schlecht am Boden von Kulturgefäßen und lösen sich leicht ab. Dieser Prozess konnte durch die Verwendung von Kollagen-beschichteten Schalen verhindert werden. Dazu wurde ein Gemisch aus H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> und Essigsäure (0,02 N; Sigma Aldrich, 33209) mit Hilfe eines 0,2 µm Vakuum-Filters (Fast PES Filter Unit; VWR, 514-0025) steril filtriert und anschließend mit Rattenschwanz-Kollagen I (50 µg/ml; Corning, 354236) versetzt. Diese Lösung wurde auf normale Zellkulturschalen aufgebracht (0,085 ml/cm<sup>2</sup>) und für ca. 3 h bei Raumtemperatur (RT) unter leichtem Schwenken dort belassen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Kollagenlösung abgesaugt und die Schalen zweimal mit sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> und einmal mit PBS gewaschen. Direkt im Anschluss daran konnten die Zellen in die beschichteten Kulturgefäße gegeben werden.

### 3.5.2 Bestimmung der Zellzahl

Um für die Produktion von Lentiviren eine vergleichbare Anzahl an HEK 293T-Zellen aussäen zu können, war es notwendig, deren Zahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer zu ermitteln. Dazu wurde eine Suspension bereits abtrypsinerter Zellen (3.5.1) in einem geeigneten Verhältnis mit DMEM verdünnt. Davon wurden je 15 µl in zwei gegenüberliegende Seiten der Zählkammer pipettiert. Insgesamt wurden Zellen in acht Großquadraten unter dem inversen Lichtmikroskop ausgezählt und daraus der Mittelwert gebildet. Danach erfolgte die Berechnung der Zellzahl pro ml durch Multiplikation der durchschnittlichen Zellzahl im Großquadrat mit dem Faktor 10<sup>4</sup> (Volumen in einem Großquadrat: 0,1 mm<sup>3</sup> = 0,1 µl) und dem Verdünnungsfaktor.



### 3.5.3 Produktion von hCMV TB40/E Virusstocks

Die Elektroporation bietet die Möglichkeit, auch sehr große DNA-Moleküle effizient in humane Zellen einzuschleusen. Sie wurde im Rahmen dieser Arbeit für die Transfektion von TetR- bzw. TetR-IE1-Zellen mit hCMV-Bacmiden (3.1.3) verwendet, um daraus rekombinante TB40/E(*d//IE1*)-Viren zu generieren. Beide Zelltypen wurden 24 h vor Versuchsbeginn mit Doxycyclin (1 µg/ml; Clontech Laboratories, 631311) behandelt, um die IE1-Expression in den TetR-IE1-Zellen anzuschalten. Das in trans bereitgestellte Protein sollte das Fehlen von IE1 bei den TB40/*Ed//IE1*-Mutanten kompensieren und so ein wildtypähnliches Viruswachstum ermöglichen. Die IE1-negativen TetR-Kontrollzellen wurden hingegen mit dem pTB4-Wildtyp-Bacmid transfiziert, das dieses Protein noch selbst kodiert und deswegen kein von außen zugeführtes IE1 benötigt.

Für die Transfektion jedes Bacmids wurden die Zellen einer konfluent bewachsenen 15 cm-Schale ( $1,5 \times 10^7$  Zellen) verwendet. Nach Ablösen der Fibroblasten vom Schalenboden durch Behandlung mit einer Trypsin/EDTA-Lösung (3.5.1) wurden die Zellen sedimentiert (8 min, 25°C, 300 x g) und in 250 µl Vollmedium (RT) resuspendiert. Dazu wurden 40 µl steriles H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> mit 3 µg Bacmid-DNA und 1 µg pCGN-pp71 (Tab. 3.4) gegeben. Das Plasmid pCGN-pp71 kodiert für das hCMV-Tegumentprotein pp71 (U<sub>L</sub>82), welches die Infektiosität transfizierter hCMV-Bacmide erhöht (Baldick et al., 1997). Der Transfektionsansatz wurde in eine 4 mm Küvette (Gene Pulser Cuvette; Bio-Rad, 165-2088) überführt und bei einer Spannung von 260 Volt (V) und einer elektrischen Kapazität von 1050 Mikrofarad (µF) in einem Gene Pulser Xcell Eucaryotic System (Bio-Rad, 165-2661) elektroporiert. Durch dieses Verfahren werden Zellmembranen transient durchlässig gemacht, sodass die DNA-Moleküle eindringen können. Nach dem Auslösen des Pulses wurde jeder Küvette sofort 1 ml Medium zugesetzt, um die Zellsuspension abzukühlen und übermäßigen Zelltod durch Hitze einwirkung zu vermeiden. Anschließend wurden die transfizierten TetR- und TetR-IE1-Zellen in eine 10 cm-Schale überführt und in Anwesenheit von Doxycyclin (1 µg/ml) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt weiter kultiviert.

Nach etwa 16 h wurde das Medium komplett abgesaugt und durch frisches, Doxycyclin- (1 µg/ml) haltiges DMEM ersetzt, um abgestorbene Zellen zu entfernen. Dieser Vorgang wurde alle 48 h wiederholt. Nach einer Woche zeigten sich erste Plaques im Zellrasen als Zeichen einer erfolgreichen Virusproduktion, die im Laufe der Zeit immer zahlreicher und größer wurden.

Zehn Tage nach Transfektion wurden die Zellen in ein größeres Gefäß überführt. Dazu wurde der Überstand aus den Kulturgefäßen abgenommen und bei RT steril zwischengelagert, um die darin bereits enthaltenen Viren nicht zu verlieren. Nach dem Ablösen der Zellen vom Schalenboden mit Hilfe einer Trypsin/EDTA-Lösung (3.5.1) wurde die aufbewahrte Viussuspension wieder zu den Zellen gegeben. Anschließend wurde der gesamte Ansatz auf 15 cm-Schalen überführt, mit Doxycyclin- (1 µg/ml) haltigem Vollmedium auf ein finales Volumen von 25 ml aufgefüllt und unter Standard-

bedingungen kultiviert. Nach drei Tagen wurden die Zellen im Verhältnis 1:3 auf neue 15 cm-Kulturgefäße verteilt (3.5.1) und für zwei Tage in Anwesenheit von Doxycyclin (1 µg/ml) bebrütet, ehe erneut das Medium gewechselt wurde. Nach weiteren zwei Tagen konnten die Virusstocks dann geerntet werden.

Dazu wurde zunächst der Großteil des Kulturüberstandes aus den Schalen entfernt und in 50 ml-Röhrchen (Greiner Bio-One, 227261) auf Eis aufbewahrt. Die Zellen, in denen sich noch etwa 70% der Viren befanden, wurden mit einem Zellschaber (Fisher Scientific, 10508292) vorsichtig vom Plattenboden abgekratzt und in ein separates 50 ml-Röhrchen überführt. Anschließend wurden sie in flüssigem Stickstoff schockgefroren, bei 37°C im Wasserbad wieder aufgetaut und in einem dritten Schritt in der Bechersonde eines Branson Sonifier 450 beschallt (0,8 s Schall; Energie 8; 10 Pulse). Diese drei Schritte wurden in gleicher Reihenfolge noch zweimal wiederholt mit dem Ziel, die Zellen aufzuschließen und dadurch die Freisetzung der darin enthaltenen Viren zu erreichen. Im Anschluss daran wurden die Zellsuspension und der zuvor abgenommene Überstand vereint und für 10 min bei 4°C und 2500 x g zentrifugiert, um die Zelltrümmer abzutrennen. Der virushaltige Überstand wurde in 1,8 ml-Portionen aliquotiert und bei -80°C gelagert.

#### **3.5.4 Produktion rekombinanter Lentiviren**

Zur Herstellung rekombinanter Lentiviren wurden  $1,325 \times 10^7$  HEK 293T-Zellen auf Kollagenbeschichtete 15 cm-Schalen ausgesät und unter Standardbedingungen für 24 h kultiviert (3.5.1), bevor nach einem Wechsel des Nährmediums die Transfektion der Zellen mittels Kalziumphosphat-Präzipitation durchgeführt wurde. Diese Methode beruht darauf, dass sich beim Mischen einer Kalziumchlorid-haltigen DNA-Lösung mit einem Phosphatpuffer ein feines Präzipitat aus Kalziumphosphat und DNA bildet, das über Endozytose in die Zellen aufgenommen wird (Graham und van der Eb, 1973).

Pro 15 cm-Schale wurden 25 µg desjenigen lentiviralen pLKO-Plasmids (Tab. 3.4) eingesetzt, das die genetische Information trägt, die ins Genom der Fibroblasten integriert werden soll. Dazu wurden zwei weitere Plasmide gegeben: 6,25 µg des Hüllplasmids pMD2.G und 18,75 µg des Verpackungsplasmids psPAX2. Das Plasmid pMD2.G (Tab. 3.4) kodiert unter anderem für das Glykoprotein G des Vesikulären Stomatitis-Virus, welches einen wesentlichen Beitrag zur Ausbildung einer stabilen Bindung zwischen Viren und Zelloberfläche leistet und einen breiten Zelltropismus vermittelt. Das zweite Plasmid psPAX2 (Tab. 3.4) beinhaltet die HIV-1-Gene gag, pol, tat und rev. Gag steht für gruppenspezifisches Antigen und umfasst Regionen, die für die Matrix-, Kapsid- und Nukleokapsidproteine der Lentiviren kodieren. Pol dagegen enthält die Informationen für die viralen Enzyme Protease, Reverse Transkriptase und Integrase, die für das Umschreiben der Virus-RNA in Doppelstrang-DNA und die Integration des viralen Genoms in das Erbgut der Wirtszelle nötig sind.

Tat (trans-activator of transcription) und rev (regulator of expression of virion proteins) kodieren für virale Regulatorproteine, die für eine effektive Transkription der viralen RNA sowie für deren Export aus dem Zellkern ins Zytoplasma gebraucht werden.

Nach Verdünnung der Plasmide in sterilem  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  wurde 250 mM Kalziumchlorid (Sigma Aldrich, C7902) zugegeben, sodass ein Gesamtvolumen von 1,25 ml pro Schale erreicht wurde. In einem weiteren Reaktionsgefäß wurden 1,25 ml 2x HeBS (HEPES-buffered saline; 50 mM HEPES; 280 mM NaCl; 1,5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; pH 7,05) vorbereitet, in das anschließend unter sanftem Vortexen die erstellte Lösung aus Plasmiden und Kalziumchlorid getropft wurde, damit Plasmide und DNA während einer 15-minütigen Inkubation bei RT miteinander präzipitieren konnten. Fünf Minuten vor dem Ablauf der Inkubationszeit wurde Chloroquin (25  $\mu\text{M}$ ; Sigma Aldrich, C6628) ins Kulturmedium der zu transfizierenden HEK 293T-Zellen pipettiert, um lysosomale DNasen zu hemmen und dadurch einen Abbau der aufgenommenen Plasmide zu verhindern. Der fertige Transfektionsansatz wurde nun tropfenweise gleichmäßig über die Zellen verteilt. Nach kurzem Schwenken wurden die Kulturschalen über Nacht für ca. 16 h bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert.

Am nächsten Morgen wurden die Zellen mit frischem Nährmedium versorgt, dem Natrium-Butyrat (1 mM; Merck Millipore, 19-137) zugesetzt worden war, das durch eine Hemmung von Histone-Deacetylasen die Transkription der transfizierten DNA stimuliert und so die Synthese lentiviraler Partikel fördert. Nach einer Inkubationszeit von 8 h wurde dieses Medium entfernt und nach einmaligem Waschen mit PBS durch 18 ml neues DMEM ersetzt, bevor die Zellen für ca. 20 h unter Standardbedingungen weiter kultiviert wurden. Im Anschluss daran fand die Ernte der ersten Charge Virusstock statt. Dazu wurde das virushaltige Medium aus den Kulturschalen entfernt und durch 18 ml frisches DMEM ersetzt. Der abgenommene Kulturüberstand wurde in ein 50 ml-Polystyrolröhrchen (Greiner Bio-One, 227261) überführt, für 10 min bei 4°C und 2500 x g zentrifugiert und durch Filtration durch einen 0,45  $\mu\text{m}$  Vakuumfilter (VWR, 514-0603) von Zellrückständen befreit. Über Nacht wurde er steril bei 4°C gelagert, bis am nächsten Tag der Kulturüberstand der transfizierten HEK 293T-Zellen ein zweites Mal nach dem gleichen Vorgehen geerntet, mit dem ersten vereinigt und in Ultrazentrifugenröhrchen (NeoLab, C-1104) überführt werden konnte. Durch Ultrazentrifugation (Optima L-90K Ultrazentrifuge, Rotor SW 32 Ti, Beckman Coulter) für 2 h bei 16°C und 19500 rpm wurde eine Sedimentation der Viren erreicht, sodass nach Abgießen des Überstandes das Viruspellet übrig blieb. Dieses wurde im letzten Tropfen Medium belassen, sodass es unter sterilen Bedingungen 4,5 h bei 4°C quellen konnte. Um die Viren zu vereinzeln, wurden sie danach in der Bechersonde des Branson Sonifier 450 beschallt (0,8 s Schall; Energie 8; 10 Pulse). Abschließend wurde das Pellet durch 20-maliges sanftes auf- und abpipettieren resuspendiert, in ein 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß (Greiner Bio-One, 616201) überführt und nochmals für 5 s bei RT und 16100 x g

zentrifugiert, um Zelltrümmer und Virusaggregate zu entfernen. Der Überstand wurde in 50 µl-Portionen aliquotiert und bei -80°C gelagert.

### 3.5.5 Charakterisierung von Virusstocks

Für die Durchführung weiterer Versuche wurde zunächst die Konzentration an Viren in den produzierten Virusstocks ermittelt.

Zur Quantifizierung der Lentiviren wurden MRC-5-Zellen in 6-Loch-Platten in drei biologischen Replikaten mit den produzierten Viren infiziert. Ein 50 µl-Aliquot der zu charakterisierenden Viruspräparation wurde dazu rasch bei 37°C im Wasserbad aufgetaut, kurz zentrifugiert und in der Bechersonde des Branson Sonifier 450 beschallt (0,8 s Schall; Energie 8; 10 Pulse), um die Viruspartikel zu vereinzeln. Um auf ein Infektionsvolumen von 800 µl pro Vertiefung zu kommen, wurde die Virussuspension mit DMEM auf ein finales Volumen von 2,5 ml gebracht. Durch den Zusatz von Polybren (8 µg/ml; Sigma-Aldrich, H-9268) wurde eine Neutralisierung von Ladungen erreicht, die die Abstoßung von Virus- und Zellmembran vermindern und so eine bessere Infektion gewährleisten sollte. Auf ähnliche Weise wurde auch der Gehalt an infektiösen Viren in den hCMV-Stocks bestimmt. Allerdings wurden die Virusstocks hier vor der Infektion 1:10 mit DMEM verdünnt. Zudem wurde auf die Anwendung von Polybren verzichtet.

Die infizierten Zellen wurden für 2 (hCMV-Virusstocks) bzw. 16 h (Lentivirusstocks) unter Standardbedingungen kultiviert, bevor der Kulturüberstand abgenommen und der Zellrasen einmalig mit PBS gewaschen und mit frischem DMEM versehen wurde. Bei den hCMV-infizierten MRC-5-Zellen wurde dem Inokulum das Virostatikum Ganciclovir (150 µM; Merck Millipore, 345700) zugesetzt, um eine Replikation der viralen DNA zu verhindern und selektiv die eingebrachte Menge an hCMV-DNA bestimmen zu können. Aus demselben Grund wurden diese Zellen bereits 24 h nach Infektion geerntet, wohingegen Zellen, die mit Lentiviren infiziert worden waren, weitere drei Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert wurden.

In beiden Fällen wurden die Zellen nach Ablauf der Inkubationszeit nach dem in Kapitel 3.6.7 beschriebenen Protokoll geerntet, um nach Isolierung der Gesamt-DNA (3.6.7) eine Analyse der intrazellulär vorliegenden viralen DNA mittels quantitativer PCR (qPCR) durchführen zu können (3.6.8).

### 3.5.6 Herstellung stabiler Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten TetR- und TetR-IE1-Zellen entstanden durch eine Infektion von MRC-5-Zellen mit rekombinanten Lentiviren. Für die Herstellung der TetR-Zellen wurde während der Produktion der Lentiviren (3.5.4) der erste Kulturüberstand abgenommen, durch Zentrifugation und sterile Filtration von Zelltrümmern gereinigt und 13,25 ml davon zusammen mit Polybren (8 µg/ml; Sigma-Aldrich, H-9268) auf eine 15 cm-Schale mit MRC-5-Zellen gegeben. Nach vierstündiger Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurde die Infektionslösung abgenommen und der Zellrasen mit PBS gewaschen, bevor frisches DMEM zugegeben wurde. Nach weiteren 24 h wurde der gesamte Prozess wiederholt. Zwei Tage später wurden die Zellen im Verhältnis 1:3 auf frische Kulturgefäße verteilt. Durch Zugabe von G418 (200 µg/ml; Merck Millipore, 345810) konnten diejenigen Zellen selektiert werden, die das TetR-tragende Lentivirusgenom aufgenommen hatten. Die weitere Kultivierung dieser Zellen erfolgte ebenfalls in DMEM, dem G418 in der angegebenen Konzentration zugesetzt worden war. Nach einem Austausch des Mediums drei Tage später wurden die Zellen nach weiteren zwei Tagen auf zwei 10 cm-Schalen verteilt und nach 48 h nochmals mit TetR-haltigen Lentiviren infiziert, um eine möglichst hohe und gleichmäßige Expression des TetR-Gens zu erreichen. Bei dieser zweiten Infektion wurden Lentiviren verwendet, die zuvor durch Ultrazentrifugation konzentriert worden waren (3.5.4). Dazu wurden 800 µl Virusstock in 5,6 ml DMEM verdünnt und davon 3 ml pro 10 cm-Schale unter Zugabe von Polybren (8 µg/ml) eingesetzt. Die Zellen wurden für 16 h unter Standardbedingungen kultiviert, bevor das Medium abgenommen, der Zellrasen mit PBS gewaschen und anschließend mit frischem Vollmedium versorgt wurde. Nach weiteren sechs Passagen wurden die produzierten TetR-Zellen in einem dritten Schritt wiederum unter Zugabe von Polybren (8 µg/ml) mit einem Lentivirus infiziert, welches das IE1-Gen bzw. seine mutierten Formen unter der Kontrolle von TetO-Sequenzen enthielt (3.5.4). Dabei wurde der 50-fach aufkonzentrierte IE1-Wildtypstock 1:75 in DMEM verdünnt und alle anderen Viruspräparationen so, dass die Menge an eingesetzten infektiösen Viren für alle Stocks identisch war. Die Infektion erfolgte in einem finalen Volumen von 3 ml pro 10 cm-Schale. Nach einer Inkubationszeit von 4 h unter Standardbedingungen wurde der Kulturüberstand abgenommen und die Zellen nach einmaligem Waschen mit PBS mit frischem DMEM versorgt und weiterhin unter Zusatz von G418 (200 µg/ml) kultiviert. Im Verlauf wurden sie nach drei Passagen in 10 cm-Kulturgefäßen auf 15 cm-Schalen überführt. Ab diesem Zeitpunkt wurde das DMEM nicht nur mit G418 (200 µg/ml), sondern auch mit Puromycin (1 µg/ml; Sigma-Aldrich, P-8833) versetzt, um eine Selektion derjenigen Zellen zu erreichen, die erfolgreich mit den IE1-tragenden Lentiviren infiziert worden waren (3.5.1). Nach einer erneuten Aufteilung der TetR-IE1-Zellen im Verhältnis 1:3 konnten sie für weitere Experimente ausgesät werden.

### 3.5.7 Wachstumsanalysen von hCMV TB40/E(d/IE1)

Zur Ermittlung der Bedeutung des IE1-Proteins für die *in vitro* Replikation eines klinischen hCMV-Stammes wurden mit TB40/E und einer IE1-defizienten Mutante (TB40/Ed/IE1) Wachstumsstudien durchgeführt. Dazu wurden MRC-5-Zellen in 6-Loch-Platten ausgesät und in konfluentem Zustand in biologischen Triplikaten mit TB40/E-Wildtyp und drei unabhängig voneinander generierten Klonen der IE1-Deletionsmutante TB40/Ed/IE1 infiziert (800 µl finales Infektionsvolumen pro Vertiefung). Bei Experimenten, in denen das Wachstumsverhalten bei Vorliegen eines hohen Virus-Zellverhältnisses untersucht werden sollte, wurde die Viruspräparation mit dem niedrigsten Titer unverdünnt eingesetzt und alle anderen auf der Grundlage der qPCR-Ergebnisse (3.5.5, 3.6.7, 3.6.8) daran angeglichen. Nach einer Inkubationszeit von 16 h wurde das Inokulum entfernt und nach dem Waschen mit PBS frische Nährlösung auf die Zellen aufgebracht. Im weiteren Verlauf wurde über zehn Tage alle 48 h 1 ml Überstand pro Vertiefung abgenommen, in der Bechersonde des Branson Sonifier 450 beschallt (0,8 s Schall; Energie 8; 10 Pulse) und für 10 min bei 4°C und 4000 x g zentrifugiert. Davon wurden 200 µl Überstand abgenommen und bei -20°C zwischengelagert, bevor daraus Virus-DNA extrahiert und über qPCR quantifiziert werden konnte (3.6.7, 3.6.8). Das entfernte Kulturvolumen wurde sofort durch die gleiche Menge an frischem DMEM ersetzt. Auf die gleiche Weise wurden Wachstumsstudien mit niedrigem Virus-Zellverhältnis durchgeführt. Hierzu wurden die Virusstocks allerdings um den Faktor 1:50 stärker verdünnt. Die Abnahme von je 1 ml Überstand erfolgte im Abstand von 72 h über 21 Tage. Zusätzlich zu normalen MRC-5-Zellen wurden unter gleichen Versuchsbedingungen Doxycyclin- (1 µg/ml; Clontech Laboratories, 631311) behandelte TetR-IE1-Zellen mitgeführt, um zu untersuchen, ob sich der Wachstumsdefekt der IE1-Deletionsmutanten durch *in trans* bereitgestelltes IE1-Protein komplementieren lässt. Als Ausgangswert (0-h-Wert) wurde bei allen Ansätzen die relative Menge an viraler DNA in den eingesetzten Virusverdünnungen ermittelt (3.6.7, 3.6.8).

Zur Analyse des Wachstumsverhaltens in Anwesenheit von IFN- $\alpha$  (R & D Systems, 11200-2) bzw. IFN- $\gamma$  (R & D Systems, 285-IF-100) wurde für TB40/E und eine seiner Mutanten je eine 12-Loch-Platte mit dicht gewachsenen MRC-5-Zellen 24 h vor Infektion mit IFN- $\alpha/\gamma$  behandelt. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe mit unterschiedlichen IFN-Konzentrationen (1000  $\rightarrow$  100  $\rightarrow$  10  $\rightarrow$  1  $\rightarrow$  0,1 U/ml) für je zwei biologische Replikate erstellt. Die letzten beiden Ansätze enthielten kein IFN und dienten als Negativkontrolle. Die Infektion mit TB40/E bzw. TB40/Ed/IE erfolgte in einem finalen Volumen von 350 µl pro Vertiefung nach oben beschriebenem Vorgehen. Dabei wurde das Wildtypvirus unverdünnt eingesetzt und die Mutante auf der Grundlage der durchgeführten Virusquantifizierung (3.5.5, 3.6.7, 3.6.8) entsprechend verdünnt. Im weiteren Verlauf wurde über 8 Tage im Abstand von 24 h das Medium zur Hälfte ausgetauscht und durch frisches IFN-haltiges DMEM ersetzt. Die dabei abgenommenen Überstände wurden danach wie oben beschrieben weiterverarbeitet.

## 3.6 Nukleinsäuremethoden

### 3.6.1 Konzentrationsbestimmung und qualitative Analyse von Nukleinsäuren

Um Nukleinsäuren bezüglich ihrer Konzentration und Reinheit genauer analysieren zu können, wurden 2 µl der DNA- oder RNA-Lösung an einem Nanodrop-Spektrophotometer (Peqlab, ND-1000) gegen das Lösungsmittel vermessen. Dazu wurde die Absorption in einem Wellenlängenbereich von 230 bis 350 nm erfasst. Eine OD von 1 entspricht dabei einer DNA-Konzentration von 50 ng/µl bzw. einer RNA-Konzentration von 40 ng/µl. Nukleinsäuren zeigen im Bereich von 260 nm ein Absorptionsmaximum. Proteine dagegen weisen dieses bei 280 nm auf. Diesen Sachverhalt macht man sich bei der Bestimmung der Reinheit der Nukleinsäurelösungen zu Nutze, indem man den Quotienten aus  $OD_{260nm}$  und  $OD_{280nm}$  berechnet. Bei Werten zwischen 1,8 und 2,0 ist von einer reinen Lösung auszugehen, wohingegen eine Abweichung nach unten auf eine Kontamination durch Proteine hindeutet.

### 3.6.2 Agarosegelelektrophorese

Das Verfahren der Agarosegelelektrophorese kam zur quantitativen und qualitativen Beurteilung von DNA im Anschluss an PCR-Verfahren sowie als Kontrolle nach analytischem oder präparativem Verdau mittels Restriktionsendonukleasen zum Einsatz.

Dazu wurde Agarose (Biozym LE Agarose, 840004) in einer Konzentration von 0,7 bis 3% [w/v] mit 1x TAE-Puffer (40 mM Tris; 20 mM Essigsäure; 1 mM EDTA) aufgekocht, die Lösung kurz abgekühlt und zur UV-Detektion der DNA mit Ethidiumbromid (EtBr; 2,5 µg/ml; Fluka, 46047) versehen. Die noch warme Agarose-Lösung wurde je nach Verwendungszweck in kleine oder größere Gelkammern (Hoefer HE33 mini horizontal submarine unit oder HE99X submarine electrophoresis unit, Amersham Biosciences) eingefüllt und nach dem Erkalten vollständig mit EtBr- (2,5 µg/ml) haltigem 1x TAE-Puffer bedeckt. Für große DNA-Fragmente wurde eine niedrige Konzentration an Agarose gewählt, für kleinere Teilstücke eine entsprechend höhere.

Je nach Volumen der aufzutragenden Proben wurde die DNA mit 6x (0,25% [w/v] Orange G; 40% [w/v] Saccharose in 6x TAE-Puffer) oder 10x Probenpuffer (0,42% [w/v] Orange G; 67% [w/v] Saccharose in 10x TAE-Puffer) vermischt und anschließend in die Geltaschen gefüllt. Daneben wurde zur Größenbestimmung der Fragmente ein DNA-Längenstandard (50 µg/ml; 100 bp oder 1 kb DNA Ladder, New England Biolabs, N3231S oder N3232S) aufgetragen.

Zur Auftrennung der DNA nach ihrer Größe wurde an kleine analytische Gele für 1 h eine Spannung von 80 bis 120 V angelegt. Präparative Plasmid- sowie analytische Bacmid-Verdaue wurden in großen Gelen ca. 16 h bei 30 V aufgetrennt. Anschließend wurde die DNA durch Bestrahlung mit UV-Licht (Gel Doc 2000 Gel Documentation System, Bio-Rad) sichtbar gemacht und die Gele fotografiert.

### 3.6.3 PCR

Durch PCR ist eine Amplifizierung definierter DNA-Abschnitte möglich. Sie wurde zur Vervielfältigung von mutierten IE1-Sequenzen eingesetzt. Dabei dienten die Plasmide aus Tab. 3.4 als Matrizen-DNA. Zur Durchführung wurde auf Eis ein 50 µl-Ansatz aus 50 ng Plasmid-DNA, 10 µl 5x Phusion-HF-Puffer (New England Biolabs, F-540S), 1 µl dNTP-Mix (Endkonzentration jeweils 0,2 mM; New England Biolabs, N0447S), je 2,5 µl der beiden Oligonukleotide (Endkonzentration 0,5 µM), die die entsprechenden Enzymschnittstellen für die Klonierung enthielten (3.1.1), und H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> pipettiert. Unmittelbar vor dem Start der Reaktion wurden 0,5 µl DNA-Polymerase (Phusion Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase, New England Biolabs, M0530 S) hinzugefügt. Für die Amplifizierung der IE1-Sequenz, die für die Punktmutationen M483A/R486A/S487A kodiert, wurde der Phusion-HF-Puffer durch 10 µl 5x Phusion-GC-Puffer ersetzt. Zusätzlich wurden dem Ansatz 1,5 µl Dimethylsulfoxid (beides Phusion Hot Start, New England Biolabs, M0530 S) hinzugefügt. Anschließend wurde der gesamte Ansatz in einem Thermocycler (iCycler, Bio-Rad) nach folgendem Protokoll inkubiert:

1 Zyklus	98°C für 30 s	initiale Denaturierung
35 Zyklen*	98°C für 10 s	Aufschmelzen des Doppelstranges
	62°C für 20 s	Hybridisierung der Oligonukleotide
	72°C für 23 s	DNA-Polymerisation
1 Zyklus	72°C für 10 min	Auffüllen unvollständiger 3'-Enden der PCR-Produkte

\* 40 Zyklen bei IE1M483A/R486A/S487A

Die Dauer der Einzelreaktionen sowie die dabei herrschenden Temperaturen richteten sich nach den Eigenschaften der verwendeten Oligonukleotide und der DNA-Polymerase.

Um nach einer PCR-Reaktion die Größe und die Konzentration der amplifizierten DNA-Fragmente abschätzen zu können, wurden 5 µl des PCR-Ansatzes auf ein 1%-iges [w/v] EtBr-Agarosegel aufgetragen und analysiert (3.6.2).

Da sich im Anschluss an eine PCR noch Reste der verwendeten Reagenzien wie DNA-Polymerase, dNTPs, Puffer und Oligonukleotide in der DNA-Lösung befinden, wurde das PCR-Produkt mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, 28104) nach Herstellerangaben gereinigt.



### 3.6.4 Generierung von IE1 $\Delta$ AD2-AD3 über Fusions-PCR

Um die IE1-Mutante IE1 $\Delta$ AD2-AD3 herstellen zu können, musste der entsprechende Abschnitt (AS 421-475) in der IE1-Wildtyp-Sequenz deletiert werden. Dazu nutzte man das Verfahren der Fusions-PCR (Ho et al., 1989) (Abb. 3.1). Dabei wurden in zwei unabhängigen PCR-Ansätzen (3.6.3) das größere DNA-Stück vor der Deletionsstelle (AS 1-420) und das kleine Stück danach, das lediglich die CTD-kodierende Sequenz von IE1 (AS 476-491) umfasst, amplifiziert. Als Matrize diente dabei das Plasmid pEGFP-IE1 (Tab. 3.4). Für die Synthese des größeren Teilbereichs wurde am 5'-Ende das Starteroligonukleotid Nr. 483 eingesetzt, das zusätzlich eine Schnittstelle für das Enzym HindIII enthält. Am 3'-Ende kam das Oligonukleotid Nr. 699 zum Einsatz, das eine Überhangsequenz zum kleineren Teilstück beinhaltet. Das Starteroligonukleotid der CTD am 5'-Ende (Nr. 700) verfügt ebenso über eine Komplementärsequenz. Auch hier wurde über Oligonukleotid Nr. 694 am 3'-Ende eine Schnittstelle für eine Restriktionsendonuklease, in diesem Fall EcoRI, eingefügt (Oligonukleotide siehe 3.1.1).

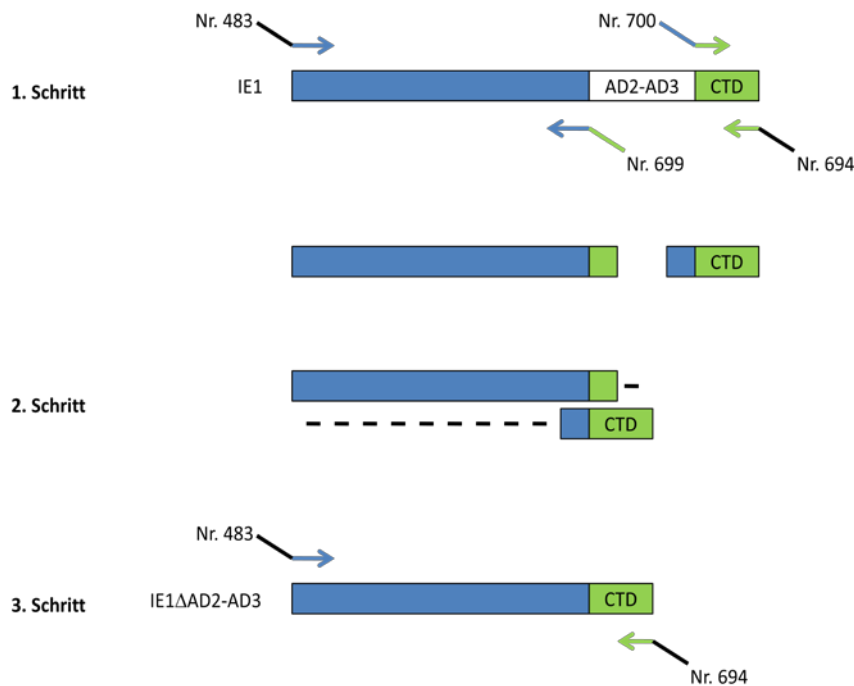
Die erhaltenen PCR-Produkte wurden auf ein 1 bzw. 3%-iges [w/v] EtBr-Agarosegel (3.6.2) aufgetragen. Die Reinigung der beiden DNA-Fragmente erfolgte im Anschluss daran durch Extraktion aus den ausgeschnittenen Gel-Blöckchen (3.6.5.2). Um bei der Aufreinigung der CTD-kodierenden Sequenz der geringen Größe des DNA-Fragments gerecht zu werden, wurde jeweils die doppelte Menge an QG-Puffer und Isopropanol (Sigma-Aldrich, 59304) verwendet. Die übrigen Schritte erfolgten nach Protokoll des Herstellers (QIAquick Gel Extraction Kit 50, Qiagen, 28704). In einer dritten PCR-Reaktion wurden die beiden erhaltenen DNA-Fragmente schließlich miteinander fusioniert. Dazu wurden sie in äquimolaren Mengen (1 ng des größeren und 38 pg des kleineren Fragments) in einen 45  $\mu$ l Ansatz aus 10  $\mu$ l 5x Phusion-HF-Puffer (New England Biolabs, F-540S), 1  $\mu$ l dNTP-Lösung (10 mM; New England Biolabs, N0447S) und 0,5  $\mu$ l DNA-Polymerase (Phusion Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase, New England Biolabs, M0530 S) eingesetzt und nach folgendem Protokoll inkubiert:

1 Zyklus	98°C für 30 s	initiale Denaturierung
15 Zyklen	$\left\{ \begin{array}{l} 98^\circ\text{C für 10 s} \\ 62^\circ\text{C für 20 s} \\ 72^\circ\text{C für 23 s} \end{array} \right.$	Aufschmelzen der Doppelstränge
		Hybridisierung der DNA-Teilfragmente
		DNA-Polymerisation
1 Zyklus	72°C für 10 min	Auffüllen unvollständiger 3'-Enden der PCR-Produkte

Währenddessen lagerten sich die Überhänge der beiden Fragmente aneinander. Die noch fehlenden Teile des jeweils komplementären DNA-Einzelstranges wurden über die DNA-Polymerase unter Verwendung freier dNTPs aufgefüllt, sodass am Ende ein Doppelstrang des gewünschten Produkts entstand. Im letzten Schritt wurde die DNA unter Zugabe der beiden äußeren Oligonukleotide Nr. 483

und 694 nach dem PCR-Protokoll aus 3.6.3 amplifiziert, um die Produkt-Menge zu erhöhen. Allerdings wurden hierbei nicht 35, sondern 30 Zyklen aus Aufschmelzen des Doppelstranges, Hybridisierung der Oligonukleotide und DNA-Polymerisation durchlaufen.

Nach Restriktionsverdau mit HindIII und EcoRI (3.6.5.1) konnte die mutierte IE1-Sequenz über Ligation (3.6.5.3) in den Zielvektor pCMV.TetO.cIE1 (Tab. 3.4) eingebracht und für weitere Klonierungen genutzt werden.



