Modulation der *Unfolded Protein Response* durch das murine Cytomegalovirus

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

an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften eingereicht im Fachbereich Chemie der Universität Hamburg

vorgelegt von

Sebastian Werner Martin Stahl geboren am 17.09.1981 in Würzburg

Hamburg, 2013

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

- 1. Gutachter: Prof. Dr. Wolfram Brune
- 2. Gutachter: Prof. Dr. Peter Heisig

Disputation am 22.03.2013

Inhaltsverzeichnis

Zusamme	enfassung	I
Summary	/	Π
1. Einlei	tung	.1
1.1. Her	pesviren	. 1
1.1.1.	Cytomegaloviren (CMV)	. 2
1.1.1.	1. Epidemiologie und Pathogenese	. 2
1.1.1.	2. Der Replikationszyklus der Cytomegaloviren	. 3
1.2. Das	s Endoplasmatischen Retikulum (ER) und die <i>Unfolded Protein Response</i> (UPI	२) 4
1.2.1.	Das Hauptregulatorprotein BiP	. 6
1.2.2.	Der PERK-Signalweg	. 7
1.2.3.	Der ATF6-Signalweg	. 9
1.2.4.	Der IRE1-Signalweg	10
1.2.5.	Virale Infektionen und die UPR	11
1.3. Ziel	lsetzung der Arbeit	13
2. Mater	ial und Methoden	14
2.1. Mat	terial	14
2.1.1.	Zelllinien	14
2.1.2.	Zellkulturmedium	14
2.1.3.	Viren	15
2.1.4.	Bakterien und Bakterienkulturmedium	15
2.1.5.	Antibiotika	15
2.1.6.	Plasmide	16
2.1.7.	Oligonukleotide	17
2.1.8.	Größenstandards	18
2.1.9.	Enzyme	18
2.1.10.	Kit-Systeme	18
2.1.11.	Antikörper	19
2.1.12.	Chemikalien	20
2.1.13.	Puffer	20
2.1.14.	Verbrauchsmaterialien	22
2.1.15.	Geräte	23

	2.2. Method	en	25
	2.2.1. Mo	lekularbiologische Methoden	25
	2.2.1.1.	DNA-Isolierung	25
	2.2.1.2.	RNA-Isolierung aus Zellen	25
	2.2.1.3.	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	26
	2.2.1.4.	cDNA-Synthese	26
	2.2.1.5.	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	26
	2.2.1.6.	Sequenzierung	27
	2.2.1.7.	Quantitative Real-time PCR	27
	2.2.1.8.	Agarose-Gelelektrophorese	28
	2.2.1.9.	Aufreinigung von DNA-Fragmenten und PCR-Reaktionen	28
	2.2.1.10.	Restriktionsverdau und Ligation	29
	2.2.1.11.	Herstellung elektrokompetenter Bakterien	29
	2.2.1.12.	Anlegen eines Glycerolstocks	29
	2.2.1.13.	Elektroporation	30
	2.2.2. Zel	lbiologische Methoden	30
	2.2.2.1.	Passagieren von Zellen	30
	2.2.2.2.	Einfrieren und Auftauen von Zellen	30
	2.2.2.3.	Transiente Transfektion	31
	2.2.2.4.	Herstellung eines Virusstocks	31
	2.2.2.5.	Virustitration zur Bestimmung der TCID ₅₀ /ml	31
	2.2.2.6.	Virusinfektion	32
	2.2.2.7.	Herstellung von Retroviren und Transduktion	32
	2.2.2.8.	Herstellung von stabil exprimierenden Zellen	33
	2.2.3. Pro	teinbiochemische Methoden	33
	2.2.3.1.	Herstellung von Zelllysaten und Messung der Proteinkonzentration	33
	2.2.3.2.	Herstellung von Kern-Extrakten	33
	2.2.3.3. chromator	Aufreinigung von IRE1-TEV-HA aus Zelllysaten mittels α-HA-Affinitäts-	34
	2.2.3.4.	SDS-PAGE (Polvacrylamid-Gelelektrophorese)	35
	2.2.3.5.	Western Blot	35
	2.2.3.6.	Silberfärbung	36
	2.2.3.7.	Koimmunopräzipitation	36
	2.2.3.8.	Immunfluoreszenz	37
3.	Ergebnis	Se	. 38
-			0

	3.1.	Unt	ersuchung der Modulation des PERK-Signalwegs durch MCMV	38
	3.2.	Unt	ersuchung der Modulation des ATF6-Signalwegs durch MCMV	41
	3.3.	Unt	ersuchung der Modulation des IRE1-Signalwegs durch MCMV	43
	3.3	.1.	Spleißen der XBP-1-mRNA	43
	3.3	.2.	Aktive Suppression des XBP-1-Spleißens durch MCMV	45
	3.3	.3.	Identifikation potentieller viraler Interaktionspartner	47
	3.3	.4.	Bestätigung der Interaktion von M50 und IRE1	49
	3	.3.4.	1. Untersuchung der M50-IRE1-Lokalisation mittels Immunfluoreszenz	49
	3	.3.4.2	2. Untersuchung der M50-IRE1-Interaktion mittels Co-Immunopräzipitation	50
	3.3	.5.	Untersuchung der IRE1-Expression	53
	3	.3.5.	1. Analyse des IRE1-Proteinlevels bei Transfektion mit M50	53
	3	.3.5.2	2. Analyse einer dominant-negativen (DN) IRE1-Mutante	53
	3	.3.5.3	3. Analyse der IRE1-Expression bei Infektion mit MCMV	54
	3	.3.5.4	4. Analyse der IRE1-Transkriptmenge	55
	3.3	.6.	Konstruktion von M50-Verkürzungsmutanten und deren funktionelle Charakterisierung	56
	3	.3.6.	1. Interaktion der M50-Verkürzungsmutanten mit IRE1	58
	3.3	.7.	Funktionelle Charakterisierung eines M50-Deletionsviruses	59
	3	.3.7.	1. Spleißen der XBP-1-mRNA bei Infektion mit ΔM50	59
	3	.3.7.2	2. Analyse der IRE1-Expression bei Infektion mit ΔM50	60
	3.3	.8.	Übertragung der Untersuchungen auf HCMV	61
	3	.3.8.	1. Aktive Suppression des XBP-1-Spleißens durch HCMV	61
	3	.3.8.2	2. Untersuchung der UL50-IRE1-Interaktion mittels Co-Immunopräzipitation	 62
	3	.3.8.	 Analyse des IRE1-Proteinlevels bei Transfektion eines UL50-Expressionsplasmids bzw. bei Infektion mit HCMV 	63
	3.3	.9.	Untersuchungen zur Aufklärung des IRE1-Abbau-Mechanismus	64
4	Dis	skus	ssion	57
	4 1	Inte	raktion von MCMV mit dem PERK-Signalweg	67
	4.2.	Мос	dulation des ATF6-Signalwegs durch MCMV	69
	4.3.	Inhi	bition des IRE1-Signalwegs durch MCMV bzw. HCMV	71
	4.3	.1.	Interaktion von IRE1 und M50 bzw. UL50	71
	4.3	.2.	Reduktion der IRE1-Menge durch M50 bzw. UL50	72
	4.3	.3.	Infektion mit einer M50-Deletionsmutante	74
	4.3	.4.	Mechanismus zur Reduktion der IRE1-Menge	75
	4.4.	Sch	lussfolgerung	77

5. Lit	eraturverzeichnis	
6. An	hang	
6.1.	Abbildungsverzeichnis	
6.2.	Tabellenverzeichnis	
6.3.	Gefahrenstoffe	
6.4.	Abkürzungsverzeichnis	
6.5.	Lebenslauf	
6.6.	Publikationen	
6.7.	Vorträge	
6.8.	Poster	
6.9.	Stipendien	
6.10.	Danksagung	
6.11.	Erklärung	

Zusammenfassung

Während einer viralen Infektion kommt es aufgrund der massiven Synthese von viralen Proteinen zu einer Überlastung der Proteinfaltungsmaschinerie, welche zu einer Überladung von ungefalteten Proteinen im Endoplasmatischen Retikulum (ER) führt. Dabei ist die Akkumulation von ungefalteten Proteinen als ER-Stress definiert. Um das Gleichgewicht im ER wiederherzustellen, aktiviert die Zelle mehrere Signalkaskaden, die als Unfolded Protein Response (UPR) zusammengefasst werden. Dabei spielen folgende drei ER-Stress-Sensoren eine wichtige Rolle: die Proteinkinase R ähnliche ER-Kinase (PERK), der aktivierende Transkriptionsfaktor 6 (ATF6) und das Inositol benötigende Enzym 1 (IRE1). Die Aktivierung dieser drei Sensoren führt zu einer Reduktion der Proteinsynthese, einem Abbau ungefalteter Proteine und einer Steigerung der Proteinfaltung, sodass es zu einer Prozessierung der ungefalteten Proteine und damit zur Auflösung des ER-Stresses kommt. Kann nach der Aktivierung der UPR das Gleichgewicht im ER nicht wiederhergestellt werden, wird in der Zelle die Apoptose induziert. Deshalb kann es für Viren vorteilhaft sein die UPR zu modulieren, um eine effiziente Virusreplikation zu gewährleisten und die Proteinsynthese aufrechtzuerhalten. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass ATF6 während der Infektion mit dem murinen Cytomegalovirus (MCMV) aktiviert wird. Folglich war auch die Expression des Chaperons GRP78/BiP, eines der Hauptzielgene des ATF6, hochreguliert. Der PERK-Signalweg hingegen wurde selbst 48 h nach Infektion nicht signifikant aktiviert. Im Falle von IRE1 konnte eine gesteigerte Prozessierung von XBP-1 durch IRE1 zu frühen Zeitpunkten festgestellt werden, die jedoch zu späten Zeitpunkten der Infektion unterdrückt wurde. Selbst bei zusätzlicher forcierter Induktion von ER-Stress, war MCMV in der Lage, eine IRE1-Aktivierung zu inhibieren. Durch Affinitätsaufreinigung konnte das virale Protein M50 erstmals als Interaktionspartner von IRE1 identifiziert werden. M50 führte in transfizierten und MCMV-infizierten Zellen zu einer deutlich reduzierten IRE1-Menge, was auf eine IRE1-Degradation schließen lässt. Durch die Klonierung von M50-Verkürzungmutanten konnte die Region, welche für die IRE1-Bindung und -Degradation verantwortlich ist, identifiziert werden. Des Weiteren war es möglich die hier neu gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der Unterbindung des IRE1-Signalwegs auch auf das verwandte Virus HCMV zu übertragen. Folglich kann im Falle von CMV von einem bislang unbekannten, evolutionär konservierten viralen Mechanismus ausgegangen werden.

Summary

During viral infection, a massive demand for viral proteins can overwhelm the capacity of the protein folding and quality control machinery, leading to an accumulation of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum (ER). To restore ER homeostasis, cells initiate the unfolded protein response (UPR) by activating the three ER stress sensors PKR-like ER kinase (PERK), inositol-requiring enzyme 1 (IRE1), and activating transcription factor 6 (ATF6). The combined action of these three branches reduces protein synthesis, increases degradation of misfolded proteins, and upregulates chaperone expression to enhance protein folding. Previous studies have shown that cytomegaloviruses modulate the UPR by preserving the beneficial functions and antagonizing the functions detrimental to viral replication. However, the molecular mechanisms and the viral proteins responsible have remained largely undefined. This work shows that ATF6 is activated in fibroblasts during infection with murine cytomegalovirus (MCMV). Consequently, expression of the chaperone GRP-78/BiP, a major transcriptional target of ATF6, is upregulated. The PERK pathway of the UPR is not significantly altered even at 48 h postinfection.

Also IRE1 signaling, the most conserved UPR branch, is modulated by CMV. IRE1mediated mRNA splicing and expression of the X-box binding protein 1 (XBP1) is briefly induced but then repressed in MCMV-infected cells. By affinity purification, M50 has been identified as a viral protein interacting with IRE1. M50 expression in transfected or infected cells induced a downregulation of IRE1 protein levels, and the N-terminal constant region of M50 proved to be required for interaction with and downregulation of IRE1. Moreover, this work shows that UL50, the M50 homolog in human cytomegalovirus (HCMV), has a similar effect on IRE1 signaling. In conclusion IRE1 downregulation represents a previously undescribed viral strategy to curb the UPR.

1. Einleitung

1.1. Herpesviren

Die Mitglieder der Familie *Herpesviridae* gehören zu den genetisch und strukturell komplexesten Viren. Obwohl sie sich im Bereich des Wirtsspektrums, der Genomgröße und der molekularen Komposition unterscheiden, besitzen sie dennoch alle die gleiche Struktur bestehend aus einem doppelsträngigen DNA-Genom, einem ikosaedrischen Kapsid, einem proteinreichen Tegument und einer Lipidhülle. Die Genomgröße variiert zwischen 124 kbp (Varicella-Zoster-Virus) und 230 kbp (Cytomegalovirus) und bildet den Kern des Viruspartikels (Virion). Geschützt wird das Virus-Genom durch ein ikosaedrisches Kapsid mit einem Durchmesser von 120-200 nm [1]. Das Kapsid wiederum ist von einer Lipidhülle umgeben. Zwischen Hülle und Kapsid befindet sich das sogenannte Tegument, welches mit zahlreichen Strukturproteinen, den Tegumentproteinen ausgefüllt wird [2]. Abbildung 1 zeigt den schematischen Aufbau eines Viruspartikels.



Abbildung 1: Schematischer Querschnitt durch die äußere Hüllmembran und das Kapsid eines typischen Herpesviruspartikels (Bild übernommen aus [3]).

Herpesviren infizieren Wirbeltiere wie Säugetiere, Vögel, Reptilien und Fische sowie einige wirbellose Tiere, wie z. B. die pazifische Auster [4]. Aufgrund von Pathogenität, Speziesspezifität, Zelltropismus und Replikationsverhalten wurden die *Herpesviridae* früher in drei Unterfamilien eingeteilt: α -, β - und γ -Herpesviren [5]. α -Herpesviren haben ein relativ breites Wirtszellspektrum und die Viruslatenz manifestiert sich vorwiegend in sensorischen Ganglien [2]. Ein bekannter Vertreter ist das Herpes-simplex-Virus (HSV-1 bzw. HSV-2). β -Herpesviren haben ein eingeschränkteres Wirtszellspektrum. Kennzeichnend ist außerdem das Anschwellen von infizierten Zellen (Zytomegalie). Persistierende Viren sind in Speicheldrüsen, lymphatischen Organen und der Niere lokalisiert [2]. Mitglied dieser Unterfamilie ist unter anderem das humane Cytomegalovirus (HCMV). Die Vertreter der γ -Herpesviren zeigen das strikteste Wirtsspektrum. Diese Viren persistieren entweder in B- oder T-Zellen. Bekannte Vertreter sind das Epstein-Barr-Virus (EBV) oder das Kaposi-Sarkom-assoziierte-Herpes-Virus (KSHV) [2]. Heutzutage werden Viren aufgrund ihrer Genomsequenz eingeteilt.

1.1.1. Cytomegaloviren (CMV)

Das humane Cytomegalovirus (HCMV), sowie das murine Cytomegalovirus (MCMV), gehören zu den β-Herpesviren. Beide Vertreter haben den typischen herpesviralen Aufbau, jedoch unterscheiden sie sich in ihrer Replikationsgeschwindigkeit. Ein Replikationszyklus von HCMV dauert etwa 48-72 Stunden, während MCMV ca. 24 Stunden benötigt. Ihre Genome sind ca. 230 kb groß und kodieren etwa 160-200 Gene [6-8]. Nach erfolgter Primärinfektion persistiert HCMV bzw. MCMV lebenslang im Wirtsorganismus, wobei eine Reaktivierung jederzeit möglich ist [9, 10]. Beide Viren haben eine ausgeprägte Speziesspezifität und replizieren daher nur in Zellen der eigenen oder nahe verwandten Art. Aufgrund der Speziesspezifität und der Ähnlichkeit in Bezug auf Pathogenese, Immunmodulation und Latenz dient MCMV als Modell für das humane Cytomegalovirus.

1.1.1.1. Epidemiologie und Pathogenese

HCMV ist ein weltweit vorkommender Erreger und erreicht in Industrienationen eine Durchseuchungsrate von ca. 50 - 60 % in Entwicklungsländern sogar mehr als 95 % [11]. Die Übertragung findet dabei meist durch Körperflüssigkeiten wie Blut, Speichel, Urin oder auch durch Genitalsekret statt. Eine weitere Übertragungsmöglichkeit ist kongenital in der Gebärmutter oder postnatal über die Muttermilch [12]. Die Primärinfektion in immunkompetenten Personen verläuft in den meisten Fällen inapparent [13]. Nach etwa zwei Wochen geht die Infektion in das Stadium der Persistenz über, welche sich sowohl durch eine stark reduzierte Virusproduktion als auch durch die Expression der viralen Latenz-Gene auszeichnet. In immunsupprimierten Personen kommt es häufig zu schwerwiegenden klinischen Symptomen. Die drei Hauptrisikogruppen bilden dabei AIDS-Patienten, deren T-Zellvermittelte spezifische Immunantwort durch die fortgeschrittene HIV-Infektion stark geschwächt ist, Organtransplantatempfängern, deren T-Zell-vermittelte Immunantwort medikamentös unterdrückt wird, um die Abstoßung des fremden Gewebes zu verhindern und ungeborene/neugeborene Kinder, deren Immunsystem noch nicht voll ausgebildet ist. AIDS-Patienten entwickeln häufig gastrointestinale Erkrankungen, Retinitiden und Enzephalitiden [14], bei Transplantatempfängern zeigen sich häufig Hepatitiden und Lungenentzündungen [15, 16]. Durch die plazentare Übertragung von HCMV auf ungeborene Kinder können Schädigungen bei der Entwicklung des zentralen Nervensystems verursacht werden, welche zu Hörverlust bis hin zu starker geistiger Retardierung führen [17, 18]. In schweren Fällen kann eine kongenitale Infektion sogar tödlich enden [12, 19].

1.1.1.2. Der Replikationszyklus der Cytomegaloviren

Nachdem ein Virion an die extrazelluläre Matrix gebunden hat, wird die Fusion der viralen Hülle und der Plasmamembran durch die viralen Glykoproteine gB, gH und gL eingeleitet [20]. Dies hat das Einschleusen der Tegumentproteine und des Kapsids zur Folge. Letzteres bindet daraufhin an Mikrotubuli, welche das Kapsid zum Kern transportieren [21]. Dort angekommen bindet es an Kernporen und die virale DNA wird in den Kern geschleust. Da die Replikation der Cytomegaloviren kaskadenartig abläuft, werden die viralen Gene entsprechend ihrer Expressionskinetik in drei Gruppen immediate early (IE), early (E) und late (L) unterteilt. Zunächst beginnt die Transkription der IE-Gene. Nachdem die IE-mRNAs im Zytosol translatiert wurden, wandern die IE-Proteine in den Nukleus, wo sie die Transkription der E-Gene aktivieren. Die E-Proteine sind unter anderem für die DNA-Replikation und die Produktion von Substraten für die DNA-Synthese verantwortlich [3]. Die virale DNA-Synthese wird am lytischen Replikationsursprung initiiert und erfolgt nach dem Rolling-Circle-Mechanismus [22]. Nachdem die virale DNA repliziert worden ist, kommt es zur Expression der L-Gene. Die L-Proteine sind primär Strukturproteine und Proteine, die für die Virus-Assemblierung und Ausschleusung der neuen Kapside aus dem Kern verantwortlich sind (nuclear egress) [2].

Die Verpackung neuer Virionen beginnt im Kern. Dort werden zunächst die replizierte DNA und die Kapsidproteine zum Kapsid zusammengesetzt. Anschließend erfolgt der Kernaustritt der Kapside durch Knospung an der Kernhülle. Damit die Kapside die innere und äußere Kernmembran (KM) passieren können, muss diese partiell aufgelöst werden. Hierzu bedient sich MCMV der beiden Proteine M50 und M53 [23, 24]. Wie ihre Homologe in HCMV (UL50 und UL53), rekrutieren diese die zelluläre Proteinkinase C (PKC) an die Kernmembran. Durch Phosphorylierung des KM-Proteins Lamin wird die Kernhülle soweit destabilisiert, dass ein Austritt der Kapside ermöglicht wird [23, 25-27]. Nach dem Kernaustritt wird das Kapsid mit Hilfe von Mikrotubuli durch das Zytoplasma transportiert und dabei Tegumentproteine angelagert [28]. Die eigentliche Hüllmembran erhalten die Kapside dann durch die Verschmelzung mit einem vom Golgi-Apparat abstammenden sekretorischen Vesikel. Dieses enthält in seiner Membran die synthetisierten viralen Glykoproteine [29, 30]. Nach dem Transport an die Zellmembran erfolgt die Virion-Freisetzung durch Exozytose [31].

1.2. Das Endoplasmatischen Retikulum (ER) und die *Unfolded Protein Response* (UPR)

Um eine Replikation von CMV gewährleisten zu können, müssen während der Infektion virale Proteine synthetisiert und posttranslational modifiziert werden. Die Faltung bzw. Reifung der translatierten Glykoproteine findet am oder im Endoplasmatischen Retikulum (ER) statt. Auch werden hier alle in einer Zelle synthetisierten Glykoproteine und sezernierten Proteine einer Proteingualitätskontrolle unterzogen. Das bedeutet, dass die meisten falsch gefalteten Proteine über das zytosolische Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut und korrekt gefaltete Proteine zu ihren Bestimmungsorten transportiert werden. Die Proteingualitätskontrolle dient somit der Zelle als Schutzmechanismus, um zur Aufrechterhaltung eines funktionierenden Proteoms und damit zum Überleben der Zelle beizutragen. Kommt es zu einer Störung der ER-Homöostase z. B. durch Mutationen in sekretorischen Proteinen oder Formationsveränderungen von korrekt gefalteten Rezeptoren so häufen sich ungefaltete oder fehlerhaft gefaltete Proteine im ER an, was als ER-Stress definiert ist [32]. ER-Stress kann auch durch verschiedene physiologische Bedingungen induziert werden [33]. So führt z. B. Thapsigargin zu einer Kalzium-Entleerung des ER, welche zu einer Beeinträchtigung der Kalzium abhängigen Chaperone führt und somit ER-Stress induziert [34]. Bei Infektion einer Zelle durch Viren müssen virale Proteine gebildet bzw. gefaltet werden, wodurch es ebenfalls zu einem Anstieg von ungefalteten Proteinen im ER kommt [35].

ER-Stress führt in der Zelle hauptsächlich zu einer Initiation und Aktivierung dreier Signalwege, die zusammengefasst als unfolded protein response (UPR) bezeichnet werden. Die Zelle erkennt **ER-Stress** durch das Regulatorprotein BiP (Immunoglobulin Heavy Chain Binding Protein), welches an die drei Sensoren PERK (Proteinkinase R ähnliche ER-Kinase), ATF6 (aktivierender Transkriptionsfaktor 6) und IRE1 (Inositol benötigendes Enzym 1) bindet und somit inaktiviert (Abbildung 2) [36-39]. Nach Dissoziation von BiP werden die drei Sensoren aktiviert, was im Falle von PERK einen Translationsstopp initiiert, der der Zelle Zeit verschafft, die angehäuften ungefalteten Proteine zu verarbeiten [40]. Kann die ER-Homöostase nicht wieder hergestellt werden, wird die Apoptose eingeleitet [41]. Wird der IRE1-Signalweg aktiviert, so führt dies zur Expression von Degradierungsfaktoren, die ungefaltete Proteine abbauen oder zur Induktion der Apoptose [42-46]. Eine ATF6-Aktivierung induziert die Expression von Chaperonen, um so vermehrt ungefaltete Proteine zu prozessieren [47].



Abbildung 2: Unfolded Protein Response (UPR). Die Detektion einer Akkumulation von ungefalteten Proteinen erfolgt durch die drei ER-Stress-Sensoren PERK, IRE1 und ATF6. Die Aktivierung von PERK führt zu einem Translationsstopp, der in der Induktion der Apoptose resultieren kann. Eine IRE1-Aktivierung führt zur Expression von Degradierungsfaktoren, die einen Abbau von ungefalteten Proteinen ermöglichen und ATF6 induziert die Transkription von Chaperon-Genen.

1.2.1. Das Hauptregulatorprotein BiP

Um der Funktion der Proteinfaltung/Modifikation nachkommen zu können, werden im ER-Lumen zahlreiche Chaperone, Lektine und Kohlenhydrat verarbeitende Enzyme exprimiert, die eine Proteinfaltung unterstützen. Schlüsselenzyme sind hierbei das glucose regulated protein 78 (GRP78; auch bekannt unter dem Namen Immunoglobulin Binding Protein - BiP) und 94 (GRP94), die Lektine Calnexin und Calreticulin, sowie die Protein-Disulfid-Isomerase (PDI).

BiP (GRP78) ist eines der am häufigsten vorkommenden und am besten charakterisierten Chaperone im ER, welches mit hydrophoben Domänen vieler Proteine interagiert. Diese Interaktion hilft z. B. eine Fehlfaltung bei der Translokation von Proteinen in das ER zu vermeiden. BiP gehört zur Hsp70-Familie [48, 49] und ist eine Peptid-abhängige ATPase mit einer N-terminalen ATPase- und einer C-terminalen Substratbindungs-Domäne. Es kann als freies, unmodifiziertes Monomer, als ADP ribosyliertes oder phosphoryliertes Oligomer oder als Komplex mit anderen Proteinen vorkommen. Als freies Monomer dient es der Modulation von ER unterstützenden Prozessen wie der Unterstützung der Proteinfaltung, der Markierung von falsch gefalteten Proteinen zur Degradierung und der Regulierung der UPR. In Zellen, deren ER-Homöostase nicht gestört ist, bindet BiP luminal an jeden der drei ER-Stress-Sensoren wodurch diese inaktiviert werden [50, 51]. Kommt es zu einer Akkumulation von ungefalteten Proteinen im ER, so wird BiP als Chaperon rekrutiert und die damit einhergehende Dissoziation von den drei ER-Stress-Sensoren führt zu einer Aktivierung der im Folgenden näher beschriebenen Signalwege.



1.2.2. Der PERK-Signalweg



Abbildung 3: Der PERK-Signalweg. Die Anhäufung von ungefalteten Proteinen im ER führt zu einer Dissoziation des Chaperons BiP von PERK. Daraufhin homodimerisiert PERK und wird anschließend transautophosphoryliert. Es folgt die Phosphorylierung des eukaryotischen Initiationsfaktors 2 (eIF2 α). Dies führt zu einem Stopp der Translation, wodurch die Zelle die Möglichkeit erhält, die Überladung des ER mit ungefalteten Proteinen zu reduzieren. Ist dies nicht möglich, so kann über die Expression von ATF4 und CHOP die Apoptose induziert werden. Die Phosphatase GADD34 dephosphoryliert eIF2 α wodurch ein negativer Feedback-Mechanismus eingeleitet wird.

PERK ist ein Typ I-Transmembranprotein, welches in der ER-Membran lokalisiert ist [51]. Es ist luminal an BiP gebunden, wodurch dieser ER-Stress Sensor inaktiviert wird. Nach Induktion von ER-Stress und Dissoziation von BiP erfolgt die **PERK-Aktivierung** durch eine Homodimerisierung und anschließender Transautophosphorylierung [52, 53]. Daraufhin wird die α -Untereinheit des eukaryotischen Initiationsfaktors 2 (eIF2a) phosphoryliert. Der eIF2 bindet an Initiator Met-tRNAi^{Met} (aminoacylated initiator methionyl-tRNA) und GTP und transferiert das kleine die 40S-Untereinheit Startcodon an des Ribosoms [54]. Nach Zusammenlagerung der großen und der kleinen ribosomalen Untereinheit wird die Translation eingeleitet. Das an eIF2 gebundene GTP wird zu GDP hydrolysiert, woraufhin der eIF2-GDP-Komplex vom Ribosom gelöst wird. Im Anschluss daran wird eIF2-GDP durch den Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktor eIF2B zum aktiven elF2-GTP recycelt [55]. In Säugerzellen sind vier Proteinkinasen bekannt, welche die α-Untereinheit von elF2 an Ser51 phosphorylieren können: die Proteinkinase R (PKR), die Kinase general control non-repressed-2 (GCN2), der Häm-regulierte

Inhibitor (HRI) und PERK [56-60]. Die Phosphorylierung von elF2 führt zu einer Stabilisierung des elF2-GDP-Komplexes. Dadurch kann elF2B elF2 nicht mehr in seine aktive GTP-gebundene Form umwandeln. So reduziert eine elF2a-Phosphorylierung den elF2-GTP-Level, wodurch eine generell verminderte Translation erreicht wird [61, 62]. Aufgrund der so verursachten reduzierten Menge an neu synthetisierten Proteinen verhindert die Zelle, dass weitere ungefaltete Proteine in das ER geschleust werden, und trägt somit zum Abbau des ER-Stresses bei. Allerdings führt die generelle Translationsreduktion zu einer vermehrten Translation spezifischer mRNAs wie der des aktivierenden Transkriptionsfaktors 4 (ATF4) [63]. Die ATF4-mRNA besitzt zwei offene Leserahmen (ORF) oberhalb der ATF4 kodierenden Region (uORF1 und uORF2). Der uORF1 kodiert für ein nur drei Aminosäuren kurzes Tripeptid, während uORF2 59 Aminosäuren lang ist und mit der kodierenden Sequenz des ATF4 überlappt. Bei hohem elF2-GTP-Level beginnt das Ribosom am uORF1 und initiiert die Translation am uORF2, welcher durch die Überlappung mit dem ATF4 kodierenden Bereich die ATF4-Expression inhibiert. In ER-Stress induzierten Zellen führt jedoch das verminderte eIF2-GTP-Level zu einer Verzögerung der Initiation, wodurch der uORF2 übersprungen wird und stattdessen das Ribosom an der ATF4 kodierenden Sequenz die neue Translation beginnt [56]. ATF4 wiederum aktiviert die Expression des Chaperons BiP und des proapoptotischen Transkriptionsfaktors GADD153 (growth arrest and DNA-damageinducible protein 153; auch bekannt als CHOP (C/EBP-homologous protein)) [64]. Die GADD153-Expression führt zur Induktion der Apoptose, indem GADD153 z. B. das antiapoptotische Protein Bcl-2 herunter reguliert [41, 65, 66]. Des Weiteren induziert GADD153 die Transkription der Proteinphosphatase growth arrest and DNA damage-inducible 34 (GADD34), welche phosphoryliertes aene elF2α dephosphoryliert und somit einen negativen Feedback Mechanismus einleitet [67-69]. Dadurch wird eine Wiederherstellung der ursprünglichen Situation und Abschaltung des PERK-Signalwegs sichergestellt.

