Aktivierung von NF-kB durch das murine Cytomegalovirus-Protein M45

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

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

> vorgelegt von Eva Krause aus Dresden

> > Juni 2014

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: 05.09.2014

Wenn das Gehirn des Menschen so einfach wäre, dass wir es verstehen könnten, dann wären wir so dumm, dass wir es doch nicht verstehen würden. (Jostein Gaarder)

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	7
Summary	8
1 Einleitung	9
1.1 Cytomegalovirus	9
1.1.1 Klassifizierung, Viruspartikel und Replikationszyklus	9
1.1.2 Epidemiologie und Pathogenese	12
1.2 NF-κB Signalweg und angeborene Immunantwort	13
1.2.1 Der Transkriptionsfaktor NF-кВ	13
1.2.2 Funktion von NF-кВ in der angeborenen Immunantwort	16
1.2.3 Pathogendetektion und NF-kB-Aktivierung in der angeborenen Immunantwort	17
1.2.3.1 NF-кB-Aktivierung durch Toll-like-Rezeptoren	17
1.2.3.2 NF-kB-Aktivierung durch zytoplasmatische Mustererkennungsrezeptoren	21
1.2.3.3 NF-кB-Aktivierung durch Zytokinrezeptoren	23
1.3 Modulation der angeborenen Immunantwort und der NF-KB-Aktivität durch CMV	24
1.3.1 Immunmodulation durch das MCMV-Protein M45	27
1.4 Zielsetzung	30
2 Material und Methoden	31
2.1 Material	31
2.1.1 Zelllinien	31
2.1.2 Viren	32
2.1.3 Bakterien	33
2.1.4 Plasmide	33
2.1.5 Primer und Oligos	35
2.1.6 Antikörper	38
2.1.7 Chemikalien und Reagenzien	39
2.1.8 Medien, Puffer und Lösungen	41
2.1.9 Kits	43
2.1.10 Geräte	43
2.2 Methoden	45
2.2.1 Molekularbiologische Methoden	45
2.2.1.1 Herstellung elektrokompetenter Bakterien, Transformation und Lagerung	45
2.2.1.2 DNA-Präparation aus Bakterien	45
2.2.1.3 Polymerase Chain Reaction, Restriktionsverdau und DNA-Ligation	46
2.2.1.4 Agarose-Gelelektrophorese und Aufreinigung von DNA-Fragmenten	46
2.2.1.5 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA-Präparationen	47

2.2.1.6 DNA-Sequenzierung	47
2.2.1.7 BAC-Mutagenese	47
2.2.1.8 4sU-Markierung und qRT-PCR	48
2.2.2 Zellbiologische und virologische Methoden	48
2.2.2.1 Zellkultivierung, Einfrieren und Auftauen von Zellen	48
2.2.2.2 Transfektion von Zellen	49
2.2.2.3 Herstellung von Viruspräparationen	49
2.2.2.4 Bestimmung des Titers von Viruspräparationen und Infektion von Zellen	50
2.2.2.5 UV-Inaktivierung von Viren	50
2.2.2.6 Gradientenaufreinigung von Virionen	50
2.2.2.7 Anzucht von Retroviren und retrovirale Transduktion	51
2.2.2.8 Herstellung M45-exprimierender NIH3T3-Zellen	51
2.2.2.9 Zellviabilitätsassay	52
2.2.3 Proteinbiochemische Methoden	52
2.2.3.1 Herstellung von Zelllysaten und Bestimmung der Proteinkonzentration	52
2.2.3.2 Fraktionierung von Zytoplasma und Zellkern	53
2.2.3.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot	53
2.2.3.4 Koimmunpräzipitation	54
2.2.3.5 Immunfluoreszenz	54
2.2.3.6 NF-кB-Reporterassay	55
3 Ergebnisse	56
з.1 M45 induziert die Aktivierung von NF-кВ unmittelbar nach der Infektion	56
3.2 Die M45-Interaktionspartner RIP1 und NEMO tragen zu der initialen NF-κB-Aktivieru	ing
bei	60
3.3 Die verzögerte, M45-unabhängige NF-кB-Aktivierung involviert TRIF-abhängige TLF	२-
Signalwege	65
3.4 Die Interaktion von M45 mit RIP1 und NEMO ist nicht ausreichend für die NF-κB-	
Aktivierung in infizierten Zellen	67
3.5 M45 induziert NF-кB-abhängige Genexpression	71
3.6 Das Virion-assoziierte M45 induziert die frühe NF-κB-Aktivierung in infizierten Zellen	74
4 Diskussion	78
4.1 Aktivierung von NF-кВ durch MCMV	78
- 4.2 Mechanismus der M45-induzierten NF-κB-Aktivierung	80
4.2.1 Rolle von RIP1 und NEMO bei der M45-induzierten NF-κB-Aktivierung	80
4.2.2 Einfluss der N- und C-terminalen Domänen von M45 auf die NF-κB-Aktivierung	82
4.2.3 NF-κB-Aktivierung durch das Virion-assoziierte M45	82
4.3 Bedeutung von NF-κB für Virusinfektionen und virale Modulation der NF-κB-Aktivität	84

4.4 NF-κB-Regulation im Verlauf der MCMV-Infektion	86
5 Literaturverzeichnis	89
6 Anhang	105
6.1 Publikationen und Vorträge	105
6.2 Abkürzungen	
6.3 Gefahrstoffe	
6.4 Lebenslauf	110
6.5 Danksagung	111
6.6 Eidesstattliche Versicherung	111

Zusammenfassung

Der Transkriptionsfaktor NF-κB reguliert eine Vielzahl biologischer Prozesse und spielt vor allem in der angeborenen Immunantwort, dem Zelltod und der Zellproliferation eine wichtige Rolle. Die Aktivierung von NF-κB kann sowohl positive als auch negative Auswirkungen auf die virale Replikation haben. Im Zuge der angeborenen Immunantwort induziert NF-κB die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine, Chemokine und Zelladhäsionsmoleküle, was der Bekämpfung der Virusinfektion dient. NF-κB induziert jedoch auch die Expression antiapoptotischer und proliferationsfördernder Proteine, was das Überleben infizierter Zellen begünstigt. Aufgrund dieser ambivalenten Funktion von NF-κB regulieren viele Viren die NF-κB-Aktivität auf komplexe Weise und exprimieren häufig sowohl NF-κB-aktivierende als auch NF-κB-inhibierende Proteine.

Das murine Cytomegalovirus (MCMV) induziert zu Beginn der Infektion eine kurzzeitige Aktivierung von NF-κB. Zu späteren Zeitpunkten wird die NF-κB-Aktivierung jedoch blockiert. In vorangegangenen Studien wurde gezeigt, dass das virale Protein M45 für die NF-κB-Inhibition verantwortlich ist. M45 interagiert mit der IκB-Kinase (IKK)-Untereinheit NEMO (NF-κB essential modulator) und induziert deren Degradation, was zur Blockierung aller kanonischen NF-κB-Signalwege führt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen erstmals, dass M45 auch die initiale NF-κB-Aktivierung nach Infektion induziert. In murinen Fibroblasten, die mit einem M45-defizienten Virus infiziert werden, findet keine sofortige NF-κB-Aktivierung statt. Die initiale NF-κB-Aktivierung ist blockiert in Zellen, die kein NEMO besitzen und stark reduziert in Zellen, denen RIP1 (receptor-interacting protein 1) fehlt, ein bekannter Interaktionspartner von M45. Bei Plasmid-vermittelter Expression induzieren alle M45-Verkürzungsmutanten, die mit RIP1 und NEMO interagieren können, die Aktivierung eines NF-κB-abhängigen Reportergens. Im Kontext der Virusinfektion ist die Interaktion mit RIP1 und NEMO jedoch nicht ausreichend für die NF-κB-Aktivierung. Zusätzlich ist die Inkorporation von M45 in Viruspartikel nötig. Dies ist abhängig von einem Bereich im C-Terminus des M45-Proteins, der nicht für die Interaktion mit RIP1 und NEMO benötigt wird. Nur das virion-assoziierte M45, nicht jedoch das neusynthetisierte M45, ist in der Lage, NF-κB in infizierten Zellen zu aktivieren.

Die Resultate dieser Arbeit erweitern das Verständnis der komplexen und dynamischen Immunmodulation durch MCMV. Sie zeigen, dass M45 eine duale Rolle bei der NF-κB-Regulation in infizierten Zellen spielt und ermöglichen die Aufstellung folgenden Modells: Das mit den Viruspartikeln in die Zelle gelangende M45 interagiert mit RIP1 und NEMO, was initial die Aktivierung von NF-κB induziert. Dem folgt die M45-vermittelte Degradation von NEMO, die zu einer dauerhaften NF-κB-Inhibition führt.

7

Summary

Transcription factor NF- κ B regulates numerous biological processes and plays an especially important role in the innate immune response, cell death and cell proliferation. The activation of NF- κ B can have both beneficial and detrimental effects on viral replication. NF- κ B induces the production of proinflammatory cytokines, chemokines and cell adhesion molecules, which are essential components of the innate immune response serving to counteract viral infection. However, NF- κ B also induces the expression of anti-apoptotic and proproliferative proteins, which promotes the survival of infected cells. Due to this ambivalent function of NF- κ B many viruses regulate the NF- κ B activity in a complex manner and often express both NF- κ B-activating and NF- κ B-inhibiting proteins.

The murine cytomegalovirus (MCMV) induces a brief and transient activation of NF-κB immediately after infection, but blocks NF-κB activation at later times. Previous studies have shown that the viral protein M45 is responsible for the NF-κB inhibition. M45 interacts with the IκB kinase (IKK) subunit NEMO (NF-κB essential modulator) and induces its degradation, which leads to the inhibition of all canonical NF-κB pathways.

The results presented here show for the first time that M45 also induces the activation of NF- κ B immediately after infection. In murine fibroblasts infected with an M45-deficient virus, no rapid NF- κ B activation can be observed. The initial NF- κ B activation is abolished in cells that do not express NEMO and strongly reduced in cells lacking RIP1 (receptor-interacting protein 1), a known interaction partner of M45. When M45 is expressed from a plasmid, all M45 mutants that are capable of interacting with RIP1 and NEMO can also induce the expression of an NF- κ B-dependent reporter gene. However, in the context of a viral infection, the interaction with RIP1 and NEMO is not sufficient to induce NF- κ B activation. In addition, the incorporation of M45 into viral particles is required. This depends on a C-terminal region of the M45 protein that is not required for the interaction with RIP1 and NEMO. Only the virion-associated M45, but not the newly synthesized M45, is capable of activating NF- κ B upon viral infection.

The data of this study expand the knowledge and understanding of the complex and dynamic immune modulation of MCMV. They demonstrate a dual role of M45 in the regulation of NF- κ B in infected cells and allow the proposition of the following model: M45 that is delivered to the cell by viral particles interacts with RIP1 and NEMO, which initially activates NF- κ B. Subsequently, M45 induces the degradation of NEMO leading to a permanent inhibition of NF- κ B.

1 Einleitung

1.1 Cytomegalovirus

1.1.1 Klassifizierung, Viruspartikel und Replikationszyklus

Das Cytomegalovirus (CMV) gehört zu den Herpesviren, eine Gruppe großer DNA-Viren, die sich durch eine charakteristische Virionmorphologie auszeichnet [1]. Die Virionen dieser Virusgruppe haben einen Durchmesser von 200-300 nm und sind von einer Lipidmembran umhüllt, in die virale Glykoproteine eingelagert sind [2] (Abb. **1.1**). Die Membran umschließt das Tegument, eine Struktur, die hauptsächlich aus viralen Proteinen besteht [3]. In das Tegument ist das ikosaedrische Kapsid eingebettet, in dem sich das Virusgenom befindet [4]. Alle Herpesviren besitzen ein lineares, doppelsträngiges DNA-Genom. Das CMV-Genom ist mit etwa 235 kb das größte Genom der humanen Herpesviren und umfasst etwa 200 Gene [5].



В



Abb. 1.1: Viruspartikel der Herpesviren (A) Schematische Darstellung (B) Elektronenmikroskopische Aufnahme (Quelle: http://web.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/emimages.html)

Innerhalb der Familie der *Herpesviridae* wird CMV in die Unterfamilie der β -Herpesvirinae eingeordnet. Die drei Unterfamilien der *Herpesviridae* (α -, β - und γ -Herpesviren) unterscheiden sich in einigen Merkmalen, wozu die Dauer des Replikationszyklus, der Ort der Latenz und die Wirtspezifität gehören [6]. β -Herpesviren besitzen ein enges Wirtsspektrum, weshalb das humane Cytomegalovirus (HCMV) nicht im Modellorganismus Maus untersucht werden kann [7]. Aus diesem Grund wird das murine Cytomegalovirus (MCMV) als Modell für HCMV verwendet [8]. Wie alle Herpesviren weist CMV einen zweiphasigen Lebenszyklus auf, der aus einer lytischen und einer latenten Phase besteht. Bei der lytischen Infektion wird der virale Replikationszyklus vollständig durchlaufen, was in der Produktion infektiöser Viren und der Lyse der Wirtszelle resultiert. Die lytische Infektion findet in vielen verschiedenen Zelltypen statt, unter anderem in Fibroblasten, Epithelzellen, Endothelzellen und verschiedenen Leukozyten [9]. Während der latenten Infektion werden nur wenige virale Proteine exprimiert und keine infektiösen Partikel gebildet. Ort der Latenz sind hauptsächlich Leukozyten der myeloiden Linie, unter anderem Monozyten und CD34-positive Vorläuferzellen [10]. Im Stadium der Latenz persistiert CMV lebenslang im Wirt und reaktiviert sporadisch die lytische Replikation. β-Herpesviren haben im Vergleich zu anderen Herpesviren einen langen Replikationszyklus, der bei HCMV 48-72 Stunden beträgt, bei MCMV etwa 24 Stunden [11, 12].

Der erste Schritt des viralen Replikationszyklus ist die Anheftung des Virus an die Wirtszelle (Abb. 1.2). Hierbei dienen Heparansulfat-Proteoglykane als zelluläre Anheftungsfaktoren, die von den viralen Glykoproteinen gB und gM gebunden werden, wobei gB für die Anheftung nicht essentiell zu sein scheint [13, 14]. Auf die Anheftung folgen die Bindung zellulärer Rezeptoren und die Fusion der viralen Hüllmembran mit der Zellmembran, wofür gB, gH und gL benötigt werden [15]. Nach aktuellen Erkenntnissen scheint der gH/gL-Komplex für die Rezeptorbindung verantwortlich zu sein, während gB hauptsächlich die Membranfusion vermittelt [16]. Die Identität der zellulären Rezeptoren ist nicht abschließend geklärt. Diskutiert werden unter anderem verschiedene Wachstumsfaktorrezeptoren und Integrine [17-21]. Während bei der Infektion von Fibroblasten die Virusmembran mit der Plasmamembran der Wirtszelle fusioniert, findet bei Epithelzellen und Endothelzellen die Aufnahme der Viruspartikel durch Endozytose statt, gefolgt von einer pH-abhängigen Fusion mit der Endosomenmembran [22, 23]. Durch die Membranfusion werden Kapsid und Tegument ins Zytoplasma entlassen. Die Proteine des Teguments scheinen unter anderem am Transport des Kapsids zum Zellkern beteiligt zu sein, der über Mikrotubuli geschieht [24-26]. Das virale Genom wird über einen noch unbekannten Mechanismus in den Zellkern transportiert, wo es zirkularisiert und die virale Genexpression initiiert wird [27]. Die Expression der viralen Gene erfolgt kaskadenartig in drei Phasen, die als sehr früh (Immediate-Early, IE), früh (Early, E) und spät (Late, L) bezeichnet werden [28, 29] (Abb. 1.2). Zuerst werden die IE-Gene transkribiert, wofür keine de novo Proteinsynthese benötigt wird. IE-Gene kodieren unter anderem für Transkriptionsfaktoren, die für die Expression der E-Gene benötigt werden [11]. E-Proteine sind beteiligt an der viralen Genomreplikation, die nach dem Prinzip der rolling circle-Replikation abläuft [30, 31]. Nach Initiation der Genomreplikation werden die L-Gene exprimiert, die hauptsächlich für Strukturproteine kodieren [32, 33]. Dazu gehören die Kapsidproteine, die in den Zellkern transportiert werden, wo das Viruskapsid zusammengesetzt wird. In jedes Kapsid wird ein repliziertes virales Genom in linearer Form verpackt [34] Die reifen Kapside werden aus dem Zellkern in das Zytoplasma transportiert. Dies geschieht durch Knospung der Kapside an der inneren Kernmembran, wobei sie eine

primäre Membranhülle erhalten, die anschließend mit der äußeren Kernmembran fusioniert [35]. An die nun wieder unbehüllten Kapside lagern sich die viralen Tegumentproteine an, bevor die Viruspartikel durch Knospung in Glykoprotein-haltige, vom Golgi abgeleitete Vesikel ihre finale Hüllmembran erhalten [36, 37]. Die reifen Virionen werden durch Fusion der Vesikelmembran mit der Plasmamembran freigesetzt.



Abb. 1.2 Replikationszyklus des Cytomegalovirus

Schematische Darstellung des CMV-Replikationszyklus. Das Virus heftet sich an die Wirtszelle an und induziert die Fusion der Plasmamembran mit der viralen Hüllmembran. Tegument und Kapsid werden in das Zytoplasma entlassen und das Kapsid wird zum Zellkern transportiert. Das virale Genom gelangt in den Zellkern, wo es zirkularisiert und die virale Genexpression beginnt. Zuerst werden die *Immediate-Early*-Gene exprimiert, deren Genprodukte für die Expression der *Early*-Gene benötigt werden. Die *Early*-Proteine sind beteiligt an der viralen Genomreplikation, während die *Late*-Proteine hauptsächlich für Strukturproteine kodieren. Das Kapsid wird durch Knospung aus dem Kern über das Endoplasmatische Retikulum (ER) in das Zytoplasma transportiert. Im Zytoplasma lagern sich die Tegumentproteine an und das Virus erhält seine finale Hülle durch Knospung in Glykoprotein-haltige, vom Golgi abgeleitete Vesikel, die mit der Plasmamenbran fusionieren und so die Viruspartikel freisetzen.

1.1.2 Epidemiologie und Pathogenese

Bisher wurden bereits über 200 verschiedene Herpesviren identifiziert, in einem breiten Spektrum an Vertebraten als auch in einigen Invertebraten [38-41]. Strukturelle Ähnlichkeiten zu Bakteriophagen der Ordnung *Caudovirales* weisen darauf hin, dass die evolutionären Wurzeln der Herpesviren bis zu den Anfängen der Evolution des Lebens reichen [42]. Aufgrund von Übereinstimmungen zwischen Stammbäumen der Herpesviren und Stammbäumen der zugehörigen Wirtsorganismen wird angenommen, dass eine viele Millionen Jahre andauernde Co-Evolution zwischen Virus und Wirt stattgefunden hat [43, 44]. Daher sind die meisten Herpesviren gut an ihren natürlichen Wirt angepasst und verursachen oftmals keine schweren Krankheitssymptome.

Die für eine Cytomegalovirus-Infektion typischen vergrößerten Zellen, die bei Färbung dunkle Einschlüsse im Kern zeigen (sogenannte Eulenaugenzellen) wurden zum ersten Mal 1904 beschrieben und damals als einzellige Parasiten missinterpretiert [45, 46]. In den 50er Jahren des 20. Jahrhunderts wurde das Virus von drei unabhängigen Forschungsgruppen isoliert und erhielt 1960 aufgrund der charakteristischen Vergrößerung infizierter Zellen den Namen Cytomegalovirus [7, 47].

Das humane Cytomegalovirus ist weltweit verbreitet, mit einer Seroprävalenz von 40 % bis nahezu 100 %, abhängig von den sozio-ökonomischen Bedingungen der jeweiligen Region [48]. Die Übertragung erfolgt über Körperflüssigkeiten wie Blut, Speichel, Urin, Muttermilch oder Samenflüssigkeit [49-51]. Das Virus kann auch intrauterin von der Mutter auf das ungeborene Kind übertragen werden [52]. In gesunden Personen verläuft die Infektion mit CMV meist asymptomatisch. In manchen Fällen kann eine CMV-Mononukleose auftreten, eine milde Erkrankung mit grippeähnlichen Symptomen, ähnlich der Epstein-Barr Virus-Mononukleose (Pfeiffersches Drüsenfieber) [53]. In Individuen mit supprimiertem oder unreifem Immunsystem kann CMV jedoch schwerwiegende Erkrankungen verursachen. Zu den Risikogruppen gehören AIDS-Patienten (*Aquired Immune Deficiency Syndrome*), Organtransplantat-Empfänger, die immunsupprimierende Medikamente erhalten, und Neugeborene.

Die kongenitale CMV-Infektion bei neugeborenen Kindern wurde bereits vor der Identifizierung des Cytomegalovirus beschrieben und wird auch als zytomegale Einschlusskörperchen-Krankheit (*cytomegalic inclusion disease*, CID) bezeichnet [54]. Weltweit werden durchschnittlich 0,64 % aller Kinder mit kongenitaler CMV-Infektion geboren, von denen etwa 11 % Symptome aufweisen [55], die von Petechien über Entzündung verschiedener Organe wie Leber und Lunge bis hin zu neuronalen Schäden wie Gehörverlust, Sehverlust und mentaler Retardierung reichen können [56, 57].

Bei AIDS-Patienten, die keine hochaktive antiretrovirale Therapie (*highly active antiretroviral therapy*, HAART) erhalten, sind bis zu 40 % von CMV-bedingten Erkrankungen betroffen

[58]. Am häufigsten tritt Retinitis auf, gefolgt von Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes und des Zentralnervensystems [59]. Durch die Anwendung von HAART kann die CMV-verursachte Morbidität und Mortalität in HIV-infizierten Personen erheblich reduziert werden [60].

Ein wachsendes Problem ist die Infektion mit CMV bei Organtransplantat-Empfängern, von denen bis zu 75 % eine lytische CMV-Infektion innerhalb des ersten Jahres nach der Transplantation aufweisen [61]. Bei Transplantation eines Organs eines seropositiven Spenders in einen seronegativen Empfänger kann es zu einer Primärinfektion kommen, durch Reaktivierung von CMV in einem bereits seropositiven Empfänger zu einer Sekundärinfektion. Erkrankungsraten und Mortalität variieren abhängig vom CMV-Status des Spenders und Emfängers (Primär- oder Sekundärinfektion), dem Grad der Immunsuppression und der Art des transplantierten Organs [62]. Eine häufig auftretende Erkrankung bei Transplantatemfängern ist das CMV-Syndrom, das einer CMV-Mononucleose ähnelt. Typisch sind auch Lungenentzündung und Entzündungen des Gastrointestinaltraktes. Zudem kann eine CMV-Infektion zur Beschädigung oder Abstoßung des transplantierten Organs führen [63].

1.2 NF-κB Signalweg und angeborene Immunantwort

1.2.1 Der Transkriptionsfaktor NF-κB

Der nukleäre Faktor kappa B (NF-κB) wurde 1986 als ein nukleäres Protein identifiziert, das an den *Enhancer* des Gens für die leichte Kette κ in B-Zellen bindet [64]. Besondere Aufmerksamkeit erlangte NF-κB durch die Erkenntnis, dass es sich um einen induzierbaren Transkriptionsfaktor handelt, der durch einen posttanslationalen Mechanismus von einem inaktiven in einen aktiven Zustand überführt wird [65]. Dies ermöglicht eine schnelle und transiente Änderung der Genexpression, wodurch induzierbare Transkriptionsfaktoren ein wichtiges Prinzip darstellen, mittels dessen Organismen auf äußere Einflüsse reagieren können. NF-κB ist in diesem Zusammenhang von besonderer Bedeutung, da dieser Transkriptionsfaktor von einer Vielzahl verschiedener Stimuli aktiviert wird und die Expression einer großen Zahl an Genen reguliert, die in diversen biologischen Prozessen beteiligt sind.

Wirbeltiere exprimieren fünf verschiedene Proteine der NF- κ B-Proteinfamilie: RelA (p65), RelB, c-Rel, p50 (Vorläufer p105) und p52 (Vorläufer p100). Sie liegen als Homo- oder Heterodimere in der Zelle vor, wobei das p50/p65-Heterodimer das am häufigsten zu findende NF- κ B-Dimer ist [66-68]. Alle NF- κ B-Proteine besitzen eine Rel-Homologiedomäne (RHD), die für die Dimerisierung und DNA-Bindung erforderlich ist [69]. Sie enthält außerdem eine nukleäre Lokalisationssequenz (NLS) und vermittelt die Bindung von NF- κ B an inhibitorische Proteine der I κ B (*Inhibitor of NF-\kappaB)*-Proteinfamilie [70]. I κ B α ist das am besten untersuchte IKB-Protein und reguliert maßgeblich die Aktivität des abundanten p50/p65-Heterodimers [71]. Im nicht-induzierten Zustand bindet IKB α an NF-KB und hält es durch Maskierung der NLS der p65-Untereinheit im Zytoplasma zurück [72] (Abb. **1.3**). NF-KBaktivierende Signale führen zur proteasomalen Degradation von IKB α , woraufhin die vorher verdeckte NLS exponiert und NF-KB in den Zellkern transportiert wird [73]. Induziert wird die IKB α -Degradation durch den IKB-Kinase (IKK)-Komplex, der neben NF-KB und IKB die dritte Hauptkomponente des NF-KB-Signalweges ist. Der IKK-Komplex besteht aus den katalytischen Untereinheiten IKK α (IKK1) und IKK β (IKK2) sowie der regulatorischen Untereinheit IKK γ , die auch als NEMO (*NF-KB essential modulator*) bezeichnet wird [74, 75]. Der aktivierte IKK-Komplex phosphoryliert IKB α an den Serinresten 32 und 36, was die Rekrutierung von Ubiquitin-Ligasen zur Folge hat. Diese modifizieren IKB α mit Lysin 48verknüpften Polyubiquitin-Ketten und induzieren so die Degradation von IKB α durch das Proteasom [76].

Neben diesem als kanonisch bezeichneten NF-κB-Signalweg, gibt es auch einen alternativen oder nicht-kanonischen Weg zur NF-κB-Aktivierung. Dieser ist abhängig von IKKα, erfordert jedoch weder IKKβ noch NEMO [77]. IKKα wird durch NIK (*NF-κB-inducing kinase*) aktiviert und induziert die Prozessierung des inaktiven NF-κB-Vorläuferproteins p100 zu p52, das vor allem mit RelB dimerisiert [77].

Im Kern bindet NF-κB an spezifische DNA-Sequenzen, die als κB-Bindestellen bezeichnet werden und aktiviert die Transkription der jeweiligen Zielgene durch Rekrutierung transkriptionaler Co-Aktivatoren und Chromatin-modifizierender Proteine [78].

NF-kB kann durch vielfältige Stimuli aktiviert werden. Viele davon stehen im Zusammenhang mit einer bakteriellen oder viralen Infektion. Strukturelle Bestandteile von Pathogenen, wie mikrobielle Proteine oder Nukleinsäuren können NF-KB ebenso aktivieren wie pro-inflammatorische Zytokine [79]. NF-KB-Aktivierung kann auch durch Zellstress induziert werden, unter anderem durch UV-Strahlung, oxidativen Stress oder hyperosmotischen Schock [68]. So vielfältig wie die aktivierenden Signale sind auch die Zielgene der NF-kB-Transkriptionsfaktoren [80]. Sie sind beteiligt an wichtigen Prozessen der Immunantwort, wie Antigenpräsentation oder Inflammation [79]. NF-kB-Zielgene regulieren auch Zelltod und Proliferation und haben entscheidenden Einfluss auf die Embryonalentwicklung und Zelldifferenzierung [81-83]. Auch die Expression von IkB-Proteinen wird von NF-kB induziert, was einen wichtigen Mechanismus zur Beendigung der NF-KB-Antwort darstellt. Resynthetisiertes IkBa kann NF-kB von der DNA lösen und ins Zytoplasma zurück transportieren [71]. Daneben gibt es eine Reihe weiterer autoregulatorischer feedback loops, die eine zeitlich abgestimmte Deaktivierung von NF-kB auf verschiedenen Ebenen des Signalweges einleiten [84]. Da NF-KB viele wichtige zelluläre Prozesse beeinflusst, kann die Dysregulation von NF-kB schwerwiegende Erkrankungen zur Folge haben. Dazu gehören Immundefizienz, Autoimmun- und inflammatorische Erkrankungen sowie die Entstehung von Tumoren [85, 86].