**Abb. 3.1: Schematische Darstellung des Vorgehens bei der Fusions-PCR**

In einem ersten Schritt wurden der größere Abschnitt von IE1 vor der Deletionsstelle (AS 1-420, blau dargestellt) und die CTD (AS 476-491, grün dargestellt) getrennt voneinander amplifiziert. Dazu wurden in den äußeren Bereichen Oligonukleotide verwendet, die Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen enthalten (schwarz dargestellt). In den inneren Bereichen kamen Oligonukleotide zum Einsatz, die über eine Überhangsequenz zum Teilbereich jenseits der Deletion verfügen (blau bzw. grün dargestellt). Die Nummern entsprechen dabei den laufenden Nummern der Oligonukleotide in der laboreigenen Datenbank (siehe Tab. 3.1). Als Ergebnis des ersten Schrittes entstanden DNA-Sequenzen mit einer Überhangsequenz zum benachbarten Teilstück. Im Rahmen des zweiten Schrittes lagerten sich beide DNA-Stränge im Bereich der Überhangsequenz aneinander an. Die fehlenden Nukleotide des komplementären Doppelstranges wurden dabei unter Verwendung freier dNTPs von der DNA-Polymerase aufgefüllt (gestrichelte schwarze Linie), sodass am Ende die gewünschte DNA-Sequenz der Mutante IE1ΔAD2-AD3 entstand, die in einem dritten Schritt über PCR nochmals amplifiziert wurde.

### 3.6.5 Klonierung

#### 3.6.5.1 DNA-Verdau mittels Restriktionsendonukleasen

Alle Enzyme, die im Rahmen dieser Arbeit für den analytischen oder präparativen Verdau von Plasmid-DNA oder PCR-Produkten benutzt wurden, wurden von der Firma New England Biolabs bezogen und nach Angaben des Herstellers im geeigneten Puffer und gegebenenfalls unter Zusatz von Rinderserumalbumin eingesetzt. Für analytische Zwecke wurden bei Plasmid-Präparationen 500 ng DNA eingesetzt, die im Rahmen eines Doppelverdau zusammen mit je 1 µl der entsprechenden Enzyme für 2 h bei 37°C inkubiert und anschließend auf ein 1%-iges [w/v] EtBr-Agarosegel aufgetragen wurden (3.6.2). Bei einem Einfachverdau wurde 1 µl Enzymlösung verwendet. Bei analytischen Bacmid-Verdauen wurde hingegen eine DNA-Menge von 1 µg eingesetzt und mit 2 µl Enzymlösung verdaut (Einfachverdau).

Zum präparativen Verdau eines Plasmid-Vektors wurden 5 µg Vektor-DNA, entsprechend verdünnt in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>, und für die Inserts die größte im Ansatz mögliche DNA-Menge (2,4 bis 5 µg) eingesetzt. Im 50 µl-Ansatz eines Restriktionsdoppelverdau wurden 5 µl 10x Puffer sowie je 2 µl der beiden Enzyme verwendet. Der gesamte Ansatz wurde anschließend für 2,5 h bei 37°C inkubiert, bevor noch einmal für dieselbe Zeit 41 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> sowie 5 µl 10x Puffer und je 2 µl Enzymlösung zugegeben wurden. Eine Stunde vor Ablauf der Inkubationszeit wurden zudem zum Vektorverdau 10 U alkalische Phosphatase (CIP oder Antarctic Phosphatase; New England Biolabs, M0290S oder M0289S) zugegeben, um die Phosphatgruppen am 5'-Ende des DNA-Doppelstranges abzuspalten und dadurch eine Religation zu verhindern. Abschließend wurde die DNA-Lösung auf ein 1%-iges [w/v] EtBr-Agarosegel aufgetragen (3.6.2).

#### 3.6.5.2 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Zur Extraktion von genetischem Material aus präparativen EtBr-Agarosegelen wurden diese auf einen Transilluminator (UVT-14L, Herolab) aufgelegt und die EtBr-gebundene DNA durch langwelliges UV-Licht bei 365 nm angeregt und dadurch sichtbar gemacht. Anschließend wurden die DNA-Banden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit 50 (Qiagen, 28704) nach Protokoll des Herstellers. Um Größe, Reinheit und Konzentration der präparierten DNA zu überprüfen, wurde die Lösung auf ein 1%-iges [w/v] EtBr-Agarosegel aufgetragen und zusätzlich am NanoDrop spektrophotometrisch vermessen (3.6.2, 3.6.1).

#### 3.6.5.3 Ligation

Für das Einschleusen des jeweiligen Inserts in den Plasmid-Vektor wurden 50 ng Vektor-DNA und die dreifache molare Menge an Insert-DNA, entsprechend verdünnt in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>, zusammen mit 10 µl 2x Quick Ligase Puffer und 1 µl Quick-Ligase (Quick Ligation Kit, New England Biolabs, M2200S) in

20 µl Gesamtvolumen für 30 min bei RT inkubiert. Zusätzlich wurde ein Ansatz ohne Insert-DNA erstellt, damit die Religationrate des Zielvektors ermittelt werden konnte. Die Produkte der Ligation wurden direkt im Anschluss in die Transformation eingesetzt.

#### **3.6.5.4 Transformation von E. coli mit Hitzeschock**

Für die Transformation wurde der chemisch kompetente E. coli-Stamm GM169 (3.3.1) auf Eis aufgetaut. Davon wurden 200 µl Bakteriensuspension mit 20 µl Ligationsansatz (3.6.5.3) in einem Rundbodenröhrchen (Corning, 352059) vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Röhrchen für exakt 45 s in ein 42°C warmes Wasserbad getaucht, bevor sie für weitere 2 min auf Eis gelagert wurden. Durch den Hitzeschock wird die Zellwand der Bakterien für Plasmide durchlässig gemacht. Damit das Resistenzgen exprimiert werden konnte, wurden die Transformationsansätze mit 800 µl LB-Medium ohne Zusatz von Antibiotikum (10 g Bacto-Hefeextrakt/l, 10 g Bacto-Trypton/l, 10 g NaCl/l in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>) versetzt und für 90 min bei 37°C und 220 rpm geschüttelt (Orbital Shaker, Thermo Forma). Zur Selektion der transformierten Bakterien wurden 200 µl Bakterienkultur auf eine Agarplatte mit Kanamycin (50 µg/ml) oder Ampicillin (100 µg/ml) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C kultiviert (3.4.2). E. coli, die das Vektor-Plasmid, welches ein Resistenzgen gegenüber dem verwendeten Antibiotikum besitzt, aufgenommen hatten, waren am nächsten Tag in Form von Kolonien auf der Platte gewachsen und konnten für die Präparation von DNA verwendet werden.

#### **3.6.6 Reinigung von Plasmid- und Bacmid-DNA aus E. coli**

Zur Vervielfältigung von Plasmid- und Bacmid-DNA wurde eine Flüssigkultur mit einer Einzelkolonie der transformierten Bakterien angeimpft und über Nacht unter Schütteln inkubiert (3.4.1). Dabei betrug das Kulturvolumen für Plasmid-Minipräparationen 4 ml, für Plasmid-Maxipräparationen 250 bis 300 ml und für Bacmid-Präparationen 500 ml. Durch die ständige Teilung von E. coli alle 20 min wurden auch die eingebrachten Plasmide entsprechend vermehrt. Am nächsten Morgen wurden kleine Kulturansätze für 10 min bei RT und 3000 x g zentrifugiert und die in den Zellen enthaltene DNA mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, 27106) nach Herstellerangaben isoliert. Anschließend wurde die DNA durch analytischen Doppelverdau mit EcoRI und HindIII (3.6.5.1) und die photometrische Bestimmung der Konzentration am NanoDrop (3.6.1) genauer überprüft. Plasmide, die für die Generierung neuer Zelllinien vorgesehen waren, wurden zusätzlich unter Verwendung der in Tab. 3.2 angegebenen Oligonukleotide sequenziert (Geneart/Life Technologies), um unerwünschte Mutationen im IE1-Gen auszuschließen.

Durch Maxipräparationen konnte DNA in größerer Menge und Reinheit gewonnen werden. Dazu wurde die bis zur entsprechenden Dichte gezüchtete Flüssigkultur (3.4.1) für 10 min bei 4°C und

6000 rpm zentrifugiert (Sorvall RC 5-Zentrifuge, Rotor SLA-3000). Im Anschluss daran konnte die DNA mit dem EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen, 12362) isoliert werden. Die reine, Endotoxin-freie DNA wurde unter sterilen Bedingungen getrocknet, in 100 µl TE-Puffer aus dem Kit resuspendiert und anschließend mittels analytischem Restriktionsverdau mit HincII und XhoI (jeweils Einfachverdau) überprüft (3.6.5.1). Nach Bestimmung ihrer Konzentration am NanoDrop-Spektrophotometer (3.6.1) wurde sie portioniert bei -20°C gelagert. Sie diente der Transfektion von HEK 293T-Zellen (3.5.4).

Bakterien, aus denen Bacmid-DNA isoliert werden sollte, wurden für 20 min bei 4°C und 6000 rpm sedimentiert (Sorvall RC 5-Zentrifuge, Rotor SLA-3000). Die Aufreinigung des genetischen Materials erfolgte mit dem NucleoBond BAC 100 Kit (Macherey-Nagel, 740579) nach Angaben des Herstellers. Das erhaltene DNA-Pellet wurde unter sterilen Bedingungen getrocknet und in sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> resuspendiert, bevor die erhaltene Lösung ebenfalls spektrophotometrisch vermessen und mit EcoRI analytisch verdaut wurde (3.6.1, 3.6.5.1). Die DNA-Lösung wurde bei 4°C gelagert, bevor die Bacmide über Elektroporation in TetR- bzw. TetR-IE1-Zellen eingebracht wurden (3.5.3).

### **3.6.7 Isolierung von Nukleinsäuren aus humanen Zellen und virushaltigen Kulturüberständen**

Zur Isolierung von genomischer DNA aus infizierten MRC-5-Zellen zum Zweck der Quantifizierung von Virusstocks (3.5.5) wurde der dicht gewachsene Zellrasen in der Vertiefung einer 6-Loch-Platte nach Abnahme des Kulturüberstandes und Waschen mit 3 ml PBS durch 5-minütige Inkubation mit 200 µl Trypsin/EDTA-Lösung bei 37°C vom Kulturgefäß abgelöst (3.5.1). Um einen Abbau der DNA durch Nukleasen zu verhindern, fanden alle folgenden Arbeitsschritte auf Eis statt. Nach Zugabe von 500 µl vorgekühltem, serumhaltigem DMEM wurde der Plattenboden zehnmal mit der in den Vertiefungen befindlichen Zellsuspension gespült, bevor diese in ein 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß (Greiner Bio-One, 623201) überführt wurde. Um nahezu alle Zellen aus der Vertiefung zu ernten, wurde der Boden des Gefäßes in zwei weiteren Durchgängen mit je 500 µl Medium gewaschen. Die erhaltenen Suspensionen wurden zu der des ersten Durchgangs hinzugefügt. Anschließend wurde die gesamte Probe für 5 min bei 4°C und 1000 x g zentrifugiert und das Zellpellet nach dem Entfernen des Überstandes in 200 µl PBS resuspendiert. Im Anschluss daran erfolgte die Isolierung der DNA mit Hilfe des DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, 69506) nach Angaben des Herstellers. Bei der Isolation viraler DNA aus Kulturüberständen (3.5.7) entfiel das Ernten der Zellen. In diesem Fall konnten 200 µl Kulturmedium direkt mit dem oben genannten Kit weiterverarbeitet werden. Die relative Quantifizierung der isolierten DNA erfolgte jeweils über qPCR (3.6.8).

Ein ähnliches Verfahren kam bei der Ernte von induzierten TetR-IE1-Zellen zur relativen Quantifizierung viraler und zellulärer mRNA zur Anwendung. Dazu wurden Zellen einer 12-Loch-Platte nach Absaugen des Kulturmediums bei RT mit 350 µl RLT-Puffer (RNeasy Mini Kit, Qiagen, 74104; versetzt

mit 143 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, Sigma Aldrich, M3148-25ML) direkt im Kulturgefäß lysiert, das Lysat in ein RNase-freies 1,5 ml-Eppendorf-Gefäß (Greiner Bio-One, 616201) überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Verarbeitung konnten die Proben bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

Die Präparation der RNA erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kit (Qiagen, 74104) nach Herstellerprotokoll, das lediglich dahingehend modifiziert wurde, dass anfangs eine zweimalige Zentrifugation des Lysats durch die Säule stattfand. Anschließend wurde die RNA-Konzentration spektrophotometrisch am NanoDrop bestimmt (3.6.1) und eine maximale Menge an RNA (100 bis 530 ng) zur Synthese von cDNA eingesetzt. Diese erfolgte unter oligo(dT) priming mit dem SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix (Life Technologies, 18080-400) in einem iCycler von Bio-Rad nach Angaben des Herstellers. Durch qPCR (3.6.8) konnte im Anschluss daran die Menge der cDNA ermittelt werden.

### 3.6.8 qPCR

Die qPCR ist eine sehr sensitive Möglichkeit zur Bestimmung der DNA-Menge in einer Probe. Sie basiert auf der Einlagerung des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green I in den neu entstehenden DNA-Doppelstrang. Das Fluoreszenzsignal, das am Ende jeder Elongationsphase gemessen wird, ist dabei um ein Vielfaches höher als bei freiem oder an DNA-Einzelstränge gebundenem SYBR Green I. Entscheidend ist bei dieser Methode der sogenannte crossing point- oder Cp-Wert, der denjenigen PCR-Zyklus beschreibt, in dem das Fluoreszenzsignal zum ersten Mal die Hintergrundfluoreszenz übersteigt. Über die Zunahme der Fluoreszenz lassen sich so Rückschlüsse auf die Menge der enthaltenen Ziel-DNA ziehen. Die Berechnung erfolgt dabei nach folgender Formel:

$$N = N_0 \times E^{\text{Cp}}$$

#### Formel 3.1: Zusammenhang zwischen DNA-Menge und Cp-Wert

N: DNA-Menge am Ende der Reaktion

$N_0$ : DNA-Menge zu Beginn

E: Amplifikationseffizienz

Cp: PCR-Zykluszahl, bei der das Fluoreszenzsignal zum ersten Mal die Hintergrundfluoreszenz übersteigt

Im Idealfall beträgt die Amplifikationseffizienz dabei 2, das heißt pro Zyklus wird die DNA-Menge verdoppelt. Da dieser Wert in der Realität nicht erreicht wird, wurde die Effizienz mit Hilfe einer Standardkurve bestimmt. Um sicherzustellen, dass nur das korrekte PCR-Produkt generiert wurde, wurde am Ende jeder qPCR eine Schmelzkurve ermittelt (Morrison et al., 1998; Pfaffl, 2001).

Für einen 20  $\mu\text{l}$ -Reaktionsansatz wurden 9  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  und 4  $\mu\text{l}$  SYBR-Green Mastermix aus dem LightCycler Fast Start DNA Master Plus SYBR Green I Kit (Roche, 4957164702) mit je 1  $\mu\text{l}$

10 µM Starteroligonukleotiden (Tab. 3.3) vermischt und in spezielle Kapillaren (Roche, 04929292001) überführt. Dazu wurden 5 µl Ziel-DNA pipettiert, die gegebenenfalls zuvor geeignet in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> verdünnt worden waren, bevor alles für 30 s bei 4°C und 700 x g zentrifugiert wurde, damit die Flüssigkeit in den Glasteil der Kapillare gelangen konnte. Anschließend wurde die Reaktion in einem Light-Cycler 1.5 der Firma Roche nach folgendem Protokoll gestartet:

1 Zyklus	95°C für 10 min	initiale Denaturierung
40 Zyklen	95°C für 10 s	Aufschmelzen des Doppelstranges
	66 bis 56°C für 10 s <sup>+</sup>	Hybridisierung der DNA-Teilfragmente
	72°C für 8 bis 12 s*	DNA-Polymerisation
1 Zyklus	Aufheizen von 65°C auf 95°C (0,1 °C/s)	Ermittlung der Schmelzkurve

<sup>+</sup> Abnahme der Temperatur in 0,5°C-Schritten = Touch-down-PCR

\* abhängig von der Größe des Amplikons, siehe Tab. 3.3

## 3.7 Proteinmethoden

### 3.7.1 Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie

Die Methode der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie (IF) eignet sich sehr gut zum Nachweis der subzellulären Lokalisation von zellulären und viralen Proteinen und wurde deshalb vor allem im Rahmen von Kollokalisationsstudien verwendet.

Dazu wurden TetR-IE1-Zellen in 6-Loch-Platten auf 22 x 22 mm Deckgläschen (Roth, H874.2) ausgesät. Je nach Fragestellung wurden sie bereits nach 24 h uninduziert fixiert oder zunächst nach Erreichen der vollständigen Dichte für 6, 72 oder 96 h mit Doxycyclin (1 µg/ml; Clontech Laboratories, 631311) und/oder direkt vor dem Ernten für 20 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> mit IFN-γ (1000 U/ml; R & D Systems, 285-IF-100) inkubiert (3.5.1).

Für die Fixierung wurden die Deckgläschen zunächst mit einer Pinzette vorsichtig aus den Vertiefungen geholt und nacheinander in drei Bechergläser mit Waschpuffer getaucht, bevor sie mit der bewachsenen Seite nach oben in neue 6-Loch-Platten gelegt wurden, die ebenfalls mit Waschpuffer gefüllt waren. Dieser bestand aus PBS mit Kalzium- und Magnesiumionen, dem zusätzlich 0,05% [v/v] Tween 20 (Merck Millipore, 9480) zugesetzt worden war, um durch eine Reduktion der Oberflächenspannung eine bessere Haftung der Zellen auf den Deckgläschen zu gewährleisten. Nach Absaugen der Pufferlösung wurden pro Vertiefung 5 ml vorgekühltes Methanol zugegeben und die Zellen darin für 20 min bei -20°C inkubiert. Durch das Dehydrieren der Zellen wurde eine Fixierung der Proteine an Ort und Stelle erreicht. Überdies wurden die Zellmembranen durch die Behandlung mit Methanol permeabilisiert, sodass die intrazellulär vorliegenden Antigene von den Antikörpern gebunden werden konnten. Nach Absaugen des Methanols konnten die Präparate im Luftstrom der Sterilbank getrocknet und für einige Tage bei -20°C gelagert werden.

Eine andere Möglichkeit war die sofortige Färbung. Dazu wurden die Deckgläschen nach dreimaligem Waschen mit oben beschriebener PBS-Tween-Lösung für 1 h in 2,5 ml Blockierungslösung (PBS mit 2% [w/v] Rinderserumalbumin und 0,05% [v/v] Tween 20) pro Vertiefung bei RT inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Präparate wiederum dreimal mit PBS-Tween-Lösung gewaschen, bevor sie mit einer Pinzette aus den Vertiefungen genommen und mit der Zellseite nach oben auf Parafilm gelegt wurden. Jedes Deckgläschen wurde mit 100 µl Primärantikörperverdünnung (3.2.1) versehen und für mindestens 1 h bei RT in einer dunklen, feuchten Kammer inkubiert. Nach Zurücklegen der Präparate in die 6-Loch-Platten und viermaligem Waschen mit PBS-Tween-Lösung wurden sie auf die gleiche Weise für 1 h bei RT mit je 100 µl einer Mischung aus der entsprechenden Sekundärantikörperverdünnung (3.2.2) und 4, 6-Diamin-2-Phenylindol (DAPI; 300 ng/ml; Roche, 10236276001) inkubiert. Da der Sekundärantikörper einen roten oder grünen Fluoreszenzmarker trägt und an den



spezifischen Primärantikörper bindet, können auf diese Weise bestimmte Proteine angefärbt werden. DAPI dagegen bindet an DNA und macht so die Zellkerne sichtbar.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Präparate fünfmal mit PBS-Tween-Lösung und einmal mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  gewaschen. Durch das Wasser konnten Salzurückstände des Puffers auf den Präparaten reduziert werden. Anschließend wurde ein Tropfen des Antifade-Mediums ProLong Gold (Life Technologies, P-36931) unter Vermeidung von Luftblasen auf einen sauberen Objektträger (R. Langenbrinck, 03-0004) pipettiert und das Deckgläschen mit der Zelleseite nach unten darauf gelegt, sodass sich das ProLong Gold gleichmäßig darunter verteilte. Zur Aushärtung wurden die Präparate über Nacht bei RT in einer dunklen Mappe belassen, bevor sie bei 4°C über einige Zeit gelagert werden konnten.

Die Auswertung erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop (Leica DMRX) mit 63x Objektiv und einer Retiga-SRV Digitalkamera unter Verwendung des digitalen Bildbearbeitungsprogrammes Image-Pro AMS 6.2.

### 3.7.2 Herstellung von Proteinextrakten

Um Proteinanalysen mittels Western Blot-Verfahren durchführen zu können, mussten die entsprechenden Proteine zuvor aus den Zellen extrahiert werden. Dazu wurden dicht gewachsene TetR-IE1-Zellen zunächst für 72 oder 96 h mit Doxycyclin (1 µg/ml; Clontech Laboratories, 631311) induziert (3.5.1). Anschließend wurden die Schalen zum Ernten auf Eis gelagert, der Zellrasen ein- bis zweimal mit 10 (10 cm-Schalen) bzw. 25 ml (15 cm-Schalen) eiskaltem serumfreiem DMEM mit Penicillin/Streptomycin (3.5.1) (SFM) gewaschen und die Zellen in einem Volumen von 1 (10 cm-Schalen) bzw. 3 ml (15 cm-Schalen) SFM mit Hilfe eines Zellschabers (Fisher Scientific, 10508292) vom Plattenboden abgekratzt. Damit möglichst alle Zellen geerntet werden konnten, wurde der Plattenboden noch dreimal mit 1 bzw. 3 ml SFM gespült. Zellen und SFM einer Schale wurden in einem 50 ml-Polystyrolröhrchen (Greiner Bio-One, 227261) auf Eis gesammelt und anschließend für 5 min bei 4°C und 2500 x g zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes, erneuter kurzer Zentrifugation und Abnahme des letzten Mediumtropfens wurden die erhaltenen Zellpellets in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Für Zellextrakte, die dem Nachweis von STAT1 und seiner posttranslational modifizierten Formen im Western Blot dienen, wurde das SFM zum Ernten mit Inhibitoren versetzt, um eine größtmögliche Stabilisierung der Proteine zu erreichen. Der Zusatz bestand dabei aus Natriumbutyrat (10 mM; Merck Millipore, 19-137), N-Ethylmaleimid (NEM; 5 µg/ml; Sigma-Aldrich, E1271-5G), Protease-Inhibitor Cocktail Set III (Merck Millipore, 539134; Verdünnung 1:100) sowie Phosphatase-Inhibitor Cocktail Set V (Merck Millipore, 524629; Verdünnung 1:50).

Zur weiteren Verarbeitung wurde das Zellpellet auf Eis aufgetaut und in 100 bzw. 250  $\mu\text{l}$  (Ernte aus 10 bzw. 15 cm-Schalen) Lysepuffer (MIPA: 50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 50 mM NaCl; 0,1% [w/v] SDS; 1% [v/v] Igepal CA-630; 0,5% [w/v] Natriumdeoxycholat) mit Protease- und Phosphatase-Inhibitoren und gegebenenfalls Natriumbutytrat und NEM in oben angegebener Konzentration resuspendiert und in ein 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß (Greiner Bio-One, 616201) überführt. Während einer 15-minütigen Inkubation auf Eis wurde die Suspension alle 5 min durch Vortexen gemischt und danach für 10 min bei 4°C und 20800 x g zentrifugiert, um genomische DNA und unlösliche Bestandteile zu sedimentieren. Aus der Mitte des erhaltenen Überstandes wurden 75 (10 cm-Schalen) bzw. 200  $\mu\text{l}$  (15 cm-Schalen) in ein frisches 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit dem gleichen Volumen an 2x SDS-Gelelektrophoresepuffer (60 mM Tris-HCl, pH 6,8; 2% [w/v] SDS; 10% [v/v] Glycerin; 0,001% [w/v] Bromphenolblau; 200 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) vermischt. Der gesamte Ansatz wurde danach für 5 min bei 95°C erhitzt, um die dreidimensionale Struktur der Proteine aufzulösen und sie mit dem Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate = SDS) des Puffers zu beladen. Die auf diese Weise vorbereiteten Proben wurden entweder direkt analysiert oder bei -80°C gelagert.

### 3.7.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Methode der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) beruht auf der Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekülmasse in einem elektrischen Feld. Durch die Verbindung von Proteinen und SDS werden die eigentlichen Ladungen der Proteine überdeckt, sodass alle die negative Ladung des SDS erhalten (3.7.2). Beim Lauf durch ein Polyacrylamidgel wandern daher alle Moleküle von der Kathode zu Anode, mit dem Unterschied, dass große Proteine leichter in den Maschen des Polyacrylamidgeflechtes hängen bleiben und damit langsamer laufen als kleinere.

Für die Durchführung der SDS-PAGE wurde die Gelapparatur Hoefer SE600 Ruby (Amersham Biosciences) verwendet. Nach Angaben des Herstellers wurde zunächst ein Trenngel zwischen zwei Glasplatten gegossen und mit wassergesättigtem 2-Butanol überschichtet. Nach der vollständigen Polymerisation wurde der Alkohol entfernt und der Zwischenraum gründlich mit entionisiertem Wasser gespült und getrocknet, bevor auf das Trenngel noch ein schmaler Streifen Sammelgel gegossen wurde (genaue Zusammensetzung beider Gele siehe Tab. 3.8). Nach der Aushärtung der Gele wurden pro Probe 20  $\mu\text{l}$  Proteinextrakt (3.7.2) und zur Abschätzung der Proteingröße 15  $\mu\text{l}$  eines Proteingrößenstandards (Prestained Protein Marker Broad Range, New England Biolabs, P7708S) aufgetragen.

Die Auftrennung erfolgte in Tris-Glycin-Elektrophoresepuffer (20 mM Tris; 150 mM Glycin; 1% [w/v] SDS) bei einer Stromstärke von 20 mA, die nach ca. 2 h auf 25 mA erhöht wurde. Beim gleichzeitigen Lauf von zwei Gelen in der gleichen Apparatur wurde die Stromstärke entsprechend

verdoppelt. In beiden Fällen wurde sie so lange angelegt, bis die Farbbande des Bromphenolblaus vollständig aus dem Gel gelaufen war.

**Tab. 3.8: Zusammensetzung der Gele für die SDS-PAGE**

Reagenzien	10 ml 5%-iges [w/v] Sammelgel	40 ml 10%-iges [w/v] Trenngel
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	6,8 ml	15,9 ml
30% [w/v] Acrylamid Mix (AppliChem, A1157)	1,7 ml	13,3 ml
1,0 M Tris-HCl, pH 6,8 (Roth, 4855.2)	1,25 ml	---
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 (Roth, 4855.2)	---	10,0 ml
10% [w/v] SDS (AppliChem, A1112,1000)	0,1 ml	0,4 ml
10% [w/v] Ammoniumpersulfat (Biomol, 50404)	0,1 ml	0,4 ml
Tetramethylethylendiamin (AppliChem, A1148, 0025)	0,01 ml	0,016 ml

### 3.7.4 Western Blot-Analyse

Zur Identifizierung bestimmter Proteine aus dem Proteingemisch eines Zellextrakts kam die Methode der Western Blot-Analyse zum Einsatz, die mit Hilfe spezifisch bindender Antikörper deren exakte Detektion erlaubt. Dafür ist ein Transfer der Proteine vom Gel der SDS-PAGE (3.7.3) auf eine Nitrozellulosemembran (Optitran BA-S83, Hartenstein) notwendig. Dazu wurde das Gel zunächst dreimal für 5 min in Towbin-Transferpuffer (13 mM Tris; 100 mM Glycin; 20% [v/v] Methanol) gewaschen, um verbliebene SDS-Rückstände zu entfernen, bevor es auf die Membran gelegt wurde. Gel und Membran wurden zwischen je drei Lagen Whatman-Papier und einem Schwamm auf jeder Seite in das Gitternetz einer Blotapparatur (Trans Blot Cell, Bio-Rad) eingespannt. Alle Einzelteile waren zuvor bereits mit Towbin-Transferpuffer durchtränkt worden. Das Gitternetz wurde anschließend in die Kammer der Apparatur eingehängt und bis zum oberen Rand mit Towbin-Transferpuffer bedeckt. Unter gleichmäßigem Rühren der Pufferlösung bei 4°C wurde für ca. 16 h eine Stromstärke von 100 mA angelegt, sodass die negativ geladenen Proteine im elektrischen Feld auf die Membran übertragen werden konnten. Um den Erfolg des Transfers zu überprüfen, wurde die Nitrozellulosemembran nach Abbau der Blotapparatur zunächst in Ponceau S-Lösung (1% [w/v] Ponceau S; 5% [v/v] Essigsäure) eingelegt. Diese färbt reversibel alle Proteinbanden rot an. Zur Entfernung der Farbrückstände wurde mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> und PBS mit 0,1% [v/v] Tween 20 (Merck Millipore, 9480) gewaschen, bevor die Membran unter leichtem Schwenken bei RT für 2 h in Magermilch (PBS mit 5% [w/v] Magermilchpulver) inkubiert wurde, um dadurch unspezifische Bindungsstellen für die Antikörper abzudecken. Im Anschluss daran wurde sie für 2 h bei RT in 40 ml

Primärantikörperverdünnung (3.2.1) geschwenkt. Alternativ konnte die Inkubation auch über Nacht bei 4°C durchgeführt werden. Dem folgten drei jeweils 15-minütige Waschschriffe mit PBS-Tween 0,1%, um nicht gebundene Reste des Primärantikörpers zu entfernen. Danach wurde die Membran ebenfalls unter leichtem Schwenken für 1 h bei RT in 50 ml der entsprechenden Sekundärantikörperverdünnung (3.2.2) inkubiert, bevor wiederum dreimal für 15 min mit PBS-Tween 0,1% gewaschen wurde. Daran schloss sich ein einzelner Waschschriff mit PBS ohne Zusatz von Tween 20 an, um vor dem Entwickeln Detergenzrückstände zu entfernen, ehe die Membran aus der Pufferlösung genommen wurde. Nach Abfließen der Restflüssigkeit wurde sie auf eine Frischhaltefolie gelegt und bei RT für 5 min mit einer 1:1 Mischung der beiden Chemilumineszenz-Substrate Super Signal West Pico Stable Peroxide Solution und Luminol/Enhancer Solution (Thermo Scientific, 34080) bedeckt (0,09 ml/cm<sup>2</sup>). Wenn ein sehr schwaches Fluoreszenzsignal zu erwarten war, wurde eine 1:1 Mischung aus Super Signal West Femto Stable Peroxide Solution und Luminol/Enhancer Solution (Thermo Scientific, 34096) verwendet. Nach erneutem Abtropfen der Membran wurde diese in ein neues Stück Frischhaltefolie eingeschlagen, um sie während des Entwickelns vor dem Austrocknen zu schützen. Durch Umsetzung des Substrats durch die Meerrettichperoxidase, die am Sekundärantikörper konjugiert ist, entsteht ein Signal, das nach Auflegen eines Films (CL-Xposure Film, Thermo Scientific, 34090) eine Schwärzung im Bereich der spezifischen Proteinbande bewirkt. Durch das Eintauchen in Entwicklerlösung (Sigma-Aldrich, 1900943), Wasser, Fixierer (Sigma-Aldrich, 1901875) und weitere zwei Wasserbäder konnten die Banden sichtbar gemacht und fixiert werden.

Die Nitrozellulosemembran kann in PBS eingelegt bei 4°C ein paar Tage aufbewahrt und nochmals mit anderen Antikörpern inkubiert werden.

### 3.7.5 Co-Immunpräzipitation

Die Methode der Co-Immunpräzipitation (Co-IP) bietet eine Möglichkeit, Interaktionen zwischen Proteinen zu detektieren und diente im Rahmen dieser Arbeit dem Nachweis einer Komplexbildung zwischen IE1 und STAT1. Grundprinzip ist dabei die Isolation eines Proteins über die Bindung an seinen spezifischen Antikörper. Dieser wiederum wird vorher an uniforme superparamagnetische Kügelchen (Dynabeads Protein A, Life Technologies, 100.02D) gekoppelt, sodass der gesamte Protein-Antikörperkomplex immunomagnetisch aus dem Zellextrakt gezogen werden kann.

Dazu wurden die Dynabeads zunächst durch Inkubation in einem Rotator (PTR-30, Grant-bio) für 5 min bei 4°C gründlich resuspendiert, bevor sie in Portionen von 50 µl auf 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße (Greiner Bio-One, 616201) aufgeteilt wurden (Konzentration: 6-7 x 10<sup>8</sup> beads/ml). Nach Bindung der Dynabeads an einen Magneten für 3 min wurde die Lösung abgesaugt und jeder Ansatz mit 5 µg Antikörpern in einem Volumen von 200 µl PBS mit Zusatz von 0,01% [v/v] Tween 20

(Merck Millipore, 9480) versehen. Dabei erhielt die eine Hälfte der Proben normales Maus-IgG (Sigma-Aldrich, A-0919) für die Vorreinigung der Zellextrakte von unspezifisch bindenden Bestandteilen und die andere Hälfte den IE1-spezifischen Antikörper MAB810R (3.2.1) zur Isolation des IE1-Proteins. Alle Ansätze wurden über Nacht bei 4°C unter Drehen inkubiert, sodass die Antikörper während dieser Zeit an das Protein A auf der Oberfläche der Dynabeads binden konnten. Am nächsten Morgen wurde der Überstand nach kurzer Zentrifugation bei 100 x g und dreiminütiger Inkubation am Magneten abgesaugt und durch 200 µl Co-IP Lysepuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 150 mM NaCl; 10% [v/v] Glycerin; 0,5% [v/v] Triton-X-100) ersetzt. Nach Resuspension der Dynabeads wurden sie erneut für 3 min am Magneten pelletiert. Nach Absaugen des Überstands konnten die Dynabeads mit dem Zellextrakt vermischt werden.

Für die Durchführung einer Co-IP wurden zwei 15 cm-Schalen mit konfluenten, für 96 h mit Doxycyclin (1 µg/ml) induzierten TetR-IE1-Zellen verwendet (3.5.1). Die Zellen jeder Schale wurden zunächst nach Absaugen des Kulturmediums für 15 min mit 15 ml SFM mit Zusatz von 1% [v/v] Formaldehyd (Sigma-Aldrich, F-8775) bedeckt, um transiente Protein-Protein-Wechselwirkungen im Status quo zu fixieren. Anschließend wurde die Quervernetzungsreaktion durch Zugabe von 1,92 ml Glycinlösung (1 M; Merck Millipore, 1.04201.1000) unterbrochen. Nach fünfminütiger Inkubation bei RT wurden die Schalen auf Eis gestellt, das Medium entfernt und die Zellen einmal mit 25 ml eiskaltem SFM gewaschen. Nach Absaugen der Waschlösung wurde der Zellrasen in 3 ml SFM mit Protease Inhibitor Cocktail Set III (Merck Millipore, 539134; Verdünnung 1:100) mit einem Zellschaber (Fisher Scientific, 10508292) vom Boden der Schale abgekratzt, die Zellsuspension in ein frisches 50 ml-Reaktionsgefäß (Greiner Bio-One, 227261) überführt und das Kulturgefäß weitere dreimal mit je 3 ml SFM ohne Inhibitoren gespült. Die erhaltenen Zellsuspensionen wurden mit denen des ersten Durchgangs vereinigt und für 12 min bei 4°C und 3600 x g zentrifugiert. Nach dem Abgießen des Überstandes, erneuter kurzer Zentrifugation und Abnahme des letzten Flüssigkeitsrestes wurde das Zellpellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

Für die Weiterverarbeitung wurden die Zellpellets auf Eis aufgetaut und danach in 750 µl Co-IP-Lysepuffer mit Natriumbutyrat (10 mM; Merck Millipore, 19-137), NEM (5 µg/ml; Sigma-Aldrich, E1271-5G), Protease-Inhibitor Cocktail Set III (Merck Millipore, 539134; Verdünnung 1:100) sowie Phosphatase-Inhibitor Cocktail Set V (Merck Millipore, 524629; Verdünnung 1:50) resuspendiert, um die Proteine zu solubilisieren. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis und 5 min bei RT im Ultraschallbad (Branson Ultrasonic Cleaner B-200) wurden die unlöslichen Bestandteile durch dreimaliges Zentrifugieren für 10 min bei 4°C und 20800 x g aus dem Lysat entfernt, indem nach jedem Zentrifugieren der Überstand abgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt wurde. Alle Überstände eines IE1-Extraktes wurden anschließend zu den Maus-IgG-gekoppelten Dynabeads gegeben, um unspezifisch bindende Komponenten aus der Lösung zu entfernen. Dazu wurden die Ansätze für

1 h unter Drehen bei 4°C inkubiert. Nachfolgend wurden die Dynabeads wiederum auf den Magneten pelletiert und 25 µl des Überstandes abgenommen, der später als Kontrolle dafür diente, dass sowohl das IE1- als auch das STAT1-Protein vor Zugabe des spezifischen Antikörpers tatsächlich in der Lösung vorhanden waren. Die Kontrollprobe wurde mit dem gleichen Volumen an 2x SDS-Gelelektrophoresepuffer (60 mM Tris-HCl, pH 6,8; 2% [w/v] SDS; 10% [v/v] Glycerin; 0,001% [w/v] Bromphenolblau; 200 mM β-Mercaptoethanol) vermischt und bei -80°C gelagert.