1.2.3. Der ATF6-Signalweg



Abbildung 4: Der ATF6-Signalweg. Die Anhäufung von ungefalteten Proteinen im ER führt zu einer Dissoziation des Chaperons BiP von ATF6. Daraufhin transloziert ATF6 in den Golgi und wird dort von S1, S2-Proteasen gespalten. Das so entstandene Spaltprodukt wandert in den Kern, wo es als Transkriptionsfaktor für diverse UPR-induzierbare Gene dient.

ATF6 ist ein Transmembranprotein vom Typ II, welches ebenfalls in der ER-Membran lokalisiert ist und in nicht stimulierten Zellen luminal an BiP gebunden ist [70-72]. ATF6 kommt in den beiden Isoformen ATF6a und ATF6ß vor [72], wobei ATF6α als Homodimer die Expression von Chaperon-Genen aktiviert und als Heterodimer mit dem X-box bindenden Protein 1 (XBP-1) die Expression von Proteinen, die bei der ER assoziierten Degradation ein Rolle spielen, induziert. Welche Gene ATF6ß reguliert ist bis heute unbekannt [73]. Kommt es zur Akkumulation von ungefalteten Proteinen im ER. dissoziiert BiP von ATF6 wodurch dieses in den Golgi transloziert, wo es von site 1 und site 2 Proteasen (S1P, S2P) in gespalten wird [70, 74-76]. seine aktive Form Der SO entstandene Transkriptionsfaktor, ein Leucin-Zipper (bZIP), wandert in den Kern und bindet an Promotoren von UPR-induzierbaren Genen wie ER-Chaperonen (z. B. BiP) und XBP-1 [77, 78]. Alle diese Promotoren weisen eine einzigartige Seguenz bestehend aus 19 Nukleotiden (CCAAT-N₉-CCACG) auf, die auch als ER-Stress response element (ERSE) bezeichnet werden [79].

1.2.4. Der IRE1-Signalweg



Abbildung 5: Der IRE1-Signalweg. Die Anhäufung von ungefalteten Proteinen im ER führt zu einer Dissoziation des Chaperons BiP von IRE1. Daraufhin homodimerisiert IRE1 und wird anschließend transautophosphoryliert. Die so aktive Endoribonuklease-Domäne spleißt die XBP-1 (X-box binding protein 1) -mRNA im Zytosol. Das Protein XBP-1 wandert in den Kern und bindet an den Promotor des ER response element (ERSE), welcher die Aktivierung der Transkription von verschiedenen Genen zur Folge hat, die bei der Proteinfaltung und der ER-assoziierten Protein Degradation (ERAD) eine Rolle spielen. Ein weiterer Zweig der IRE1-Signaltransduktion geht über TRAF2. Dieses Adapterprotein bindet an IRE1 und indiziert die ASK1-Kinase-Aktivierung. Daraufhin wird JNK phosphoryliert, die über Bcl-2 die Apoptose induziert.

IRE1 ist ein Typ I-Transmembranprotein bestehend aus einer luminalen-, einer Transmembran-, einer Serin/Threonin-Proteinkinase- und einer Endoribonuklease-Domäne [80, 81]. Es sind zwei IRE1-Isoformen (IRE1α und IRE1β) bekannt, wobei IRE1α ubiquitär und IRE1β nur in Epithelzellen des Darms und des Magens exprimiert wird [82]. Wie die beiden anderen ER-Stress-Sensoren PERK und ATF6, ist IRE1 in der ER-Membran lokalisiert und durch die Bindung von BiP inaktiviert. Zum Mechanismus der IRE1-Aktivierung werden derzeit zwei mögliche Modelle diskutiert. In einem Modell dissoziiert BiP bei Induktion von ER-Stress von IRE1, in einem alternativen Modell führt die direkte Bindung von ungefalteten Proteinen an IRE1 zu einer Aktivierung [83-85]. In beiden Fällen erfolgt im Anschluss daran die Aktivierung in zwei Schritten. Zunächst homo-oligomerisiert IRE1 und anschließend sorgen die Proteinkinase-Domänen für eine Transautophosphorylierung von IRE1 [86-89]. Dadurch wird die zytoplasmatische Endoribonuklease aktiv, die im Zytoplasma ein 26 Nukleotid großes Intron aus der mRNA entfernt, welche für das XBP-1 kodiert [77, 90-95]. Die so entstandene gespleißte XBP-1-Variante wandert in den Kern und bindet an den Promotor des ER response element (ERSE) [96]. Dies hat eine Aktvierung der Transkription von Genen zur Folge, die bei der Proteinfaltung und der ER assoziierten Protein Degradation (ER associated protein degradation, ERAD) eine Rolle spielen [82, 97-99]. Neben dem unkonventionellen Spleißen der XBP-1-mRNA hat die RNase-Aktivität von IRE1 außerdem einen Einfluss auf die Stabilität von mRNAs, welche das ER als Ziel haben [92, 100] und IRE1 kann die Spaltung der 28S-Untereinheit des Ribosoms induzieren [101]. Auch microRNAs, welche die Translation der Caspase-2-mRNA regulieren, werden von IRE1 gespalten [102, 103]. Des Weiteren spielt IRE1 bei der Regulation der Autophagie ein Rolle [104-106]. Als Autophagie wird ein zellulärer Prozess bezeichnet, bei dem zelleigene Proteine oder ganze Zellorganelle lysosomal degradiert werden. Nach Aktivierung von IRE1 durch ER-Stress rekrutiert JIK (c-Jun NH2-terminal inhibitory kinase) das Adapterprotein TRAF2 (TNF receptor-associated factor 2) an die ER-Membran. Der so gebildete IRE1/TRAF2-Komplex aktiviert daraufhin die Kinase ASK1 (apoptosis signal regulating kinase 1) welche wiederum JNK (Jun-amino-terminal kinase) und p38-MAP-Kinase aktiviert [107]. Die zweifache Phosphorylierung von JNK an T183 und Y185 führt zur Phosphorylierung von Bcl-2 und Bim (BH3-only protein), welche die mitochondrial-vermittelte Apoptose einleitet [45]. IRE1 kann weitere Kinasen wie ERK (extracellular signal-regulated kinase) oder auch den NF-κB (nuclear factor κB) -Signalweg aktivieren, was eine weitere Möglichkeit der Transkriptions- und Translationsregulierung und der damit verbundenen Wiederherstellung der ER-Homöostase bedeutet [108, 109].

1.2.5. Virale Infektionen und die UPR

Virale Infektionen induzieren ER-Stress aufgrund der Synthese viraler Proteine [110]. Um eine produktive Virusreplikation zu gewährleisten haben viele Viren im Laufe der Evolution wirksame Mechanismen entwickelt, um die für die virale Replikation schädlichen Auswirkungen der UPR zu überwinden [111-114]. So kann die durch ER-Stress induzierte ER-assoziierte Protein Degradation oder eine Initiierung eines Translationsstopps verhindert werden und auf der anderen Seite die Expression von Protein-prozessierenden Genen gesteigert werden. Auch eine durch anhaltenden ER-Stress induzierte Apoptose kann inhibiert werden. Im Falle von HSV-1 wurde gezeigt, dass eine Aktivierung des PERK-Signalwegs supprimiert wird, indem das virale Glykoprotein gB an PERK bindet und somit dessen Dimerisierung verhindert [115]. Zusätzlich führt die Expression des viralen Proteins γ 34.5 zu einer Dephosphorylierung des eIF2 α [116]. Dadurch ist neben dem PERK-Signalweg auch die PKR-vermittelte Phosphorylierung von eIF2 α inhibiert und HSV-1 kann die Induktion eines Translationsstopps bzw. der Apoptose hemmen.

Auch HCMV ist in der Lage, die UPR zu modifizieren. Das virale Protein UL38 induziert die Expression von ATF4, verhindert die dauerhafte Phosphorylierung von JNK und inhibiert somit die ER-Stress induzierte Apoptose [117, 118]. Des Weiteren HCMV die Expression des Chaperons und Hauptregulatorproteins BiP kann regulieren und damit die Faltung viraler Proteine fördern [119, 120]. HCMV nutzt BiP auch noch in der Weise, dass es durch die Bindung der viralen Proteine US2 und US11 an BiP die Degradation von MHC Klasse I-Proteinen einleitet, was HCMVinfizierte Zellen vor einer Erkennung durch das Immunsystem schützt [121]. Auch die Aktivierung des ATF6-Signalwegs wird durch HCMV supprimiert, indem die Spaltung von ATF6 inhibiert wird. Obwohl eine Aktivierung von ATF6 für das Virus förderlich wäre, da ATF6 ein Transkriptionsfaktor für verschiedene Chaperon-Gene ist, kann HCMV dennoch die BiP-Expression über einen alternativen Signalweg steigern [119]. Der IRE1-Signalweg wird ebenfalls durch HCMV moduliert. So blockiert HCMV die Aktivierung von XBP-1 Zielgenen, welche eine ER-Stress induzierte Degradierung von Proteinen zur Folge hätte [35].

Nicht nur Herpesviren sind zu einer UPR-Modulation fähig. In Tabelle 1 sind einige Viren und deren Interaktion mit der UPR zusammengefasst.

Virus	Interaktion mit der UPR	Quellen
Asfarviridae: African swine fever Virus	BiP und PERK	[122, 123]
Herpesviridae: Cytomegalovirus	XBP-1, ATF4, ATF6, und	[117, 120,
	PKR	124-126]
Herpes-simplex-virus 1	PERK und PKR	
		[116]
Hepadnaviridae: Hepatitis-B-Virus	BiP	[127, 128]
Papillomaviridae: Papillomavirus	GADD34 und PKR	[129]
Poxiviridae: Vaccinia-Virus	PERK und PKR	[130]
Bunyaviridae: Tula Virus	BiP und Caspase-12	[131]
Flaviviridae: Bovines Virusdiarrhoe-Virus	BiP	[132, 133]
Hepatitis-C-Virus	BiP, PERK, XBP-1, und	[128, 134,
	PKR	135]
Japanisches-Encephalitis-	BiP und CHOP	
Virus		[136]
Orthomyxoviridae: Influenza-A-Virus	BiP, P58 ^{IPK} und PKR	[99, 137,
		138]
Paramyxoviridae: Respiratorisches-	BiP und Caspase-12	[110]
Synzytial-Virus, Affenvirus 5		[139]
Retroviridae: Maus Retrovirus	BiP	[140]
Rhabdoviridae: Vesicular stomatitis Virus	BiP, PERK und PKR	[141, 142]

Taballa 1. Viron und ibra Interaktion mit dar UDB

1.3. Zielsetzung der Arbeit

Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass das humane CMV eine Feinregulation der UPR durchführt [35]. Zwar induziert HCMV eine mäßige PERK-Phosphorylierung, jedoch wird ein Translationsarrest verhindert. Des Weiteren wird die Aktivierung des ATF6-Signalwegs unterbunden, jedoch werden für das Virus nützliche Zielgene des ATF6, z. B. Chaperone, auf alternativen Signalwegen induziert. Auch der IRE1-Signalweg wird von HCMV beeinflusst. So wird die Transkription "virusfeindlicher" Zielgene, wie Protein Degradierungsfaktoren inhibiert [35]. Insgesamt kann HCMV die UPR sowohl positiv als auch negativ modulieren. Die viralen Proteine, die dabei eine Rolle spielen und die zugrunde liegenden Regulationsmechanismen sind jedoch weitgehend unbekannt. Da sich MCMV und HCMV in vielerlei Hinsicht ähnlich verhalten, kann von einer MCMV-Interaktion mit der UPR ausgegangen werden. Allerdings wurde bis zum Beginn dieser Arbeit noch keine Wechselwirkung von MCMV mit der UPR beschrieben. Aus diesem Grund war Ziel dieser Arbeit herauszufinden, ob MCMV ebenfalls die UPR-Signalwege modulieren kann. Falls eine Regulation durch MCMV erfolgt, sollten ggf. verantwortliche virale Proteine identifiziert und charakterisiert werden. Darüber hinaus war es von Interesse, welche molekularen Mechanismen bei einer Modulation der UPR zugrunde liegen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Zelllinien

Tabelle 2: Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Medium	Umsetzungs- verhältnis	Quelle/ Referenz
10.1	Spontan immortalisierte primäre BALB/c murine embryonale Fibroblasten, p53 negativ	DMEM 5 % FCS P/S	1:10	[143]
NIH3T3	Spontan immortalisierte primäre NIH swiss mouse embryonale Fibroblasten	DMEM 5 % NCS P/S	1:5	ATCC: CRL-1658
PKR-/-	Spontan immortalisierte 3T3- ähnliche embryonale Fibroblasten	DMEM 5 % FCS P/S	1:3	[144]
293A	Adenovirus transformierte humane embryonale Nierenzellen; exprimieren Adenovirus E1 Proteine	DMEM 5 % FCS P/S	1:10	Invitrogen
Phoenix ^a	Amphotrophe Verpackungszelllinie zur Herstellung von Retroviren basierend auf 293T-Zellen, stabile Expression der <i>gag/pol/env</i> Gene des Moloney-Maus-Leukämie- Virus.	DMEM 5 % FCS P/S	1:10	[145]
HFF	Humane Vorhautfibroblasten Telomeraseimmortalisiert	DMEM 10 % FCS P/S	1:3	[146]
MRC-5	Humane Lungenfibroblasten	DMEM 10 % FCS P/S	1:3	ATCC: CCL-171

^a regelmäßig selektionieren mit 200 µg/ml Hygromycin B und 2 µg/ml Diphteriatoxin

2.1.2. Zellkulturmedium

Dulbeccos Modified Eagles Medium (DMEM) mit Glucose (PAA)

Dulbeccos PBS (D-PBS) ohne Calcium und Magnesium (PAA)

Trypsin/EDTA (0,05 %/0,02 %) in PBS (PAA)

Fetales Kälber Serum (FCS) (PAN)

Neugeborenes Kälber Serum (NCS) (PAN)

2.1.3. Viren

Tabelle	3:	Viren
1400110	•••	

Virus	Beschreibung	Quelle/ Referenz
Murines	Rekombinantes murines CMV kloniert als BAC	[147]
Cytomegalovirus,	Konstrukt mit Expression des grün	
Stamm Smith	fluoreszierenden Proteins (GFP), Selektion in	
(MCMV GFP)	Bakterien über Chloramphenicol-Resistenz	
Murines	Rekombinantes murines CMV kloniert als BAC	[148]
Cytomegalovirus,	Konstrukt mit Expression des rot	
Stamm Smith	fluoreszierenden Proteins (mCherry), Δ 1-16	
(MCMV		
Kontrolle)		
Murines	Rekombinantes murines CMV kloniert als BAC	[148]
Cytomegalovirus,	Konstrukt mit Expression des rot	
Stamm Smith	fluoreszierenden Proteins (mCherry), Δ 1-16,	
(MCMV ∆M50)	Substitution des M50 ORFs mit einer EGFP-	
	Kassette	
HCMV GFP	rekombinantes humanes CMV kloniert als BAC	[149]
AD169	Konstrukt mit Expression des grün	
	fluoreszierenden Proteins (GFP), Selektion in	
	Bakterien über Chloramphenicol-Resistenz	

2.1.4. Bakterien und Bakterienkulturmedium

Tabelle 4	: Bakterien	und Medien	

E.coli	Beschreibung	Quelle/ Referenz		
DH10B ^a	F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80dlacZ Δ M15 Δ lacX74 endA1 recA1 deoR Δ (ara,leu)7697 araD139 galU GalK nupG rpsL λ -	Invitrogen		

¹ Selektion mit Tetracyclin möglich, Zucht der Bakterien bei 37 °C

Luria-Bertani Flüssigmedium (LB):

1 % Bactotrypton (Roth), 0,5 % Hefeextrakt (Roth), 0,5 % NaCl

Luria-Bertani-Agarplatten:

1 % Bactotrypton (Roth), 0,5 % Hefeextrakt (Roth), 0,5 % NaCl, 15 g/l Agar-Agar

2.1.5. Antibiotika

Tabelle 5: Antibiotika				
Antibiotikum	Arbeitskonzentration	Hersteller		
Ampicillin	100 μg/ml	Roth		
Chloramphenicol	15 μg/ml	Roth		
Kanamycin	50 μg/ml	Roth		
Hygromycin B	200 µg/ml	PAA		
Penicillin	100 U/ml	PAA		
Streptomycin	100 μg/ml	PAA		
Diphterietoxin	2 μg/ml	PAA		

2.1.6. Plasmide

Tabelle	6:	Plasn	nide

Name	Beschreibung	Quelle/ Referenz
pcDNA3	5,4 kb, high copy, eukaryotischer Expressions- vektor, CMV-Promoter, Neomycin und Ampicillin Resistenz	Invitrogen
pRetroGFP	12,3 kb, low copy, retroviraler Vektor, LTR Promotor, Ampicillin Resistenz, exprimiert GFP	T. Shenk, Princeton University, USA
pMSCVHyg- IRE1-HA	10,0 kb, low copy, retroviraler Vektor, LTR Promotor, Hygromycin Resistenz, exprimiert IRE1 mit C-Terminalem HA-Tag	Clontech Laboratories
pMSCVHyg- IRE1-3xmyc	10,0 kb, low copy, retroviraler Vektor, LTR Promotor, Hygromycin Resistenz, exprimiert IRE1 mit C-Terminalem 3xmyc-Tag	Clontech Laboratories
pBRep	9,7 kb, low copy, episomaler Vektor, RSV Promoter, Ampicillin Resistenz	W. Brune, Heinrich-Pette- Institut, Hamburg
pcDNA-3xFlag- ATF6	7,4 kb, high copy, basierend auf pcDNA3, eukaryotischer Expressionsvektor für murines ATF6 mit N-Terminalem 3xFlag-Tag	Sebastian Stahl
pcDNA-Calnexin- Flag	7,2 kb, high copy, basierend auf pcDNA3, eukaryotischer Expressionsvektor für murines Calnexin mit C-Terminalem Flag-Tag (Kontrolle)	Sebastian Stahl
pcDNA-Flag-M50	6,3 kb, high copy, basierend auf pcDNA3, eukaryotischer Expressionsvektor für das MCMV Gen M50 mit N-Terminalem Flag-Tag	Sebastian Stahl
pcDNA-M50	6,3 kb, high copy, basierend auf pcDNA3, eukaryotischer Expressionsvektor für das MCMV Gen M50	Sebastian Stahl
pcDNA-IRE1- TEV-HA	8,4 kb, high copy, basierend auf pcDNA3, eukaryotischer Expressionsvektor für murines IRE1mit C-Terminaler TEV-Schnittstelle und HA-Tag	Sebastian Stahl
pcDNA-IRE1- 3xmyc	8,4 kb, high copy, basierend auf pcDNA3, eukaryotischer Expressionsvektor für murines IRE1 mit C-Terminalem 3xmyc-Tag	Sebastian Stahl
pcDNA-m144- Flag	6,6 kb, high copy, basierend auf pcDNA3, eukaryotischer Expressionsvektor für das MCMV Gen m144 mit C-Terminalem Flag-Tag (Kontrolle)	W. Brune, Heinrich-Pette- Institut, Hamburg

2.1.7. Oligonukleotide

Tabelle 7: Oligonukleotide

Primername	Sequenz	Funktion
Notl BgIII 3xFlag-	fwd:5'AGCGGCCGCAGATCTATGGACTACAA	Klonierung
ATF6 Xhol	GGACGACGACGACAAGGACTACAAGGACG	
	ACGACGACAAGGACTACAAGGACGACGAC	
	GACAAGGAGTCGCCTT-3'	
	rev: 5'-TTCTCGAGCTACTGCAACGACTCAG	
	GGATG GTGCTGACCAC-3'	
BamHI BiP Xhol	5'-AGGATCCATGATGAAGTTCACTGTGGTG-	Klonierung
	GTATC-3'	
Notl EcoRI	5'-	Klonieruna
Calnexin-Flag	AGCGGCCGCGAATTCATGGAAGGGAAGTG	J
Xhol	GTTA CTGTGTTTG-3'	
	5'-TCTCGAGTCACTTGTCGTCGTCGTCCTT	
	GTAGTC CTCTCTTCGTGGCTTTCTGTTTCT	
	TG-3'	
Sall HindIII Flag-	5'-AGTCGACAAGCTTATGGACTACAAGGAC	Klonierung
M50 Xhol Hpal	GACGA CGACAAGGAGATCGAC-3'	
	5'-TGTTAACCTCGAGTCACGGATGACCCGC	
	CGAAC GGGCCG-3'	
NhelEcoRI IRE1-	5'-AAGCTAGCGAATTCATGCCGGCCCGGTG	Klonierung
TEV-HA	GCT-3'	
XholNotl	5'-TTGCGGCCGCCTCGAGCTAAGCGTAGTC	
	TGGGACGTCGTATGGGTAACCACCACCTT	
	GGAAGIAGAGGIICICGAGGGCAIAIGGA	
5		
		Kionierung
	CGTATGGGTAGAGGGGGGTCTGGAGTCACT	
HindIIIEcoBl		Klonierung
Flag-UL 50 Xhol		Romerang
	CTCCATCAGGATCTGGTGC-3	
	5'-TTCTCGAGTCAGTCGCGGTGTGCGGAG	
	C-3'	
m/h IRE1 I	5'-AGCAGACTTTGTCATCGGC-3'	Sequenzierung
m/h IRE1 II	5'-CTATGCCTCTCCCTCAATG-3'	Sequenzierung
m IRE1 III	5'-ACTTCAGACAACACACCGAC-3'	Sequenzierung
m IRE1 IV	5'-AGGTATGTTTGACAACCGAG-3'	Sequenzierung
m/h IRE1 V	5'-AGGACAACCCTACCTACACG-3'	Sequenzierung
m IRE1 VI	5'-CTACTTCACTTCCCGCTTC-3'	Sequenzierung
m Calnexin I	5'-GTGGAATTGATCCAGGCTGAGCTCTG-3'	Sequenzierung
m Calnexin II	5'-TTGGAGGCTTCCATTTGCCCTTATAATT-	Sequenzierung
	3'	
m Calnexin III	5'-CAGCGACCTATGATTGACAACCCCAA-3'	Sequenzierung
M50 I	5'-CGCCGCGTGTTGGAAATCAG-3'	Sequenzierung

Primername	Sequenz	Funktion
M50 II	5'-GACAAGAATGTGGGCGCCGA-3'	Sequenzierung
M50 III	5'-GGCCGACATCGAGAGGATCAAG-3'	Sequenzierung
M50 IV	5'-CAAGAATCAGCCCGCGGC-3'	Sequenzierung
M50 V	5'-CCCAATAGCTGAGGAGATACTCGACCG	Sequenzierung
	G-3'	
BiP	5'-TCATCGGACGCACTTGGAA-3'	Real-time PCR
	5'-CAACCACCTTGAATGGCAAGA-3'	
XBP-1 gespleißt	5'-GAGTCCGCAGCAGGTG-3'	Real-time PCR
	5'-GTGTCAGAGTCCATGGGA-3'	
XBP-1	5'-CACTCAGACTATGTGCACCTC-3'	Real-time PCR
ungespleißt	5'-GTGTCAGAGTCCATGGGA-3'	
GAPDH	5'-GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG-3'	Real-time PCR
	5'-CCCACTCTTCCACCTTCGATG-3'	
IRE1	5'-CGGCCTTTGCTGATAGTCTC-3'	Real-time PCR
	5'-AGTTACCACCAGTCCATCGC-3'	
ATF6	5'-GGCCAGACTGTTTTGCTCTC-3'	Real-time PCR
	5'-CCCATACTTCTGGTGGCACT-3'	
XBP-1	5'-AAACAGAGTAGCAGCGCAGACTGC-3'	PCR
	5'-GGATCTCTAAAACTAGAGGCTTGGTG-3'	

2.1.8. Größenstandards

O'GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas) PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas)

2.1.9. Enzyme

FastDigest-Restriktionsenzyme (10 U/µl) (Fermentas) T4 DNA Ligase (5 U/µl) (Fermentas) PRECISOR High-Fidelity DNA Polymerase (2u/µl) (BioCat) DreamTaq[™] Green DNA Polymerase (5u/µl) (Fermentas) Klenow Fragment (10u/µl) (Fermentas) Ribonuclease A (10 mg/ml) (Fermentas) AcTEV[™] Protease (Invitrogen) TURBO DNA-*free*[™] Kit (Ambion)

2.1.10. Kit-Systeme

NukleoBond® Xtra Midi (Machery-Nagel)

NukleoSpin® Extract II (Machery-Nagel)

RNeasy Mini Kit (Qiagen)

TOPO® TA Cloning® Kit for subcloning (Invitrogen)

BCA Protein Assay Kit

2.1.11. Antikörper

Tabelle 8: Primäre Antikörper

Primäre Antikörper	Hergestellt	Antigen	Anwendung	Quelle/
	in			Referenz
α-BiP	Kaninchen	BiP	WB 1:1000	Cell Signaling
				Technology,
				Inc., Danvers,
				MA, USA
α-elF2α	Kaninchen	elF2 α	WB 1:1000	Cell Signaling
				Technology,
				Inc., Danvers,
				MA, USA
α -Phospho-eIF2 α	Kaninchen	pelF2 α	WB 1:1000	Cell Signaling
(Ser51) (D9G8)				Technology,
				Inc., Danvers,
				MA, USA
α-Flag M2	Maus	Flag	WB 1:3000	Sigma-Aldrich
		0		Chemie
				GmbH, München
α-GADD 153 (9C8)	Maus	CHOP	WB 1:200	Santa Cruz
				Biotechnology,
				Inc., Santa Cruz,
				CA, USA
α-GRP 78 (E-4)	Maus	BiP	WB 1:1000	Santa Cruz
				Biotechnology,
				Inc., Santa Cruz,
				CA, USA
α -HA (16B12)	Maus	HA	WB 1:1000	Covance
				Research
				Products,
				Berkeley, USA
α-ΗΡ1 α	Kaninchen	HP1 α	WB 1:1000	Cell Signaling
				Technology,
				Inc., Danvers,
				MA, USA
α -IRE1 α (14C10)	Kaninchen	IRE1 α	WB 1:1000	Cell Signaling
				Technology,
				Inc., Danvers,
				MA, USA
a -Phospho-	Kaninchen	pIRE1	WB 1:1000	Novus Biologicals
ERN1/IRE1 (Ser724)		1.		Inc., Littleton,
				CO, USA
α-XBP-1 (M-186)	Kaninchen	XBP-1	WB 1:200	Santa Cruz
				Biotechnology,
				Inc., Santa Cruz.
				CA, USA
α-M50	Kaninchen	M50	WB 1:1000	U. Koszinowski,
				Max von
				Pettenkofer-
				Institut, München

Primäre Antikörper	Hergestellt in	Antigen	Anwendung	Quelle/ Referenz
α -β-Aktin (AC-74)	Maus	β-Aktin	WB 1:1000	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

Tabelle 9: Sekundäre Antikörper

Sekundäre Antikörper	Hergestellt in	Antigen	Anwendung	Quelle/ Referenz
α-Kaninchen	Ziege	lgG aus Kanin- chen	WB 1:10000	Dianova GmbH, Hamburg
α –Maus	Ziege	lgG aus Maus	WB 1:10000	Dianova GmbH, Hamburg
α –Ratte AlexaFluor 488	Ziege	lgG aus Ratte	IF 1:1000	Invitrogen
α –Ratte AlexaFluor 555	Ziege	lgG aus Ratte	IF 1:1000	Invitrogen
α –Kaninchen AlexaFluor 488	Ziege	lgG aus Kanin- chen	IF 1:1000	Invitrogen
α –Kaninchen AlexaFluor 555	Ziege	lgG aus Kanin- chen	IF 1:1000	Invitrogen

2.1.12. Chemikalien

Standardchemikalien (p.a. Qualität) wurden von Carl Roth, Sigma Aldrich oder AppliChem bezogen. Alle anderen von dem jeweils angegebenen Hersteller.