Abb. 1.3 Kanonische NF-kB-Aktivierung

NF-κB spielt eine zentrale Rolle in der Immun- und Zellstressantwort. Stimuli wie bakterielle oder virale Infektionen, Zytokine oder Zellstress aktivieren den IKK-Komplex. Dieser phosphoryliert daraufhin den NF-κB-Inhibitor IκBα, was zur Polyubiquitinierung und anschließender proteasomaler Degradation von IκBα führt. NF-κB kann nun in den Zellkern transportiert werden, wo es an DNA bindet und die Transkription vieler verschiedener Gene aktiviert. Die Produkte der NF-κB-Zielgene sind unter anderem an der Regulation der Immunantwort und des Zelltods beteiligt. Auch IκBα und andere NF-κB-regulierende Proteine werden induziert.

1.2.2 Funktion von NF-kB in der angeborenen Immunantwort

Die angeborene Immunantwort stellt eine schnelle und unspezifische Reaktion auf eindringende Pathogene dar, die auf einer limitierten Zahl Keimbahn-kodierter Rezeptoren und sezernierter Proteine beruht. Im Zuge der angeborenen Immunantwort werden Pathogen-typische Molekülstrukturen erkannt und die Erreger mittels Phagozytose und sezernierten antimikrobiellen oder antiviralen Substanzen bekämpft. Im Gegensatz dazu verfügt die erworbene oder adaptive Immunantwort über eine theoretisch unbegrenzte Zahl an Antigenrezeptoren, die durch somatische Rekombination in B- und T-Lymphozyten generiert werden. Sie ermöglichen eine hochspezifische Erkennung mikrobieller Moleküle und damit eine sehr effiziente Eliminierung von Pathogenen. Zudem bewirkt die adaptive Immunantwort eine langfristige Immunität gegen wiederkehrende Infektionen. Bis zur vollen Ausprägung der adaptiven Immunantwort vergehen jedoch mehrere Tage, da zunächst die Aktivierung, klonale Expansion und Differenzierung der Antigen-spezifischen Lymphozyten erfolgen muss. Die angeborene Immunantwort ist somit von essentieller Bedeutung als erste Verteidigungslinie des Körpers, die Infektionen verhindert oder begrenzt und die Initiierung und Wirkung des adaptiven Immunsystems unterstützt [87].

Einige Komponenten des angeborenen Immunsystems stehen konstitutiv zur Verfügung und dienen der sofortigen Abwehr eindringender Mikroorganismen. Dazu gehören das Komplementsystem sowie bestimmte antimikrobielle Enzyme und Peptide [87, 88]. Ein großer Teil der angeborenen Immunantwort wird jedoch erst durch eine Infektion induziert. Dies geschieht über die Aktivierung bestimmter Transkriptionsfaktoren, vor allem NF-κB, Aktivatorprotein-1 (AP-1) und Interferon-regulierende Faktoren (IRFs). Aufgrund seiner zahlreichen immunmodulatorischen Zielgene ist die Aktivierung von NF-κB dabei von besonderer Bedeutung.

NF-kB reguliert die Synthese von Substanzen mit direkter antimikrobieller Aktivität, wie antimikrobielle Peptide oder toxisch wirkende Stickstoff- und Sauerstoffradikale [89-93].

Von herausragender Bedeutung für die angeborene Immunantwort ist die Produktion von Zytokinen, von denen viele durch NF- κ B induziert werden [80]. Zytokine sind sezernierte Signalproteine, die durch Bindung an spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche immunmodulatorische Reaktionen der betreffenden Zelle hervorrufen [87]. Einige Zytokine induzieren die Inflammationsreaktion, im Zuge derer phagozytierende Zellen, vor allem Neutrophile und Makrophagen, an den Ort der Infektion rekrutiert und aktiviert werden. Zu den NF- κ B-induzierten pro-inflammatorischen Zytokinen gehören unter anderem Tumornekrosefaktor α (TNF α) und Interleukin-1 β (IL-1 β), die die Inflammationsreaktion verstärken, indem sie ihrerseits NF- κ B und andere immunmodulatorische Transkriptionsfaktoren aktivieren [80]. Die Rekrutierung der Phagozyten geschieht mit Hilfe chemotaktischer Zytokine, auch Chemokine genannt sowie bestimmter Zelladhäsionsmoleküle, die ebenfalls zu den NF-κB-Zielgenen gehören [89]. NF-κB spielt zudem eine wichtige Rolle bei der Sicherung des Überlebens von Neutrophilen am Ort der Infektion sowie bei der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen [94, 95].

Neben den pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen reguliert NF- κ B auch die Transkription von Typ I-Interferonen (IFN), einer Klasse von Zytokinen mit antiviraler Funktion. Typ I-Interferone, wozu IFN α und IFN β gehören, induzieren einen antiviralen Status in infizierten und benachbarten uninfizierten Zellen durch transkriptionelle Aktivierung von Proteinen, die zur Inhibition der Virusreplikation beitragen [96].

Interferone und andere Zytokine aktivieren auch Natürliche Killerzellen (NK-Zellen), die infizierte Zellen eliminieren können, und tragen zur Rekrutierung und Aktivierung von Lymphozyten bei, was schließlich zur Einleitung der adaptiven Immunantwort führt [87].

1.2.3 Pathogendetektion und NF-kB-Aktivierung in der angeborenen Immunantwort

Innerhalb der angeborenen Immunantwort erfolgt die Pathogendetektion durch Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRRs). Diese erkennen Pathogenassoziierte molekulare Muster (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs), die im Wirtsorganismus nicht vorkommen. PRRs werden unterschieden in membrangebundene und zytoplasmatische Rezeptoren. Zusätzlich können bestimmte Zytokinrezeptoren zur NF-κB-Aktivierung führen. Sowohl PRRs als auch Zytokinrezeptoren aktivieren neben NF-κB zudem weitere Transkriptionsfaktoren, die an der angeborenen Immunantwort beteiligt sind, darunter AP-1 und IRF3.

1.2.3.1 NF-kB-Aktivierung durch Toll-like-Rezeptoren

Die wichtigste Klasse membrangebundener PRRs sind die *Toll-like*-Rezeptoren (TLRs). Beim Menschen sind 10 funktionelle TLRs bekannt (TLR1-TLR10), bei der Maus 12 (TLR1-TLR9, TLR11-TLR13) [97, 98]. Einige TLRs sind in der Plasmamembran lokalisiert, andere in intrazellulären Vesikeln, vor allem in Endosomen (Abb. **1.4**). Die Plasmamembran-lokalisierten TLRs 1, 2, 4, 5 und 6 detektieren hauptsächlich Moleküle, die typisch sind für bakterielle Zellwände. Dazu gehören bestimmte Lipide, Lipoproteine und Proteine [98]. TLR4 ist einer der am besten untersuchten TLRs und wird durch Lipopolysaccharide (LPS) aktiviert, die in der Zellwand gram-negativer Bakterien zu finden sind. Doch auch Bestandteile von Viruspartikeln können durch TLRs an der Zelloberfläche detektiert werden. So wurde gezeigt, dass TLR4 durch das Fusionsprotein des Respiratorischen Syncytialvirus (RSV) aktiviert wird [99]. Auch das Kaposi-Sarkoma-assoziierte Herpesvirus (KSHV) und Herpes-simplex-Virus Typ 1 (HSV-1) scheinen die Aktivierung von TLR4 induzieren zu können [100, 101]. TLR2, der bei Aktivierung Heterodimere mit TLR1 oder TLR6 bildet, spielt ebenfalls eine Rolle bei der Detektion verschiedener Viren, darunter HSV-1, Epstein-Barr-

Virus (EBV), HCMV und MCMV [99, 102]. Im Falle von HCMV wurden die Glykoproteine gB und gH als TLR2-Liganden identifiziert [103].

Die endosomalen TLRs 3, 7, 8, und 9 erkennen hauptsächlich mikrobielle Nukleinsäuren [98]. TLR3 wird durch doppelsträngige RNA (dsRNA) aktiviert, die typischerweise bei der Replikation von RNA-Viren auftritt [104]. Doch auch bei einer Infektion mit DNA-Viren kann dsRNA gebildet werden, vermutlich durch bidirektionale Transkription komplementärer DNA-Stränge [105]. Im Falle von EBV wurde gezeigt, dass die einzelsträngige nicht-kodierende RNA EBV-encoded small RNA (EBER) TLR3 aktivieren kann, da sie intramolekulare Basenpaarungen ausbildet [106]. TLR3 wurde mit einer schützenden Wirkung bei HSV-1induzierter Enzephalitis in Verbindung gebracht [107]. Die Rolle von TLR3 bei der Infektion mit MCMV ist dagegen umstritten. Während eine Studie eine erhöhte MCMV-Suszeptibilität von TLR3-knockout-Mäusen gegenüber Wildtyp-Mäusen feststellen konnte, war dies bei einer anderen Studie nicht der Fall [108, 109]. Die TLRs 7 und 8 erkennen einzelsträngige RNA (ssRNA) und spielen eine Rolle bei der Detektion verschiedener Viren mit ssRNA-Genom, wie dem Influenza A-Virus (IAV) und dem Humanen Immundefizienzvirus (HIV) [110]. TLR9 wird durch unmethylierte CpG-Motive aktiviert, die in bakterieller und viraler DNA zu finden sind [111, 112]. So ist TLR9 an der Detektion verschiedener DNA-Viren beteiligt, darunter Hepatitis B-Virus (HBV), HSV-2 und MCMV [108, 113-115].

TLRs binden Liganden über ihre aus LRRs (leucine-rich repeats) aufgebaute Ektodomäne [116]. Die Ligandenbindung resultiert in der Dimerisierung der Rezeptoren, wobei die meisten TLRs Homodimere bilden. TLR2 bildet Heterodimere mit TLR1 oder TLR6. Durch die Dimerisierung werden die intrazellulären Toll/IL-1-Rezeptor (TIR)-Domänen der TLRs in räumliche Nähe zueinander gebracht, was die Interaktion mit zytoplasmatischen Adaptermolekülen erlaubt, die ebenfalls eine TIR-Domäne besitzen [117]. Die meisten TLRs, mit Ausnahme von TLR3, nutzen MyD88 (myeloid differentiation factor 88) als Adapterprotein (Abb. 1.4). TLR2 und TLR4 rekrutieren MyD88 indirekt über TIRAP (TIR-containing adaptor protein). MyD88 interagiert mit Kinasen der IRAK-Proteinfamilie (IL-1 receptorassociated kinase), die die E3-Ubiquitinligase TRAF6 (TNF receptor-associated factor 6) rekrutieren [118, 119]. TRAF6 wird benötigt für die Rekrutierung des IKK-Komplexes und der Kinase TAK1 (*TGFβ-activated kinase 1*), die an TAB2 und TAB3 (*TAK1-associated binding* proteins 2/3) gebunden ist [120]. Der genaue Ablauf der Komplex-Assemblierung ist nicht bekannt. Eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung des IKK- und des TAK/TAB-Komplexes scheinen Lysin 63-verknüpfte Polyubiguitinketten zu spielen, die im Gegensatz zu Lysin 48verknüpfter Ubiquitinierung keine proteasomale Degradation induzieren, sondern an der Signalübertragung beteiligt sind [121, 122]. TRAF6 ubiquitiniert mehrere Komponenten des TLR-Signalweges, darunter IRAK1, NEMO und auch sich selbst. Zudem wurde gezeigt, dass sowohl NEMO als auch TAB2/3 an Lysin 63-verknüpfte Polyubiguitinketten binden können

[123-126]. Die Aktivierung des IKK-Komplexes erfolgt durch Phosphorylierung von IKKα und/oder IKKβ [127]. Dies scheint entweder durch Trans-Autophosphorylierung zu geschehen oder durch eine IKK-Kinase, wofür TAK1 ein möglicher Kandidat ist [120, 127, 128]. TAK1 ist auch beteiligt an der Aktivierung eines zweiten Signalweges, der Mitogenaktivierte Proteinkinasen (MAPKs) involviert. Die MAP-Kinasen p38 und JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) aktivieren unter anderem AP-1, das wie NF-κB die Expression pro-inflammatorischer Zytokine induzieren kann.

TLR3 ist der einzige TLR, der statt MyD88 ausschließlich das Adaptermolekül TRIF (*TIR domain-containing adaptor inducing IFNβ*) verwendet. TLR4 ist wiederum der einzige TLR, der sowohl MyD88- als auch TRIF-abhängige Signalwege aktivieren kann, wobei TRIF über TRAM (*TRIF-related adapter molecule*) an TLR4 rekrutiert wird (Abb. **1.4**). TRIF interagiert sowohl mit TRAF6 als auch mit dem Rezeptor-interagierenden Protein 1 (RIP1), was die Rekrutierung von TAK1 sowie des IKK-Komplexes zur Folge hat [129-131]. Es wurde gezeigt, dass RIP1 nach Rezeptorstimulation ubiquitiniert wird [131]. Obwohl es nahe liegt, dass TRAF6 die dafür verantwortliche Ubiquitinligase ist, wurde bisher keine TRAF6-abhängige RIP1-Ubiquitinierung gezeigt und in Makrophagen scheint TRAF6 für die TLR3-vermittelte NF-κB-Aktivierung keine Rolle zu spielen [132]. Als mögliche Alternative kommt die Ubiquitinligase Peli1 in Frage, die mit TLR3-abhängiger RIP1-Ubiquitinierung und NF-κB-Aktivierung in Zusammenhang gebracht wurde [133]. Ubiquitiniertes RIP1 interagiert mit NEMO und kann so den IKK-Komplex rekrutieren, was zu dessen Aktivierung führt [134]. Es ist jedoch nicht zweifelsfrei geklärt, ob die Ubiquitinierung von RIP1 absolut essentiell ist für die Aktivierung von NF-κB [127, 133].

TRIF-abhängige Signalwege aktivieren neben NF-κB auch IRFs, eine weitere Gruppe induzierbarer Transkriptionsfaktoren, die unter anderem die Produktion von Typ I-Interferonen stimulieren [135]. Die TLR3-vermittelte Aktivierung der für die IFN-Produktion besonders wichtigen IRFs 3 und 7 ist abhängig von TRAF3 und den IKK-verwandten Kinasen TBK1 (*TANK-binding kinase 1*) und IKKε [136].



Zytokine

Abb. 1.4 NF-kB-Aktivierung durch Toll-like-Rezeptoren (TLRs)

Die Membran-gebundenen TLRs detektieren Pathogenstrukturen im extrazellulären Raum oder in Endosomen und triggern Signalkaskaden, die zur Aktivierung von NF-κB sowie den Transkriptionsfaktoren AP-1 und IRF3/7 führen. Die Bindung des Liganden an den jeweililgen Rezeptor ermöglicht die Assoziation der zytoplasmatischen Adaptermoleküle MyD88 oder TRIF, die wiederum weitere Proteine rekrutieren, darunter verschiedene Ubiquitinligasen wie TRAF3/6 oder Peli1. Es folgt die wahrscheinlich Ubiquitin-abhängige Rekrutierung der IKK- und TAK/TAB-Proteinkomplexe. Innerhalb des so entstandenen Multiproteinkomplexes kommt es zur Aktivierung des IKK-Komplexes durch Phosphorylierung von IKKα/β. Der TAK/TAB-Komplex ist beteiligt an der IKK-Aktivierung und phosphoryliert zudem MAP-Kinase-Kinasen (MKKs), was zur Aktivierung von AP-1 führt. Sowohl NF-κB als auch AP-1 induzieren die Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen. Die IKK-verwandten Kinasen TBK1 und IKKε aktivieren IRF3/7, die entscheidend zur Interferonproduktion beitragen.

1.2.3.2 NF-kB-Aktivierung durch zytoplasmatische Mustererkennungsrezeptoren

Neben den Membran-assoziierten TLRs, die PAMPs im extrazellulären Raum oder im endosomalen Kompartiment detektieren, gibt es weitere PRRs, die Pathogene innerhalb des Zytoplasmas erkennen und ebenfalls NF-kB aktivieren können. Von besonderer Bedeutung für die Detektion viraler Infektionen im Zytoplasma sind *RIG-I-like receptors* (RLRs), die durch RNA aktiviert werden. Daneben gibt es eine heterogene Gruppe zytoplasmatischer DNA-Sensoren [99].

Zu den RLRs gehören RIG-I (*retinoic acid inducible gene-I*) und MDA5 (*melanoma differentiation-associated factor 5*) (Abb. **1.5**). Während gesichert ist, dass diese Rezeptoren durch RNA aktiviert werden, wird die dafür erforderliche Struktur der RNA-Liganden kontrovers diskutiert [137]. MDA5 scheint hauptsächlich lange dsRNA (> 1 kb) zu detektieren. Als Liganden für RIG-I wurden dagegen primär kurze dsRNA und 5'-Triphosphat-ssRNA beschrieben, wobei auch im Falle der dsRNA ein 5'-Triphosphat die Detektion erleichtert, jedoch nicht essentiell ist [138, 139]. Beide Rezeptoren detektieren verschiedene RNA-Viren. RIG-I wird unter anderem durch das Vesikuläre Stomatitis-Virus (VSV), Hepatitis C-Virus (HCV) und IAV aktiviert, MDA5 zum Beispiel durch Poliovirus und Encephalomyocarditis-Virus (EMCV). Einige Viren, wie das Dengue Virus, werden durch beide RLRs erkannt [138]. Zudem kann RIG-I indirekt DNA-Viren detektieren, wie HSV-1 oder EBV. In diesem Fall erkennt die zelluläre RNA-Polymerase III zytosolische dsDNA und transkribiert diese in 5'-Triphosphat-dsRNA, die als Ligand für RIG-I dient [140].

Die Bindung des Liganden induziert eine Konformationsänderung der Rezeptoren, die die Interaktion mit dem Adapterprotein MAVS (*mitochondrial antiviral signaling*; auch VISA, Cardif oder IPS-1 genannt) ermöglicht, das in der äußeren Mitochondrienmembran verankert ist (Abb. **1.5**). MAVS polymerisiert daraufhin und bildet eine Plattform für die Rekrutierung verschiedener an der NF-κB-Aktivierung beteiligter Proteine. Dazu gehören die Ubiquitinligasen TRAF2, 5 und 6 [141]. Über den Adapter FADD (*Fas-associated death domain protein*) wird auch RIP1 an MAVS rekrutiert [142]. Die Ubiquitin-abhängige Rekrutierung von NEMO führt anschließend zur Aktivierung des IKK-Komplexes [141]. Auch IRF3 und IRF7 können durch RIG-I und MDA5 aktiviert werden. Dies geschieht durch die Rekrutierung von TRAF3 und Aktivierung von TBK1 und IKKε [136].



Abb. 1.5 NF-kB-Aktivierung durch zytoplasmatische Mustererkennungsrezeptoren

Zytoplasmatische Mustererkennungsrezeptoren werden durch mikrobielle Nukleinsäuren im Zytoplasma aktiviert. Die dsRNA-Sensoren RIG-I und MDA5 nutzen für die Signalweiterleitung das an der äußeren Mitochondrienmembran lokalisierte Adapterprotein MAVS, das verschiedene TRAFs sowie RIP1 rekrutiert. Es folgt die Ubiquitin-abhängige Rekrutierung und Aktivierung des IKK-Komplexes, was zur Aktivierung von NF-κB führt. Abhängig von TRAF3 und TBK1 wird außerdem IRF3/7 aktiviert. Der dsDNA-Sensor DAI rekrutiert den IKK-Komplex über die Interaktion mit RIP1 und RIP3. DAI interagiert auch mit TBK1 sowie mit IRF3 und vermittelt so die IRF3-Aktivierung. IFI16 erkennt sowohl ssDNA als auch dsDNA und aktiviert NF-κB und IRF3 mittels des ER-lokalisierten Proteins STING. cGAS synthetisiert nach Bindung von dsDNA den sekundären Botenstoff cGAMP, der ebenfalls STING aktiviert.

Neben der bereits erwähnten RNA-Polymerase III, wurden einige weitere putative DNA-Sensoren im Zytoplasma identifiziert, von denen vor allem DAI (*DNA-dependent activator of IRFs*), IFI16 (*IFNγ-inducible protein 16*) und cGAS (*cyclic-GMP-AMP synthase*) mit der Aktivierung von NF-κB in Verbindung gebracht wurden [140, 143]. Es wurde gezeigt, dass DAI dsDNA binden und NF-κB durch Rekrutierung von RIP1 und RIP3 aktivieren kann [144-146] (Abb. **1.5**). DAI interagiert außerdem mit TBK1 und IRF3, was die Aktivierung von IRF3 vermittelt [144]. Sowohl HSV-1 als auch HCMV scheinen eine DAI-abhängige Immunantwort induzieren zu können [147-149]. Beide Viren wurden auch mit einer möglichen Detektion durch IFI16 in Zusammenhang gebracht [150, 151]. IFI16 bindet ssDNA und dsDNA, was in der Rekrutierung des in der ER-Membran lokalisierten Adapterproteins STING (*stimulator of interferon genes*) resultiert [150]. STING aktiviert über einen noch unbekannten Signalweg NF-κB und induziert die Aktivierung von IRF3, indem es sowohl mit IRF3 selbst als auch mit TBK1 interagiert [152, 153]. Auch cGAS aktiviert NF-κB und IRF3 mittels STING. Nach Bindung von dsDNA synthetisiert cGAS den sekundären Botenstoff cGAMP (cyclic-GMP-AMP), der mit STING interagiert und dessen Aktivierung induziert [154]. Es wurde gezeigt, dass cGAS an der Detektion verschiedener DNA-Viren wie HSV-1 und Vaccinia-Virus beteiligt ist und sogar durch Retroviren wie HIV-1 aktiviert wird [154].

1.2.3.3 NF-kB-Aktivierung durch Zytokinrezeptoren

Die Aktivierung von NF- κ B durch die Zytokinrezeptoren Interleukin-1-Rezeptor (IL-1R) und Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1 (TNFR1) dient der Verstärkung der Inflammationsreaktion, da die entsprechenden Rezeptorliganden, IL-1 β und TNF α , zu den NF- κ B-Zielgenen gehören, die nach PRR-Aktivierung induziert werden [80].

Der IL-1R besitzt wie die TLRs eine intrazelluläre TIR-Domäne, über welche die MyD88abhängige Signalweiterleitung erfolgt [155] (Abb. **1.6**).

Die intrazelluläre Domäne des TNFR1 enthält dagegen eine *death domain* (DD), über die das Adapterprotein TRADD (*TNFR-associated death domain protein*) rekrutiert wird [156]. TRADD vermittelt die Assoziation von RIP1 und TRAF2, die wiederum weitere Proteine an den TNFR-Komplex rekrutieren [157, 158]. Während RIP1 mit TRAF5 interagiert, wird TRAF2 für die Rekrutierung der Ubiquitinligasen cIAP1 und 2 (*cellular inhibitor of apoptosis* 1/2) benötigt [158, 159]. Es wird angenommen, dass die Ubiquitinierung von RIP1 und TRAF2 durch TRAF2/5 und cIAP1/2 die Rekrutierung des IKK-Komplexes sowie des TAK1-Komplexes ermöglicht, was in der Aktivierung von NF-κB und des MAPK-Signalweges resultiert [160] (Abb. **1.6**).

Unter bestimmten Bedingungen kann der TNFR1 auch Zelltod induzieren. Die Rekrutierung und Aktivierung von Caspase-8 oder RIP3 an den TNFR-Komplex führt zur Induktion von Apoptose beziehungsweise programmierter Nekrose [161].



Abb. 1.6 NF-kB-Aktivierung durch Zytokinrezeptoren

Der IL-1-Rezeptor vermittelt die NF-κB- und MAPK-Aktivierung über MyD88-abhängige Signalweiterleitung, wie sie auch bei TLRs stattfindet. Der TNF-Rezeptor 1 rekrutiert mittels der Adapterproteine TRADD und FADD die Ubiquitinligasen TRAF2/5 und cIAP1/2 sowie RIP1. Anschließend erfolgt die wahrscheinlich Ubiquitin-abhängige Rekrutierung des IKK-Komplexes und des TAK/TAB-Komplexes, was in der Aktivierung von NF-κB und AP-1 resultiert.

1.3 Modulation der angeborenen Immunantwort und der NF-κB-

Aktivität durch CMV

CMV wird durch eine Reihe von PRRs detektiert und ruft neben der angeborenen Immunantwort auch eine ausgeprägte adaptive Immunantwort hervor [162, 163]. Dennoch ist das Virus in der Lage, seiner Eliminierung zu entgehen und lebenslang im Wirt zu persistieren. Gleichzeitig ist CMV einer wirksamen Immunkontrolle unterworfen, die die Virusreplikation stark einschränkt und eine symptomatische Erkrankung des Wirtes verhindert. Es existiert ein Gleichgewicht zwischen der Immunantwort des Wirtes und den immunmodulatorischen Eigenschaften des Virus. Einige virale Proteine inhibieren bestimmte Immunreaktionen des Wirtes, andere induzieren oder modifizieren immunologische Mechanismen zum Vorteil der Virusreplikation. Zahlreiche CMV-Proteine weisen Sequenzhomologien zu zellulären immunmodulatorischen Proteinen auf. Dazu gehören verschiedene Zytokin- und Chemokin-Homologe sowie Zytokinrezeptor- und Chemokinrezeptor-Homologe [164]. Nicht in allen Fällen wurde bisher auch eine entsprechende Funktion dieser viralen Homologe nachgewiesen. Für das IL-10-Homolog des HCMV wurde jedoch gezeigt, dass es wie das zelluläre IL-10 eine antiinflammatorische Wirkung hat. Es reduziert die Zytokinexpression und die Expression der für die Antigenpräsentation essentiellen MHC (major histocompatibility complex) -Klasse I und II [164, 165]. Das bestcharakterisierte CMV-Chemokin-Homolog ist das MCMV-Protein MCK-2. MCK-2 ist wichtig für die Ausbreitung des Virus im Wirt, speziell für die effiziente Infektion der Speicheldrüsen, die eine große Rolle bei der Übertragung von Wirt zu Wirt spielen [166]. Ein wichtiger Mechanismus der angeborenen Immunantwort zur Eliminierung infizierter Zellen ist der programmierte Zelltod, der ebenfalls durch CMV inhibiert wird. HCMV und MCMV exprimieren die homologen Proteine UL36 und M36, die die extrinsische Apoptose inhibieren, indem sie mit Caspase-8 interagieren und deren Aktivierung blockieren [167-169]. HCMV hemmt die intrinsische Apoptose mittels des mitochondrial lokalisierten Proteins UL37exon1, das mit den pro-apoptotischen Proteinen Bax und Bak interagiert und deren Funktion inhibiert [170-172]. MCMV exprimiert zwei verschiedene Proteine zur Inhibition der mitochondrial vermittelten Apoptose. Bax wird durch das Protein m38.5 inhibiert, Bak dagegen durch m41.1 [173-175].