Der verbliebene Überstand wurde nun in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, das die MAB810R-gekoppelten Dynabeads enthielt und mit diesen unter Drehen für 1 h bei 4°C inkubiert, damit IE1 an seinen spezifischen Antikörper binden konnte. Danach wurde der gesamte Ansatz für 1 min bei 4°C und 100 x g zentrifugiert und die Dynabeads für 3 min am Magneten pelletiert, um den kompletten Überstand absaugen zu können. Das IE1-Protein sowie alle daran gebundenen Moleküle sollten über den Antikörper am Magneten gebunden haben und sich nicht mehr in Lösung befinden. Zur weiteren Aufreinigung wurde jede Probe mit 1 ml Co-IP-Waschpuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 150 mM NaCl; 0,1% [v/v] Igepal CA-630), der mit Protease Inhibitor Cocktail Set III (Merck Millipore, 539134; Verdünnung 1:100), Phosphatase-Inhibitor Cocktail Set V (Merck Millipore, 524629; Verdünnung 1:50), Natrium-Butyrat (10 mM; Merck Millipore, 19-137) und NEM (5 µg/ml; Sigma-Aldrich, E1271-5G) versetzt war, gewaschen. Im Folgenden wurden die Proben 15-mal umgewendet, die Dynabeads für 3 min auf den Magneten pelletiert und der gesamte Überstand abgesaugt. Dieser Vorgang wurde weitere viermal wiederholt, wobei dem Co-IP-Waschpuffer ab dem zweiten Mal nur noch NEM (5 µg/ml) zugefügt wurde. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand vollständig entfernt und durch 30 µl 1x SDS-Gelelektrophoresepuffer ersetzt. Nach Überführen der Lösung in ein frisches Reaktionsgefäß wurde sie vorübergehend bei -80°C gelagert.

Nach dem Auftauen auf Eis und dem Erhitzen der Suspension auf 95°C für 5 min wurden die Proben noch einmal gut durchmischt, kurz zentrifugiert und für 3 min auf dem Magneten inkubiert, um die Dynabeads zu entfernen. Der Überstand und die Kontrollproben wurden zur weiteren Analyse in die SDS-PAGE (3.7.3) und das Western Blot-Verfahren (3.7.4) eingesetzt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Kartierung immunmodulatorischer Funktionen im IE1-Protein

Wie in der Einleitung bereits beschrieben, ist das hCMV IE1-Protein IFN-unabhängig in der Lage, die Transkription menschlicher Gene zu stimulieren, die normalerweise nur im Zuge einer Immunantwort durch IFN- $\gamma$  aktiviert werden (Typ II-ISG) (Knoblach et al., 2011). Dabei spielt vor allem eine noch nicht im Detail geklärte Interaktion mit dem Transkriptionsaktivator STAT1 eine Rolle. Daneben könnte für diesen Prozess aber auch die Bindung an und Auflösung von PML-Körpern durch IE1 von größerer Bedeutung sein. Schwerpunkt des ersten Abschnitts dieser Arbeit ist daher die Frage, welche Bereiche im IE1-Protein für die Hochregulierung der Typ II-ISG in Abwesenheit von IFN- $\gamma$  verantwortlich sind und welchen Einfluss diese Abschnitte auf die Wechselwirkungen zwischen IE1, STAT1 und PML-Körpern haben.

#### 4.1.1 Herstellung und Charakterisierung der IE1-Mutanten

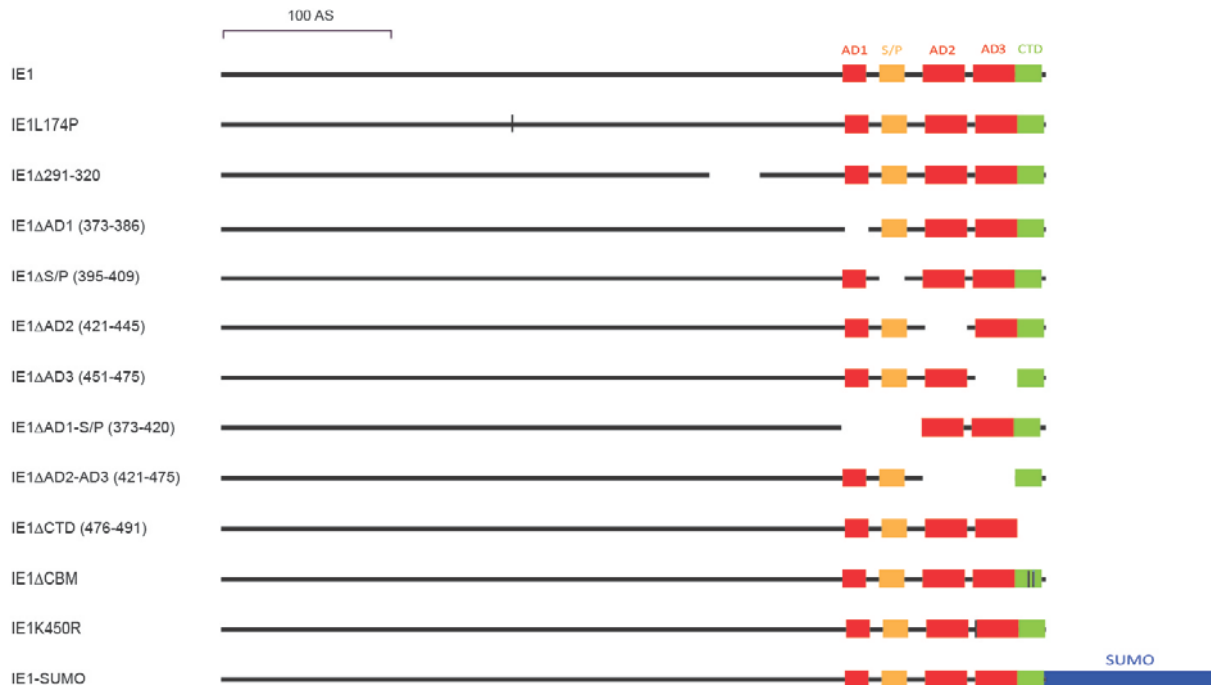
##### 4.1.1.1 Auswahl und Beschreibung der IE1-Mutanten

Zur genaueren Analyse der oben beschriebenen Sachverhalte wurden zwölf IE1-Mutanten generiert, bei denen verschiedene definierte Abschnitte der IE1-Sequenz des hCMV-Stammes Towne deletiert oder durch Punktmutationen verändert worden sind. Dabei wurden vor allem Sequenzen ausgewählt, von denen man bereits wusste, dass sie wichtige Funktionen von IE1 beinhalten, um daraus Rückschlüsse auf den molekularen Mechanismus der IFN- $\gamma$ -ähnlichen Antwort ziehen zu können. Eine Übersicht über die verwendeten IE1-Mutanten liefert Abb. 4.1.

Der Aminosäure Leucin an Position 174 kommt eine wesentliche Bedeutung bei der Interaktion von IE1 mit PML zu, da eine Mutation an dieser Stelle (L174P) eine Bindung von IE1 an PML-Körper und damit eine Auflösung dieser Strukturen unmöglich macht (Muller und Dejean, 1999; Lee et al., 2004). Auch eine Deletion im mittleren Bereich von IE1 (AS 291-320) führt zu dieser Funktionseinschränkung (Ahn et al., 1998). Darüber hinaus zeigte eine entsprechende Virusmutante auch keine Infektiosität in kultivierten Fibroblasten (Lee et al., 2004).

Das Hauptaugenmerk lag allerdings eher auf der C-terminalen Region (AS 373-491), da schon seit längerer Zeit bekannt ist, dass hier Abschnitte lokalisiert sind, die für wichtige Eigenschaften von IE1 bedeutsam sind. Über Sequenzen im Bereich der AD1- und S/P-Motive (AS 373-420) erfolgt die Bindung an STAT2 und damit die Unterdrückung der antiviralen Wirkung von Typ I-IFN. Das benachbarte AD2-Motiv scheint dabei eine unterstützende Funktion zu haben (Paulus et al., 2006; Krauss et al., 2009). Darüber hinaus scheint das Teilstück von AD2 bis AD3 auf noch ungeklärte Weise für die

Virusreplikation bei Infektionen mit niedrigem Virus-Zellverhältnis wichtig zu sein (Reinhardt et al., 2005). Ob das AD3-Motiv selbst eine wesentliche Funktion für das IE1-Protein enthält, ist derzeit noch nicht erforscht.



#### Abb. 4.1: Übersicht über die verwendeten IE1-Mutanten

Die schematische Darstellung zeigt die komplette Länge der Aminosäure-Sequenz (AS 1-491) von IE1 als durchgezogene schwarze Linie. Die sauren Domänen AD1, AD2 und AD3 sind in Form von roten Kästchen an ihrer Position entlang der IE1-Sequenz dargestellt. Die S/P-reiche Region ist gelb markiert, die CTD grün und das fusionierte SUMO-1 blau. Punktmutationen sind durch senkrechte schwarze Striche gekennzeichnet, Deletionen durch ein Freilassen des jeweiligen IE1-Abschnittes. Die betroffenen Aminosäuren sind dabei jeweils in Klammern angegeben. Die Mutante IE1 $\Delta$ CBM weist Punktmutationen an den Positionen M483A/R486A/S487A auf.

Das letzte Stück des C-Terminus, die CTD (AS 476-491), ist für die Kolokalisation von IE1 und mitotischem Chromatin verantwortlich (Wilkinson et al., 1998; Reinhardt et al., 2005). Die Assoziation mit Metaphase-Chromosomen wird dabei unter anderem über die drei Aminosäuren M483, R486 und S487 vermittelt (Mucke et al., 2014). Sie wurden hier alle durch Alanin (A) ersetzt, sodass die „Chromatin-Binde-Mutante“ (CBM) entstand.

Seit ein paar Jahren ist auch bekannt, dass IE1 durch die kovalente Bindung von SUMO-1 an Lysin 450 (K450) posttranslational modifiziert wird. Bei einem Austausch von Lysin gegen Arginin (K450R) ist dieser Vorgang nicht mehr möglich. Allerdings wurden bei einem Fehlen der Sumoylierung außer einem abgeschwächten Viruswachstum durch eine reduzierte IE2-Expression keine Funktionseinschränkungen für IE1 beobachtet, sodass die Bedeutung dieser Modifikation noch nicht abschließend geklärt ist (Muller und Dejean, 1999; Xu et al., 2001; Spengler et al., 2002; Nevels et al., 2004). Um die Modifikation von IE1 durch SUMO-1 in vitro nachzustellen, wurde eine



Mutante (IE1-SUMO) konzipiert, bei der die DNA-Sequenz von SUMO-1 direkt im Anschluss an die genetische Information für IE1 angehängt wurde, sodass beide Proteine als Fusion exprimiert werden. Dazu wurde das Stopp-Codon von IE1 durch eine Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease SmaI ersetzt, über die die SUMO-1 cDNA an die IE1-Sequenz angehängt werden konnte.

Diese genetischen Veränderungen in IE1 sollten in den folgenden Experimenten Aufschluss darüber geben, welche Abschnitte dieses Proteins am Prozess der Hochregulierung von Typ II-ISG beteiligt sind und ob es eventuell Wechselwirkungen zwischen dieser und anderen, schon länger bekannten Funktionen von IE1 gibt.

#### **4.1.1.2 Herstellung von Zelllinien zur induzierbaren Expression der IE1-Mutanten**

Für alle im Weiteren beschriebenen Versuche mit IE1 und seinen Mutanten nutzte man ein sogenanntes „induzierbares System“, mit dessen Hilfe es möglich war, die Expression des (mutierten) IE1-Gens gezielt anzuschalten. Dies erlaubt die Analyse des IE1-Proteins außerhalb des komplexen Zusammenspiels verschiedener Komponenten bei einer Virusinfektion. Es ermöglicht damit eine Abgrenzung von Vorgängen, die durch IE1 alleine zustande kommen von solchen, die durch andere Faktoren (mit-) bedingt werden. Darüber hinaus werden eine Gewöhnung der Zellen an hohe IE1-Spiegel sowie schwankende oder unphysiologisch erhöhte IE1-Mengen vermieden. Dieses System kam bereits erfolgreich bei Versuchen zur Funktion des immediate-early proteins ICPO von HSV-1 zur Anwendung und wurde auch schon in einem ähnlichen Kontext mit IE1 verwendet (Everett et al., 2009; Knoblach et al., 2011).

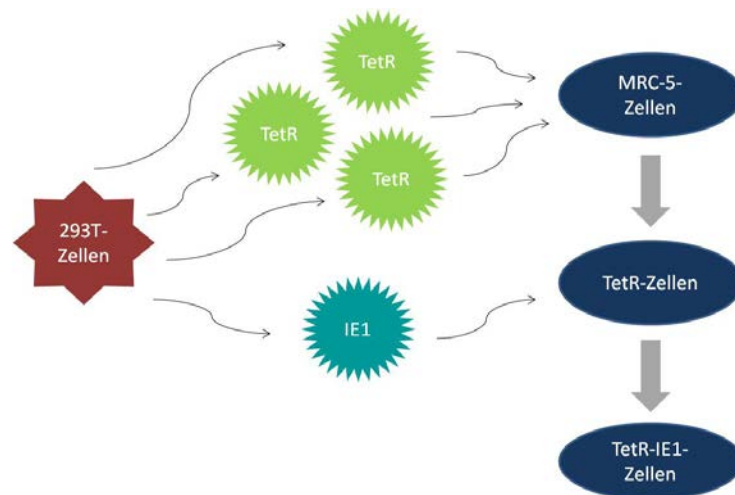
Eine wichtige Komponente für die Schaffung dieses induzierbaren Systems war das Plasmid pLKOneo.CMV.EGFPnlsTetR (3.1.2), das nach der hCMV-Promotorregion die Sequenz für einen Tetrazyklin-Repressor (TetR) enthält, der zusätzlich an ein nukleäres Lokalisationssignal (nuclear localization signal = NLS) und ein grün fluoreszierendes Protein (enhanced green fluorescent protein = EGFP) gekoppelt ist. Die Aufgabe des TetR bestand darin, nach seiner Translokation in den Zellkern an den Tandem-Tetrazyklin-Operator (TetO) vor der IE1-Sequenz zu binden und dadurch eine Transkription von IE1 zu verhindern. Diese Blockade konnte nur durch Zugabe eines Tetrazyklins (Doxycyclin) aufgehoben werden, welches eine Konformationsänderung am TetR bewirkt und so zu dessen Dissoziation vom TetO führt (Everett et al., 2009).

Der erste Schritt für die Herstellung von Zelllinien zur induzierbaren Expression von IE1 und seinen Mutanten bestand in der Amplifizierung der entsprechenden IE1-Sequenzen über PCR-Verfahren (3.6.3, 3.6.4). Dabei wurden Starteroligonukleotide mit Schnittstellen für die Restriktionsenzyme HindIII am 5'-Ende und EcoRI am 3'-Ende verwendet (3.1.1). Über diese konnten die einzelnen IE1-Konstrukte anstelle der Wildtyp-IE1-Sequenz in das Vektorplasmid pCMV.TetO.cIE1 eingesetzt werden (3.6.5) und kamen dort direkt hinter der hCMV-Promotorregion und der Sequenz des TetO zu liegen. Über eine Spaltung dieses Plasmids mit NdeI und EcoRI konnten sowohl der für das

mutierte IE1 kodierende DNA-Abschnitt als auch der davor liegende Bereich mit Promotor und TetO in den Vektor pLKO.DCMV.TetO.cIE1 übertragen werden (3.6.5). Neben den auf diese Weise mutierten Vektoren wurde auch das Plasmid pLKO.1puro verwendet, das zwar über eine Puromycin-Resistenz verfügt, aber keine IE1-kodierenden Sequenzen enthält, sodass es für die weiteren Versuche als Negativkontrolle verwendet wurde.

Alle Vektorplasmide wurden zur Produktion rekombinanter Lentiviren in HEK 293T-Zellen transfiziert (3.5.4). Über dieses lentivirale System konnte die (mutierte) IE1-Sequenz anschließend in humane Zellen eingebracht werden. Dieses Vorgehen hat den Vorteil, dass dadurch der Gentransfer in einen deutlich höheren Prozentsatz an Zellen möglich ist als dies mit anderen Methoden erreicht werden kann. Zudem wird hierbei die virale DNA direkt ins Erbgut der Wirtszelle integriert, was eine hohe Stabilität und damit eine zuverlässige Expression der Ziel-DNA gewährleistet.

In diesem Fall wurden MRC-5-Zellen dreimal mit den TetR-DNA-tragenden Lentiviren infiziert, um eine gleichmäßig starke Expression des TetR zu erzielen. Diese konnte durch die Detektion von EGFP im Fluoreszenzmikroskop überprüft werden. Die auf diese Weise erzeugten TetR-Zellen wurden noch einmal mit den jeweiligen Lentiviren infiziert, die die entsprechenden Mutationen im IE1-Gen trugen und wurden dadurch zu TetR-IE1-Zellen (3.5.6). Eine schematische Darstellung der Herstellung dieser neuen Zelllinien zeigt Abb. 4.2.



**Abb. 4.2: Schematische Darstellung der Herstellung induzierbarer Zelllinien**

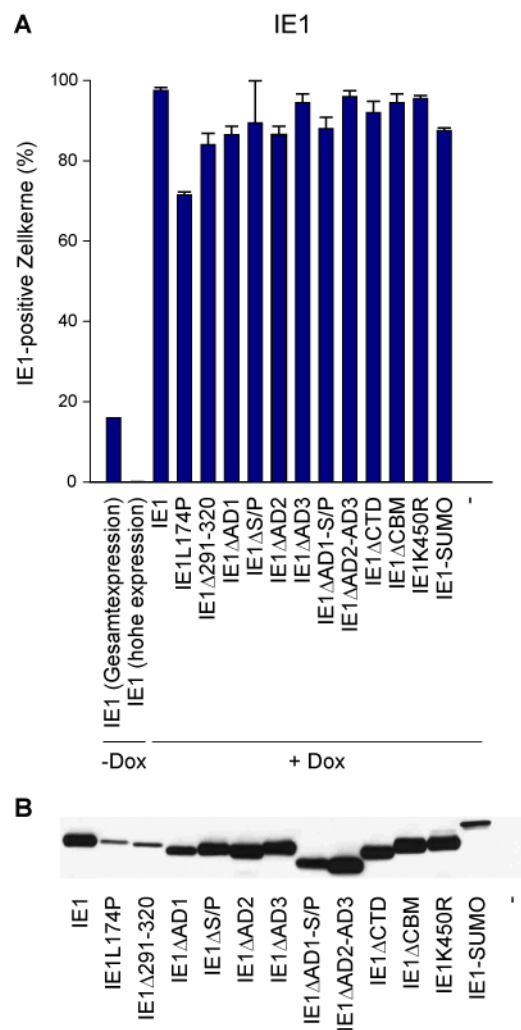
Nach dem Einschleusen von pLKO-Plasmiden in HEK 293T-Zellen (hier dunkelrot) erfolgte dort die Produktion von rekombinanten Lentiviren. TetR-DNA-tragende Lentiviren sind hier hellgrün dargestellt, IE1-DNA-tragende türkis. IE1 symbolisiert hier nicht nur den Wildtyp, sondern auch die jeweiligen Mutanten. Normale MRC-5-Zellen wurden dreimal mit TetR-DNA-tragenden Lentiviren infiziert und wurden so zu TetR-Zellen. Diese wurden anschließend mit IE1-DNA-tragenden Lentiviren infiziert, woraus die TetR-IE1-Zellen entstanden. Alle Zelllinien, die sich von MRC-5-Zellen ableiten, sind hier dunkelblau dargestellt.

#### 4.1.1.3 Analyse der Expression der IE1-Mutanten

Die erhaltenen TetR-IE1-Zellen wurden zunächst dahingehend überprüft, ob sie die DNA der IE1-Mutanten tatsächlich aufgenommen hatten. Dazu wurden dicht gewachsene Zellen bis auf eine Negativkontrolle (- Dox) für 72 h mit Doxycyclin behandelt, sodass IE1 exprimiert werden konnte. Nach Methanol-Fixierung wurden sowohl IE1 als auch der TetR über Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Antikörper gefärbt (3.7.1). Zusätzlich wurde die DNA durch DAPI sichtbar gemacht, um die Zellkerne darstellen zu können.

Bei der Betrachtung der Präparate im Fluoreszenzmikroskop fiel als erstes auf, dass sowohl der IE1-Wildtyp als auch alle Mutanten und der TetR im Zellkern vorzufinden waren. Im weiteren Verlauf wurden pro Probe willkürlich zwei Stellen herausgesucht, fotografiert und anschließend die Gesamtzahl aller Zellkerne sowie der Anteil der IE1-positiven Kerne ermittelt (Abb. 4.3 A). Bei der nicht-induzierten Negativkontrolle wurde zusätzlich noch zwischen einer leichten Hintergrund- und einer deutlich sichtbaren IE1-Expression unterschieden, wie sie im induzierten Wildtyp-Präparat zu sehen war. Dabei fiel auf, dass die Hintergrundexpression von IE1 relativ niedrig (< 20%) und eine starke Expression des Proteins ohne vorherige Induktion mit Doxycyclin praktisch nicht vorhanden war. Das deutete darauf hin, dass der TetR in ausreichender Menge vorlag und gut funktionierte. Bei den zuvor mit Doxycyclin behandelten Zellen wurden dagegen bei fast allen Konstrukten > 80% IE1-positive Kerne gezählt. Dies spricht für eine gute Aufnahme der IE1-DNA in den Zellkern und eine Expression nahe an den Mengen des IE1-Wildtyps. Einzig IE1L174P blieb unter diesem Wert, zeigte aber dennoch einen Anteil an IE1-positiven Kernen von > 70%.

Die Stabilität der IE1-Mutanten auf Proteinebene wurde in einem zweiten Versuchsansatz analysiert. Dazu wurden wiederum wachstumsarretierte TetR-IE1-Zellen für 72 h mit Doxycyclin inkubiert. Nach Extraktion der Proteine wurden diese mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot-Verfahren untersucht (3.7.2, 3.7.3, 3.7.4) (Abb. 4.3 B). Dabei zeigten fast alle Mutanten eine IE1-Expression, die mindestens das Niveau des Wildtyps erreichte oder im Fall von IE1 $\Delta$ AD1 und IE1 $\Delta$ AD1-S/P nur knapp darunter lag. Bei IE1L174P, IE1 $\Delta$ 291-320 und IE1-SUMO waren dagegen deutlich schwächere Banden zu sehen. Auch unterschiedlich lange Induktionszeiten oder eine größere Menge an Doxycyclin konnten die Proteinmengen dieser Mutanten nicht steigern. Die Verwendung des IE1-spezifischen Antikörpers 1B12 anstelle von MAB810R zur Detektion von IE1 erbrachte ebenfalls dasselbe Ergebnis (Daten nicht gezeigt). Dies deutet darauf hin, dass Mutationen im zentralen Bereich eventuell zu schwerwiegenden Defekten des IE1-Proteins führen, die eine stabile Expression in ausreichender Menge unmöglich machen. Unter Umständen behindert auch das Anhängen eines anderen Proteins, in diesem Fall SUMO-1, die Ausbildung der korrekten dreidimensionalen Struktur. Für alle anderen Konstrukte konnte jedoch von einer stabilen Expression der mutierten IE1-Proteine ausgegangen werden.



**Abb. 4.3: Charakterisierung der IE1-Proteine bezüglich Expression und Stabilität**

(A) Dicht gewachsene TetR-IE1-Zellen wurden für 72 h mit Doxycyclin behandelt (+ Dox) oder, als Negativkontrolle, in unbehandeltem Zustand belassen (- Dox), bevor sie mit Methanol fixiert wurden. Anschließend wurden IE1 und EGFP mit Hilfe des monoklonalen Maus-Antikörpers MAB810R gegen IE1 und des polyklonalen Kaninchen-Antikörpers gegen EGFP sowie mit Maus-spezifischen Alexa Fluor 594-konjugierten (rot fluoreszierenden) bzw. Kaninchen-spezifischen Alexa Fluor 488-konjugierten (grün fluoreszierenden) Sekundärantikörpern angefärbt. Zur Identifikation der Zellkerne wurde die DNA mittels DAPI blau markiert.

Am Fluoreszenzmikroskop wurden pro Lichtfeld zwischen 300 und 500 Zellen ausgezählt. Darin wurde der Anteil an IE1-positiven Zellkernen ermittelt und auf die Anzahl der insgesamt sichtbaren Zellkerne (= 100%) normiert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Auszählung zweier zufällig ausgewählter Lichtfelder pro Präparat.

(B) TetR-IE1-Zellen wurden in wachstumsarretiertem Zustand für 72 h mit Doxycyclin behandelt und anschließend im Western Blot-Verfahren mit Hilfe des IE1-spezifischen Antikörpers MAB810R bezüglich ihrer Proteinexpression analysiert.

Für beide Teilabbildungen dienten TetR-Zellen ohne IE1-Fremd-DNA als Negativkontrolle.

#### **4.1.2 Bedeutung verschiedener IE1-Abschnitte für IFN-abhängige Immunantworten**

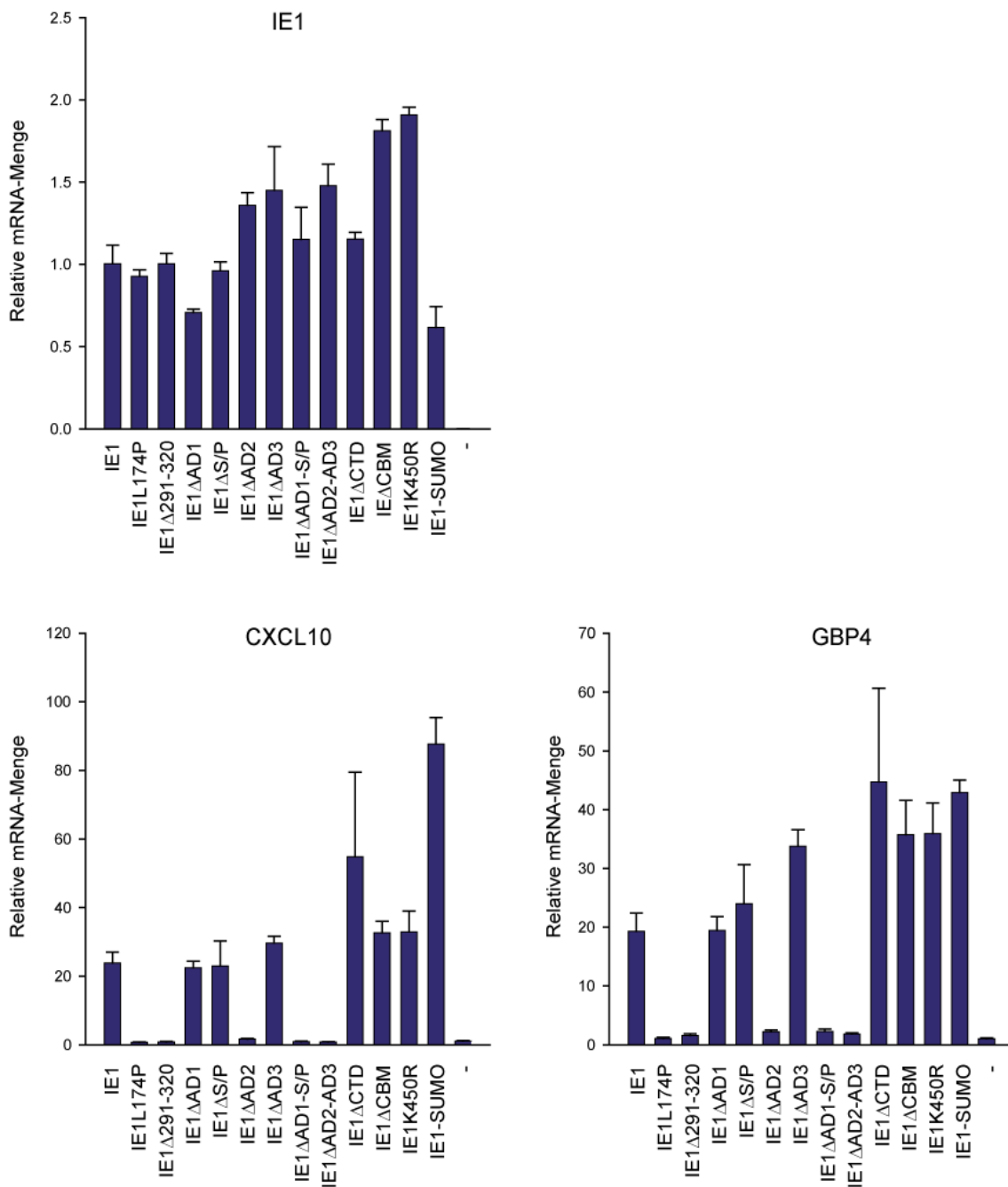
Nach Sicherstellung einer ausreichenden Expression der IE1-Mutanten wurden Versuche durchgeführt, die diejenigen Abschnitte im IE1-Protein identifizieren sollten, die für die Hochregulierung von Typ II-ISG verantwortlich sind. Darüber hinaus wurde untersucht, ob diese Bereiche auch für die Regulation STAT2- und STAT3-abhängiger JAK-STAT-Signalwege verantwortlich sind.

##### **4.1.2.1 Definierte IE1-Abschnitte vermitteln eine Aktivierung von Typ II-ISG**

Zunächst wurden die IE1-Mutanten daraufhin geprüft, ob sie noch in der Lage sind, eine Hochregulierung von Typ II-ISG zu bewirken. Dazu wurden TetR-IE1-Zellen im wachstumsarretierten Zustand für 72 h mit Doxycyclin behandelt. Im Anschluss daran wurde die mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben (3.6.7) und über qPCR quantifiziert (3.6.8). Dabei wurde ihr Anstieg in Bezug auf Zellen gemessen, die kein IE1-Fremdgen enthielten.

Im ersten Schritt wurde die relative Menge der mRNA für IE1 bestimmt, um sicherzustellen, dass diese für alle Konstrukte vergleichbar war (Abb. 4.4). Dabei stellte sich heraus, dass die meisten Mutanten IE1 in einer mit dem Wildtyp vergleichbaren oder sogar höheren Menge exprimierten. Einzig IE1 $\Delta$ AD1 und IE1-SUMO lagen etwas unter diesen Werten. Auch IE1L174P und IE1 $\Delta$ 291-320 lieferten mit dem IE1-Wildtyp vergleichbare Ergebnisse, obwohl sie im Western Blot (4.1.1.3) eine deutlich schlechtere Proteinexpression gezeigt hatten. Insgesamt lag demzufolge keine der Mutanten in ihrer IE1-Expression auf mRNA-Ebene so weit unterhalb des Wildtyps, dass die Ergebnisse der qPCR nicht mehr vergleichbar gewesen wären.

Im weiteren Verlauf wurde dann die relative mRNA-Menge für Typ II-ISG in den Proben gemessen. Exemplarisch für normalerweise durch IFN- $\gamma$ -stimulierte Gene wurde die Hochregulierung von CXCL10 und GBP4 untersucht (Abb. 4.4). Das Ergebnis lieferte den eindeutigen Nachweis, dass bestimmte IE1-Abschnitte für diesen Prozess von zentraler Bedeutung sind. Zwar hatten die meisten Mutationen in der Sequenz von IE1 keine Auswirkung auf eine Aktivierung dieser Gene und Mutanten wie IE1 $\Delta$ CTD, IE1 $\Delta$ CBM, IE1K450R und IE1-SUMO konnten die Typ II-ISG vor allem im GBP4-Versuch sogar stärker hochregulieren als der Wildtyp. Jedoch lagen auch einige Mutanten mit ihren Werten im Bereich der Negativkontrolle und waren nicht mehr in der Lage, einen Anstieg der Transkription der beiden Typ II-ISG zu bewirken. Diese Beobachtung traf auf IE1L174P, IE1 $\Delta$ 291-320, IE1 $\Delta$ AD2, IE1 $\Delta$ AD1-S/P und IE1 $\Delta$ AD2-AD3 zu. Da die Proteinexpression im Western Blot für IE1L174P und IE1 $\Delta$ 291-320 relativ niedrig war (4.1.1.3), kann man nur schwer eine Aussage darüber treffen, ob diese Regionen für die Hochregulierung von Typ II-ISG tatsächlich unmittelbar bedeutsam sind oder ob die Menge der exprimierten Proteine nicht mehr ausreicht, um die Funktion der Typ II-ISG-Aktivierung zu erhalten.



**Abb. 4.4: Einfluss der Mutationen im IE1-Gen auf die Hochregulierung von Typ II-ISG**

Wachstumsarretierte TetR-IE1-Zellen wurden für 72 h mit Doxycyclin behandelt. Nach Isolierung der mRNA aus den Zellen wurde diese mittels RT-qPCR quantifiziert. Dazu wurden Starteroligonukleotide verwendet, die spezifisch waren für IE1 oder CXCL10 bzw. GBP4 als exemplarische Vertreter von Typ II-ISG. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von je zwei biologischen und zwei technischen Replikaten, die zuvor auf das Haushaltsgen Tubulin normiert worden waren. Als Negativkontrolle dienten TetR-Zellen, die über kein IE1-Fremdgen verfügten (-).

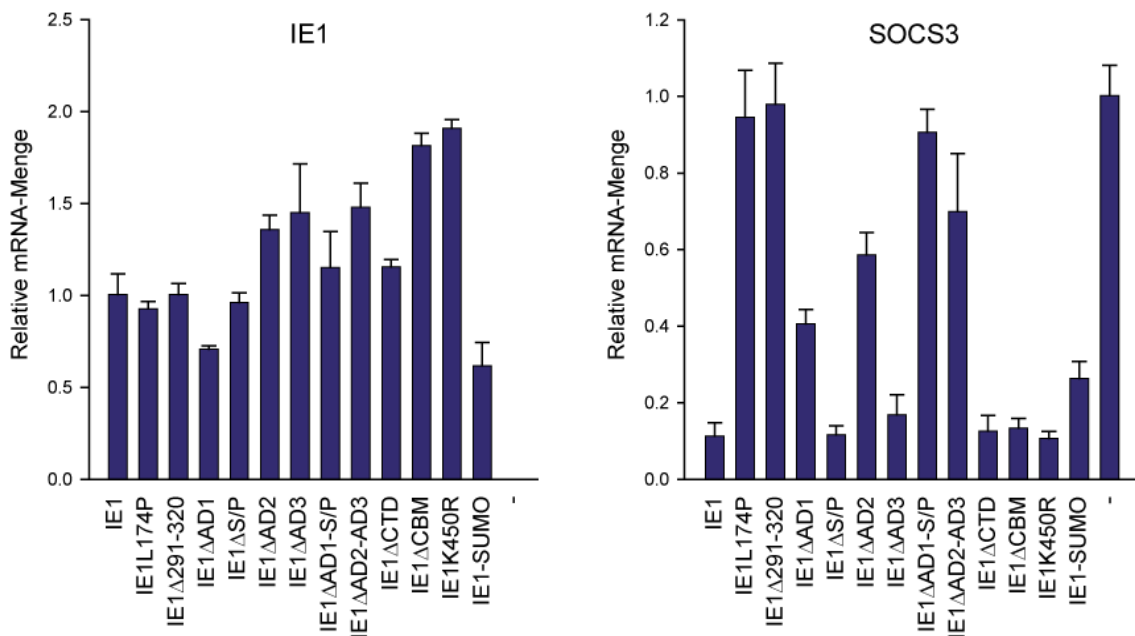
Im Gegensatz dazu schien die Mutante IE1 $\Delta$ AD2, nach den Ergebnissen von Western Blot (4.1.1.3) und qPCR (Abb. 4.4), keine Expressionsdefizite zu haben. Das bedeutet, dass diesem Abschnitt für die Stimulation von Typ II-ISG eine zentrale Rolle zukommt. In Übereinstimmung dazu zeigte die Mutante IE1 $\Delta$ AD2-AD3 das gleiche Defizit, wohingegen IE1 $\Delta$ AD3 alleine keine Funktionseinschränkungen aufwies. Interessanterweise wurde der Ausfall dieser Eigenschaft von IE1 auch bei IE1 $\Delta$ AD1-S/P deutlich, obwohl die einzelne Deletion der beiden Teilbereiche AD1 und S/P keinerlei Auswirkungen zu haben schien. Möglicherweise spielt hierbei das Teilstück zwischen AD1 und S/P oder zwischen S/P und AD2 eine Rolle oder die beiden Abschnitte können sich gegenseitig in dieser Funktion ersetzen, sodass nur ein Ausfall beider Regionen zusammen zum Funktionsverlust führt.