2.1.13. Puffer

50x TAE-Puffer:	Proben-Puffer (4x):	Transferpuffer:
2 M Tris	0,3 M Tris	50 mM Tris
5,7 % AcOH	12 % SDS	40 mM Glycin
50 mM EDTA	40 % Glycerin	0,04 % SDS
	200 mM DTT	20 % MetOH
	pH 6,8 einstellen	
	Bromphenolblau	

<u>RIPA-Puffer:</u>	TritonX100-Puffer:
50 mM Tris	50 mM Tris
150 mM NaCl	150 mM NaCl
1 % TritonX100	2,5 % TritonX100
0,1 % SDS	pH 7,5 einstellen
1 % Deoxycholat	

pH 7,2 einstellen

+ Protease-Inhibitoren (Complete Mini, Roche) 1Tablette/10ml Puffer

Waschpuffer B (IP):	<u>Waschpuffer C (IP):</u>
150 mM NaCl	500 mM NaCl
1 mM Tris pH 7,6	1 mM Tris pH 7,6
2 mM EDTA	2 mM EDTA
1 % NP40	1 % NP40

<u>Waschpuffer D (IP):</u> 100 mM Tris pH 8,0 1 % NP40

Equilibrierungspuffer (Affinitätschromatographie):

20 mM Tris pH 7,5 0,1 M NaCl 0,1 mM EDTA

Waschpuffer (Affinitätschromatographie): 20 mM Tris pH 7,5 0,1 M NaCl 0,1 mM EDTA 0,05 % Tween20

Regenerationspuffer (Affinitätschromatographie): 0,1 M Glycin pH 2

Lagerpuffer (Affinitätschromatographie): 20 mM Tris pH 7,5 0,1 M NaCl 0,1 mM EDTA 0,09 % NaAzid

<u>S1:</u>	<u>S2:</u>	<u>S3:</u>
50 mM Tris pH 8	200 mM NaOH	2,8 M KAc
10 mM EDTA	1 % SDS	pH 5,1 mit AcOH
RNaseA 100 µg/ml		
<u>TBST (10x):</u>	<u>Lämmli (10x):</u>	
100 mM Tris pH 7,5	250 mM Tris	
1,5 M NaCl	1,92 M Glycin	
1 % Tween20	1 % SDS	
<u>Tris:</u>	<u>EDTA:</u>	<u>NaOH:</u>
1 M Tris NaCl	0,5 M EDTA pH 8,0	5 M NaOH
1 M NaCl		
<u>KOH:</u>	<u>TE:</u>	
5 M KOH	10 mM Tris pH 8	

1 mM EDTA

Kern	Extrakt:	Harvest	buffer:

 10 mM HEPES pH 7,9
 10

 50 mM NaCl
 10

 0,5 M Sucrose
 0,1

 0,1 mM EDTA
 0,1

 0,5 % Triton X100
 +

 + Protease-Inhibitoren, + 1 mM DTT

<u>Waschpuffer:</u> 10 mM HEPES pH 7,9 10 mM KCI 0,1 mM EDTA 0,1 mM EGTA

2.1.14. Verbrauchsmaterialien

0,45 µm Filteraufsätze Minisart® (Sartorius) BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) Cyro-Röhrchen 2 ml (steril) (Roth) Deoxyribonukleotide, je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Fermentas) ECL Western Blotting Detection Reagents (Amersham Biosciences) Elektroporationsküvetten (Eurogentec) Glasplättchen 1,5 x 15 mm (Hartenstein) Hybond ECL/Nitrocellulose (GE Healthcare) Mounting medium (Polysciences) Objektträger 76 x 26 mm (Roth) Phosphatase Inhibitor Cocktail 2 + 3 (Sigma-Aldrich) Pipettenspitzen (VWR, Neolab) Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) Protease Inhibitor Cocktail "Complete Mini" (Roche) QIAshredder (Qiagen) Reaktionsgefäße (VWR) StrataClean Resin (Agilent Technologies) Whatman Papier 3mm (Roth) Zellkulturschaber (TPP) Zellkulturwaren (Greiner, Nunc, Sarstedt, TPP) α-HA-3F10-Affinitätssäulen (Roche)

2.1.15. Geräte

ABI 7500 Real-time PCR System (Applied Biosystems)

Agagel Maxi (Biometra)

Agagel Midi-Wide (Biometra)

Axiovert 25 Mikroskop (Zeiss)

Bakterienbrutschrank (Memmert)

Bakterienschüttelinkubator GFL3033 (Hilab)

Bakterienschüttler Certomat® R (B. Braun Biotech International)

Finnpipette® Multistepper (ThermoFisher)

FUSION-SL 4.2 MP (Peqlab)

Geldokumentation GelDoc XR (Bio-Rad)

Gene Pulser XCell (Bio-Rad)

Glaspipetten (5 ml, 10 ml, 20 ml) (Brandt)

Heraeus Multifuge 1S-R (ThermoFisher)

Inverted Microscope Axiovert 200M (Carl Zeiss)

Konfokales Laserscannning Mikroskop Axioplan LSM510 (Zeiss)

Kühltischzentrifuge Hereus Fresco 21 (ThermoFisher)

Kühlzentrifuge Sorvall® RC 5C Plus (ThermoFisher)

Magnetrührer MR2002 (Heidolph)

Mini-Protean 3 Cell (Bio-Rad) Multiplate Absorbance Reader Spectrafluor Plus (Tecan) Nanodrop (Peqlab) PefectBlue Gelsystem Mini S (Peqlab) PerfectBlue Gelsystem Maxi S (Peqlab) ph-Meter inoLab pH720 (WTW) Photometer Ultrospec 10 (GE Healtcare) Pipettboy acu (IBS) Pipetten 0,2 – 1000 µl (Gilson) Schüttler für Blots Wt-17 (Biometra) Spannungsgenerator Power-PacTM Universal (Bio-Rad) TC10[™] Automated Cell Counter (Bio-Rad) Thermomixer 5496 (Eppendorf) Tischzentrifuge Centrifuge 5415D (Eppendorf) Transblot® SD Semi-dry Transfer Cell (Bio-Rad) Überkopfschüttler Rotator SB2 (Stuart) Vortex Mixer 7-2020 (Neolab) Zellkultur Inkubator HeraCell 150 Zellkulturwerkbank Clean Air DLF/Rec 4 KL 2A (ThermoFisher)

2.2. Methoden

2.2.1. Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1. DNA-Isolierung

Die Isolierung kleiner DNA-Mengen erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse. Dazu wurden 5 ml LB-Medium mit einer Bakterienkultur angeimpft. Über Nacht konnte bei optimaler Temperatur ein Wachstum stattfinden. Am folgenden Tag wurden 3 ml der Bakterienkultur bei 6000 g für 3 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 300 µl kaltem S1-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 300 µl S2-Puffer wurde für 5 min lysiert und anschließend 300 µl kalter S3-Puffer zugegeben. Nach einer 10-minütigen Inkubation auf Eis wurde das Präzipitat bei 16000 g für 10 min bei 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit 0,6 Volumen Isopropanol gemischt. Die DNA wurde dann durch Zentrifugation bei 16000 g für 30 min bei 4 °C präzipitiert und anschließend das DNA-Pellet mit 1 ml Ethanol (70 %) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (16000 g, 4 °C, 10 min) wurde der Alkohol entfernt und die DNA bei 50 °C getrocknet. Zuletzt wurde die DNA in 50 µl TE-Puffer gelöst.

Die Isolierung größerer DNA-Mengen in reinster Form erfolgte ebenfalls nach dem Prinzip der alkalischen Lyse, jedoch wurden hierfür 200 ml Bakterienkultur eingesetzt. Die DNA-Isolierung geschah mittels eines kommerziell erworbenen Kits von Macherey-Nagel (NucleoBond® Xtra Midi) nach Herstellerangaben. Zuletzt wurde das DNA Pellet bei 50 °C getrocknet, in TE-Puffer gelöst und anschließend die Konzentration photometrisch bestimmt.

2.2.1.2. RNA-Isolierung aus Zellen

Zunächst wurden MEFs in einer 6Loch-Platte ausplattiert und nach entsprechender Behandlung mit PBS gewaschen. Die RNA-Isolierung erfolgte mit Hilfe des RNeasy® Mini Kit von Qiagen nach Herstellerangaben. Nachdem die RNA in 44 µl Wasser aufgenommen wurde, erfolgte eine DNase-Behandlung, um mögliche DNA-Kontaminationen zu entfernen. Dazu wurden 44 µl der RNA mit 5 µl 10x-DNase-Puffer und 1 µl DNase vermischt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Zur Inaktivierung der DNase wurden 5 µl Inaktivierungsreagenz zugegeben und für 10 min bei RT inkubiert. Die Inaktivierungsbeads wurden durch anschließende Zentrifugation bei 11000 g für 5 min pelletiert und der RNA-enthaltende Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Zum Schluss wurde die RNA-Konzentration photometrisch bestimmt.

2.2.1.3. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Um die Konzentration von Nukleinsäuren zu bestimmen, wird die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen, da bei dieser Wellenlänge die aromatischen Basen der Nukleinsäuren ein Absorptionsmaximum aufweisen. Proteine hingegen besitzen ein Absorptionsmaximum bei 280 nm. Durch Messung beider Werte und anschließender Bildung des Quotienten lässt sich neben der Konzentration auch eine Aussage über den Reinheitsgrad der Nukleinsäure treffen. So liegt der Quotient OD₂₆₀/OD₂₈₀ einer reinen DNA-Präparation zwischen 1,8 und 2 und die optische Dichte von 1 entspricht einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml.

2.2.1.4. cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurde 1 μ g RNA eingesetzt. Die gewonnene RNA wurde mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 11 μ l gebracht. Anschließend wurden 1 μ l (100 pmol) Oligo(dT)₁₈, 2 μ l dNTP's (20mM), 0,5 μ l (20 U) RNase-Inhibitor, 5 μ l MMLV-RT-Puffer (10x) und 1 μ l (200 U) MMLV-Reverse Transkriptase zugegeben. Es folgte eine Inkubation für eine Stunde bei 37 °C. Zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase wurde der Ansatz bei 70 °C für 10 min erhitzt.

2.2.1.5. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR können beliebige DNA Fragmente aus einer Nukleinsäure, die als Matrize dient, mit komplementären Oligonukleotiden amplifiziert werden. Im ersten Schritt einer PCR wird die doppelsträngige DNA in Einzelstränge denaturiert. In der zweiten Stufe, dem Primer-Annealing, kommt es über komplementäre Basenpaarung zu einer Bindung der Primer an die nun einzelsträngigen DNA-Zielsequenzen. Im letzten Schritt erfolgt die Elongation, bei der die zwischen den Primern liegende DNA synthetisiert wird. Die Temperatur der Elongation ist dabei von der eingesetzten DNA-Polymerase abhängig.

Als Ergebnis einer PCR ergibt sich ein Reaktionsgemisch, das nach n Zyklen ein theoretisches Maximum von 2ⁿ⁻² doppelsträngigen DNA-Molekülen enthält. In der

Regel reichen 30 Zyklen aus, um das gewünschte DNA-Material in ausreichendem Maße zu amplifizieren.

Der Ansatz für eine PCR wurde nach Herstellerangaben der eingesetzten Polymerase pipettiert. Die PCR wurde nach folgendem PCR-Programm durchgeführt:

- 1. 98 °C, 5 min
- 2. 98 °C, 30 s
- 3. Annealing-Temperatur (Tm 5 °C), 30 s
- 4. 72 °C, 1-2 min/kbp
- 5. 72 °C, 10 min
- 6. 4 °C, ENDE

Die Schritte 2 bis 5 wurden je nach Expressionslevel des zu untersuchenden Gens 24 bis 29-mal wiederholt. Zur Kontrolle wurden 10 µl des PCR-Ansatzes mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt.

2.2.1.6. Sequenzierung

Sequenzierungsreaktionen wurden nach Herstellerangaben unter Verwendung des "ABI BigDye Terminators v3.1 Cycle Sequencing-Kit" angesetzt und nach folgendem Programm durchgeführt:

- 1. 96 °C, 5 min
- 2. 96 °C, 10 sec
- 3. Annealing-Temperatur, 5 sec
- 4. 60 °C, 4 min
- 5. 4 °C, ENDE

Die Schritte 2 bis 5 wurden zwischen 24 und 29-mal wiederholt.

Die Sequenzierungen wurden im hauseigenen Sequenzierungslabor durchgeführt mit einer DNA-Menge von 150-300 ng pro Ansatz.

2.2.1.7. Quantitative Real-time PCR

Der Vorteil der quantitativen Real-time PCR (RT-PCR) ist die Verfolgung der Amplifikation der Ziel-DNA direkt während der PCR-Reaktion. Sie eignet sich gut, um mRNA eines bestimmten Gens quantitativ im Vergleich zu einem Haushaltsgen zu analysieren. Als Haushaltsgen wird ein Gen bezeichnet, das unabhängig von Zelltyp, Zellstadium und äußeren Einflüssen exprimiert wird. In dieser Arbeit diente GAPDH als Haushaltsgen. Zur Quantifizierung der DNA-Mengen wurde der Power SYBR® Green PCR Master Mix von ABI verwendet. Pro Reaktion wurden 12,5 μ I SYBR Green Master Mix, 9,5 μ I H₂O, je 0,5 μ I Primer und 1 μ I Template eingesetzt. Alle Proben wurden im Duplett gemessen und die Ergebnisse gemittelt. Das zu Grunde liegende Programm sah wie folgt aus:

- 1. 95 °C, 10 min
- 2. 95 °C, 3 sec
- 3. 60 °C, 34 sec

Die Schritte 2 bis 3 wurden 44-mal wiederholt. Im Anschluss wurde außerdem noch eine Schmelzkurve aufgenommen, um die Spezifität der Primer zu kontrollieren.

2.2.1.8. Agarose-Gelelektrophorese

Mittels Agarose-Gelelektrophorese können Nukleinsäure-Stränge (RNA oder DNA) nach ihrer Größe und Ladung getrennt werden. Für die in dieser Arbeit durchgeführte Analyse von PCR-Fragmenten oder für die Aufreinigung von Restriktionsverdauen wurden Agarosegele (1 %) gegossen. Dazu wurden entsprechende Mengen Agarose abgewogen und in 1 x TAE-Puffer aufgekocht. Nachdem die Agaroselösung etwas abgekühlt war, wurde Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) zugegeben und die Lösung in eine Gelkammer gegossen. Nach der Polymerisierung wurden die zu analysierenden Proben mit Ladepuffer vermischt und in die Geltasche pipettiert. Zusätzlich wurde ein Marker mit definierter Bandengröße aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 140 Volt für 30 min. Die im Gel aufgetrennten Fragmente wurden anschließend unter UV-Licht (312 nm) analysiert und dokumentiert.

2.2.1.9. Aufreinigung von DNA-Fragmenten und PCR-Reaktionen

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel bzw. aus einer PCR-Reaktion erfolgte mit Hilfe des "NukleoSpin® Extract II-Kit" nach Herstellerangaben. Hierzu wurde das gewünschte DNA-Fragment nach elektrophoretischer Auftrennung aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit entsprechender Menge an Bindepuffer in Lösung gebracht. Zur Aufreinigung einer PCR-Reaktion wurde diese ebenfalls mit Bindepuffer versetzt. Nachdem die DNA-Lösung über eine Anionenaustausch-Matrix gegeben und gewaschen wurde, konnte die gereinigte DNA im gewünschten Volumen eluiert werden.
2.2.1.10. Restriktionsverdau und Ligation

Bei Klonierungen werden DNA-Fragmente untersucht, die durch Restriktionen erhalten wurden. Für einen Plasmid- oder PCR-Verdau wurden 2 μ g DNA mit 1 μ l (10 U) des jeweiligen FastDigest Enzyms und Puffer bei optimaler Temperatur für 10 min verdaut. Die Analyse der Fragmente erfolge wie oben beschrieben mittels Agarose-Gelelektrophorese. Falls notwendig wurden die benötigten DNA-Fragmente aus dem Agarosegel ausgeschnitten und nach Aufreinigung über passende Schnittstellen in einen zuvor entsprechend geschnittenen Vektor ligiert. Dazu wurde Vektor und Insert im Verhältnis von 1:4 bis 1:7 gemischt und mit 1 μ l (5 U) Ligase und der entsprechenden Menge Puffer versetzt. Die Ligation wurde bei 16 °C über Nacht oder bei RT für 1 h durchgeführt. Anschließend wurde mit 2 μ l des Ligationsansatzes eine Elektroporation durchgeführt und die transformierten Bakterien entsprechend selektioniert.

2.2.1.11. Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Zur Elektroporation Plasmiden Ligationsansätzen wurden von bzw. elektrokompetente Bakterien vom Stamm DH10B verwendet. Dazu wurde eine Übernachtkultur (3 ml LB-Medium) aus einem Glycerolstock angeimpft und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden in einem 500 ml Kolben 200 ml LB-Medium mit einer 1:100 Verdünnung der Übernachtkultur vermischt und für ca. 3 h bei 37 °C bis zu einer OD_{600} = 0,5 wachsen gelassen. Die Bakterien wurden bei 6000 g und 4 °C für 10 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 200 ml eiskaltem H₂O resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 6000 g und 4 °C für 10 min wurde das Pellet nochmals in 100 ml eiskaltem H₂O resuspendiert. Nach einem dritten Waschschritt mit 10 % Glycerin wurde das Pellet in 2 ml 10 % Glycerin aufgenommen und in 50 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.2.1.12. Anlegen eines Glycerolstocks

Zum Anlegen eines Glycerolstocks wurden 700 µl einer 5 ml Übernachtkultur mit 300 µl Glycerol (86 %) vermischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.2.1.13. Elektroporation

Zur Elektroporation von Plasmiden oder Ligationsansätzen wurden elektrokompetente DH10B-Bakterien auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden pro Elektroporationsansatz 50 µl Bakterien mit ca. 100 ng Plasmid-DNA bzw. 2 µl Ligationsansatz vermischt und in eine kalte 2 mm-Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte im "Gene Pulser XCell" mit 2,5 kV. Sofort nach der Elektroporation wurden die Bakterien mit 1 ml warmem LB-Medium vermischt und aus der Küvette in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine Inkubation bei 37 °C für 1 h. Danach wurden 100 µl der Bakterienkultur auf LB-Agar-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.2. Zellbiologische Methoden

2.2.2.1. Passagieren von Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden in Zellkulturschalen mit Zellkulturmedium gehalten. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem CO₂-Inkubator bei 37 °C, gesättigter Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂. Erreichten die Zellen Konfluenz, wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen, mit Trypsin abgelöst und dem Umsetzungsverhältnis entsprechend in neue Schalen überführt. Sollte eine genau definierte Zellzahl ausgesät werden, wurde die Zellzahl mit Hilfe eines TC10[™] Automated Cell Counter bestimmt.

2.2.2.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren von subkonfluenten Zellen wurden diese gewaschen, abgelöst und 3 min bei 1000 g pelletiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in FCS mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) resuspendiert. Nach Überführung in Cryoröhrchen wurden diese bei -80 °C gelagert. Zur langfristigen Lagerung wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

Um Zellen aufzutauen, wurden sie dem Stickstofftank entnommen und bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen in eine Petrischale überführt und mit Zellkulturmedium vermischt. Am folgenden Tag erfolgte ein Mediumwechsel.

2.2.2.3. Transiente Transfektion

Für die Transfektion wurden $2x10^5$ NIH3T3-Zellen pro 6-Loch-Platte ausplattiert. 24 h später wurden 100 µl Antibiotika- und Serum-freies Medium pro Ansatz in ein Eppendorfgefäß vorgelegt und mit 1,5 - 3 µg Plasmid-DNA und 10 µl PolyFect oder PEI (im Verhältnis DNA:PEI von 1:4) vermischt. Die Suspension wurde 10 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Zellen mit 2 ml frischem Medium versetzt. Die DNA/PolyFect-Lösung wurde mit 600 µl Vollmedium vermischt und auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen 24 - 48 h inkubiert.

2.2.2.4. Herstellung eines Virusstocks

Alle MCMV-Viren wurden auf murinen 10.1-Fibroblasten gezüchtet. Hierzu wurden pro Virusstock jeweils zehn Ø15 cm Schalen mit 4x10⁶ Zellen pro Platte mit einer TCID₅₀ von 0,05 infiziert und im Zellkulturschrank bis zum Erntezeitpunkt inkubiert (ca. fünf Tage nach Infektion). Nachdem alle Zellen infiziert waren, wurde das Kulturmedium der Schalen vereint und die Zelltrümmer mittels Zentrifugation entfernt (6000 g, 15 min, 4 °C). Anschließend wurde der Überstand mit den darin enthaltenen Viren erneut zentrifugiert (23000 g, 3 h, 4 °C) und das überschüssige Medium vorsichtig entfernt. Das entstandene Viruspellet wurde in 1 ml frischem Zellkulturmedium mittels eines Douncers bei 4 °C resuspendiert. Das Virus wurde in 100 µl Aliquots bei -80 °C gelagert.

2.2.2.5. Virustitration zur Bestimmung der TCID₅₀/ml

Um eine Aussage über die Anzahl infektiöser Viruspartikel in einem Virusstock bzw. einem Zellkulturüberstand treffen zu können, wurde die "median tissue culture infection dose" (TCID₅₀/ml) Endpunktbestimmungsmethode genutzt. Diese liefert einen Wert, der angibt, wie viele Viruspartikel statistisch nötig sind um 50 % einer definierten Zellzahl zu infizieren. Die Durchführung erfolgte folgendermaßen: Es wurden $2x10^5$ Zellen pro 96-Lochplatte in einem Volumen von 100 µl pro Loch ausgelegt. Am nächsten Tag wurde der zu bestimmende Virusstock oder Zellkulturüberstand in einem Volumen von 4 ml 1:100 verdünnt. Anschließend wurde, ausgehend von der ersten Verdünnung, eine Verdünnungsreihe angelegt, wobei logarithmisch verdünnt wurde. Danach wurden 100 µl jeder Verdünnung zu 12 Kavitäten pipettiert. Um das statistische Mittel bilden zu können, wurden parallel zwei Bestimmungen durchgeführt. Anschließend wurden die Platten im Zellkulturschrank für 5 Tage inkubiert. Zur Titrationen von Virusstocks wurden zusätzlich zwei weitere Platten genutzt, um die Infektionserhöhung nach Zentrifugation, das so genannte "centrifugal enhancement" zu bestimmen [150]. Hierzu wurden die Platten wie bereits beschrieben infiziert und anschließend zentrifugiert (1000 g, 30 min) bevor diese inkubiert wurden (37 °C, 5 % CO₂). Zur Bestimmung der TCID₅₀/ml wurde am Fluoreszenzmikroskop jede Kavität auf Virusausbreitung untersucht, sichtbar an der GFP-Expression und am induzierten zytopathischen Effekt. Der Virustiter errechnet sich dann anhand der Formel von Spearman (1908) und Kaerber (1931):

 $Titer = \frac{10^{N}}{Infektionsvolumen [ml]} TCID50/ml$ $N = x - 0.5 + \frac{Summe der Plaque - positivien wells ab x}{Anzahl der wells pro Verdünnung}$ mit x = Höchste Verdünnung mit 100 % CPE

2.2.2.6. Virusinfektion

Um bei Infektion einer bestimmten Zellzahl immer mit einer definierten Anzahl an infektiösen Viruspartikeln zu infizieren, wurde mit der so genannten "multiplicity of infection" (MOI) gearbeitet. Wenn z.B. eine Infektion aller Zellen erfolgen sollte, wurde eine MOI von 5 TCID₅₀/Zelle verwendet. Die einzusetzende Virusmenge ergab sich aus: Virusmenge = $\frac{\text{Zellzahl} \times 5 \text{ TCID}_{50}/\text{ml}}{\text{Virustiter}}$. Die errechnete Virusmenge wurde mit der benötigten Menge Zellkulturmedium vermischt und zu den Zellen gegeben. Falls nötig, wurden die Zellen wie oben beschrieben zentrifugiert. Danach erfolgte eine Inkubation bei 37 °C, 5 % CO₂.

2.2.2.7. Herstellung von Retroviren und Transduktion

Für die Übertragung von bestimmten Genen in eukaryotische Zellen wurde das Prinzip der retroviralen Transduktion genutzt. Dabei werden Phoenix-Zellen mit einem retroviralen Vektor, der das zu untersuchende Gen enthielt, transfiziert. Die Transfektion erfolgte mittels Polyethylenimin (PEI). Hierzu wurden am ersten Tag $3x10^{6}$ Zellen pro 10 cm Schale ausplattiert. Am nächsten Tag wurden je 15 µg DNA und 60 µl PEI mit 500 µl Antibiotika-freiem Medium pro Ansatz vermischt. Anschließend wurden beide Lösungen vereint und gevortext. Es folgte eine Inkubation für 20 min bei RT. In der Zwischenzeit wurden die Zellen mit 7 ml frischem Medium versetzt. Die DNA/PEI-Lösung wurde zuletzt auf die Zellen gegeben. Ca. 24 h nach Transfektion wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 10 ml frischem Medium versetzt. Des Weiteren wurden die zu transduzierenden Zielzellen in einer 6-Lochplatte ausplattiert. Am nächsten Tag wurde der retrovirale Überstand durch einen 45 µm Sterilfilter gegeben und der Durchfluss mit 5 µg/ml Polybrene vermischt. Anschließend wurden 3 ml retroviraler Überstand pro Loch zu den Zellen gegeben und diese für 30 min bei 1000 g, 37 °C zentrifugiert. Abends erfolgte ein Mediumwechsel. Am nächsten Tag wurden die Zellen nochmals transduziert bevor sie am letzten Tag zur weiteren Untersuchung analysiert wurden.

2.2.2.8. Herstellung von stabil exprimierenden Zellen

10.1-Zellen wurden wie in 2.2.2.7 beschrieben mit einem retroviralen Vektor, der IRE1-TEV-HA bzw. IRE1-3xmyc kodiert, transduziert und mit entsprechendem Antibiotikum über eine Woche selektioniert.

2.2.3. Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1. Herstellung von Zelllysaten und Messung der Proteinkonzentration

Um Proteine aus kultivierten Zellen zu isolieren, wurden diese zunächst mit PBS gewaschen und anschließend in Lysepuffer (RIPA-Puffer vermischt mit Protease-Inhibitor bzw. Phosphatase-Inhibitor) abgeschabt. Die Lyse erfolgte für 20 min auf Eis. Danach wurde das Zelllysat für 10 min bei 13000 g und 4 °C zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde abgenommen und die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des BCA Protein Assay Kit nach Herstellerangaben bestimmt. Die Proteinkonzentration errechnete sich hierbei anhand einer BSA-Standardreihe.

2.2.3.2. Herstellung von Kern-Extrakten

Um Kern-Extrakte aus $3x10^6$ Zellen herzustellen, wurden diese zunächst mit PBS gewaschen und anschließend in 500 µl Harvestpuffer abgeschabt. Die Lyse erfolgte für 20 min auf Eis. Danach wurde das Zelllysat für 10 min bei 3000 g und 4 °C zentrifugiert, um die Nuklei zu pelletieren. Die Nuklei wurden mit 500 µl Waschpuffer A gewaschen und für 5 min bei 3000 g und 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl RIPA-Puffer lysiert. Das

Kernlysat wurde für 10 min bei 13000 g und 4 °C zentrifugiert und anschließend der proteinhaltige Überstand abgenommen.

2.2.3.3. Aufreinigung von IRE1-TEV-HA aus Zelllysaten mittels α-HA-Affinitätschromatographie

Für die Aufreinigung des IRE1 Proteins und seiner Interaktionspartner wurden ca. 8x10⁷ IRE1-TEV-HA stabil exprimierende Zellen mit einer MOI von 1 mit MCMV-GFP oder mock infiziert. 48 h später wurden die Zellen wie oben beschrieben mit RIPA-Puffer lysiert. Der Überstand wurde auf equilibrierte α-HA-3F10-Affinitätssäulen geladen. Die Säulen wurden mit 20 ml Waschpuffer gewaschen und anschließend das IRE1-TEV-HA und assoziierte Proteine durch Verdauen mit AcTEV-Protease spezifisch aus der Säule eluiert. Dazu wurden 100 U der Protease in 2,5 ml TEV-Puffer zu der Säulenmatrix gegeben und die Proben für 1 h bei RT verdaut. Die eluierten Proben wurden mittels StrataClean Resin-Beads aufkonzentriert und anschließend im Proteingel separiert. Das Gel wurde silbergefärbt und Banden, die spezifisch für die IRE1-TEV-HA Probe waren und nicht in der Kontrollprobe auftauchten, wurden ausgeschnitten. Die massenspektrometrische Analyse (inklusive Probenauftrennung, Silberfärbung und Ausschneiden der Banden) wurde im Labor von Albert Sickmann (ISAS, Dortmund) durchgeführt.