Aufgrund seiner vielfältigen Funktionen in der angeborenen Immunantwort ist NF-κB ein attraktives Ziel für virale Modulation. Sowohl HCMV als auch MCMV beeinflussen die Aktivität von NF-κB auf differenzierte Weise. Zu frühen Zeitpunkten der Infektion wird NF-κB aktiviert, zu späteren Zeitpunkten dagegen inhibiert. Beide Viren unterscheiden sich jedoch im zeitlichen Ablauf und Mechanismus der NF-κB-Aktivierung und -Inhibition.

HCMV induziert zwei Phasen der NF-κB-Aktivität. Die erste Aktivierungsphase wird durch die Anheftung und den Eintritt des Virus in die Wirtszelle ausgelöst und ist unabhängig von viraler oder zellulärer Genexpression [176]. Es wurde gezeigt, dass die viralen Glykoproteine gB und gH den Rezeptor TLR2 stimulieren, was die Aktivierung von NF-κB und die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine bewirkt [103, 177, 178]. Zudem enthalten HCMV-Virionen die zelluläre Proteinkinase CK2, die nach Eintritt des Virus in die Wirtszelle IκBα phosphorylieren und dadurch NF-κB aktivieren kann [179]. Die zweite Phase der NF-κB-Aktivierung ist abhängig neu-synthetisierten Proteinen [176] und kann bis zu 72 h nach Infektion andauern [180]. Mehrere HCMV-Proteine induzieren oder fördern die NF-κB-Aktivierung. Die viralen Transkriptionsfaktoren IE1 und IE2 induzieren die Expression der NF-κB-Proteine p65 und p105/p50 [176, 181]. IE1 wurde zusätzlich mit der Aktivierung von NF-κB in Verbindung gebracht [182, 183]. Das HCMV-Protein UL144 aktiviert NF-κB durch Interaktion mit dem zellulären Protein TRIM23, das die Autoubiquitinierung von TRAF6 induziert [184, 185]. Das Chemokinrezeptor-Homolog US28 kann in transfizierten Zellen NF-κB konstitutionell aktivieren [186, 187]. Der zugrunde liegende Mechanismus ist jedoch nicht bekannt.

Im Unterschied zu HCMV induziert MCMV nur eine einzige, relativ kurze Phase der NF-κB-Aktivität etwa 1 bis 3 h nach Infektion [188, 189]. Die darin involvierten viralen Proteine wurden nicht identifiziert. In Transfektionsstudien wurden bisher zwei MCMV-Proteine mit einer Aktivierung von NF-κB in Zusammenhang gebracht. Das MCMV-Protein IE1 kann wie das HCMV-IE1 die Expression des NF-κB-Proteins p105/p50 stimulieren [190]. Zudem induziert der virale Chemokinrezeptor M33 die NF-κB-abhängige Reportergenexpression in transfizierten Zellen, ähnlich dem HCMV-Protein US28 [191].

Die Bedeutung der frühen NF-κB-Aktivierung für den CMV-Replikationszyklus wird kontrovers diskutiert. Da der Enhancer der IE-Proteine (*major immediate-early* (MIE) *enhancer*) von HCMV und MCMV mehrere NF-κB-Bindestellen enthält, könnte eine Aktivierung von NF-κB die Expression der IE-Proteine induzieren oder verstärken und so die virale Replikation fördern. Einige Studien haben einen solchen Effekt nachgewiesen, andere jedoch nicht, was wahrscheinlich durch Unterschiede in den experimentellen Bedingungen begründet ist [180, 192-194]. Eine wichtige Variable scheint der Aktivierungsstatus anderer zellulärer Transkriptionsfaktoren zu sein, die mit NF-κB zusammenwirken und das Fehlen von NF-κB zum Teil kompensieren können [195, 196]. Es wurde gezeigt, dass die NF-κB-Aktivierung essentiell ist bei der Infektion nicht-proliferierender Zellen [197]. Die Autoren diese Studie stellen die Vermutung auf, dass dies auf den veränderten transkriptionellen Status ruhender Zellen gegenüber proliferierenden Zellen zurückzuführen ist.

Zu späteren Zeitpunkten der Infektion kann HCMV die TNFα- und IL-1β-induzierte NF-κB-Aktivierung blockieren [198, 199]. Dies scheint über zwei voneinander getrennte Mechanismen zu geschehen. Während die IL-1β-induzierte NF-κB-Aktivierung auf noch unbekannte Weise inhibiert wird, korreliert die Inhibition der TNFα-induzierten NF-κB-Aktivierung mit der Herabregulation des TNFR1 von der Zelloberfläche [198, 200]. Für zwei HCMV-Proteine wurde eine NF-κB-inhibierende Funktion beschrieben. Das virale Zytokin-Homolog cmvIL-10 inhibiert die Phosphorylierung und Degradation von IκBα nach Stimulation mit LPS und TNFα und reduziert die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine [201]. Da es sich um ein sezerniertes Virusprotein handelt, könnte cmvIL-10 die NF-κB-Aktivierung und Zytokinproduktion in uninfizierten benachbarten Zellen inhibieren, was die Immunantwort reduzieren und die virale Persistenz fördern würde [201]. Das virale Protein IE2 blockiert die Virusinduzierte und TNFα-induzierte NF-κB-Aktivierung, was die Produktion von IFNβ und anderer NF-κB-Zielproteine inhibiert [202]. IE2 verhindert nicht die IκBα-Degradation, sondern blockiert die Bindung von NF-κB an DNA [202]. Eine weitere Studie zeigte, dass IE2 auch die Transkriptions-aktivierende Funktion von NF-κB nach erfolgter DNA-Bindung inhibieren kann [203].

Wie HCMV inhibiert auch MCMV zu späteren Zeitpunkten der Infektion die NF- κ B-Aktivierung nach Stimulation mit TNF α , IL-1 β und verschiedenen TLR-Liganden [204, 205]. Das dafür verantwortliche virale Protein ist M45, das im folgenden Abschnitt genauer vorgestellt wird.

1.3.1 Immunmodulation durch das MCMV-Protein M45

Das Protein M45 des MCMV besteht aus 1174 Aminosäuren und ist in seinem C-terminalen Bereich homolog zur großen Untereinheit des zellulären Enzyms Ribonukleotid-Reduktase (RNR R1), das die Reduktion von Ribonukleotiden zu Desoxyribonukleotiden katalysiert [206] (Abb. **1.7**). Im Gegensatz zu α - und γ -Herpesviren, fehlt β -Herpesviren wie CMV die kleine RNR-Untereinheit (R2) und ihr R1-Homolog besitzt keine RNR-Aktivität [206, 207]. Dies trifft auch auf M45 zu, dem wichtige katalytische Aminosäuren innerhalb der R1-Domäne fehlen [208]. Stattdessen ist MCMV in der Lage, die Expression der zellulären RNR-Untereinheiten zu stimulieren [208]. Es wird angenommen, dass diese alternative Strategie zur Generierung von Deoxyribonukleotiden dazu führte, dass M45 seine RNR-Aktivität durch Mutation verloren und neue Funktionen erworben hat [207].



Abb. 1.7 Schematische Darstellung des M45-Proteins von MCMV

M45 ist aus 1174 Aminosäuren (AS) aufgebaut und besitzt im C-terminalen Bereich eine Homolgie zur großen Untereinheit der Ribonukleotid-Reduktase (RNR R1). Am N-Terminus befindet sich ein RIP-homotypisches Interaktionsmotiv (RHIM).

Während der Infektion wird M45 zu frühen Zeitpunkten exprimiert, ist im Zytoplasma infizierter oder transfizierter Zellen lokalisiert und ist auch Bestandteil des Viruspartikels [208]. M45 hat multiple Funktionen in der Modulation der angeborenen Immunantwort, vor allem in der Zelltod-Inhibition und der Regulierung der Inflammationsreaktion.

M45 inhibiert eine Form des Zelltods, die programmierte Nekrose oder Nekroptose genannt wird. Nekroptose kann durch die Aktivierung von Todesrezeptoren wie Fas oder TNFR1 ausgelöst werden, aber auch durch PRRs wie TLR3, TLR4 oder DAI [209, 210]. Zudem kann Zellstress wie DNA-Schäden oder oxidativer Stress zur Induktion von Nekroptose führen [209]. Die programmierte Nekrose verläuft im Gegensatz zur Apoptose Caspase-unabhängig und wird durch Caspase-8 negativ reguliert. Daher sind Zellen, in denen Caspase-8 fehlt

oder inhibiert ist, sensitiv für die Induktion von Nekrose [209]. In MCMV-infizierten Zellen wird Caspase-8 durch das virale Protein M36 inhibiert [168]. Zudem kann MCMV die programmierte Nekrose mittels des DNA-Sensors DAI auslösen [210]. RIP3 ist essentiell für die Nekrose-Induktion und wird durch Interaktion mit RIP1, DAI oder TRIF aktiviert [211, 212]. Alle vier Proteine besitzen ein RIP-homotypisches Interaktionsmotiv (RHIM), das für die Interaktion notwendig ist [212]. Auch M45 besitzt ein RHIM, mittels dessen es mit RIP3 und DAI interagiert [213, 214]. In RHIM-abhängiger Weise blockiert M45 die Interaktion zwischen RIP3 und RIP1 sowie zwischen RIP3 und DAI und inhibiert damit sowohl die TNFR1-vermittelte Nekrose als auch die Virus-induzierte Nekrose [146, 214] (Abb. **1.8**).



Abb. 1.8 Inhibition der programmierten Nekrose durch M45

M45 interagiert in RHIM-abhängiger Weise mit RIP3 und DAI und inhibiert die TNFR1-vermittelte und Virus-induzierte Nekrose.

RIP1 und RIP3 sind auch an der DAI-vermittelten NF-κB-Aktivierung beteiligt, die ebenfalls durch M45 inhibiert wird [146] (Abb. **1.9**). M45 interagiert außerdem mit RIP1 und blockiert die RIP1-abhängige Aktivierung von NF-κB und p38 MAPK nach Stimulation des TNFR1 und TLR3 [204] (Abb. **1.9**). Für die Interaktion von M45 mit RIP1 und die Inhibition der RIP1-vermittelten NF-κB-Aktivierung wird das RHIM nicht benötigt [204]. M45 inhibiert zudem die RIP1-unabhängige NF-κB-Aktivierung nach TLR2- und IL-1R-Stimulation [205]. Hierfür dient der IKK-Komplex als Angriffspunkt. M45 interagiert mit der IKK-Untereinheit NEMO und induziert deren lysosomale Degradation durch Relokalisation von NEMO in Autophagosomen [205]. Die NEMO-Degradation ist ein effizienter Mechanismus zur Blockierung aller kanonischen NF-κB-Signalwege, womit einer der wichtigsten Mediatoren der Inflammationsreaktion weitgehend inaktiviert wird.



Abb. 1.9 Inhibition der NF-κB-Aktivierung durch M45

M45 interagiert mit RIP1 und inhibiert die RIP1-abhängige Aktivierung von NF-κB- und p38 MAPK. Durch Interaktion mit RIP1 und RIP3 blockiert M45 auch die DAI-vermittelte NF-κB-Aktivierung. Zudem interagiert M45 mit NEMO und induziert dessen lysosomale Degradation, was in der Inhibition aller kanonischen NF-κB-Signalwege resultiert.

1.4 Zielsetzung

Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass MCMV zu frühen Zeitpunkten der Infektion eine Aktivierung von NF-κB induziert, zu späteren Zeitpunkten jedoch die NF-κB-Aktivierung inhibiert [188]. In vorangegangenen Studien wurde gezeigt, dass das virale Protein M45 für die NF-κB-Inhibition verantwortlich ist [204, 205]. Wodurch die initiale NF-κB-Aktivierung bewirkt wird, war dagegen unbekannt. Bemerkenswerterweise wurde beschrieben, dass M45 in transfizierten Zellen eine schwache, aber messbare Induktion der NF-κB-Aktivität bewirkte [146].

Ziel der Arbeit war es, festzustellen ob M45 die frühe NF-kB-Aktivierung während der viralen Infektion induziert und sollte dies der Fall sein, den zugrunde liegenden Mechanismus aufzuklären. Ein weiteres Ziel bestand darin, zu bestimmen welche Bereiche des M45-Proteins für die verschiedenen bekannten M45-Funktionen benötigt werden. Da in früheren Studien zu diesem Zweck hauptsächlich Überexpressionssysteme verwendet wurden, sollte die Funktionalität verschiedener N- oder C-terminal verkürzter M45-Mutanten im Kontext der Virusinfektion untersucht werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen zu einem besseren Verständnis der Virus-Wirt-Interaktion, speziell der viralen Immunmodulation beitragen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Quelle
293A	humane embryonale Nierenepithel- zellen, Subklon der 293 Zellline (selektiert auf flache Morphologie)	Invitrogen
IC-21	murine peritoneale Makrophagen aus C57Bl/6, SV40-immortalisiert	ATCC (TIB-186)
MEFs	murine embryonale Fibroblasten aus C57Bl/6N, immortalisiert durch SV40 large T antigen	Edward Mocarski (Stanford University, Stanford, CA)
MyD88 -/-	immortalisierte murine Fibroblasten aus MyD88-Knockout-Mäusen	Simon Fillatreau (Deutsches Rheuma-Forschungszentrum, Berlin) [215]
NEMO -/-	immortalisierte murine Fibroblasten aus NEMO-Knockout-Mäusen	Michael Karin (University of California, San Diego, CA) [216]
NIH3T3	murine embryonale Fibroblasten aus NIH/Swiss, spontan immortalisiert	ATCC (CRL-1658)
NIH3T3 pEpiNo-M45	NIH3T3, stabil transfiziert mit pEpiNo-M45 HA-ori	im Rahmen dieser Arbeit generiert
Phoenix	retrovirale Verpackungszelllinie, basierend auf HEK-293T Zellen; exprimiert stabil gag, pol und env	Gary Nolan (Stanford University, Stanford, CA) [217]
RIP1 -/-	immortalisierte murine Fibroblasten aus RIP1-Knockout-Mäusen	Michelle Kelliher (University of Massachusetts, Boston, MA) [218]
RIP1 ^{-/-} pMSCV	RIP1 ^{-/-} Zellen, stabil transduziert mit pMSCVpuro-Leervektor	[204]
RIP1 ^{-/-} pMSCV-RIP1	RIP1 -/- Zellen, stabil transduziert mit RIP1-exprimierendem pMSCVpuro	[204]
RIP3 -/-	immortalisierte murine Fibroblasten aus RIP3-Knockout-Mäusen	Edward Mocarski (Stanford University, Stanford, CA) [219]
SVEC4-10	murine Endothelzellen aus C3H/HeJ, SV40-immortalisiert	ATCC (CRL-2181)
TLR2/4 -/-	immortalisierte murine Fibroblasten aus TLR2/4-Doppelknockout-Mäusen	Simon Fillatreau (Deutsches Rheuma-Forschungszentrum, Berlin) [220]
TLR3 -/-	immortalisierte murine Fibroblasten aus TLR3-Knockout-Mäusen	Jackson Laboratories [221]

TNFR1	immortalisierte murine Fibroblasten	Michelle Kelliher (University of
	aus TNFR1-Knockout-Mäusen	Massachusetts, Boston, MA) [222]
	immortalisierte murine Fibroblasten	Michelle Kelliher (Liniversity of
TRAF2/5 -/-	aus TRAF2/5-Doppelknockout-	Magaaghugatta Bastan MA) [150]
	Mäusen	Massachusetts, Boston, MA) [159]
	immortalisierte murine Fibroblasten	Arnd Kieser (Helmholtz Center,
IKAFO	aus TRAF6-Knockout-Mäusen	München) [223]
TRAF6 ^{-/-}	TRAF6 ^{-/-} Zellen, stabil transduziert mit	im Pahman diasar Arhait ganariart
pMSCV	pMSCVpuro-Leervektor	
TRAF6 ^{-/-}	TRAF6 ^{-/-} Zellen, stabil transduziert mit	
pMSCV-	FLAG-TRAF6-exprimierendem	im Rahmen dieser Arbeit generiert
TRAF6	pMSCVpuro	
	immortalisierte murine Fibroblasten	Marcus Heimesaat (Charité,
	aus TRIF-Knockout-Mäusen	Berlin) [224]

2.1.2 Viren

Virus	Beschreibung	Quelle
	MCMV Smith, kloniert als BAC; mit reparierter Mutation des ORFs	[225,
	MCK-2 (Bezeichnung des reparierten BACs: pSM3fr-MCK-2fl)	226]

Folgende Virusmutanten wurden im Rahmen dieser Arbeit auf Basis des MCMV wt generiert:

Virus	Beschreibung		
MCMV ΔM45	MCMV Smith pSM3fr-MCK-2fl mit vollständiger Deletion des ORFs M45		
	MCMV Smith pSM3fr-MCK-2fl mit reinseriertem vollständigen ORF M45		
	einschließlich eines C-terminalen HA-Tags		
	MCMV Smith pSM3fr-MCK-2fl mit reinseriertem N-terminal verkürzten		
	ORF M45 Nt2 einschließlich eines C-terminalen HA-Tags		
	MCMV Smith pSM3fr-MCK-2fl mit reinseriertem N-terminal verkürzten		
	ORF M45 Nt3 einschließlich eines C-terminalen HA-Tags		
MCMV/ NH3h	MCMV Smith pSM3fr-MCK-2fl mit reinseriertem N-terminal verkürzten		
	ORF M45 Nt3b einschließlich eines C-terminalen HA-Tags		
	MCMV Smith pSM3fr-MCK-2fl mit reinseriertem N-terminal verkürzten		
	ORF M45 Nt3c einschließlich eines C-terminalen HA-Tags		
	MCMV Smith pSM3fr-MCK-2fl mit reinseriertem C-terminal verkürzten		
	ORF M45 Ct6 einschließlich eines C-terminalen HA-Tags		
	MCMV Smith pSM3fr-MCK-2fl mit reinseriertem C-terminal verkürzten		
	ORF M45 Ct5 einschließlich eines C-terminalen HA-Tags		
	MCMV Smith pSM3fr-MCK-2fl mit reinseriertem C-terminal verkürzten		
	ORF M45 Ct4 einschließlich eines C-terminalen HA-Tags		

MCMV Ct3	MCMV Smith pSM3fr-MCK-2fl mit reinseriertem C-terminal verkürzten
	ORF M45 Ct3 einschließlich eines C-terminalen HA-Tags
MCMV 1-277	MCMV Smith pSM3fr-MCK-2fl mit reinseriertem C-terminal verkürzten
	ORF M45 1-277 einschließlich eines C-terminalen HA-Tags
MCMV mutRHIM	MCMV Smith pSM3fr-MCK-2fl mit reinseriertem vollständigen ORF M45
	mit mutierter RHIM-Domäne einschließlich eines C-terminalen HA-Tags

2.1.3 Bakterien

Bakterien	Beschreibung	Quelle
E coli	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80dlacZΔM15	
DH10B	ΔlacX74 endA1 recA1 deoR Δ(ara,leu)7697	Life Technologies
	araD139 galU GalK nupG rpsL λ-	
E. coli	$DH10B \mid c/857 \wedge (crc bic/l) \sim crc C BB \wedge D/ ccc/$	Nikolaus Osterrieder
GS1783		(FU Berlin) [227]

2.1.4 Plasmide

Plasmid	Beschreibung Quelle		
pBlueScript II KS(+)	Klonierungsvektor, <i>amp</i> ^R	Stratagene	
pcDNA3	Expressionsvektor, <i>amp</i> ^R , <i>neo</i> ^R	Life Technologies	
pcDNA3-M45	Expression der M45-Verkürzung Ct3 mit	[205]	
Ct3 HA	C-terminalem HA-Tag		
pcDNA3-M45	Expression der M45-Verkürzung Ct4 mit	[205]	
Ct4 HA	C-terminalem HA-Tag		
pcDNA3-M45	Expression der M45-Verkürzung Ct5 mit	[205]	
Ct5 HA	C-terminalem HA-Tag		
pcDNA3-M45	Expression der M45-Verkürzung Ct6 mit	[205]	
Ct6 HA	C-terminalem HA-Tag		
pcDNA3-M45	Expression von M45 mit C-terminalem	[204]	
НА	HA-Tag		
pcDNA3-M45	Expression der M45-Verkürzung Nt2 mit	[204]	
Nt2 HA	C-terminalem HA-Tag		
pcDNA3-M45	Expression der M45-Verkürzung Nt3 mit	[204]	
Nt3 HA	C-terminalem HA-Tag		
pCMV-Tag 5A-	Expression der M45-Verkürzung 1-277 mit	Edward Mocarski (Stanford	
M45 1-277	C-terminalem myc-Tag	University, Stanford, CA)	
pCMV-Tag 5A-	Expression der M45-Mutante mutRHIM mit	Edward Mocarski (Stanford	
M45 mutRHIM	C-terminalem myc-Tag	University, Stanford, CA)	
	Expressionsvektor zur Herstellung von GFP-	Clontech	
pEGFP-C1	Fusionsproteinen (C-terminales GFP), kan ^R ,	Laboratories	
	neo ^R		

	episomaler Expressionsvektor mit lytischem	Zsolt Ruzsics (Max von	
pEpiNo-luc-ori	MCMV-Replikationsursprung, <i>neo</i> ^R ,	Pettenkofer-Institut,	
	Luciferase-Expression	München) [228]	
	Template-Plasmid für En Passant-	Nikolaus Osterrieder	
perkan-3	Mutagenese, enthält I-SceI-aphAI-Kassette	(FU Berlin) [229]	
pFLAG CMV2-	Expression von humanem IKKβ mit	Addgene	
ΙΚΚβ	N-terminalem Flag-Tag, <i>amp</i> ^R	(Plasmid 11103)	
pFLAG CMV2-	Expression von murinem MyD88 mit	Addgene	
MyD88	N-terminalem FLAG-Tag, amp ^R	(Plasmid 13093)	
pME18S-	Expression des murinen TRAF6 mit	[230]	
FLAG-TRAF6	N-terminalem FLAG-Tag		
	Retroviraler Expressionsvektor zur Anzucht	Clontech	
pMSCvpuro	von Retroviren, <i>amp</i> ^R , <i>puro</i> ^R	Laboratories	
	NF-kB Reporterplasmid, exprimiert		
pNifty2-SEAP	sekretierte embryonale alkalische	InvivoGen	
(NF-kB)	Phosphatase unter Kontrolle eines NF-kB-		
	induzierbaren ELAM-1-Promoters, <i>zeo</i> ^R		
pRK5-	Expression von humanem RIP1 mit	Zeng-Gang Liu, NIH,	
myc RIP1	N-terminalem myc-Tag	Bethesda, MD [157]	

Folgende Plasmide wurden im Rahmen dieser Arbeit generiert:

Plasmid	Beschreibung	Klonierung
pBlueScript- Homologie	Klonierungsvektor zur Erstellung der Transfer-Konstrukte für En Passant-Mutagenese, enthält Homologien für Rekombination in den M45-Lokus des MCMV- BAC	Einsetzen eines entsprechend designten Oligonukleotides in Pvull- Schnittstelle von pBlueScript II KS(+)
pBlueScript- Homologie-M45 HA-pEPkan	Transfer-Konstrukt für Insertion von M45 HA in MCMV-BAC mittels En Passant-Mutagenese	PCR-Amplifikation der I-Scel-aphAl- Kassette aus pEPkan-S und Einsetzen in Bsu36I-Schnittstelle von M45 HA in pcDNA3; Umklonierung von M45 HA- pEPkan aus pcDNA3 in pBlueScript- Homologie mittels KpnI- und Apal- Schnittstellen
pBlueScript- Homologie-M45 Verkürzung HA- pEPkan	Transfer-Konstrukte für Insertion der M45-Verkürzungen Nt2, Nt3, Nt3b, Nt3c, Ct6, Ct5, Ct4, Ct3 und 1-277sowie der mutRHIM- Mutante in MCMV-BAC mittels En Passant-Mutagenese	Insertion der der I-Scel-aphAI-Kassette aus pEPkan-S in Bsu36I-Schnittstelle von M45, bei 1-277 in BamHI-Schnitt- stelle; Umklonierung in pBlueScript- Homologie mittels KpnI- oder HindIII- und ApaI- oder XbaI-Schnittstellen

pcDNA3-M45 1-277 HA	Expression der M45-Verkürzung 1-277 mit C-terminalem HA-Tag	PCR-Amplifikation der M45-Nukleotide
		1 bis 277 und Einsetzen in KpnI- und
		Apal-Schnittstellen von pcDNA3
pcDNA3-M45 mutRHIM HA	Expression der M45-Mutante mutRHIM mit C-terminalem HA- Tag	Ersetzen des KpnI-BamHI-Fragmentes
		von pcDNA3-M45 HA mit dem
		entsprechenden Fragment aus pCMV-
		Tag 5A-M45 mutRHIM
pcDNA3-M45 Nt3b HA	Expression der M45-Verkürzung Nt3b mit C-terminalem HA-Tag	PCR-Amplifikation der M45-Nukleotide
		415 bis 1174 und Einsetzen in KpnI-
		und Xbal-Schnittstellen von pcDNA3
pcDNA3-M45 Nt3c HA	Expression der M45-Verkürzung Nt3c mit C-terminalem HA-Tag	PCR-Amplifikation der M45-Nukleotide
		494 bis 1174 und Einsetzen in KpnI-
		und Xbal-Schnittstellen von pcDNA3
	Expression von M45 HA nach Infektion mit MCMV	Restriktion von M45 HA aus pcDNA3
pEpiNo-		durch Partialverdau mit HindIII und
M45 HA-ori		Xbal, Ersetzen des Luciferase-Gens in
		pEpiNo-luc-ori durch M45 HA
pMSCVpuro- FLAG-TRAF6	retroviraler Expressionsvektor, exprimiert TRAF6 mit N-terminalem FLAG-Tag	Restriktion von pME18S-FLAG-TRAF6
		mit BamHI und Acc65I, Blunten und
		Einsetzen in Hpal-Schnittstelle von
		pMSCVpuro
pMSCVpuro- hRIP1	retroviraler Expressionsvektor, exprimiert humanes RIP1	Restriktion von pRK5-myc RIP1 mit
		EcoRI und HindIII, Blunten und
		Einsetzen in Hpal-Schnittstelle von
		pMSCVpuro

2.1.5 Primer und Oligos

Alle Primer und Oligos wurden von Life Technologies bezogen.