#### 4.1.2.2 Zusammenhang mit der Unterdrückung der SOCS3-Expression

Das Protein SOCS3 gehört zu einer Familie von Proteinen, die unter anderem den IFN- $\gamma$ -abhängigen Signalweg durch einen Eingriff in die JAK-STAT-Kaskade negativ regulieren. SOCS3 verhindert dabei die Phosphorylierung von STAT1 und damit dessen Translokation in den Zellkern (Song und Shuai, 1998; Alexander und Hilton, 2004). IE1 hingegen sorgt über eine Interaktion mit STAT3 für eine Unterdrückung der SOCS3-Expression (Knoblach, 2010; Reitsma et al., 2013). Dies legte die Vermutung nahe, dass IE1 eine Hemmung der SOCS3-Expression bewirkt, um über die daraus folgende vermehrte Phosphorylierung von STAT1 eine Aktivierung von Typ II-ISG erreichen zu können. Demzufolge wäre es denkbar, dass die Steuerung dieser beiden Prozesse (SOCS3-Repression und Typ II-ISG-Aktivierung) in den gleichen IE1-Abschnitten lokalisiert ist.

Um diesem Verdacht nachzugehen, wurde aus den Proben von 4.1.2.1 über RT-qPCR (3.6.8) die relative Menge an mRNA für SOCS3 bestimmt. Als Nachweis dafür, dass die Unterschiede nicht durch eine ungleichmäßige Expression von IE1 bei den verschiedenen Mutanten zustande kamen, ist hier noch einmal die mRNA für IE1 mit aufgeführt (Abb. 4.5). Wie erwartet, war die SOCS3-Expression im Vergleich zur Negativkontrolle für den IE1-Wildtyp entsprechend niedrig. Auch IE1 $\Delta$ S/P, IE1 $\Delta$ AD3, IE1 $\Delta$ CTD, IE1 $\Delta$ CBM und IE1K450R zeigten ähnlich niedrige Werte. Bei IE1-SUMO lag die mRNA-Menge für SOCS3 zwar leicht über dem Niveau des Wildtyps, erreichte aber bei weitem nicht die Werte der Negativkontrolle, sodass auch hier von einem Erhalt dieser Eigenschaft von IE1 ausgegangen werden konnte. Einen kompletten Funktionsverlust zeigten dagegen die Mutanten IE1L174P, IE1 $\Delta$ 291-320 und IE1 $\Delta$ AD1-S/P, wobei auch hier keine genaue Aussage über die tatsächliche Bedeutung von L174 und den Bereich zwischen Aminosäure 291 und 320 getroffen werden konnte (siehe 4.1.2.1). Eine Art Intermediärstellung nahmen bei diesem Versuch IE1 $\Delta$ AD1, IE1 $\Delta$ AD2 und IE1 $\Delta$ AD2-AD3 ein, bei denen die Ergebnisse in ihrer Höhe zwar nicht ganz an die Negativkontrolle heranreichten, aber doch deutlich über den Werten des Wildtyps lagen. Dabei war die Einschränkung bei IE1 $\Delta$ AD1 nicht ganz so groß wie bei den anderen beiden Mutanten.

Zusammenfassend lässt sich erkennen, dass die Ergebnisse hier nicht überall so eindeutig sind wie für die Hochregulierung der Typ II-ISG und vor allem quantitativ auch nicht exakt mit diesen korrelieren, obwohl gewisse Überlappungen vorhanden sind. Demzufolge ist es möglich, dass die Hochregulierung von Typ II-ISG und die Unterdrückung der SOCS3-Expression nicht über identische Abschnitte von IE1 vermittelt werden und diese beiden Vorgänge demzufolge auch nicht unmittelbar gekoppelt sein müssen. Allerdings könnte die SOCS3-Repression aufgrund dieser Daten durchaus einen gewissen Beitrag zur IE1-vermittelten Typ II-ISG-Aktivierung leisten.



**Abb. 4.5: Einfluss der Mutationen im IE1-Gen auf die Unterdrückung der SOCS3-Expression**

Wachstumsarretierte TetR-IE1-Zellen wurden für 72 h mit Doxycyclin behandelt. Nach Isolierung der mRNA aus den Zellen wurde diese mittels RT-qPCR-Verfahren quantifiziert. Dazu wurden Starteroligonukleotide verwendet, die spezifisch waren für IE1 bzw. SOCS3. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von je zwei biologischen und zwei technischen Replikaten, die zuvor auf das Haushaltsgen Tubulin normiert worden waren. Als Negativkontrolle dienten TetR-Zellen ohne IE1-Fremdgen (-).

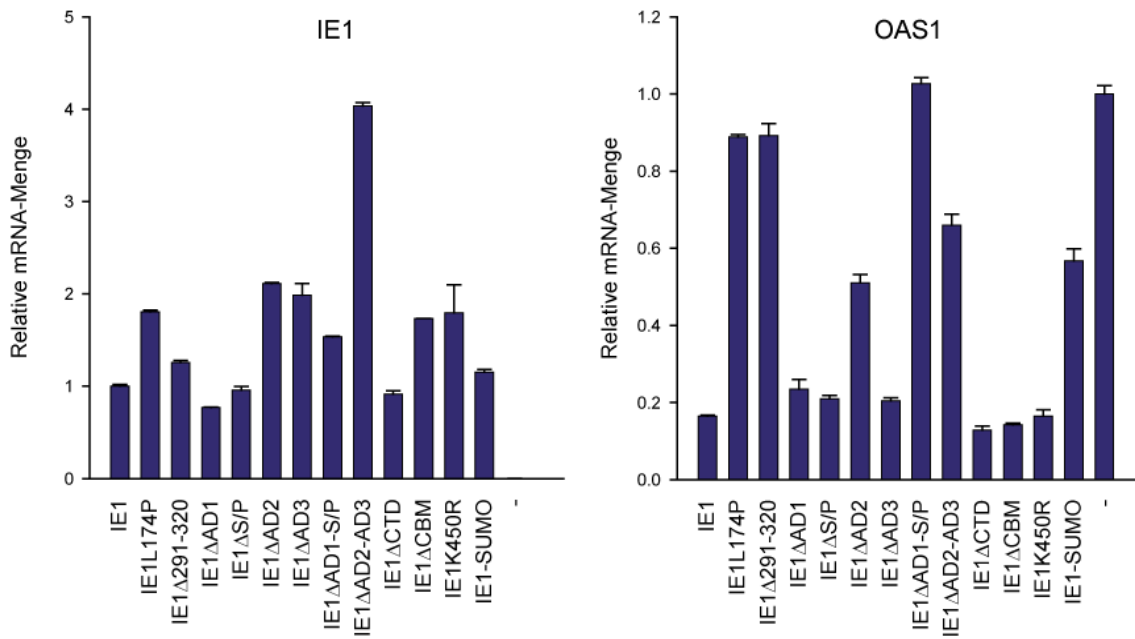


#### 4.1.2.3 Zusammenhang mit der Unterdrückung der OAS1-Aktivierung

Das IE1-Protein greift jedoch nicht nur in Signalwege ein, die über IFN- $\gamma$  aktiviert werden, sondern ist über die Bindung von STAT2 auch an einer Hemmung der Transkription Typ I-IFN- (IFN- $\alpha$ - und IFN- $\beta$ -) abhängiger Gene beteiligt (Paulus et al., 2006; Huh et al., 2008; Krauss et al., 2009). Da beide Prozesse wahrscheinlich über definierte Domänen des C-terminalen Endes von IE1 vermittelt werden, stellte sich die Frage, inwiefern die Blockade des Typ I-IFN-Signalweges mit der Hochregulierung von Typ II-ISG zusammenhängt und ob dafür dieselben Abschnitte von IE1 zuständig sind.

Um diesem Sachverhalt genauer nachzugehen, wurde, exemplarisch für ein Typ I-IFN-aktiviertes Gen, die relative Menge für die mRNA von OAS1 bestimmt. Dazu wurden TetR-IE1-Zellen im wachstums-arretierten Zustand für 72 h mit Doxycyclin behandelt. Vierundzwanzig Stunden vor dem Ernten der Zellen wurde IFN- $\alpha$  zugegeben, um die Transkription des OAS1-Gens zu aktivieren. Nach Isolierung der mRNA wurde diese im Hinblick auf IE1 und OAS1 über RT-qPCR quantifiziert (3.6.7, 3.6.8) (Abb. 4.6). Die Messungen ließen für IE1 auch hier eine gewisse Streuung um das Ergebnis des Wild-typs erkennen, wobei die meisten Mutanten aber eher darüber lagen, sodass eine Vergleichbarkeit aller IE1-Konstrukte gegeben war. Bei der Ermittlung der mRNA-Menge für OAS1 zeigte der IE1-Wild-typ im Vergleich zur Negativkontrolle, wie erwartet, relativ niedrige Werte, da die Expression durch eine Blockade des IFN- $\alpha$ -Signals unterdrückt wird. Auch die Mutanten IE1 $\Delta$ AD1, IE1 $\Delta$ S/P, IE1 $\Delta$ AD3, IE1 $\Delta$ CTD, IE1 $\Delta$ CBM und IE1K450R lagen in diesem Bereich. Im Gegensatz dazu zeigten IE1L174P, IE1 $\Delta$ 291-320, IE1 $\Delta$ AD2, IE1 $\Delta$ AD1-S/P, IE1 $\Delta$ AD2-AD3 und IE1-SUMO deutlich erkennbare Einschränkungen darin, die Transkription von OAS1 zu verhindern. Vor allem IE1L174P, IE1 $\Delta$ 291-320 und IE1 $\Delta$ AD1-S/P präsentierten sich auf gleichem Niveau wie die Negativkontrolle, wohingegen IE1 $\Delta$ AD2, IE1 $\Delta$ AD2-AD3 und IE1-SUMO noch eine gewisse Restaktivität aufwiesen.

Damit zeigt dieser Versuch zwar ähnliche Ergebnisse wie für die Hochregulierung der Typ II-ISG, allerdings ist keine exakte Korrelation vorhanden, da hier zum einen das Funktionsdefizit für IE1 $\Delta$ AD2 und IE1 $\Delta$ AD2-AD3 weniger stark ausgeprägt ist und zum anderen die Mutante IE1-SUMO Auffälligkeiten zeigte, die bei der Induktion einer IFN- $\gamma$ -ähnlichen Antwort nicht vorhanden waren. Damit ist es einerseits nicht unwahrscheinlich, dass das Eingreifen von IE1 in verschiedene IFN-stimulierte Signalkaskaden über unterschiedliche Mechanismen abläuft und dafür nicht in beiden Fällen genau dieselben Regionen auf dem IE1-Protein verantwortlich sind. Andererseits dürften bestimmte Überlappungen zwischen OAS1-, SOCS3- (4.1.2.2) und Typ II-ISG-Regulierung (4.1.2.1) durch IE1 bestehen, die sich möglicherweise gegenseitig in ihrer Funktion unterstützen.



**Abb. 4.6: Einfluss von Mutationen im IE1-Gen auf die Unterdrückung der Expression von OAS1**

Wachstumsarretierte TetR-IE1-Zellen wurden für 72 h mit Doxycyclin und für 24 h mit IFN- $\alpha$  (1000 U/ml) behandelt. Nach Isolierung der mRNA aus den Zellen wurde diese mittels RT-qPCR quantifiziert. Dazu wurden Starteroligonukleotide verwendet, die spezifisch waren für IE1 bzw. OAS1. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von je zwei biologischen und zwei technischen Replikaten, die zuvor auf das Haushaltsgen Tubulin normiert worden waren. Als Negativkontrolle dienten TetR-Zellen ohne IE1-Fremdgen (-).

### 4.1.3 Interaktion zwischen IE1 und STAT1

Wie eingangs bereits erläutert, führt die Stimulation von Zellen mit IFN- $\gamma$  zu einer Phosphorylierung von STAT1, was eine verstärkte Translokation dieses Proteins in den Zellkern nach sich zieht und dort die Transkription von Typ II-ISG aktiviert (Schroder et al., 2004; Saha et al., 2010). Auch IE1 nutzt diesen Weg und bewirkt eine Phosphorylierung von STAT1 an Y701 und S727, wobei vor allem erstere eine entscheidende Rolle für die Hochregulierung von Typ II-ISG spielt. Die Modifikation an S727 scheint dagegen nur eine unterstützende Funktion zu haben (Knoblach et al., 2011). Ob eine intrazelluläre Kolo­kalisierung oder sogar eine direkte oder indirekte Bindung von IE1 und STAT1 für diese Vorgänge notwendig ist, ist derzeit noch nicht bekannt und sollte deshalb im Folgenden genauer untersucht werden.

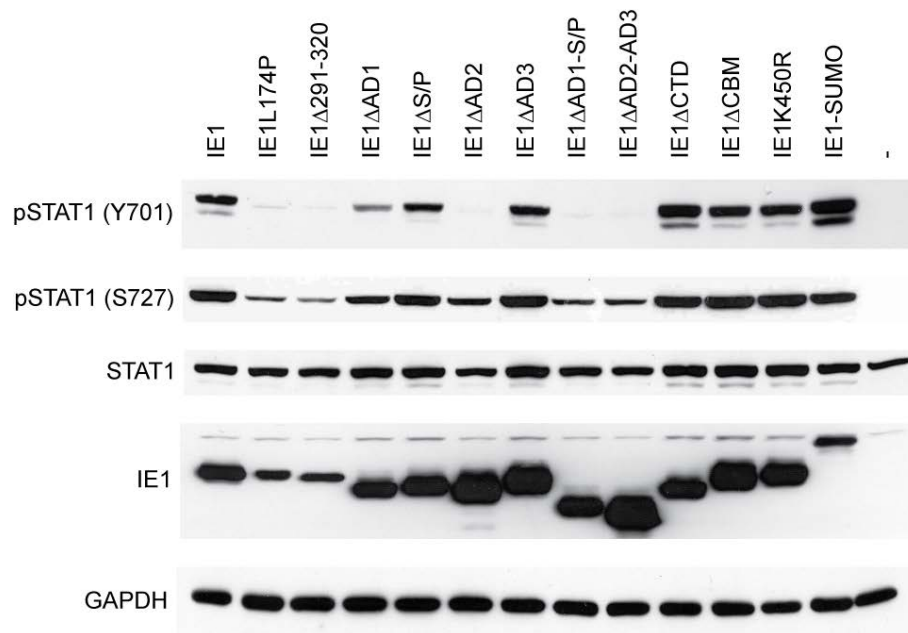
#### 4.1.3.1 Definierte IE1-Abschnitte sind essenziell für die Phosphorylierung von STAT1

Anfangs stellte sich jedoch die Frage, welche Abschnitte des IE1-Proteins für die Phosphorylierung von STAT1 an Y701 und S727 wichtig sind und ob diese identisch sind mit jenen, die für eine Hochregulierung der Typ II-ISG gebraucht werden. Dazu wurden wachstumsarretierte TetR-IE1-Zellen für 96 h mit Doxycyclin behandelt. Die daraus gewonnenen Proteinextrakte wurden anschließend über SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot-Verfahren mit Hilfe modifikationsspezifischer Antikörper analysiert (3.7.2, 3.7.3, 3.7.4) (Abb. 4.7).

Die Betrachtung der Menge an Gesamt-STAT1 in den jeweiligen Zellen machte deutlich, dass dieses Protein überall in ungefähr äquivalenten Mengen exprimiert wurde. Ähnlich verhielt es sich bei IE1 mit Ausnahme der Mutanten IE1L174P, IE1 $\Delta$ 291-320 und IE1-SUMO, von denen bereits bekannt war, dass ihre Expression weit unter der des Wildtyps liegt (4.1.1.3). Auch der als Ladekontrolle verwendete Nachweis der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), die grundsätzlich in jeder Zelle exprimiert wird, gab keinen Hinweis auf Unterschiede bezüglich der Zellzahl in den einzelnen Proben, sodass man insgesamt von vergleichbaren Versuchsbedingungen für alle untersuchten Zelllinien ausgehen konnte.

Bei den Proteinmengen für Y701-phosphoryliertes STAT1 fielen jedoch deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen IE1-Konstrukten auf. Die Mutanten IE1 $\Delta$ S/P, IE1 $\Delta$ AD3, IE1 $\Delta$ CTD, IE1 $\Delta$ CBM, IE1K450R und IE1-SUMO zeigten, wie der Wildtyp, eine deutlich erkennbare Bande für phosphoryliertes STAT1 (Y701), wohingegen diese bei IE1L174P, IE1 $\Delta$ 291-320, IE1 $\Delta$ AD2, IE1 $\Delta$ AD1-S/P und IE1 $\Delta$ AD2-AD3 kaum oder gar nicht zu erkennen war. Somit lag hier bei exakt denselben Mutanten ein Funktionsdefizit vor, bei denen schon zuvor über qPCR kein Anstieg der mRNA von Typ II-ISG gemessen werden konnte (4.1.2.1). Lediglich die leichte Abschwächung der Bande bei IE1 $\Delta$ AD1 ist nicht ganz konsistent.

Ein vergleichbares Ergebnis lieferten die Proteinbanden für S727-phosphoryliertes STAT1, wenngleich der Unterschied zwischen den einzelnen Konstrukten nicht ganz so auffällig war. Obwohl in allen Spuren zumindest Reste an S727-phosphoryliertem STAT1 vorhanden waren, sah man doch eindeutig die Differenz zwischen aktiven und inaktiven IE1-Mutanten. Zusammenfassend kann man also sagen, dass für die Phosphorylierungsvorgänge an STAT1 an beiden Positionen (Y701 und S727) dieselben Abschnitte im IE1-Protein verantwortlich sind wie für die Hochregulierung der Typ II-ISG.



**Abb. 4.7: Auswirkungen der Mutationen im IE1-Gen auf die Phosphorylierung von STAT1 an Y701 und S727**

TetR-IE1-Zellen wurden im wachstumsarretierten Zustand für 96 h mit Doxycyclin behandelt. Die daraus gewonnenen Proteinextrakte wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot-Verfahren mit Hilfe modifikationsspezifischer Antikörper gegen phosphoryliertes STAT1 (pSTAT1) (Y701), pSTAT1 (S727) sowie STAT1 (gesamt) und IE1 analysiert. Der Nachweis von GAPDH diente als Ladekontrolle. Als Negativkontrolle wurden TetR-Zellen ohne IE1-Fremdgen verwendet (-).

#### 4.1.3.2 Definierte IE1-Abschnitte vermitteln eine nukleäre Akkumulation von STAT1

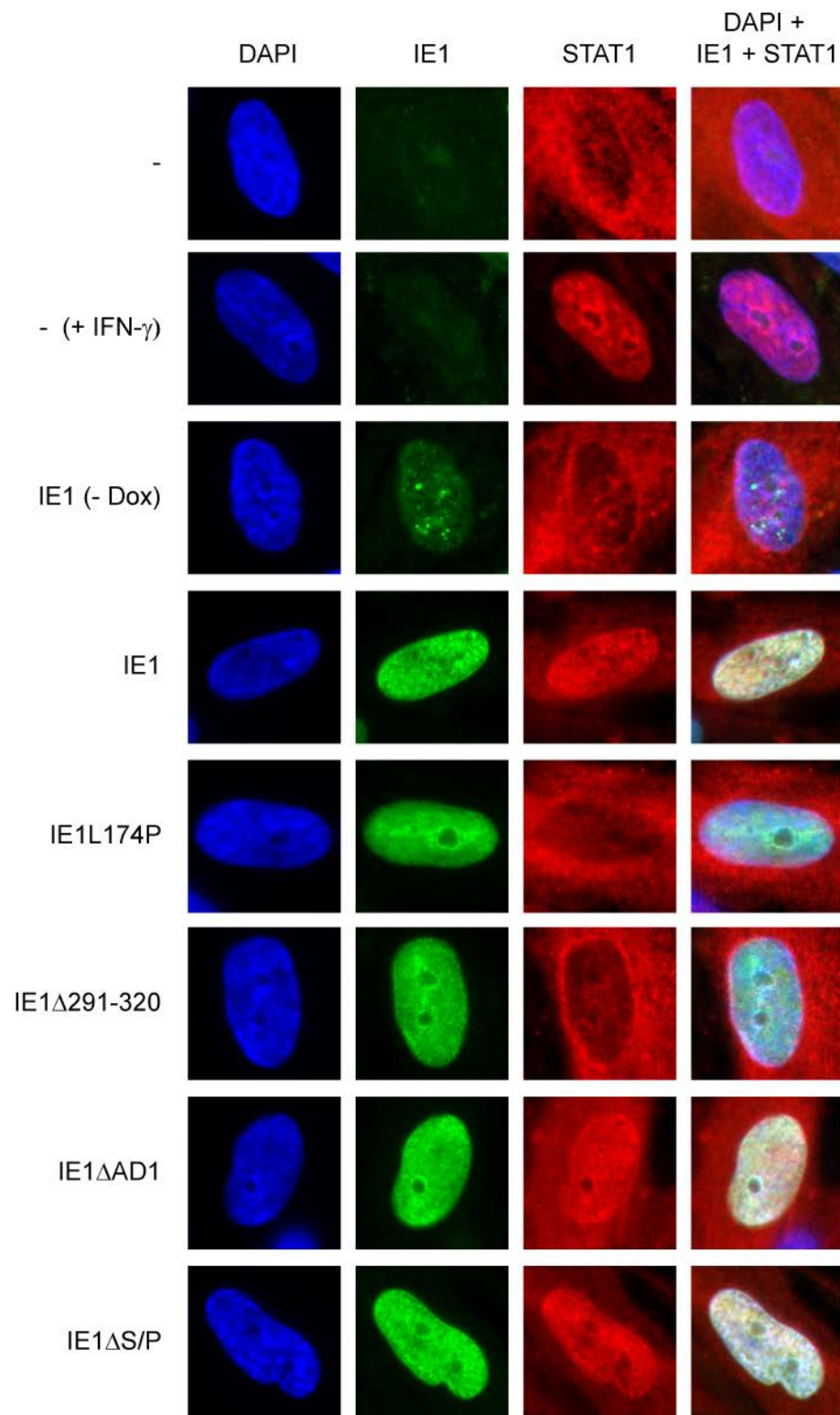
Da unter normalen Umständen eine Y701-Phosphorylierung von STAT1 zu dessen Translokation in den Zellkern führt, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob diejenigen IE1-Mutanten, die eine Phosphorylierung von STAT1 bewirken, auch dessen nukleäre Akkumulation hervorrufen können.

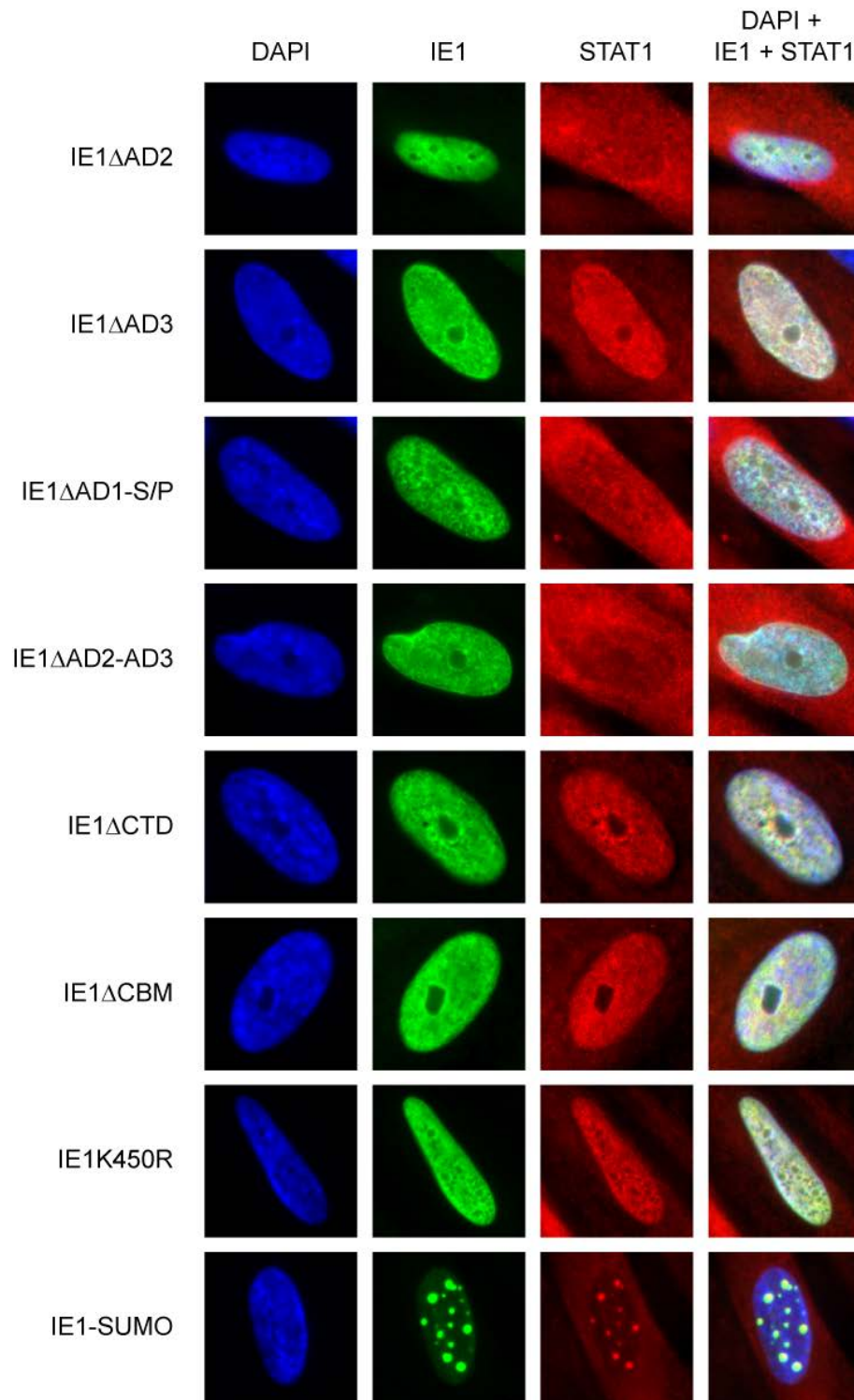
Um diesen Sachverhalt aufzuklären, wurde ein dichter Zellrasen von TetR-IE1-Zellen für 96 h mit Doxycyclin behandelt. Als Negativkontrolle dienten TetR-IE1-Wildtyp-Zellen, die zuvor nicht mit Doxycyclin inkubiert worden waren und daher nur wenig IE1 exprimierten, sowie TetR-Zellen, die über keine IE1-DNA verfügten. Letztere wurden in einem zweiten Reaktionsansatz als Positivkontrolle für 30 min mit IFN- $\gamma$  behandelt, das bekanntermaßen eine Akkumulation von STAT1 im Zellkern bewirkt (Schroder et al., 2004; Saha et al., 2010). Alle Präparate wurden mit Methanol fixiert, über eine indirekte Reaktion mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern gefärbt und im inversen

Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Als Marker für den Zellkern diente dabei der DNA-Farbstoff DAPI (3.7.1).

Wie erwartet bewirkte IFN- $\gamma$  in der Positivkontrolle eine starke nukleäre Anreicherung von STAT1, wohingegen das Protein in beiden Negativkontrollen zwar im Zytoplasma, aber kaum im Zellkern nachgewiesen werden konnte (Abb. 4.8). Eine starke Expression von nicht mutiertem IE1 hatte hingegen eine nukleäre Translokation von STAT1 zur Folge, was deutlich an der stärkeren Rotfärbung des Zellkerns im Vergleich zu den Negativkontrollen ohne IE1-DNA bzw. mit nicht induzierter IE1-Expression zu erkennen war. Ein vergleichbares Muster wiesen auch die Zellkerne der Mutanten IE1 $\Delta$ AD1, IE1 $\Delta$ S/P, IE1 $\Delta$ AD3, IE1 $\Delta$ CTD, IE1 $\Delta$ CBM und IE1K450R auf, in denen sich das STAT1-Protein genauso wie beim Wildtyp und der Positivkontrolle diffus verteilte. Allerdings konnte dieses Phänomen nur zuverlässig beobachtet werden, wenn ein hohes Maß an IE1-Expression in der jeweiligen Zelle vorlag. Das IE1-Protein akkumulierte dagegen bei fast allen Mutanten, genauso wie beim Wildtyp, im Zellkern und lag dort in diffuser Verteilung vor. Die einzige Ausnahme bildete IE1-SUMO: Hier war zwar deutlich die Anreicherung von IE1 und STAT1 im Zellkern zu sehen, allerdings nicht diffus wie bei allen anderen Präparaten, sondern ausschließlich in einer punktförmigen Anordnung. Dieses Muster wurde für IE1 in verschiedenen Versuchsansätzen noch öfter beobachtet und sollte später als Kolo-kalisation zwischen IE1 und PML-Körpern identifiziert werden (4.1.4.1). Auffällig war dabei, dass die punktförmigen Ansammlungen von IE1 und STAT1 nach Überlagerung der Farbkanäle komplett überlappten, was auf eine Interaktion zwischen IE1 und STAT1 an den PML-Körpern hindeuten könnte.

Dagegen waren IE1L174P, IE1 $\Delta$ 291-320, IE1 $\Delta$ AD2, IE1 $\Delta$ AD1-S/P und IE1 $\Delta$ AD2-AD3 nicht mehr in der Lage, STAT1 in den Zellkern zu rekrutieren, auch wenn dies vor allem bei IE1 $\Delta$ AD2, IE1 $\Delta$ AD1-S/P und IE1 $\Delta$ AD2-AD3 nicht ganz so gut sichtbar war wie bei der Negativkontrolle. Bei diesen Mutanten war immer noch ein leichter „Schleier“ an STAT1-Protein im Kern zu sehen. Dennoch wurde hier niemals eine Akkumulation im Umfang der Positivkontrolle oder des IE1-Wildtyps erreicht. Dadurch fielen auch hier wiederum exakt dieselben Mutanten durch ein Funktionsdefizit auf wie bereits in den Versuchen zuvor. Die einzige Ausnahme hiervon bildete IE1-SUMO, das zwar keinen Ausfall, aber dennoch ein äußerst ungewöhnliches Verhalten zeigte.





**Abb. 4.8: Einfluss von Mutationen im IE1-Gen auf die nukleäre Akkumulation von STAT1**

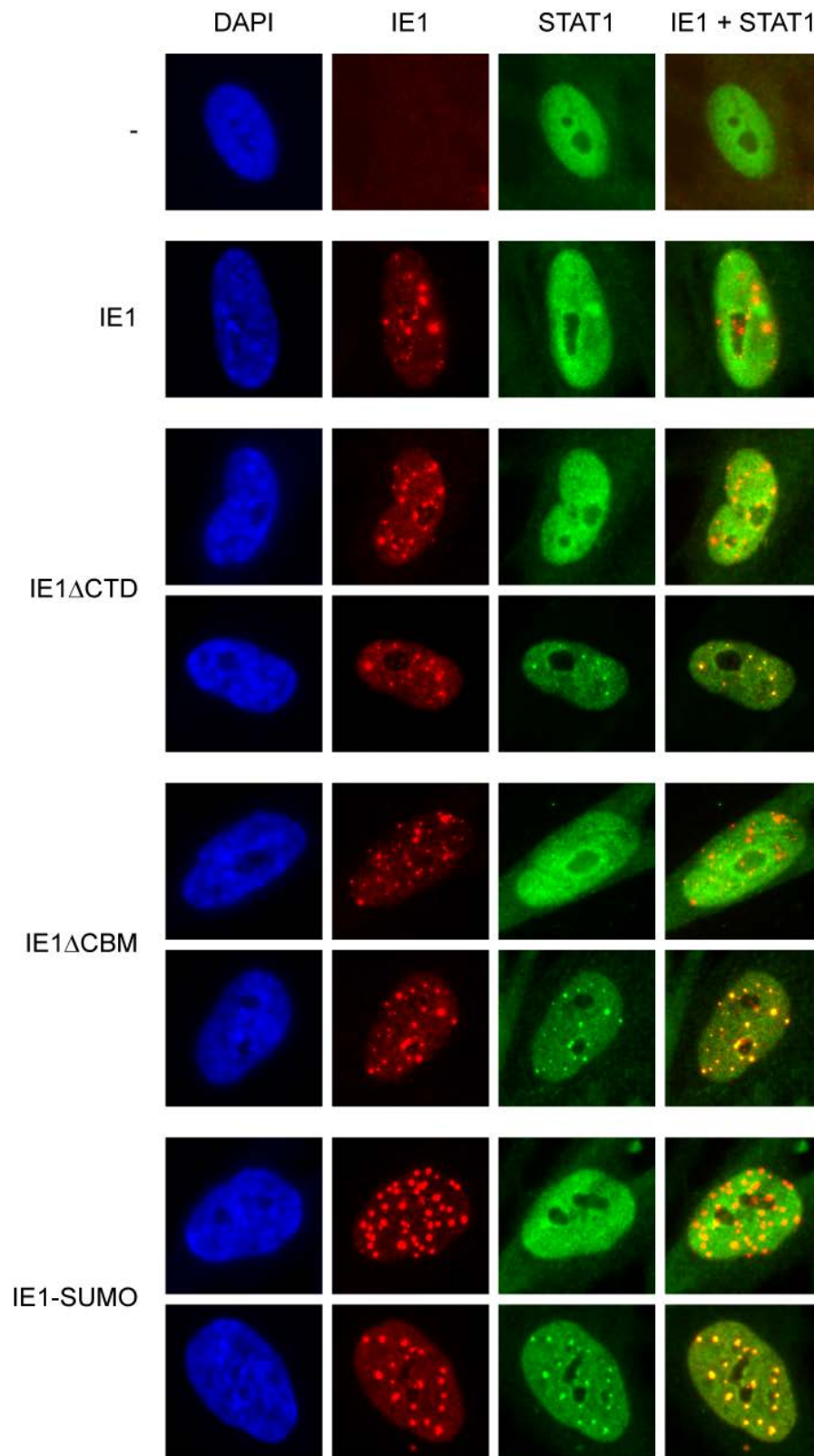
Wachstumsarretierte TetR-IE1-Zellen wurden für 96 h mit Doxycyclin behandelt oder im Fall einer Negativkontrolle unbehandelt gelassen (IE1 (-Dox)). Als zweite Negativkontrolle dienten TetR-Zellen, die kein IE1 enthalten (-), die aber trotzdem mit Doxycyclin behandelt worden waren. Für die Positivkontrolle wurden TetR-Zellen ohne IE1-Fremdgen für 30 min mit IFN- $\gamma$  (1000 U/ml) inkubiert (- (+ IFN- $\gamma$ )). Anschließend wurden alle Zellen mit Methanol fixiert und über indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert. Dazu wurden die Zielproteine mit Hilfe von polyklonalen Kaninchen-Antikörpern gegen STAT1 und monoklonalen Maus-Antikörpern gegen IE1 sowie über Kaninchen-spezifische Alexa Fluor 594-konjugierte (rot fluoreszierende) bzw. Maus-spezifische Alexa Fluor 488-konjugierte (grün fluoreszierende) Sekundärantikörper farblich markiert. Zur Identifikation des Zellkerns wurde die DNA mit DAPI blau angefärbt.