2.2.3.4. SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Um die isolierten Proteine aufzutrennen wurde eine SDS-PAGE nach Lämmli durchgeführt. Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE wird ein System aus zwei Gelen, dem Sammelgel und dem Trenngel verwendet. Das Sammelgel konzentriert die Proteine; das Trenngel führt zu einer Auftrennung entsprechend des Molekulargewichtes der Proteine. Die Proteingröße kann anhand eines Molekulargewichtstandards ermittelt werden. Das Sammel- und Trenngel setzt sich folgendermaßen zusammen:

Trenngel	H ₂ O	30 %	1,5 M	20 % w/v	10 %	TEMED
	(ml)	Acrylamide/Bis	Tris pH	SDS (µI)	APS (µI)	(µI)
		(ml)	8,8 (ml)			
8 %	4,7	2,7	2,5	50	100	50
10 %	4,1	3,3	2,5	50	100	50
15 %	2,4	5,0	2,5	50	100	50
Sammelgel	H ₂ O	30 %	0,5 M	20 % w/v	10 %	TEMED
_	(ml)	Acrylamide/Bis	Tris pH	SDS (µI)	APS (µI)	(µI)
		(ml)	6,8 (ml)			
4 %	6,1	1,3	2,5	50	50	25

Tabelle 10: SDS-Gelzusammensetzung

Für die SDS-PAGE wurden 50 µg Gesamtproteinlysat aufgetragen. Bevor das Polyacrylamidgel mit den zu analysierenden Proben beladen wurde, wurden diese mit reduzierendem Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert.

2.2.3.5. Western Blot

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung bei 140 Volt folgte der Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran mittels Semidry-Verfahrens. Dazu wurden zunächst die Nitrozellulosemembran (NC-Membran), sowie das für den Transfer benötigte Whatmanpapier und das Gel in Transferpuffer äquilibriert. Der für den Blotvorgang notwendige Aufbau sieht wie folgt aus: Anode, drei Lagen Whatmanpapier, Nitrozellulose, Gel, drei Lagen Whatmanpapier, Kathode.

Der Transfer erfolgte bei 100 mA/Gel für 60 min.

Zum Nachweis spezifischer Proteine, wurde ein spezifischer Antikörper verwendet. Hierzu wurde zunächst die Membran in einer Lösung aus 5 % Magermilchpulver in TBST für 1 h blockiert. Danach wurde der erste Antikörper (AK) in entsprechender Verdünnung zugegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde dreimal mit TBST für jeweils 5 min gewaschen. Es folgte eine 1-stündige Inkubation mit sekundärem Antikörper bei RT. Nach erneutem Waschen (3x5 min) wurden die spezifischen Banden nach Zugabe der ECL-Lösung im Entwickler analysiert.

2.2.3.6. Silberfärbung

Für die Silberfärbung von Proteinen in einem Polyacrylamidgel wurde das Gel zweimal für 3 h in Fixierlösung (50 % Ethanol, 12 % Essigsäure, 0,05 % Formaldehyd) fixiert. Anschließend wurde es dreimal in Ethanol (20 %) für jeweils 7 min gewaschen. Zur Quervernetzung der Proteine wurde das Gel für 2 min in Natriumthiosulfat (0,02 %) inkubiert. Danach wurde das Gel zweimal mit Wasser für jeweils 1 min gewaschen. Die Silberfärbung erfolgte in 4 °C kalter Silbernitratlösung (0,2 %) mit 0,076 % Formaldehyd für 20 min. Das Gel wurde anschließend zweimal mit Wasser gewaschen bevor es durch Inkubation über 3 mal 20 Sekunden entwickelt wurde (6 % Natriumcarbonat, 0,0004 % Natriumthiosulfat, 0,05 % Formaldehyd). Sobald die Banden sichtbar waren, wurde die Entwicklung durch Inkubation in 12 % Essigsäure gestoppt. Anschließend wurde das Gel kurz mit Wasser abgespült und eingescannt.

2.2.3.7. Koimmunopräzipitation

Für eine Koimmunopräzipitation wurden 3x10⁶ Zellen pro 10 cm Schale ausplattiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 5 µg DNA transfiziert und 24 - 48 h später in 1,4 ml RIPA-Puffer lysiert. Nach Pelletieren der Zelltrümmer wurde der Überstand mit einem spezifischen Antikörper im Verhältnis 1:500 vermischt. Danach erfolgte eine Inkubation bei 4 °C im Überkopf-Rotationsmischer über Nacht. Am nächsten Tag wurden 50 µl Protein-A- oder G-Sepharose pro Probe zugegeben und erneut für 2 h bei 4 °C geschüttelt. Es folgten drei Waschschritte mit Puffer B, zwei mit Puffer C und einer mit Puffer D, wobei die Sepharose nach jedem Waschschritt jeweils 20 sec bei 13000 g abzentrifugiert und der Überstand verworfen wurde. Nach dem letzten Waschschritt wurde der Puffer vollständig entfernt und die Sepharose in 80 µl 4x Probenpuffer aufgenommen und bei 95 °C für 5 min aufgekocht. Die Sepharose wurde wiederum abzentrifugiert und mit dem Überstand ein SDS-Polyacrylamidgel beladen. Anschließend erfolgte ein Western Blot gegen das kopräzipitierte Protein.

2.2.3.8. Immunfluoreszenz

Um die intrazelluläre Lokalisation bestimmter Proteine untersuchen zu können wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Am ersten Tag wurde ein steriles Ø15 mm Glasplättchen pro Kavität einer 12-Loch-Platte ausgelegt und 1,5x10⁵ Zellen darauf ausplattiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 0,75 µg DNA transfiziert und 24 - 48 h später zweimal mit je 1 ml PBS gewaschen und anschließend mit einer PFA-Lösung (4 %) (20 min, RT) fixiert. Es folgte das Permeabilisieren mit 1 ml 0,3 % TritonX-100/PBS pro Loch für 10 min bei RT. Nach einem Waschschritt mit 1 ml PBS wurde mit 1 ml 0,2 % Gelatine/PBS für mindestens 10 min bei RT geblockt und danach zweimal mit je 1 ml PBS gewaschen. Die Verdünnung des Primärantikörpers wurde in Blockierungspuffer hergestellt. Bei einer Doppelfärbung mit Primärantikörpern aus unterschiedlichen Spezies, konnte die Inkubation dieser Primärantikörper gleichzeitig erfolgen. Für die Inkubation wurde zunächst eine Nassbettkammer vorbereitet. Dazu wurde ein Einmalpapierhandtuch mit Wasser getränkt und in einer 15 cm Schale ausgestrichen. Darüber wurde eine Lage Parafilm ausgebreitet und darauf 50 µl der Primärantikörperverdünnung gegeben. Die Glasplättchen mit den fixierten Zellen wurden mit der Zellschicht nach unten auf den Tropfen der AK-Verdünnung gelegt und 2 h bei RT inkubiert. Danach wurde das Deckglas dreimal mit 1 ml PBS gewaschen in 50 und μl Sekundärantikörperverdünnung für 1 h im Dunkeln nach dem gleichen Prinzip inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit 1 ml PBS gewaschen und dann eine DAPI-Färbung (0.25 µg/ml in PBS) durchgeführt, indem die Zellen für 10 min mit 1 ml DAPI-Verdünnung überschichtet wurden. Anschließend der folgten drei Waschschritte mit je 1 ml PBS und vier Waschschritte mit H₂O. Danach wurden die Glasplättchen vorsichtig mit einem Tropfen "Mounting medium" auf einem Objektträger befestigt (Zellen nach unten). Nach dem Aushärten über Nacht konnten die Präparate mikroskopisch analysiert werden.

3. Ergebnisse

3.1. Untersuchung der Modulation des PERK-Signalwegs durch MCMV

Aufgrund der massiven Proteinsynthese bei einer lytischen MCMV-Infektion wurde in dieser Arbeit untersucht, ob MCMV eine ER-Stressantwort induziert. Dazu wurde zunächst der Signalweg des ER-Stress-Sensors PERK näher erforscht. Eine PERK-Aktivierung erfolgt nach Induktion von ER-Stress, wenn ungefaltete Proteine im ER akkumulieren, was zu einer Phosphorylierung des elF2α führt und konsekutiv einen Translationsstopp induziert. Dies ermöglicht der Zelle einer Überladung des ER mit ungefalteten Proteinen entgegenzuwirken. Im Falle von anhaltendem ER-Stress kann die Zelle durch die Expression von CHOP, welche durch eine Aktivierung von ATF4 induziert wird, die Apoptose einleiten. Als Maß für die Aktivierung von PERK wurde zunächst die Phosphorylierung von eIF2a untersucht. Da eIF2a auch durch die Kinase PKR phosphoryliert werden kann, wurden hierfür PKR-knock-out-Zellen verwendet, um auszuschließen, dass eine Phosphorylierung über diesen Signalweg stattfindet. Abbildung 6 zeigt exemplarisch den kinetischen Verlauf der eIF2a-Phosphorylierung während der MCMV Infektion. Als Negativkontrolle dienten nicht infizierte, unbehandelte Zellen, als Positivkontrolle wurde in den Zellen ER-Stress durch die Behandlung mit Thapsigargin (Tg) induziert. Tg führt zu einer Kalzium-Entleerung des ER, was einen Funktionsverlust von Kalzium-abhängigen Chaperonen und somit eine Akkumulation von ungefalteten Proteinen im ER nach sich zieht [34]. Die Detektion von IE1 diente als Infektionskontrolle. Der Versuchszeitraum erstreckte sich über 48 h.

Wie erwartet, konnte in Tg-behandelten Zellen ein signifikanter Anstieg der eIF2 α -Phosphorylierung im Vergleich zu scheinbehandelten Zellen detektiert werden. Dagegen zeigten MCMV-infizierte Zellen keine signifikant erhöhte eIF2 α -Phosphorylierung. Der Nachweis von gesamt eIF2 α diente als Ladekontrolle. IE1 konnte in allen infizierten Zellen nachgewiesen werden, was eine erfolgreiche Infektion belegt.



Abbildung 6: MCMV induziert keine Phosphorylierung von eIF2α. PKR^{-/-}-Zellen wurden mit MCMV (MOI 5) infiziert und nach den angegebenen Zeitpunkten mit RIPA-Puffer lysiert. Für die Positivkontrolle wurden die Zellen für eine Stunde mit 1 μM Thapsigargin behandelt. Als Infektionskontrolle diente IE1. Die Proteinlysate wurden im Western Blot unter Verwendung spezifischer Antikörper analysiert.

Um zu untersuchen, ob MCMV die Phosphorylierung von eIF2α aktiv inhibiert, wurde zusätzlich zur Infektion exogen ER-Stress durch Tg induziert. Der Versuchszeitraum betrug wiederum 48 h. Als Kontrollen wurden wie zuvor unbehandelte, nicht infizierte Zellen (Negativkontrolle) und Tg-behandelte nicht infizierte Zellen (Positivkontrolle) verwendet. Als Ladekontrolle diente wieder der Nachweis von gesamt eIF2α und als Infektionskontrolle der Nachweis von IE1.

Abbildung 7 zeigt, dass eine Tg-Stimulation zu einer Erhöhung der eIF2α-Phosphorylierung im Vergleich zu mock-Zellen führte. In der Infektion konnte bestätigt werden, dass MCMV keine signifikante eIF2α-Phosphorylierung induziert. Allerdings war MCMV nicht in der Lage, bei zusätzlicher exogener Tg-Stimulation, die Phosphorylierung von eIF2α zu verhindern.



Abbildung 7: MCMV kann die Phosphorylierung von elF2α nicht verhindern, wenn exogen ER-Stress durch Tg induziert wird. PKR^{-/-}-Zellen wurden mit MCMV (MOI 5) infiziert und zusätzlich stimuliert. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen mit RIPA-Puffer lysiert. Für die Positivkontrolle wurden die Zellen für eine Stunde mit 1 μM Thapsigargin behandelt. Als Infektionskontrolle diente IE1. Die Proteinlysate wurden im Western Blot unter Verwendung spezifischer Antikörper analysiert.

Als nächstes wurde die Expression eines weiteren Proteins dieses Signalwegs analysiert. Durch Phosphorylierung von eIF2α wird bei anhaltendem ER-Stress eine ATF4-vermittelte CHOP-Expression induziert. CHOP ist ein proapoptotischer Transkriptionsfaktor, der Apoptose durch Runterregulation von Bcl-2 einleitet. Um auszuschließen, dass MCMV eine CHOP-Expression auf anderem Wege induziert, wurde diese mittels Western Blot untersucht. Als Negativkontrolle dienten nicht infizierte, unbehandelte Zellen (mock). Als Positivkontrolle wurde in den Zellen ER-Stress durch die Behandlung mit Tunicamycin (Tm) induziert. Tm verhindert die N-Glykosylierung von translatierten Proteinen und führt somit zu einer Akkumulation fehlgefalteter bzw. ungefalteter Proteine im ER [151]. Die Detektion von IE1 diente als Infektionskontrolle und der Versuchszeitraum erstreckte sich über 48 h.

Es zeigte sich, dass die Tm-Stimulation in einer Erhöhung der CHOP-Expression in nicht infizierten Zellen resultierte. Eine MCMV-Infektion induzierte jedoch keine gesteigerte CHOP-Expression im Vergleich zu nicht infizierten unbehandelten Zellen (Abbildung 8). Die Detektion von IE1 bewies die Infektion der Zellen mit MCMV und die von β -Aktin, dass gleiche Mengen an Protein aufgetragen wurden.



Abbildung 8: MCMV induziert keine CHOP-Expression. PKR^{-/-}-Zellen wurden mit MCMV (MOI 5) infiziert und nach den angegebenen Zeitpunkten mit RIPA-Puffer lysiert. Als Positivkontrolle diente mit Tm stimulierte Fibroblasten (2 µM Tm für 4 h). Die Proteinlysate wurden im Western Blot unter Verwendung spezifischer Antikörper analysiert. Die Detektion von IE1 diente als Infektionskontrolle und Aktin als Ladekontrolle.

Um auch hier eine aktive Inhibition der CHOP-Expression auszuschließen wurden die Zellen in einem weiteren Versuch zusätzlich zur Infektion mit Tm stimuliert. Der Versuchszeitraum betrug wiederum 48 h. Als Kontrollen wurden wie zuvor unbehandelte, nicht infizierte Zellen (Negativkontrolle) und Tm-behandelte, nicht infizierte Zellen (Positivkontrolle) verwendet. Als Infektionskontrolle wurde wieder IE1 nachgewiesen. Der Nachweis von β -Aktin diente als Ladekontrolle.

Abbildung 9 zeigt, dass eine exogene Stimulation mit Tm in einer Induktion der CHOP-Expression im Vergleich zu unbehandelten Zellen resultierte. Außerdem konnte demonstriert werden, dass MCMV diese exogene ER-Stress Induktion nicht supprimieren kann.



Abbildung 9: MCMV kann die CHOP-Expression bei exogener ER-Stress Induktion durch Tm nicht verhindern. PKR^{-/-}-Zellen wurden mit MCMV (MOI 5) infiziert und zusätzlich stimuliert. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen mit RIPA-Puffer lysiert. Für die Positivkontrolle wurden die Zellen für 4 Stunden mit 2 μM Tunicamycin behandelt. Die Detektion von IE1 diente als Infektionskontrolle und Aktin als Ladekontrolle.

Zusammenfassend zeigen oben genannte Ergebnisse, dass eine MCMV-Infektion zu keiner Aktivierung des PERK-Signalwegs führt. Weder eine Phosphorylierung von eIF2α noch eine Induktion der CHOP-Expression konnte beobachtet werden. Des Weiteren konnte durch exogene Induktion von ER-Stress dargelegt werden, dass MCMV diesen Signalweg nicht aktiv hemmen kann.

3.2. Untersuchung der Modulation des ATF6-Signalwegs durch MCMV

Nachdem gezeigt worden ist, dass der PERK-Signalweg von MCMV nicht aktiviert wird, wurde der ER-Stress-Sensor ATF6 näher analysiert. Dieses Transmembranprotein ist ebenfalls in der ER-Membran lokalisiert und wird durch die luminale Bindung des Chaperons BiP in einem inaktiven Zustand gehalten. Durch Induktion von ER-Stress transloziert ATF6 in den Golgi-Apparat, wo es durch S1und S2-Proteasen in seine aktive Form gespalten wird. Der so entstandene Transkriptionsfaktor, wandert in den Kern und induziert die Expression von UPRinduzierbaren Genen wie ER-Chaperonen (z. B. BiP) und XBP-1.

Ob MCMV eine Aktivierung von ATF6 auslöst, wurde zunächst durch den Nachweis der aktiven Form des Transkriptionsfaktors mittels Western Blots untersucht. Dazu wurden 10.1-Fibroblasten mit einem retroviralen Vektor für Flag-markiertes ATF6 transduziert und nach Selektion mit MCMV infiziert. Der Grund für die FlagMarkierung war, dass zu Beginn dieser Arbeit kaum kommerziell erwerbliche Antikörper gegen ATF6 existierten und deshalb endogenes ATF6 bzw. der aktive Transkriptionsfaktor schwer nachzuweisen war. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit Tg stimuliert und somit ER-Stress induziert. Die Probenentnahme erfolgte über einen Zeitraum von 48 h.

Abbildung 10 zeigt, dass es nach Stimulation mit Tg in nicht infizierten Zellen zu einer Aktivierung von ATF6 kommt. Auch die Infektion mit MCMV induziert eine Spaltung des ATF6, wenn auch in etwas abgeschwächter Form. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass es in den späten Phasen der Infektion zu einer verminderten Expression des Proteins kommt. Die Detektion von IE1 belegt, dass die Zellen infiziert wurden und die Detektion von β -Aktin, dass gleiche Mengen an Protein geladen wurden.



Abbildung 10: Aktivierung von ATF6 während der Infektion mit MCMV. 10.1-Fibroblasten wurden mit Flagmarkiertem ATF6 transduziert und nach Selektion mit MCMV (MOI 5) infiziert. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen mit RIPA-Puffer lysiert. Für die Positivkontrolle wurden die Zellen für eine Stunde mit 5 µM Thapsigargin behandelt. Die Detektion von IE1 diente als Infektionskontrolle und die von Aktin als Ladekontrolle.

ATF6 induziert die Transkription einiger Chaperon-Gene unter anderem die des Hauptregulatorproteins der UPR BiP. Um zu klären. ob die aezeiate ATF6-Aktivierung auch zu einer erhöhten Expression des Zielgens BiP führt, wurde als nächstes die Expression von BiP näher untersucht. 10.1-Fibroblasten wurden mit MCMV infiziert und über einen Zeitraum von 48 h Proteinlysate hergestellt. Um ER-Stress zu induzieren und somit eine Expressionssteigerung von BiP auszulösen, wurden die Zellen mit Tg stimuliert.

Wie erwartet zeigte sich, dass die Tg-Stimulation zu gesteigerten BiP-Mengen in nicht infizierten Zellen im Vergleicht zu unbehandelten Zellen führt. Auch eine MCMV-Infektion induziert die BiP-Expression zu späten Zeitpunkten der Infektion (Abbildung 11). Die Detektion von IE1 beweist, dass die Zellen infiziert wurden, die Detektion von β -Aktin zeigt, dass gleiche Mengen an Protein geladen wurden.



Abbildung 11: Induktion von BiP während der MCMV Infektion. 10.1-Fibroblasten wurden mit MCMV (MOI 5) infiziert. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen mit RIPA-Puffer lysiert. Für die Positivkontrolle wurden die Zellen für acht Stunden mit 1 μ M Thapsigargin behandelt. Die Detektion von IE1 diente als Infektionskontrolle und die von Aktin als Ladekontrolle.

3.3. Untersuchung der Modulation des IRE1-Signalwegs durch MCMV

3.3.1. Spleißen der XBP-1-mRNA

Im Anschluss wurde der dritte Signalweg der UPR während der MCMV-Infektion analysiert. IRE1 ist ein TypI-Transmembranprotein bestehend aus einer luminalen-, einer Transmembran-, einer Serin/Threonin-Proteinkinase- und einer Endoribonuklease-Domäne. Bei Induktion von ER-Stress wird die zytoplasmatische Endoribonuklease aktiv, die im Zytoplasma ein Intron aus der XBP-1-mRNA entfernt. Die so entstandene gespleißte XBP-1-Variante wandert in den Kern und bindet an den Promotor des ERSE. Um zu testen, ob eine MCMV-Infektion per se diesen Signalweg aktiviert, wurde als Maß der IRE1-Aktivierung in dieser Arbeit das Spleißen von XBP-1 untersucht.

Um das Spleißen von XBP-1 zu induzieren, wurden 10.1-Fibroblasten mit steigenden Konzentrationen an Tm behandelt. Zum Vergleich wurden unbehandelte Zellen eingesetzt. Des Weiteren wurden Zellen mit MCMV über einen Zeitraum von 48 h infiziert. Die RNA wurde isoliert, revers transkribiert und ein das Intron enthaltende XBP-1 Fragment mittels PCR amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mit Pstl verdaut und im Agarosegel analysiert. Da das gespleißte PCR-Produkt keine Pstl-Schnittstelle mehr enthält (diese befindet sich im Intron), läuft es im Agarosegel langsamer als das ungespleißte aber verdaute Produkt. Als Ladekontrolle wurde c-myc amplifiziert und aufgetragen. Zur Quantifizierung des Ergebnisses wurde die umgeschriebene cDNA des Weiteren mittels quantitativer Real-time PCR untersucht. Dabei wurden die Expressionslevel von XBP-1 mit Hilfe des *houskeeping*-Gens GAPDH und auf die mock-Werte normalisiert.

Abbildung 12 zeigt, dass es zu einem verstärkten Spleißen der XBP-1-mRNA bei Tm-stimulierten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen kommt, während das ungespleißte XBP-1 abnimmt. Auch zu frühen Zeitpunkten der MCMV-Infektion wurde ein leichter Anstieg des XBP-1-Spleißens festgestellt. Jedoch nimmt dieses im Laufe der Infektion wieder ab. 8 h nach Infektion sinkt das Verhältnis zwischen gespleißtem und ungespleißtem XBP-1 wieder etwa auf das Niveau von nicht infizierten Zellen ab wie die Ergebnisse der Real-time PCR darstellen (Abbildung 12B).



Abbildung 12: MCMV induziert XBP-1-Spleißen zu frühen Zeitpunkten der Infektion. A) 10.1-Fibroblasten wurden mit MCMV (MOI 5) infiziert oder mit 50 nM bzw. 100 nM Tunicamycin für 4 h behandelt. Die RNA wurde isoliert, revers transkribiert und ein das Intron enthaltende XBP-1 Fragment mittels PCR amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mit Pstl verdaut und im Agarosegel analysiert. Als Ladekontrolle wurde c-myc amplifiziert. B) 10.1-Fibroblasten wurden mit MCMV (MOI 5) infiziert oder mit Tm stimuliert. Die RNA wurde isoliert, revers transkribiert und die gespleißte und ungespleißte Form des XBP-1 mittels quantitativer Real-time PCR untersucht. Sämtliche Proben wurden im Duplikat bestimmt.

3.3.2. Aktive Suppression des XBP-1-Spleißens durch MCMV

Nachdem gezeigt wurde, dass MCMV zu späten Zeitpunkten der Infektion kein XBP-1-Spleißen induziert, wurde überprüft, ob das Spleißen aktiv durch das Virus supprimiert wird.

Dazu wurden NIH3T3-Fibroblasten Schein- oder MCMV infiziert und zusätzlich mit Tm stimuliert. Die RNA wurde isoliert, revers transkribiert und mittels PCR ein XBP-1 Fragment, welches das Intron enthält, amplifiziert. Nach Verdau des PCR-Produkts mit Pstl wurde es im Agarosegel analysiert. Als Ladekontrolle diente wiederum c-myc. Zur Quantifizierung des Ergebnisses wurde wie zuvor die umgeschriebene cDNA mittels quantitativer Real-time PCR untersucht und auf GAPDH normalisiert.

Wie bereits zuvor beschrieben löst die Stimulation mit Tm ein XBP-1-Spleißen in den behandelten Zellen aus. Abbildung 13 zeigt außerdem, dass es 24 h nach der MCMV-Infektion zu einem verminderten Spleißen der XBP-1-mRNA im Vergleich zu nicht infizierten Zellen kommt. Dieser Effekt ist 48 h nach der Infektion sogar noch stärker ausgeprägt. Somit konnte eine aktive Suppression des XBP-1-Spleißens durch MCMV demonstriert werden.



Abbildung 13: MCMV supprimiert das XBP-1-Spleißen selbst bei exogener ER-Stress Induktion. A) NIH3T3-Fibroblasten wurden mock oder MCMV (MOI 5) infiziert und mit 100 nM bzw. 500 nM Tunicamycin für 4 h behandelt. Die RNA wurde isoliert, revers transkribiert und ein das Intron enthaltende XBP-1 Fragment mittels PCR amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mit Pstl verdaut und im Agarosegel analysiert. Als Ladekontrolle wurde c-myc amplifiziert. B) NIH3T3-Fibroblasten wurden mit MCMV (MOI 5) infiziert und mit Tm stimuliert. Die RNA wurde isoliert, revers transkribiert und ein dugespleißte Form des XBP-1 mittels quantitativer Real-time PCR untersucht. Sämtliche Proben wurden im Duplikat bestimmt.

Um das Ergebnis ebenfalls auf Proteinebene zu bestätigen, wurden Kernlysate hergestellt und im Western Blot XBP-1 mit spezifischen Antikörpern detektiert. Als Positivkontrolle dienten wiederum Lysate von nicht infizierten und mit Tm stimulierten Zellen.

Auch hier zeigte sich eine verminderte XBP-1-Menge im Vergleich zu nicht infizierten Zellen, die 48 h nach Infektion noch stärker reduziert war als nach 24 h (Abbildung 14). Als Ladekontrolle wurde das zelluläre Heterochromatin Protein 1 (HP1α) detektiert.



Abbildung 14: MCMV supprimiert das XBP-1-Spleißen selbst bei exogener ER-Stress Induktion. Mock und MCMV (MOI 5) infizierte NIH3T3-Zellen wurden mit DMSO oder Tunicamycin für 4 h stimuliert und danach Kernextrakte hergestellt. Die Lysate wurden im Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen XBP-1 bzw. HP1α analysiert.

Zusammenfassend lässt sich über die Interaktion von MCMV mit dem IRE1-Signalweg folgendes festhalten: Es konnte bestätigt werden, dass MCMV zu frühen Zeitpunkten der Infektion zwar in geringem Umfang XBP-1-Spleißen induziert, jedoch im weiteren Verlauf der Infektion dies aktiv hemmen kann. Selbst bei einer exogenen Induktion von ER-Stress durch Tm war es MCMV möglich das IRE1-vermittelte XBP-1-Spleißen zu verhindern.

3.3.3. Identifikation potentieller viraler Interaktionspartner

Nachdem festgestellt wurde, dass das XBP-1-Spleißen in MCMV infizierten Zellen supprimiert wird, wurde nach viralen Proteinen gesucht, die das Spleißen der XBP-1-mRNA verhindern können. Da das Spleißen durch die Endoribonuklease-Domäne von IRE1 prozessiert wird, wurden stabile Zellen generiert, die IRE1 mit einer HA-Markierung und einer TEV-(Tobacco Etch Virus)-Protease-Schnittstelle exprimieren. Diese Zellen wurden mock oder MCMV infiziert und anschließend die Proteinlysate über anti-HA-Affinitätssäulen aufgereinigt. Dabei wird das IRE1 mit der HA-Markierung von den HA-Antikörpern der Säule gebunden und kann nach Verdau mit TEV-Protease und der somit induzierten Abspaltung der HA-Markierung spezifisch von der Säule eluiert werden. Die an das IRE1 gebundenen Interaktionspartner werden auf diese Weise ebenfalls eluiert. Die Eluate wurden anschließend in einem Proteingel aufgetrennt und die Proteine in einer Silberfärbung sichtbar gemacht.

Es zeigten sich einige zusätzliche Banden zwischen MCMV und mock infizierten Proben, die potentielle Interaktionspartner darstellen (Abbildung 15). Um diese identifizieren zu können, wurden die Banden von unseren Kooperationspartnern Albert Sickmann und René Zahedi im ISAS (Leibniz-Institut für Analytische Wissenschaften, Dortmund) massenspektrometrisch untersucht. Die Analyse

erbrachte eine Vielzahl von zellulären und viralen Proteinen, allerdings wurden nur die viralen Proteine weiter analysiert, da nur die Regulation von IRE1 durch MCMV von Interesse war. Eines der gefundenen potentiellen Proteine war das Kapsid-Protein M85, was jedoch in anschließenden Experimenten nicht als Interaktionspartner bestätigt werden konnte (Daten nicht abgebildet). Ein weiteres identifiziertes Protein war das virale Protein M50, das im Folgenden weiter untersucht wurde.



Abbildung 15: Silbergel der α-HA-aufgereinigten Lysatproben. Stabil exprimierende IRE1-TEV-HA-Zellen wurden mit einer MOI von 1 mit MCMV-GFP oder mock infiziert. 48 h später wurden die Zellen mit RIPA-Puffer lysiert. Der Überstand wurde auf equilibrierte anti-HA-3F10-Affinitätssäulen geladen. Die Säulen wurden gewaschen und anschließend das IRE1-TEV-HA und assoziierte Proteine durch Verdau mit AcTEV-Protease spezifisch aus der Säule eluiert. Die Eluate wurden mittels StrataClean Resin-Beads aufkonzentriert und anschließend im Proteingel separiert. Das Gel wurde silbergefärbt und Banden, die spezifisch für die IRE1-TEV-HA Probe waren und nicht in der Kontrollprobe auftauchten, wurden ausgeschnitten. Die massenspektrometrische Analyse (inklusive Probenauftrennung, Silberfärbung und Ausschneiden der Banden) wurde im Labor von Albert Sickmann (ISAS, Dortmund) durchgeführt.