Primer	Sequenz (5`- 3`)	Verwendung
en passant M45k.o. fwd	TTCTACGTCGACGTCGGGCCCCTCGT CGAGTTCGCGTGACCGGCGAACTCGT CGCCAAAAtagggataacagggtaatcgattt	Knockout von M45 mittels En Passant-Mutagenese
en passant M45k.o. rev	CCAGAGCAATAGAACTCGTTTTTTGGC GACGAGTTCGCCGGTCACGCGAACTC GACGAGGgccagtgttacaaccaattaacc	Knockout von M45 mittels En Passant-Mutagenese
en passant RevM45 fwd	CTACCTCAGGCAGATCTCGAAAGAGT CCGCGACGGTCGCCGTGCGCCGCGG CCGCTCGGCtagggataacagggtaatcgattt	Klonierung der Transfer- Konstrukte für Insertion von M45 in MCMV ΔM45
en passant RevM45 rev	ACTCCTGAGGgccagtgttacaaccaattaacc	Klonierung der Transfer- Konstrukte für Insertion von M45 in MCMV ΔM45

M45-Homologie fwd	ATCAGCTGGGACAGCTCTCCGTGGTT AAGCTAGAGAAGTTCTACGTCGACGT CGGGCCTCTCGTCGAGTTCGCGTGAC GGTACCAAGCTTTCTAGAGG	Oligo zur Klonierung von pBlueScript-Homologie
M45-Homologie rev	ATCAGCTGCACTCGAGCGCCAGAGCA ATAGAACTCGTTTTTTGGCGACGAGTT CGCCGGGGCCCTCTAGAAAGCTTGG	Oligo zur Klonierung von pBlueScript-Homologie
Myco 1 GPO-3 (fwd)	GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT	PCR zum Nachweis von Mycoplasmen
Myco 2 MGSO (rev)	TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC	PCR zum Nachweis von Mycoplasmen
Nt3b fwd	ACTGGTACCACCATGGCTCGCATCCG CCG	PCR-Primer für Klonierung von pcDNA3-M45 Nt3b HA
Nt3b rev	CCTCTAGATCAAGCGTAGTCTG	PCR-Primer für Klonierung von pcDNA3-M45 Nt3b HA und pcDNA3-M45 Nt3c HA
Nt3c fwd	ACTGGTACCACCATGGTGGTGGACGC CATG	PCR-Primer für Klonierung von pcDNA3-M45 Nt3c HA
RevM45 1-277 fwd	ACAGGTACCATGGATCGCCAGCCCAA AGTC	Klonierung von pcDNA3-M45 1-277 HA
RevM45 1-277 rev	TAGGGCCCTCAAGCGTAGTCTGGGAC GTCGTATGGGTAGTACAGGAGGGGAT CAGCTTTAG	Klonierung von pcDNA3-M45 1-277 HA
RevM45 BamHI fwd	AAGGATCCGCGGCCGCCACCCCGC CGCCACCACCCCCGCCGCCACCGCC GTCGAAAAtagggataacagggtaatcgattt	Klonierung des Transfer- Konstruktes für Insertion der M45-Verkürzung 1-277 in MCMV ΔM45
RevM45 BamHI rev	AAGGATCCgccagtgttacaaccaattaacc	Klonierung des Transfer- Konstruktes für Insertion der M45-Verkürzung 1-277 in MCMV ΔM45
Seq M45 mutRHIM	GTCTACTCCGACCCGGACAA	Sequenzierung des M45 RHIM-Motivs (bindet in M45)
Seq M45k.o. fwd	GGCCGTCCACCGGCTGTCTC	Sequenzierung des M45- Lokus in MCMV (bindet in M46)
Seq M45k.o. rev	CTCGCGATCAGACAGTCTCG	Sequenzierung des M45- Lokus in MCMV (bindet zwischen M44 und M45)
Seq pBlueScript fwd	CGCGTAACCACCACACCCGC	Sequenzierung von pBlueScript-Konstrukten
Seq pBlueScript rev	GCTGATACCGCTCGCCGCAG	Sequenzierung von pBlueScript-Konstrukten
		Sequenzierung von pcDNA-
----------------	--------------------------	----------------------------------
Seq pcDNA fwd	CGTGTACGGTGGGAGGTC	Konstrukten (bindet im CMV-
		Promoter)
		Sequenzierung von pcDNA-
Seq pound rev	CAGGGTCAAGGAAGGCACG	Konstrukten
Sog pEpiNo fwd	CCTCTTACCCCTCCTACC	Sequenzierung von pEpiNo-
		ori-Konstrukten
		Sequenzierung von pEpiNo-
		ori-Konstrukten
Seq pMSCVpuro	CCCTTGAACCTCCTCGTTCGACC	Sequenzierung von
fwd		pMSCVpuro-Konstrukten
Seq pMSCVpuro	GAGACGTGCTACTTCCATTTGTC	Sequenzierung von
rev	CACACCICCIACITICCATTICIC	pMSCVpuro-Konstrukten
	assetttatastactsttac	Sequenzierung von
Seq Sv40pA lev	gaaalligigalgelalige	pME18S-Konstrukten
Seq SV40pro	tatttatacagaggccgagg	Sequenzierung von
fwd	lalliaigcayayyccyayy	pME18S-Konstrukten
LBR fwd	TGCAGAAGGAACACCTCT TG	qRT-PCR von Lamin B
		receptor (NM_133815)
I BR rov		qRT-PCR von Lamin B
	receptor (NM_133815)	
		qRT-PCR von <i>Nfkbia</i> (ΙκΒα)
		(NM_010907)
		qRT-PCR von <i>Nfkbia</i> (ΙκΒα)
NI KDIA IEV		(NM_010907)
		qRT-PCR von Tnfaip3 (A20)
		(NM_001166402)
	AGGCACGGGACATTGTTCT	qRT-PCR von Tnfaip3 (A20)
		(NM_001166402)
CXCI 10 fwd	GCTGCCGTCATTTCTGC	qRT-PCR von Cxcl10
CACETOTWO		(NM_021274)
CXCI 10 rov	TETEACTERCOCCATENTE	qRT-PCR von Cxcl10
CACETOTEV		(NM_021274)
		qRT-PCR von MCMV ie1
		(M11788)
IE1 rov		qRT-PCR von MCMV ie1
		(M11788)

2.1.6 Antikörper

Primärantikörper:

Antigen	Klon/Bezeichnung	Spezies	Verwendung	Hersteller
FLAG	M2	Maus	Western Blot (1:1000)	Sigma-Aldrich
GAPDH	14C10	Kaninchen	Western Blot (1:1000)	Cell Signaling
gВ	SN101	Maus	Western Blot (1:50)	Stipan Jonjic (University of Rijeka, Croatia)
НА	16B12	Maus	Western Blot (1:1000)	Covance
НА	H6908	Kaninchen	Immunpräzipitation (1,2 µg pro 500 µg Proteinlysat)	Sigma-Aldrich
IE1	Chroma101	Maus	Western Blot (1:1000) Immunfluoreszenz (1:500)	Stipan Jonjic (University of Rijeka, Croatia)
IE3		Kaninchen	Immunfluoreszenz (1:300)	Eva Borst (Medizinische Hochschule Hannover)
ΙκΒα	C-21	Kaninchen	Western Blot (1:500)	Santa Cruz Biotechnology
LSD1		Kaninchen	Western Blot (1:1000)	Cell Signaling
M45	crude serum	Kaninchen	Western Blot (1:1000)	[208]
NEMO (IKKy)	EA2-6	Maus	Western Blot (1:2000)	MBL International
NF-кВ p65	F-6	Maus	Western Blot (1:500)	Santa Cruz Biotechnology
Phospho- ΙκΒα	5A5	Maus	Western Blot (1:1000)	Cell Signaling
RIP1	Klon 38	Maus	Western Blot (1:1000)	BD Transduction Laboratories
RIP3		Kaninchen	Western Blot (1:1000)	Imgenex
β-Aktin	AC-74	Maus	Western Blot (1:3000)	Sigma-Aldrich

Antigen	Konjugation	Spezies	Verwendung	Hersteller
Maus-Ig	HRP	Ziege	Western Blot (1:3000)	DakoCytomation
Kaninchen-Ig	HRP	Schwein	Western Blot (1:3000)	DakoCytomation
Maus-InG	HRP	Ziege	Western Blot	Jackson
Mads-igO		Ziege	(1:3000)	ImmunoResearch
Kaninchen-IgG HRP	Ziege	Western Blot	Jackson	
		Liogo	(1:3000)	ImmunoResearch
Maus-IgG	Alexa Fluor 488	Ziege	Immunfluoreszenz (1:1000)	Life Technologies
Maus-IgG	Alexa Fluor 555	Ziege	Immunfluoreszenz (1:1000)	Life Technologies
Kaninchen-IgG	Alexa Fluor 488	Ziege	Immunfluoreszenz (1:1000)	Life Technologies
Kaninchen-IgG	Alexa Fluor 555	Ziege	Immunfluoreszenz (1:1000)	Life Technologies

Sekundärantikörper:

2.1.7 Chemikalien und Reagenzien

Standardchemikalien und -Reagenzien wurden von Roth, Merck, Sigma-Aldrich und Applichem bezogen. Nachfolgend sind besondere Substanzen und Reagenzien sowie die dazugehörigen Hersteller aufgeführt:

Antibiotika:

Antibiotikum	Verwendung	Endkonzentration	Hersteller
Ampicillin	Selektion von Bakterien	100 µg/ml	Roth
Chloramphenicol	Selektion von Bakterien	15 µg/ml	Roth
Diphterietoxin	Selektion von Zellen (Phoenix)	2 µg/ml	PAA
Geneticin (G418)	Selektion von Zellen	2 mg/ml	Roth
Hygromycin B	Selektion von Zellen (Phoenix)	200 µg/ml	PAA
Kanamycin	Selektion von Bakterien	50 µg/ml	Roth
Penicillin	Zusatz zum Zellkulturmedium	100 U/ml	PAA/Sigma- Aldrich
Puromycin	Selektion von Zellen	5 µg/ml	Sigma-Aldrich

Streptomycin	Zusatz zum Zellkulturmedium	100 µg/ml	PAA/Sigma- Aldrich
Enzyme:			
DreamTaq Green I	DNA-Polymerase	Thermo Scientif	ic
FastDigest-Restrik	tionsenzyme	Thermo Scientif	ic
Fast-AP (Alkalisch	e Phosphatase)	Thermo Scientif	ic
Klenow-Fragment		Thermo Scientif	ic
Phusion® High-Fic	lelity DNA-Polymerase	New England B	iolabs
T4-DNA-Ligase		Thermo Scientif	ic
T4-DNA-Polymera	se	Thermo Scientif	ic
RNAse A		Roth	
Größenstandards	:		
O'GeneRuler™ DN	IA Ladder Mix	Thermo Scientif	ic
PageRuler™ Prest	ained Protein Ladder	Thermo Scientif	ic
Sonstige Substar	zen und Reagenzien:		
Aqua-Poly/Mount		Polysciences, Ir	IC.
CellTiter 96® AQ _{ueous} One Solution Reagent		Promega	
Clean-Blot IP Detection Reagent		Thermo Scientif	ic
Draq5		BioStatus Limite	ed
ECL Western Blotting Detection Reagents		Amersham Bios	ciences
GelRed™ Nucleic Acid Stain		Biotrend Chemi	kalien GmbH
IL-1β, murin (Endk	onzentration 20 ng/ml)	Biomol	
LE Agarose		Biozym	
Lumigen TMA-6		Bioquote Limite	d
Lipofectamine 200	0	Life Technolgies	
Polyethylenimine, I	branched	Sigma	
Polybrene		Millipore	
PolyFect Transfect	tion Reagent	Qiagen	
Protease Inhibitor	Cocktail Complete Mini	Roche	
QUANTI-Blue™ D	etektionsmedium	InvivoGen	
rmp Protein A Sepharose Fast Flow		GE Healthcare	

2.1.8 Medien, Puffer und Lösungen

Zellkultur:

PAA/Sigma-Aldrich
PAA/Sigma-Aldrich
PAN Biotech
PAN Biotech
Life Technolgies
PAA/Sigma-Aldrich
PAA/Sigma-Aldrich
10 % (v/v) DMSO in FKS

Bakterienmedium:

LB-Medium (Lennox)	Roth
LB-Agar	LB-Medium mit 15 g/l
	Agar-Agar

Agarose-Gelelektrophorese:

50x TAE	2 M Tris	5x TBE	445 mM Tris
	50 mM EDTA		20 mM EDTA
	5,7 % (v/v) Essigsäure		445 mM Borat
	pH 8,0		pH 8,0

Polyacrylamid-Gelelektrophorese:

2x Proteinladepuffer	150 mM Tris			
	2 mM EDTA			
	20 % (v/v) Glycerin			
	4 % (v/v) SDS			
	10 % (v/v) β-Mercaptoethanol			
	Bromphenolblau			
	pH 6,8			
10x Lämmli-Laufpuffer	250 mM Tris	10x TBS-T	100 mM Tris	
	1,92 M Glycin		1,5 M NaCl	
	1 % (w/v) SDS		1 % (v/v) Tween	
			pH 7,5	

Transfer-Puffer Lysepuffer:	50 nM Tris 40 nM Glycin 0,04 % (v/v) SDS 20 % (v/v) Ethanol		
NP-40-Puffer	50 mM Tris	RIPA-Puffer	50 nM Tris
	150 mM NaCl		150 mM NaCl
	1 % (v/v) Nonidet P-4	0	1 % (v/v) Triton X-100
	pH 7,5		0,1 % (v/v) SDS
			1 % (w/v) Deoxylcholat
			pH 7,2
Waschpuffer für Ko	immunpräzipitation:		
Waschpuffer 1	10 mM Tris	Waschpuffer 2	10 mM Tris
	150 mM NaCl		500 mM NaCl
	2 mM EDTA		2 mM EDTA
	0,2 % (v/v) NP-40		0,2 % (v/v) NP-40
	pH 7,6		pH 7,6
Waschpuffer 3	10 mM Tris		
	рН 7,6		
Puffer für Plasmid-F	Präparation (Mini-Prä	p):	
S1	50 mM Tris	S2	200 mM NaOH
	10 mM EDTA		1 % (v/v) SDS
	100 µg/ml RNAse A		
	pH 8,0	S3	2,8 M Kaliumacetat
			pH 5,1
TE	10 mM Tris		
	1 mM EDTA		
	рН 8,0		

Puffer für Virionenaufreinigung:

NaPO ₄ -Puffer (0,04 M)	8 mM NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O
	32 mM Na ₂ HPO ₄ •(H ₂ O) ₂
	рН 7,4
15 % Natriumtartrat	15 % (w/v) Na ₂ Tartrat•(H ₂ O) ₂
	30 % (v/v) Glycerin
	in 0,04 M NaPO ₄ -Puffer
35 % Natriumtartrat	35 % (w/v) Na ₂ Tartrat•(H ₂ O) ₂
	in 0,04 M NaPO ₄ -Puffer
Immunfluoreszenz:	
Fixierung	4 % Paraformaldehyd in PBS
Aldehydblockierung	50 mM NH₄CI in PBS
Permeabilisierung	0,3 % Triton X-100 in PBS
Blockierung	0,2 % Gelatine in PBS

Fraktionierung von Zytoplasma und Zellkern:

Puffer A	10 mM HEPES
	10 mM KCL
	0,1 mM EDTA
	0,1 mM EGTA
	pH 7,9

2.1.9 Kits

BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific
FractionPREP™ Cell Fractionation Kit	Biovision
NucleoBond Xtra Midi	Macherey-Nagel
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel

2.1.10 Geräte

Ausschwingrotor SW-41Ti	Beckman
Bakterienbrutschrank IPP400	Memmert
Bakterienschüttelinkubator HT	Infors
Chemilumineszenzdetektion SL-4 3500WL	Peqlab

Electrophoresis Power Supply 301 FLUOstar-Omega Geldokumentation XR+ & Image Lab Gelsystem PerfectBlue MiniM Gene Pulser XCell HL-2000 HybriLinker L-70 Ultrazentrifuge LSM510 META/FCS Mikroskop Axiovert 40 CFL Mikroskop Primo Vert Mikrozentrifugen Mini-Protean Tetra Cell NanoDrop ND-1000 pH-Meter 211 Schüttelwasserbad 1092 Sicherheitswerkbank HeraSafe Taumel-Rollenmischer TRM 50 TC10 Automated Cell Counter Thermocycler T3000 Thermomixer comfort 5355 Transblot® Semi-dry Transfer Cell Überkopfschüttler Rotator SB2 Zellkulturinkubator CO2 HeraCell Zentrifuge 5810R Zentrifuge RC-6 plus

GE Healthcare BMG LABTECH Bio-Rad Peqlab **Bio-Rad** UVP Beckman Zeiss Zeiss Zeiss Eppendorf, Heraeus **Bio-Rad** Peglab Hanna Instruments GFL Heraeus **IDL GmbH Bio-Rad Biometra** Eppendorf **Bio-Rad** Stuart Heraeus Eppendorf Sorvall

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Herstellung elektrokompetenter Bakterien, Transformation und Lagerung

Zur Herstellung elektrokompetenter Bakterien wird eine exponentiell wachsende Kultur auf 4 °C abgekühlt und alle Salze des Kulturmediums entfernt.

Aus einer kleinvolumigen Übernacht-Kultur (10 ml) wurde eine große Kultur (100 ml) im Verhältnis 1:50 bis 1:20 angeimpft und bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,6 im Schüttelinkubator kultiviert. Daraufhin wurden die Bakterien auf Eis abgekühlt und 10 min bei 2500 g und 4 °C pelletiert. Das Pellet wurde 2x mit je 40 ml kaltem autoklavierten Wasser gewaschen sowie 1x mit 20 ml kaltem 10 %igen Glycerin. Die Resuspendierung des Pellets erfolgte jeweils durch Schütteln des Zentrifugenbechers, nicht durch Auf- und Abpipettieren. Schließlich wurden die Bakterien in 1 ml 10 %igem Glycerin resuspendiert, aliquotiert und in einem bei -80 °C vorgekühlten Aluminiumblock schockgefroren.

Die Transformation von Bakterien erfolgte mittels Elektroporation. Hierfür wurden 50 µl elektrokompetente Bakterien auf Eis mit der zu transformierenden DNA gemischt. Von Ligationsansätzen wurden 3 µl transformiert, von *supercoiled* Plasmiden 1 ng und von PCR-Produkten 150 ng. Das Bakterien-DNA-Gemisch wurde in 2 mm-Elektroporationsküvetten gegeben und mittels des *Gene Pulser XCell* einem elektrischen Impuls ausgesetzt (2500 V, 25 µF, 200 Ω). Es folgte die Zugabe von 950 µl LB-Medium und die Inkubation für 1 h im Schüttelheizblock vor dem Ausplattieren auf LB-Agar-Platten und der Übernacht-Inkubation im Bakterienbrutschrank.

Zur Langzeitlagerung von Bakterien wurde ein kleines Volumen einer Übernachtkultur 1:1 mit 60% Glycerin gemischt und bei -80 °C eingefroren.

2.2.1.2 DNA-Präparation aus Bakterien

Plasmid- und BAC-Präparation im kleinen Maßstab (Mini-Präp):

Die Präparation von Plasmid- oder BAC-DNA im 5 ml-Volumen erfolgte nach der Methode der alkalischen Lyse [231]. Hierzu wurden die Bakterien 5 min bei 3000 g pelletiert und in 300 µl Puffer S1 resuspendiert. Die Lyse erfolgte durch Zugabe von 300 µl Puffer S2. Nach 2-3minütiger Inkubation folgte die Neutralisation durch Zugabe von 300 µl Puffer S3, was zur Fällung von chromosomaler DNA und Proteinen führt. Diese wurden 20 min bei 15000 g und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand in neue Reaktionsgefäße überführt. Die Plasmid-

bzw. BAC-DNA wurde gefällt durch Zugabe 600 µl Isopropanol und anschließender Zentrifugation für 30 min bei 15000 g und 4 °C. Das DNA-Pellet wurde bei 50 °C im Heizblock getrocknet und in 50 µl Wasser (bei Plasmid-DNA) oder TE-Puffer (bei BAC-DNA) resuspendiert.

Plasmid- und BAC-Präparation im mittleren Maßstab (Midi-Präp):

Die Präparation von Plasmid- oder BAC-DNA im 200 ml-Volumen wurde mit Hilfe des NucleoBond Xtra Midi-Kits (Macherey-Nagel) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für BAC-Präparationen wurde das Protokoll für Low-copy Plasmide verwendet und der Elutionspuffer vor Zugabe auf die Säule erhitzt, um einen höheren pH-Wert für effizientere Elution zu erreichen.

2.2.1.3 Polymerase Chain Reaction, Restriktionsverdau und DNA-Ligation

Polymerase Chain Reactions (PCRs) wurden mit der DreamTaq Green DNA-Polymerase (Thermo Scientific) oder der Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase (New England Biolabs) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Alle verwendeten Restriktionsenzyme und zugehörige Puffer wurden von Thermo Scientific bezogen und nach Herstellerangaben verwendet. Für analytische Spaltungen von Plasmiden wurden 0,5 µg DNA eingesetzt, für präparative Plasmid-Verdaue 3 µg. Die Inkubation bei 37 °C erfolgte für jeweils 30 min. Analytische Spaltungen von BAC-DNA wurden mit 0,75-1,5 µg DNA durchgeführt, bei 30-60 minütiger Inkubationszeit. Für den Verdau von Mini-Präp-DNA wurden von Plasmid-Präparationen 2 µl eingesetzt, von BAC-Präparationen 17 µl.

Ligationen wurden mit der T4-DNA-Ligase (Thermo Scientific) durchgeführt. Vektor und Insert wurden im Verhältnis 1:6 oder 1:3 eingesetzt. Das Gesamtvolumen betrug 10 µl und die Ligation erfolgte über Nacht bei 16 °C oder für 2 h bei Raumtemperatur.

2.2.1.4 Agarose-Gelelektrophorese und Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Agarosegele für Plasmid-Fragmente wurden in einem Volumen von 100 ml mit 1 % Agarose in TAE-Puffer gegossen und die Proben für 1 h bei 120 V aufgetrennt. Für BAC-DNA wurden 0,5-0,6 %ige Agarosegele in TBE-Puffer mit einem Volumen von 300 ml hergestellt und die Auftrennung erfolgte über Nacht bei 50-60 V. Als Größenstandard diente der O'GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific), von dem für Plasmid-Gele 5 µl geladen wurden, für BAC-Gele 7 µl. Alle Agarosegele enthielten 0,5 µg/ml Ethidiumbromid. Für BAC-Gele wurde Ethidiumbromid zusätzlich in den Laufpuffer gegeben. Für besonders starke und gleichmäßige Anfärbung von BAC-Gelen wurde Ethidiumbromid in einigen Fällen durch GelRed Nucleic Acid Stain (Biotrend Chemikalien GmbH) ersetzt.

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte unter Verwendung des NucleoSpin Gel and PCR Clean-up-Kits (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben. Vektor-DNA wurde in 30 µl eluiert, Insert-DNA in 20 µl.

2.2.1.5 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA-Präparationen

Die Konzentration und Reinheit von DNA-Lösungen wurde photometrisch mit Hilfe des NanoDrop-1000 (Peqlab) bestimmt. Die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm dient der Bestimmung der DNA-Konzentration. Bei doppelsträngiger DNA entspricht eine OD_{260} von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml. Der Reinheitsgrad ergibt sich nach Messung der Absorption bei 280 nm aus dem Quotienten OD_{260}/OD_{280} , der bei einer sauberen Präparation zwischen 1,8 und 2,0 liegen sollte.

2.2.1.6 DNA-Sequenzierung

Alle DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma Seqlab - Sequence Laboratories Göttingen GmbH durchgeführt. Für Plasmid-DNA wurde die HotShot-Sequenzierung in Anspruch genommen, für BAC-DNA die AdvantageRead-Sequenzierung.

2.2.1.7 BAC-Mutagenese

Alle Virusmutanten wurden mittels En Passant-Mutagenese generiert [227]. Hierzu wurden E. coli des Stammes GS1783, die den MCMV-Wildtyp-BAC trugen, rekombinations- und elektrokompetent gemacht. Für den Knockout des M45-ORF wurde die I-Scel-aphAl-Kassette des Template-Plasmids pEPkan-S amplifiziert. Die verwendeten Primer enthielten Homologien zu den M45-flankierenden Bereichen im MCMV-BACsowie eine Duplikation für den zweiten Rekombinationsschritt zur Eliminierung der Selektionskassette. Abweichend vom publizierten Protokoll wurde die PCR bei gleichbleibender Annealing-Temperatur durchgeführt. Das entstandene PCR-Produkt wurde transformiert und die Bakterien auf Kanamycin-haltigen Agar-Platten selektiert. Die Überprüfung der Klone erfolgte durch Verdau mit Clal, EcoRI und Pstl. Zwei positive Klone wurden dem zweiten Rekombinationsschritt durch Bestätigung des Verlustes der Kanamycin-Resistenz, Restriktionsverdau mit Clal und EcoRIsowie durch Sequenzierung des M45-ORF tragen. Sie wurden überprüft durch Bestätigung des Verlustes der Kanamycin-Resistenz, Restriktionsverdau mit Clal und EcoRIsowie durch Sequenzierung des M45-ORF Lokus.

Auf der Basis des M45-Knockout-BAC wurde eine Revertante generiert durch Wiedereinsetzen des Volllänge-M45-ORFs. Alle M45-Mutanten wurden ebenfalls in den M45-

Material und Methoden

Knockout-BAC eingesetzt. Sowohl die Revertante als auch die M45-Mutanten tragen einen C-terminalen HA-Tag. Das Einsetzen von M45 in den M45-Knockout-BAC erfolgte über Transfer-Konstrukte. Hierzu wurde zunächst der Klonierungsvektor pBlueScript-Homologie erstellt. Dieser enthält Homologien für die Rekombination in den M45-Lokus des MCMV-BACsowie Schnittstellen zur Klonierung des Volllänge-M45 und aller M45-Mutanten. Die Homologie upstream des M45-Lokus enthält einen Nukleotid-Austausch zur Eliminierung einer Apal-Schnittstelle, die in einer stummen Mutation innerhalb des M46-ORF resultiert. Das fertige Transfer-Konstrukt trägt den M45-ORF, in den die I-Scel-aphAI-Kassette des pEPkan-S-Plasmids mit einer flankierenden Duplikation eingesetzt wurde. Mittels Pvull-Verdau wurde M45 zusammen mit den Homologie-Bereichen aus dem Transfer-Konstrukt ausgeschnitten und das resultierende lineare DNA-Fragment in Bakterien transformiert, die den M45-Knockout-BAC trugen. Nach dem zweiten Rekombinationsschritt zur Entfernung der Selektionskassette wurden positive Klone durch Restriktionsverdau mit Clal und Sequenzierung des M45-Lokus identifiziert.

2.2.1.8 4sU-Markierung und qRT-PCR

Für die Markierung frisch transkribierter RNA wurden 200 µM 4-Thiouridine (4sU; Carbosynth) für 1 h in das Zellkulturmedium gegeben. Anschließend wurde die Gesamt-RNA mittels Trizol-Reagenz (Invitrogen) isoliert. Die 4sU-markierte RNA wurde biotinyliert und aufgereinigt [232]. Es folgte die reverse Transkription (RT) in cDNA mit Superscript III (Invitrogen), Hexanukleotid Random-Primern (Invitrogen) und RNAse-Inhibitor RNAsin (Promega). Danach wurde eine quantitative RT-PCR der zu analysierenden Gene mittels SYBR green durchgeführt.

Dieses Experiment wurde von Miranda de Graaf und Lars Dölken an der Universität Cambridge, England durchgeführt.

2.2.2 Zellbiologische und virologische Methoden

2.2.2.1 Zellkultivierung, Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Kultivierung aller Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 80 % relativer Luftfeuchtigkeit auf 145 mm- Zellkulturschalen in 20 ml DMEM mit 4,5 g/l Glukose und L-Glutamin. Das Medium wurde ergänzt mit 1 % Penicillin/Streptomycin und 10 % Kälberserum. NIH3T3 erhielten Serum von neugeborenen Kälbern (NKS), alle anderen Zellen fötales Kälberserum (FKS). FKS und NKS wurden zur Inaktivierung des Komplementsystems für 30 min bei 56 °C im Wasserbad inkubiert. In der Regel wurden die Zellen alle 2-3 Tage gesplittet, wobei sie mit Trypsin von der Schale abgelöst und im Verhältnis 1:5 bis 1:10 verdünnt wurden. Zum Einfrieren wurden die Zellen trypsiniert, in Medium aufgenommen und für 5 min bei 300 g und 37 °C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in FKS mit 10 % DMSO resuspendiert. Die Zellen einer konfluenten 145 mm-Schale wurden in 4 Aliquots à 1 ml in Kryoröhrchen zunächst bei -80 °C eingefroren und später zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Zur Rekultivierung wurde der Inhalt eines Kryoröhrchens im 37 °C-Wasserbad aufgetaut, in 15 ml Medium aufgenommen und in eine 100 mm-Schale überführt.