#### 4.1.3.3 Kolokalisation von IE1 $\Delta$ CTD, IE1 $\Delta$ CBM und IE1-SUMO mit STAT1 an PML-Körpern

Da die Mutante IE1-SUMO im vorherigen Versuch (4.1.3.2) bereits Anhaltspunkte dafür geliefert hatte, dass eine Kolokalisation von IE1 und STAT1 an den PML-Körpern im Zellkern an der Hochregulierung von Typ II-ISG beteiligt sein könnte, wurde dieser Sachverhalt nun genauer analysiert. Zu diesem Zweck wurden TetR-IE1-Zellen einen Tag nach ihrer Aussaat für 20 min mit einer hohen Dosis an IFN- $\gamma$  inkubiert, um eine Akkumulation großer Mengen an STAT1 im Zellkern zu bewirken. Direkt im Anschluss daran wurden die Präparate mit Methanol fixiert und IE1 und STAT1 mittels Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelter Antikörper indirekt angefärbt (3.7.1). Als Negativkontrolle dienten TetR-Zellen ohne IE1-Fremdgen. Auf eine vorherige Behandlung der Zellen mit Doxycyclin wurde verzichtet, um die PML-Körper nicht IE1-vermittelt zu zerstören.

Bei der Betrachtung im Mikroskop konnte zunächst anhand der Negativkontrolle nachgewiesen werden, dass die Wirkung von IFN- $\gamma$  wie vorgesehen eingetreten war, da hier eine deutliche nukleäre Anreicherung von STAT1 sichtbar war, obwohl die Zellen kein IE1 exprimierten (Abb. 4.9). Das gleiche Bild bezüglich STAT1 bot sich auch bei allen anderen Präparaten. In der IE1-Färbung zeigte sich für den Wildtyp das für eine frühe Infektionsphase typische Punktmuster, das vermutlich auf eine Bindung zwischen IE1 und PML zurückgeht, bevor das hCMV-Protein die PML-Körper im weiteren Verlauf einer Infektion auflöst. Diese Anordnung war mit Ausnahme von IE1L174P und IE1 $\Delta$ 291-320 auch bei allen anderen Mutanten zu sehen (Abb. 4.9 und Daten nicht gezeigt). Die spannende Frage war jedoch, ob STAT1 ebenfalls an den PML-Körpern nachweisbar ist oder lediglich in diffuser Verteilung im Kern vorkommt. Dabei konnte für den IE1-Wildtyp keine Kolokalisation von STAT1 und IE1 an den PML-Körpern gefunden werden, da alle Zellkerne, in denen IE1 im typischen Punktmuster zu sehen war, STAT1 ausschließlich in unstrukturierter Form über den gesamten Zellkern verteilt erkennen ließen. Fast alle anderen Mutanten zeigten ebenfalls keinen Hinweis auf eine Kolokalisation von IE1 und STAT1 (Daten nicht gezeigt). Jedoch waren in den Präparaten von IE1 $\Delta$ CTD, IE1 $\Delta$ CBM und IE1-SUMO vereinzelt Zellen zu finden, in denen IE1 in großer Menge an die PML-Körper gebunden hatte. Dort wurde auch STAT1 teilweise in Punktform entdeckt. Bei einer Überlagerung der Farbkanäle von IE1 und STAT1 stellte sich heraus, dass beide Darstellungen in diesem Bereich überlappten. Bei der Mehrzahl der Zellkerne verhielt es sich jedoch ähnlich wie bereits für den Wildtyp beschrieben. Dennoch lassen diese Beobachtungen die Vermutung zu, dass zwischen IE1 und STAT1 eine Wechselwirkung besteht. Möglicherweise bedarf es dafür allerdings einer hohen Expression von IE1, die in den hier verwendeten Zellen durch Unterlassen einer Behandlung mit Doxycyclin nicht immer gegeben war.





**Abb. 4.9: Kolokalisationsanalyse zwischen IE1 und STAT1 an PML-Körpern**

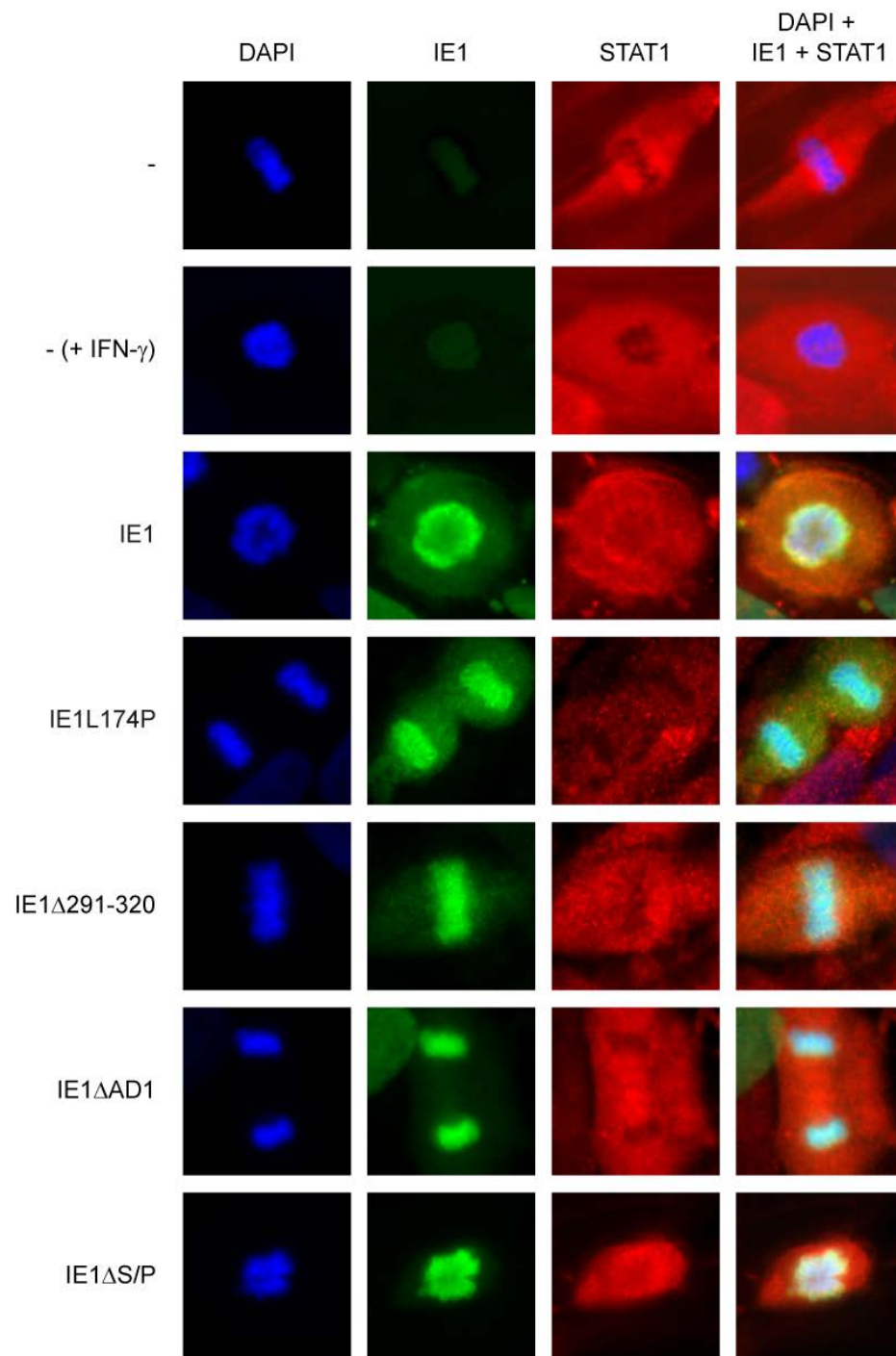
TetR-IE1-Zellen wurden ohne vorherige Behandlung mit Doxycyclin einen Tag nach ihrer Aussaat auf Deckgläschen für 20 min mit IFN- $\gamma$  (1000 U/ml) inkubiert und mit Methanol fixiert. Durch Inkubation mit dem monoklonalen Maus-Antikörper MAB810R gegen IE1 und dem polyklonalen Kaninchen-Antikörper sc-346X gegen STAT1 wurden die Zielproteine identifiziert und über eine Reaktion mit Maus-spezifischen Alexa Fluor 594-konjugierten (rot fluoreszierenden) und Kaninchen-spezifischen Alexa Fluor 488-konjugierten (grün fluoreszierenden) Sekundärantikörpern farblich markiert. Zur Identifikation des Zellkerns wurde die DNA mittels DAPI blau angefärbt. Als Negativkontrolle dienten TetR-Zellen, die kein IE1-Fremdgen enthielten (-).

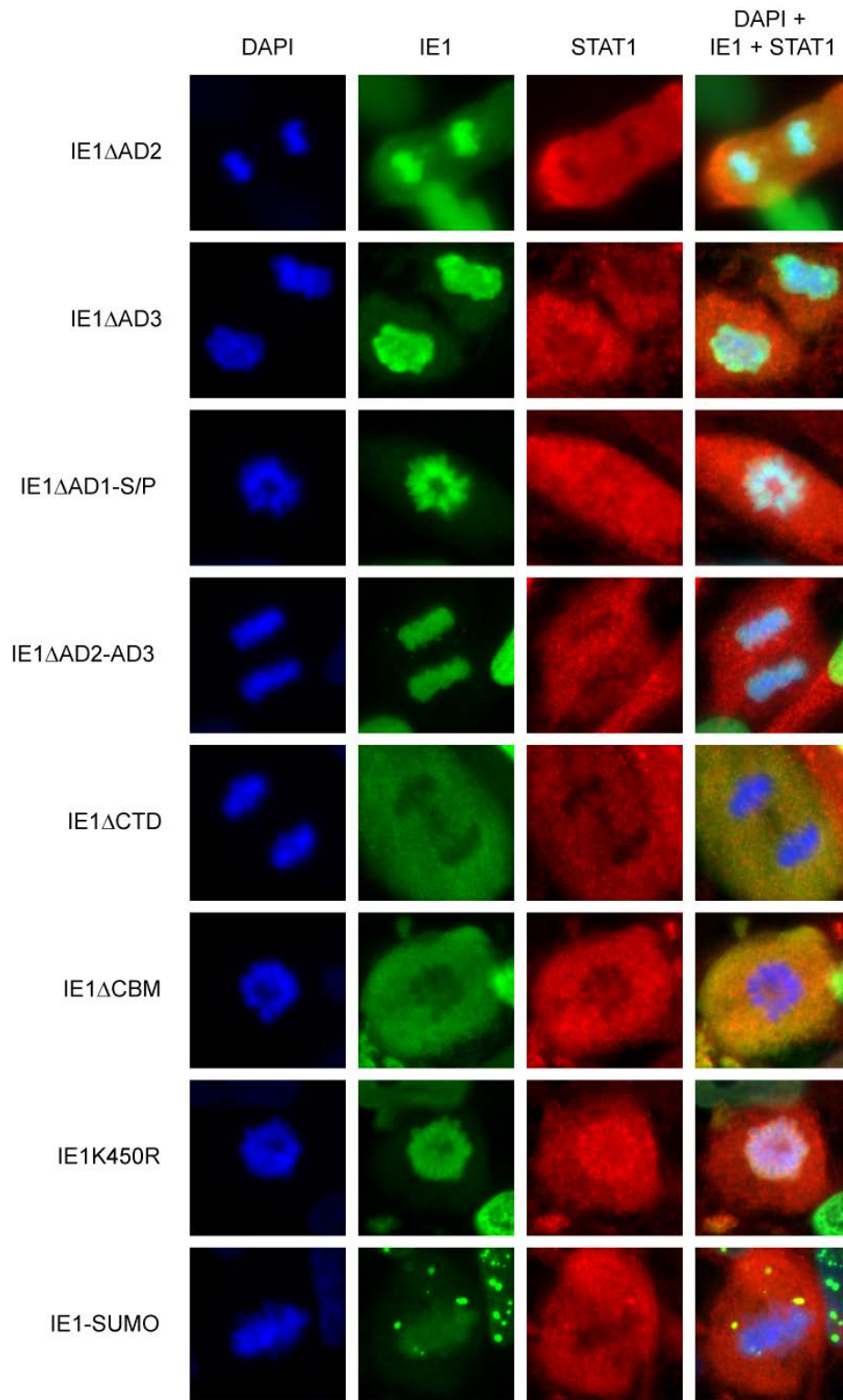
#### 4.1.3.4 Hinweise auf eine Kolokalisation von STAT1 und bestimmten IE1-Varianten am mitotischen Chromatin

Für das IE1-Protein ist schon seit langem bekannt, dass es die Eigenschaft besitzt an Chromatin zu binden und auch PML dorthin rekrutieren kann (Lafemina et al., 1989; Ahn et al., 1998). Für STAT1 ist dagegen bis jetzt keine Interaktion mit mitotischem Chromatin beschrieben. Um in einem weiteren Versuch der Möglichkeit einer Kolokalisation von IE1 und STAT1 nachzugehen, wurden die Immunfluoreszenzpräparate aus 4.1.3.2 daraufhin untersucht, ob IE1 in der Lage ist, auch STAT1 an mitotisches Chromatin zu dirigieren.

Wie aus Abb. 4.10 ersichtlich ist, nimmt STAT1 in Abwesenheit von IE1 selbst nach Stimulation mit IFN- $\gamma$  keinen nachweisbaren Kontakt zum Chromatin mitotischer Zellen auf (- (+ IFN- $\gamma$ )). Bei den übrigen Präparaten zeigten der IE1-Wildtyp und die meisten Mutanten nach der Inkubation mit Doxycyclin für 96 h eine deutliche Bindung an Chromatin in Mitosefiguren. Selbst bei IE1L174P und IE1 $\Delta$ 291-320 konnte dies beobachtet werden, obwohl sich die beiden Mutanten bisher in allen Versuchen als funktionslos erwiesen hatten. Nur IE1 $\Delta$ CTD und IE1 $\Delta$ CBM zeigten wie erwartet eine Aussparung am mitotischen Chromatin, da hier der entscheidende Abschnitt für diese Aktivität mutiert worden war. Daher konnte bei den beiden Mutanten keine Aussage über eine Kolokalisation mit STAT1 in diesem Bereich getroffen werden. Auch IE1-SUMO schien Schwierigkeiten zu haben, eine stabile Bindung an Chromatin aufzubauen. Man konnte zwar eine Anreicherung dieses Proteins um die kondensierten Chromosomen erkennen, diese stellte sich aber vergleichsweise diffus und weniger stark konzentriert dar als bei den anderen Formen von IE1. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass die CTD durch die Fusion mit SUMO-1 in ihrer Funktion behindert wird.

Obwohl demzufolge der Großteil der IE1-Mutanten noch dazu fähig ist, selbst an mitotisches Chromatin zu binden, konnte nur in wenigen Präparaten eine Kolokalisation mit STAT1 nachgewiesen werden. Meist zeigte sich eine zentrale Aussparung für STAT1 an den Chromosomen. Allerdings entstand bei manchen Zellen der Eindruck, als ob sich ein kleiner Anteil von STAT1 um das IE1-Protein am mitotischen Chromatin konzentriert, wie man besonders gut beim IE1-Wildtyp und den Mutanten IE1 $\Delta$ S/P und IE1K450R erkennen konnte (Abb. 4.10). Dieser Aspekt wiederum spricht sehr stark für eine Kolokalisation von IE1 und STAT1 und vermittelt den Eindruck, dass STAT1 zwar eventuell nicht selbst an mitotisches Chromatin binden kann, jedoch vor allem in Randbereichen mit IE1 kolokalisiert.



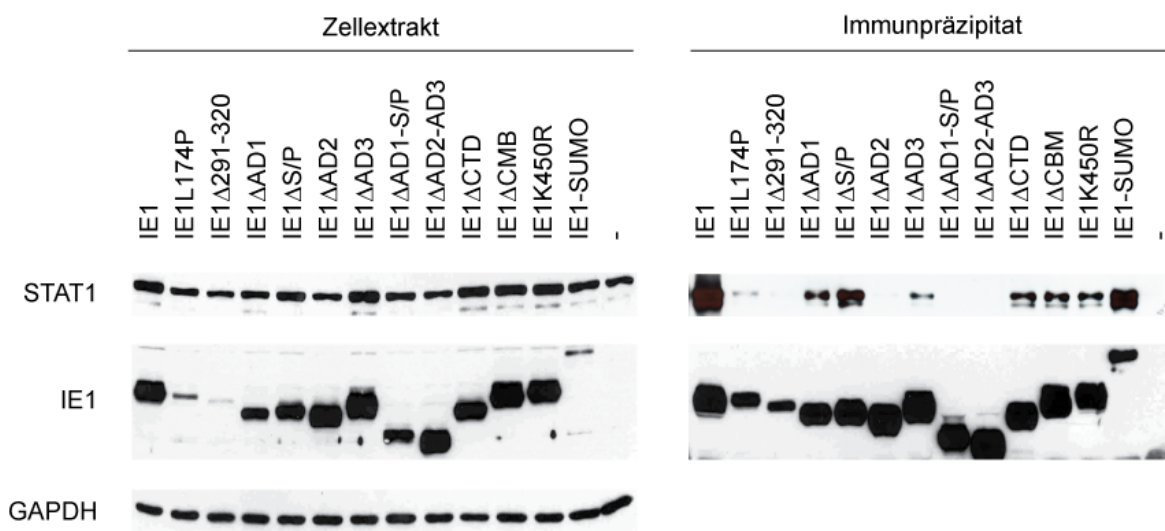


**Abb. 4.10: Kolokalisationsanalyse von STAT1 und IE1 an mitotischem Chromatin**

Wachstumsarretierte TetR-IE1-Zellen wurden für 96 h mit Doxycyclin behandelt oder im Fall einer Negativkontrolle unbehandelt gelassen (IE1 (-Dox)). Als zweite Negativkontrolle dienten TetR-Zellen ohne IE1-Fremdgen (-), die aber trotzdem mit Doxycyclin behandelt worden waren. Für die Positivkontrolle wurden TetR-Zellen ohne IE1-Fremdgen für 30 min mit IFN- $\gamma$  (1000 U/ml) inkubiert (- (+ IFN- $\gamma$ )). Anschließend wurden die Zellen mit Methanol fixiert und über indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert. Dazu wurden die Zielproteine mit Hilfe von polyklonalen Kaninchen-Antikörpern gegen STAT1 und monoklonalen Maus-Antikörpern gegen IE1 sowie Kaninchen-spezifischen Alexa Fluor 594-konjugierten (rot fluoreszierenden) bzw. Maus-spezifischen Alexa Fluor 488-konjugierten (grün fluoreszierenden) Sekundärantikörpern markiert. Zur Identifikation von Mitosefiguren wurde die DNA mittels DAPI blau angefärbt.

#### 4.1.3.5 Nachweis einer Interaktion zwischen IE1 und STAT1

Damit endgültig geklärt werden konnte, ob für die Aktivierung von Typ II-ISG eine direkte oder indirekte Wechselwirkung zwischen IE1 und STAT1 notwendig ist, wurde der Versuch unternommen, mit der Methode der Co-IP eine Interaktion zwischen beiden Proteinen nachzuweisen. Dafür wurden pro IE1-Konstrukt zwei Schalen wachstumsarretierter TetR-IE1-Zellen für 96 h mit Doxycyclin induziert. Durch die Verwendung einer größeren Menge an Zellmaterial erhoffte man sich eine bessere Detektion dieser bereits in Vorversuchen schwierig nachzuweisenden Bindung. Zur Stabilisierung von transienten Protein-Protein-Wechselwirkungen wurden die Zellen zunächst mit Formaldehyd behandelt und anschließend unter Zusatz von Enzyminhibitoren geerntet, bevor die Proteine nach Extraktion in die Co-IP eingesetzt wurden (3.7.5). Vor Zugabe des spezifischen IE1-Antikörpers wurde von allen Proben ein Aliquot abgenommen, um mittels SDS-PAGE und Western Blot (3.7.3, 3.7.4) zu überprüfen, ob die einzelnen Komponenten in vergleichbaren Mengen vorlagen (Abb. 4.11, linke Seite).



**Abb. 4.11: Nachweis einer Interaktion zwischen IE1 und STAT1 und Einfluss der Mutationen im IE1-Gen auf diese Eigenschaft**

Wachstumsarretierte TetR-IE1-Zellen wurden für 96 h mit Doxycyclin behandelt und nach Formaldehyd-Quervernetzung geerntet. Nach Herstellung eines Gesamtzellextrakts wurde IE1 mit Hilfe des spezifischen Antikörpers MAB810R und Protein A-gekoppelten Dynabeads immunpräzipitiert und über SDS-PAGE und Western Blot-Verfahren analysiert. Der Nachweis von STAT1 im Immunpräzipitat erfolgte über den spezifischen STAT1 p84/p91- (E-23-) Antikörper (rechts dargestellt). Als Kontrolle erfolgte der Nachweis von STAT1 und IE1 im Zellextrakt sowie von GAPDH als Ladekontrolle (links).

Der Nachweis des ubiquitär in allen Zellen vorkommenden Proteins GAPDH diente dabei als Ladekontrolle und zeigte für alle Proben eine vergleichbare Bande, sodass davon auszugehen war, dass überall gleich viel Zellmaterial verwendet wurde. Auch die Bande für STAT1 war für alle Konstrukte annähernd gleich und wies zwischen den einzelnen Mutanten nur minimale Schwankungen auf. Beim Nachweis von IE1 im Zellextrakt waren dagegen wiederum dieselben Abweichungen in den Proteinmengen der einzelnen Mutanten vorhanden, wie sie schon mehrfach aufgetreten waren (4.1.1.3,

4.1.3.1): Der Wildtyp und die meisten anderen Formen ließen große Mengen an IE1-Protein erkennen, wohingegen die Expression vor allem für IE1L174P, IE1 $\Delta$ 291-320 und IE1-SUMO nur sehr schwach ausgeprägt war. Bis auf diese Ausnahmen machte die Auswertung der Proteinmengen im Zellextrakt jedoch deutlich, dass von einer ausreichenden Menge an Zielproteinen für den Nachweis einer Wechselwirkung zwischen STAT1 und IE1 auszugehen war.

Der vorher beschriebene Proteinextrakt wurde anschließend mit einem spezifischen IE1-Antikörper und uniformen superparamagnetischen Kügelchen (Dynabeads) inkubiert, sodass IE1 damit aus der Lösung präzipitiert werden konnte (3.7.5). Im Fall einer Bindung von STAT1 wäre dieses ebenfalls mit im Immunpräzipitat enthalten, wohingegen alle nicht an IE1 bindenden Komponenten in mehreren Waschschritten entfernt wurden. Auch hier wurden die erhaltenen Proben mittels SDS-PAGE und Western Blot-Verfahren genauer analysiert (3.7.3, 3.7.4). Auf diese Weise konnten mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen IE1 und STAT1 beide Proteine im Immunpräzipitat nachgewiesen werden (Abb. 4.11, rechte Seite). Dabei waren beim Wildtyp sowohl für IE1 als auch für STAT1 große Proteinmengen in den jeweiligen Spuren zu sehen. Das bedeutet, dass nicht mutiertes IE1 in der Lage ist, direkt oder indirekt an STAT1 zu binden. Auch für die Mutanten IE1 $\Delta$ AD1, IE1 $\Delta$ S/P, IE1 $\Delta$ AD3, IE1 $\Delta$ CTD, IE1 $\Delta$ CBM und IE1-SUMO war ein Nachweis von STAT1 im Präzipitat möglich, wenn auch nicht in derselben starken Ausprägung wie beim Wildtyp. Vor allem bei IE1-SUMO fand sich relativ viel gebundenes STAT1-Protein, obwohl die IE1-Expression hier niedriger war als bei den meisten anderen Konstrukten. Dagegen war die STAT1-Bande bei IE1 $\Delta$ AD3 im Verhältnis zum präzipitierten IE1 erstaunlich schwach, auch wenn sie immer noch zweifelsfrei erkennbar war. Im Gegensatz dazu konnte für IE1 $\Delta$ 291-320, IE1 $\Delta$ AD2, IE1 $\Delta$ AD1-S/P und IE1 $\Delta$ AD2-AD3 kein STAT1 in der Co-IP nachgewiesen werden, sodass hier eine Interaktion mit STAT1 offenbar nicht mehr möglich ist. Überraschenderweise war für die ansonsten völlig inaktive Mutante IE1L174P eine, wenn auch sehr schwache, Co-Präzipitation von STAT1 sichtbar. Bis auf diese Ausnahme waren aber alle Mutanten, die nicht mehr an STAT1 binden konnten, auch nicht mehr in der Lage, eine Hochregulierung von Typ II-ISG oder eine Phosphorylierung von STAT1 mit nachfolgender Akkumulation dieses Proteins im Zellkern zu bewirken. Damit wird ein Zusammenhang zwischen diesen Prozessen immer eindeutiger.

#### **4.1.4 Interaktion zwischen IE1, PML-Körpern und mitotischem Chromatin**

Wie bereits in der Einleitung dargestellt, besitzt das IE1-Protein die Fähigkeit an PML als Teilstruktur der PML-Körper im Zellkern zu binden und diese aufzulösen, vermutlich um dadurch deren antivirale Wirkung zu antagonisieren. Dabei zeigt sich die Bindung von IE1 an PML sehr früh nach der Infektion durch ein punktförmiges Muster im Zellkern, das im weiteren Verlauf durch eine diffuse Verteilung der beiden Komponenten ersetzt wird. Diese tritt typischerweise nach erfolgter Auflösung der PML-Körper auf. Darüber hinaus ist IE1 in der Lage, bei seiner Bindung an mitotisches Chromatin das PML-Protein ebenfalls dorthin zu rekrutieren (Korioth et al., 1996; Ahn und Hayward, 1997; Ahn et al., 1998). Wenn man berücksichtigt, dass PML überdies eine verstärkende Wirkung auf IFN- $\gamma$ -stimulierte Signalwege zu haben scheint (El Bougrini et al., 2011) und eine IFN- $\gamma$ -ähnliche Immunantwort durch IE1 in Abwesenheit von PML nicht möglich ist (Knoblach, 2010), war es unerlässlich, die in dieser Arbeit hergestellten IE1-Mutanten auf die oben beschriebenen Fähigkeiten zu untersuchen, um daraus Rückschlüsse auf deren Bedeutung für den molekularen Mechanismus der Hochregulierung von Typ II-ISG ziehen zu können.

##### **4.1.4.1 Bindung und Auflösung von PML-Körpern durch IE1**

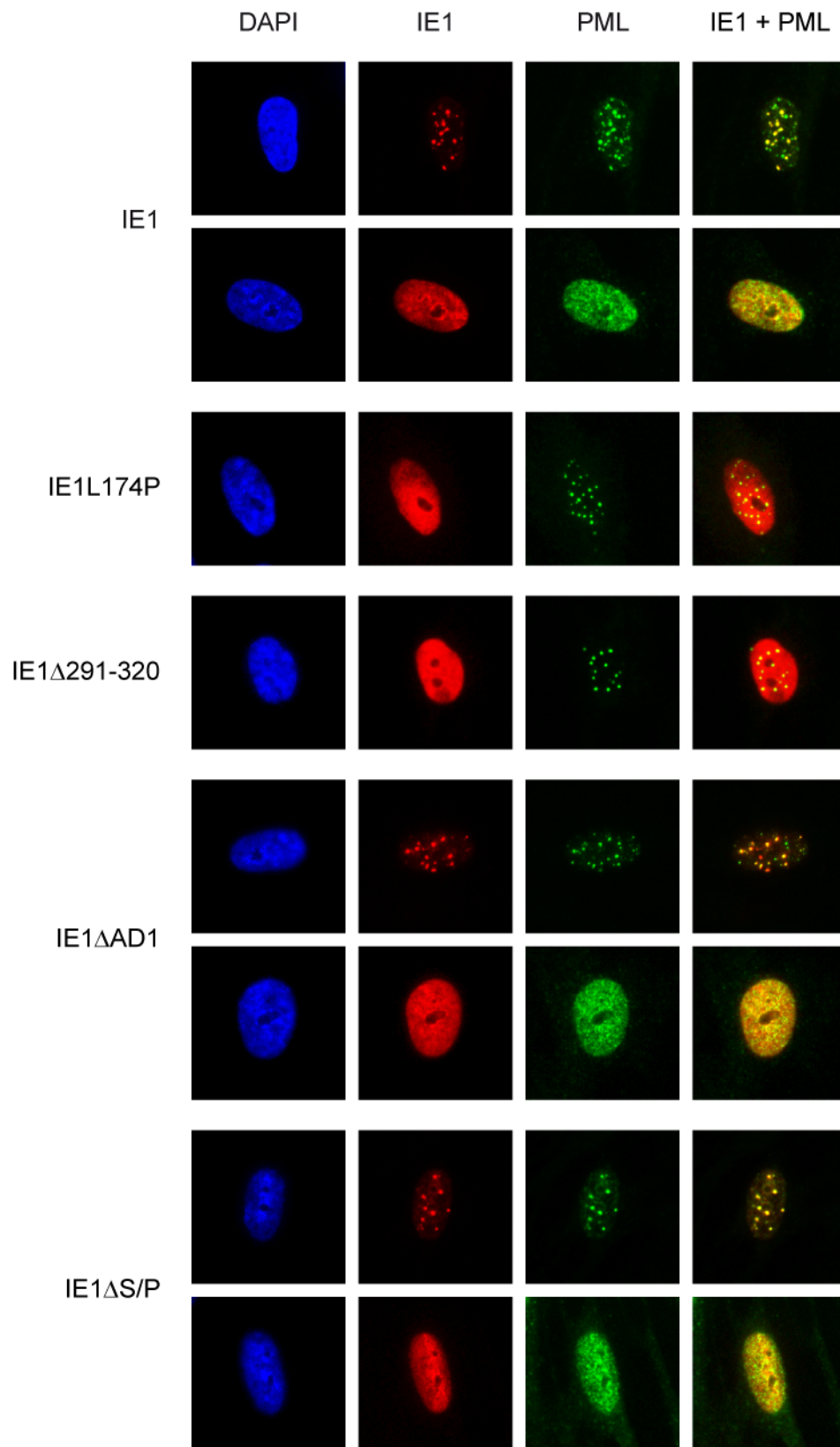
Zunächst sollten die Mutanten daraufhin geprüft werden, ob sie noch in der Lage sind, an PML zu binden und in Folge dessen die PML-Körper aufzulösen. Aus diesem Grund wurden TetR-IE1-Zellen einen Tag nach ihrer Aussaat in noch nicht dicht gewachsenem Zustand und ohne vorherige Zugabe von Doxycyclin mit Methanol fixiert. Dieses Vorgehen hatte den Vorteil, dass Einzelzellen besser beurteilt werden konnten, da noch kein dichter Verband an Fibroblasten vorlag. Durch Unterlassen einer Induktion der IE1-Expression konnte sichergestellt werden, dass in den Präparaten noch Zellen zu finden waren, in denen die PML-Körper nicht vollständig aufgelöst waren. Hohe Mengen an IE1 hätten eine solche Auflösung innerhalb relativ kurzer Zeit verursacht.

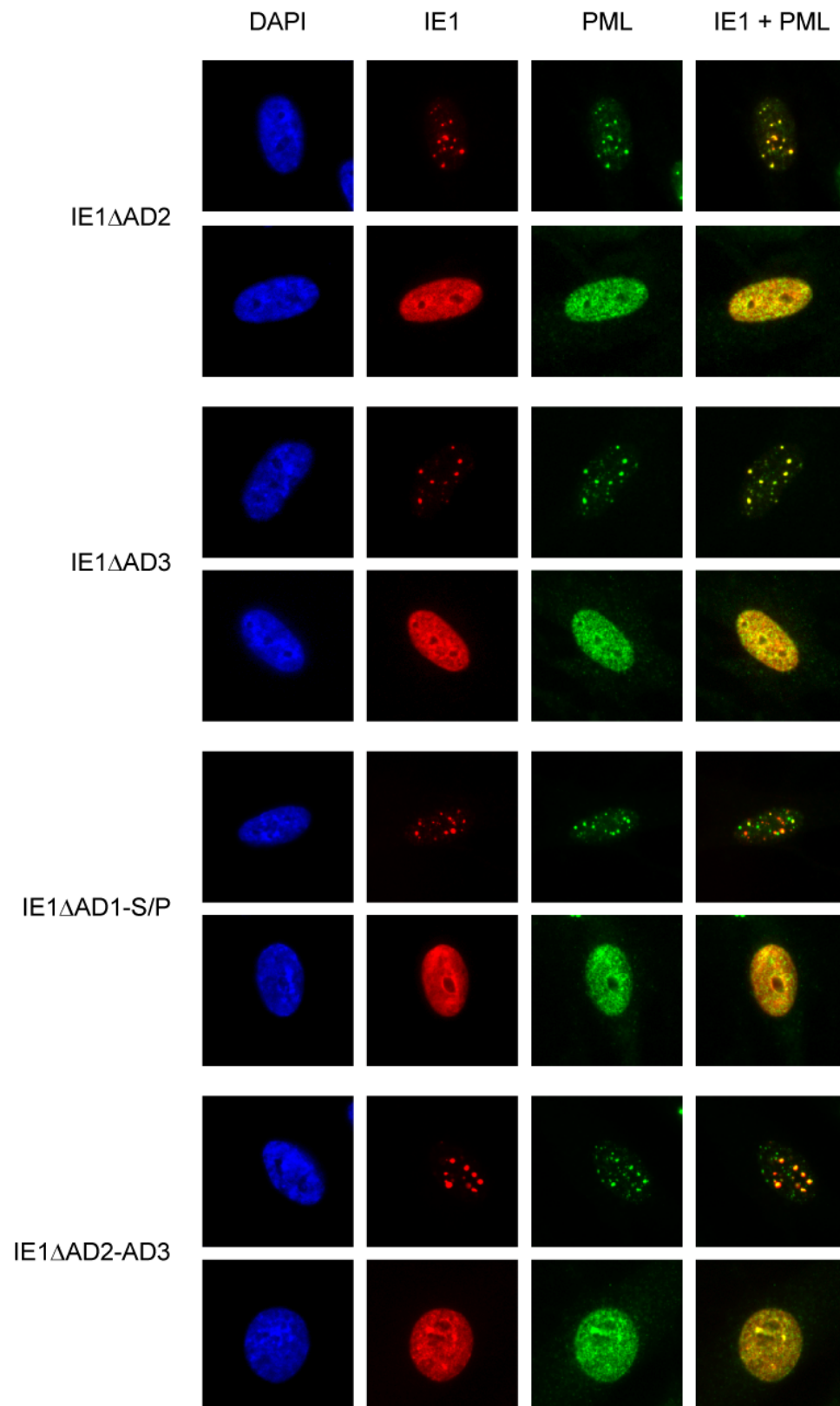
Nach Detektion der Zielproteine mittels spezifischer Antikörper und Färbung durch eine Immunreaktion mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Sekundärantikörpern, konnten die Präparate unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht werden (3.7.1) (Abb. 4.12). Wie erwartet waren für den IE1-Wildtyp sowohl das punktförmige Muster als auch eine diffuse Ansammlung von IE1 und PML im Zellkern nachweisbar. Für die meisten Mutanten wurden ebenfalls beide Formen des nukleären Arrangements von PML und IE1 beobachtet. Eine Ausnahme davon bildete IE1-SUMO: Diese Mutante konnte zwar offensichtlich ausgezeichnet an PML binden, was durch große und hell leuchtende Kugeln von IE1-Proteinen im Zellkern deutlich wurde, allerdings gelang es ihr nicht, die PML-Körper tatsächlich aufzulösen. Daher konnte hier auch keine diffuse Verteilung der beiden untersuchten Proteine im Zellkern dargestellt werden.