3.3.4. Bestätigung der Interaktion von M50 und IRE1

3.3.4.1. Untersuchung der M50-IRE1-Lokalisation mittels Immunfluoreszenz

M50 ist ein 35 kDa großes Transmembranprotein vom Typ II. Es spielt während der Infektion beim sogenannten Kern-Ausschleusungs-Komplex (Nuclear Egresscomplex, NEC) eine wichtige Rolle. Es rekrutiert die zelluläre Protein Kinase C (PKC) an die Kernmembran, wo diese Lamin phosphoryliert. Lamin bildet den Hauptbestandteil der Kernlamina und führt in phosphorylierter Form zu einer lokale Auflösung der Lamina. Dadurch knospen die Kapside zunächst durch die innere KM in den Zwischenraum und gelangen anschließend durch Verschmelzung mit der äußeren KM ins Zytosol. Nachdem die Kapside zum Assemblierungskomplex transportiert wurden, wo der Zusammenbau der Virionen erfolgt, werden sie durch Verschmelzung mit der Zellmembran durch Exozytose entlassen.

Zunächst wurde die Lokalisation von IRE1 und M50 in der Immunfluoreszenz untersucht. Stabil exprimierende IRE1-TEV-HA-Fibroblasten wurden mit einem Expressionsplasmid für Flag-markiertes M50 bzw. UL56 von HSV-1 (Kontrolle) transfiziert und 24 h nach Transfektion fixiert. Alternativ wurden stabil IRE1-3xmycexprimierende Fibroblasten mit MCMV-M50-HA infiziert und nach den unten angegebenen Zeitpunkten fixiert. IRE1 wurde mit anti-HA bzw. anti-myc und M50 mit anti-Flag bzw. anti-HA gefärbt. Als sekundäre Antikörper wurden AlexaFluor488bzw. AlexaFluor555-gekoppelte Antikörper eingesetzt.

Die konfokale Laserscanning Mikroskopie ergab eine Verteilung von IRE1 und M50 im ER bei Transfektionsexperimenten. Abbildung 16 (oben) zeigt, dass beide Proteine kolokalisieren. Eine Kolokalisation mit dem Kontrollprotein UL56 konnte nicht nachgewiesen werden. In der Infektion konnte IRE1 im ER und M50 sowohl im ER als auch in der Kernmembran nachgewiesen werden. Wobei 16 h nach der Infektion (hpi) die Lokalisation von M50 sich mehr auf das ER beschränkte, während sie sich 20 hpi mehr in Richtung der inneren Kernmembran verschob.



Abbildung 16: Kolokalisation von M50 und IRE1. Stabil exprimierende IRE1-TEV-HA-Fibroblasten wurden mit einem Expressionsplasmid für Flag-markiertes M50 bzw. UL56 transfiziert. 24h nach Transfektion wurden die Zellen fixiert und IRE1 mit Antikörpern anti-HA und M50 mit anti-Flag gefärbt. Des Weiteren wurden IRE1-3xmycexprimierende 10.1-Zellen mit MCMV M50-HA infiziert, nach angegebenen Zeitpunkten fixiert und mit Antikörpern anti-myc und anti-HA gefärbt. Als sekundäre Antikörper wurden AlexaFluor488 bzw. AlexaFluor555 eingesetzt. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI. Die Analyse erfolgte mittels konfokaler Laserscanning Mikroskopie. Als Negativkontrolle wurde das UL56 von HSV-1 nachgewiesen.

3.3.4.2. Untersuchung der M50-IRE1-Interaktion mittels Co-Immunopräzipitation

Nachdem die Immunfluoreszenz-Versuche einen Hinweis auf eine Interaktion von IRE1 und M50 aufgrund der Kolokalisation ergaben, wurde als nächstes überprüft, ob eine Co-Immunopräzipitation die Interaktion bestätigt.

Dazu wurde in 293A-Zellen HA-markiertes IRE1 und Flag-markiertes M50 co-exprimiert. Als Kontrolle dienten Flag-markiertes Calnexin bzw. m144. 24 h nach Transfektion wurden Proteinlysate hergestellt und IRE1 mittels anti-HA-Antikörpers

präzipitiert. Co-präzipitierte Proteine wurden mit Hilfe eines anti-Flag-Antikörpers nachgewiesen.

Abbildung 17B stellt die Expressionskontrolle der transfizierten Proteine dar. Abbildung 17A fasst das Ergebnis der Co-IP zusammen. M50 konnte nur mit IRE1 co-präzipitiert werden, während bei den Kontrollen keine Bande nachgewiesen werden konnte.



Abbildung 17: Co-Immunopräzipitation von IRE1 und M50. 293A-Zellen wurden mit einem Expressionsplasmid für Flag-markiertes Calnexin (Canx), m144 oder M50 und einem Expressionsplasmid für HA-markiertes IRE1 co-transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit RIPA-Puffer lysiert und IRE1 mittels anti-HA-Antikörpers präzipitiert. Co-präzipitierte Proteine wurden mit einem anti-Flag-Antikörper im Western Blot nachgewiesen. A) Co-IP B) Expressionskontrolle

Um die Interaktion von IRE1 und M50 nochmals zu bestätigen wurde das Experiment modifiziert. Jetzt wurden die Flag-markierten Proteine (m144 und M50) präzipitiert und das co-präzipitierte IRE1 mittels anti-HA-Antikörper im Western Blot nachgewiesen.

Abbildung 18B zeigt die Expressionskontrolle der transfizierten Proteine während Abbildung 18A das Ergebnis der Co-IP darstellt. Zwar wurden die flag-markierten Proteine erfolgreich präzipitiert, aber nur in Anwesenheit von M50 konnte IRE1 co-präzipitiert werden.



Abbildung 18: Co-Immunopräzipitation von M50 und IRE1. 293-Zellen wurden mit einem Expressionsplasmid für Flag-markiertes m144 oder M50 und einem Expressionsplasmid für HA-markiertes IRE1 co-transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit RIPA-Puffer lysiert und M50 mittels anti-Flag-Antikörpers präzipitiert. Co-präzipitierte Proteine wurden mit einem anti-HA-Antikörper im Western Blot nachgewiesen. A) Co-IP B) Expressionskontrolle

Im Anschluss wurde die Interaktion zwischen IRE1 und M50 auch während der MCMV-Infektion untersucht. Dazu wurden stabil exprimierende IRE1-3x-myc Zellen mit MCMV-M50-HA infiziert und nach 17 h bzw. 31 h Proteinlysate hergestellt. IRE1 wurde mittels anti-myc-Antikörpers präzipitiert und co-präzipitierte Proteine mit Hilfe eines anti-HA-Antikörpers nachgewiesen. Auch in diesem Fall konnte eine Interaktion von IRE1 mit M50 bestätigt werden (Abbildung 19).



Abbildung 19: Co-Immunopräzipitation von IRE1 und M50 während der MCMV-Infektion. Stabil exprimierende IRE1-3x-myc Zellen wurden mit MCMV (MOI 3) infiziert und nach angegebenen Zeitpunkten mit RIPA-Puffer lysiert. IRE1 wurde mittels anti-myc-Antikörpers präzipitiert und co-präzipitierte Proteine mit einem anti-HA-Antikörper im Western Blot nachgewiesen. A) Co-IP B) Expressionskontrolle

3.3.5. Untersuchung der IRE1-Expression

3.3.5.1. Analyse des IRE1-Proteinlevels bei Transfektion mit M50

Nachdem eine Interaktion von IRE1 und M50 nachgewiesen werden konnte, wurden die Konsequenzen dieser Interaktion untersucht. Dazu wurde zunächst der Proteinlevel von IRE1 näher analysiert.

NIH3T3-Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen eines Expressionsplasmids für Flag-markiertes virales m144 oder M50 und einem Expressionsplasmid für HA-markiertes IRE1 co-transfiziert. Nach Lyse und Auftrennung im SDS-Gel wurden die Proteine im Western Blot detektiert. Als Ladekontrolle diente β-Aktin.

Abbildung 20 zeigt, dass bei Transfektion mit m144 die Proteinmenge von phosphoryliertem und gesamt IRE1 sich nicht signifikant ändert. Allerdings führt die Co-Transfektion von M50 zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion sowohl von phosphoryliertem als auch IRE1 insgesamt.



Abbildung 20: Reduktion des IRE1-Levels durch Co-Transfektion eines M50-Expressionsplasmids. NIH3T3-Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen eines Expressionsplasmids für Flag-markiertes virales m144 oder M50 und einem Expressionsplasmid für HA-markiertes IRE1 co-transfiziert. Nach Lyse und Auftrennung im SDS-Gel wurden die Proteine im Western Blot detektiert. Als Ladekontrolle diente Aktin. + = 0,5 μ g, ++ = 1 μ g und +++ = 2 μ g DNA

3.3.5.2. Analyse einer dominant-negativen (DN) IRE1-Mutante

Das Spleißen der XBP-1-mRNA wird nur von aktiviertem IRE1 durchgeführt. Um herauszufinden, ob M50 nur die Menge des aktiven (phosphorylierten) dimerisierten oder auch die Menge des inaktiven monomeren IRE1 reduziert, wurde eine dominant-negative (DN) Mutante generiert, die zwar selbst noch phosphoryliert werden kann, aber deren Kinase-Domäne defekt ist. Erreicht wurde dies durch einen Aminosäureaustausch von Lysin zu Alanin an Position 599. Im Anschluss wurde

diese Mutante zusammen mit M50 in NIH3T3-Zellen co-exprimiert und die IRE1-Menge analysiert. Als Kontrolle diente IRE1 wt.

Es zeigte sich zum einen, dass nur IRE1 wt nach Überexpression phosphoryliert wurde. In den Zellen, die mit der DN-Mutante transfiziert wurden, konnte kein phosphoryliertes IRE1 detektiert werden. Zum anderen verdeutlicht Abbildung 21, dass nicht nur die Menge des aktivierten, sondern auch die Menge des inaktivierten IRE1 durch M50 reduziert wird.



Abbildung 21: Reduktion der Menge von aktiviertem und inaktiviertem IRE1. Eine dominant-negative IRE1-Mutante, welche eine Mutation in der Kinase-Domäne von Lysin zu Alanin trägt, wodurch die Kinase-Aktivität inhibiert wird, wurde mit M50 in steigenden Konzentrationen in NIH3T3-Zellen co-exprimiert. Als Kontrolle wurde IRE1 wt und M50 co-exprimiert. Die Zellen wurden mit RIPA-Puffer lysiert und im SDS-Gel aufgetrennt. Die Detektion der Proteine erfolgte mit spezifischen Antikörpern.

3.3.5.3. Analyse der IRE1-Expression bei Infektion mit MCMV

Als nächstes wurde überprüft, ob die Reduktion der IRE1-Menge auch in infizierten Zellen stattfindet.

Aufgrund der geringen Expression von endogenem IRE1 und den damit verbundenen Schwierigkeiten des Nachweises im Western Blot wurden 10.1-Fibroblasten mit einem retroviralen Vektor, welcher für HA-markiertes IRE1 kodiert, transduziert. Nach erfolgter Selektion wurden die Zellen mit MCMV (MOI 3) infiziert. Es zeigte sich, dass auch bei infizierten Zellen die IRE1-Expression im Vergleich zu nicht infizierten Zellen reduziert war. Dabei ist festzuhalten, dass eine inverse Korrelation betreffend der IRE1- und M50-Menge vorlag. Je mehr M50 exprimiert wurde, desto weniger IRE1 konnte detektiert werden (Abbildung 22).



Abbildung 22: Reduktion des IRE1-Levels bei Infektion. IRE1-HA wurde in 10.1-Fibroblasten mittels retroviraler Transduktion stabil exprimiert. Nach Infektion mit MCMV (MOI 3) wurden Proteinlysate hergestellt und im SDS-Gel aufgetrennt. Die IRE1- und M50-Expression wurde im Western Blot detektiert. Als Ladekontrolle diente die Detektion von Aktin.

3.3.5.4. Analyse der IRE1-Transkriptmenge

Um der Frage nachzugehen, ob die Reduktion der IRE1-Expression aufgrund einer gestörten Transkription erfolgt, wurde die cDNA von infizierten Zellen in der quantitativen Real-time PCR analysiert.

10.1-Fibroblasten wurden hierzu mit MCMV infiziert und nach unten angegebenen Zeitpunkten die RNA isoliert. Nach erfolgter reverser Transkription wurde IRE1 amplifiziert und die Transkriptmenge quantitativ bestimmt.

Es war ein leichter Anstieg der IRE1-mRNA-Menge im Vergleich zu nicht infizierten Zellen zu beobachten (Abbildung 23).



Abbildung 23: Eine MCMV-Infektion führt zu einem geringen Anstieg des IRE1-mRNA-Menge. 10.1-Fibroblasten wurden mit MCMV (MOI 5) infiziert. Die RNA wurde isoliert, revers transkribiert und IRE1 mittels quantitativer Real-time PCR untersucht. Sämtliche Proben wurden im Duplikat bestimmt.

3.3.6. Konstruktion von M50-Verkürzungsmutanten und deren funktionelle Charakterisierung

Nachdem bestätigt werden dass M50 für Reduktion konnte, eine der IRE1-Proteinmenge sorgt, wurde als nächstes der dafür verantwortliche Bereich des M50 identifiziert. Dafür wurden verschiedene M50-Verkürzungsmutanten konstruiert, die entweder N-Terminal oder C-Terminal verkürzt wurden. Des Weiteren wurde eine Flag-markierte Mutante kloniert, bei der die Aminosäuren 179 bis 276 entfernt wurden. Der Grund für die Flag-Markierung dieser Mutante lag darin, dass die Detektion der Expression des Proteins nur dadurch möglich war, dass in dem deletierten Bereich das Epitop des M50-Antikörpers lag. M50 enthält eine Transmembrandomäne mit der es in der nuklearen Membran verankert ist. Bei Wegfall dieser TM-Domäne würde M50 nicht mehr in der Membran verankert und die Funktion beeinträchtigt werden. Um auszuschließen, dass die Aminosäuresequenz der TM-Domäne für die Reduktion der IRE1-Menge verantwortlich ist, wurden Chimären erzeugt. Dabei wurde die TM-Domäne mit einer TM-Domäne des UL34 TM-Domäne M50-Homologs bzw. einer eines anderen Typ II-Transmembranproteins aus HSV-1, dem UL56, ersetzt.

Abbildung 24 stellt schematisch den Aufbau aller erzeugten Mutanten einschließlich des Wildtyp M50 dar.



Abbildung 24: Schematische Darstellung der konstruierten M50-Verkürzungsmutanten. P: Prolin-reiche Region, ab: Antikörper-Bindestelle, TM: Transmembrandomäne

Nachdem alle Konstrukte kloniert waren, wurden sie im Anschluss auf ihre Fähigkeit zur Reduktion der IRE1-Menge getestet. Dazu wurde in NIH3T3-Zellen IRE1 und je eine Verkürzungsmutante co-exprimiert und die Expression der Proteine im Western Blot untersucht.

Die Expression des M50-Homologs UL34 und des Transmembranproteins UL56 aus HSV-1 zeigten keinen Effekt auf die IRE1-Menge; ebenso wenig der Leervektor. M50 wt führte wie zuvor bereits gesehen zu einem Abbau von IRE1 genauso wie die ersten drei N-Terminalen M50-Verkürzungsmutanten. Allerdings war ab einer Deletion der ersten 142 aa die Funktion der M50-Mutanten eingeschränkt bzw. inhibiert. So zeigte die M50-Mutante (142-317aa) einen intermediären Phänotyp, die M50-Mutanten 171-317aa und 180-317aa dagegen waren nicht mehr in der Lage die IRE1-Menge zu reduzieren. Auch die Expression der M50-Mutante, deren TM-Domäne deletiert war, führte nicht mehr zu einem IRE1-Abbau. Wurde die TM-Domäne jedoch durch die eines anderen Transmembranproteins ersetzt, so wurde die Funktion wiederhergestellt und die IRE1-Menge reduziert (Abbildung 25).



Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass sich der für den IRE1-Abbau essentielle Bereich auf die Aminosäuren 101-171 einschränken lässt.

Abbildung 25: Untersuchung der Verkürzungsmutanten in Bezug auf ihre IRE1-Degradation. Die verschiedenen M50-Verkürzungmutanten wurden zusammen mit HA-markiertem IRE1 in NIH3T3-Zellen coexprimiert. Als Kontrollen dienten Leervektor, M50 wt, UL34 und UL56 aus HSV-1. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen mit RIPA-Puffer lysiert und die Lysate im SDS-Gel aufgetrennt. Die Detektion der Proteine erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen HA, Flag, M50 und Aktin.

3.3.6.1. Interaktion der M50-Verkürzungsmutanten mit IRE1

Es konnte demonstriert werden, dass ab einer N-terminalen Verkürzung von 142 aa nur noch eine eingeschränkte bzw. keine Reduktion der IRE1-Menge mehr möglich war. Um zu klären, ob durch den Wegfall dieses Bereiches auch die Interaktion mit IRE1 verloren geht, wurde eine Co-Immunopräzipitation durchgeführt.

Dazu wurde HA-markiertes IRE1 mit M50 wt oder den M50-Verkürzungsmutanten in 293A-Zellen co-exprimiert. 24 h nach Transfektion wurden Proteinlysate hergestellt

und IRE1 mittels anti-HA-Antikörper präzipitiert. Die co-präzipitierten Proteine wurden mit einem M50 spezifischen Antikörper nachgewiesen.

Abbildung 26A stellt die Expressionskontrolle der transfizierten Proteine dar. Sämtliche transfizierten Proteine wurden in gleicher Menge exprimiert. Abbildung 26B zeigt die Co-IP und bestätigt die Interaktion von IRE1 und M50 wt, wie in 3.3.4.2 bereits gezeigt. Außerdem wurde die M50-Mutante 101-317 aa co-präzipitiert, welche noch zu einer IRE1-Reduktion führte. Die Verkürzungsmutante M50 142-317 aa, welche einen intermediären Phänotyp aufwies, wurde mit IRE1 co-präzipitiert. Eine Interaktion zwischen den größeren N-terminalen M50-Verkürzungsmutanten und IRE1 konnte nicht bestätigt werden.



Abbildung 26: Interaktion von IRE1 mit den N-terminalen M50-Verkürzungsmutanten. HA-markiertes IRE1 wurde mit M50 wt oder den M50-Verkürzungsmutanten in 293-Zellen co-exprimiert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen mit RIPA-Puffer lysiert und IRE1 mittels anti-HA-Antikörper präzipitiert. Co-Präzipitierte Proteine wurden mit einem M50 spezifischen Antikörper nach Auftrennung im SDS-Gel im Western Blot detektiert. A) Co-IP B) Expressionskontrolle

3.3.7. Funktionelle Charakterisierung eines M50-Deletionsviruses

3.3.7.1. Spleißen der XBP-1-mRNA bei Infektion mit ΔM50

Bis jetzt konnte belegt werden, dass die **IRE1-Menge** sowohl in Transfektionsexperimenten als auch in Infektionsversuchen mit MCMV durch das virale Protein M50 reduziert wurde und dadurch ein XBP-1-Spleißen verhindert wird. Der logische nächste Schritt war deshalb die Untersuchung des IRE1-Signalwegs bei Infektion mit einem knock-out-Virus. M50 ist ein essentielles Gen, weshalb es nicht ohne Weiteres aus dem Virusgenom deletiert werden kann [152]. Auch eine Trans-Komplementation oder ein induzierbares System ist aufgrund der Zytotoxizität von M50 schwierig zu etablieren. Von einem Kooperationpartner (Dr. Zsolt Ruzsics, Max von Pettenkofer-Institut, LMU München) konnte dennoch ein solches Virus hergestellt werden. Durch ein Trans-Komplementationssystem, welches auf einer Gen-Stilllegung (gene silencing) durch einen Histon-Deactylase abhängigen Mechanismus und Reaktivierung bei Infektion mit MCMV basiert, konnte ein M50 Deletionsvirus angezüchtet werden. Dieses Virus kann zwar in komplementierenden Zellen replizieren, jedoch führt eine Infektion von M50 defizienten Zellen zwar zu einer Expression aller viralen Gene, allerdings wir durch das fehlende M50 ein Kapsid-Austritt aus dem Zellkern verhindert [148].

Zunächst wurde überprüft, ob die Suppression des XBP-1-Spleißens durch das ko-Virus aufgehoben wird. Dazu wurden 10.1-Zellen mit MCMV-Kontrolle oder MCMV-ΔM50 infiziert und zusätzlich mit Tunicamycin stimuliert. Von mock und MCMV infizierten Zellen wurde RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und in der quantitativen Real-time PCR das XBP-1-Spleißen untersucht.

Es zeigte sich, dass die mit Kontroll-Virus infizierten Zellen ein XBP-1-Spleißen wie bereits beschrieben aktiv supprimieren können. Dabei war 48 h nach der Infektion eine stärkere Suppression als nach 24 h feststellbar. Die Δ M50-Mutante jedoch war nicht mehr bzw. deutlich schlechter in der Lage das XBP-1 Spleißen zu inhibieren.





Abbildung 27: MCMV-Kontrolle supprimiert das XBP-1-Spleißen selbst bei exogener ER-Stress Induktion. Das M50 knock out Virus ist dazu nicht mehr in der Lage. 10.1-Fibroblasten wurden mock oder MCMV (MOI 5) infiziert und mit 500 nM Tunicamycin für 4 h behandelt. Die RNA wurde isoliert, revers transkribiert und die gespleißte und ungespleißte Form des XBP-1 mittels quantitativer Real-time PCR untersucht. Sämtliche Proben wurden im Duplikat bestimmt.

3.3.7.2. Analyse der IRE1-Expression bei Infektion mit ΔM50

Im Anschluss wurde die Expression von IRE1 während der Infektion mit dem M50-knock-out-Virus überprüft. Dazu wurden 10.1-Fibroblasten mit einem

retroviralen Vektor für HA-markiertes IRE1 transduziert und nach Selektion mit MCMV-Kontrolle oder MCMV- Δ M50 infiziert. Nach angegeben Zeitpunkten wurden Proteinlysate hergestellt und die Expression von IRE1 im Western Blot überprüft. Das Ergebnis der Infektionsexperimente ist in Abbildung 28 zusammengefasst. Wie zuvor bereits gesehen wird bei der Infektion mit MCMV-Kontrolle die IRE1-Menge durch M50 reduziert, wobei diese Reduktion 48 h nach Infektion deutlich stärker zu beobachten war. Die Infektion mit MCMV- Δ M50 führte im Vergleich dazu jedoch nicht zu einer Reduktion der IRE1-Menge. Als Infektionskontrolle wurde IE1 und als Ladekontrolle Aktin detektiert.



Abbildung 28: IRE1-Expression in MCMV-Kontrolle und MCMV-ΔM50 infizierten Zellen. 10.1-Fibroblasten wurden mit einem retroviralen Vektor für HA-markiertes IRE1 transduziert und nach Selektion mit MCMV-Kontrolle oder MCMV-ΔM50 infiziert. Nach angegeben Zeitpunkten wurden die Zellen mit RIPA-Puffer lysiert und die Expression der angegebenen Proteine im Western Blot überprüft. Als Infektionskontrolle wurde IE1 und als Ladekontrolle Aktin nachgewiesen.

3.3.8. Übertragung der Untersuchungen auf HCMV

Da die Funktion des M50 und auch die konstante Region des Proteins bei Herpesviren sehr stark konserviert ist, wurden im Anschluss die hier erlangten Erkenntnisse auf das humane CMV angewandt.

3.3.8.1. Aktive Suppression des XBP-1-Spleißens durch HCMV

Zunächst wurde überprüft, ob auch das XBP-1 Spleißen durch HCMV supprimiert wird. Dazu wurden MRC5-Zellen Schein- oder HCMV infiziert und zusätzlich mit Tm stimuliert. Die RNA wurde isoliert, revers transkribiert und mittels quantitativer Real-time PCR untersucht und auf GAPDH normalisiert.

Wie bereits zuvor beschrieben löst die Stimulation mit Tm ein XBP-1-Spleißen in den behandelten Zellen aus. Abbildung 29 stellt außerdem dar, dass es 24 h nach der

HCMV-Infektion zu einem verminderten Spleißen der XBP-1-mRNA im Vergleich zu nicht infizierten Zellen kommt. Dieser Effekt ist 72 h nach der Infektion sogar noch stärker ausgeprägt. Somit konnte eine aktive Suppression des XBP-1-Spleißens auch durch HCMV gezeigt werden.



Abbildung 29: HCMV supprimiert ebenfalls das XBP-1-Spleißen selbst bei exogener ER-Stress Induktion. MRC5-Zellen wurden mit HCMV (MOI 3) infiziert und mit Tm stimuliert. Die RNA wurde isoliert, revers transkribiert und die gespleißte und ungespleißte Form des XBP-1 mittels quantitativer Real-time PCR untersucht. Sämtliche Proben wurden im Duplikat bestimmt. Diese Abbildung wurde von Florian Hinte erstellt.

3.3.8.2. Untersuchung der UL50-IRE1-Interaktion mittels

Co-Immunopräzipitation

In vorangegangenen Immunfluoreszenz-Versuchen konnte beobachtet werden, dass auch humanes IRE1 (hIRE1) und UL50 kolokalisieren (Daten nicht abgebildet). Dies deutete daraufhin, dass möglicherweise auch hIRE1 mit UL50 interagiert. Um dies zu überprüfen wurde als nächstes auch hier eine Co-Immunopräzipitation durchgeführt.

Dazu wurde in 293A-Zellen HA-markiertes IRE1 und Flag-markiertes M50 (Positivkontrolle) bzw. UL50 co-exprimiert. Als Negativkontrolle diente Flag-markiertes UL56. 24 h nach Transfektion wurden Proteinlysate hergestellt und IRE1 mittels anti-HA-Antikörper präzipitiert. Co-präzipitierte Proteine wurden mit Hilfe eines anti-Flag-Antikörpers nachgewiesen.

Abbildung 30B zeigt die Expressionskontrolle der transfizierten Proteine. Abbildung 30A stellt das Ergebnis der Co-IP dar. Es konnte demonstriert werden, dass auch UL50 mit hIRE1 co-präzipitiert wurde, während bei der Kontrolle keine Bande

nachgewiesen werden konnte. Wie zuvor bereits gesehen, konnte die Interaktion von murinem IRE1 mit M50 bestätigt werden.



Abbildung 30: Co-Immunopräzipitation von IRE1 und M50 bzw. UL50. 293A-Zellen wurden mit einem Expressionsplasmid für Flag-markiertes M50, UL56 oder UL50 und einem Expressionsplasmid für HA-markiertes IRE1 co-transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit RIPA-Puffer lysiert und IRE1 mittels anti-HA-Antikörper präzipitiert. Co-präzipitierte Proteine wurden mit einem anti-Flag-Antikörper im Western Blot nachgewiesen. A) Co-IP B) Expressionskontrolle. Diese Abbildung wurde von Florian Hinte erstellt.

3.3.8.3. Analyse des IRE1-Proteinlevels bei Transfektion eines

UL50-Expressionsplasmids bzw. bei Infektion mit HCMV

Nachdem auch eine Interaktion von humanem IRE1 mit UL50 nachgewiesen werden konnte, wurde als nächstes die Proteinexpression von IRE1 näher analysiert.

In einem Fall wurden HFF-Zellen mit einem Expressionsplasmid für Flag-markiertes UL56 oder UL50 und einem Expressionsplasmid für HA-markiertes hIRE1 co-transfiziert. Nach Lyse und Auftrennung im SDS-Gel wurden die Proteine im Western Blot detektiert. Als Ladekontrolle diente β-Aktin (Abbildung 31A).

Im anderen Fall wurden aufgrund der geringen Expression von endogenem hIRE1 und den damit verbundenen Schwierigkeiten des Nachweises im Western Blot MRC5-Zellen mit einem retroviralen Vektor, welcher für HA-markiertes hIRE1 kodiert, transduziert. Anschließend wurden die Zellen mit HCMV (MOI 3) infiziert. Der Versuchszeitraum erstreckte sich über 72 h. Als Infektionskontrolle diente der Nachweis von IE1 und als Ladenkontrolle der Nachweis von β -Aktin.

Abbildung 31A zeigt, dass bei Transfektion des UL56-Expressionsplasmids die Proteinmenge von humanem IRE1 sich nicht signifikant ändert. Allerdings führt die Co-Expression von UL50 zu einer Reduktion der IRE1-Menge.

Abbildung 31B demonstriert, dass auch in infizierten Zellen die hIRE1-Expression im Vergleich zu nicht infizierten Zellen reduziert war. Dabei ist festzuhalten, dass je weiter die Infektion fortgeschritten war, desto weniger konnte hIRE1 detektiert werden. Zur Expression des UL50 während der Infektion kann keine Aussage getroffen werden, da kein spezifischer Antikörper gegen UL50 zur Verfügung stand und deshalb das Protein nicht nachgewiesen werden konnte. Es muss jedoch davon ausgegangen werden, dass UL50 ebenfalls exprimiert wird, da es, genau wie sein Homolog in MCMV, ein essentielles Protein ist.



Abbildung 31: Reduktion der hIRE1-Menge in Transfektions- und Infektionsexperimenten. A) Expressionsplasmide für Flag-markiertes UL50 bzw. UL56 wurden mit einem Expressionsplasmid für HA-markiertes hIRE1 in HFF-Zellen co-transfiziert. Die Zellen wurden 24 h nach Transfektion mit RIPA lysiert und nach Auftrennung im SDS-Gel die Proteine im Western Blot detektiert. Als Ladekontrolle diente Aktin. B) hIRE1-HA wurde in MRC5-Zellen mittels retroviraler Transduktion stabil exprimiert. Nach Infektion mit HCMV (MOI 3) wurden Proteinlysate hergestellt und im SDS-Gel aufgetrennt. Die hIRE1-Expression wurde im Western Blot detektiert. Als Infektionskontrolle diente die Detektion von IE1 und als Ladekontrolle die Detektion von Aktin. Diese Abbildung wurde von Florian Hinte erstellt.