2.2.2.2 Transfektion von Zellen

Phoenix-Zellen wurden mit Polyethylenimine (PEI, Sigma) transfiziert. Dies diente der Produktion von Retroviren für die Transduktion. Hierfür wurden 4x10⁶ Zellen pro 100mm-Schale ausgesät und am folgenden Tag mit 8 µg DNA transfiziert. Dazu wurde die DNA in 500 µl DMEM ohne Zusätze verdünnt. Parallel wurden 32 µl PEI in ebenfalls 500 µl DMEM ohne Zusätze verdünnt. Beide Ansätze wurden 10 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und anschließend vereint. Nach einer weiteren Inkubation von 25 min bei RT wurde das DNA-PEI-Gemisch auf die Zellen gegeben.

Für den NF-κB-Reporterassay wurden NIH3T3 mit Lipofectamine 2000 (Life Technolgies) transfiziert. Dazu wurden 7,5x10⁴ Zellen pro 24Well ausgesät und 1,5-2 h später mit 0,8 μg DNA transfiziert. Die DNA wurde in 50 μl Opti-MEM (Life Technolgies) verdünnt. Parallel wurden 2 μl Lipofectamine in ebenfalls 50 μl Opti-MEM verdünnt. Beide Ansätze wurden 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und anschließend vereint. Nach einer weiteren Inkubation von 20 min bei RT wurde das DNA-Lipofectamine-Gemisch auf die Zellen gegeben.

Zur Virusrekonstitution wurden NIH3T3 mit PolyFect (Qiagen) transfiziert. Es wurden $1,75x10^5$ Zellen pro 6Well ausgesät und am folgenden Tag mit 3 µg BAC-DNA transfiziert. Die DNA wurde in 300 µl DMEM ohne Zusätze aufgenommen und 32 µl PolyFect zugegeben. Diese Mischung wurde 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 600 µl DMEM mit Zusätzen zugegeben und der gesamte Ansatz auf die Zellen pipettiert.

2.2.2.3 Herstellung von Viruspräparationen

Für die Herstellung einer Viruspräparation wurden NIH3T3 auf 8 145 mm-Schalen ausgesät, mit 5x10⁶ Zellen pro Schale, und zugleich infiziert mit einer MOI von 0,02. Die Virusernte erfolgte etwa 24 h nach dem Beobachten eines zytopathischen Effekts bei allen Zellen, was der Regel 4-6 Tage nach der Infektion der Fall war. Der virushaltige Überstand aller Schalen wurde in 250 ml-Zentrifugenbechern vereint und zur Pelletierung abgelöster Zellen und Zelltrümmer für 15 min bei 5500 g und 4 °C zentrifugiert. Nach der Überführung in neue Zentrifugenbecher erfolgte die Pelletierung der Viren für 3 h bei 15000 g und 4 °C. Der

Überstand wurde verworfen und das Viruspellet in 1 ml Medium resuspendiert, aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Zur Rekonstitution eines Virus aus dem BAC wurden NIH3T3 im 6Well-Format mit der entsprechenden BAC-DNA transfiziert (siehe 2.2.2.2). Am folgenden Tag wurden die Zellen auf eine 100 mm-Schale umgesetzt und im weiteren Verlauf auf eine steigende Anzahl an 145 mm-Schalen, bis alle Zellen in infiziert waren. Daraufhin folgte die Virusernte wie oben beschrieben.

2.2.2.4 Bestimmung des Titers von Viruspräparationen und Infektion von Zellen

Zur Quantifizierung von Viruspräparationen wurde die mittlere tissue culture infectious dose pro ml (TCID₅₀/ml) mittels Endpunktverdünnung bestimmt. Die TCID₅₀ ist definiert als die Virusverdünnung, die benötigt wird, um 50 % einer gegebenen Zellzahl zu infizieren [233].

Hierzu wurden NIH3T3 in 96Well-Platten ausgesät, mit einer Zelldichte von 2000 Zellen pro Well. Am folgenden Tag wurde die zu titrierende Viruspräparation seriell in 10er-Potenzschritten verdünnt, mit den Verdünnungsstufen 10⁻² bis 10⁻⁹. Mit jeder Verdünnungsstufe wurden jeweils 12 Wells zweier 96Well-Platten infiziert. Eine Platte wurde anschließend 30 min bei 1000 g und 37 °C zentrifugiert, um auch den Titer nach centrifugal enhancement zu bestimmen [234]. Nach 6tägiger Inkubation im Brutschrank wurden die Wells, in denen ein zytopathischer Effekt zu beobachten war gezählt und der Titer mittels der Spearman-Kärber-Methode berechnet. Von jeder Viruspräparation wurden zwei Verdünnungsreihen erstellt und der Mittelwert der resultierenden Titer bestimmt.

Die Infektion von Zellen für Experimente erfolgte mit einer bestimmten multiplicity of infection (MOI). Die MOI ist die durchschnittliche Zahl an Viruspartikeln, mit der jede Zelle infiziert wird. Alle Experimente wurden mit einer hohen MOI von 5 oder 10 durchgeführt, um mit großer Sicherheit jede Zelle zu infizieren. Aus dem Virustiter, der gewünschten MOI und der ausgesäten Zellzahl wurde das benötigte Volumen an Viruspräparation berechnet.

2.2.2.5 UV-Inaktivierung von Viren

Für die UV-Inaktivierung wurden 8 ml der für die Infektion benötigten Virusverdünnung hergestellt und in eine 100 mm-Schale gegeben. Diese wurde ohne Deckel in einen UV-Crosslinker (HL-2000 HybriLinker, UVP) gestellt und 30 sec mit 1 J/cm² bestrahlt (Wellenlänge 254 nm).

2.2.2.6 Gradientenaufreinigung von Virionen

Für die Herstellung von Viruspräparationen zur Analyse im Western Blot wurde eine Aufreinigung mittels eines Glycerin-Tartrat-Gradienten vorgenommen [235].

Hierfür wurde zunächst eine Viruspräparation nach bereits beschriebenem Protokoll hergestellt (2.2.2.3) und das Viruspellet in 1 ml PBS resuspendiert. Der Gradient wurde in einem Gradientenmischer aus 5 ml einer 35 %igen Natriumtartrat-Lösung und 6,5 ml einer 15 %igen Natriumtartrat-Lösung mit 30 % Glycerin gegossen. Darüber wurde die Virussuspension geschichtet und über Nacht bei 94000 g und 10 °C ohne Bremse zentrifugiert. Die Virusbande wurde durch seitliches Anstechen des Röhrchens mit einer Spritze abgesaugt, die Viren mit PBS verdünnt und erneut pelletiert durch Zentrifugation für 2 h bei 68000 g und 4 °C. Das Viruspellet wurde in 100 µl PBS aufgenommen.

2.2.2.7 Anzucht von Retroviren und retrovirale Transduktion

Zur Anzucht von Retroviren zur Transduktion wurden Phoenix-Zellen mit einem retroviralen Vektor transfiziert, der das zu transduzierende Gen trägt. Die Transfektion von Phoenix-Zellen wurde bereits beschrieben (2.2.2.2). 48 h und 72 h nach Transfektion wurde der Retrovirus-haltige Überstand geerntet, durch einen 0,45 µm-Sterilfilter filtriert und bei -80 °C eingefroren oder direkt zur Transduktion verwendet.

Die zu transduzierenden Zellen wurden in geringer Dichte in 12Well-Platten ausgesät (NIH3T3 $4x10^4$ Zellen pro Well, MEFs $2x10^4$ Zellen pro Well) und am folgenden Tag transduziert. Hierfür wurde das Medium von den zu transduzierenden Zellen abgesaugt und durch 1,5 ml Retrovirussuspension ersetzt, die zuvor mit 5 µg/ml Polybrene versetzt wurde. Es folgte eine 30minütige Zentrifugation bei 1000 g und 37 °C. 4-8 h nach der Transduktion wurde das Medium gewechselt und am folgenden Tag eine zweite Transduktion durch-geführt.

2.2.2.8 Herstellung M45-exprimierender NIH3T3-Zellen

Zur Generierung von Viren, die das M45-Protein im Tegument tragen ohne das M45-Gen besitzen, wurden M45-komplementierende Zellen hergestellt mittels eines Systems, das den lytischen Replikationsursprung des MCMV zur konditionalen Genexpression nutzt [228]. Hierfür wurden NIH3T3 mit dem episomalen Plasmid pEpiNo-M45 HA-ori transfiziert, welches das M45-Gen und den MCMV-Replikationsursprung trägt. Von diesem Plasmid erfolgt nur dann eine M45-Expression, wenn die Zelle mit MCMV infiziert wird. Die transfizierten Zellen wurden selektiert mit G418 und Einzelzellklone isoliert, die durch Infektion mit MCMV ΔM45 auf Induzierbarkeit der M45-Expression getestet wurden. Der beste Klon wurde expandiert und zur Herstellung einer Viruspräparation genutzt. Das resultierende komplementierte Virus wurde mit ΔM45komp bezeichnet.

2.2.2.9 Zellviabilitätsassay

Zur Bestimmung der Zellviabilität wurde der CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) angewandt, auch MTS-Assay genannt. Hierbei wird ein gelbes Substrat (MTS) durch die Stoffwechselaktivität der Zellen in ein braunes Produkt (Formazan) umgewandelt, was durch Messung der Absorbanz bei 490 nm quantifiziert wird. Für die Messung der Viabilität infizierter Zellen wurden diese im 96Well ausgesät, mit einer Dichte von 3000 Zellen pro Well, und am folgenden Tag mit einer MOI von 5 in Triplikaten infiziert. 24 h nach Infektion erfolgte die Zugabe von 20 µl MTS-Reagenz pro Well und nach 3-8 h wurde die Absorbanz bei 490 nm gemessen.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Herstellung von Zelllysaten und Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die schnelle und zeitgleiche Lyse von Zellen in einer Infektionskinetik oder nach Rezeptorstimulation wurde 2x Proteinladepuffer als Lysepuffer verwendet. Hierfür wurden die Zellen 1x mit PBS gewaschen und durch Zugabe von 2x Proteinladepuffer (120 µl pro 12Well) lysiert.

Für die Lyse von Proben, deren Proteinkonzentration gemessen werden sollte oder die für eine Immunpräzipitation bestimmt waren, wurde NP-40-Puffer verwendet. Dieser wurde vor der Verwendung mit Protease Inhibitor Cocktail Complete Mini (Roche) ergänzt. Die Zellen wurden 1x mit PBS gewaschen und durch Zugabe von NP-40-Puffer (1 ml pro 100 mm-Schale, 300 µl pro 6Well) 20 min auf Eis lysiert. Das Lysat wurde in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und durch 10minütige Zentrifugation bei 15000 g und 4 °C von unlöslichen Zellbestandteilen befreit. Alternativ wurden die Zellen mittels eines Zellspatels in PBS von der Schale abgelöst, 5 min bei 300 g pelletiert und anschließend in dem gewünschten Volumen NP-40-Puffer lysiert.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe des BCA Protein Assay Kits (Thermo Scientific). Hierfür wurden 2 µl Probe in einer 96Well-Platte vorgelegt sowie 2 µl des BSA-Proteinstandards mit den Konzentrationen 0,125, 0,25, 0,5, 1,0 und 2,0 mg/ml. Alle Proben und BSA-Standardlösungen wurden in Duplikaten gemessen. Die BCA-Lösungen A und B wurden im Verhältnis 50:1 gemischt und à 100 µl in jedes zu messende Well gegeben. Nach 30minütiger Inkubation bei 37 °C wurde die Absorbanz bei 562 nm gemessen und aus den Werten des BSA-Proteinstandards die Proteinkonzentration der Proben errechnet.

2.2.3.2 Fraktionierung von Zytoplasma und Zellkern

Die Fraktionierung von Zellen in Zytoplasma und Zellkerne erfolgte mit Hilfe des FractionPREP[™] Cell Fractionation Kits (Biovision), nach einem von den Herstellerangaben abweichenden Protokoll.

Die Zellen eines 6Wells wurden 1x mit PBS gewaschen, in 1 ml PBS mit Hilfe eines Zellspatels abgelöst, in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und 5 min bei 800 g pelletiert. Das Zellpellet wurde in 75 µl CEB-Puffer für 5 min auf Eis lysiert und 2 min bei 15000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und weitere 5 min bei 15000 g und 4 °C zentrifugiert. Der resultierende Überstand entsprach der zytoplasmatischen Fraktion. Das Pellet wurde in 75 µl MEB-A-Puffer für 5 min auf Eis lysiert und die Kerne 5 min bei 800 g und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 180 µl Puffer A resuspendiert und erneut für 7 min bei 800 g und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde das Kernpellet in 75 µl NEB-Puffer für 5 min auf Eis mit gelegentlichem Vortexen lysiert und 5 min bei 15000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand entsprach dem Kernextrakt.

Alle verwendeten Puffer wurden mit Proteaseinhibitoren und 1 mM DTT ergänzt.

2.2.3.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Lämmli [236]. Alle Proben wurden mit Proteinladepuffer versetzt und für 5-10 min bei 95 °C denaturiert. Die Auftrennung wurde unter Verwendung eines 10 %igen Trenngels für 2-3 h bei 60-80 V durchgeführt (im Mini-PROTEAN Tetra Cell-System, Bio Rad). Anschließend wurden die Proteine durch semi dry-Elektroblotting bei 100 mA pro Gel für 80 min auf eine Nitrozellulose-Membran (Hybond ECL, GE Healthcare) transferiert. Für alle weiteren Schritte bis zur Detektion wurde die Membran in ein 50 ml-Falkonröhrchen überführt und auf einem Taumelrollenmischer inkubiert. Die Blockierung der Membran erfolgte mit 5 % Milchpulver in TBS-T, für 1 h bei RT. Die Primärantikörper wurden in der entsprechenden Verdünnung in 5 % Milchpulver/TBS-T auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 10 min mit TBS-T wurde die Membran mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:3000 in 5 % Milchpulver/TBS-T für 1 h bei RT inkubiert. Es erfolgen drei weitere 10minütige Waschschritte mit TBS-T. Zur Detektion wurden die ECL Western Blotting Detection Reagents (Amersham Biosciences) und das hochsensitive Lumigen TMA-6 (Bioquote Limited) im Verhältnis 1:1 gemischt, auf die Membran gegeben und das emittierte Licht mittels des Chemilumineszenz-Detektors Fusion SL-4 3500WL Molecular Imaging (Peqlab) detektiert.

2.2.3.4 Koimmunpräzipitation

Zur Durchführung einer Koimmunpräzipitation (Ko-IP) mit infizierten Zellen wurden MEFs im 6Well-Format mit 3x10⁵ Zellen pro Well ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit einer MOI von 5 infiziert und circa 15 h nach der Infektion mit 300 µl NP-40-Puffer pro Well lysiert. Die Lysate dreier 6Wells wurden vereint und die Proteinkonzentration bestimmt (2.2.3.1). 50 µg Protein wurden als Lysatkontrolle abgenommen, 500 µg Protein wurden für die IP eingesetzt und zunächst einem preclearing unterzogen. Dazu wurden 25 µl Protein A-Sepharose (PAS) zugegeben und die Proben für 1 h bei 4 °C in einem Überkopf-Rotator inkubiert. Anschließend wurde die PAS 1 min bei 15000 g abzentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 1,2 µg anti-HA Antikörper zugegeben. Nach 2stündiger Inkubation bei 4 °C im Überkopf-Rotator wurden 35 µl PAS zugeben und die Proben weitere 2 h inkubiert. Danach wurde die PAS 6x mit je 700 µl IP-Waschpuffer gewaschen (3x mit Waschpuffer 1, 2x mit Waschpuffer 2 und 1x mit Waschpuffer 3). Nach dem letzten Waschschritt wurde der Überstand vollständig abgesaugt und die PAS in 110 µl 2x Proteinladepuffer resuspendiert.

2.2.3.5 Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenz wurden NIH3T3 auf Deckgläschen im 12Well-Format ausgesät, mit einer Dichte von 1x10⁵ Zellen pro Well. Zuvor wurden die Deckgläschen mit 0,4 % Gelatine in PBS für 30 min bei 37 °C beschichtet und anschließend 2x mit PBS gewaschen. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit einer MOI von 5 infiziert. Zum gewünschten Zeitpunkt erfolgte nach zweimaligem Waschen mit PBS die Fixierung mittels 4 % Paraformaldehyd für 20 min bei RT. Anschließend wurden die Zellen zur Blockierung der Aldehydgruppen für 10 min bei RT in 50 mM NH₄Cl inkubiert. Es folgte die Permeabilisierung mit 0,3 % Triton X-100 und die Blockierung unspezifischer Antikörperbindestellen mit 0,2 % Gelatine, jeweils für 10 min bei RT. Zwischen allen Inkubationsschritten wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen. Die Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörpern erfolgte in einer feuchten Kammer für jeweils 2 h bei RT, im Falle des Sekundärantikörpers im Dunkeln. Pro Deckgläschen wurden 100 µl Antikörper, verdünnt in 0,2 % Gelatine verwendet. Nach jeder Antikörperinkubation wurden die Zellen 3x mit PBS gewaschen. Zuletzt wurde eine Kernfärbung mit Draq5 durchgeführt, das 1:1000 in Wasser eingesetzt und 10 min bei RT mit den Zellen inkubiert wurdw. Nach weiteren drei Waschschritten mit PBS und zusätzlich drei Waschschritten mit Wasser wurden die Deckgläschen mittels Agua-Poly/Mount (Polysciences, Inc.) mit den Zellen nach unten auf Objektträgern befestigt. Nach 24stündiger Aushärtung erfolgte der Analyse der Zellen mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie am Zeiss LSM510 META/FCS.

2.2.3.6 NF-κB-Reporterassay

Zur Bestimmung der NF-κB-Aktivierung in transfizierten Zellen wurde ein NF-κB-Reporterassay durchgeführt, der auf dem Reporterplasmid pNifty2-SEAP basiert. Dieses exprimiert eine sekretierte embryonale alkalische Phosphatase (SEAP) unter Kontrolle eines NF-κB-induzierbaren Promoters. Das Reporterplasmid wurde mit den zu testenden Plasmiden in NIH3T3 kotransfiziert (2.2.2.2). 24-48 h nach Transfektion wurde der SEAPhaltige Zellkulturüberstand abgenommen und zur Inaktivierung endogener alkalischer Phosphatasen für 30 min bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurden 40 µl des Überstandes in einer 96Well-Platte vorgelegt und je 200 µl QUANTI-Blue Detektionsmedium (InvivoGen) zugegeben, das aufgrund der enzymatischen Aktivität der SEAP einen Farbumschlag von Pink zu Blau durchläuft. Dieser wurde durch die Messung der Absorption bei 640 nm quantifiziert.

3 Ergebnisse

3.1 M45 induziert die Aktivierung von NF-кВ unmittelbar nach der Infektion

Es ist bekannt, dass MCMV zu sehr frühen Zeitpunkten der Infektion eine kurzzeitige Aktivierung von NF- κ B induziert [188, 189]. Zu späteren Zeitpunkten wird die NF- κ B-Aktivierung blockiert. Frühere Studien haben gezeigt, dass das virale Protein M45 die NF- κ B-Aktivierung durch Interaktion mit RIP1 und NEMO inhibiert [204, 205]. Wie es zu der initialen NF- κ B-Aktivierung in infizierten Zellen kommt ist jedoch nicht bekannt.

Um dieses Phänomen näher zu untersuchen, wurden die zeitlichen Verläufe der NF-kB-Aktivierung, der NF-kB-Inhibition und der M45-Expression während der Infektion betrachtet. NIH3T3-Fibroblasten wurden mit Wildtyp-MCMV (wt MCMV), einer M45-Deletionsmutante (ΔM45) oder einer M45-Revertante (RevM45) infiziert, zu verschiedenen Zeiten nach der Infektion lysiert und mittels Western Blot analysiert. Die Degradation des NF-kB-Inhibitors IκBα diente als Indikator für die Aktivierung von NF-κB. IκBα bindet NF-κB und hält es im Zytoplasma zurück. Die NF-kB-Aktivierung geht mit der proteasomalen Degradation von IkBa einher, was die Translokation von NF-κB in den Zellkern ermöglicht (Abb. 1.3). In Zellen, die mit wt MCMV oder RevM45 infiziert waren, konnte eine Reduktion der IkBa-Proteinmenge zwischen 1 und 5 Stunden nach Infektion (hours post infection, hpi) beobachtet werden, die bei 3 hpi ihr Maximum erreichte (Abb. **3.1** A). Ab 5 hpi stiegen die IkB α -Level wieder an und erreichten bis 9 hpi ihr Ausgangsniveau. Der Wiederanstieg der IκBα-Level fiel zeitlich mit der Reduktion der NEMO-Level zusammen. Die NEMO-Degradation ist ein bereits beschriebener Mechanismus durch den M45 NF-kB inhibiert [205]. Etwa zur gleichen Zeit (5 hpi) begann eine Reduktion der RIP1-Level, während die M45-Level deutlich anstiegen. In ΔM45infizierten Zellen fand keine NEMO-Degradation und keine Reduktion der RIP1-Level statt. Überraschenderweise war in $\Delta M45$ -infizierten Zellen auch keine sofortige IkB α -Degradation zu beobachten, sondern eine verzögerte Reduktion der IκBα-Level ab etwa 5 hpi (Abb. **3.1 A**).



Abb. 3.1 M45 induziert die Degradation von IkBa und die nukleäre Translokation von NF-kB p65

(A) NIH3T3-Zellen wurden mit Wildtyp-MCMV (wt MCMV), einer M45-Deletionsmutante (Δ M45) oder einer M45-Revertante (RevM45) mit einer MOI von 10 TCID₅₀/Zelle infiziert. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeiten nach Infektion mit Lämmli-Probenpuffer lysiert und die Proteinlevel mittels Western Blot analysiert. IE1 diente als Infektionskontrolle, β -Aktin als Ladekontrolle.

(B) NIH3T3-Zellen wurden mit wt MCMV oder ΔM45 mit einer MOI von 10 TCID₅₀/Zelle infiziert. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeiten nach Infektion lysiert und die zytoplasmatische von der nukleären Fraktion getrennt. Die Proteinlevel beider Fraktionen wurden mittels Western Blot analysiert. Lsd1 diente als Kernmarker, GAPDH als Marker für die zytoplasmatische Fraktion.

Um zu bestätigen, dass die nachgewiesene Degradation von IκBα zur Aktivierung von NF-κB führt, wurde die subzelluläre Lokalisation der NF-κB-Untereinheit p65 im Verlauf der Infektion untersucht. Aktiviertes NF-κB wird aus dem Zytoplasma in den Zellkern transportiert, wo es an DNA bindet und die Transkription verschiedener Gene aktiviert. NIH3T3-Fibroblasten wurden mit wt MCMV oder ΔM45 infiziert, zu verschiedenen Zeiten nach Infektion geerntet und in eine zytoplasmatische und eine nukleäre Fraktion aufgetrennt, die anschließend im Western Blot untersucht wurden. In wt MCMV-infizierten Zellen konnte ein starker Anstieg der nukleären NF-κB p65-Level zwischen 2 und 5 hpi beobachtet werden (Abb. **3.1 B**). In ΔM45-infizierten Zellen stiegen die NF-κB p65-Level im Zellkern ab 5 hpi an. In beiden Fällen erfolgte der Anstieg der nukleären NF-κB p65-Level kurze Zeit nach der IκBα-Degradation. In einem zweiten Ansatz wurde die subzelluläre Lokalisation von NF- κ B p65 mittels Immunfluoreszenz untersucht. Hierfür wurden Zellen mit wt MCMV oder Δ M45 infiziert, zu verschiedenen Zeiten nach Infektion fixiert und NF- κ B p65 mit einem Fluoreszenzgekoppelten Antikörper angefärbt. Die Fluoreszenz-Signale wurden mittels konfokaler Mikroskopie analysiert. In den Zellkernen von wt MCMV-infizierten Zellen konnte NF- κ B p65 vor allem zwischen 2 und 5 hpi detektiert werden (Abb. **3.2**). Dagegen war NF- κ B p65 in den Kernen Δ M45-infizierter Zellen erst ab 5 hpi nachweisbar. Diese Resultate bestätigen die Ergebnisse der Western Blot-Analyse.

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass die unmittelbar nach der Infektion stattfindende NF-κB-Aktivierung durch M45 induziert wird. In Abwesenheit von M45 wird NF-κB mit verzögerter Kinetik aktiviert.



Abb. 3.2 Immunfloureszenz-Analyse der nukleären Translokation von NF-kB p65

NIH3T3-Zellen wurden mit wt MCMV oder Δ M45 mit einer MOI von 5 TCID₅₀/Zelle infiziert. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeiten nach Infektion fixiert und die subzelluläre Lokalisation von NF- κ B

p65 nach Färbung mit einem Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper mittels konfokaler Mikroskopie analysiert. Als Infektionskontrolle wurde das virale Protein IE3 angefärbt. Draq5 diente der Markierung der Zellkerne. Merge zeigt die Überlagerung der Fluoreszenzbilder. Die weißen Pfeile markieren Zellen mit nukleärem NF-κB p65.

3.2 Die M45-Interaktionspartner RIP1 und NEMO tragen zu der initialen NF-κB-Aktivierung bei

NF-κB kann durch verschiedene Signale aktiviert werden, unter anderem durch Stimulation von Mustererkennungsrezeptoren wie TLRs oder von Zytokinrezeptoren wie TNFR1 und IL-1R. Die von den verschiedenen Rezeptoren ausgehenden Signalwege sind teilweise überlappend und konvergieren am IKK-Komplex, der aus den katalytischen Untereinheiten IKKα und IKKβ, sowie der regulatorischen Untereinheit NEMO besteht (Abb. **3.3 A**).

Um Einblick in den Mechanismus der M45-induzierten NF-κB-Aktivierung zu gewinnen, wurde der Einfluss verschiedener zellulärer Proteine auf die initiale IκBα-Degradation untersucht. Hierfür wurden murine embryonale Fibroblasten (MEFs) verwendet, denen verschiedene Proteine fehlen, die an NF-κB-aktivierenden Signalwegen beteiligt sind. Die Zellen wurden mit wt MCMV infiziert und die IκBα-Level zu verschiedenen Zeiten nach Infektion mittels Western Blot analysiert. In NEMO-defizienten Zellen blieben die IκBα-Mengen während des gesamten beobachteten Infektionsverlaufs unverändert, was zeigt, dass NEMO für die M45-induzierte NF-κB-Aktivierung essentiell ist (Abb. **3.3 B**). Demnach wird die NF-κB-Aktivierung durch M45 auf der Ebene des IKK-Komplexes oder oberhalb davon initiiert. In RIP1-defizienten Zellen fand nur eine sehr geringe IκBα-Degradation statt, was für eine partielle Beteiligung von RIP1 bei der M45-induzierten NF-κB-Aktivierung spricht. Auch in TRAF6-defizienten Zellen schien die initiale IκBα-Degradation reduziert zu sein, jedoch weniger deutlich als in RIP1-defizienten Zellen.

In allen anderen getesteten Zellen war die IκBα-Degradation dagegen nicht beeinflusst, was zeigt, dass die in diesen Zellen fehlenden Proteine für die M45-induzierte NF-κB-Aktivierung nicht benötigt werden (Abb. **3.3 B**). Das galt für die Rezeptoren TLR2, 3, 4 und TNFR1, für die Adaptermoleküle TRIF und MyD88, für die Ubiquitinligasen TRAF2 und 5 sowie für RIP3.



Abb. 3.3 Einfluss verschiedener zellulärer Proteine auf die M45-induzierte IkBα-Degradation

(A) Schematische Darstellung NF-κB-aktivierender Signalwege und daran beteiligte zelluläre Proteine.
(B) Murine embryonale Fibroblasten (MEFs), denen das jeweils angegebene zelluläre Protein fehlt, wurden mit wt MCMV mit einer MOI von 10 TCID₅₀/Zelle infiziert. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeiten nach Infektion mit Lämmli-Probenpuffer lysiert und die Proteinmengen mittels Western Blot analysiert. IE1 diente als Infektionskontrolle, β-Aktin als Ladekontrolle.