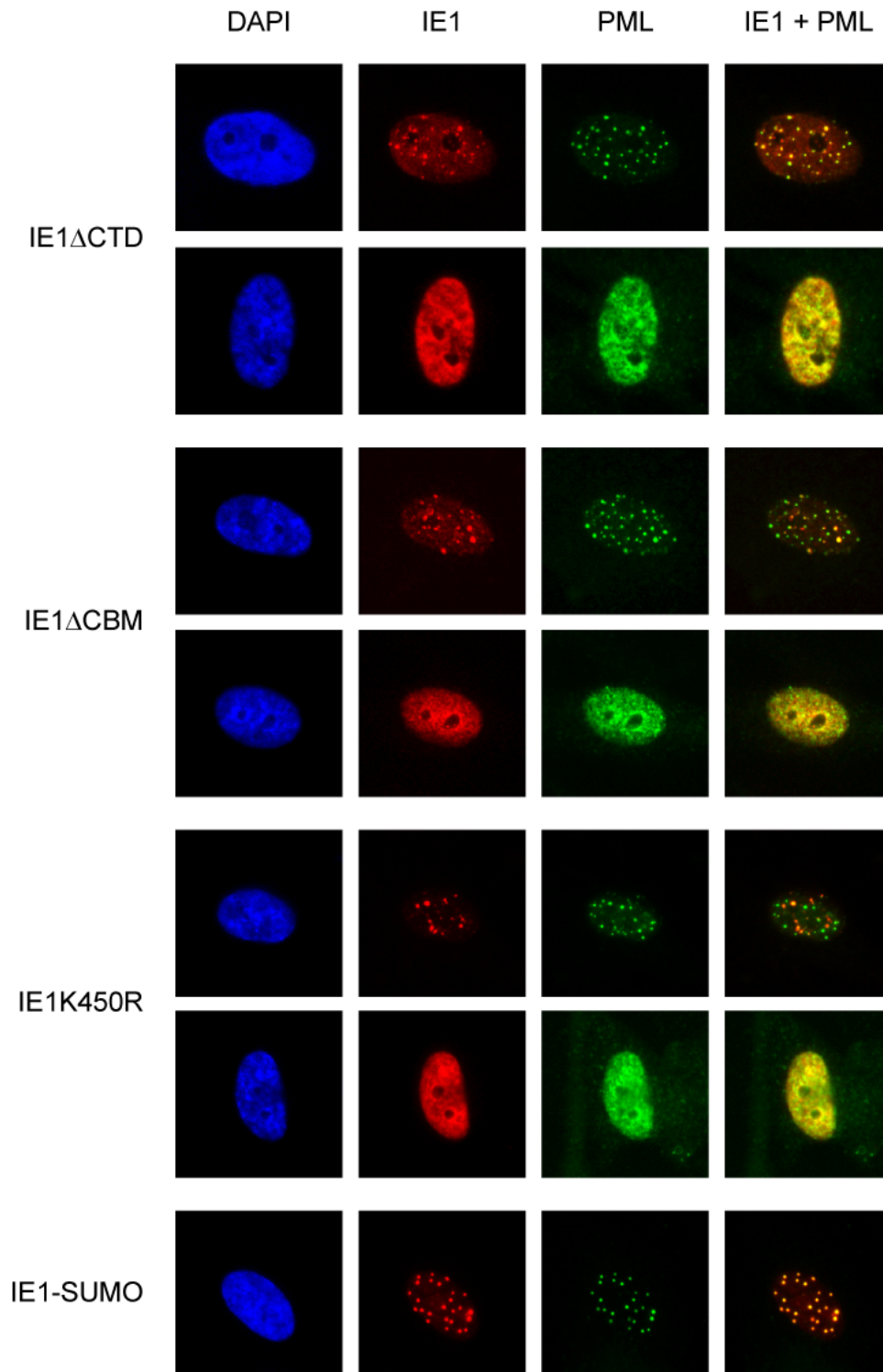
Lediglich IE1L174P und IE1 $\Delta$ 291-320 waren nicht imstande, an PML-Körper zu binden oder sie aufzulösen, sodass nur Zellen gefunden wurden, die PML in Punktform und IE1 diffus im Nukleoplasma zeigten. Dies war insofern nicht weiter verwunderlich, als schon vorher ähnliche Beobachtungen über diese beiden Mutanten publiziert worden waren (Muller und Dejean, 1999; Lee et al., 2004) und sie sich bereits in mehreren Versuchen dieser Arbeit als funktionslos erwiesen hatten. Die übrigen IE1-Mutanten zeigten dagegen kein Funktionsdefizit bezüglich der Kolokalisation mit und der Auflösung von PML-Körpern. Daraus ist abzuleiten, dass diejenigen Abschnitte des IE1-Proteins, die für die Hochregulierung von Typ II-ISG und die Wechselwirkung mit STAT1 essenziell sind, für die Interaktion zwischen IE1 und PML nicht gebraucht werden.

Betrachtet man die Ergebnisse im Hinblick auf die Mutante IE1-SUMO, so scheint eine Auflösung der PML-Körper für die Induktion einer IFN- $\gamma$ -ähnlichen Antwort ebenfalls nicht notwendig zu sein, da IE1-SUMO keine Destruktion der PML-Körper mehr bewirken kann, aber dennoch zu einer deutlichen Hochregulierung von CXCL10 und GBP4 in der Lage ist. Möglicherweise spielt jedoch die Kolokalisation von IE1 und PML eine gewisse Rolle, da alle Mutanten, die noch zu einer suffizienten Induktion der IFN- $\gamma$ -ähnlichen Antwort fähig sind, auch an PML binden können.









**Abb. 4.12: Einfluss der Mutationen im IE1-Gen auf die Fähigkeit, an PML zu binden und PML-Körper aufzulösen**

Unbehandelte TetR-IE1-Zellen wurden einen Tag nach ihrer Aussaat mit Methanol fixiert. Im Anschluss daran wurden die Zielproteine mit Hilfe von polyklonalen Kaninchen-Antikörpern gegen PML und monoklonalen Maus-Antikörpern gegen IE1 sowie Kaninchen-spezifischen Alexa Fluor 488-konjugierten (grün fluoreszierenden) bzw. Maus-spezifischen Alexa Fluor 594-konjugierten (rot fluoreszierenden) Sekundärantikörpern farblich markiert. Zur Identifikation des Zellkerns wurde die DNA mit DAPI blau angefärbt.

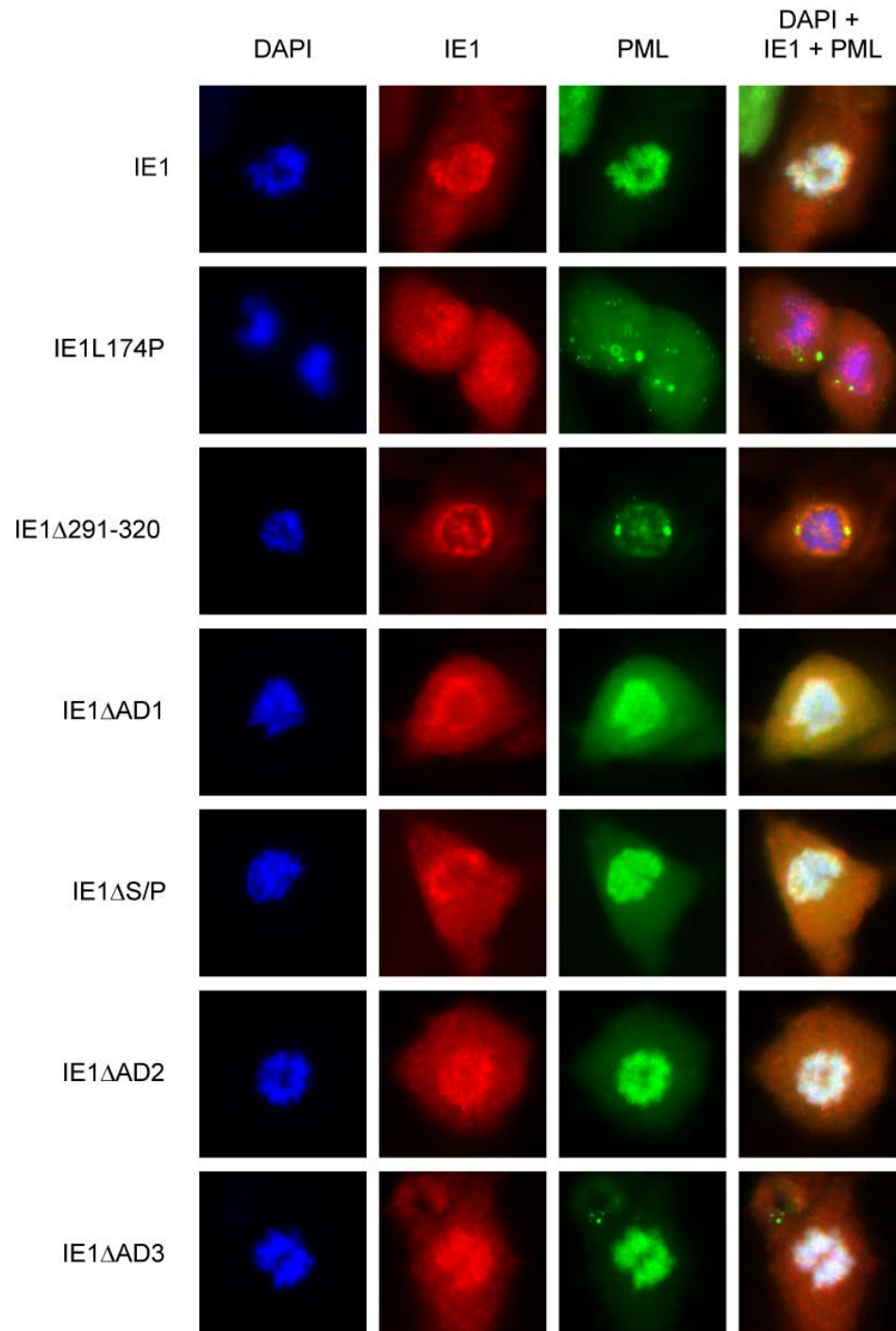
#### 4.1.4.2 Rekrutierung von PML an mitotisches Chromatin

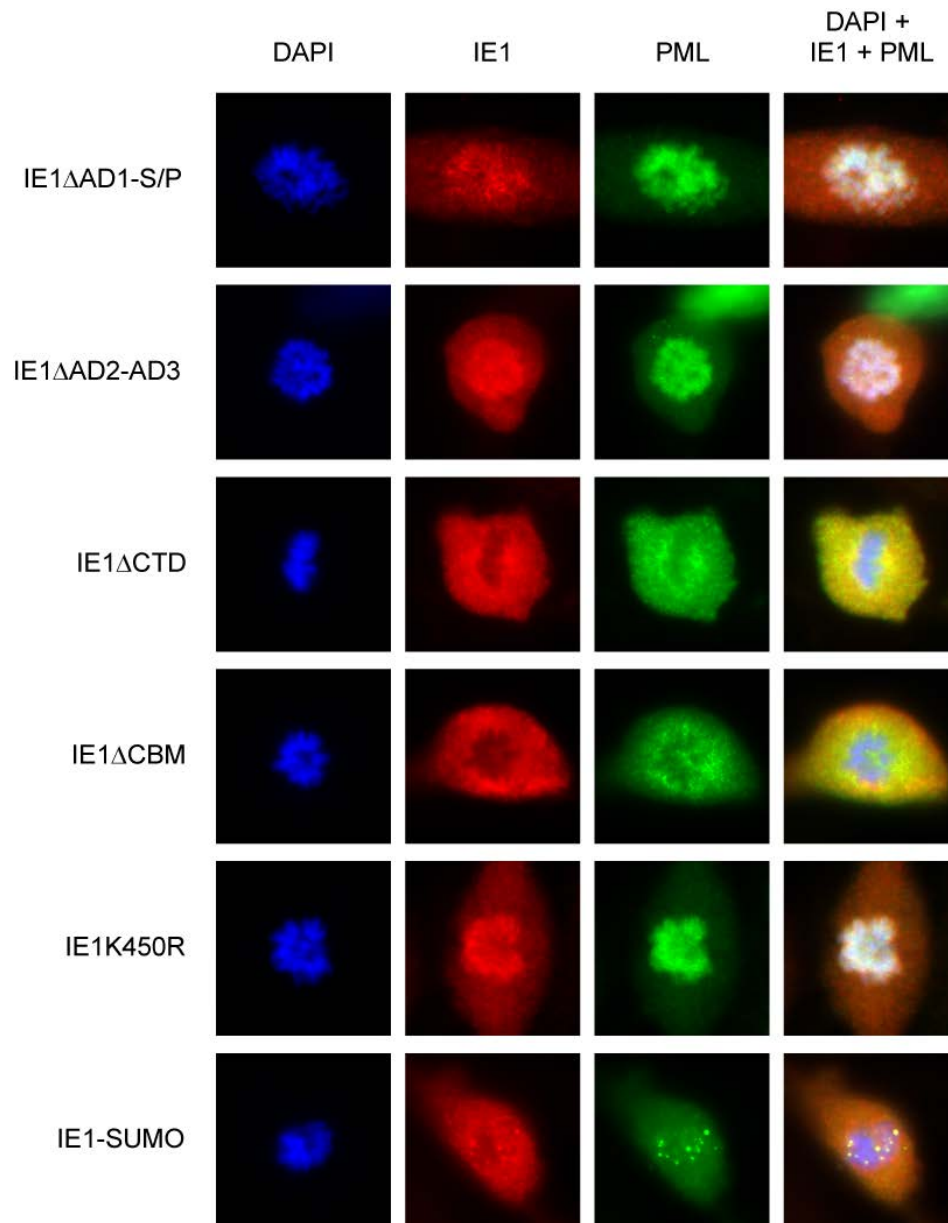
Nach Klärung des Einflusses von Mutationen im IE1-Protein auf die Fähigkeit der Bindung und Auflösung von PML-Körpern, sollte in einem weiteren Experiment überprüft werden, welche Mutanten PML noch an mitotisches Chromatin rekrutieren können. Dafür wurden TetR-IE1-Zellen einen Tag nach der Aussaat für 6 h mit Doxycyclin inkubiert und im Anschluss daran mit Methanol fixiert. Da bei diesen Zellen noch kein Wachstumsarrest durch Kontaktinhibition eingetreten war, bestand eine größere Chance für das Auffinden von Mitosefiguren als bei einem dicht gewachsenen Zellrasen. Davon erhoffte man sich eine bessere Beurteilbarkeit von IE1 und PML am mitotischen Chromatin. Nach Detektion und Färbung der Zielproteine mit Hilfe spezifischer Antikörper, konnten die Präparate unter dem inversen Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden (3.7.1). Das Ergebnis zeigt Abb. 4.13. Daraus ist ersichtlich, dass fast alle Mutanten noch dazu in der Lage waren, selbst an mitotisches Chromatin zu binden und auch PML dorthin zu dirigieren. Wie bereits in 4.1.3.4 beschrieben, war bei IE1 $\Delta$ CTD und IE1 $\Delta$ CBM keine Kolokalisation mit mitotischem Chromatin nachweisbar. Als logische Konsequenz aus der Bindung von PML an IE1 unterblieb hier auch die Rekrutierung von PML an mitotisches Chromatin. Sehr viel weniger eindeutig war dagegen das Ergebnis für IE1L174P, IE1 $\Delta$ 291-320 und IE1-SUMO. Aufgrund der schwachen IE1-Expression und nur weniger mitotischer Zellen in den Präparaten der drei Mutanten war im Hinblick auf diese Fragestellung keine sichere Aussage möglich. Auch wenn es in Abb. 4.10 den Anschein erweckte, als ob IE1L174P und IE1 $\Delta$ 291-320 noch an Chromatin binden könnten, konnte diese Beobachtung in diesem Versuch nicht bestätigt werden, da es hier eher so aussah, als ob IE1 und damit auch PML im Bereich der DNA-Färbung ausgespart wären. Möglicherweise war die Inkubation mit Doxycyclin für 6 h in diesem Versuch zu kurz, um eine ausreichende Expression der mutierten IE1-Proteine zu erreichen, verglichen mit den 96 h in 4.1.3.4.

Die Interpretation für IE1-SUMO war vergleichbar schwierig, da auch in diesem Präparat das Chromatin im Farbkanal für IE1 eher ausgespart erschien. Erstaunlicherweise fanden sich in diesem Bereich nicht vollständig aufgelöste PML-Körper, was bedeuten würde, dass diese zwar nicht zerstört, aber dennoch an mitotisches Chromatin dirigiert werden können. Aufgrund der erläuterten Problematik ist eine sichere Aussage dazu jedoch nicht möglich.

Im Hinblick auf die Hochregulierung der Typ II-ISG und die Interaktion mit STAT1 kann man jedoch sagen, dass bis auf IE1L174P und IE1 $\Delta$ 291-320 keine der in 4.1.2 und 4.1.3 auffälligen Mutanten in Bezug auf die Bindung und Auflösung sowie auf die Kolokalisation von PML und IE1 an mitotischem Chromatin Funktionsdefizite gezeigt hätte. Damit sind für diese beiden Funktionen (Typ II-ISG-Aktivierung und Interaktion mit PML-Körpern) nicht dieselben Abschnitte im IE1-Protein verantwortlich. Betrachtet man darüber hinaus die Ergebnisse für IE1 $\Delta$ CTD und IE1 $\Delta$ CBM, so scheint die Bindung von IE1 an mitotisches Chromatin bzw. die Rekrutierung von PML dorthin für die Induktion einer

IFN- $\gamma$ -ähnlichen Antwort ebenfalls keine Rolle zu spielen. Beide Mutanten können eine deutliche Hochregulierung von Typ II-ISG bewirken, jedoch sind sie weder dazu in der Lage an mitotisches Chromatin zu binden noch PML dorthin zu rekrutieren.





**Abb. 4.13: Auswirkungen der Mutationen im IE1-Gen auf die Rekrutierung von PML an mitotisches Chromatin**

TetR-IE1-Zellen wurden einen Tag nach der Aussaat für 6 h mit Doxycyclin behandelt und anschließend mit Methanol fixiert. PML-Proteine wurden mit dem spezifischen monoklonalen Maus-Antikörper 5E10 detektiert, IE1-Proteine mit dem polyklonalen Antikörper GST-IE1 $\Delta$ N aus dem Kaninchen. Zur Färbung wurde ein Kaninchen-spezifischer Alexa Fluor 594-gekoppelter (rot fluoreszierender) sowie ein Maus-spezifischer Alexa Fluor 488-gekoppelter (grün fluoreszierender) Sekundärantikörper eingesetzt. Für die Identifikation mitotischer Zellen wurde die DNA mit DAPI blau angefärbt.

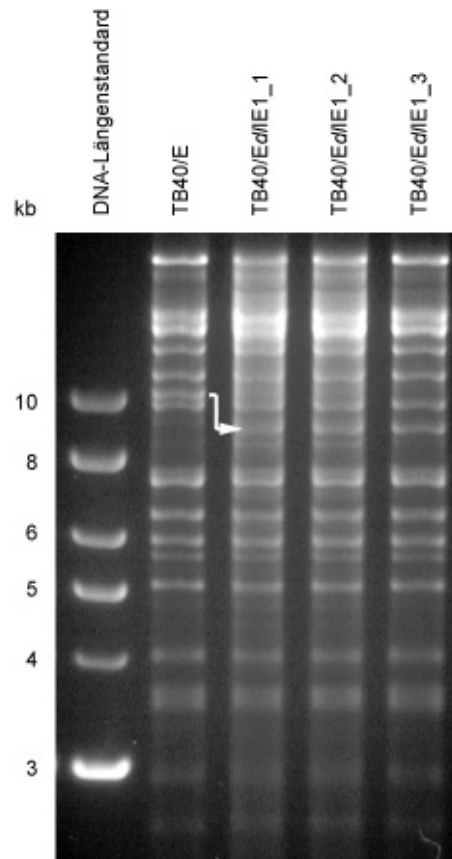
## 4.2 Charakterisierung IE1-deletierter Virusmutanten des klinischen hCMV-Isolats TB40/E

Die meisten der bisher veröffentlichten Daten über die Bedeutung des IE1-Proteins für hCMV beruhen auf Versuchen, die mit laboradaptierten Virusstämmen wie Towne oder AD169 durchgeführt wurden. Hierbei ließen sich zwar viele neue Erkenntnisse gewinnen, jedoch ist nicht abschließend geklärt, inwieweit die Ergebnisse tatsächlich auf klinisch relevante Stämme übertragen werden können. Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte deshalb für das klinische hCMV-Isolat TB40/E untersucht werden, welche Rolle IE1 für die Virusvermehrung bei hohen und niedrigen Virus-Zellverhältnissen sowie für eine Resistenz gegenüber der antiviralen Wirkung von IFN spielt.

### 4.2.1 Herstellung des TB40/E-Virus und IE1-deletierter Virusmutanten

Dazu wurden unabhängig voneinander drei Mutanten von hCMV TB40/E generiert, bei denen jeweils das major IE Exon 4 und damit alle kodierenden IE1-spezifischen Sequenzen in identischer Weise deletiert wurden. Die Mutationen wurden in Bacmide eingebracht (3.1.3), die vermehrt und über Bacmid-Präparation gereinigt wurden (3.4.1, 3.6.6). Um unbeabsichtigte Mutationen im hCMV-Genom auszuschließen, wurde die DNA anschließend mit dem Restriktionsenzym EcoRI gespalten und in einem EtBr-Agarosegel aufgetrennt (3.6.5.1, 3.6.2) (Abb. 4.14). Bei dessen Auswertung war deutlich zu erkennen, dass das genetische Material von TB40/E und seinen Mutanten bis auf eine Bande identisch war und somit keine offensichtlichen ungeplanten Veränderungen in der DNA-Sequenz stattgefunden hatten. Der Wildtyp wies lediglich bei ca. 10 kb eine Bande auf, die bei TB40/E/IE1\_1-3 erst im Bereich von ca. 8,5 kb zu sehen war. Die Verkleinerung dieses DNA-Abschnitts (weißer Pfeil) entspricht der Größe des IE1-spezifischen Exons 4 (ca. 1,5 kb) und spiegelt damit dessen erfolgreiche Deletion wider. Da alle drei Mutanten über die gesamte Gelstrecke das gleiche Bandenmuster zeigten, war davon auszugehen, dass es sich tatsächlich um identische Klone handelt.

Für die Virusproduktion wurden Bacmide mit der Wildtyp-DNA über Elektroporation in TetR-Zellen eingebracht (3.5.3). Die Bacmide der Mutanten wurden über das gleiche Verfahren in TetR-IE1-Zellen eingeschleust, die durch ektopische Expression des viralen Proteins den IE1-abhängigen Replikationsdefekt ausgleichen können. Die Wirtszellen wurden für insgesamt zweieinhalb Wochen kultiviert und weiter expandiert, bevor sie durchinfiziert waren und damit geerntet werden konnten (3.5.3). Nach Bestimmung der Virustiter (3.5.5, 3.6.7, 3.6.8) konnten die Viruspräparationen in einer definierten Menge in die folgenden Versuche eingesetzt werden.



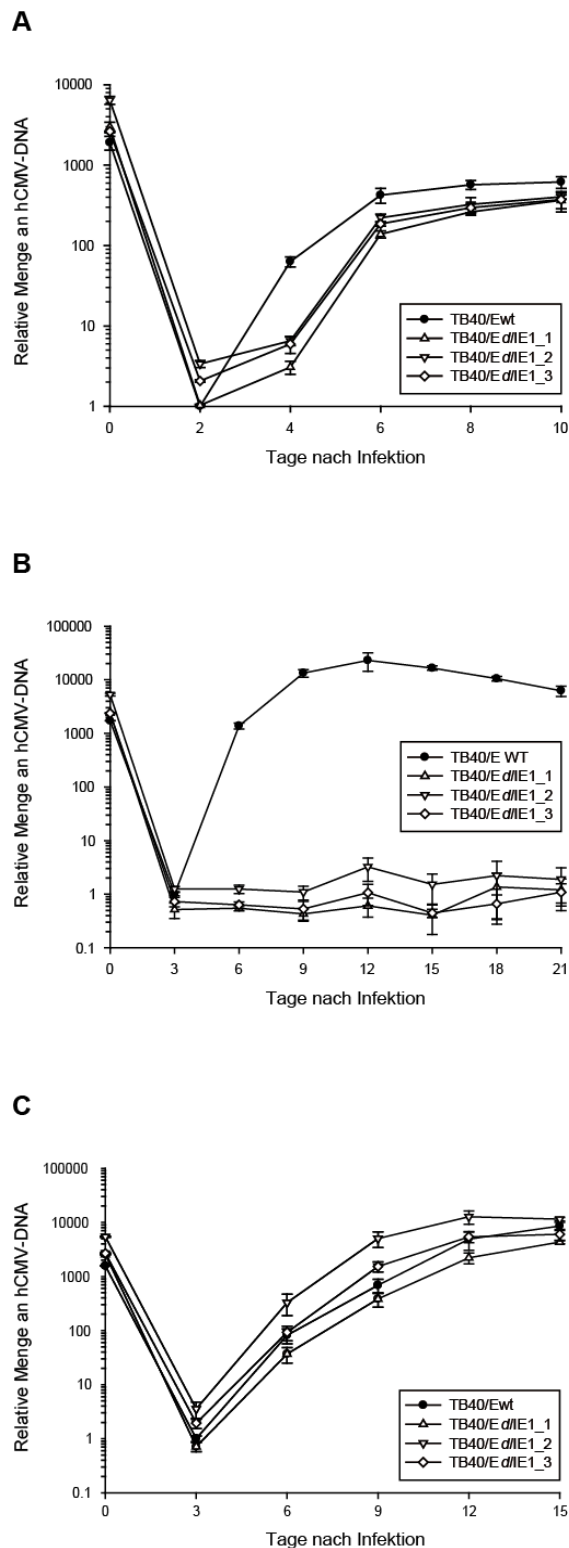
**Abb. 4.14: Überprüfung der korrekten IE1-Deletion im hCMV-Genom mittels Restriktionsfragmentanalyse**

Je 1 µg Bacmid-DNA wurde mit EcoRI gespalten und in einem 0,7%-igen [w/v] EtBr-Agarosegel aufgetrennt. An dieses wurde zur Auftrennung der Banden für 16 h eine Spannung von 30 V angelegt. Der weiße Pfeil verdeutlicht die Verkleinerung der Bande durch die Deletion des IE1-spezifischen Exons 4 bei den drei Mutanten (TB40/Ed/IE1\_1-3) im Vergleich zum Wildtyp (TB40/E).

#### 4.2.2 IE1-abhängiges Replikationsverhalten von hCMV TB40/E

Bereits seit längerer Zeit ist bekannt, dass das Fehlen des IE1-Proteins nach Infektion mit niedriger Multiplizität (weniger als ein infektiöses Virus pro Zelle) bei laboradaptierten hCMV-Stämmen zu einem ausgeprägten Replikationsdefekt führt. Dieses Defizit ist jedoch bei Infektion mit höherer Multiplizität (mehr als ein infektiöses Virus pro Zelle) kaum nachweisbar (Mocarski et al., 1996; Greaves und Mocarski, 1998). Zur Ermittlung der Bedeutung von IE1 für das Replikationsverhalten von TB40/E wurden daher Experimente unter verschiedenen Infektionsbedingungen durchgeführt (Abb. 4.15).





**Abb. 4.15: Wachstumsanalysen von TB40/E und TB40/EΔIE1\_1-3 unter Einsatz verschiedener Virusmengen auf nicht-komplementierenden und komplementierenden Zellen**

(A) MRC-5-Zellen wurden für 16 h mit unverdünnten Virusstocks von TB40/E bzw. TB40/EΔIE1\_1-3 infiziert. Alle 48 h wurde aus dem Kulturüberstand die virale DNA isoliert und mittels qPCR quantifiziert.

(B) MRC-5- bzw. (C) TetR-IE1-Zellen wurden für 16 h mit niedrigen Mengen an TB40/E bzw. TB40/EΔIE1\_1-3 infiziert (ein Fünfzigstel der Virusmenge aus (A)). Alle 72 h wurde aus dem Kulturüberstand die virale DNA isoliert und mittels qPCR quantifiziert. Für (C) wurden TetR-IE1-Zellen 24 h vor Infektion sowie im weiteren Verlauf im Abstand von 72 h zusätzlich mit Doxycyclin behandelt.

Abgebildet sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen aus je drei biologischen Replikaten. Als Ausgangswert (Zeitpunkt 0) diente die zur Infektion eingesetzte Menge an Virus-DNA.

In einem ersten Versuch wurde zunächst die Relevanz von IE1 für das Wachstum dieses hCMV-Stammes unter Bedingungen einer hohen Infektionsmultiplizität untersucht. Zu diesem Zweck wurden MRC-5-Zellen für 16 h mit der maximal einsetzbaren Menge an TB40/E bzw. TB40/Ed/IE1\_1-3 infiziert und anschließend für mehrere Tage kultiviert, wobei jeweils im Abstand von 48 h das komplette Medium abgenommen und durch frisches ersetzt wurde (3.5.7). Aus dem entfernten Überstand konnte anschließend die virale DNA isoliert und über qPCR quantitativ analysiert werden (3.6.7, 3.6.8). Dabei zeigte der Wildtyp eine relativ rasche Zunahme der DNA-Menge, die bereits sechs Tage nach Infektion ein finales Plateau erreicht hatte (Abb. 4.15 A). Die Mutanten ließen insgesamt einen ähnlichen Verlauf erkennen, der sich jedoch darin unterschied, dass der deutliche Anstieg der Virusreplikation erst zwei Tage später begann, dann zwar eine vergleichbar steile Kurve aufwies, aber im Plateau nicht die finale Viruskonzentration des Wildtyps erreichte. Damit unterscheiden sich die Ergebnisse für TB40/E dahingehend von denen für laboradaptierte Virusstämme, dass das Replikationsdefizit, das durch ein Fehlen des IE1-Proteins zustande kommt, selbst bei hoher Infektionsmultiplizität nicht vollständig ausgeglichen werden kann.

Die spannende Frage war nun, welche Konsequenz ein Fehlen von IE1 hat, wenn nur eine geringe Menge an Viren für die Infektion zu Verfügung steht. Dies sollte ein zweiter Versuch klären, bei dem MRC-5-Zellen für 16 h mit einer 1:50 Verdünnung der Virusstocks infiziert wurden. Wegen des langsameren Wachstums bei niedriger Multiplizität erfolgte hier nur alle drei Tage ein Austausch des Mediums und die Isolierung der viralen DNA aus dem Überstand. Deren Menge wurde wiederum über qPCR ermittelt (Abb. 4.15 B). Wie erwartet zeigte sich beim Wildtyp aufgrund der niedrigeren Infektionsmultiplizität der Anstieg der Virusreplikation erst mit einer gewissen zeitlichen Verzögerung im Vergleich zu dem Versuch aus Abb. 4.15 A. Die Mutanten dagegen ließen trotz des sehr langen Beobachtungszeitraums über 21 Tage nie eine signifikante Virusreplikation erkennen.

Um dieses Verhalten zweifelsfrei auf die Abwesenheit von IE1 zurückführen zu können, wurde der gleiche Versuch auf komplementierenden TetR-IE1-Zellen durchgeführt. Diese exprimieren nach vorheriger Stimulation mit Doxycyclin hohe Mengen an IE1. Wenn das Wachstumsdefizit von TB40/Ed/IE1\_1-3 ausschließlich durch den Verlust dieses Proteins bedingt wäre, sollte es durch dessen exogene Zufuhr behoben werden können. Wie Abb. 4.15 C belegt, wurde durch die Substitution von IE1 jegliche Replikationseinschränkung der Mutanten beseitigt. Bei TB40/Ed/IE1\_2 und TB40/Ed/IE1\_3 lag die gemessene relative Menge an hCMV-DNA sogar leicht über der des Wildtyps. Folglich ist allein die Deletion der IE1-Sequenz für den Verlust der Replikationsfähigkeit von TB40/Ed/IE1 verantwortlich. Dieses Ergebnis macht deutlich, dass IE1 für das Wachstum von TB40/E bei niedriger Infektionsmultiplizität so immens wichtig ist, dass sein Fehlen eine Vermehrung der Viren fast unmöglich macht.

Damit unterscheidet sich TB40/E von anderen hCMV-Stämmen wie z.B. Towne hauptsächlich darin, dass ein Verlust von IE1 bereits unter Bedingungen einer hohen Infektionsmultiplizität zu einer detektierbaren Reduktion der Virusreplikation führt und bei niedriger Infektionsmultiplizität sogar einen kompletten Replikationsverlust nach sich zieht. Laboradaptierte Stämme können hingegen ein Fehlen des IE1-Proteins unter Bedingungen einer hohen Infektionsmultiplizität ganz und bei niedriger Multiplizität zumindest teilweise ausgleichen (Mocarski et al., 1996; Greaves und Mocarski, 1998).

### 4.2.3 IE1-abhängige Resistenz von hCMV TB40/E gegenüber IFN

Eine wichtige Eigenschaft des IE1-Proteins ist die Unterdrückung der antiviralen Wirkung von Typ I-IFN durch einen Eingriff in deren Signalkaskade. Ein Verlust von IE1 führt daher zu einer Hypersensitivität laboradaptierter hCMV-Stämme gegenüber IFN- $\alpha$ , die sich durch abnehmende Replikation bei steigender IFN-Konzentration äußert (Paulus et al., 2006). Daneben bewirkt auch IFN- $\gamma$  eine deutliche Beeinträchtigung in Bezug auf die Vermehrung der Viren (Trilling et al., 2012).

Daher stellte sich zum einen die Frage, ob und inwieweit steigende Konzentrationen von IFN- $\gamma$  das Wachstum des klinischen hCMV-Isolats TB40/E beeinträchtigen und welche Rolle ein Fehlen von IE1 dabei spielt. In einem zweiten Versuchsansatz wurde darüber hinaus untersucht, wie stark sich ein Fehlen des IE1-Protein bei diesem klinischen Virusstamm in Bezug auf die Suppression der antiviralen Wirkung von IFN- $\alpha$  bemerkbar macht.

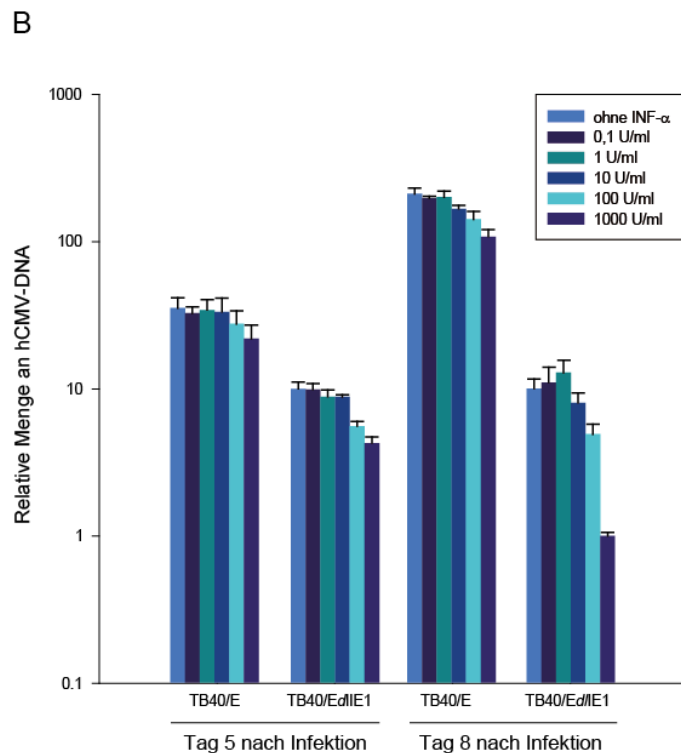
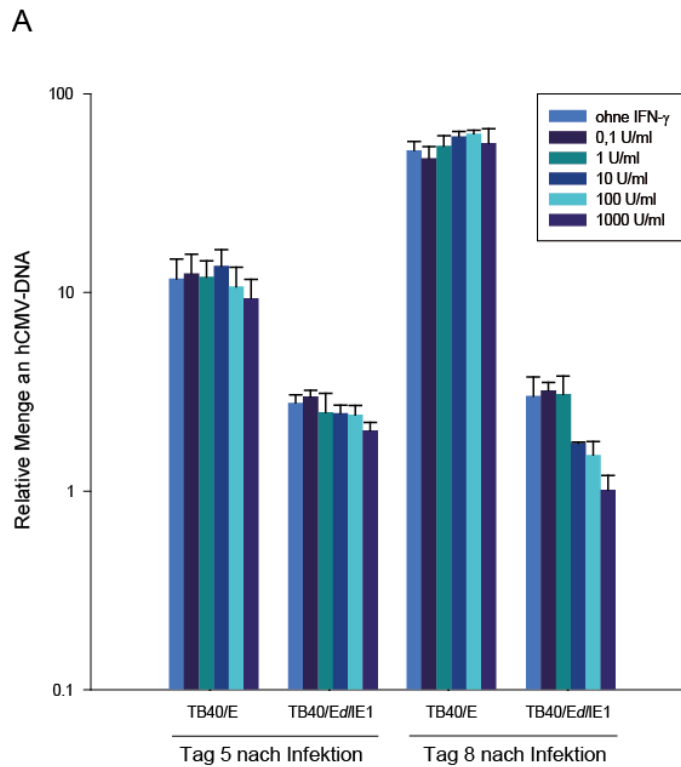
Dafür wurden MRC-5-Zellen zunächst für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen von IFN- $\alpha$  oder IFN- $\gamma$  (Abb. 4.16) behandelt. Erst dann erfolgte die Infektion mit TB40/E oder TB40/Ed/IE1\_3 (3.5.7) für einen Zeitraum von 16 h. Dazu wurden von beiden Viren hohe Titer eingesetzt, um auf diese Weise das Fehlen von IE1 zu kompensieren und kein signifikantes Wachstumsdefizit zu provozieren (Abb. 4.15 A). Da die Ergebnisse aus 4.2.2 bereits gezeigt hatten, dass sich alle drei Mutanten gleich verhalten, wurde hier nur noch eine davon verwendet. Auch nach der Infektion wurden die Zellen weiter mit der jeweiligen Anfangskonzentration an IFN- $\alpha$  bzw. IFN- $\gamma$  behandelt. Zur Ermittlung der relativen Menge an hCMV-DNA im Kulturmedium wurde während der ersten vier Tage der Überstand zur Hälfte und später komplett abgenommen und durch frisches, IFN-haltiges Medium ersetzt. Anschließend wurde aus dem entnommenen Kulturüberstand die DNA isoliert und über qPCR quantifiziert (3.6.7, 3.6.8). Die grafische Darstellung in Abb. 4.16 zeigt davon nur Tag 5 und Tag 8, da hier die Unterschiede am deutlichsten erkennbar waren.