3.3.9. Untersuchungen zur Aufklärung des IRE1-Abbau-Mechanismus

Nachdem gezeigt wurde, dass die IRE1-Expression nicht auf Transkriptebene, sondern auf Proteinebene gestört ist, sollte im Folgenden versucht werden den zu Grunde liegenden Mechanismus aufzuklären. Ein möglicher Protein-Abbau wäre zum einen durch das Proteasom zum anderen durch das Lysosom denkbar. Deshalb wurde in NIH3T3-Zellen IRE1-HA und Leervektor bzw. M50 co-exprimiert und mit einem Proteasom- oder Lysosom-Inhibitor behandelt. Auch eine Kombination beider Inhibitoren wurde eingesetzt sowie einem generellen Protease-Inhibitor-Cocktail. Die Detektion von p53 diente als Funktionalitätskontrolle des Proteasom-Inhibitors.

Es zeigte sich, dass keiner der eingesetzten Inhibitoren in der Lage war, den Abbau von IRE1 zu hemmen. Auch die Kombination beider Inhibitoren erbrachte keine IRE1-Anreicherung (Abbildung 32).


Abbildung 32: Versuch einen proteasomalen bzw. Iysosomalen Abbau von IRE1 zu verhindern. NIH3T3-Zellen wurden mit einem Expressionsplasmid für HA-markiertes IRE1 und Leerverktor bzw. einem Expressionsplasmid für M50 co-transfiziert. Nach Lyse und Auftrennung im SDS-Gel wurden die angegebenen Proteine im Western Blot detektiert. Als Funktionalitätskontrolle des Protease-Inhibitors wurde p53 detektiert, als Ladekontrolle diente Aktin. Neben oben genannten Inhibitoren wurden des Weiteren folgende Inhibitoren auf ihre Fähigkeit den IRE1-Abbau zu blockieren überprüft:

Name des Inhibitors	Funktion
(Z-LL) ₂ Keton	Cysteinprotease-Inhibitor
AEBSF	Serinprotease-Inhibitor
Aprotinin	inhibiert die Serinprotease Trypsin,
	Chymotrypsin, Kallikrein und Plasmin
Bafilomycin A	Inhibitor der H ⁺ -ATPase (V-ATPase)
Bestatin	inhibiert die Metalloprotease Leucin-
	Aminopeptidase, Aminopeptidase B und
	Tri-amino Peptidase
E64	inhibiert die Cysteinprotease Papain,
	Actinidase und Cathepsin B, H und L
Eeyarestatin	ATPase p97 Inhibitor (ERAD Inhibitor)
EGCG	inhibiert die Metalloprotease MMP-2 und
	MMP-9
Gamma-Sekretase Inhibitor	inhibiert Protease-Untereinheit, welche
	Transmembranproteine innerhalb der
	Transmembrandomäne schneidet
Lactacystin	Proteasom-Inhibitor
Leupeptin	inhibiert die Serin- und Cysteinprotease
	Plasmin, Trypsin, Papain, Calpain und
10115	Cathepsin B
MG115	inhibiert das 20S- und 26S-Proteasom
N,N,N',N'-I etrakis(2-	Zinkchelat (innibiert Zink-abhangige
pyridyimethyi)ethyienediamine (TPEN)	Proteasen)
Pepstatin A	Innibiert die Aspartatproteasen Pepsin,
	Renin, Cathepsin D, Chymosin und
	Piolease B
ILON	Sprin Drotocoop Tryppin und der
	Thrombin öhnlichen
	Corastooutin
TPCK	chaslocyllii spezifischer Inhibiter für Chymotryppin
	und hemmt die Thrombin ähnliche
	Protease Cerastocytin
Z-VAD-FMK	Caspase-Inhibitor
TPCK Z-VAD-FMK	spezifischer Inhibitor für Chymotrypsin und hemmt die Thrombin-ähnliche Protease Cerastocytin Caspase-Inhibitor

Tabelle 11: getestete Inhibitoren

Es konnte mit keinem der angegebenen Inhibitoren die Reduktion der IRE1-Menge supprimiert werden.

4. Diskussion

Cytomegaloviren kodieren mehr als 160 Proteine, die bei Infektion der Zelle translatiert und posttranskriptional modifiziert werden müssen. Durch die massive Überladung des ER mit ungefalteten viralen Proteinen wird in der Zelle ER-Stress induziert. Um eine Aktivierung der UPR zu verhindern und eine produktive Virusreplikation zu gewährleisten, haben Cytomegaloviren im Laufe der Evolution wirksame Mechanismen entwickelt, um die für die virale Replikation schädlichen Auswirkungen der UPR zu überwinden. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass MCMV zwar den PERK-Signalweg nicht aktiv inhibiert, ihn jedoch auch nicht signifikant aktiviert. Der ATF6-Zweig der UPR wird durch MCMV zu frühen Zeitpunkten der Infektion aktiviert, allerdings wurde belegt, dass zu späten Zeitpunkten der Infektion eine Blockierung des Signalwegs durch Reduktion der ATF6-Expression erfolgt. Dennoch konnte eine erhöhte BiP-Expression festgestellt werden. Im Falle des IRE1-Signalweges konnte dargelegt werden, dass sowohl MCMV als auch HCMV diesen aktiv supprimieren kann, indem das Virus eine Reduktion der IRE1-Menge bewirkt. Das dafür verantwortliche virale Protein (M50 bzw. UL50) konnte identifiziert und im Falle von M50 durch Herstellung verschiedener Verkürzungsmutanten der zur Interaktion und Reduktion der **IRE1-Menge** benötigte Bereich bestimmt werden. Die Inhibition der IRE1-Signalkaskade durch Entfernung des IRE1 legt eine neuartige virale Strategie nahe die UPR zu modulieren, welche in dieser Arbeit erstmals aufgedeckt wurde.

4.1. Interaktion von MCMV mit dem PERK-Signalweg

Der PERK-Signalweg der UPR führt bei Aktivierung zu einer Phosphorylierung des elF2α und einer dadurch vermittelten Hemmung der generellen Proteintranslation. Bei anhaltendem ER-Stress wird in der Zelle über ATF4 die CHOP-Expression gesteigert, wodurch schließlich die Apoptose eingeleitet wird. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine MCMV-Infektion nicht zu einer elF2α-Phosphorylierung führt (Abbildung 6). Allerdings wurde nicht untersucht, ob die CMV-Infektion grundsätzlich schon eine PERK-Aktivierung auslöst. Dies wurde jedoch bereits von anderen Arbeitsgruppen gezeigt. J. Alwine's Arbeitsgruppe konnte u.a. nachweisen, dass eine HCMV-Infektion zu einer Phosphorylierung von PERK führt, allerdings wurde auch hier keine Phosphorylierung des elF2α beobachtet. Auch der bei PERK-Aktivierung erwartete generelle Translationsstopp konnte nicht bestätigt werden [35].

Zurückzuführen wäre dieses Phänomen auf eine aktive Antagonisierung des Signalwegs durch CMV. In der Tat wird vermutet, dass die IE-Proteine von HCMV, welche durch TRS1 und die nahe verwandten IRS1-Gene kodiert werden, bei der Inhibition der eIF2α-Phosphorylierung eine Rolle spielen [153]. Des Weiteren konnte eine signifikante Induktion der gesamt eIF2α-Menge durch HCMV belegt werden. Dies ist ein zusätzlicher Mechanismus, um die Mengen an phosphoryliertem eIF2α niedrig zu halten und somit die globale Proteintranslation zu erhalten [35]. Da sich HCMV und MCMV im Hinblick auf Pathogenese, Immunmodulation und Latenz ähnlich verhalten, wäre auch hier eine Interaktion von MCMV mit PERK denkbar. Verwunderlich ist jedoch, dass in dieser Arbeit keine Suppression des Signalwegs bei exogener Induktion von ER-Stress bestätigt werden konnte (Abbildung 7). Möglicherweise liegt dies an der Art bzw. der Intensität der Stimulation. Da Thapsigargin ein relativ starker ER-Stress Induktor ist, wäre es vorstellbar, dass MCMV bei zu intensiver Stimulation die Phosphorylierung von eIF2α nicht mehr blockieren kann.

Dass die Hemmung des PERK-Signalwegs wichtig für die Virusreplikation zu sein scheint, zeigt die Tatsache, dass auch andere Viren die PERK-Signalkaskade steuern. So führt eine HCV-Infektion zwar zu einer PERK-Aktivierung, jedoch bindet das E2 Protein von HCV an phosphoryliertes PERK und verhindert somit die Phosphorylierung von eIF2α und den dadurch induzierten Translationsstopp [154]. HSV-1 exprimiert sogar mehrere Proteine um diesen Signalweg zu unterbinden. Das Glykoprotein B (gB) verhindert die Dimerisierung von PERK, während das Protein ICP34.5 Protein die PKR-vermittelte Phosphorylierung des eIF2α verhindert [69, 115]. Somit ist eine Inhibition der Signalweiterleitung auf mehreren Ebenen gegeben.

ATF4 reguliert die Transkription von Genen, die im Metabolismus eine Rolle spielen sowie des proapoptotischen Proteins CHOP. Interessanterweise konnte in anderen Arbeiten für HCMV sowie für MCMV ein Anstieg von ATF4 beobachtet werden, dessen Translation von phosphoryliertem eIF2α abhängig ist [35, 117]. Dadurch müsste CHOP vermehrt exprimiert und die Apoptose induziert werden. Ein Anstieg der CHOP-Expression konnte jedoch in dieser Arbeit zu keiner Zeit der Probenentnahme beobachtet werden (Abbildung 8). Auch würde ein eIF2α-vermittelter Anstieg der ATF4-Menge widersprüchlich zu der These stehen, dass CMV aktiv eine Phosphorylierung von eIF2α verhindert, da keine vermehrte

Phosphorylierung von eIF2α festgestellt wurde. Allerdings konnte gezeigt werden, dass ein Funktionsverlust von ATF4 zu signifikant attenuiertem viralem Wachstum führt. Begründet wird dies durch eine reduzierte virale DNA Synthese und der Inhibition der Transkription später Gene [124]. Zusätzlich aktiviert ATF4 GADD34, welches mit der Protein Phosphatase 1 interagiert und zu einer Dephosphorylierung von eIF2α führt [68, 155]. So könnte die Aktivierung von GADD34 durch ATF4 wiederum förderlich für die Infektion sein, da so die Menge an phosphoryliertem eIF2α reguliert werden kann. Auch die Tatsache, dass HSV-1 ein GADD34-Homolog (ICP34.5) kodiert, spricht für eine wichtige Rolle für die Funktion von GADD34 in der Herpesvirus-Biologie [156].

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass MCMV mit großer Wahrscheinlichkeit ebenfalls den PERK-Signalweg, wie HCMV, regulieren kann. So werden die negativen Effekte der PERK-Aktivierung, wie ein elF2α-vermittelter genereller Translationsstopp durch MCMV verhindert, indem die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors durch PERK inhibiert wird. MCMV kodiert des Weiteren die Proteine m142 und m143, die eine Phosphorylierung von elF2α durch die PKR unterbinden [126, 157, 158]. Die positiven Effekte dagegen, wie die Induktion der ATF4-Expression, werden vermutlich erlaubt, um eine Aufrechterhaltung der Biosynthese und einer permessiven Umgebung zu gewährleisten. Gleichzeitig wird aber die CHOP-Expression kontrolliert, um eine Induktion der Apoptose zu vermeiden. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass die Expression von ATF4 in dieser Arbeit nicht näher untersucht wurde.

4.2. Modulation des ATF6-Signalwegs durch MCMV

Der ER-Stress-Sensor ATF6 transloziert bei Akkumulation von ungefalteten Proteinen in den Golgi, wo er durch intramembranäre Spaltung in einen aktiven Transkriptionsfaktor prozessiert wird [74]. Dieser wandert in den Kern und induziert die Transkription von UPR-induzierbaren Genen wie z. B. dem ER-Chaperon BiP [77, 78]. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass MCMV die Aktivierung von ATF6 zu frühen Zeitpunkten der Infektion auslöst. Dabei diente als Maß für die Aktivierung der Nachweis des ATF6-Spaltprodukts im Western Blot. Am deutlichsten war die ATF6-Spaltung 8 h nach Infektion zu beobachten. Ab 12 h nach der Infektion wurden die Mengen an ATF6 kontinuierlich weniger, was auf einen Abbau des Proteins schließen lässt (Abbildung 10). Da sich die Transkription von ATF6 um den Faktor

Diskussion

drei während der Infektion steigerte (Daten nicht abgebildet), muss von einer posttranslationalen Degradation ausgegangen werden. Diese wird möglicherweise jedoch nicht direkt durch MCMV ausgelöst. Eher anzunehmen ist, dass der ER-Stress, welcher durch MCMV induziert wird, zu einem Abbau von ATF6 führt. Hong et al. konnte bei Induktion von ER-Stress durch Thapsigargin einen signifikanten Rückgang der ATF6-Menge beobachten, welcher durch die Proteasom-Inhibitoren ALLN und MG115 supprimiert werden konnte [159]. Dies bestätigt, dass ATF6 über einen Proteasom-abhängigen Signalweg degradiert wird. Ob allerdings auch MCMV in dieser Art zu einer ATF6-Reduktion führt, oder ob MCMV aktiv den ATF6-Abbau fördert, muss noch geklärt werden.

Die aktive Form von ATF6 ist unter anderem ein Transkriptionsfaktor für das Hauptregulatorprotein der UPR: BiP. Abbildung 11 zeigt, dass die Expression von BiP in den frühen Phasen der Infektion unverändert bleibt, während 24 h nach Infektion eine erhöhte BiP-Menge festgestellt werden konnte, die 48 h nach Infektion ihr Maximum erreichte. Erstaunlicherweise wurde die BiP-Expression gesteigert, obwohl ATF6 nachweislich abgebaut wurde. Eine mögliche Erklärung ist, dass auch andere Proteine außer ATF6 die Transkription von BiP steigern können. In der Tat konnte Luo et al. demonstrieren, dass ATF4 bei Bindung an den BiP-Promoter, ERSE, Transkription unabhängig von dem dessen aktiviert [160]. Um auszuschließen, dass der Anstieg der BiP-Menge ATF4-vermittelt war, wurde die BiP-Expression in dieser Arbeit in PERK/GCN2 knock-out-Zellen überprüft (Daten nicht gezeigt). In diesen Zellen kann eine Aktivierung von ATF4 über die UPR ausgeschlossen werden, da eine Phosphorylierung von elF2a nicht durch die Kinase PERK bzw. GCN2 vollzogen werden kann. Interessanterweise zeigten jedoch auch diese Zellen eine Erhöhung der BiP-Menge zu späten Zeitpunkten der Infektion. Die PKR ist eine weitere Kinase, die eIF2α phosphoryliert [161]. Auch wenn MCMV PKR durch die Proteine m142/m143 inhibiert [157], könnte dennoch auf diese Weise elF2a in ausreichenden Mengen phosphoryliert worden sein, um die ATF4-Expression zu induzieren.

Alternativ wäre auch denkbar, dass das Protein IE1 von MCMV eine Transkription von BiP induziert. Zumindest wurde für das IE-Protein IE1 von HCMV gezeigt, dass dieses an das ERSE des BiP-Promoters binden kann, in Abhängigkeit von der ATP-Bindestelle, der Zink-Finger-Domäne und des vermuteten Leucin-Zipper-Motivs des

70

IE1-Proteins. Dagegen konnten Deletionsmutanten von IE1 keine Promoter-Stimulation induzieren [162]. Auch J. Alwine fand eine Aktivierung der BiP-Expression durch die IE-Proteine IEP72 und IEP86 bei einer HCMV-Infektion [120]. Jedoch führten diese nur zu einem 3 - 4 -fachen Anstieg der BiP-mRNA-Menge. In einer späteren Publikation konnte seine Arbeitsgruppe darlegen, dass bei einer HCMV-Infektion das Sjögren's Syndrom Antigen B (SSB) signifikant erhöht war, wodurch die Benutzung einer internen ribosomale Eintrittsstelle (IRES) der BiPmRNA gefördert wurde [119]. Diese vermittelt die Bindung der mRNA an die Ribosomen und begünstigt somit die Synthese des Proteins.

Ob jedoch auch die IE-Proteine des murinen CMVs in der beschriebenen Art zu einer gesteigerten BiP-Expression beitragen, muss in weiterführenden Experimenten untersucht werden.

4.3. Inhibition des IRE1-Signalwegs durch MCMV bzw. HCMV

4.3.1. Interaktion von IRE1 und M50 bzw. UL50

Der ER-Sensor IRE1 dimerisiert bei einer Akkumulation von ungefalteten Proteinen im ER, wodurch dessen zytoplasmatische Endoribonuklease-Domäne aktiviert wird. Diese entfernt durch unkonventionelles Spleißen im Zytosol ein Intron der XBP-1-mRNA und führt zur Translation eines Transkriptionsfaktors, der Gene reguliert, die bei der Proteinfaltung und der ER assoziierten Protein Degradation eine Rolle spielen [163]. Als Maß für die Aktivierung des IRE1-Signalwegs wurde zum einen das Spleißen der XBP-1-mRNA untersucht und zum anderen der Transkriptionsfaktor XBP-1 im Western Blot nachgewiesen. Abbildung 12 zeigt, dass zu frühen Zeitpunkten der Infektion ein XBP-1-Spleißen durch MCMV induziert wird. Jedoch kehrt das Verhältnis zwischen gespleißtem und ungespleißtem XBP-1 12 h nach Infektion wieder auf das Niveau von nicht infizierten Zellen zurück. Auch die Tatsache, dass trotz exogener Stimulation mit Tunicamycin zu späten Zeitpunkten der Infektion kein XBP-1-Spleißen ausgelöst wird (Abbildung 13 und Abbildung 14), deutet auf eine aktive Hemmung dieses Signalwegs durch MCMV bzw. auch durch das verwandte HCMV hin (Abbildung 29). Übereinstimmend mit den hier gezeigten Ergebnissen konnte auch Qian et al. demonstrieren, dass MCMV zu späten Zeitpunkten der Infektion unempfindlich gegenüber der exogenen Induktion von ER-Stress im Hinblick auf den IRE1-Signalweg ist [124]. Aufgrund dieser Untersuchungen wurde im Anschluss nach möglichen viralen Interaktionspartnern gesucht und das Protein M50 von MCMV identifiziert. M50 ist ein Typll-Transmembranprotein, welches in der späten Phase der Infektion exprimiert wird. Durch IP-Versuche konnte M50 in der vorliegenden Arbeit erstmals identifiziert und als Interaktionspartner von IRE1 bestätigt werden (Abbildung 17 und Abbildung 18). Dabei wurde nicht nur IRE1 präzipitiert und M50 co-präzipitiert, sondern es konnte auch eine Funktionalität der reziproken IP bestätigt werden. Eine weitere Erhärtung dieser Ergebnisse lieferte die Co-IP von M50 in Infektionsversuchen (Abbildung 19). Die Kolokalisation von IRE1 und M50 in der Immunfluoreszenz deutete ebenfalls, Co-IPs, auf eine Interaktion beider Proteine wie die hin. In genau Transfektionsexperimenten war deutlich eine überlagernde Verteilung von IRE1 und M50 zu erkennen. Interessanterweise sah die Lokalisation von IRE1 und M50 in der Infektion etwas anders aus. Ca. 16 h nach der MCMV-Infektion war eine Kolokalisation von M50 und IRE1 zu erkennen. Etwa 20 h nach Infektion ist M50 allerdings überwiegend in der Kernmembran lokalisiert (Abbildung 16). Der Grund für diese Diskrepanz liegt in der Expression anderer viraler Proteine begründet. Es ist bekannt, dass M53 von MCMV mit M50 interagiert [26, 164]. Durch diese Interaktion beider Proteine kommt es zu einer Stabilisierung von M50 in der Kernmembran und folglich zur Ausbildung des NEC. Dabei wird die Proteinkinase C an die innere Kernmembran rekrutiert, wo letztere die Phosphorylierung von Lamin A/C induziert. Dadurch wird das Laminnetz der Kernmembran instabil und die Kapside können aus dem Kern austreten [24, 25]. Vermutlich ist nach 16 h noch kein bzw. nur sehr wenig M53 exprimiert, nach 20 h dagegen ist mehr M53 vorhanden wodurch die Verankerung von M50 in der inneren Kernmembran stabilisiert wird. Diese Theorie würde die eben beschriebene Verteilung von M50 erklären. Allerdings sind weiterführende Experimente erforderlich, um diese Hypothese zu bestätigen.

4.3.2. Reduktion der IRE1-Menge durch M50 bzw. UL50

In Abbildung 16 und Abbildung 31 ist zu erkennen, dass in infizierten Zellen die IRE1-Menge deutlich geringer ist als in nicht infizierten Zellen. Dies lässt einen M50bzw. UL50-vermittelten Abbau von IRE1 vermuten. In Abbildung 20, Abbildung 22 und Abbildung 31 konnte genau dies erstmals gezeigt werden. Bei Co-Expression von M50 bzw. UL50 und IRE1 war die IRE1-Menge im Vergleich zur Kontrolle stark reduziert. Interessanterweise konnte in den Experimenten kein IRE1-Abbauprodukt detektiert werden. Der Grund dafür ist vermutlich, dass IRE1 zum einen ein relativ kurzlebiges Protein mit einer Halbwertszeit von nur ca. 3 h ist [91, 165] und dass das Abbauprodukt zum anderen extrem instabil ist und schnell degradiert wird [166]. So konnte Niwa et al. eine Proteolyse von IRE1 nur nachweisen, indem Proteinlysate mit kochendem Probenpuffer hergestellt wurden.

Abbildung 20 zeigt, dass nicht nur die Gesamtmenge an IRE1 reduziert war, sondern auch die Phosphorylierung. Um zu überprüfen, ob nur aktiviertes, phosphoryliertes IRE1 abgebaut wird oder auch monomeres IRE1 wurde eine dominant negative IRE1-Mutante kloniert, deren Kinase-Domäne defekt ist. Auch hier konnte eine Reduktion der IRE1-Menge beobachtet werden, obwohl keine Phosphorylierung detektiert wurde (Abbildung 21). Das belegt, dass für die Degradation von IRE1 keine Phosphorylierung bzw. Aktivierung notwendig ist.

Im Anschluss daran wurde getestet, welcher Teil von M50 für die Degradation von IRE1 verantwortlich ist. Dazu wurden Verkürzungsmutanten kloniert und deren Fähigkeit IRE1 zu degradieren untersucht (Abbildung 25). Der Leervektor und ein nicht verwandtes Typ II-Transmembranprotein (UL56 von HSV-1) konnte IRE1 nicht abbauen. Interessanterweise war auch das M50 Homolog von HSV-1, das Protein UL34, nicht zu einer IRE1-Reduktion fähig. Da die Destabilisierung der Kernmembran durch M50 (MCMV), UL50 (HCMV) bzw. UL34 (HSV-1) bei Herpesviren essentiell ist, um den Kernaustritt der Kapside zu gewährleiten, wäre dies zu erwarten gewesen. Zumal auch die konstante Region dieser Proteine stark konserviert ist. Möglicherweise reicht jedoch die Homologie zwischen M50 und UL34 nicht aus, um eine IRE1-Proteolyse zu induzieren.

Das M50 Volllängen-Protein führte, wie bereits in Abbildung 20 gesehen, zu einer Degradation von IRE1, dagegen zeigte die Mutante bestehend aus den Aminosäuren 142 - 317 einen gemischten Phänotyp in Bezug auf den IRE1-Abbau. Die Mutanten mit den größeren N-Terminalen Deletionen konnten keine Reduktion der IRE1-Menge induzieren (Abbildung 25). So lässt sich der für den IRE1-Abbau essentielle Bereich auf die Aminosäuren 101-171 einschränken. Des Weiteren konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass durch die Deletion der konstanten Region nicht nur die Fähigkeit des IRE1-Abbaus, sondern damit einhergehend auch die Interaktion mit IRE1 verloren geht (Abbildung 26). Die Deletion der Transmembrandomäne (TMD) führte ebenfalls zu einem Verlust der Fähigkeit IRE1 zu degradieren, weil dadurch das Protein nicht mehr in der Membran verankert werden kann. Aus der Konstruktion eines chimären M50, bei dem die TMD durch die TMD eines anderen Proteins (UL34 bzw. UL56) ersetzt wurde, konnte geschlossen werden, dass die Sequenz der Transmembrandomäne nicht für die Reduktion der IRE1-Menge essentiell ist. Offenbar waren diese Chimären wieder in der Lage, IRE1 zu degradieren (Abbildung 25).

Interessant wäre in diesem Zusammenhang die Konstruktion einer M50-Mutante, die zwar noch zur Bildung des Kernausschleusungskomplexes, also einer Interaktion mit M53, fähig ist, deren Wirksamkeit, IRE1 zu degradieren, aber gleichzeitig gestört ist.

4.3.3. Infektion mit einer M50-Deletionsmutante

Einen weiteren Beleg dafür, dass M50 den Abbau des IRE1 induziert, zeigt die Abbildung 28. Bei der Infektion mit einem M50-Deletionsvirus konnte im Vergleich zur Kontrolle keine Abnahme der IRE1-Menge beobachtet werden. Des Weiteren wurde auch das IRE1-vermittelte XBP-1-Spleißen bei Infektion mit dem M50-Deletionsvirus untersucht. Auch hier bestätigte sich, dass bei Infektion und gleichzeitiger Stimulation mit Tunicamycin keine Inhibition des XBP-1-Spleißens im Vergleich zur Kontrolle möglich war. Allerdings oder vielmehr war ein minimaler Rückgang des XBP-1-Spleißens feststellbar. Eine denkbare Erklärung wäre, dass MCMV möglicherweise noch auf anderem Wege den IRE1-Signalweg hemmen kann. In Abbildung 11 wurde gezeigt, dass es während der MCMV-Infektion zu einer Hochregulation der BiP-Expression kommt. BiP ist das Hauptregulatorprotein der UPR und bindet luminal an die drei ER-Stress-Sensoren PERK, IRE1 und ATF6, wodurch diese inaktiviert werden. Bei erhöhtem BiP-Level wäre eine gesteigerte Inaktivierung dieser Sensoren die Folge und somit die Abschaltung der Signalkaskade. Auf diese Weise könnte MCMV zusätzlich einer Aktivierung der UPR entgegenwirken. Eine weitere Möglichkeit den IRE1-Signalweg zu inhibieren, ist durch das Protein BAX Inhibitor-1 (BI-1). Es wurde sowohl in Hefen, als auch in Säugerzellen gezeigt, dass der BI-1 mit IRE1 interagiert und so dessen Endoribonuklease-Domäne inaktiviert. Auch die Signalweiterleitung über TRAF2 und damit die Induktion der Apoptose durch JNK wurde durch diese Interaktion blockiert [167-169]. Es ist denkbar, dass MCMV weitere Proteine exprimiert, die z. B. eine Bindung von BI-1 mit IRE1 unterstützen bzw. stabilisieren oder dass diese Proteine direkt eine Phosphorylierung von JNK verhindern. So wurde z. B. für HCMV gezeigt, dass pUL38 eine JNK-Aktivierung verhindert [117, 118, 170]. Ob auch MCMV ein ähnliches Protein exprimiert, ist jedoch nicht bekannt und muss in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden. Allerdings wurde in dieser Arbeit nicht näher untersucht, ob auch der JNK-Signalweg durch MCMV blockiert wird. Aufgrund der gezeigten Degradation des IRE1 ist dies jedoch anzunehmen.

4.3.4. Mechanismus zur Reduktion der IRE1-Menge

Um die Frage zu beantworten, durch welchen Mechanismus IRE1 degradiert wird, wurden folgende Möglichkeiten in Betracht gezogen: Zum einen könnte die Transkription von IRE1 supprimiert und dadurch reduzierte Mengen an IRE1 verursacht werden. Zum anderen wäre ein posttranslationaler Abbau durch das Proteasom oder das Lysosom denkbar. Eine weitere Möglichkeit wäre die Proteolyse durch Spaltung des Proteins.

Über IRE1 ist bekannt, dass es die Stabilität seiner eigenen mRNA beeinträchtigt [100]. So wäre es vorstellbar gewesen, dass M50 eine IRE1-vermittelte Degradation der IRE1-mRNA unterstützt oder die Transkription blockiert. Allerdings konnte diese Hypothese widerlegt werden (Abbildung 23). Die Menge der IRE1-mRNA war im Gegenteil während der MCMV-Infektion sogar um das 2,5 fache erhöht.