Um den Effekt von RIP1 und TRAF6 auf die M45-induzierte NF-κB-Aktivierung zu bestätigen, wurden RIP1- und TRAF6-defiziente Zellen mit RIP1 beziehungsweise TRAF6 komplementiert. Dies geschah durch Transduktion der Knockout-Zellen mit retroviralen Vektoren, die das jeweils fehlende Gen exprimieren. Falls RIP1 und TRAF6 an der M45-induzierten NF-κB-Aktivierung beteiligt sind, sollte die initiale IκBα-Degradation in den komplementierten Zellen stärker sein als in den Knockout-Zellen. Um dies zu überprüfen wurden RIP1- und TRAF6-defiziente Zellen und die dazugehörigen komplementierten Zellen mit wt MCMV infiziert und die IκBα-Degradation im Western Blot verglichen. Tatsächlich konnte in RIP1komplementierten Zellen eine gegenüber RIP1-defizienten Zellen deutlich verstärkte IκBα-Degradation beobachtet werden (Abb. **3.4**). TRAF6-komplementierte Zellen zeigten dagegen keinen Unterschied in der IκBα-Degradation im Vergleich zu TRAF6-defizienten Zellen. Diese Ergebnisse schließen eine Rolle von TRAF6 bei der M45-induzierten NF-κB-Aktivierung weitgehend aus, bestätigen jedoch den Einfluss von RIP1.



Abb. 3.4 RIP1, aber nicht TRAF6, trägt zur M45-induzierten NF-kB-Aktivierung bei

RIP1- und TRAF6-defiziente MEFs (RIP1^{-/-} und TRAF6^{-/-}) wurden durch retrovirale Transduktion mit murinem RIP1 (mRIP1) und murinem FLAG-markierten TRAF6 (mTRAF6) komplementiert. Die Transduktion der Kontrollzellen erfolgte mit einem Leervektor. Die Zellen wurden mit wt MCMV mit einer MOI von 10 TCID₅₀/Zelle infiziert, zu den angegebenen Zeiten nach Infektion mit Lämmli-Probenpuffer lysiert und die Proteinlevel mittels Western Blot analysiert. IE1 diente als Infektionskontrolle, β -Aktin als Ladekontrolle.

Ein weiterer Ansatz zur Aufklärung des Mechanismus der M45-induzierten NF- κ B-Aktivierung bestand darin, zu testen, ob es sich um einen Zelltyp-spezifischen Effekt handelt. Dazu wurden verschiedene Zelltypen mit wt MCMV und Δ M45 infiziert und die I κ B α -Mengen im Western Blot untersucht. In allen getesteten murinen Zelltypen, einschließlich Fibroblasten (NIH3T3 und MEFs), Endothelzellen (SVEC4-10) und Makrophagen (IC-21) konnte die initiale I κ B α -Degradation bei Infektion mit wt MCMV und die verzögerte I κ B α -Degradation bei Infektion mit Δ M45 beobachtet werden (Abb. **3.5**). Bemerkenswerterweise wurde in IC-21-Makrophagen auch nach Infektion mit Δ M45 eine NF- κ B-Aktivierung zu frühen Zeitpunkten induziert. In diesen Zellen scheint NF- κ B demnach durch einen zusätzlichen oder alternativen Mechanismus aktiviert zu werden. Dieser Effekt wurde in geringerem Maße auch in SVEC4-10-Endothelzellen beobachtet. Hier fand bei Infektion mit Δ M45 eine schwache I κ B α -Degradation nach 2 und 3 Stunden statt.

Interessanterweise konnte in humanen embryonalen Nierenepithelzellen (293A) nur eine sehr geringe initiale IκBα-Degradation nach wt MCMV-Infektion nachgewiesen werden (Abb. **3.5**). Obwohl es sich um humane Zellen handelt, sind 293A-Zellen permissiv für eine MCMV-Infektion [237]. Dass in diesen Zellen dennoch keine effiziente NF-κB-Aktivierung

stattfand, weist darauf hin, dass sich bestimmte Wirtszellfaktoren, die an der M45-induzierten NF-κB-Aktivierung beteiligt sind, von denen in murinen Zellen unterscheiden.



Abb. 3.5 Frühe und verzögerte IkBα-Degradation in verschiedenen Zelltypen

NIH3T3-Fibroblasten, murine embryonale Fibroblasten (MEFs), SVEC4-10-Endothelzellen, IC-21-Makrophagen und humane embryonale Nierenepithelzellen (293A) wurden mit wt MCMV und Δ M45 mit einer MOI von 10 TCID₅₀/Zelle infiziert. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeiten nach Infektion mit Lämmli-Probenpuffer lysiert und die Proteinlevel mittels Western Blot analysiert. IE1 diente als Infektionskontrolle, β -Aktin als Ladekontrolle.

Um die Ursachen der stark verringerten IκBα-Degradation in 293A-Zellen zu untersuchen wurde getestet, ob M45 mit endogenem NEMO und RIP1 in 293A-Zellen interagiert. NEMO und RIP1 sind bekannte Interaktionspartner von M45 [204, 205, 213] und beteiligt an der M45-induzierten NF-κB-Aktivierung (Abb. **3.3 B** und Abb. **3.4**). Humane 293A- und murine NIH3T3-Zellen wurden mit RevM45 und ΔM45 infiziert. RevM45 exprimiert das Volllänge-M45-Protein mit einem C-terminalen HA-Tag. Somit konnte eine Immunpräzipitation von M45 mit einem anti-HA-Antikörper durchgeführt werden. Die Präzipitate wurden mittels Western Blot auf kopräzipitiertes NEMO und RIP1 untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass M45 mit

endogenem NEMO in murinen NIH3T3-Zellen und in humanen 293A-Zellen interagiert (Abb. **3.6 A**). M45 interagierte auch mit endogenem murinen RIP1, jedoch nicht mit humanem RIP1. Dies könnte der Grund für die fehlende frühe NF-κB-Aktivierung in 293A-Zellen sein.



Abb. 3.6 Humanes RIP1 interagiert nicht mit M45 und kann die Reduktion der NF-κB-Aktivierung in RIP1-defizienten Zellen nicht kompensieren

(A) Humane 293A-Zellen und murine NIH3T3-Zellen wurden mit Δ M45 oder der M45-Revertante (RevM45), die HA-markiertes M45 exprimiert, mit einer MOI von 5 TCID₅₀/Zelle infiziert. 15 h nach der Infektion wurden die Zellen mit NP-40-Puffer lysiert und M45 mit einem anti-HA-Antikörper präzipitiert. Die Lysate und Immunpräzipitate (IP:HA) wurden mittels Western Blot auf kopräzipitiertes NEMO und RIP1 analysiert. In den Lysaten diente IE1 als Infektionskontrolle und β -Aktin als Ladekontrolle.

(B) RIP1-defiziente MEFs (RIP1^{-/-}) wurden durch retrovirale Transduktion mit murinem RIP1 (mRIP1) oder humanem RIP1 (hRIP1) komplementiert. Die Transduktion der Kontrollzellen erfolgte mit einem Leervektor. Die Zellen wurden mit wt MCMV mit einer MOI von 10 TCID₅₀/Zelle infiziert, zu den angegebenen Zeiten nach Infektion mit Lämmli-Probenpuffer lysiert und die Proteinlevel mittels Western Blot analysiert.

Um zu bestätigen, dass nur murines, aber nicht humanes RIP1 die M45-induzierte NF-κB-Aktivierung unterstützt, wurden RIP1-defiziente MEFs durch retrovirale Transduktion mit murinem oder humanem RIP1 komplementiert. Anschließend wurden die Zellen mit wt MCMV infiziert und die IκBα-Mengen im Western Blot analysiert. Wie bereits zuvor beobachtet (Abb. **3.4**) zeigten Zellen, die mit murinem RIP1 (mRIP1) komplementiert waren, eine gegenüber den Kontrollzellen deutlich verstärkte IκBα-Degradation (Abb. **3.6 B**). Die Komplementation mit humanem RIP1 (hRIP1) konnte die Verringerung der IκBα-Degradation jedoch nicht kompensieren. Zudem fiel auf, dass die hRIP1-Level im Laufe der Infektion nicht reduziert wurden, was möglicherweise ebenfalls auf die fehlende Interaktion zwischen M45 und hRIP1 zurückzuführen ist.

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass die M45-Interaktionspartner NEMO und RIP1 zu der initialen NF-κB-Aktivierung in Fibroblasten beitragen, wobei NEMO essentiell ist und RIP1 eine partielle Rolle spielt. Zudem unterstützt nur murines und nicht humanes RIP1 die M45-induzierte NF-κB-Aktivierung.

3.3 Die verzögerte, M45-unabhängige NF-кВ-Aktivierung involviert TRIF-abhängige TLR-Signalwege

In den vorangegangenen Abschnitten wurde gezeigt, dass die Infektion mit wt MCMV zu einer sofortigen NF-κB-Aktivierung führt, die in Fibroblasten von M45 abhängig ist (Abb. **3.1**) und die zellulären Proteine NEMO und RIP1 involviert (Abb. **3.3 B**). Bei der Infektion mit einem M45-defizienten Virus findet in diesen Zellen keine initiale NF-κB-Aktivierung statt. Es kommt jedoch zu einer verzögerten Aktivierung von NF-κB, die etwa 5 Stunden nach Infektion beginnt.

Um zu untersuchen, welche zellulären Proteine an der verzögerten NF-κB-Aktivierung beteiligt sind, wurden MEFs aus verschiedenen Knockout-Mäusen mit ΔM45 infiziert und die IκBα-Level im Verlauf der Infektion mittels Western Blot analysiert. Die verzögerte IκBα-Degradation war reduziert in TLR2/4-Doppelknockout-Zellen und kaum nachweisbar in TLR3-Knockout-Zellen (Abb. **3.7**). TLR3 und TLR4 verwenden für die Signalweiterleitung das Adapterprotein TRIF, das die Ubiquitinligase TRAF6 sowie RIP1 rekrutiert (Abb. **3.3 A**). Die Überprüfung der entsprechenden Knockout-Zellen zeigte, dass die verzögerte IκBα-Degradation auch bei Fehlen von TRIF, TRAF6 oder RIP1 reduziert ist (Abb. **3.7**). In Zellen, die defizient sind für TNFR1, MyD88, TRAF2/5 oder RIP3 war die IκBα-Degradation dagegen nicht beeinträchtigt.



Abb. 3.7 Einfluss verschiedener zellulärer Proteine auf die verzögerte, M45-unabhängige NF-kB-Aktivierung

Murine embryonale Fibroblasten (MEFs), denen das jeweils angegebene zelluläre Protein fehlt, wurden mit Δ M45 mit einer MOI von 10 TCID₅₀/Zelle infiziert. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeiten nach Infektion mit Lämmli-Probenpuffer lysiert und die Proteinlevel mittels Western Blot analysiert. IE1 diente als Infektionskontrolle, β -Aktin als Ladekontrolle.

Die Rolle von RIP1 und TRAF6 bei der M45-unabhängigen NF-κB-Aktivierung wurde durch einen Vergleich der RIP1- und TRAF6-defizienten Zellen mit den dazugehörigen komplementierten Zellen bestätigt. Nach Infektion mit ΔM45 war die verzögerte IκBα-Degradation sowohl in den RIP1-komplementierten Zellen als auch in den TRAF6-komplementierten Zellen gegenüber den jeweiligen Kontrollzellen deutlich verstärkt (Abb. **3.8**). Demnach sind sowohl RIP1 als auch TRAF6 an der verzögerten, M45-unabhängigen NF-κB-Aktivierung beteiligt, während die frühe, M45-abhängige NF-κB-Aktivierung nur von RIP1 und nicht von TRAF6 beeinflusst wird (Abb. **3.4**).

Zusammengefasst weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass in Abwesenheit von M45 eine verzögerte NF-κB-Aktivierung induziert wird, die nach einem anderen Mechanismus abläuft als die frühe M45-induzierte NF-κB-Aktivierung und wahrscheinlich auf der Stimulation TRIFabhängiger TLR-Signalwege beruht.



Abb. 3.8 RIP1 und TRAF6 tragen zu der verzögerten, M45-unabhängigen NF-κB-Aktivierung bei RIP1- bzw. TRAF6-defiziente MEFs (RIP1^{-/-} und TRAF6^{-/-}) wurden durch retrovirale Transduktion mit murinem RIP1 (mRIP1) bzw. murinem FLAG-markierten TRAF6 (mTRAF6) komplementiert. Die Transduktion der Kontrollzellen erfolgte mit einem Leervektor. Die Zellen wurden mit ΔM45 mit einer MOI von 10 TCID₅₀/Zelle infiziert, zu den angegebenen Zeiten nach Infektion mit Lämmli-Probenpuffer Iysiert und die Proteinlevel mittels Western Blot analysiert. IE1 diente als Infektionskontrolle, β-Aktin als Ladekontrolle.

3.4 Die Interaktion von M45 mit RIP1 und NEMO ist nicht ausreichend für die NF-κB-Aktivierung in infizierten Zellen

Das M45-Protein besteht aus 1174 Aminosäuren und enthält in seinem C-terminalen Bereich eine Homologie zur großen Untereinheit der zellulären Ribonukleotid-Reduktase (RNR R1). Aufgrund von Mutationen katalytisch wichtiger Aminosäuren besitzt M45 jedoch keine RNR-Aktivität [208]. Am N-Terminus von M45 befindet sich ein RIP-homotypisches Interaktionsmotiv (RHIM), das für die Interaktion mit RIP3 und DAI und die Inhibition der programmierten Nekrose benötigt wird [210, 213]. Für die Interaktion von M45 mit RIP1 und NEMO und die Inhibition der NF-κB-Aktivierung sind dagegen große Teile des N-Terminus einschließlich des RHIM entbehrlich [204, 205]. Es wurde gezeigt, dass der C-Terminus für diese Funktionen essentiell ist [205]. Viele der vorangegangenen Studien wurden jedoch mittels Plasmid- oder Retrovirus-kodiertem M45 durchgeführt und nicht im Kontext einer MCMV-Infektion. Daher wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Virusmutanten generiert, die verschiedene N- oder C-terminal verkürzte Varianten von M45 exprimieren oder ein M45, dessen RHIM mutiert wurde (mutRHIM) (Abb. **3.9 A**). Mit Hilfe dieser Virusmutanten wurde untersucht, welche Bereiche des M45-Proteins für verschiedene M45-Funktionen im Kontext der Virusinfektion erforderlich sind.



Abb. 3.9 Einfluss der N- und C-terminalen Domänen von M45 auf die Inhibition der IL-1 β -induzierten NF- κ B-Aktivierung und des Virus-induzierten Zelltods

(A) Schematische Darstellung der M45-Mutanten. Die M45-Revertante (RevM45) exprimiert das Volllänge-M45 mit einem C-terminalen HA-Tag. Alle abgebildeten M45-Varianten besitzen ebenfalls einen C-terminalen HA-Tag und wurden mittels *En passant*-Mutagenese in das Genom des M45-Knockout-Virus (ΔM45) kloniert. Die Zahlen in Klammern bezeichnen die Aminosäuren, aus denen die jeweilige M45-Mutante besteht.

(B) NIH3T3-Zellen wurden mit den angegebenen MCMV-Mutanten mit einer MOI von 5 TCID₅₀/Zelle infiziert. 15 h nach der Infektion wurden die Zellen mit IL-1 β stimuliert (20 ng/ml, 15 min), anschließend mit Lämmli-Probenpuffer lysiert und mittels Western Blot analysiert. IE1 diente als Infektionskontrolle, β -Aktin als Ladekontrolle.

(C) SVEC4-10-Endothelzellen wurden mit den angegebenen MCMV-Mutanten mit einer MOI von 5 TCID₅₀/Zelle infiziert. 24 h nach der Infektion wurde die Zellviabilität mittels eines MTS-Assays bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten, relativ zu wt MCMV-infizierten Zellen.

Für die Testung der M45-vermittelten NF- κ B-Inhibition wurden NIH3T3-Zellen mit den verschiedenen Virusmutanten infiziert und 15 h nach der Infektion mit dem NF- κ B-aktivierenden Zytokin IL-1 β stimuliert. Die IL-1 β -induzierte I κ B α -Degradation wurde anschließend im Western Blot analysiert. In wt MCMV-infizierten Zellen wurde die I κ B α -Degradation blockiert, jedoch nicht in Δ M45-infizierten Zellen (Abb. **3.9 B**). Auch die

N-terminal verkürzten M45-Mutanten Nt2 und Nt3, denen die ersten 280 bzw. 350 Aminosäuren fehlen, konnten die Degradation von IκBα inhibieren. Die noch stärker verkürzten Mutanten Nt3b und Nt3c wurden in allen Experimenten deutlich schwächer exprimiert als alle anderen M45-Varianten, was keine eindeutige Aussage über ihre Funktionalität zuließ. Allerdings schien Nt3b die IL-1β-induzierte IκBα-Degradation zumindest partiell zu inhibieren, während Nt3c dies nicht konnte. Die C-terminalen Verkürzungsmutanten Ct6, Ct5 und Ct4 inhibierten die IκBα-Degradation nach IL-1β-Stimulation. Die Ct3-Mutante, bei der die letzten 53 Aminosäuren deletiert sind, war dazu nicht in der Lage (Abb. **3.9 B**). Während also große Teile des M45 N-Terminus für die Inhibition der IL-1β-induzierten NF-κB-Aktivierung entbehrlich sind, kann nur ein sehr kleiner Bereich des C-Terminus deletiert werden, ohne diese Funktion zu beeinträchtigen. Diese Ergebnisse bestätigen die Resultate früherer Studien, die mit überexprimiertem M45 durchgeführt wurden [204, 205].

Die M45-Virusmutanten wurden auch auf ihre Fähigkeit hin überprüft, die Virus-induzierte Zelltodinduktion zu blockieren. Für diesen Versuch wurden SVEC4-10-Endothelzellen verwendet, die besonders sensitiv für die MCMV-vermittelte Nekrose-Induktion sind [214]. Die Zellen wurden mit den verschiedenen Virusmutanten infiziert und 24 h nach der Infektion wurde die Zellviabilität als Maß für die Zelltodinduktion bestimmt. ΔM45-infizierte SVEC4-10-Zellen zeigten eine geringere Zellviabilität als wt MCMV-infizierten Zellen (Abb. **3.9 C**). Die Infektion mit ΔM45 führte somit zur Zelltodinduktion, während wt MCMV-infizierte Zellen davor geschützt waren. Alle Virusmutanten, die eine N-terminal verkürzte M45-Variante exprimierten oder ein M45, dessen RHIM mutiert wurde (mutRHIM), induzierten ebenfalls Zelltod. Dies bestätigte publizierte Daten, die zeigen, dass das RHIM für die Nekrose-Inhibition essentiell ist [214]. Interessanterweise konnte auch die C-terminal verkürzte Mutante Ct3 die Zelltodinduktion nicht blockieren (Abb. **3.9 C**). Demnach werden neben dem RHIM auch C-terminale Bereiche für die Zelltodinhibition benötigt.

Anschließend wurde getestet, welche M45-Mutanten mit endogenem RIP1 und NEMO in murinen Fibroblasten interagieren können. Dazu wurden NIH3T3-Zellen mit den verschiedenen Virusmutanten infiziert und eine Koimmunpräzipitation durchgeführt. Die HAmarkierten M45-Varianten wurden mit einem anti-HA-Antikörper präzipitiert und kopräzipitiertes RIP1 und NEMO im Western Blot nachgewiesen. Die Ergebnisse zeigen, dass alle M45-Mutanten, die die IL-1β-induzierte NF-κB-Aktivierung inhibieren konnten, auch mit RIP1 und NEMO interagierten. So kopräzipitierten RIP1 und NEMO mit den M45-Mutanten Nt2 und Nt3, jedoch nicht mit Ct3 (Abb. **3.10 A**). Diese Resultate bestätigen die Ergebnisse früherer Studien, in denen überexprimiertes M45 verwendet wurde [204, 205].

69



Abb. 3.10 Einfluss der N- und C-terminalen Domänen von M45 auf die Interaktion mit RIP1 und NEMO und die auf die Virus-induzierte NF-κB-Aktivierung

(A) NIH3T3-Zellen wurden mit den angegebenen MCMV-Mutanten mit einer MOI von 5 TCID₅₀/Zelle infiziert. 15 h nach der Infektion wurden die Zellen mit NP-40-Puffer lysiert und M45 mit einem anti-HA-Antikörper präzipitiert. Die Lysate und Immunpräzipitate (IP:HA) wurden mittels Western Blot auf kopräzipitiertes NEMO und RIP1 analysiert. In den Lysaten diente IE1 als Infektionskontrolle und β -Aktin als Ladekontrolle.

(B) NIH3T3-Zellen wurden mit den angegebenen MCMV-Mutanten mit einer MOI von 10 TCID₅₀/Zelle infiziert. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeiten nach Infektion mit Lämmli-Probenpuffer lysiert und die Proteinlevel mittels Western Blot analysiert.

Schließlich wurde untersucht, welche M45-Mutanten in der Lage sind, die initiale NF-κB-Aktivierung zu induzieren. NIH3T3-Zellen wurden mit den verschiedenen Virusmutanten infiziert und die Degradation von IκBα im Infektionsverlauf mittels Western Blot analysiert. Alle N-terminal verkürzten M45-Mutanten, die mit RIP1 und NEMO interagierten, induzierten auch die frühe NF-κB-Aktivierung (Abb. **3.10 B**). Überraschenderweise konnte von den C-terminal verkürzten Mutanten nur Ct6 NF-κB sofort nach der Infektion aktivieren. Lediglich 7 Aminosäuren fehlen der Ct6-Mutante im Vergleich zum Volllänge-Protein. Ct5 und Ct4, bei denen 19 beziehungsweise 37 Aminosäuren deletiert sind, konnten die initiale NF-κB-Aktivierung nicht induzieren, obwohl beide Mutanten mit RIP1 und NEMO interagierten und auch bei allen übrigen überprüften M45-Funktionen eine mit dem Volllänge-Protein vergleichbare Aktivität gezeigt haben.

Während also alle anderen getesteten M45-Funktionen die Deletion von mindestens 37 Aminosäuren des C-Terminus tolerierten, führte schon das Fehlen von nur 19 Aminosäuren zum Verlust der frühen NF-κB-Aktivierung in infizierten Zellen.

3.5 M45 induziert NF-kB-abhängige Genexpression

Um zu überprüfen, ob M45 NF-κB auch bei alleiniger Expression, unabhängig von einer MCMV-Infektion, aktivieren kann wurden die M45-Mutanten (Abb. **3.9** A) in Expressionsplasmide kloniert und mittels eines NF-κB-Reporterassays analysiert. Dazu wurden NIH3T3-Zellen mit den verschiedenen M45-Mutanten und dem NF-κB-Reporterplasmid pNifty-SEAP kotransfiziert. 40 h nach der Transfektion wurde die Reportergen-Expression quantifiziert und auf die Werte des GFP-exprimierenden Plasmids (grün fluoreszierendes Protein) normalisiert, das als Negativkontrolle diente. Die Resultate zeigen, dass das Volllänge-M45 eine moderate Aktivierung von NF-κB induzierte, ähnlich der die durch Überexpression von MyD88 und IKKβ erreicht wurde, die als Positivkontrollen dienten (Abb. **3.11**). Überraschenderweise konnten neben Ct6 auch Ct5 und Ct4 NF-κB aktivieren, was im Kontext der Virusinfektion nicht zu beobachten war (vergleiche Abb. **3.10 B** und Abb. **3.11**). Diese Ergebnisse zeigen, dass in transfizierten Zellen alle M45-Mutanten, die mit RIP1 und NEMO interagieren, auch in der Lage sind, die NF-κB-abhängige Reportergenexpression zu aktivieren.



Abb. 3.11 M45 induziert NF- κ B-abhängige Reportergenexpression in transfizierten Zellen NIH3T3-Zellen wurden mit dem NF- κ B-abhängigen Reporterplasmid pNifty-SEAP und Expressionsplasmiden, die die angegebenen Proteine exprimieren kotransfiziert. pNifty-SEAP exprimiert in NF- κ B-abhängiger Weise eine sekretierte alkalische Phosphatase (SEAP). 40 h nach der Transfektion wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und die Menge an SEAP durch Zugabe des QUANTI-Blue Detektionsmediums (InvivoGen) und anschließender Absorptionsmessung quantifiziert. Alle Werte sind relativ zu GFP-exprimierenden Zellen dargestellt, die als Negativkontrolle dienten. MyD88 und IKK β wurden als Positivkontrollen verwendet. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten.

Um die NF-kB-abhängige Genexpression im Verlauf der viralen Infektion zu untersuchen, wurde eine hochsensitive Methode angewandt, mittels derer kurzzeitige Änderungen der Genexpression nachgewiesen werden können. Dazu wurden frisch transkribierte RNAs zu verschiedenen Zeiten der Infektion mit 4-Thiouridin (4sU) markiert und anschließend mittels quantitativer RT-PCR analysiert. Dieses Experiment wurde auf der Basis einer Kollaboration von Miranda de Graaf und Lars Dölken an der Universität Cambridge, England durchgeführt. Neben wt MCMV wurden die funktionelle Virusmutante Nt2 sowie die nicht-funktionelle Virusmutante Ct3 in diesem Assay untersucht. Wt MCMV und Nt2 aktivierten die Transkription der NF-κB-induzierbaren Gene Nfkbia und Tnfaip3 zwischen 1 und 2 hpi (Abb. 3.12). Danach sanken die Expressionslevel beider Gene wieder ab. Ct3 konnte die Expression von Nfkbia und Tnfaip3 nicht induzieren. Bemerkenswerterweise sanken die Nfkbia-Expressionslevel nach Infektion mit der Ct3-Mutante sogar deutlich ab, was bei Tnfaip3 nicht der Fall war. Auch die Expression des Interferon-induzierbaren Gens Cxcl10 war nach Infektion mit Ct3 im Vergleich zu wt M45 und Nt2 leicht beeinträchtigt. Dies weist darauf hin, dass NF-κB bei der Regulation der Cxcl10-Expression ebenfalls eine Rolle spielt, was auch in einer kürzlich erschienenen Studie nachgewiesen wurde [238].




NIH3T3-Zellen wurden mit wt MCMV oder den M45-Mutanten Nt2 and Ct3 mit einer MOI von 10 TCID₅₀/Zelle infiziert. Zu den angegebenen Zeiten nach Infektion wurde 4-Thiouridine (200 μ M) für 1 h in das Zellkulturmedium gegeben. Die Expressionslevel der NF-κB-induzierbaren Gene *Nfkbia* (Protein NFKBIA = IκBα) und *Tnfaip3* (Protein TNFAIP3 = A20) sowie des viralen Gens *ie1* und des Interferon-induzierbaren Gens *Cxcl10* wurden mittels qRT-PCR quantifiziert. Gezeigt sind die kombinierten Daten zweier unabhängiger Experimente, normalisiert auf die Lamin B-Rezeptor (LBR)-Expression (d.I. = Detektionslimit).

Dieses Experiment wurde von Miranda de Graaf und Lars Dölken an der Universität Cambridge, England durchgeführt.

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass M45 die NF-κB-abhängige Genexpression induzieren kann, sowohl in transfizierten als auch in infizierten Zellen. Allerdings können die M45-Mutanten Ct5 und Ct4 NF-κB nur nach Transfektion und nicht nach Infektion aktivieren. Dies weist darauf hin, dass die Fähigkeit, mit RIP1 und NEMO zu interagieren, in transfizierten Zellen für die Induktion der NF-κB-Aktivität ausreichend ist, dass M45 in infizierten Zellen jedoch eine oder mehrere zusätzliche Eigenschaften für die NF-κB-Aktivierung benötigt.