Bei der Behandlung mit IFN- $\gamma$  (Abb. 4.16 A) zeigte sich fünf Tage nach Infektion zwar ein gut erkennbarer Unterschied in den DNA-Mengen zwischen Wildtyp und Mutante, jedoch wiesen beide nur minimale Abstufungen zwischen den verschiedenen IFN- $\gamma$ -Konzentrationen auf. An Tag 8 konnte man beim Wildtyp diesbezüglich überhaupt keine Differenz mehr feststellen. Die Viren schienen mit zunehmender Menge an IFN- $\gamma$  sogar geringfügig besser zu wachsen.

Ein etwas anderes Bild fand sich bei TB40/Ed/IE1\_3: Dort entwickelte sich ab einer IFN- $\gamma$ -Konzentration von 10 U/ml ein signifikanter Abfall der hCMV-DNA-Menge, bei der maximal verwendeten IFN- $\gamma$ -Menge betrug der Unterschied zu unbehandelten Zellen immerhin das Fünffache. Auffällig war zudem, dass bei der Mutante im Vergleich zu Tag 5, unabhängig von IFN- $\gamma$ , kein Anstieg in der Virusvermehrung mehr festgestellt werden konnte.

In einem weiteren Versuchsansatz wurde unter den gleichen Bedingungen wie für IFN- $\gamma$  der Einfluss von IFN- $\alpha$  auf das Wachstum von TB40/E und TB40/Ed/IE1\_3 ermittelt (Abb. 4.16 B). Ebenso wie in Abb. 4.16 A fiel hier der Unterschied im Replikationsverhalten zwischen Wildtyp und Mutante auf, der wiederum von Tag 5 zu Tag 8 größer wurde. In Bezug auf die verschiedenen IFN- $\alpha$ -Konzentrationen war in diesem Fall der sukzessive Abfall der relativen hCMV-DNA-Menge mit zunehmender IFN- $\alpha$ -Konzentration etwas besser erkennbar. Wildtyp und Mutante zeigten diesen in Nuancen an Tag 5 ab 100 U/ml. An Tag 8 war eine Abnahme der Virus-DNA im Vergleich zu Zellen ohne IFN-Behandlung bei beiden hCMV-Varianten bereits ab 10 U/ml nachweisbar, wenngleich dies bei der Mutante wesentlich eindeutiger zu sehen war. Allerdings schien die hCMV-Replikation dort bei geringen Mengen von IFN- $\alpha$  bis 1 U/ml im Vergleich zu unbehandelten Zellen erstaunlicherweise eher zu- als abzunehmen. Insgesamt war die Beeinträchtigung der Viren durch IFN- $\alpha$  aber nicht zu vergleichen mit der drastischen Abnahme der Replikation bei ähnlichen Versuchen mit hCMV Towne (Paulus et al., 2006).

Letztendlich scheint IE1 also als Antagonist der antiviralen IFN-Wirkung für hCMV TB40/E vor allem im Bereich hoher IFN-Konzentrationen eine gewisse Bedeutung zu haben. Allerdings kann TB40/E einen Ausfall dieses Proteins offenbar wesentlich besser kompensieren als die bisher untersuchten Virusstämme, sodass man davon ausgehen muss, dass hier für die Modulation IFN-stimulierter Signalwege neben IE1 noch weitere virale Faktoren eine wichtige Rolle spielen.



**Abb. 4.16: Bedeutung des IE1-Proteins für die Resistenz von hCMV TB40/E gegenüber IFN**

Wachstumsarretierte MRC-5-Zellen wurden mit den angegebenen Mengen an IFN- $\gamma$  (A) bzw. IFN- $\alpha$  (B) vorbehandelt und 24 h später für 16 h mit TB40/E bzw. TB40/Ed/IE1\_3 infiziert (hohe Multiplizität). Im Abstand von 24 h wurde über vier Tage das Medium zur Hälfte und von Tag 5 bis Tag 8 komplett abgenommen und durch frisches mit der jeweiligen IFN-Konzentration ersetzt. Für Tag 5 und Tag 8 wurde die Virus-DNA aus dem Überstand isoliert und mittels qPCR quantifiziert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus je zwei biologischen und zwei technischen Replikaten.

## 5 Diskussion

### 5.1 Molekularer Mechanismus der IE1-vermittelten Induktion von Typ II-ISG

#### 5.1.1 Essenzielle Abschnitte im IE1-Protein

Vorherige Experimente der eigenen Arbeitsgruppe hatten gezeigt, dass das hCMV IE1-Protein alleine in der Lage ist, über einen STAT1-abhängigen Mechanismus die Hochregulierung von bestimmten Typ II-ISG zu bewirken, ohne dass dafür die Anwesenheit von IFN- $\gamma$  erforderlich ist (Knoblach et al., 2011). Allerdings war bisher nicht bekannt, welche Aminosäuren oder Proteinabschnitte von IE1 für diesen Prozess verantwortlich sind. Mit Hilfe von qPCR-Versuchen wurden verschiedene IE1-Mutanten auf ihre Fähigkeit zur Aktivierung ausgewählter Typ II-ISG (CXCL10 und GBP4) untersucht. Dabei fielen signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Mutanten auf, die zeigen, dass bestimmte Bereiche von IE1 für diese Funktion zwingend notwendig sind, wohingegen andere dafür überhaupt keine Rolle spielen. Eine Übersicht über aktive und inaktive Mutanten zeigt Abb. 5.1.

Bei der Auswertung dieser Daten fiel auf, dass sich Veränderungen im distalen Bereich des C-terminalen Abschnitts von IE1, wie eine Deletion der CTD (AS 476-491) oder deren Veränderung an bestimmten Aminosäuren in Form der CBM, in keinster Weise negativ auf die IFN- $\gamma$ -ähnliche Antwort auswirken. Diese beiden Mutanten (IE1 $\Delta$ CTD und IE1 $\Delta$ CBM) zeigten teilweise sogar eine etwas höhere mRNA-Menge der relevanten Gene als der Wildtyp. Dies lässt den Schluss zu, dass eine Bindung von IE1 an Chromatin, die über verschiedene Aminosäuren der CTD vermittelt wird (Wilkinson et al., 1998; Reinhardt et al., 2005; Mucke et al., 2014), für eine Hochregulierung der Typ II-ISG nicht erforderlich ist. Aufgrund dieser Ergebnisse scheint die CTD für diesen Prozess sogar eher hinderlich zu sein.

Auch eine posttranslationale Sumoylierung von IE1 ist demnach für die Induktion von Typ II-ISG nicht zwingend notwendig. Eine Punktmutation an K450, die eine kovalente Bindung von SUMO-1 unmöglich macht (Xu et al., 2001; Spengler et al., 2002), führt zu keiner Verminderung der untersuchten Antwort. Jedoch zeigte die Mutante IE1-SUMO, bei der SUMO-1 über eine Deletion des Stoppcodons und eine SmaI-Restriktionsschnittstelle an die IE1-Sequenz angehängt wurde, eine deutlich verstärkte Aktivierung von CXCL10 und GBP4 im Vergleich zum Wildtyp. Dies könnte darauf hindeuten, dass eine Sumoylierung von IE1 neben einer verstärkten Expression von IE2 und der damit verbundenen Zunahme der viralen DNA-Replikation (Nevels et al., 2004) auch zu einer Steigerung der Transkription von Typ II-ISG beiträgt. Allerdings ist es schwer zu sagen, inwieweit das IE1-SUMO-Konstrukt dieser Arbeit die tatsächliche Bindung von IE1 und SUMO-1 unter natürlichen Bedingungen

widerspiegelt. Möglicherweise wurde hier eine neue Form von sumoyliertem IE1 geschaffen, bei der der SUMO-Anteil nicht in der natürlichen räumlichen Ordnung vorliegt. Aufgrund dessen ist es möglich, dass sich die Eigenschaften dieser Mutante von denen des über den normalen Weg sumoylierten IE1 unterscheiden.

	Hochregulierung von Typ II-ISG
IE1	
IE1 L174P	
IE1 $\Delta$ 291-320	
IE1 $\Delta$ AD1	
IE1 $\Delta$ S/P	
IE1 $\Delta$ AD2	
IE1 $\Delta$ AD3	
IE1 $\Delta$ AD1-S/P	
IE1 $\Delta$ AD2-AD3	
IE1 $\Delta$ CTD	
IE1 $\Delta$ CBM	
IE1 K450R	
IE1-SUMO	

**Abb. 5.1: Übersicht über die Funktionalität verschiedener IE1-Mutanten bezüglich der Hochregulierung von Typ II-ISG**

- Aktivität deutlich über Wildtypniveau
- Aktivität auf Wildtypniveau
- keine Aktivität (Ergebnis im Bereich der Negativkontrolle)

Erst im proximalen Teil des C-terminalen Abschnitts waren deutliche Unterschiede zwischen den IE1-Mutanten erkennbar, die sich vornehmlich auf den Bereich der sauren Domänen (AD1, AD2 und AD3) sowie die S/P-reiche Region konzentrierten. Dabei hatte eine isolierte Deletion von AD1, S/P oder AD3 jeweils keinen negativen Effekt auf die Expression von CXCL10 und GBP4, sodass man zunächst davon ausging, dass diese Bereiche mit der Hochregulierung von Typ II-ISG nichts zu tun haben und sich diese Funktion allein auf die AD2 (AS 421-445) konzentriert. Die entsprechende Deletionsmutante (IE1 $\Delta$ AD2) wies nämlich bei der Analyse der relativen mRNA-Menge für die beiden ISG Werte auf, die mit denen der Negativkontrolle vergleichbar waren. Folglich zeigte auch die kombinierte Deletion von AD2 und AD3 (AS 421-475) einen kompletten Funktionsausfall bezüglich dieser Eigenschaft von IE1. Da eine Wegnahme von AD3 (AS 451-475) alleine jedoch keine Auswirkungen auf die Hochregulierung von Typ II-ISG hatte, wurde AD2 als wesentlicher Bestandteil von IE1 bei der Vermittlung einer IFN- $\gamma$ -ähnlichen Immunantwort identifiziert.

Erstaunlicherweise führte die verknüpfte Deletion von AD1-S/P (AS 373-420) ebenfalls zu einer drastischen Verminderung der Expression von CXCL10 und GBP4, obwohl dies bei einem Fehlen nur eines der beiden Teilstücke (AD1 oder S/P) nicht beobachtet wurde. Dieses überraschende Verhalten kann möglicherweise dadurch erklärt werden, dass die Deletion von AD1-S/P nicht nur diese beiden

Domänen und ihr „Zwischenstück“ (AS 387-394) umfasst, sondern auch einen kleinen Bereich (AS 410-420) zwischen den Sequenzen von S/P und AD2. Eventuell gehört dieser kurze Abschnitt funktionell noch mit zu AD2, sodass sein Verlust sich negativ auf die Hochregulierung der Typ II-ISG auswirkt. Ähnlich verhält es sich möglicherweise mit dem Teilstück zwischen AD1 und S/P, das bei den Einzeldelationen ebenfalls in beiden Fällen noch erhalten ist. Eine andere Begründung für dieses Verhalten könnte sein, dass sich AD1 und S/P gegenseitig in ihrer Funktion ersetzen und dadurch den individuellen Ausfall eines dieser Bereiche kompensieren können. Nur bei einem Fehlen beider Domänen käme es folglich zu einem Verlust der Gesamtfunktion. Interessanterweise handelt es sich bei AD1-S/P um diejenige IE1-Sequenz (AS 373-420), die über eine Bindung an STAT2 die Typ I-IFN-induzierte Signalweiterleitung verhindert und in ihrer Funktion wiederum von AD2 unterstützt wird (Krauss et al., 2009). Damit befinden sich beide Funktionen von IE1, die zu einer Veränderung IFN-gesteuerter Signalwege führen (Blockierung der Typ I- und Induktion der Typ II-IFN-Antwort), in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander und lassen sich auf definierten Abschnitten im C-terminalen Bereich von IE1 lokalisieren.

Neben diesen Auffälligkeiten im C-terminalen Bereich führten auch die Mutationen im mittleren Abschnitt von IE1 zu einem Funktionsverlust bezüglich der Hochregulierung der Typ II-ISG. Weder IE1L174P noch IE1 $\Delta$ 291-320 waren in der Lage diese Antwort zu induzieren. Eine logische Schlussfolgerung wäre, dass auch diese Bereiche von IE1 dafür von essenzieller Bedeutung sind. Allerdings erwiesen sich beide Mutanten in Western Blot-Analysen als relativ instabil und lagen mit ihren Proteinnengen weit unter denen des Wildtyps und anderer Mutanten, sodass es hier schwierig ist, Rückschlüsse auf die Aktivierung von Typ II-ISG abzuleiten. Möglicherweise wurden durch die Mutationen wichtige Bereiche für die Proteinfaltung derartig verändert, dass die Ausbildung einer aktiven Form von IE1 nicht mehr möglich ist. Dafür spricht, dass vor allem IE1 $\Delta$ 291-320 bereits bei früheren Versuchen vielfältige Funktionseinschränkungen gezeigt hatte und Viren mit dieser Veränderung in ihrem Genom nicht mehr zu einer Vermehrung in Fibroblasten fähig waren (Ahn et al., 1998; Lee et al., 2004). Wegen ihrer fraglichen Struktur und begrenzten Stabilität bleiben beide Mutanten in der folgenden Diskussion über große Teile unberücksichtigt.



### 5.1.2 Zusammenhang mit der Suppression von SOCS3

Neben der Identifizierung der entscheidenden Abschnitte im IE1-Protein war der molekulare Mechanismus, welcher der Hochregulierung von Typ II-ISG zugrunde liegt, ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit. Schon lange ist bekannt, dass eine Aktivierung der JAK-STAT-Kaskade durch IFN gleichzeitig die Expression von negativen Regulatoren dieser Signalwege induziert, um eine übermäßige Stimulation des Immunsystems und dadurch die Auslösung schwerer Komplikationen für den Organismus zu verhindern (Samuel, 2001; Schroder et al., 2004; Saha et al., 2010). Zu diesen negativen Regulatoren gehören unter anderem Proteine der SOCS-Familie. Dabei spielen vor allem SOCS1 und SOCS3 eine elementare Rolle, die über eine Hemmung von JAK die Phosphorylierung von STAT1 an Y701 und damit dessen nukleäre Akkumulation verhindern (Song und Shuai, 1998; Alexander und Hilton, 2004). Neuere Untersuchungen zu den Effekten von IE1 auf das humane Transkriptom zeigten, dass dieses Protein nicht nur in der Lage ist eine Hochregulierung von Typ II-ISG zu bewirken, sondern darüber hinaus auch eine Aktivierung der SOCS3-Transkription verhindert. Dabei sequestriert das IE1-Protein unphosphoryliertes STAT3 im Zellkern und unterbindet dadurch dessen Phosphorylierung am IL-6-Rezeptor. Infolge dessen ist eine Bindung von phosphoryliertem STAT3 an den SOCS3-Promotor, die normalerweise die Transkription von SOCS3 aktiviert, nicht mehr möglich und die Expression dieses negativen Regulators IFN-stimulierter Signalwege unterbleibt (Knoblach, 2010; Reitsma et al., 2013). Eine konsekutive Überlegung daraus war, dass die IE1-vermittelte Unterdrückung der SOCS3-Aktivierung möglicherweise eine Freigabe des IFN- $\gamma$ -Signalweges und damit die Expression von Genen wie CXCL10 oder GBP4 ermöglicht. Bei einer derartigen Koppelung dieser beiden Vorgänge müssten folglich auch jeweils dieselben Abschnitte von IE1 dafür zuständig sein. Über eine Analyse der relativen Menge an SOCS3-mRNA in Zellen, die die verschiedenen IE1-Mutanten enthalten, konnte dieser Sachverhalt genauer untersucht werden. Hierbei zeigten sich zwar ähnliche Ergebnisse wie für die Hochregulierung der Typ II-ISG, allerdings war keine exakte Korrelation der beiden Datensätze erkennbar (siehe Abb. 5.2). Außer IE1L174P und IE1 $\Delta$ 291-320 wies nur IE1 $\Delta$ AD1-S/P einen kompletten Funktionsverlust bezüglich der SOCS3-Suppression auf. Die AD2 schien hingegen bei diesem Vorgang zwar unterstützend gebraucht zu werden, aber nicht essenziell notwendig zu sein, da sie die SOCS3-Expression nicht komplett, aber dennoch teilweise unterdrücken konnte. Sieht man diese Ergebnisse im Zusammenhang mit der Hochregulierung von Typ II-ISG, so ist die AD2 dort als eine der wichtigsten Regionen im IE1-Protein zu sehen. Dagegen wird die Repression von SOCS3 hauptsächlich über den Teilbereich von AD1-S/P vermittelt. Damit sind für diese beiden Prozesse (SOCS3-Repression und Typ II-ISG-Aktivierung) zwar überlappende, aber nicht exakt dieselben Abschnitte von IE1 verantwortlich, sodass man nicht davon ausgehen kann, dass sie zwingend miteinander gekoppelt sind. Demzufolge erfordert die IE1-vermittelte Expression von Genen wie CXCL10 und GBP4 mehr als nur die Suppression eines Antagonisten wie SOCS3, sodass diesem

Vorgang weitere Mechanismen zugrunde liegen müssen. Dennoch ist es naheliegend, dass die Ausschaltung von SOCS3 einen unterstützenden Effekt auf die Hochregulierung von Typ II-ISG hat, indem sie dazu beiträgt, dass eine ständige Transkription dieser Gene stattfinden kann.

	Hochregulierung von Typ II-ISG	Suppression von SOCS3
IE1		
IE1 L174P		
IE1 $\Delta$ 291-320		
IE1 $\Delta$ AD1		
IE1 $\Delta$ S/P		
IE1 $\Delta$ AD2		
IE1 $\Delta$ AD3		
IE1 $\Delta$ AD1-S/P		
IE1 $\Delta$ AD2-AD3		
IE1 $\Delta$ CTD		
IE1 $\Delta$ CBM		
IE1 K450R		
IE1-SUMO		

**Abb. 5.2: Zusammenhang zwischen der Hochregulierung von Typ II-ISG und der Suppression von SOCS3**

- Aktivität deutlich über Wildtypniveau
- Aktivität auf Wildtypniveau
- leicht reduzierte Aktivität im Vergleich zum IE1-Wildtyp
- kaum Aktivität (Ergebnis nur geringgradig oberhalb der Negativkontrolle)
- keine Aktivität (Ergebnis im Bereich der Negativkontrolle)

### 5.1.3 Zusammenhang mit der Unterdrückung von Typ I-ISG

Neben der Induktion einer IFN- $\gamma$ -ähnlichen Antwort war für IE1 bereits zuvor beschrieben worden, dass es in Typ I-IFN-stimulierte Signalwege eingreift. Über eine Bindung an STAT2 kann IE1 die Interaktion zwischen ISGF3 und ISRE verhindern und auf diese Weise die Expression antiviral wirksamer Genprodukte unterdrücken. Wie man mittlerweile weiß, wird diese Aktivität von IE1 hauptsächlich über den Abschnitt AD1-S/P (AS 373-420) vermittelt, wobei AD2 (AS 421-445) zusätzlich als eine Art unterstützender Faktor fungieren kann (Paulus et al., 2006; Huh et al., 2008; Krauss et al., 2009). Da AD1-S/P auch für die Hochregulierung der Typ II-ISG von großer Bedeutung zu sein scheint, ergab sich die Überlegung, dass die beiden Funktionen von IE1, die dessen Eingreifen in IFN-vermittelte Prozesse betreffen, zusammenhängen könnten. Eventuell hat die Bindung von STAT2 nicht nur für die Unterdrückung der Typ I-IFN-vermittelten Antwort eine wesentliche Bedeutung, sondern wird auch im Zusammenhang mit der Hochregulierung von Typ II-ISG gebraucht, beispielsweise indem sie zur Freisetzung von STAT1 aus STAT1-STAT2-Komplexen führt. Vergleicht man jedoch Daten von verschiedenen IE1-Mutanten zur Aktivierung der Typ II-ISG GBP4 und CXCL10 mit jenen zur Repression von OAS1 nach Stimulation mit IFN- $\alpha$ , so zeigt sich, dass für diese Vorgänge jeweils nicht exakt dieselben Bereiche von IE1 verantwortlich sind (Abb. 5.3).

	Hochregulierung von Typ II-ISG	Suppression von OAS1
IE1		
IE1 L174P		
IE1 $\Delta$ 291-320		
IE1 $\Delta$ AD1		
IE1 $\Delta$ S/P		
IE1 $\Delta$ AD2		
IE1 $\Delta$ AD3		
IE1 $\Delta$ AD1-S/P		
IE1 $\Delta$ AD2-AD3		
IE1 $\Delta$ CTD		
IE1 $\Delta$ CBM		
IE1 K450R		
IE1-SUMO		

**Abb. 5.3: Zusammenhang zwischen der Hochregulierung von Typ II-ISG und der Suppression von Typ I-ISG**

- Aktivität deutlich über Wildtypniveau
- Aktivität auf Wildtypniveau
- leicht reduzierte Aktivität im Vergleich zum IE1-Wildtyp
- keine Aktivität (Ergebnis im Bereich der Negativkontrolle)

So wird die Suppression von OAS1 hauptsächlich über AD1-S/P vermittelt, wohingegen IE1 $\Delta$ AD2 in diesem Zusammenhang nur ein gering ausgeprägtes Funktionsdefizit aufweist, wie es bereits beschrieben worden war (Krauss et al., 2009). Im Gegensatz dazu bewirkt ein Fehlen von AD2 eine vollständige Inaktivität von IE1 in Bezug auf die Induktion einer IFN- $\gamma$ -ähnlichen Immunantwort.

Dies lässt den Schluss zu, dass die Bindung von STAT2 mit anschließender Suppression Typ I-IFN-stimulierter Faktoren und die Aktivierung der Expression von Typ II-ISG nicht zwangsläufig miteinander gekoppelt sind. Allerdings kann auch hier eine gegenseitige Beeinflussung nicht ausgeschlossen werden, da sich die entsprechenden Areale in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander befinden und bei beiden Vorgängen dieselben Mutanten Auffälligkeiten zeigen, die sich jedoch in ihrer Ausprägung stark voneinander unterscheiden. Aufgrund dieser Ergebnisse muss es also neben der Bindung von STAT2 und der Unterdrückung der SOCS3-Expression weitere Faktoren geben, die für die Induktion einer IFN- $\gamma$ -ähnlichen Antwort durch IE1 wichtig sind.

### 5.1.4 Bedeutung der Interaktion zwischen IE1 und STAT1

Bereits erste Analysen bezüglich des molekularen Mechanismus der Hochregulierung von Typ II-ISG durch IE1 hatten gezeigt, dass hier ein Ablauf ähnlich der JAK-STAT-Kaskade vorliegt, der eine Phosphorylierung von STAT1 an Y701 (und S727) erfordert, die anschließend zu einer Akkumulation dieses Proteins im Zellkern und dort zu einer Bindung an die GAS-Elemente der DNA führt. Jedoch ist der eigentliche Auslöser dieser Vorgänge in Abwesenheit von IFN- $\gamma$  nicht bekannt. Es wurde vermutet, dass die Aktivierung der Transkription eines löslichen Faktors durch IE1 sowie unter Umständen auch eine Interaktion zwischen IE1 und STAT1 zu den beschriebenen Prozessen führen könnten (Knoblach et al., 2011).

Auch im Rahmen dieser Arbeit wurde bei den einzelnen Mutanten mittels Western Blot- und Immunfluoreszenzanalysen die Relevanz der Phosphorylierung von STAT1 für die Induktion dieser IFN- $\gamma$ -ähnlichen Antwort untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass eben jene Formen von IE1, die keine Phosphorylierung von STAT1 an Y701 (und S727) und folglich auch keine nukleäre Akkumulation dieses Proteins bewirken konnten, auch ein Funktionsdefizit bezüglich der Hochregulierung von Typ II-ISG aufweisen (Abb. 5.4). Damit konnte die große Bedeutung dieser Prozesse im Zusammenhang mit der Aktivierung von Genen wie CXCL10 und GBP4 nochmals bestätigt werden.

	Hochregulierung von Typ II-ISG	Phosphorylierung von STAT1 an Y701	Phosphorylierung von STAT1 an S727	Nukleäre Akkumulation von STAT1	(Indirekte) Bindung an STAT1
IE1	■	■	■	■	■
IE1 L174P	■	■	■	■	■
IE1 $\Delta$ 291-320	■	■	■	■	■
IE1 $\Delta$ AD1	■	■	■	■	■
IE1 $\Delta$ S/P	■	■	■	■	■
IE1 $\Delta$ AD2	■	■	■	■	■
IE1 $\Delta$ AD3	■	■	■	■	■
IE1 $\Delta$ AD1-S/P	■	■	■	■	■
IE1 $\Delta$ AD2-AD3	■	■	■	■	■
IE1 $\Delta$ CTD	■	■	■	■	■
IE1 $\Delta$ CBM	■	■	■	■	■
IE1 K450R	■	■	■	■	■
IE1-SUMO	■	■	■	(*)	■

**Abb. 5.4: Zusammenhang zwischen der Bindung, Phosphorylierung und nukleären Akkumulation von STAT1 und der Hochregulierung von Typ II-ISG durch IE1**

- Aktivität deutlich über Wildtypniveau
- Aktivität leicht über Wildtypniveau
- Aktivität auf Wildtypniveau
- leicht reduzierte Aktivität im Vergleich zum IE1-Wildtyp
- deutlich reduzierte Aktivität im Vergleich zum IE1-Wildtyp
- kaum Aktivität (Ergebnis nur geringgradig oberhalb der Negativkontrolle)
- keine Aktivität (Ergebnis im Bereich der Negativkontrolle)

(\*) Bei der Mutante IE1-SUMO zeigte sich die nukleäre Akkumulation von STAT1 als punktförmiges statt als diffuses Muster.

Die entscheidende Frage dabei war allerdings, was all diese Vorgänge einschließlich der STAT1-Phosphorylierung letzten Endes auslöst. Frühere Experimente der eigenen Arbeitsgruppe im Zusammenhang mit der Blockade von Typ I-IFN-vermittelten Signalwegen hatten gezeigt, dass IE1 nicht nur in der Lage ist an STAT2 zu binden, sondern auch an STAT1, wenngleich Komplexe aus IE1 und STAT1 in wesentlich geringeren Mengen als IE1-STAT2-Komplexe nachweisbar waren (Paulus et al., 2006). In der Annahme, dass eine IE1-STAT1-Interaktion auch für die Hochregulierung von Typ II-ISG wichtig sein könnte, wurde dieser Sachverhalt mittels Co-IP für die jeweiligen IE1-Mutanten analysiert. Diese Versuche führten zu dem Ergebnis, dass IE1 und einige seiner Mutanten zu einer Wechselwirkung mit STAT1 fähig sind. Ob es sich dabei jedoch um eine direkte oder nur eine indirekte Bindung über andere Proteine handelt, konnten diese Experimente nicht zeigen. Jedoch ließen wiederum dieselben IE1-Mutanten, die keine Interaktion mit STAT1 zeigten, weder eine Phosphorylierung mit anschließender nukleärer Akkumulation von STAT1 noch eine Aktivierung IFN- $\gamma$ -stimulierter Gene erkennen (Abb. 5.4). Aufgrund dieser Daten ist anzunehmen, dass die direkte oder indirekte Interaktion zwischen dem IE1-Protein und STAT1 ein weiteres maßgebliches Element im komplexen Prozess der Induktion einer IFN- $\gamma$ -ähnlichen Antwort darstellt. Genau wie bei allen anderen untersuchten Vorgängen kommt auch dabei dem Bereich von AD2 (AS 421-445) sowie der davor liegenden Region um AD1-S/P (AS 373-420) in der C-terminalen Domäne von IE1 die größte Bedeutung zu.

Da IE1 fast ausschließlich im Zellkern und bestenfalls in sehr geringen Mengen im Zytoplasma vorkommt (Mocarski, 2007), ist es unwahrscheinlich, dass eine Interaktion mit STAT1 außerhalb des Zellkerns stattfindet. Dementsprechend kommt es vermutlich bereits zuvor zu einer Phosphorylierung von STAT1, die eine nukleäre Translokation dieses Proteins bewirkt. Für die Phosphorylierung ist nicht zwangsläufig eine Aktivierung durch IFN- $\gamma$  notwendig, da auch andere Mediatoren wie Wachstumsfaktoren oder Hormone dies in begrenztem Umfang bewerkstelligen können (Subramaniam et al., 2001). Deshalb ist es naheliegend, dass STAT1 zumindest zu einem geringen Anteil in Form von phosphorylierten, aktiven Dimeren im Zytoplasma vorliegt. Diese Hypothese wird zusätzlich dadurch gestützt, dass IE1 im Gegensatz zu IFN- $\gamma$  nur eine Phosphorylierung von vergleichsweise wenigen STAT1-Molekülen bewirkt (Knoblach et al., 2011). Durch ihre Eigenschaft zwischen Zytoplasma und Zellkern hin und her zu pendeln (Meyer und Vinkemeier, 2004; Reich und Liu, 2006; Sehgal, 2008), würden zumindest kleine Mengen an STAT1 in den Zellkern gelangen. Dort könnte dann, durch Bindung an IE1, zum einen eine Dephosphorylierung verhindert und zum anderen ein Verlassen des nukleären Zellkompartiments unterbunden werden, sodass es im Laufe der Zeit zu einer Akkumulation von STAT1 im Zellkern kommt. Im Verlauf könnte das IE1-Protein zusätzlich für eine Komplexbildung mit weiteren, bisher noch nicht identifizierten Faktoren sowie für die STAT1-Bindung an die entsprechenden DNA-Sequenzen und die Aktivierung der Transkription wichtig sein.

Der Nachweis einer Interaktion zwischen IE1 und STAT1 schließt allerdings die von Knoblach et al. (2011) favorisierte Existenz eines oder mehrerer löslicher Faktoren nicht aus, die eventuell zu einer Verstärkung der Phosphorylierung von STAT1 beitragen könnten. Vielmehr lässt die Komplexität dieser Vorgänge erahnen, dass an diesem Prozess mehr Komponenten beteiligt sind als derzeit bekannt. So deuten Beobachtungen aus dieser wie aus anderen Arbeiten darauf hin, dass neben STAT1 auch die PML-Körper eine wesentliche Rolle im Zusammenhang mit dieser Antwort spielen (siehe 5.1.5).

### **5.1.5 Rolle der PML-Körper**

Die als PML-Körper oder ND10 bezeichneten Multiproteinkomplexe im Zellkern spielen für viele verschiedene Prozesse innerhalb der Zelle eine Rolle. Auch im Kontext von Virusinfektionen werden ihnen die unterschiedlichsten Funktionen zugeschrieben. Bereits seit einiger Zeit geht man davon aus, dass die PML-Körper unter anderem an der Vermittlung einer antiviralen Wirkung beteiligt sind, da hCMV und andere Viren effektive Mechanismen entwickelt haben, um diese Strukturen zu modifizieren. Bei hCMV kommt dabei dem IE1-Protein wiederum eine besondere Bedeutung zu, da es in der Lage ist sowohl an PML zu binden als auch, kurze Zeit später, eine Auflösung der PML-Körper zu bewirken (Korioth et al., 1996; Ahn und Hayward, 1997; Ahn et al., 1998; Wilkinson et al., 1998; Muller und Dejean, 1999). Andererseits werden diese Strukturen jedoch auch als wichtige Bausteine für eine erfolgreiche Expression der viralen DNA angesehen, da nur in deren unmittelbarer Nähe zu Beginn der Infektion transkriptionell aktive Virusgenome gefunden wurden. PML-Körper sind also wahrscheinlich nicht nur Gegner der Viren, sondern weisen in Bezug auf bestimmte Funktionen sogar provirale Eigenschaften auf (Ishov et al., 1997).

Überdies sind die PML-Körper dafür bekannt, dass sie auch unabhängig von der Infektion einer Zelle, über eine Reorganisation von Chromatin und eine Interaktion mit Co-Faktoren der Transkription, die Expression zellulärer Gene regulieren können (Bernardi und Pandolfi, 2007; Tavalai und Stamminger, 2008; Tavalai und Stamminger, 2009). Dies spielt auch im Zusammenhang mit IFN-regulierten Vorgängen eine große Rolle. So ist bereits seit längerem bekannt, dass eine Stimulation von Zellen mit IFN- $\gamma$  zu einer Steigerung der Expression von MHC-Genen der Klasse I auf Chromosom 6 führt, die ebenso wie CXCL10 und GBP4 zur großen Familie der ISG gehören. Dabei kommt es in Abhängigkeit von phosphoryliertem STAT1 zur Auflockerung des Chromatins in diesem Bereich, was durch die Ausbildung von Chromatinschleifen sichtbar wird. Damit assoziiert wurden auch große Mengen an PML-Körpern gefunden, sodass man davon ausgeht, dass diese ebenfalls an der Transkription dieser Gene beteiligt sind und so die IFN- $\gamma$ -vermittelte Immunantwort unterstützen (Zheng et al., 1998; Volpi et al., 2000; Shiels et al., 2001; Christova et al., 2007; Kumar et al., 2007). Neuere Ergebnisse zeigen zudem, dass die Anwesenheit von sumoyliertem PML im Zellkern zu einer gesteigerten Phos-

phorylierung von STAT1 führt und damit einen verstärkenden Effekt auf die Weiterleitung IFN- $\gamma$ -induzierter Signale hat, wohingegen ein Fehlen des PML-Proteins zu einer deutlichen Abschwächung der Expression IFN- $\gamma$ -stimulierter Gene führt (El Bougrini et al., 2011).

Betrachtet man diese Aspekte im Zusammenhang mit der Hochregulierung von Typ II-ISG durch IE1, so könnten die PML-Körper zum einen durch eine verstärkte Phosphorylierung von STAT1 und zum anderen über eine Erleichterung der Transkription der entsprechenden Gene an diesen Prozessen beteiligt sein. Experimente der eigenen Arbeitsgruppe ließen zudem bereits erkennen, dass eine Hochregulierung der Typ II-ISG durch IE1 in Abwesenheit von PML nicht möglich ist (Knoblach, 2010). Daher wurden die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten IE1-Mutanten auch bezüglich ihrer Fähigkeit mit den PML-Körpern zu interagieren genauer analysiert (siehe Abb. 5.5). Dabei stellte sich heraus, dass eine Auflösung der PML-Körper für die Induktion der IFN- $\gamma$ -ähnlichen Antwort nicht notwendig ist. Dies wird vor allem daran deutlich, dass IE1-SUMO zu diesem Vorgang nicht mehr in der Lage ist, aber dennoch eine sehr starke Hochregulierung von Typ II-ISG bewirken kann. Auch eine Rekrutierung von PML an mitotisches Chromatin, die ebenfalls durch IE1 vermittelt wird (Ahn et al., 1998), spielt diesen Daten zufolge für die untersuchte Antwort keine Rolle. Sowohl eine Deletion als auch eine Veränderung der CTD in Form der CBM führten zu einem Verlust der Bindefähigkeit von IE1 an Chromatin. Folglich konnten diese Mutanten auch PML nicht mehr dorthin dirigieren, wiesen aber dennoch eine Induktion von Typ II-ISG auf, die mit den Ergebnissen des IE1-Wildtyps vergleichbar war.