Dies lässt vermuten, dass M50 möglicherweise zu einer posttranslationalen Degradation führt. Für diese Theorie spricht, dass beide Proteine kolokalisieren und eine Interaktion von IRE1 und M50 in der IP bestätigt werden konnte. Es wurde gezeigt, dass das Hitzeschockprotein 90 (HSP90) mit IRE1 interagiert und so zu dessen Stabilität beiträgt [171]. Möglicherweise wird durch die Bindung von M50 an IRE1 die Interaktion von HSP90 mit IRE1 verhindert und so IRE1 schneller abgebaut. Alternativ wäre eine Proteolyse durch Spaltung denkbar. Der ER-Stress-Sensor ATF6 wird im Golgi durch S1- und S2-Proteasen gespalten, wozu auch die Protease Furin zählt [172]. Möglicherweise wird IRE1 ebenfalls durch Furin degradiert. Furin Konsensussequenz Arg-X-Lys/Arg-Arg spaltet Proteine, die die in ihrer Aminosäuresequenz enthalten [173]. Allerdings konnte in der IRE1-Sequenz keine solche Schnittstelle ausgemacht werden. Wahrscheinlicher ist eher, dass IRE1 durch ein Mitglied der γ-Sekretase-Familie gespaltet wird. Presenilin-1 (PS1) wurde in Hefe- und in Säugetierzellen als Regulator der IRE1-Proteolyse identifiziert [166, 174]. Niwa et al. konnte in PS1-knock-out-Mäusen zeigen, dass die Induktion von ER-Stress und die Spaltung von IRE1 reduziert war. Vielleicht rekrutiert M50 PS1, um so eine IRE1-Proteolyse zu fördern.

Denkbar wäre auch eine Spaltung von IRE1 durch Caspasen oder Caspaseähnlichen Proteasen [175-179].

Ein weiterer möglicher IRE1-Abbaumechanismus könnte sein, dass IRE1 indirekt sich selbst für eine Degradation markiert. Chiang et al. konnte zeigen, dass IRE1 den proteasomalen und lysosomalen Abbau von fehlgefaltetem Rhodopsin reguliert [180, 181]. So könnte IRE1 einen M50-Abbau induzieren. Dadurch, dass M50 mit IRE1 interagiert, würde dies gegebenenfalls zu einer Degradation beider Proteine führen. In der Tat wurden in dieser Arbeit M50-Abbauprodukte detektiert (Abbildung 25).

Normalerweise führt eine Markierung mit Ubiquitin zu einem proteasomalen Abbau des markierten Proteins [182]. Es konnte in dieser Arbeit jedoch keine Ubiquitinierung von IRE1 festgestellt werden (Daten nicht abgebildet). Allerdings kann auch eine Sumoylierung Einfluss auf die Stabilität von Proteinen haben [183, 184]. So hat Wang et al. demonstriert, dass die Sumoylierung von *specificity protein* 1 (SP1) mit Sumo-1 eine erhebliche Reduktion der Halbwertzeit des Proteins nach sich zieht. Begründet wurde dies durch eine Stabilisierung der Interaktion zwischen SP1 und der Proteasom-Untereinheit rpt6, wodurch eine effektivere Ubiquitinierung und anschließende SP1-Degradation erreicht wurde [185]. Vielleicht kann auch M50 zu einer Sumoylierung von IRE1 mit nachfolgender Ubiquitinierung und Degradation beitragen. Um diese Frage beantworten zu können, müssen weitere Versuche durchgeführt werden.

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, spielt IRE1 auch bei der Regulation der Autophagie eine Rolle. Als Autophagie wird ein zellulärer Prozess bezeichnet, bei dem zelleigene Proteine oder ganze Zellorganelle lysosomal degradiert werden. Fliss et al. konnte zeigen, dass M45 von MCMV mit NEMO interagiert und dessen proteasom-unabhängige Degradation NEMO induziert. Dabei wird in Autophagosomen transportiert und im Lysosom abgebaut [186]. Ein ähnlicher Mechanismus wäre für IRE1 vorstellbar. So könnte M50 einen Transport des IRE1 ins Autophagosom unterstützen, in dem beide Proteine degradiert werden. Ein essentielles Protein zur Bildung der Autophagosomen ist das Protein Atg5 [187-189]. Vorausgesetzt, dass dieser Mechanismus zutreffend ist, sollte bei einer Co-Transfektion eines IRE1- und M50-Expressionsplamids in Atg5-defiziente Zellen IRE1 nicht abgebaut werden, da keine Autophagosomen gebildet werden können.

Allerdings zeigten auch Atg5-defiziente Zellen einen IRE1-Abbau (Daten nicht abgebildet). Daraus kann gefolgert werden, dass ein Abbau von IRE1 in Autophagosomen unwahrscheinlich ist.

Um den zu Grunde liegenden Mechanismus der IRE1-Proteolyse zu identifizieren, wurden verschiedene Proteasom-, Lysosom-und Protease-Inhibitoren auf ihre Fähigkeit untersucht, den IRE1-Abbau zu verhindern. Abbildung 32 zeiat exemplarisch das Ergebnis. Keiner der eingesetzten Inhibitoren führte zu einer Suppression der IRE1-Degradation. Dies kann zum einen darin begründet sein, dass die verwendeten Inhibitoren, die für die Degradation verantwortliche Protease nicht hemmen konnten oder dass ein alternativer Abbaumechanismus aktiviert wurde, sobald ein Abbau-Weg blockiert wurde. Zum anderen wäre denkbar, dass die Protease, welche IRE1 spaltet, noch nicht entdeckt worden ist oder ein möglicher Inhibitor noch nicht existiert bzw. nicht kommerziell erworben werden kann. Auch dass die entsprechende Protease bzw. Inhibitor noch nicht getestet wurde, wäre vorstellbar. Um die Frage zu beatworten, welche Protease mit IRE1 interagiert, könnte ein Crosslinking von M50 und IRE1 durchgeführt werden und anschließend der hochmolekulare Komplex massenspektrometrisch untersucht werden. Vielleicht würde dies Hinweise zur Identifikation der verantwortlichen Protease liefern.

4.4. Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Modulation der UPR durch MCMV untersucht und erstmals eine neuartige Strategie der Inhibition des IRE1-Signalwegs durch das virale Protein M50 aufgedeckt. Neben der bereits bekannten Interaktion mit M53 im Kernausschleusungskomplex wurde eine bislang unbekannte Interaktion von M50 mit dem ER-Stress-Sensor IRE1 identifiziert. Diese führt zu einer Degradation des Sensors und damit zu einer Inhibition des IRE1-vermittelten XBP-1-Spleißens. Es ist anzunehmen, dass auch die IRE1-vermittelte Induktion der Apoptose durch Entfernen von IRE1 blockiert wird. Die hier gewonnenen Erkenntnisse beschreiben einen neuartigen Mechanismus, mit dem das Virus die für seine Replikation negativen Auswirkungen der UPR unterbindet.

Wahrscheinlich haben neben MCMV noch weitere Viren diese äußerst effiziente Strategie entwickelt, mit der sie der Immunantwort des Wirtes entgegenwirken. So konnten z. B. in der Masterarbeit von Florian Hinte (Abteilung Prof. Brune, Heinrich-Pette-Institut) die hier gewonnenen Erkenntnisse auch auf das humane CMV übertragen werden. Dies belegt, dass der hier identifizierte Mechanismus zur Unterbindung des IRE1-Signalwegs nicht nur für MCMV, sondern zumindest auch bei dem verwandten Virus HCMV zutreffend ist.

Die Ergebnisse dieser Arbeit können helfen, zu einem besseren Verständnis der Virus-Wirt-Interaktion, insbesondere der Modulation der *Unfolded Protein Response* beizutragen, um somit mögliche Angriffspunkte für antivirale Therapien entwickeln zu können.

5. Literaturverzeichnis

- 1. Knipe, D.M.H., P. M.; Griffin, D. E., *Fields Virology*. Vol. 5th revised Edition. 2006, Philadelphia: Lamb von Lippincott Williams & Wilkins.
- 2. Modrow, S.F., D.; Truyen, U., *Molekulare Virologie*. Vol. 2. Auflage. 2003, Berlin: Spectrum. Akademischer Verlag GmbH Heidelberg.
- 3. Flint, S.J.E., L. W.; Racaniello, V. R.; Skalka, A. M., *Principles of Virology*. Vol. second edition. 2003.
- 4. Davison, A.J., et al., *A novel class of herpesvirus with bivalve hosts*. The Journal of general virology, 2005. **86**(Pt 1): p. 41-53.
- 5. McGeoch, D.J., F.J. Rixon, and A.J. Davison, *Topics in herpesvirus genomics and evolution.* Virus research, 2006. **117**(1): p. 90-104.
- 6. Brocchieri, L., et al., *Predicting coding potential from genome sequence: application to betaherpesviruses infecting rats and mice.* Journal of virology, 2005. **79**(12): p. 7570-96.
- 7. Dolan, A., et al., *Genetic content of wild-type human cytomegalovirus*. The Journal of general virology, 2004. **85**(Pt 5): p. 1301-12.
- 8. Murphy, E., et al., *Reevaluation of human cytomegalovirus coding potential.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. **100**(23): p. 13585-90.
- 9. Sinclair, J., *Human cytomegalovirus: Latency and reactivation in the myeloid lineage.* Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology, 2008. **41**(3): p. 180-5.
- 10. Sinclair, J. and P. Sissons, *Latency and reactivation of human cytomegalovirus*. The Journal of general virology, 2006. **87**(Pt 7): p. 1763-79.
- 11. Soderberg-Naucler, C., *Human cytomegalovirus persists in its host and attacks and avoids elimination by the immune system.* Critical reviews in immunology, 2006. **26**(3): p. 231-64.
- 12. Landolfo, S., et al., *The human cytomegalovirus*. Pharmacology & therapeutics, 2003. **98**(3): p. 269-97.
- 13. Britt, W., *Manifestations of human cytomegalovirus infection: proposed mechanisms of acute and chronic disease.* Current topics in microbiology and immunology, 2008. **325**: p. 417-70.
- 14. Cheung, T.W. and S.A. Teich, *Cytomegalovirus infection in patients with HIV infection.* The Mount Sinai journal of medicine, New York, 1999. **66**(2): p. 113-24.
- 15. Arthurs, S.K., et al., *Delayed-onset primary cytomegalovirus disease after liver transplantation*. Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society, 2007. **13**(12): p. 1703-9.
- 16. Razonable, R.R., *Cytomegalovirus infection after liver transplantation: current concepts and challenges.* World journal of gastroenterology : WJG, 2008. **14**(31): p. 4849-60.
- 17. Maidji, E., et al., Developmental regulation of human cytomegalovirus receptors in cytotrophoblasts correlates with distinct replication sites in the placenta. Journal of virology, 2007. **81**(9): p. 4701-12.
- 18. Malm, G. and M.L. Engman, *Congenital cytomegalovirus infections*. Seminars in fetal & neonatal medicine, 2007. **12**(3): p. 154-9.
- 19. Gandhi, M.K. and R. Khanna, *Human cytomegalovirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging treatments.* The Lancet infectious diseases, 2004. **4**(12): p. 725-38.
- 20. Ryckman, B.J., et al., Characterization of the human cytomegalovirus gH/gL/UL128-131 complex that mediates entry into epithelial and endothelial cells. Journal of virology, 2008. **82**(1): p. 60-70.
- 21. Ogawa-Goto, K., et al., *Microtubule network facilitates nuclear targeting of human cytomegalovirus capsid.* Journal of virology, 2003. **77**(15): p. 8541-7.
- 22. Anders, D.G., et al., *Boundaries and structure of human cytomegalovirus oriLyt, a complex origin for lytic-phase DNA replication.* Journal of virology, 1992. **66**(6): p. 3373-84.
- 23. Muranyi, W., et al., *Cytomegalovirus recruitment of cellular kinases to dissolve the nuclear lamina*. Science, 2002. **297**(5582): p. 854-7.
- 24. Camozzi, D., et al., *Remodelling of the nuclear lamina during human cytomegalovirus infection: role of the viral proteins pUL50 and pUL53.* The Journal of general virology, 2008. **89**(Pt 3): p. 731-40.
- 25. Milbradt, J., S. Auerochs, and M. Marschall, *Cytomegaloviral proteins pUL50 and pUL53 are associated with the nuclear lamina and interact with cellular protein kinase C.* The Journal of general virology, 2007. **88**(Pt 10): p. 2642-50.
- 26. Lotzerich, M., Z. Ruzsics, and U.H. Koszinowski, *Functional domains of murine cytomegalovirus nuclear egress protein M53/p38.* Journal of virology, 2006. **80**(1): p. 73-84.

- 27. Milbradt, J., et al., *Specific residues of a conserved domain in the N terminus of the human cytomegalovirus pUL50 protein determine its intranuclear interaction with pUL53.* The Journal of biological chemistry, 2012. **287**(28): p. 24004-16.
- 28. Sanchez, V., et al., Accumulation of virion tegument and envelope proteins in a stable cytoplasmic compartment during human cytomegalovirus replication: characterization of a potential site of virus assembly. Journal of virology, 2000. **74**(2): p. 975-86.
- 29. Homman-Loudiyi, M., et al., *Envelopment of human cytomegalovirus occurs by budding into Golgi-derived vacuole compartments positive for gB, Rab 3, trans-golgi network 46, and mannosidase II.* Journal of virology, 2003. **77**(5): p. 3191-203.
- 30. Silva, M.C., et al., *Human cytomegalovirus UL99-encoded pp28 is required for the cytoplasmic envelopment of tegument-associated capsids.* Journal of virology, 2003. **77**(19): p. 10594-605.
- 31. Mettenleiter, T.C., B.G. Klupp, and H. Granzow, *Herpesvirus assembly: a tale of two membranes.* Current opinion in microbiology, 2006. **9**(4): p. 423-9.
- 32. Ron, D. and P. Walter, Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. Nature reviews. Molecular cell biology, 2007. **8**(7): p. 519-29.
- 33. Hetz, C., et al., *The Unfolded Protein Response: Integrating Stress Signals Through the Stress Sensor IRE1{alpha}.* Physiological reviews, 2011. **91**(4): p. 1219-43.
- 34. Lodish, H.F. and N. Kong, *Perturbation of cellular calcium blocks exit of secretory proteins from the rough endoplasmic reticulum.* The Journal of biological chemistry, 1990. **265**(19): p. 10893-9.
- 35. Isler, J.A., A.H. Skalet, and J.C. Alwine, *Human cytomegalovirus infection activates and regulates the unfolded protein response.* Journal of virology, 2005. **79**(11): p. 6890-9.
- 36. Kawaguchi, S. and D.T. Ng, *Cell biology. Sensing ER stress.* Science, 2011. **333**(6051): p. 1830-1.
- 37. Mori, K., Signalling pathways in the unfolded protein response: development from yeast to mammals. Journal of biochemistry, 2009. **146**(6): p. 743-50.
- 38. Kohno, K., *Stress-sensing mechanisms in the unfolded protein response: similarities and differences between yeast and mammals.* Journal of biochemistry, 2010. **147**(1): p. 27-33.
- 39. Austin, R.C., *The unfolded protein response in health and disease.* Antioxidants & redox signaling, 2009. **11**(9): p. 2279-87.
- 40. Harding, H.P., et al., *Transcriptional and translational control in the Mammalian unfolded protein response.* Annual review of cell and developmental biology, 2002. **18**: p. 575-99.
- 41. Marciniak, S.J., et al., *CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum.* Genes & development, 2004. **18**(24): p. 3066-77.
- 42. Meusser, B., et al., *ERAD: the long road to destruction.* Nature cell biology, 2005. **7**(8): p. 766-72.
- 43. Kincaid, M.M. and A.A. Cooper, *ERADicate ER stress or die trying*. Antioxidants & redox signaling, 2007. **9**(12): p. 2373-87.
- 44. McCracken, A.A. and J.L. Brodsky, *Evolving questions and paradigm shifts in endoplasmicreticulum-associated degradation (ERAD).* BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology, 2003. **25**(9): p. 868-77.
- 45. Szegezdi, E., et al., *Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis.* EMBO reports, 2006. **7**(9): p. 880-5.
- 46. Vembar, S.S. and J.L. Brodsky, *One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation.* Nature reviews. Molecular cell biology, 2008. **9**(12): p. 944-57.
- 47. Yoshida, H., et al., *ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response.* Molecular and cellular biology, 2000. **20**(18): p. 6755-67.
- 48. Gething, M.J. and J. Sambrook, *Protein folding in the cell*. Nature, 1992. **355**(6355): p. 33-45.
- 49. Haas, I.G., *BiP--a heat shock protein involved in immunoglobulin chain assembly.* Current topics in microbiology and immunology, 1991. **167**: p. 71-82.
- 50. Lee, A.S., *The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress.* Methods, 2005. **35**(4): p. 373-81.
- 51. Bertolotti, A., et al., *Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfoldedprotein response.* Nature cell biology, 2000. **2**(6): p. 326-32.
- 52. Liu, C.Y., M. Schroder, and R.J. Kaufman, *Ligand-independent dimerization activates the stress response kinases IRE1 and PERK in the lumen of the endoplasmic reticulum.* The Journal of biological chemistry, 2000. **275**(32): p. 24881-5.
- 53. Cui, W., et al., *The structure of the PERK kinase domain suggests the mechanism for its activation.* Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography, 2011. **67**(Pt 5): p. 423-8.

- 54. Kimball, S.R., *Eukaryotic initiation factor eIF2.* The international journal of biochemistry & cell biology, 1999. **31**(1): p. 25-9.
- 55. Price, N.T., et al., *eIF2B, the guanine nucleotide-exchange factor for eukaryotic initiation factor* 2. Sequence conservation between the alpha, beta and delta subunits of *eIF2B* from mammals and yeast. The Biochemical journal, 1996. **318 (Pt 2)**: p. 637-43.
- 56. Wek, R.C., H.Y. Jiang, and T.G. Anthony, *Coping with stress: eIF2 kinases and translational control.* Biochemical Society transactions, 2006. **34**(Pt 1): p. 7-11.
- 57. Chen, J.J. and I.M. London, *Regulation of protein synthesis by heme-regulated eIF-2 alpha kinase*. Trends in biochemical sciences, 1995. **20**(3): p. 105-8.
- 58. Hamanaka, R.B., et al., *PERK and GCN2 contribute to eIF2alpha phosphorylation and cell cycle arrest after activation of the unfolded protein response pathway.* Molecular biology of the cell, 2005. **16**(12): p. 5493-501.
- 59. Deng, J., et al., *Activation of GCN2 in UV-irradiated cells inhibits translation.* Current biology : CB, 2002. **12**(15): p. 1279-86.
- 60. Berlanga, J.J., et al., *Antiviral effect of the mammalian translation initiation factor 2alpha kinase GCN2 against RNA viruses.* The EMBO journal, 2006. **25**(8): p. 1730-40.
- 61. Yang, W. and A.G. Hinnebusch, *Identification of a regulatory subcomplex in the guanine nucleotide exchange factor eIF2B that mediates inhibition by phosphorylated eIF2.* Molecular and cellular biology, 1996. **16**(11): p. 6603-16.
- 62. Krishnamoorthy, T., et al., *Tight binding of the phosphorylated alpha subunit of initiation factor* 2 (*eIF2alpha*) to the regulatory subunits of guanine nucleotide exchange factor *eIF2B* is required for inhibition of translation initiation. Molecular and cellular biology, 2001. **21**(15): p. 5018-30.
- 63. Jiang, H.Y., et al., *Activating transcription factor 3 is integral to the eukaryotic initiation factor 2 kinase stress response*. Molecular and cellular biology, 2004. **24**(3): p. 1365-77.
- 64. Harding, H.P., et al., *Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells.* Molecular cell, 2000. **6**(5): p. 1099-108.
- 65. McCullough, K.D., et al., *Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by downregulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state.* Molecular and cellular biology, 2001. **21**(4): p. 1249-59.
- 66. Rao, R.V., H.M. Ellerby, and D.E. Bredesen, *Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program.* Cell death and differentiation, 2004. **11**(4): p. 372-80.
- 67. Naidoo, N., *ER and aging-Protein folding and the ER stress response.* Ageing research reviews, 2009. **8**(3): p. 150-9.
- 68. Brush, M.H., D.C. Weiser, and S. Shenolikar, *Growth Arrest and DNA Damage-Inducible Protein GADD34 Targets Protein Phosphatase 1 to the Endoplasmic Reticulum and Promotes Dephosphorylation of the Subunit of Eukaryotic Translation Initiation Factor 2.* Molecular and cellular biology, 2003. **23**(4): p. 1292-1303.
- 69. Novoa, I., et al., *Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of elF2alpha.* The Journal of cell biology, 2001. **153**(5): p. 1011-22.
- 70. Haze, K., et al., *Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress.* Molecular biology of the cell, 1999. **10**(11): p. 3787-99.
- 71. Thuerauf, D.J., L. Morrison, and C.C. Glembotski, *Opposing roles for ATF6alpha and ATF6beta in endoplasmic reticulum stress response gene induction.* The Journal of biological chemistry, 2004. **279**(20): p. 21078-84.
- 72. Thuerauf, D.J., et al., *Effects of the isoform-specific characteristics of ATF6 alpha and ATF6 beta on endoplasmic reticulum stress response gene expression and cell viability.* The Journal of biological chemistry, 2007. **282**(31): p. 22865-78.
- 73. Cao, S.S. and R.J. Kaufman, *Unfolded protein response*. Current biology : CB, 2012. **22**(16): p. R622-6.
- 74. Ye, J., et al., *ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs.* Molecular cell, 2000. **6**(6): p. 1355-64.
- 75. Sato, Y., et al., Luminal Domain of ATF6 Alone Is Sufficient for Sensing Endoplasmic Reticulum Stress and Subsequent Transport to the Golgi Apparatus. Cell Structure and Function, 2011. **36**(1): p. 35-47.
- 76. Nyborg, A.C., et al., A signal peptide peptidase (SPP) reporter activity assay based on the cleavage of type II membrane protein substrates provides further evidence for an inverted orientation of the SPP active site relative to presenilin. The Journal of biological chemistry, 2004. **279**(41): p. 43148-56.

- 77. Lee, K., et al., *IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response.* Genes & development, 2002. **16**(4): p. 452-66.
- 78. Shang, J. and M.A. Lehrman, *Discordance of UPR signaling by ATF6 and Ire1p-XBP1 with levels of target transcripts*. Biochemical and biophysical research communications, 2004. **317**(2): p. 390-6.
- 79. Yoshida, H., et al., *Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors.* The Journal of biological chemistry, 1998. **273**(50): p. 33741-9.
- 80. Zhou, J., et al., *The crystal structure of human IRE1 luminal domain reveals a conserved dimerization interface required for activation of the unfolded protein response.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006. **103**(39): p. 14343-8.
- 81. Lee, K.P., et al., *Structure of the dual enzyme lre1 reveals the basis for catalysis and regulation in nonconventional RNA splicing.* Cell, 2008. **132**(1): p. 89-100.
- 82. Kohno, K., *How transmembrane proteins sense endoplasmic reticulum stress.* Antioxidants & redox signaling, 2007. **9**(12): p. 2295-303.
- 83. Gardner, B.M. and P. Walter, Unfolded proteins are Ire1-activating ligands that directly induce the unfolded protein response. Science, 2011. **333**(6051): p. 1891-4.
- 84. Korennykh, A. and P. Walter, *Structural basis of the unfolded protein response.* Annual review of cell and developmental biology, 2012. **28**: p. 251-77.
- 85. Credle, J.J., et al., On the mechanism of sensing unfolded protein in the endoplasmic reticulum. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(52): p. 18773-84.
- 86. Li, H., et al., *Mammalian endoplasmic reticulum stress sensor IRE1 signals by dynamic clustering.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010. **107**(37): p. 16113-8.
- 87. Korennykh, A.V., et al., *The unfolded protein response signals through high-order assembly of Ire1.* Nature, 2009. **457**(7230): p. 687-93.
- 88. Oikawa, D., et al., *An essential dimer-forming subregion of the endoplasmic reticulum stress sensor Ire1.* The Biochemical journal, 2005. **391**(Pt 1): p. 135-42.
- 89. Korennykh, A.V., et al., *Cofactor-mediated conformational control in the bifunctional kinase/RNase Ire1.* BMC biology, 2011. **9**(1): p. 48.
- 90. Korennykh, A.V., et al., *Structural and functional basis for RNA cleavage by Ire1.* BMC biology, 2011. **9**(1): p. 47.
- 91. Xue, Z., et al., A conserved structural determinant located at the interdomain region of mammalian inositol-requiring enzyme 1alpha. The Journal of biological chemistry, 2011. **286**(35): p. 30859-66.
- 92. Hollien, J. and J.S. Weissman, *Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response.* Science, 2006. **313**(5783): p. 104-7.
- 93. Kaufman, R.J. and S. Cao, *Inositol-requiring 1/X-box-binding protein 1 is a regulatory hub that links endoplasmic reticulum homeostasis with innate immunity and metabolism.* EMBO molecular medicine, 2010. **2**(6): p. 189-92.
- 94. Calfon, M., et al., *IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA.* Nature, 2002. **415**(6867): p. 92-6.
- 95. Uemura, A., et al., *Unconventional splicing of XBP1 mRNA occurs in the cytoplasm during the mammalian unfolded protein response.* Journal of cell science, 2009. **122**(Pt 16): p. 2877-86.
- 96. Wang, F.M., Y.J. Chen, and H.J. Ouyang, *Regulation of unfolded protein response modulator XBP1s by acetylation and deacetylation*. The Biochemical journal, 2010. **433**(1): p. 245-52.
- 97. Hetz, C., et al., *Unfolded protein response transcription factor XBP-1 does not influence prion replication or pathogenesis.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008. **105**(2): p. 757-62.
- 98. Lai, E., T. Teodoro, and A. Volchuk, *Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response.* Physiology, 2007. **22**: p. 193-201.
- 99. Melville, M.W., et al., *The cellular inhibitor of the PKR protein kinase, P58(IPK), is an influenza virus-activated co-chaperone that modulates heat shock protein 70 activity.* The Journal of biological chemistry, 1999. **274**(6): p. 3797-803.
- 100. Tirasophon, W., et al., *The endoribonuclease activity of mammalian IRE1 autoregulates its mRNA and is required for the unfolded protein response.* Genes & development, 2000. **14**(21): p. 2725-36.
- 101. Iwawaki, T., et al., *Translational control by the ER transmembrane kinase/ribonuclease IRE1 under ER stress*. Nature cell biology, 2001. **3**(2): p. 158-64.

- 102. Upton, J.P., et al., *IRE1alpha Cleaves Select microRNAs during ER Stress to Derepress Translation of Proapoptotic Caspase-2.* Science, 2012.
- 103. Hassler, J., S.S. Cao, and R.J. Kaufman, *IRE1, a Double-Edged Sword in Pre-miRNA Slicing and Cell Death.* Developmental cell, 2012. **23**(5): p. 921-3.
- 104. Ogata, M., et al., *Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress.* Molecular and cellular biology, 2006. **26**(24): p. 9220-31.
- 105. Xu, C., B. Bailly-Maitre, and J.C. Reed, *Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions.* The Journal of clinical investigation, 2005. **115**(10): p. 2656-64.
- 106. Lee, D.Y., J. Lee, and B. Sugden, *The unfolded protein response and autophagy: herpesviruses rule!* Journal of virology, 2009. **83**(3): p. 1168-72.
- 107. Luo, D., et al., *AIP1 is critical in transducing IRE1-mediated endoplasmic reticulum stress response.* The Journal of biological chemistry, 2008. **283**(18): p. 11905-12.
- 108. Hu, P., et al., Autocrine tumor necrosis factor alpha links endoplasmic reticulum stress to the membrane death receptor pathway through IRE1alpha-mediated NF-kappaB activation and down-regulation of TRAF2 expression. Molecular and cellular biology, 2006. **26**(8): p. 3071-84.
- 109. Sha, H., et al., *Stressed out about obesity: IRE1alpha-XBP1 in metabolic disorders.* Trends in endocrinology and metabolism: TEM, 2011. **22**(9): p. 374-81.
- 110. He, B., *Viruses, endoplasmic reticulum stress, and interferon responses.* Cell death and differentiation, 2006. **13**(3): p. 393-403.
- 111. Pasqual, G., et al., *Role of the host cell's unfolded protein response in arenavirus infection.* Journal of virology, 2011. **85**(4): p. 1662-70.
- 112. Trujillo-Alonso, V., et al., *Rotavirus infection induces the unfolded protein response of the cell and controls it through the nonstructural protein NSP3.* Journal of virology, 2011.
- 113. Bechill, J., et al., *Coronavirus infection modulates the unfolded protein response and mediates sustained translational repression.* Journal of virology, 2008. **82**(9): p. 4492-501.
- 114. Reggiori, F., et al., *Coronaviruses Hijack the LC3-I-positive EDEMosomes, ER-derived vesicles exporting short-lived ERAD regulators, for replication.* Cell host & microbe, 2010. **7**(6): p. 500-8.
- 115. Mulvey, M., C. Arias, and I. Mohr, *Maintenance of endoplasmic reticulum (ER) homeostasis in herpes simplex virus type 1-infected cells through the association of a viral glycoprotein with PERK, a cellular ER stress sensor.* Journal of virology, 2007. **81**(7): p. 3377-90.
- 116. Cheng, G., Z. Feng, and B. He, *Herpes simplex virus 1 infection activates the endoplasmic reticulum resident kinase PERK and mediates eIF-2alpha dephosphorylation by the gamma(1)34.5 protein.* Journal of virology, 2005. **79**(3): p. 1379-88.
- 117. Xuan, B., et al., *Human cytomegalovirus protein pUL38 induces ATF4 expression, inhibits persistent JNK phosphorylation, and suppresses endoplasmic reticulum stress-induced cell death.* Journal of virology, 2009. **83**(8): p. 3463-74.
- 118. Terhune, S., et al., *Human cytomegalovirus UL38 protein blocks apoptosis.* Journal of virology, 2007. **81**(7): p. 3109-23.
- 119. Buchkovich, N.J., et al., *Human cytomegalovirus induces the endoplasmic reticulum chaperone BiP through increased transcription and activation of translation by using the BiP internal ribosome entry site.* Journal of virology, 2010. **84**(21): p. 11479-86.
- 120. Buchkovich, N.J., et al., *Human cytomegalovirus specifically controls the levels of the endoplasmic reticulum chaperone BiP/GRP78, which is required for virion assembly.* Journal of virology, 2008. **82**(1): p. 31-9.
- 121. Hegde, N.R., et al., *The role of BiP in endoplasmic reticulum-associated degradation of major histocompatibility complex class I heavy chain induced by cytomegalovirus proteins.* The Journal of biological chemistry, 2006. **281**(30): p. 20910-9.
- 122. Galindo, I., et al., *The ATF6 branch of unfolded protein response and apoptosis are activated to promote African swine fever virus infection.* Cell death & disease, 2012. **3**: p. e341.
- 123. Netherton, C.L., J.C. Parsley, and T. Wileman, *African swine fever virus inhibits induction of the stress-induced proapoptotic transcription factor CHOP/GADD153.* Journal of virology, 2004. **78**(19): p. 10825-8.
- 124. Qian, Z., et al., *Murine cytomegalovirus targets transcription factor ATF4 to exploit the unfolded protein response.* Journal of virology, 2012.
- 125. Buchkovich, N.J., et al., *The endoplasmic reticulum chaperone BiP/GRP78 is important in the structure and function of the human cytomegalovirus assembly compartment.* Journal of virology, 2009. **83**(22): p. 11421-8.
- 126. Child, S.J., et al., *Double-stranded RNA binding by a heterodimeric complex of murine cytomegalovirus m142 and m143 proteins.* Journal of virology, 2006. **80**(20): p. 10173-80.