3.6 Das Virion-assoziierte M45 induziert die frühe NF-κB-Aktivierung in infizierten Zellen

Im den beiden vorangegangenen Abschnitten wurde gezeigt, dass alle M45-Mutanten, die mit RIP1 und NEMO interagieren, NF-κB in transfizierten Zellen aktivieren können. In infizierten Zellen ist die Fähigkeit, mit RIP1 und NEMO zu interagieren jedoch nicht ausreichend für die NF-κB-Aktivierung, was darauf hinweist, dass im Kontext der Infektion eine weitere M45-Funktion benötigt wird.

Es ist bekannt, dass M45 Bestandteil der MCMV-Viruspartikel ist [208, 239]. Daher sollten geringe Mengen an M45 direkt nach dem Eintritt des Virus in der infizierten Zelle vorliegen. Die Neusynthese von M45 beginnt in der *Early*-Phase des Replikationszyklus [208] und im Western Blot können ab 3 bis 5 Stunden nach Infektion deutlich ansteigende M45-Level nachgewiesen werden. Da die M45-induzierte IκBα-Degradation bereits eine Stunde nach Infektion beobachtet werden kann, ist es denkbar, dass das Virion-assoziierte M45 die frühe NF-κB-Aktivierung initiiert, bevor die M45-Neusynthese beginnt.

Zunächst wurde überprüft, ob es einen Zusammenhang gibt zwischen der Fähigkeit, NF-κB nach Infektion zu aktivieren und der Inkorporation von M45 in Viruspartikel. Dazu wurden die Virionen verschiedener M45-Virusmutanten mittels Gradientenzentrifugation aufgereinigt und die Menge an Virion-assoziiertem M45 im Western Blot untersucht. Es zeigte sich, dass die M45-Varianten, die NF-κB nach Infektion aktivieren können, in den aufgereinigten Virionen in gut detektierbaren Mengen vorhanden waren. Dies war der Fall für das Volllänge-M45 sowie die Verkürzungen Nt3 und Ct6 (Abb. **3.13 A**). Dagegen konnten nur sehr geringe Mengen der Verkürzungen Ct3, Ct4 und Ct5 in den Viruspartikel nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Verpackung von M45 in Virionen für die frühe NF-κB-Aktivierung notwendig sein könnte.

Um zu testen, ob das Virion-assoziierte M45 tatsächlich in der Lage ist, die Aktivierung von NF-κB zu induzieren, wurden mittels zwei verschiedener Methoden Viren generiert, die nur das Virion-assoziierte M45 besitzen und keine M45-Neusynthese durchführen können. Zum einen wurde eine UV-Inaktivierung durchgeführt. Dabei wird das Virusgenom zerstört, so dass keine virale Genexpression stattfinden kann. Die Viruspartikel bleiben jedoch intakt und können in Zellen eindringen. Zum anderen wurde ein komplementiertes ΔM45-Virus (ΔM45komp) produziert durch Anzucht eines ΔM45-Virusstocks auf M45-exprimierenden NIH3T3-Zellen. Die resultierenden Viruspartikel sind voll replikationsfähig und beinhalten das von den Zellen exprimierte M45. Sie besitzen jedoch kein M45-Gen, weshalb keine Neusynthese von M45 stattfinden kann. NIH3T3-Zellen wurden mit RevM45, UV-inaktiviertem RevM45, ΔM45 und ΔM45komp infiziert. Um eine hohe zeitliche Auflösung der sehr frühen Ereignisse nach Infektion zu erhalten, wurde nur der Zeitraum bis 3 hpi betrachtet.

Unter diesen Bedingungen konnte das Virion-assoziierte M45 im Western Blot deutlich nachgewiesen werden (Abb. **3.13 B**). Ausgehend von 30 min nach Infektion nahmen die M45-Mengen langsam ab und stiegen ab etwa 2 hpi wieder an, wahrscheinlich aufgrund der beginnenden Neusynthese von M45. Für einen sensitiveren Nachweis der NF- κ B-Aktivierung wurde neben der I κ B α -Degradation auch die I κ B α -Phosphorylierung untersucht. In Zellen, die mit RevM45 infiziert waren, konnte phosphoryliertes I κ B α bereits 30 min nach der Infektion detektiert werden (Abb. **3.13 B**). Die Infektion mit UV-inaktiviertem RevM45 führte zu einer ebenso frühen und ebenso starken I κ B α -Phosphorylierung. Die Abwesenheit eines IE1-Signals in diesen Zellen bestätigte, dass die Viren inaktiviert waren und keine virale Genexpression stattfand. Auch Δ M45komp induzierte die Phosphorylierung von I κ B α , Δ M45 jedoch nicht. Die I κ B α -Phosphorylierung war in Δ M45komp-infizierten Zellen schwächer als in RevM45-infizierten Zellen, was wahrscheinlich auf die geringeren M45-Level in den komplementierten Virionen zurückzuführen ist.

Anschließend wurden auch die Virusmutanten Ct6, Ct5, Ct4 und Ct3 getestet. Nur Ct6 war zwischen 30 min und 1,5 h nach Infektion deutlich nachweisbar und induzierte die Phosphorylierung von IκBα in den ersten 3 h der Infektion (Abb. **3.13 B**). Dagegen waren Ct5, Ct4 und Ct3, die nur in geringen Mengen in Viruspartikeln vorhanden sind, erst ab dem Beginn der M45-Neusynthese bei etwa 2 h nach Infektion gut detektierbar und induzierten im Zeitraum bis 3 h nach Infektion keine IκBα-Phosphorylierung.

Die Analyse verschiedener Knockout-Zelllinien hatte gezeigt, dass die M45-Interaktionspartner RIP1 und NEMO für die Induktion der frühen NF-κB-Aktivierung benötigt werden (Abb. **3.3 B**). Da nun klar war, dass das Virion-assoziierte M45 die NF-κB-Aktivierung induziert, stellte sich die Frage, ob auch das Virion-assoziierte M45 in der Lage ist, mit RIP1 und NEMO zu interagieren. Um dies zu beantworten, wurden NIH3T3-Zellen mit verschiedenen M45-Virusmutanten infiziert und 1 h nach Infektion eine Koimmunpräzipitation durchgeführt. Zu diesem frühen Zeitpunkt waren erwartungsgemäß nur die Virionassoziierten M45-Varianten detektierbar, zu denen das Volllänge-Protein, die N-terminalen Verkürzungen Nt2 und Nt3 sowie die C-terminale Verkürzungsmutante Ct6 gehören (Abb. **3.13 C**). Ct5, Ct4 und Ct3 konnten weder in den Lysaten noch in den Immunpräzipitaten nachgewiesen werden. RIP1 und NEMO kopräzipitierten mit allen getesteten Virion-assoziierten M45-Varianten.

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass das Virion-assoziierte M45 die Phosphorylierung und nachfolgende Degradation von IκBα unmittelbar nach der Infektion induziert und so die frühe NF-κB-Aktivierung vermittelt.

75



Abb. 3.13 Das Virion-assoziierte M45 induziert die frühe NF-kB-Aktivierung

(A) Gradientengereinigte Virionen der angegebenen MCMV-Mutanten und Lysate infizierter Zellen (MOI 3, 48 hpi) wurden mittels Western Blot analysiert. gB diente als Ladekontrolle.

(B) NIH3T3-Zellen wurden mit folgenden Viren mit einer MOI von 10 TCID₅₀/Zelle infiziert: M45-Revertante (RevM45), UV-inaktiviertes RevM45 (RevM45 UV), Δ M45, auf M45-exprimierenden NIH3T3-Zellen angezogenes Δ M45 (Δ M45komp), M45-Verkürzungsmutanten Ct6, Ct5, Ct4 und Ct3. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeiten nach Infektion mit Lämmli-Probenpuffer lysiert und die Proteinlevel mittels Western Blot analysiert. IE1 diente als Infektionskontrolle, β -Aktin als Ladekontrolle. (C) NIH3T3-Zellen wurden mit den angegebenen MCMV-Mutanten mit einer MOI von 30 TCID₅₀/Zelle infiziert. 1 h nach der Infektion wurden die Zellen mit NP-40-Puffer lysiert und M45 mit einem anti-HA-Antikörper präzipitiert. Die Lysate und Immunpräzipitate (IP:HA) wurden mittels Western Blot auf kopräzipitiertes NEMO und RIP1 analysiert. In den Lysaten diente IE1 als Infektionskontrolle und β -Aktin als Ladekontrolle.

4 Diskussion

4.1 Aktivierung von NF-κB durch MCMV

Sowohl HCMV als auch MCMV regulieren die Aktivität von NF-κB in zwei Phasen: Zu Beginn der Infektion wird eine sofortige Aktivierung von NF-κB induziert, zu späteren Zeitpunkten wird die NF-κB-Aktivierung blockiert [176, 188, 198, 199]. HCMV induziert die NF-κB-Aktivität initial durch Stimulation von TLR2 im Zuge der Anheftung an die Wirtszelle [178]. Die viralen Glykoproteine gB und gH dienen dabei als TLR2-Liganden [103, 177]. Bei der MCMV-Infektion scheint dieser Mechanismus zumindest in Fibroblasten nicht zu existieren, da die frühe NF-κB-Aktivierung auch in TLR2-defizienten MEFs induziert wird (Abb. **3.3 B**). Überraschenderweise hängt die NF-κB-Aktivierung in Fibroblasten von dem viralen Protein M45 ab, das in vorangegangenen Studien als NF-κB-Inhibitor beschrieben wurde [146, 204, 205]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen erstmals, dass M45 zu frühen Zeitpunkten der Infektion die Aktivierung von NF-κB induziert.

In Wildtyp-MCMV-infizierten Fibroblasten wird zwischen 1 und 3 Stunden nach Infektion die Degradation von IκBα und die nukleäre Translokation von NF-κB induziert (Abb. **3.1**). Dies geschieht nicht in Zellen, die mit einem M45-defizienten Virus infiziert sind, was zeigt, dass die NF-κB-Aktivierung innerhalb der ersten 3 Stunden nach Infektion M45-abhängig ist.

Ab 5 Stunden nach Infektion steigen die IkBa-Level in Wildtyp-Virus-infizierten Zellen wieder an und die M45-vermittelte NEMO-Degradation führt zur dauerhaften Inhibition von NF-KB [205]. In ΔM45-infizierten Zellen findet dagegen ab etwa 5 Stunden nach Infektion eine Degradation von IκBα sowie eine Translokation von NF-κB in den Zellkern statt (Abb. 3.1). Diese verzögerte NF-κB-Aktivierung in ΔM45-infizierten Zellen wirft die Frage auf, ob M45 tatsächlich direkt für die NF-kB-Aktivierung verantwortlich ist oder eine durch andere Faktoren ausgelöste NF-kB-Aktivierung beschleunigt. Da M45 Teil des Viruspartikels ist, wäre es denkbar, dass das Fehlen von M45 den Eintritt des Virus in die Wirtszelle verzögert und dass dies auch eine Verzögerung der NF-kB-Aktivierung bewirkt. Dagegen spricht jedoch, dass die IE1-Expression in Δ M45-infizierten Zellen zur gleichen Zeit und in gleicher Stärke beginnt wie in wt Virus-infizierten Zellen (Abb. 3.1). Läge der sofortigen und der verzögerten NF-kB-Aktivierung dennoch der gleiche Stimulus zugrunde, müssten in beiden Fällen die gleichen zellulären Proteine beteiligt sein. Dass dies nicht der Fall ist, zeigen die Infektionen verschiedener Knockout-MEFs mit wt MCMV oder ΔM45. Für die initiale NF-κB-Aktivierung nach Wildtyp-Virus-Infektion konnten nur RIP1 und NEMO als notwendige Faktoren identifiziert werden (Abb. 3.3 B). Im Gegensatz dazu involviert die verzögerte NF-kB-Aktivierung nach Infektion mit ΔM45 eine Reihe weiterer zellulärer Proteine, einschließlich TLR3, TLR4, TRIF und TRAF6 (Abb. 3.7). Dies weist darauf hin, dass die verzögerte NF-κB-Aktivierung auf der Erkennung viraler Moleküle durch TLRs beruht, während die frühe NF-κB-Aktivierung durch M45 über einen anderen Mechanismus abläuft, für den neben der essentiellen IKK-Untereinheit NEMO nur RIP1 als benötigter zellulärer Faktor ermittelt werden konnte.

Im Gegensatz zu Fibroblasten wird die frühe NF-κB-Aktivierung in Makrophagen auch nach Infektion mit einem M45-defizienten Virus induziert (Abb. 3.5). In Endothelzellen findet ebenfalls eine M45-unabhängige NF-kB-Aktivierung zu frühen Zeitpunkten statt, wenngleich diese schwächer ist als in Makrophagen. Daraus lässt sich schließen, dass es in diesen Zelltypen einen zusätzlichen oder alternativen Mechanismus der NF-KB-Aktivierung gibt. Am wahrscheinlichsten ist eine NF-kB-Aktivierung durch Interaktion der Viruspartikel mit Rezeptoren auf der Zelloberfläche, die in Fibroblasten entweder nicht vorhanden oder für das Virus nicht nutzbar sind. Besonders naheliegend wäre eine NF-kB-Aktivierung durch Stimulation von TLR2, da dies bereits für HCMV und andere Herpesviren wie EBV und HSV-1 beschrieben wurde [178, 240, 241]. Auch eine Stimulation von TLR4 wäre denkbar, da dieser Rezeptor ebenfalls in der Plasmamembran lokalisiert ist. Allerdings wurde gezeigt, dass MEFs alle Plasmamembran-ständigen TLRs exprimieren, einschließlich TLR4, TLR2 sowie TLR1 und TLR6, die Heterodimere mit TLR2 bilden [242]. Zudem kann sowohl in MEFs als auch in NIH3T3-Zellen die Aktivierung von NF-kB und/oder die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen durch TLR2- und TLR4-Liganden stimuliert werden, was zeigt, dass die entsprechenden Rezeptoren und Signalwege auch in Fibroblasten funktional sind [205, 242]. Möglicherweise werden für die frühe M45-unabhängige NF-kB-Aktivierung andere oder zusätzliche Rezeptoren benötigt. CD14 ist zum Beispiel ein wichtiger Korezeptor für TLR2 und TLR4 [243, 244] und es wurde gezeigt, dass die HCMV-induzierte Zytokinproduktion in humanen Leukozyten zum Teil von CD14 abhängig ist [178]. HSV-1 kann NF-κB durch Bindung von ανβ3-Integrin aktivieren, was in Kooperation mit TLR2 geschieht [245]. CD14 und αvβ3-Integrin können jedoch auch in Fibroblasten exprimiert werden [246, 247]. Um die Rolle dieser oder anderer Rezeptoren bei der frühen M45unabhängigen NF-kB-Aktivierung zu untersuchen, wäre eine genaue Analyse der Expressionslevel der verschiedenen Rezeptoren und Korezeptoren in den verwendeten Zelllinien notwendig.

Möglich wäre auch, dass die erforderlichen Rezeptoren in Fibroblasten zwar vorhanden sind, das Virus sie jedoch nicht stimulieren kann. Ein Grund dafür könnte die Nutzung unterschiedlicher Mechanismen zum Eintritt in die Zelle sein. Wie die meisten Herpesviren können HCMV und MCMV grundsätzlich über zwei verschiedene Wege in die Zelle eindringen: Durch direkte Fusion der Virusmembran mit der zellulären Plasmamembran oder durch Endozytose und anschließende Fusion der Virusmembran mit der Endosommembran [22, 23, 248]. Welcher dieser beiden Wege genutzt wird, ist abhängig vom Zelltyp und den viralen Hüllproteinen [22, 23, 248-250]. Es wird angenommen, dass die verschiedenen Zelltypen unterschiedliche Rezeptoren exprimieren, die mit verschiedenen Proteinkomplexen auf der Virusoberfläche interagieren [15, 20, 250]. Es wäre denkbar, dass dies auch eine Zelltypspezifische NF-κB-Aktivierung zur Folge hat.

4.2 Mechanismus der M45-induzierten NF-kB-Aktivierung

4.2.1 Rolle von RIP1 und NEMO bei der M45-induzierten NF-kB-Aktivierung

Durch Infektion verschiedener Knockout-MEFs wurden zwei Proteine identifiziert, die für die M45-induzierte NF-κB-Aktivierung benötigt werden: RIP1 und NEMO (Abb. 3.3 B). Beide Proteine sind bekannte Interaktionspartner von M45 [146, 204, 205]. Eine Reihe anderer zellulärer Proteine, die an NF-κB-aktivierenden Signalwegen beteiligt sind, scheinen bei der M45-induzierten NF-kB-Aktivierung keine Rolle zu spielen (Abb. 3.3 B). Getestet wurden die Rezeptoren TNFR1, TLR2, 3 und 4, die Adapterproteine MyD88 und TRIF sowie die Ubiquitinligasen TRAF2, 5 und 6. Auch der M45-Interaktionspartner RIP3 ist verzichtbar für die M45-induzierte NF-kB-Aktivierung (Abb. 3.3 B). Ein weiteres zelluläres Protein, das mit M45 interagiert, ist DAI [146]. Da keine MEFs aus DAI-Knockout-Mäusen zur Verfügung standen, konnte der Einfluss von DAI auf die M45-induzierte NF-kB-Aktivierung nicht direkt überprüft werden. Es wurde jedoch gezeigt, dass NIH3T3-Zellen keine detektierbaren Mengen an DAI exprimieren [210] und dennoch findet die frühe NF-kB-Aktivierung in diesen Zellen statt (Abb. 3.1 A). Zudem ist bekannt, dass die Interaktion von M45 mit DAI RHIMabhängig ist [145, 146], doch auch Virusmutanten, die eine RHIM-defiziente Version von M45 exprimieren sind in der Lage, NF-κB zu aktivieren (Abb. 3.10 B). Daher ist eine Beteiligung von DAI an der M45-induzierten NF-kB-Aktivierung unwahrscheinlich.

Ist es denkbar, dass M45 allein durch die Interaktion mit RIP1 und NEMO NF-κB aktivieren kann oder sind weitere zelluläre Proteine beteiligt, die nicht getestet wurden? Welche allgemeinen Mechanismen liegen der NF-κB-Aktivierung zugrunde und wie könnte M45 darauf einwirken? Der entscheidende Schritt bei der kanonischen NF-κB-Aktivierung ist die Aktivierung des IKK-Komplexes durch Phosphorylierung der katalytischen Untereinheiten IKKα und/oder IKKβ. Der molekulare Mechanismus der IKK-Aktivierung ist nicht vollständig aufgeklärt. Vorhandene Daten weisen darauf hin, dass eine Oligomerisierung der IKK-Komplexe von zentraler Bedeutung für die Aktivierung ist [127, 251, 252]. Dies ist im Einklang mit einem Modell der IKK-Aktivierung durch induzierte Proximität und Trans-Autophosphorylierung der IKK-Komplexe. Die erzwungene direkte Oligomerisierung der Kinase-Untereinheiten IKKα oder IKKβ ist ausreichend, um NF-κB zu aktivieren [251, 252]. Unter physiologischen Umständen ist jedoch die regulatorische Untereinheit NEMO unverzichtbar

80

für die Aktivierung des IKK-Komplexes [75, 253]. NEMO gilt als Adaptermolekül, das eine Verbindung herstellt zwischen den IkB-Kinasen und den regulatorischen Proteinen, die in der Signalkette oberhalb des IKK-Komplexes liegen, zum Beispiel RIP1 oder TRAFs. NEMO ist ein Ubiquitin-bindendes Protein und interagiert mit Lys63-verknüpften und Met1-verknüpften (linearen) Ubiquitinketten, die eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion spielen [254]. Es gibt Hinweise, dass die Bindung von NEMO an polyubiquitinierte Proteine die Oligomerisierung der IKK-Komplexe induziert, was zur IKK-Aktivierung führt [255]. Eines dieser ubiquitinierbaren Proteine, die mit NEMO interagieren ist RIP1, das für die NF-KB-Aktivierung nach Stimulation von TLR3 und TNFR1 benötigt wird [130, 157]. Die direkte Interaktion von RIP1 und NEMO ist bei endogener Expression sehr schwach, wird RIP1 jedoch ubiquitiniert führt dies zu einer deutlich verstärkten Interaktion mit NEMO und zur NFκB-Aktivierung [134, 256]. Auch die artifiziell induzierte Oligomerisierung von RIP1 oder NEMO resultiert in der Aktivierung von NF-κB [134]. Da M45 sowohl an RIP1 als auch an NEMO bindet und zudem mit sich selbst interagieren kann (Daten nicht gezeigt), ist es vorstellbar, dass M45 die Oligomerisierung von RIP1 und NEMO induziert und auf diesem Wege NF-kB ohne Beteiligung weiterer Signalwegproteine aktiviert. In diesem Modell würde M45 die Funktion der Ubiquitinketten als verbindendes Element übernehmen. Da anzunehmen ist, dass M45 diese Funktion nicht mit der gleichen Effizienz ausfüllen kann, würde dies auch erklären, weshalb die M45-induzierte IkBa-Degradation nach MCMV-Infektion deutlich langsamer eintritt (nach 1-2 h) als zum Beispiel die TNFa-induzierte IkBa-Degradation (nach 10-15 min).

Es gibt mehrere Beispiele anderer Proteine, die NF-κB auf ähnliche Weise aktivieren. Das zelluläre Protein Annexin-1 induziert eine konstitutive NF-κB-Aktivierung in Brustkrebs-Zellen durch Interaktion mit RIP1 und NEMO, den gleichen Proteinen, die auch bei der M45induzierten NF-κB-Aktivierung eine Rolle spielen [257]. Zudem sind drei verschiedene virale Proteine bekannt, die eine NF-κB-Aktivierung durch Interaktion mit NEMO induzieren: das KSHV-Protein vFLIP [258], das Protein Tax des humanen T-Zell-Leukämievirus-1 (HTLV-1) [259] und vCLAP des equinen Herpesvirus-2 (EHV-2) [260]. Kristallstrukturanalysen haben gezeigt, dass die Bindung von vFLIP an NEMO eine Konformationsänderung von NEMO bewirkt, die mutmaßlich zur Rekrutierung und Aktivierung von IKKα und IKKβ führt [261]. vCLAP aktiviert NF-κB, indem es die Oligomerisierung von NEMO induziert [260]. Und auch bei der Tax-vermittelten NF-κB-Aktivierung scheint die Multimerisierung von NEMO eine Rolle zu spielen [262]. Dies unterstützt die Hypothese der M45-induzierten NF-κB-Aktivierung von RIP1 und NEMO.

4.2.2 Einfluss der N- und C-terminalen Domänen von M45 auf die NF-kB-Aktivierung

Die Analyse von Virusmutanten, die verschiedene N- oder C-terminal verkürzte M45-Versionen exprimieren, zeigte, dass der C-Terminus von M45 essentiell ist für die initale NF-κB-Aktivierung nach Infektion (Abb. **3.10 B**). Die Deletion von nur 19 Aminosäuren am M45-C-Terminus (Mutante Ct5) verhinderte die Induktion der frühen NF-κB-Aktivierung. Dagegen hatte die Deletion von 350 Aminosäuren am N-Terminus (Mutante Nt3), was fast einem Drittel des gesamten Proteins entspricht, keine Beeinträchtigung der NF-κB-Aktivierung zur Folge.

Der C-Terminus wird auch für die Interaktion mit RIP1 und NEMO benötigt (Abb. 3.10 A). Allerdings verlor M45 diese Funktion erst bei der Deletion von 53 Aminosäuren des C-Terminus (Mutante Ct3). Somit existieren zwei M45-Mutanten (Ct4 und Ct5), die keine NF-kB-Aktivierung nach Infektion induzieren können, obwohl sie in der Lage sind, mit RIP1 und NEMO zu interagieren. Ist das ein Hinweis darauf, dass doch noch weitere zelluläre oder virale Proteine an der initialen NF-KB-Aktivierung beteiligt sind? Dagegen sprechen die Ergebnisse des NF-kB-Reporterassays, in dem die Induktion der NF-kB-Aktivität nach Transfektion von M45-Expressionsplasmiden getestet wurde (Abb. 3.11). Alle M45-Mutanten, die mit RIP1 und NEMO interagieren können, waren auch in der Lage, NF-kB im Reporterassay zu aktivieren. Dies zeigt, dass M45 NF-kB auch in Abwesenheit anderer Virusproteine aktivieren kann und weist auf einen Zusammenhang zwischen der Interaktion von M45 mit RIP1 und NEMO und der M45-vermittelten NF-kB-Aktivierung hin. Dennoch ist im Falle der M45-Mutanten Ct4 und Ct5 die Interaktion mit RIP1 und NEMO nicht ausreichend für die NF-kB-Aktivierung nach Infektion. Dies macht deutlich, dass der Bereich zwischen Aminosäure 1138 und 1167, der für die Interaktion mit RIP1 und NEMO entbehrlich ist, für eine zusätzliche Funktion benötigt wird, die sich nur im Kontext der Virusinfektion auf die M45-induzierte NF-kB-Aktivierung auswirkt. Weitere Untersuchungen zeigten, dass es sich bei dieser Funktion um die Inkorporation von M45 in Viruspartikel handelt, was im folgenden Abschnitt diskutiert wird.

4.2.3 NF-kB-Aktivierung durch das Virion-assoziierte M45

Die genauere Analyse der sehr frühen Zeitpunkte nach Infektion zeigte, dass das Virionassoziierte M45 für die NF- κ B-Aktivierung verantwortlich ist (Abb. **3.13**). Viren, die M45 mit in die Zelle bringen, es aber nicht exprimieren können, sind dennoch in der Lage, NF- κ B zu aktivieren, was bereits 30 min nach Infektion anhand der Phosphorylierung von I κ Ba nachweisbar ist. Gezeigt wurde dies mit Hilfe eines UV-inaktivierten Virus sowie mit einem Δ M45-Virus, das auf M45-exprimierenden Zellen angezogen wurde (Abb. **3.13 B**). Auch der Gegenbeweis konnte erbracht werden: Viren, die M45 exprimieren, es jedoch nicht effizient in Viruspartikel inkorporieren, können keine NF- κ B-Aktivierung innerhalb der ersten 3 Stunden nach Infektion induzieren. Dies ist der Fall bei den M45-Verkürzungsmutanten Ct4 und Ct5. Demnach ist die Inkorporation von M45 in Viruspartikel eine Voraussetzung für die frühe NF-κB-Aktivierung nach Infektion.

Doch was unterscheidet das Virion-assoziierte M45 von dem neusynthetisierten M45? Eine Möglichkeit wären unterschiedliche posttranslationale Modifikationen. Es ist jedoch nur sehr wenig über posttranslationale Modifikationen von M45 bekannt. Gezeigt wurde eine proteolytischen Spaltung nach Aminosäure 277 [208] und eine Ubiquitinierung [204], Es ist jedoch nicht bekannt, welchen Einfluss dies auf die Funktionalität von M45 hat. Zudem zeigt das Ergebnis des NF-KB-Reporterassays, dass auch Plasmid-kodiertes M45 NF-KB aktivieren kann, was gegen die Notwendigkeit einer Virion-spezifischen posttranslationalen Modifikation von M45 spricht (Abb. 3.11). Denkbar wäre, dass die Menge an vorhandenem M45 eine Rolle spielt. Während die geringen Mengen M45, die mit den Viruspartikeln in die Zelle gelangen, ausreichend für die NF-kB-Aktivierung sind, könnte die Degradation von NEMO und damit die NF-kB-Inhibition größere Mengen an M45 erfordern, die erst durch die Neusynthese erreicht werden. Ein ähnlicher Mengen-abhängiger Effekt wurde für das Protein MC159 des Molluscum contagiosum-Virus (MCV) gezeigt. Im NF-kB-Reporterassay führen geringe Mengen MC159 zur NF-kB-Aktivierung, größere Mengen MC159 dagegen zur NF-kB-Inhibition [263]. Möglich wäre auch, dass die Prozesse, die zur Aktivierung und Inhibition von NF-kB führen, unterschiedlich viel Zeit in Anspruch nehmen und die beiden Ereignisse aus diesem Grund nacheinander ablaufen. Es scheint plausibel, dass eine NF-kB-Aktivierung, die möglicherweise allein auf der Bindung von M45 an RIP1 und NEMO beruht, schneller abläuft als die durch Autophagie vermittelte NEMO-Degradation, die wahrscheinlich ein sehr komplexer Vorgang ist.