Im Gegensatz dazu kann anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden, dass eine Assoziation von IE1 mit PML-Körpern für die Aktivierung von Genen wie CXCL10 oder GBP4 eine Rolle spielt. Von den untersuchten Mutanten konnte für alle, die noch zu einer Aktivierung der IFN- $\gamma$ -ähnlichen Antwort fähig waren, auch eine Kolo-kalisation mit PML im Zellkern nachgewiesen werden. Dabei war zudem auffällig, dass eine Mutante wie IE1-SUMO, die konstitutiv und in großen Mengen an PML-Körpern zu finden ist, auch die stärkste Induktion der Typ II-ISG bewirkt. Dagegen sind Mutanten wie IE1L174P und IE1 $\Delta$ 291-320, die nicht mehr an PML binden können, wie es bereits zuvor von anderen Arbeitsgruppen beschrieben worden war (Ahn, 1998; Lee, 2004; Müller und Dejean, 1999), auch bezüglich der untersuchten Antwort komplett funktionslos. Allerdings ist es im Rahmen der erhobenen Daten schwierig, Rückschlüsse auf die Bedeutung einer Interaktion zwischen IE1 und PML für die Hochregulierung von Typ II-ISG zu ziehen, da diese beiden Mutanten (IE1L174P und IE1 $\Delta$ 291-320) sich, wie bereits erwähnt, insgesamt als äußerst instabil erwiesen hatten.

	Hochregulierung von Typ II-ISG	Assoziation mit PML-Körpern	Auflösung von PML-Körpern	Bindung an Chromatin	Rekrutierung von PML an Chromatin
IE1					
IE1 L174P					
IE1 $\Delta$ 291-320					
IE1 $\Delta$ AD1					
IE1 $\Delta$ S/P					
IE1 $\Delta$ AD2					
IE1 $\Delta$ AD3					
IE1 $\Delta$ AD1-S/P					
IE1 $\Delta$ AD2-AD3					
IE1 $\Delta$ CTD					
IE1 $\Delta$ CBM					
IE1 K450R					
IE1-SUMO					

**Abb. 5.5: Zusammenhang zwischen der Bindung und Auflösung von PML-Körpern sowie der Rekrutierung des PML-Proteins an Chromatin und der Hochregulierung von Typ II-ISG durch IE1**

- Aktivität deutlich über Wildtypniveau
- Aktivität auf Wildtypniveau
- keine Aktivität (Ergebnis im Bereich der Negativkontrolle)
- aussagekräftige Beurteilung des untersuchten Sachverhaltes nicht möglich

Jedoch zeigen die vorliegenden Daten, dass die PML-Körper für diese Vorgänge nicht zwangsläufig über lange Zeit intakt bleiben müssen, da eine Auflösung dieser Proteinkomplexe zu keinem Defizit bezüglich der Induktion einer IFN- $\gamma$ -ähnlichen Antwort führt, wie verschiedene Mutanten beweisen, die sowohl zu einer Zerstörung der PML-Körper als auch zu einer Aktivierung von Typ II-ISG fähig sind. Möglicherweise ist daher nur eine initiale Kolo-kalisation zwischen IE1 und PML im Zellkern wichtig und nicht die Interaktion mit anderen Komponenten der PML-Körper. Neben IE1 und PML sind eventuell auch die phosphorylierten STAT1-Dimere Bestandteile dieses Komplexes, da sowohl PML als auch IE1 bekanntermaßen mit STAT1 interagieren können (Choi, 2006). Zudem konnten in immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen dieser Arbeit Hinweise auf eine nukleäre Kolo-kalisation von IE1 und STAT1 an PML-Körpern gefunden werden (4.1.3.3).

Betrachtet man die oben geschilderten, bereits bekannten Aspekte des PML-Proteins im Kontext mit der Hochregulierung von Typ II-ISG, so ergibt sich folgende Modellvorstellung: Ein Komplex aus IE1 und dem aktivierten STAT1-Homodimer bindet im Zellkern an PML, welches anschließend durch eine Reorganisation des Chromatins und die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, ähnlich der Induktion von Transkriptionsvorgängen auf dem MHC Klasse I Genlocus, sowohl den Zugang des IE1-STAT1-Komplexes zu den entsprechenden DNA-Sequenzen als auch deren Transkription erleichtern bzw. erst möglich machen könnte. Daneben ist es aber auch denkbar, dass für die Induktion dieser Antwort lediglich die Anwesenheit des PML-Proteins im Zellkern ohne die Ausbildung eines derartigen Komplexes erforderlich ist. Diese Frage kann jedoch anhand der hier durchgeführten Versuche nicht abschließend geklärt werden. Ebenso wenig kann eine konkrete Aussage darüber getroffen werden,



inwieweit eine Wechselwirkung zwischen IE1 und PML für die Hochregulierung der Typ II-ISG tatsächlich von Bedeutung ist.

Eindeutig belegt werden kann jedoch die Tatsache, dass die Interaktion mit PML allein nicht für die Induktion einer IFN- $\gamma$ -ähnlichen Antwort ausreicht, da Mutanten wie IE1 $\Delta$ AD2 oder IE1 $\Delta$ AD1-S/P in Bezug auf ihre Wechselwirkung mit den PML-Körpern völlig unauffällig sind und trotzdem keine Aktivierung von Typ II-ISG vermitteln. Auch dieser Sachverhalt legt wiederum oben beschriebene Hypothese nahe, dass die Aktivierung von Genen wie CXCL10 und GBP4 durch IE1 ein Zusammenspiel mehrerer verschiedener Faktoren erfordert, von denen zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht alle bekannt sind.

## 5.2 Schlussfolgerung und Ausblick

Anhand der vorliegenden Daten lässt sich zusammenfassend sagen, dass für eine Hochregulierung von Typ II-ISG vor allem die C-terminalen Abschnitte AD2 (AS 421-445) sowie AD1-S/P (AS 373-420) des IE1-Proteins benötigt werden, die unter anderem für die Komplexbildung zwischen IE1 und STAT1 wichtig sind und darüber hinaus einen Beitrag zur Phosphorylierung und nukleären Akkumulation von STAT1 leisten. Vor allem die Region im Bereich von AD1-S/P spielt darüber hinaus auch in Bezug auf die Repression der SOCS3-Expression eine essenzielle Rolle und wird in dieser Funktion möglicherweise zusätzlich durch AD2 unterstützt. Damit befinden sich alle bisher bekannten Funktionen des IE1-Proteins bezüglich der Interaktion mit IFN-vermittelten Signalwegen (Induktion der IFN- $\gamma$ -ähnlichen Antwort, Suppression der SOCS3-Aktivierung und Inhibition des Typ I-IFN-Signalweges über Bindung an STAT2) im C-terminalen Abschnitt von AD1-S/P bis AD2 (AS 373-445). Aufgrund der unterschiedlichen Relevanz der beschriebenen Abschnitte für die jeweilige Antwort erscheint eine direkte Kopplung dieser drei Funktionen des IE1-Proteins unwahrscheinlich, vermutlich unterstützen sich die entsprechenden IE1-Sequenzen jedoch gegenseitig in ihrer Funktion.

Möglicherweise kommt im Rahmen der Hochregulierung von Typ II-ISG auch der Interaktion zwischen IE1 und PML im Zellkern eine gewisse Bedeutung zu. Dabei ist weder die Auflösung der nukleären Komplexe noch die Rekrutierung von PML an mitotisches Chromatin entscheidend, sondern eher die Kolo-kalisation von IE1 mit dem PML-Protein zu Beginn der Infektion. Der genaue Ablauf dieser Prozesse ist jedoch noch weitgehend unbekannt, sodass künftig weitere Versuche klären müssen, wie PML tatsächlich an dieser Antwort beteiligt ist. Über Co- und Chromatin-Immünpräzipitation könnte in diesem Zusammenhang untersucht werden, ob eine Bindung des PML-Proteins an STAT1 oder bestimmte DNA-Sequenzen für die Transkription von Genen wie CXCL10 oder GBP4 erforderlich ist. Darüber hinaus könnte auch die Detektion des vermuteten löslichen Faktors Gegenstand weiterer Analysen zur Aufklärung dieser komplexen Funktion des IE1-Proteins sein.

Neben der Ermittlung des genauen Ablaufs sollte ein weiteres Forschungsziel sein, auch den Nutzen dieser Antwort für hCMV aufzuklären, um die biologische Bedeutung zu verstehen. Die erworbenen Kenntnisse könnten anschließend zur Entwicklung der dringend benötigten neuen Medikamente zur Bekämpfung der hCMV-Infektion bei Risikopatienten beitragen. Zudem könnten sie in die laufenden Forschungen an einem Impfstoff einfließen, der eine Neuinfektion mit diesem Virus zuverlässig verhindern kann.

## 6 Anhang

### Abkürzungsverzeichnis

A	Alanin
Abb.	Abbildung
AD	saure Domäne (acidic domain)
AIDS	erworbenes Immundefektsyndrom (aquired immunodeficiency syndrome)
AS	Aminosäure
Bacmid	bacterial artificial chromosome
bidest.	zweifach destilliert
bzw.	beziehungsweise
C-	Carboxy-
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CBM	Chromatin-Binde-Mutante
cDNA	copy DNA
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratzenimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Co-IP	Co-Immunpräzipitation
Cp	crossing point
CTD	Chromatinbindedomäne (chromatin tethering domain)
CXCL	C-X-C Motiv-Ligand
DAPI	4, 6-Diamin-2-Phenylindol
Daxx	Todesdomänen-assoziiertes Protein
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's modified eagles medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
Dox	Doxycyclin
E-	früh (early)
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	eukaryotisches grünes Fluoreszenzprotein (enhanced green fluorescent protein)
et al.	und andere
EtBr	Ethidiumbromid
FKS	Fötale Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
g/l	Gramm pro Liter
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GAS	Interferon- $\gamma$ -aktivierte Sequenz (interferon- $\gamma$ activated sequence)
GBP	Guanylatbindeprotein
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunden (hours)
HAART	highly active antiretroviral therapy
hCMV	humanes Zytomegalievirus
HIV	humanes Immundefizienzvirus (human immunodeficiency virus)
H <sub>2</sub> O	Wasser
HRP	Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase)

---

HSV-1	Herpes simplex Virus Typ 1
ICP0	infected cell protein 0
IE	sehr früh (immediate early)
IE1	hCMV 72 kDa immediate early-Protein 1
IE2	hCMV 86 kDa immediate early-Protein 2
IF	indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie
IFN	Interferon(e)
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL-6	Interleukin-6
IRF9	interferon regulatory factor 9
IR <sub>L</sub>	internal repeat long
IR <sub>S</sub>	internal repeat short
ISGF3	interferon stimulated gene factor 3
ISG	Interferon-stimulierte Gene (interferon stimulated genes)
ISRE	interferon stimulated response element
JAK	Januskinase(n)
K	Lysin
kb	Kilobasen
kbp	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
L	Leucin
L-	spät (late)
l	Liter
LB	Luria-Bertani
M	Methionin
M	molar (mol/l)
mA	Milliampere
MCH	major histocompatibility complex
μF	Mikrofarad
MIE	major immediate early
MIEP	major immediate early Promotor
mg	Milligramm
μg	Mikrogramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar (mmol/l)
μM	Mikromolar (μmol/l)
mm	Millimeter
μl	Mikroliter
mmol	Millimol
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger RNA)
Mx	Myxovirus
N-	Amino-
NaCl	Natriumchlorid
ND10	Nukleäre Domäne 10 (nuclear domain 10)
NEM	N-Ethylmaleimid
ng	Nanogramm
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NLS	nukleäres Lokalisationssignal (nuclear localization signal)
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
OAS1	2', 5'-Oligoadenylatsynthetase 1

---

OD	optische Dichte
P	Prolin
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PML	promyelocytic leukemia
pp	Phosphoprotein
pSTAT1	phosphoryliertes STAT1
qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
R	Arginin
rev	regulator of expression of virion proteins
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
RT-qPCR	Reverse Transkriptase quantitative Polymerasekettenreaktion
S	Serin
s	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SFM	serumfreies Medium
SOCS	suppressor of cytokine signaling
S/P	Serin/Prolin
Sp100	speckled protein of 100 kDa
STAT	signal transducer and activator of transcription
SUMO	small ubiquitin-like modifier
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
tat	trans-activator of transcription
TetO	Tetrazyklin-Operator
TetR	Tetrazyklin-Repressor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TR <sub>L</sub>	terminal repeat long
TR <sub>S</sub>	terminal repeat short
Tyk	Tyrosinkinase
U	Einheiten (units)
U <sub>L</sub>	unique long
U <sub>S</sub>	unique short
UV	ultraviolett
V	Volt
% [v/v]	Volumenprozent
WB	Western Blot
% [w/v]	Gewichtsprozent
Y	Tyrosin
z.B.	zum Beispiel

## Literaturverzeichnis

- Aggarwal BB, Kunnumakkara AB, Harikumar KB, Gupta SR, Tharakan ST, Koca C, Dey S, Sung B. 2009. Signal transducer and activator of transcription-3, inflammation, and cancer: how intimate is the relationship? *Ann N Y Acad Sci* 1171: 59-76.
- Ahn JH, Brignole EJ, 3rd, Hayward GS. 1998. Disruption of PML subnuclear domains by the acidic IE1 protein of human cytomegalovirus is mediated through interaction with PML and may modulate a RING finger-dependent cryptic transactivator function of PML. *Mol Cell Biol* 18(8): 4899-4913.
- Ahn JH, Hayward GS. 1997. The major immediate-early proteins IE1 and IE2 of human cytomegalovirus colocalize with and disrupt PML-associated nuclear bodies at very early times in infected permissive cells. *J Virol* 71(6): 4599-4613.
- Alexander WS, Hilton DJ. 2004. The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. *Annu Rev Immunol* 22: 503-529.
- Baldick CJ, Jr., Marchini A, Patterson CE, Shenk T. 1997. Human cytomegalovirus tegument protein pp71 (ppUL82) enhances the infectivity of viral DNA and accelerates the infectious cycle. *J Virol* 71(6): 4400-4408.
- Bernardi R, Pandolfi PP. 2007. Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(12): 1006-1016.
- Bonalumi S, Trapanese A, Santamaria A, D'Emidio L, Mobili L. 2011. Cytomegalovirus infection in pregnancy: review of the literature. *Journal of prenatal medicine* 5(1): 1-8.
- Braunstein J, Brutsaert S, Olson R, Schindler C. 2003. STATs dimerize in the absence of phosphorylation. *J Biol Chem* 278(36): 34133-34140.
- Choi YH, Bernardi R, Pandolfi PP, Benveniste EN. 2006. The promyelocytic leukemia protein functions as a negative regulator of IFN-gamma signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(49): 18715-18720.
- Christova R, Jones T, Wu PJ, Bolzer A, Costa-Pereira AP, Watling D, Kerr IM, Sheer D. 2007. P-STAT1 mediates higher-order chromatin remodelling of the human MHC in response to IFN-gamma. *J Cell Sci* 120(Pt 18): 3262-3270.
- Cinatl J, Jr., Vogel JU, Kotchetkov R, Wilhelm Doerr H. 2004. Oncomodulatory signals by regulatory proteins encoded by human cytomegalovirus: a novel role for viral infection in tumor progression. *FEMS microbiology reviews* 28(1): 59-77.
- Cobbs CS. 2011. Evolving evidence implicates cytomegalovirus as a promoter of malignant glioma pathogenesis. *Herpesviridae* 2(1): 10.
- Cobbs CS, Harkins L, Samanta M, Gillespie GY, Bharara S, King PH, Nabors LB, Cobbs CG, Britt WJ. 2002. Human cytomegalovirus infection and expression in human malignant glioma. *Cancer Res* 62(12): 3347-3350.
- Compton T, Feire A. 2007. Early events in human cytomegalovirus infection. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, (ed. A Arvin, G Campadelli-Fiume, E Mocarski, PS Moore, B Roizman, R Whitley, K Yamanishi), Cambridge.
- Compton T, Nepomuceno RR, Nowlin DM. 1992. Human cytomegalovirus penetrates host cells by pH-independent fusion at the cell surface. *Virology* 191(1): 387-395.
- Crough T, Khanna R. 2009. Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clinical microbiology reviews* 22(1): 76-98, Table of Contents.
- DuBridghe RB, Tang P, Hsia HC, Leong PM, Miller JH, Calos MP. 1987. Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol* 7(1): 379-387.
- El Bougrini J, Dianoux L, Chelbi-Alix MK. 2011. PML positively regulates interferon gamma signaling. *Biochimie* 93(3): 389-398.
- Everett RD, Chelbi-Alix MK. 2007. PML and PML nuclear bodies: implications in antiviral defence. *Biochimie* 89(6-7): 819-830.

- Everett RD, Parsy ML, Orr A. 2009. Analysis of the functions of herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP0 that are critical for lytic infection and derepression of quiescent viral genomes. *J Virol* 83(10): 4963-4977.
- Gandhi MK, Khanna R. 2004. Human cytomegalovirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging treatments. *The Lancet infectious diseases* 4(12): 725-738.
- Gibson W. 2008. Structure and formation of the cytomegalovirus virion. *Curr Top Microbiol Immunol* 325: 187-204.
- Graham FL, van der Eb AJ. 1973. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52(2): 456-467.
- Greaves RF, Mocarski ES. 1998. Defective growth correlates with reduced accumulation of a viral DNA replication protein after low-multiplicity infection by a human cytomegalovirus ie1 mutant. *J Virol* 72(1): 366-379.
- Grefte A, Harmsen MC, van der Giessen M, Knollema S, van Son WJ, The TH. 1994. Presence of human cytomegalovirus (HCMV) immediate early mRNA but not ppUL83 (lower matrix protein pp65) mRNA in polymorphonuclear and mononuclear leukocytes during active HCMV infection. *J Gen Virol* 75 ( Pt 8): 1989-1998.
- Griffiths P, Plotkin S, Mocarski E, Pass R, Schleiss M, Krause P, Bialek S. 2013. Desirability and feasibility of a vaccine against cytomegalovirus. *Vaccine* 31 Suppl 2: B197-203.
- Haspot F, Lavault A, Sinzger C, Laib Sampaio K, Stierhof YD, Pilet P, Bressolette-Bodin C, Halary F. 2012. Human cytomegalovirus entry into dendritic cells occurs via a macropinocytosis-like pathway in a pH-independent and cholesterol-dependent manner. *PLoS One* 7(4): e34795.
- Ho SN, Hunt HD, Horton RM, Pullen JK, Pease LR. 1989. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77(1): 51-59.
- Huh YH, Kim YE, Kim ET, Park JJ, Song MJ, Zhu H, Hayward GS, Ahn JH. 2008. Binding STAT2 by the acidic domain of human cytomegalovirus IE1 promotes viral growth and is negatively regulated by SUMO. *J Virol*. 82(21): 10444-10454.
- Ibanez CE, Schrier R, Ghazal P, Wiley C, Nelson JA. 1991. Human cytomegalovirus productively infects primary differentiated macrophages. *J Virol* 65(12): 6581-6588.
- Ishov AM, Stenberg RM, Maul GG. 1997. Human cytomegalovirus immediate early interaction with host nuclear structures: definition of an immediate transcript environment. *J Cell Biol* 138(1): 5-16.
- Knoblach T. 2010. Das Cytomegalievirus IE1-Protein als Regulator des humanen Transkriptoms und Zielstruktur RNAi-basierter Therapiestrategien. In *Institute for Medical Microbiology and Hygiene*, Vol Dr. rer. nat., p. 114. University of Regensburg, Regensburg.
- Knoblach T, Grandel B, Seiler J, Nevels M, Paulus C. 2011. Human cytomegalovirus IE1 protein elicits a type II interferon-like host cell response that depends on activated STAT1 but not interferon- $\gamma$ . *PLoS Pathog*, Vol 7, p. e1002016.
- Korioth F, Maul GG, Plachter B, Stamminger T, Frey J. 1996. The nuclear domain 10 (ND10) is disrupted by the human cytomegalovirus gene product IE1. *Exp Cell Res* 229(1): 155-158.
- Krauss S, Kaps J, Czech N, Paulus C, Nevels M. 2009. Physical requirements and functional consequences of complex formation between the cytomegalovirus IE1 protein and human STAT2. *J Virol* 83(24): 12854-12870.
- Kumar PP, Bischof O, Purbey PK, Notani D, Urlaub H, Dejean A, Galande S. 2007. Functional interaction between PML and SATB1 regulates chromatin-loop architecture and transcription of the MHC class I locus. *Nat Cell Biol* 9(1): 45-56.
- Lafemina RL, Pizzorno MC, Mosca JD, Hayward GS. 1989. Expression of the acidic nuclear immediate-early protein (IE1) of human cytomegalovirus in stable cell lines and its preferential association with metaphase chromosomes. *Virology* 172(2): 584-600.
- Lathey JL, Spector SA. 1991. Unrestricted replication of human cytomegalovirus in hydrocortisone-treated macrophages. *J Virol* 65(11): 6371-6375.
- Lee HR, Kim DJ, Lee JM, Choi CY, Ahn BY, Hayward GS, Ahn JH. 2004. Ability of the human cytomegalovirus IE1 protein to modulate sumoylation of PML correlates with its functional

- activities in transcriptional regulation and infectivity in cultured fibroblast cells. *J Virol* 78(12): 6527-6542.
- Ludwig A, Hengel H. 2009. Epidemiological impact and disease burden of congenital cytomegalovirus infection in Europe. *Euro surveillance: bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 14(9): 26-32.
- McGraw BR, Marinus MG. 1980. Isolation and characterization of Dam<sup>+</sup> revertants and suppressor mutations that modify secondary phenotypes of dam-3 strains of Escherichia coli K-12. *Molecular & general genetics: MGG* 178(2): 309-315.
- McVoy MA, Adler SP. 1994. Human cytomegalovirus DNA replicates after early circularization by concatemer formation, and inversion occurs within the concatemer. *J Virol* 68(2): 1040-1051.
- Melnick JL, Adam E, DeBakey ME. 1995. Cytomegalovirus and atherosclerosis. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 17(10): 899-903.
- Mercorelli B, Sinigaglia E, Loregian A, Palu G. 2008. Human cytomegalovirus DNA replication: antiviral targets and drugs. *Rev Med Virol* 18(3): 177-210.
- Meyer T, Vinkemeier U. 2004. Nucleocytoplasmic shuttling of STAT transcription factors. *Eur J Biochem* 271(23-24): 4606-4612.
- Michaelis M, Baumgarten P, Mittelbronn M, Driever PH, Doerr HW, Cinatl J, Jr. 2011. Oncomodulation by human cytomegalovirus: novel clinical findings open new roads. *Med Microbiol Immunol* 200(1): 1-5.
- Michaelis M, Doerr HW, Cinatl J. 2009. The story of human cytomegalovirus and cancer: increasing evidence and open questions. *Neoplasia* 11(1): 1-9.
- Miller MS, Hertel L. 2009. Onset of human cytomegalovirus replication in fibroblasts requires the presence of an intact vimentin cytoskeleton. *J Virol* 83(14): 7015-7028.
- Mocarski ES, Kemble GW, Lyle JM, Greaves RF. 1996. A deletion mutant in the human cytomegalovirus gene encoding IE1(491aa) is replication defective due to a failure in autoregulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(21): 11321-11326.
- Mocarski ES, Shenk T, & Pass, R. F. . 2007. Cytomegaloviruses. In *In Fields Virology*, pp. 2701-2772. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT. 1998. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *BioTechniques* 24(6): 954-958, 960, 962.
- Mucke K, Paulus C, Bernhardt K, Gerrer K, Schon K, Fink A, Sauer EM, Asbach-Nitzsche A, Harwardt T, Kieninger B et al. 2014. Human cytomegalovirus major immediate early 1 protein targets host chromosomes by docking to the acidic pocket on the nucleosome surface. *J Virol* 88(2): 1228-1248.
- Muller S, Dejean A. 1999. Viral immediate-early proteins abrogate the modification by SUMO-1 of PML and Sp100 proteins, correlating with nuclear body disruption. *J Virol* 73(6): 5137-5143.
- Murphy E, Shenk T. 2008. Human cytomegalovirus genome. *Curr Top Microbiol Immunol* 325: 1-19.
- Nevels M, Brune W, Shenk T. 2004. SUMOylation of the human cytomegalovirus 72-kilodalton IE1 protein facilitates expression of the 86-kilodalton IE2 protein and promotes viral replication. *J Virol* 78(14): 7803-7812.
- Nigro G, Adler SP. 2013. Hyperimmunoglobulin for prevention of congenital cytomegalovirus disease. *Clin Infect Dis* 57 Suppl 4: S193-195.
- Nigro G, Adler SP, La Torre R, Best AM. 2005. Passive immunization during pregnancy for congenital cytomegalovirus infection. *N Engl J Med* 353(13): 1350-1362.
- Ogawa-Goto K, Tanaka K, Gibson W, Moriishi E, Miura Y, Kurata T, Irie S, Sata T. 2003. Microtubule network facilitates nuclear targeting of human cytomegalovirus capsid. *J Virol* 77(15): 8541-8547.
- Ojala PM, Sodeik B, Ebersold MW, Kutay U, Helenius A. 2000. Herpes simplex virus type 1 entry into host cells: reconstitution of capsid binding and uncoating at the nuclear pore complex in vitro. *Mol Cell Biol* 20(13): 4922-4931.
- Paulus C, Krauss S, Nevels M. 2006. A human cytomegalovirus antagonist of type I IFN-dependent signal transducer and activator of transcription signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(10): 3840-3845.



- Paulus C, Nevels M. 2009. The human cytomegalovirus major immediate-early proteins as antagonists of intrinsic and innate antiviral host responses. *Viruses* 1(3): 760-779.
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29(9): e45.
- Reich NC, Liu L. 2006. Tracking STAT nuclear traffic. *Nat Rev Immunol* 6(8): 602-612.
- Reinhardt J, Smith GB, Himmelheber CT, Azizkhan-Clifford J, Mocarski ES. 2005. The carboxyl-terminal region of human cytomegalovirus IE1491aa contains an acidic domain that plays a regulatory role and a chromatin-tethering domain that is dispensable during viral replication. *J Virol* 79(1): 225-233.
- Reitsma JM, Sato H, Nevels M, Terhune SS, Paulus C. 2013. Human cytomegalovirus IE1 protein disrupts interleukin-6 signaling by sequestering STAT3 in the nucleus. *J Virol* 87(19): 10763-10776.
- Revello MG, Lazzarotto T, Guerra B, Spinillo A, Ferrazzi E, Kustermann A, Guaschino S, Vergani P, Todros T, Frusca T et al. 2014. A randomized trial of hyperimmune globulin to prevent congenital cytomegalovirus. *N Engl J Med* 370(14): 1316-1326.
- Riegler S, Hebart H, Einsele H, Brossart P, Jahn G, Sinzger C. 2000. Monocyte-derived dendritic cells are permissive to the complete replicative cycle of human cytomegalovirus. *J Gen Virol* 81 (Pt 2): 393-399.
- Ryckman BJ, Jarvis MA, Drummond DD, Nelson JA, Johnson DC. 2006. Human cytomegalovirus entry into epithelial and endothelial cells depends on genes UL128 to UL150 and occurs by endocytosis and low-pH fusion. *J Virol* 80(2): 710-722.
- Saffert R, Kalejta R. 2008. Promyelocytic leukemia-nuclear body proteins: herpesvirus enemies, accomplices, or both? *Future Virology* 3: 265-277.
- Saha B, Jyothi Prasanna S, Chandrasekar B, Nandi D. 2010. Gene modulation and immunoregulatory roles of interferon gamma. *Cytokine* 50(1): 1-14.
- Samuel CE. 2001. Antiviral actions of interferons. *Clinical microbiology reviews* 14(4): 778-809, table of contents.
- Schindler C, Plumlee C. 2008. Interferons pen the JAK-STAT pathway. *Semin Cell Dev Biol* 19(4): 311-318.
- Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. 2004. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 75(2): 163-189.
- Sehgal PB. 2008. Paradigm shifts in the cell biology of STAT signaling. *Semin Cell Dev Biol* 19(4): 329-340.
- Shiels C, Islam SA, Vatcheva R, Sasieni P, Sternberg MJ, Freemont PS, Sheer D. 2001. PML bodies associate specifically with the MHC gene cluster in interphase nuclei. *J Cell Sci* 114(Pt 20): 3705-3716.
- Sinclair J. 2008. Human cytomegalovirus: Latency and reactivation in the myeloid lineage. *J Clin Virol* 41(3): 180-185.
- Sinclair J, Sissons P. 2006. Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *J Gen Virol* 87(Pt 7): 1763-1779.
- Sinzger C, Grefte A, Plachter B, Gouw AS, The TH, Jahn G. 1995. Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues. *J Gen Virol* 76 ( Pt 4): 741-750.
- Sinzger C, Hahn G, Digel M, Katona R, Sampaio KL, Messerle M, Hengel H, Koszinowski U, Brune W, Adler B. 2008. Cloning and sequencing of a highly productive, endotheliotropic virus strain derived from human cytomegalovirus TB40/E. *J Gen Virol* 89 (Pt 2): 359-368.
- Sinzger C, Jahn G. 1996. Human cytomegalovirus cell tropism and pathogenesis. *Intervirology* 39(5-6): 302-319.
- Soderberg-Naucler C. 2008. HCMV microinfections in inflammatory diseases and cancer. *J Clin Virol* 41(3): 218-223.
- Soderberg-Naucler C, Nelson JY. 1999. Human cytomegalovirus latency and reactivation - a delicate balance between the virus and its host's immune system. *Intervirology* 42(5-6): 314-321.

- Song MM, Shuai K. 1998. The suppressor of cytokine signaling (SOCS) 1 and SOCS3 but not SOCS2 proteins inhibit interferon-mediated antiviral and antiproliferative activities. *J Biol Chem* 273(52): 35056-35062.
- Spengler ML, Kurapatwinski K, Black AR, Azizkhan-Clifford J. 2002. SUMO-1 modification of human cytomegalovirus IE1/IE72. *J Virol* 76(6): 2990-2996.
- Staras SA, Dollard SC, Radford KW, Flanders WD, Pass RF, Cannon MJ. 2006. Seroprevalence of cytomegalovirus infection in the United States, 1988-1994. *Clin Infect Dis* 43(9): 1143-1151.
- Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD. 1998. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 67: 227-264.
- Stern-Ginossar N, Weisburd B, Michalski A, Le VT, Hein MY, Huang SX, Ma M, Shen B, Qian SB, Hengel H et al. 2012. Decoding human cytomegalovirus. *Science* 338(6110): 1088-1093.
- Stuurman N, de Graaf A, Floore A, Josso A, Humbel B, de Jong L, van Driel R. 1992. A monoclonal antibody recognizing nuclear matrix-associated nuclear bodies. *J Cell Sc* 101 (Pt 4): 773-784.
- Subramaniam PS, Torres BA, Johnson HM. 2001. So many ligands, so few transcription factors: a new paradigm for signaling through the STAT transcription factors. *Cytokine* 15(4): 175-187.
- Tavalai N, Papior P, Rechter S, Leis M, Stamminger T. 2006. Evidence for a role of the cellular ND10 protein PML in mediating intrinsic immunity against human cytomegalovirus infections. *J Virol* 80(16): 8006-8018.
- Tavalai N, Papior P, Rechter S, Stamminger T. 2008. Nuclear domain 10 components promyelocytic leukemia protein and hDaxx independently contribute to an intrinsic antiviral defense against human cytomegalovirus infection. *J Virol* 82(1): 126-137.
- Tavalai N, Stamminger T. 2008. New insights into the role of the subnuclear structure ND10 for viral infection. *Biochim Biophys Acta* 1783(11): 2207-2221.
- . 2009. Interplay between herpesvirus infection and host defense by PML nuclear bodies. *Viruses* 1: 1240-1264.
- . 2010. Intrinsic cellular defense mechanisms targeting human cytomegalovirus. *Virus Res* 157 (2): 128-133
- Tischer BK, Smith GA, Osterrieder N. 2010. En passant mutagenesis: a two step markerless red recombination system. *Methods Mol Biol* 634: 421-430.
- Trilling M, Le VT, Hengel H. 2012. Interplay between CMVs and interferon signaling: implications for pathogenesis and therapeutic intervention. *Future microbiology* 7(11): 1269-1282.
- Volpi EV, Chevret E, Jones T, Vatcheva R, Williamson J, Beck S, Campbell RD, Goldsworthy M, Powis SH, Ragoussis J et al. 2000. Large-scale chromatin organization of the major histocompatibility complex and other regions of human chromosome 6 and its response to interferon in interphase nuclei. *J Cell Sci* 113 (Pt 9): 1565-1576.
- Wenta N, Strauss H, Meyer S, Vinkemeier U. 2008. Tyrosine phosphorylation regulates the partitioning of STAT1 between different dimer conformations. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(27): 9238-9243.
- Wilkinson GW, Kelly C, Sinclair JH, Rickards C. 1998. Disruption of PML-associated nuclear bodies mediated by the human cytomegalovirus major immediate early gene product. *J Gen Virol* 79 (Pt 5): 1233-1245.
- Xu J, Sylvester R, Tighe AP, Chen S, Gudas LJ. 2008. Transcriptional activation of the suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3) gene via STAT3 is increased in F9 REX1 (ZFP-42) knockout teratocarcinoma stem cells relative to wild-type cells. *J Mol Biol* 377(1): 28-46.
- Xu Y, Ahn JH, Cheng M, apRhys CM, Chiou CJ, Zong J, Matunis MJ, Hayward GS. 2001. Proteasome-independent disruption of PML oncogenic domains (PODs), but not covalent modification by SUMO-1, is required for human cytomegalovirus immediate-early protein IE1 to inhibit PML-mediated transcriptional repression. *J Virol* 75(22): 10683-10695.
- Yu H, Pardoll D, Jove R. 2009. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nature reviews Cancer* 9(11): 798-809.
- Zalckvar E, Paulus C, Tillo D, Asbach-Nitzsche A, Lubling Y, Winterling C, Strieder N, Mucke K, Goodrum F, Segal E, Nevels M. 2013. Nucleosome maps of the human cytomegalovirus

- genome reveal a temporal switch in chromatin organization linked to a major IE protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 110 (32): 13126-13131.
- Zheng P, Guo Y, Niu Q, Levy DE, Dyck JA, Lu S, Sheiman LA, Liu Y. 1998. Proto-oncogene PML controls genes devoted to MHC class I antigen presentation. *Nature* 396(6709): 373-376.
- Zhu H, Shen Y, Shenk T. 1995. Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins block apoptosis. *J Virol* 69(12): 7960-7970.

## Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die Arbeit entstand am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums Regensburg unter der Anleitung von PD Dr. Michael Nevels und Dr. Christina Paulus.

Regensburg, den 02. November 2014

---

Marion Zenger

## Danksagung

Ich möchte mich an erster Stelle sehr herzlich beim ehemaligen Leiter des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Herrn Prof. Dr. Hans Wolf, sowie bei seinem Nachfolger, Herrn Prof. Dr. Dr. André Gessner, für die Bereitsstellung des Arbeitsplatzes bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Michael Nevels und Frau Dr. Christina Paulus für die äußerst engagierte Betreuung der Doktorarbeit und die Erstellung des Erstgutachtens. Mit ihrer Hilfe konnte ich mir während der Zeit im Labor ein breites Spektrum an experimentellen Methoden aneignen. Viele Diskussionen verhalfen mir zudem zu einem tieferen Verständnis der wissenschaftlichen Hintergründe meiner Arbeit und weckten dadurch meine Neugier auf die Forschung.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Bernd Salzberger für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Auch allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich für die gute Zusammenarbeit und die überaus kollegiale Arbeitsatmosphäre. Es gab immer ein offenes Ohr für Fragen und jeder half bereitwillig bei Problemen, sodass ich auch dank der Unterstützung meiner Kolleginnen und Kollegen während dieser Zeit viel Neues dazulernen konnte. Namentlich erwähnen möchte ich in diesem Zusammenhang Ines Tschertner, Dr. Theresa Knoblach, Katrin Mücke und Katrin Gerrer.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern und meinem Freund Andreas für die moralische Unterstützung während der gesamten Entstehungszeit dieser Arbeit danken. Ihre aufmunternden Worte waren mir sowohl bei Rückschlägen im Labor als auch beim Schreiben der Arbeit eine große Hilfe.