- 127. Li, B., et al., *Hepatitis B virus X protein (HBx) activates ATF6 and IRE1-XBP1 pathways of unfolded protein response.* Virus research, 2007. **124**(1-2): p. 44-9.
- 128. Tardif, K.D., et al., *Hepatitis C virus suppresses the IRE1-XBP1 pathway of the unfolded protein response.* The Journal of biological chemistry, 2004. **279**(17): p. 17158-64.
- Kazemi, S., et al., Control of alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF2 alpha) phosphorylation by the human papillomavirus type 18 E6 oncoprotein: implications for eIF2 alpha-dependent gene expression and cell death. Molecular and cellular biology, 2004.
 24(8): p. 3415-29.
- 130. Langland, J.O. and B.L. Jacobs, *Inhibition of PKR by vaccinia virus: role of the N- and C-terminal domains of E3L.* Virology, 2004. **324**(2): p. 419-29.
- 131. Li, X.D., et al., *Tula hantavirus triggers pro-apoptotic signals of ER stress in Vero E6 cells.* Virology, 2005. **333**(1): p. 180-9.
- 132. Jordan, R., et al., *Replication of a cytopathic strain of bovine viral diarrhea virus activates PERK and induces endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis of MDBK cells.* Journal of virology, 2002. **76**(19): p. 9588-99.
- 133. Yu, C.Y., et al., *Flavivirus infection activates the XBP1 pathway of the unfolded protein response to cope with endoplasmic reticulum stress.* Journal of virology, 2006. **80**(23): p. 11868-80.
- 134. Zheng, Y., et al., *Hepatitis C virus non-structural protein NS4B can modulate an unfolded protein response.* Journal of microbiology, 2005. **43**(6): p. 529-36.
- 135. Tardif, K.D., G. Waris, and A. Siddiqui, *Hepatitis C virus, ER stress, and oxidative stress.* Trends in microbiology, 2005. **13**(4): p. 159-63.
- 136. Su, H.L., C.L. Liao, and Y.L. Lin, *Japanese encephalitis virus infection initiates endoplasmic reticulum stress and an unfolded protein response.* Journal of virology, 2002. **76**(9): p. 4162-71.
- 137. Kash, J.C., et al., *Hijacking of the host-cell response and translational control during influenza virus infection.* Virus research, 2006. **119**(1): p. 111-20.
- 138. Yan, W., et al., *Control of PERK elF2alpha kinase activity by the endoplasmic reticulum stress-induced molecular chaperone P58IPK.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002. **99**(25): p. 15920-5.
- 139. Sun, M., et al., *Conserved cysteine-rich domain of paramyxovirus simian virus* 5 V protein plays an important role in blocking apoptosis. Journal of virology, 2004. **78**(10): p. 5068-78.
- 140. Dimcheff, D.E., et al., *Endoplasmic reticulum (ER) stress induced by a neurovirulent mouse retrovirus is associated with prolonged BiP binding and retention of a viral protein in the ER.* The Journal of biological chemistry, 2004. **279**(32): p. 33782-90.
- 141. Baltzis, D., et al., *Resistance to vesicular stomatitis virus infection requires a functional cross talk between the eukaryotic translation initiation factor 2alpha kinases PERK and PKR.* Journal of virology, 2004. **78**(23): p. 12747-61.
- 142. de Silva, A., I. Braakman, and A. Helenius, *Posttranslational folding of vesicular stomatitis virus G protein in the ER: involvement of noncovalent and covalent complexes.* The Journal of cell biology, 1993. **120**(3): p. 647-55.
- 143. Harvey, D.M. and A.J. Levine, *p53 alteration is a common event in the spontaneous immortalization of primary BALB/c murine embryo fibroblasts.* Genes & development, 1991. **5**(12B): p. 2375-85.
- 144. Yang, Y.L., et al., *Deficient signaling in mice devoid of double-stranded RNA-dependent protein kinase.* The EMBO journal, 1995. **14**(24): p. 6095-106.
- 145. Kinsella, T.M. and G.P. Nolan, *Episomal vectors rapidly and stably produce high-titer recombinant retrovirus.* Human gene therapy, 1996. **7**(12): p. 1405-13.
- 146. Bresnahan, W.A., G.E. Hultman, and T. Shenk, *Replication of wild-type and mutant human cytomegalovirus in life-extended human diploid fibroblasts.* Journal of virology, 2000. **74**(22): p. 10816-10818.
- 147. Brune, W., et al., *A ribonucleotide reductase homolog of cytomegalovirus and endothelial cell tropism.* Science, 2001. **291**(5502): p. 303-5.
- 148. Mohr, H., et al., *Cytomegalovirus replicon-based regulation of gene expression in vitro and in vivo.* PLoS pathogens, 2012. **8**(6): p. e1002728.
- 149. Marschall, M., et al., *Recombinant green fluorescent protein-expressing human cytomegalovirus as a tool for screening antiviral agents.* Antimicrobial agents and chemotherapy, 2000. **44**(6): p. 1588-97.
- 150. Osborn, J.E. and D.L. Walker, *Enhancement of infectivity of murine cytomegalovirus in vitro by centrifugal inoculation.* Journal of virology, 1968. **2**(9): p. 853-8.

- Cushley, W., H.H. Singer, and A.R. Williamson, *Co-operative nature of N-glycosylation of proteins at multiple sites: evidence from studies with tunicamycin.* Bioscience reports, 1983. 3(4): p. 331-6.
- 152. Bubeck, A., et al., Comprehensive mutational analysis of a herpesvirus gene in the viral genome context reveals a region essential for virus replication. Journal of virology, 2004. **78**(15): p. 8026-35.
- 153. Child, S.J., et al., *Evasion of Cellular Antiviral Responses by Human Cytomegalovirus TRS1 and IRS1.* Journal of virology, 2003. **78**(1): p. 197-205.
- 154. Pavio, N., et al., *Protein synthesis and endoplasmic reticulum stress can be modulated by the hepatitis C virus envelope protein E2 through the eukaryotic initiation factor 2alpha kinase PERK.* Journal of virology, 2003. **77**(6): p. 3578-85.
- 155. Ma, Y. and L.M. Hendershot, *Delineation of a negative feedback regulatory loop that controls protein translation during endoplasmic reticulum stress.* The Journal of biological chemistry, 2003. **278**(37): p. 34864-73.
- 156. Chou, J. and B. Roizman, *Herpes simplex virus 1 gamma(1)34.5 gene function, which blocks the host response to infection, maps in the homologous domain of the genes expressed during growth arrest and DNA damage.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994. **91**(12): p. 5247-51.
- 157. Budt, M., et al., Specific inhibition of the *PKR-mediated antiviral response by the murine cytomegalovirus proteins m142 and m143.* Journal of virology, 2009. **83**(3): p. 1260-70.
- 158. Langland, J.O., et al., *Inhibition of PKR by RNA and DNA viruses.* Virus research, 2006. **119**(1): p. 100-10.
- 159. Hong, M., et al., *Endoplasmic reticulum stress triggers an acute proteasome-dependent degradation of ATF6.* Journal of cellular biochemistry, 2004. **92**(4): p. 723-32.
- 160. Luo, S., et al., *Induction of Grp78/BiP by translational block: activation of the Grp78 promoter by ATF4 through and upstream ATF/CRE site independent of the endoplasmic reticulum stress elements.* The Journal of biological chemistry, 2003. **278**(39): p. 37375-85.
- 161. Clemens, M.J., *PKR--a protein kinase regulated by double-stranded RNA.* The international journal of biochemistry & cell biology, 1997. **29**(7): p. 945-9.
- 162. Shi-Chen Ou, D., et al., *Transcriptional activation of endoplasmic reticulum chaperone GRP78* by HCMV IE1-72 protein. Cell research, 2011. **21**(4): p. 642-53.
- 163. Hetz, C. and L.H. Glimcher, *Fine-tuning of the unfolded protein response: Assembling the IRE1alpha interactome.* Molecular cell, 2009. **35**(5): p. 551-61.
- 164. Rupp, B., et al., *Random screening for dominant-negative mutants of the cytomegalovirus nuclear egress protein M50.* Journal of virology, 2007. **81**(11): p. 5508-17.
- 165. Gao, B., et al., Synoviolin promotes *IRE1* ubiquitination and degradation in synovial fibroblasts from mice with collagen-induced arthritis. EMBO reports, 2008. **9**(5): p. 480-5.
- 166. Niwa, M., et al., A role for presenilin-1 in nuclear accumulation of Ire1 fragments and induction of the mammalian unfolded protein response. Cell, 1999. **99**(7): p. 691-702.
- 167. Lisbona, F., et al., *BAX inhibitor-1 is a negative regulator of the ER stress sensor IRE1alpha.* Molecular cell, 2009. **33**(6): p. 679-91.
- 168. Castillo, K., et al., *BAX inhibitor-1 regulates autophagy by controlling the IRE1alpha branch of the unfolded protein response.* The EMBO journal, 2011.
- 169. Cebulski, J., et al., Yeast Bax Inhibitor, Bxi1p, Is an ER-Localized Protein That Links the Unfolded Protein Response and Programmed Cell Death in Saccharomyces cerevisiae. PloS one, 2011. **6**(6): p. e20882.
- 170. Moorman, N.J., et al., *Human cytomegalovirus protein UL38 inhibits host cell stress responses by antagonizing the tuberous sclerosis protein complex.* Cell host & microbe, 2008. **3**(4): p. 253-62.
- 171. Marcu, M.G., et al., *Heat Shock Protein 90 Modulates the Unfolded Protein Response by Stabilizing IRE1* Molecular and cellular biology, 2002. **22**(24): p. 8506-8513.
- 172. Weihofen, A. and B. Martoglio, *Intramembrane-cleaving proteases: controlled liberation of proteins and bioactive peptides.* Trends in cell biology, 2003. **13**(2): p. 71-8.
- 173. Hosaka, M., et al., Arg-X-Lys/Arg-Arg motif as a signal for precursor cleavage catalyzed by furin within the constitutive secretory pathway. The Journal of biological chemistry, 1991. **266**(19): p. 12127-30.
- 174. Haass, C. and H. Steiner, *Alzheimer disease gamma-secretase: a complex story of GxGD-type presenilin proteases.* Trends in cell biology, 2002. **12**(12): p. 556-62.
- 175. Fujita, N., et al., Acceleration of apoptotic cell death after the cleavage of Bcl-XL protein by caspase-3-like proteases. Oncogene, 1998. **17**(10): p. 1295-304.
- 176. Anantharam, V., et al., Caspase-3-dependent proteolytic cleavage of protein kinase Cdelta is essential for oxidative stress-mediated dopaminergic cell death after exposure to

methylcyclopentadienyl manganese tricarbonyl. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 2002. **22**(5): p. 1738-51.

- 177. Datta, R., et al., Caspase-3-mediated cleavage of protein kinase C theta in induction of apoptosis. The Journal of biological chemistry, 1997. **272**(33): p. 20317-20.
- 178. Kitazawa, M., V. Anantharam, and A.G. Kanthasamy, *Dieldrin induces apoptosis by promoting caspase-3-dependent proteolytic cleavage of protein kinase Cdelta in dopaminergic cells: relevance to oxidative stress and dopaminergic degeneration.* Neuroscience, 2003. **119**(4): p. 945-64.
- 179. Cheung, H.H., et al., *Involvement of caspase-2 and caspase-9 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: a role for the IAPs.* Experimental cell research, 2006. **312**(12): p. 2347-57.
- 180. Chiang, W.C., C. Messah, and J.H. Lin, *IRE1 directs proteasomal and lysosomal degradation of misfolded rhodopsin.* Molecular biology of the cell, 2012. **23**(5): p. 758-70.
- 181. Lin, J.H., et al., *IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response.* Science, 2007. **318**(5852): p. 944-9.
- 182. Glickman, M.H. and A. Ciechanover, *The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction.* Physiological reviews, 2002. **82**(2): p. 373-428.
- 183. Muller, S., et al., *SUMO, ubiquitin's mysterious cousin.* Nature reviews. Molecular cell biology, 2001. **2**(3): p. 202-10.
- 184. Hay, R.T., SUMO: a history of modification. Molecular cell, 2005. 18(1): p. 1-12.
- 185. Wang, Y.T., et al., *Sumoylation of specificity protein 1 augments its degradation by changing the localization and increasing the specificity protein 1 proteolytic process.* Journal of molecular biology, 2008. **380**(5): p. 869-85.
- 186. Fliss, P.M., et al., *Viral mediated redirection of NEMO/IKKgamma to autophagosomes curtails the inflammatory cascade.* PLoS pathogens, 2012. **8**(2): p. e1002517.
- 187. Matsushita, M., et al., *Structure of Atg5.Atg16, a complex essential for autophagy.* The Journal of biological chemistry, 2007. **282**(9): p. 6763-72.
- 188. Codogno, P. and A.J. Meijer, *Atg5: more than an autophagy factor.* Nature cell biology, 2006. **8**(10): p. 1045-7.
- 189. Matsushita, M., et al., *Expression, purification and crystallization of the Atg5-Atg16 complex* essential for autophagy. Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications, 2006. **62**(Pt 10): p. 1021-3.

6. Anhang

6.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Querschnitt durch die äußere Hüllmembran und das	
Kapsid eines typischen Herpesviruspartikels	1
Abbildung 2: Unfolded Protein Response (UPR).	5
Abbildung 3: Der PERK-Signalweg.	7
Abbildung 4: Der ATF6-Signalweg.	9
Abbildung 5: Der IRE1-Signalweg	10
Abbildung 6: MCMV induziert keine Phosphorylierung von eIF2α	39
Abbildung 7: MCMV kann die Phosphorylierung von eIF2α nicht verhindern, wenn	
exogen ER-Stress durch Tg induziert wird.	39
Abbildung 8: MCMV induziert keine CHOP-Expression	40
Abbildung 9: MCMV kann die CHOP-Expression bei exogener ER-Stress Induktion	۱
durch Tm nicht verhindern	41
Abbildung 10: Aktivierung von ATF6 während der Infektion mit MCMV	42
Abbildung 11: Induktion von BiP während der MCMV Infektion	43
Abbildung 12: MCMV induziert XBP-1-Spleißen zu frühen Zeitpunkten der Infektior	۱.
	45
Abbildung 13: MCMV supprimiert das XBP-1-Spleißen selbst bei exogener ER-Stre	ess
Induktion	46
Abbildung 14: MCMV supprimiert das XBP-1-Spleißen selbst bei exogener ER-Stre	ess
Induktion	47
Abbildung 15: Silbergel der α-HA-aufgereinigten Lysatproben	48
Abbildung 16: Kolokalisation von M50 und IRE1	50
Abbildung 17: Co-Immunopräzipitation von IRE1 und M50	51
Abbildung 18: Co-Immunopräzipitation von M50 und IRE1	52
Abbildung 19: Co-Immunopräzipitation von IRE1 und M50 während der MCMV-	
Infektion	52
Abbildung 20: Reduktion des IRE1-Levels durch Co-Transfektion eines M50-	
5	
Expressionsplasmids	53
Expressionsplasmids Abbildung 21: Reduktion der Menge von aktiviertem und inaktiviertem IRE1	53 54

Abbildung 23: Eine MCMV-Infektion führt zu einem geringen Anstieg des IRE1-	
mRNA-Menge5	55
Abbildung 24: Schematische Darstellung der konstruierten M50-	
Verkürzungsmutanten	57
Abbildung 25: Untersuchung der Verkürzungsmutanten in Bezug auf ihre IRE1-	
Degradation	58
Abbildung 26: Interaktion von IRE1 mit den N-terminalen M50-Verkürzungsmutanter	า. 59
Abbildung 27: MCMV-Kontrolle supprimiert das XBP-1-Spleißen selbst bei exogenei	r
ER-Stress Induktion	30
Abbildung 28: IRE1-Expression in MCMV-Kontrolle und MCMV-ΔM50 infizierten	
Zellen6	51
Abbildung 29: HCMV supprimiert ebenfalls das XBP-1-Spleißen selbst bei exogener	•
ER-Stress Induktion	<u>5</u> 2
Abbildung 30: Co-Immunopräzipitation von IRE1 und M50 bzw. UL50 6	53
Abbildung 31: Reduktion der hIRE1-Menge in Transfektions- und	
Infektionsexperimenten6	، 4
Abbildung 32: Versuch einen proteasomalen bzw. lysosomalen Abbau von IRE1 zu	
verhindern	5 5

6.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Viren und ihre Interaktion mit der UPR	13
Tabelle 2: Zelllinien	14
Tabelle 3: Viren	15
Tabelle 4: Bakterien und Medien	15
Tabelle 5: Antibiotika	15
Tabelle 6: Plasmide	16
Tabelle 7: Oligonukleotide	17
Tabelle 8: Primäre Antikörper	19
Tabelle 9: Sekundäre Antikörper	20
Tabelle 10: SDS-Gelzusammensetzung	35
Tabelle 11: getestete Inhibitoren	66
Tabelle 12: Zusammestellung der verwendeten Gefahrenstoffe	89

6.3. Gefahrenstoffe

Tabelle 12: Zusammenstellung der verwendeten Gefahrenstoffe

Gefahrenstoff	Gefahrensymbol	R-Sätze	S-Sätze
2-Mercaptoethanol	T, N	R 22-24-34-	S 26-
		51/53	36/37/39-45-
			61
Acrylamid	Т	R 45-46-20/21-	S 53-45-24-
		25-36/38-	36/37
		43-	
		48/23/24/25-62	
AEBSF	С	R34	S26-
			36/37/39-45
Ammoniumpersulfat	O, Xn	R 8-22-	S 22-24-26-
		36/37/38-42/43	37
Ampicilin	Т	R 21/22-	S 24-26-
		36/37/38-46-	36/37/39-45-
		60-61	46-53
Bafilomycin A	Xi	R36/37/38	S26-36
Bisacrylamid	Xn	R 22-20/21/22	S 24/25-36/37
Dimethylsulfoxid	Xi	R 20/22-	S 23-26-
		36/37/38	36/37/39
Dithiothreitol	Xn	R 22-36/38	S 24/25
EDTA	Xi	R 36	S (2)-26
Essigsäure	С	R 10-35	S 1/2-23-26-
			36/37/39-45
Ethanol	F	R 11	S 2-7-16
Ethidiumbromid	T+	R 20-22-26-	S 1/2-20/21-
		36/37/38-40-68	26-28-36/37-
			45-63
flüssiger Stickstoff	-	-	S 9-36/37/39-
			51
Formaldehydlösung	Т	R 23/24/25-34-	S 1/2-26-
		40-43	36/37/39-45-
			51

Hygromycin B	T+	R 27/28-37/38-	S (1/2)-26-
		41	27/28-
			36/37/39-
			45
Isopropanol	F, Xi	R 11-36-67	S 7-16-23-
			24/25/26-51
Methanol	F, T	R 11-23/24/25-	S 7-16-36/37-
		39/23/24/25	45
N,N,N',N'-Tetrakis(2-	Xi	R36/37/38	S26-36
pyridylmethyl)ethylenediamine			
Natriumazid	T+, N	R 28-32-50/53	S 28.1-45-60-
			61
Natriumdodecylsulfat	F, Xn	R 11-21/22-	S 26-36/37
		36/37/38	
Natriumhydroxid	С	R 35	S 1/2-26-
			37/39-45
Paraformaldehyd	O, Xn	R 20/22-	S 22-26-
		36/37/38-40-43	36/37
Penicillin	Xi	R 42/43	S 36/37/38-45
Salzsäure 37%	С	R 34-37	S 1/2-26-
			36/37/39-45
Streptomycin	Xi	R 42/43	S 36/37/38
TEMED	С, О	R 11-20/22-34	S (1/2)-16-26-
			36/37/39-45
Thapsigargin	Xn	R36/37/38-42	S26-36/37/39
TLCK	Xi	R36/37/38	S26-36
TPCK	Xi	R37/38-41	S26-36
Triton X-100	Xn	R 22-41	S 24-26-39
Tunicamycin	T+	R28	S28-37/39-45

6.4. Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
APS	Ammoniumpersulfat
ASK	apoptosis signal regulating kinase 1
ATF4	aktivierender Transkriptionsfaktor 4
ATF6	aktivierender Transkriptionsfaktor 6
ATP	Adenosintriphosphat
Bax	Bcl-2 Associated X protein
Bcl-2	Bcl-2 like X protein large
BiP	Immunoglobulin bindendes Protein
BSA	Rinderserumalbumin
CHOP	C/EBP-homologous protein
CMV	Cytomegalovirus
DAPI	4´,6´-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleinsäure
dNTPs	Deoxynukleosidtriphosphate
ds	doppelsträngig
dsDNA	doppelsträngige DNA
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
E	früh
E. coli	Escherichia coli
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamtetraessigsäure
elF2α	eukaryotischen Initiationsfaktor 2α
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER associated protein degradation
EtOH	Ethanol
FCS	Fötales Kälberserum
g	Erdschwerebeschleunigungs-konstante
GADD153	growth arrest and DNA-damage-inducible protein 153

gB	Glykoprotein G
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GRP78	Glukose reguliertes Protein 78
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
НА	Hämagglutinin
HCMV	humanes Cytomegalovirus
hpi	Stunden nach Infektion
HRP	Meerrettichperoxidase
HSP	Hitzeschockprotein
HSV-1	Herpes-Simplex-Virus-1
IE	sehr früh
lgG	Immunglobulin G
IRE1	Inositol benötigendes Enzym 1
JNK	Jun-amino-terminal kinase
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
КМ	Kernmembran
KSHV	Kaposi-Sarkom-assoziierte-Herpes-Virus
L	spät
MCMV	murines Cytomegalovirus
Met-tRNAi ^{Met}	aminoacylated initiator methionyl-tRNA
min	Minuten
MMuLV	Moloney Murine Leukemia Virus
MOI	Multiplicity of Infection
mRNA	messenger RNA
NCS	Neugeborenes Kälber Serum
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen
oriLyt	Lytischer Replikationsursprung
PAGE	Poly-Acrylamid-Gel-Elektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung

PCR	Polymerasekettenreaktion
PERK	Proteinkinase R ähnliche ER-Kinase
PFA	Paraformaldehyd
PKC	Proteinkinase C
PKR	Proteinkinase R
RIPA	radio immunoprecipitation buffer
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris/Acetat/EDTA-Puffer
TBE	Tris/Borat/EDTA-Puffer
TCID	tissue culture infection dose
TEMED	N, N, N´, N´-Tetramethylethylendiamin
Tg	Thapsigargin
TLCK	N_{α} -Tosyl-L-lysin Chloromethyl Keton Hydrochlorid
Tm	Hybridisierungstemperatur/ Tunicamycin
ТРСК	N-p-Tosyl-L-phenylalanin Chloromethyl Keton
TRAF2	TNF receptor-associated factor 2
U	Unit
UPR	Unfolded Protein Response
wt	Wildtyp
XBP-1	X-box bindendes Protein 1

6.5. Lebenslauf

1) Generelle Informationen:

Sebastian Stahl geboren 17. September 1981 in Würzburg

2) Akademische Ausbildung:

August 1988 bis Januar 1991	Grundschule Hemmingen
Januar 1991 bis August 1992	Grundschule Essen-Burgaltendorf
August 1992 bis Juni 2001	Gymnasium Essen-Überruhr
	Abitur 2001

3) Zivildienst:

August 2001 bis Mai 2002	Comenius-Schule Essen (Schule für
	körperlich und geistig behinderte Menschen)

4) Wissenschaftliche Ausbildung:

WS 2002/03 bis SS 2007	Biochemiestudium an der Ruhr Universität
	Bochum
SS 2005	Bachelor of Science
SS 2007	Master of Science
1. Februar 2008 bis	
1. September 2010	Promotion am Robert-Koch Institut,
	Berlin
1. September 2010 bis	
Januar 2013	Wechsel an das Heinrich-Pette-Institut für
	Virologie und Immunologie an der Universität
	Hamburg
5) Weitere Ausbildung:	
3. bis 28. Juni 2002	Praktikum in einem Forschungslabor der
	Innoron Klinik (Concor Doccarch) West

Inneren Klinik (Cancer Research) West German Cancer Center, Essen SS 2007 FELASA Kurs B bei der Bayer HealthCare AG in Wuppertal

6.6. Publikationen

Sebastian Stahl, René Zahedi, Florian Hinte, Zsolt Ruzsics, Boaz Tirosh, Albert Sickmann, Matthias Budt, Wolfram Brune, *"Cytomegalovirus Downregulates IRE1 to Repress the Unfolded Protein Response"*, Manuskript in Vorbereitung

6.7. Vorträge

<u>S. Stahl</u>, W. Brune and M. Budt; Murine Cytomegalovirus Regulates the Unfolded Protein Response

- Joint Scientific Retreat, Heinrich-Pette Institute, Hamburg, November 2010

- 6th Mini-Herpesvirus Workshop, Berlin, September 2011

<u>S. Stahl,</u> R. Zahedi, Z. Ruzsics, A. Sickmann, M. Budt, W. Brune; Modulation of the Unfolded Protein Response by Murine Cytomegalovirus

- Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie (GfV), Essen, März 2012

 - 36th Annual International Herpesvirus Workshop, Calgary, Kanada, August 2012

6.8. Poster

<u>S. Stahl</u>, W. Brune and M. Budt; Murine Cytomegalovirus Regulates the Unfolded Protein Response

- Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie (GfV), Leipzig, März 2009

- vierter Europäischer Kongress für Virologie, Cernobbio, Italien, April 2010

- Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie (GfV), Freiburg, März 2011

<u>S. Stahl</u>, R. Zahedi, Z. Ruzsics, A. Sickmann, M. Budt, W. Brune; Modulation of the Unfolded Protein Response by Murine Cytomegalovirus

- 36th Annual International Herpesvirus Workshop, Calgary, Kanada, August
 2012

6.9. Stipendien

"Young scientists travel award" von der Gesellschaft für Virologie für die Teilnahme an der Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie (GfV), Essen, März 2012

"Pre-meeting International Award" für die Teilnahme am 36th Annual International Herpesvirus Workshop, Calgary, Kanada, August 2012

6.10. Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Wolfram Brune möchte ich mich für die Betreuung dieser Arbeit und die geführten hilfreichen Diskussionen bedanken.

Besonderer Dank gilt Dr. Matthias Budt. Er betreute mich zu Beginn dieser Arbeit während des praktischen Teils im Labor und unterstützte mich durch sein großes Interesse und seiner Diskussionsbereitschaft. Auch für die Bereitstellung des Themas möchte ich ihm danken.

Herrn Prof. Dr. Heisig danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Dank auch an alle meine Mitarbeiter der Arbeitsgruppe am RKI und HPI, im Einzelnen Etti, Jette, Uwe, Mohammed, Katrin, Wiebke, Patricia, Eva, Florian, Tim, Jiajia, Bing, Eleonore, Julia, Martina, Gabi, Doris, Christina und Antonio. Durch die Unterstützung und die guten Ratschläge bei den Versuchen und den Spaß den wir außerhalb des Labors zusammen hatten, war das Promovieren in der Arbeitsgruppe sehr angenehm.

Bei meinen Eltern und meiner Familie möchte ich mich ganz besonders bedanken. Ohne eure Unterstützung in vielerlei Hinsicht wäre wahrscheinlich nicht alles so reibungslos verlaufen.

6.11. Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel: "Modulation der *Unfolded Protein Response* durch das murine Cytomegalovirus" selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe. Des Weiteren versichere ich, dass ich die Dissertation an keiner anderen Hochschule als Dissertation eingereicht oder veröffentlicht habe.

Hamburg, Januar 2013

Sebastian Stahl