Wenn man sich jedoch die halbstündliche Kinetik von Ct4 und Ct5 anschaut, wird klar, dass es noch weitere bestimmende Faktoren geben muss. Denn zwischen 2 und 2,5 Stunden nach Infektion sind die Mengen an Ct4 und Ct5 auf einem ähnlichen Niveau wie das Wildtyp-M45 bei 30 min nach Infektion (Abb. **3.13 B**). Und bis einschließlich 3 Stunden nach Infektion findet auch bei der Wildtyp-Virus-Infektion keine NEMO-Degradation statt, so dass eine NF-κB-Aktivierung prinzipiell möglich sein sollte. Dennoch induzieren Ct4 und Ct5 auch 2 bis 2,5 Stunden nach Infektion keine IκBα-Phosphorylierung (Abb. **3.13 B**). Eine mögliche Erklärung könnte eine unterschiedliche subzelluläre Lokalisation oder Anordnung des Virionassoziierten und des neusynthetisierten M45 sein. Die Vorstellung liegt nahe, dass das Virion-assoziierte M45 in sehr gebündelter Form in die Zelle gelangt, während das neusynthetisierte M45 über die gesamte Zelle verteilt entsteht. Dies könnte ein Grund sein, warum geringe Mengen Virion-assoziiertes M45 NF-κB aktivieren können, geringe Mengen neusynthetisiertes M45 jedoch nicht. Zudem wäre es möglich, dass nicht die Eigenschaften des Virion-assoziierten M45 entscheidend sind, sondern dass die ablaufende Virusinfektion bestimmte Bedingungen innerhalb der Zelle so verändert, dass die M45-induzierte NF-κB-Aktivierung nur sofort nach dem Viruseintritt möglich ist und nicht zu späteren Zeitpunkten der Infektion.

4.3 Bedeutung von NF-κB für Virusinfektionen und virale

Modulation der NF-ĸB-Aktivität

Die große Zahl der durch NF-κB regulierten Gene und die Vielfältigkeit ihrer Funktionen in der angeborenen und adaptiven Immunantwort machen NF-κB zu einem attraktiven Ziel für virale Modulationen zum Zwecke der Immunevasion und der Förderung der viralen Replikation. Dies kann sowohl durch die Aktivierung als auch durch die Inhibition von NF-κB geschehen, abhängig vom Virus und dessen Replikationsstrategie, der Phase des Replikationszyklus und dem Zelltyp [264, 265].

NF-κB reguliert die angeborene und adaptive Immunantwort und trägt so zur Eliminierung von Pathogenen bei. Daher kann die Aktivierung von NF-κB zu einer Resistenz gegenüber verschiedenen Viren führen, darunter HSV-1, VSV und Ektromeliavirus (Mäusepockenvirus), was vor allem mit der NF-κB-abhängigen Produktion proinflammatorischer Zytokine und Interferone zusammenhängt [264, 266-268].

Jedoch kann sich die NF-kB-Aktivierung auch positiv auf die virale Replikation auswirken. Zu der von NF-kB maßgeblich regulierten Inflammationsreaktion gehört die Rekrutierung von Immuneffektorzellen durch Produktion von Chemokinen und Zelladhäsionsmolekülen. SIV und HIV-1 nutzen die NF-kB-abhängige Chemokinproduktion zur Rekrutierung permissiver Zellen zum Ort der Primärinfektion, was für die Ausbreitung der Infektion im Organismus notwendig ist [269, 270]. HTLV-1 induziert die NF-kB-abhängige Expression des Zelladhäsionsmoleküls ICAM-1, das die Übertragung der Viren von Zellen zu Zelle fördert [271]. Da NF-kB auch die Expression anti-apoptotischer Proteine induziert, ist eine Aktivierung von NF-kB häufig assoziiert mit der Inhibition des programmierten Zelltods. Dies ist für einige Viren von Vorteil, da es den Zeitraum verlängert, der für die Virusreplikation zur Verfügung steht. Ein solcher Effekt wurde unter anderem für HIV-1 und EMCV (Encephalomyokarditis-Virus) gezeigt [272-274]. In manchen Fällen kann NF-kB die Apoptose-Induktion fördern, was zur Ausbreitung und Pathogenese bestimmter Viren, zum Beispiel Denguevirus und Reoviren, beiträgt [275, 276]. Bei vielen tumorigenen Viren ist die Aktivierung von NF-KB zudem wichtig für die Transformation infizierter Zellen. Dies wurde unter anderem für HTLV-1, KSHV und EBV nachgewiesen [277]. Zudem sind auch in vielen viralen Promotoren NF-kB-Bindestellen zu finden, was auf eine direkte Funktion von NF-kB bei der viralen Genexpression hinweist. Ein solcher Zusammenhang wurde vor allem für HIV-1, HSV-1 und HCMV gezeigt [197, 271, 278].

84

Entsprechend der vielfältigen Wirkungen von NF-κB auf die virale Replikation exprimieren viele Viren sowohl NF-κB-aktivierende als auch NF-κB-inhibierende Proteine, was eine differenzierte Regulation der NF-κB-Aktivität ermöglicht.

Ein gut untersuchtes Beispiel ist das Gammaherpesvirus KSHV. Im Unterschied zu MCMV induziert KSHV keine transiente, sondern eine konsitutive NF-κB-Aktivierung, was die Transformation infizierter Zellen fördert und zur Etablierung und Aufrechterhaltung der Latenz beiträgt [277]. Wie M45 interagiert auch das KSHV-Protein vFLIP mit NEMO, was zur Aktivierung von NF-κB führt [258]. Ein weiterer von KSHV kodierter NF-κB-Aktivator ist das Protein ORF75, das wie M45 im Virustegument zu finden ist [279]. Im Gegensatz zu M45 können jedoch sowohl vFLIP als auch ORF75 NF-κB nur aktivieren und nicht inhibieren. Stattdessen exprimiert KSHV das NF-κB-inhibierende Protein vIRF3, das die IKKβ-Kinase-aktivität blockiert [280]. Es wird vermutet, dass das Zusammenwirken von vIRF3 und vFLIP zur Balance zwischen Immunsystem und Virus beiträgt [280].

Wie bereits zuvor erwähnt, aktivieren neben vFLIP auch das HTLV-1-Protein Tax und das EHV-2-Protein vCLAP NF-κB durch Interaktion mit NEMO [259, 260]. In dieser Hinsicht sind sie M45 funktionell ähnlich, doch keines dieser Proteine ist wie M45 in der Lage, NF-κB auch zu inhibieren.

Eines der wenigen viralen Proteine, das wie M45 NF-kB sowohl aktivieren als auch inhibieren kann, ist das Core-Protein des Hepatitis C-Virus (HCV). Es wurde beschrieben, dass Core an den zytoplasmatischen Teil des TNFR1 und des Lymphotoxin-β-Rezeptors bindet und die Liganden-induzierte NF-kB-Aktivierung verstärkt [281, 282]. Die Verstärkung des TNFR1-Signals durch Core ist abhängig von TRAF2 und IKKß [283]. Zudem kann Core selbst die Aktivierung von NF-kB induzieren, was in Abhängigkeit von TRAF2, TRAF6 und IKKβ geschieht [284]. Andere Studien haben dagegen eine NF-κB-inhibierende Funktion des Core-Proteins nachgewiesen [285]. Interessanterweise ist auch dies von IKKß abhängig. Protein NF-κB aktiviert oder inhibiert scheint zum Teil vom Zelltyp und im Besonderen vom Virussubtyp abzuhängen [281, 287, 288]. Bereits ein einzelner Aminosäureaustausch an Position 9 oder 11 des Core-Proteins führt zum Verlust der NF-kB-inhibierenden Funktion [287, 288]. Es wird vermutet, dass beide Core-Varianten IKK β binden und durch geringfügige Unterschiede in ihrer Position, Konformation oder Ladung die Aktivierung oder Inhibition der Kinase bewirken [286]. Während also im Fall von M45 ein und dasselbe Protein NF-κB aktivieren und inhibieren kann, sind bei Core unterschiedliche Proteinvarianten für die Aktivierung und Inhibition von NF-kB verantwortlich.

Auch das HSV-1-Protein ICP27 wurde sowohl als NF-κB-Aktivator als auch NF-κB-Inhibitor beschrieben [289, 290]. Der Mechanismus der ICP27-vermittelten NF-κB-Aktivierung ist nicht bekannt. Die NF-κB-Inhibition geschieht durch Interaktion von ICP27 mit IκBα, was die

Phosphorylierung und Degradation von IκBα blockiert [290]. Die Autoren dieser Studie argumentieren, dass die Widersprüchlichkeit der Befunde durch unterschiedliche Zelltypen und Zeitpunkte nach Infektion sowie durch den Einfluss weiterer Virusproteine begründet sein könnte [290].

Studien zur NF-κB-Regulation durch das MCV-Protein MC159 zeigen ebenfalls konträre Resultate. Zum einen wurde MC159 als NF-κB-Inhibitor beschrieben. Durch Interaktion mit NEMO inhibiert es die Degradation von IκBβ [291, 292]. In transgenen Mäusen verstärkt MC159 jedoch die Inflammationsreaktion nach Infektion mit Vaccinia-Virus, wofür die Autoren der Studie eine MC159-vermittelte Verstärkung der NF-κB-Aktivierung verantwortlich machen [263]. In NF-κB-Reporterassays wird die TNFα-induzierte NF-κB-Aktivierung in 293-Zellen durch MC159 inhibiert, in Jurkat-Zellen jedoch verstärkt [263, 293]. In beiden Studien induzierte die alleinige Expression von MC159 eine geringe, aber nachweisbare NF-κB-Reportergenaktivität, wie es auch bei M45 zu beobachten ist (Abb. **3.11**). Eine weitere Parallele zu M45 ist die gezeigte Interaktion von MC159 mit RIP1 [294], die für die NF-κB-Inhibition jedoch keine Rolle zu spielen scheint [293]. Dagegen wurde bei der MC159vermittelten Verstärkung der NF-κB-Aktivierung eine Beteiligung von RIP1 nachgewiesen [263].

Bisher ist M45 das einzige virale Protein, dessen NF-kB-aktivierende und -inhibierende Funktion klar und widerspruchsfrei gezeigt werden konnte (vorliegende Arbeit).

4.4 NF-κB-Regulation im Verlauf der MCMV-Infektion

Die in dieser und vorangegangenen Arbeiten gezeigten Resultate zeichnen ein komplexes Bild der NF-κB-Regulation durch MCMV und speziell durch M45 im Verlauf der Infektion. Auf eine initiale Phase der NF-κB-Aktivierung zwischen 1 und 3 Stunden nach Infektion folgt eine dauerhafte Inhibition von NF-κB. Beides wird maßgeblich durch M45 beeinflusst und die Analyse der NF-κB-Aktivität mit verschiedenen Methoden und unter verschiedenen Versuchsbedingungen legte zahlreiche M45-abhängige und M45-unabhängige Regulationsebenen frei.

Mit dem Eintritt des Virus in die Wirtszelle gelangt das im Tegument befindliche M45 in das Zytoplasma, wo es wahrscheinlich durch die Interaktion mit RIP1 und NEMO eine transiente Aktivierung von NF-κB induziert, die bis 3 Stunden nach Infektion anhält und möglicherweise die Aktivierung des viralen MIEP (*major immediate early promoter*) fördert. Dies könnte vor allem in solchen Zellen von Bedeutung sein, die eine geringe NF-κB-Basalaktivität besitzen und/oder eine geringe Aktivität anderer Transkriptionsfaktoren aufweisen, die ebenfalls die MIEP-Aktivierung fördern. Da der MCMV MIE-Enhancer 9 potentielle NF-κB-Bindestellen besitzt [295], könnte er mit zellulären Promotoren um die vorhandenen aktiven NF-κB-Moleküle konkurrieren, speziell wenn mehrere virale Genome in der Zelle vorliegen. Dazu

passt, dass in Zellen, die mit einem Virus infiziert sind, das die nicht-funktionale M45-Mutante Ct3 exprimiert, die RNA-Level des NF-κB-induzierten Gens *Nfkbia* zwischen 1 und 6 Stunden nach Infektion deutlich absinken (Abb. **3.12**). Da Ct3 die initiale NF-κB-Aktivierung nicht induzieren kann, steht in Ct3-infizierten Zellen nur der NF-κB-Basalaktivitätslevel zur Verfügung, der möglicherweise nicht ausreicht, um neben der laufenden IE-Expression auch die basale IκBα-Expression aufrecht zu erhalten. Die Tatsache, dass die Expression von *Tnfaip3* nach Infektion mit Ct3 nicht beeinträchtigt ist, könnte damit zusammen hängen, dass die *Nfkbia*-Expression in höherem Maße von NF-κB abhängt als die *Tnfaip3*-Expression [296].

In Makrophagen und zum Teil auch in Endothelzellen findet eine M45-unabhängige sofortige NF-κB-Aktivierung statt (Abb. **3.5**), die wahrscheinlich durch die Virus-induzierte Stimulation bestimmter Rezeptoren in diesen Zellen vermittelt wird.

Zwischen 5 und 7 Stunden nach Infektion wird eine M45-unabhängige IκBα-Degradation und nukleäre Translokation von NF-κB induziert, die nur bei Infektion mit einem M45-defizienten Virus zu beobachten ist (Abb. **3.1**). Diese verzögerte NF-κB-Aktivierung spiegelt sich im Gegensatz zu der frühen NF-κB-Aktivierung nicht in den Expressionslevel der untersuchten NF-κB-abhängigen Gene wieder (Abb. **3.12**). Das könnte darauf hinweisen, dass neben M45 ein weiterer viraler NF-κB-Inhibitor existiert, der ab etwa 5 Stunden nach Infektion exprimiert wird, im Zellkern lokalisiert ist und die transkriptionelle Aktivität von NF-κB inhibitort.

In Anwesenheit eines funktionellen M45 könnte die verzögerte IκBα-Degradation sowohl durch die einsetzende NEMO-Degradation verhindert werden als auch durch den negativen Feedback-Loop, der auf die initiale NF-κB-Aktivierung folgt und verschiedene zelluläre NF-κB-Inhibitoren aktiviert. Dabei stellt sich die Frage, warum die M45-Mutanten Ct4 und Ct5, die grundsätzlich in der Lage sind, die NF-κB-Aktivierung zu blockieren, die verzögerte IκBα-Degradation zwischen 5 und 7 Stunden nach Infektion nicht verhindern können (Abb. **3.10 B**). Möglicherweise sind Ct4 und Ct5 zu diesen frühen Zeitpunkten weniger effizient in der Blockierung der NEMO-Aktivität. Zudem sind Ct4 und Ct5 nur in sehr geringen Mengen in Viruspartikeln vorhanden und induzieren daher keine initiale NF-κB-Aktivierung (Abb. **3.13**), wodurch kein negativer Feedback-Loop stattfindet, der der verzögerten NF-κB-Aktivierung entgegenwirken könnte.

In Wildtyp-Virus-infizierten Zellen beginnt ab etwa 5 Stunden nach Infektion die M45vermittelte Degradation von NEMO (Abb. **3.1 A**), was nicht nur die initiale M45-induzierte NF-κB-Aktivierung beendet, sondern auch zu einer permanenten Blockierung aller NEMOabhängigen NF-κB-Signalwege führt [205].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen erstmals, dass M45 die initiale NF-κB-Aktivierung in infizierten Zellen induziert und dass diese Funktion im Einklang ist mit der späteren M45-vermittelten NF-κB-Inhibition. Die M45-induzierte NF-κB-Aktivierung in infizierten Zellen erfordert die Inkorporation von M45 in Viruspartikel. Die dafür notwendige Region des M45-Proteins wurde auf einen kleinen C-terminalen Bereich von 29 Aminosäuren eingegrenzt, der für die NF-κB-inhibierende Funktion von M45 nicht erforderlich ist. Dies ermöglicht eine Trennung der NF-κB-aktivierenden und NF-κB-inhibierenden Aktivität von M45 in MCMV-infizierten Zellen. Ein Virus, das eine Inkorporations-defekte M45-Mutante exprimiert (zum Beispiel Ct5), kann in Fibroblasten keine initale NF-κB-Aktivierung induzieren, ist jedoch weiterhin in der Lage, NF-κB zu inhibieren. Die Entkoppelung dieser beiden Funktionen würde es erlauben, die Bedeutung der M45-induzierten NF-κB-Aktivierung für die Regulation der angeborenen Immunantwort und die Virusreplikation näher zu untersuchen.

5 Literaturverzeichnis

- 1. King, A., M. Adams, E. Lefkowitz, and E. Carstens, *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. 2012: Elsevier Academic Press.
- 2. Gibson, W., *Structure and formation of the cytomegalovirus virion.* Curr Top Microbiol Immunol, 2008. **325**: p. 187-204.
- 3. Kalejta, R.F., *Tegument proteins of human cytomegalovirus*. Microbiol Mol Biol Rev, 2008. **72**(2): p. 249-65, table of contents.
- 4. Chen, D.H., H. Jiang, M. Lee, F. Liu, and Z.H. Zhou, *Three-dimensional visualization of tegument/capsid interactions in the intact human cytomegalovirus.* Virology, 1999. **260**(1): p. 10-6.
- 5. Murphy, E. and T. Shenk, *Human cytomegalovirus genome.* Curr Top Microbiol Immunol, 2008. **325**: p. 1-19.
- Roizmann, B., R.C. Desrosiers, B. Fleckenstein, C. Lopez, A.C. Minson, and M.J. Studdert, *The family Herpesviridae: an update. The Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Archives of Virology, 1992. **123**(3-4): p. 425-49.
- 7. Weller, T.H., *Review. Cytomegaloviruses: the difficult years.* J Infect Dis, 1970. **122**(6): p. 532-9.
- 8. Hudson, J.B., *The murine cytomegalovirus as a model for the study of viral pathogenesis and persistent infections.* Archives of Virology, 1979. **62**(1): p. 1-29.
- 9. Sinzger, C. and G. Jahn, *Human cytomegalovirus cell tropism and pathogenesis.* Intervirology, 1996. **39**(5-6): p. 302-19.
- 10. Reeves, M. and J. Sinclair, Aspects of human cytomegalovirus latency and reactivation. Curr Top Microbiol Immunol, 2008. **325**: p. 297-313.
- 11. Mocarski, E.S., T. Shenk, and R. Pass, *Cytomegaloviruses*, in *Fields Virology 5th edition*. 2007.
- 12. Brune, W., M. Nevels, and T. Shenk, *Murine cytomegalovirus m41 open reading frame encodes a Golgi-localized antiapoptotic protein.* J Virol, 2003. **77**(21): p. 11633-43.
- Compton, T., D.M. Nowlin, and N.R. Cooper, *Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate.* Virology, 1993. 193(2): p. 834-41.
- 14. Isaacson, M.K. and T. Compton, *Human cytomegalovirus glycoprotein B is required for virus entry and cell-to-cell spread but not for virion attachment, assembly, or egress.* J Virol, 2009. **83**(8): p. 3891-903.
- 15. Vanarsdall, A.L. and D.C. Johnson, *Human cytomegalovirus entry into cells.* Curr Opin Virol, 2012. **2**(1): p. 37-42.
- 16. Wille, P.T., T.W. Wisner, B. Ryckman, and D.C. Johnson, *Human cytomegalovirus* (*HCMV*) glycoprotein gB promotes virus entry in trans acting as the viral fusion protein rather than as a receptor-binding protein. MBio, 2013. **4**(3): p. e00332-13.
- 17. Wang, X., S.M. Huong, M.L. Chiu, N. Raab-Traub, and E.S. Huang, *Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus.* Nature, 2003. **424**(6947): p. 456-61.
- Isaacson, M.K., A.L. Feire, and T. Compton, *Epidermal growth factor receptor is not required for human cytomegalovirus entry or signaling.* J Virol, 2007. 81(12): p. 6241-7.
- Soroceanu, L., A. Akhavan, and C.S. Cobbs, *Platelet-derived growth factor-alpha* receptor activation is required for human cytomegalovirus infection. Nature, 2008. 455(7211): p. 391-5.
- Vanarsdall, A.L., T.W. Wisner, H. Lei, A. Kazlauskas, and D.C. Johnson, *PDGF* receptor-alpha does not promote HCMV entry into epithelial and endothelial cells but increased quantities stimulate entry by an abnormal pathway. PLoS Pathog, 2012. 8(9): p. e1002905.

- 21. Feire, A.L., H. Koss, and T. Compton, *Cellular integrins function as entry receptors for human cytomegalovirus via a highly conserved disintegrin-like domain.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(43): p. 15470-5.
- 22. Compton, T., R.R. Nepomuceno, and D.M. Nowlin, *Human cytomegalovirus penetrates host cells by pH-independent fusion at the cell surface.* Virology, 1992. **191**(1): p. 387-95.
- 23. Ryckman, B.J., M.A. Jarvis, D.D. Drummond, J.A. Nelson, and D.C. Johnson, *Human cytomegalovirus entry into epithelial and endothelial cells depends on genes UL128 to UL150 and occurs by endocytosis and low-pH fusion.* J Virol, 2006. **80**(2): p. 710-22.
- 24. Ogawa-Goto, K., K. Tanaka, W. Gibson, E. Moriishi, Y. Miura, T. Kurata, S. Irie, and T. Sata, *Microtubule network facilitates nuclear targeting of human cytomegalovirus capsid.* J Virol, 2003. **77**(15): p. 8541-7.
- 25. Kalejta, R.F., Functions of human cytomegalovirus tegument proteins prior to immediate early gene expression. Curr Top Microbiol Immunol, 2008. **325**: p. 101-15.
- 26. Bechtel, J.T. and T. Shenk, *Human cytomegalovirus UL47 tegument protein functions after entry and before immediate-early gene expression.* J Virol, 2002. **76**(3): p. 1043-50.
- 27. McVoy, M.A. and S.P. Adler, *Human cytomegalovirus DNA replicates after early circularization by concatemer formation, and inversion occurs within the concatemer.* J Virol, 1994. **68**(2): p. 1040-51.
- 28. DeMarchi, J.M., C.A. Schmidt, and A.S. Kaplan, *Patterns of transcription of human cytomegalovirus in permissively infected cells.* J Virol, 1980. **35**(2): p. 277-86.
- 29. Wathen, M.W. and M.F. Stinski, *Temporal patterns of human cytomegalovirus transcription: mapping the viral RNAs synthesized at immediate early, early, and late times after infection.* J Virol, 1982. **41**(2): p. 462-77.
- 30. Anders, D.G., M.A. Kacica, G. Pari, and S.M. Punturieri, *Boundaries and structure of human cytomegalovirus oriLyt, a complex origin for lytic-phase DNA replication.* J Virol, 1992. **66**(6): p. 3373-84.
- 31. Pari, G.S., *Nuts and bolts of human cytomegalovirus lytic DNA replication.* Curr Top Microbiol Immunol, 2008. **325**: p. 153-66.
- 32. Meijer, H., P.H. Dormans, and C.P. van Boven, *Studies on rat cytomegalovirus induced structural and non-structural proteins present at (immediate-)early and late times of infection.* Archives of Virology, 1986. **89**(1-4): p. 45-56.
- 33. Isomura, H. and M.F. Stinski, *Coordination of late gene transcription of human cytomegalovirus with viral DNA synthesis: recombinant viruses as potential therapeutic vaccine candidates.* Expert Opin Ther Targets, 2013. **17**(2): p. 157-66.
- 34. Holzenburg, A. and E. Bogner, *From Concatemeric DNA into Unit-length Genomes a Miracle or Clever Genes?*, in *Structure-Function Relationships of Human Pathogenic Viruses*. 2002.
- 35. Mettenleiter, T.C., F. Muller, H. Granzow, and B.G. Klupp, *The way out: what we know and do not know about herpesvirus nuclear egress.* Cell Microbiol, 2013. **15**(2): p. 170-8.
- 36. Mettenleiter, T.C., B.G. Klupp, and H. Granzow, *Herpesvirus assembly: a tale of two membranes.* Curr Opin Microbiol, 2006. **9**(4): p. 423-9.
- 37. Mettenleiter, T.C., B.G. Klupp, and H. Granzow, *Herpesvirus assembly: an update.* Virus Res, 2009. **143**(2): p. 222-34.
- 38. Ehlers, B., *Discovery of herpesviruses*, in *Encyclopedia of Virology, 3rd edition*. 2008.
- 39. Pellet, P. and B. Roizman, *The family Herpesviridae: a brief introduction*, in *Fields Virology, 5th edition.* 2007.
- 40. Davison, A.J., B.L. Trus, N. Cheng, A.C. Steven, M.S. Watson, C. Cunningham, R.M. Le Deuff, and T. Renault, *A novel class of herpesvirus with bivalve hosts.* J Gen Virol, 2005. **86**(Pt 1): p. 41-53.
- 41. Savin, K.W., B.G. Cocks, F. Wong, T. Sawbridge, N. Cogan, D. Savage, and S. Warner, *A neurotropic herpesvirus infecting the gastropod, abalone, shares ancestry*

with oyster herpesvirus and a herpesvirus associated with the amphioxus genome. Virol J, 2010. **7**: p. 308.

- 42. Krupovic, M. and D.H. Bamford, *Protein Conservation in Virus Evolution*. eLS, 2011.
- 43. McGeoch, D.J., F.J. Rixon, and A.J. Davison, *Topics in herpesvirus genomics and evolution.* Virus Res, 2006. **117**(1): p. 90-104.
- 44. Davison, A.J., *Evolution of sexually transmitted and sexually transmissible human herpesviruses*. Ann N Y Acad Sci, 2011. **1230**(1): p. E37-49.
- 45. Ribbert, H., Über protozoenartige Zellen in der Niere eines syphilitischen Neugeborenen und in der Parotis von Kindern. Zbl allg Path, 1904. **15: 945–948**.
- 46. Jesionek, A. and B. Kiolemenoglou, Über einen Befund von protozoenartigen. Gebilden in den Organen eines hereditär-luetischen Fötus. Munch, med. Wschr., 1904. **51:1905-7**.
- 47. Ho, M., *The history of cytomegalovirus and its diseases.* Med Microbiol Immunol, 2008. **197**(2): p. 65-73.
- 48. Cannon, M.J., D.S. Schmid, and T.B. Hyde, *Review of cytomegalovirus* seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. Rev Med Virol, 2010. **20**(4): p. 202-13.
- 49. Cannon, M.J., T.B. Hyde, and D.S. Schmid, *Review of cytomegalovirus shedding in bodily fluids and relevance to congenital cytomegalovirus infection.* Rev Med Virol, 2011. **21**(4): p. 240-55.
- 50. Ljungman, P., *Risk of cytomegalovirus transmission by blood products to immunocompromised patients and means for reduction.* Br J Haematol, 2004. **125**(2): p. 107-16.
- 51. Kurath, S., G. Halwachs-Baumann, W. Muller, and B. Resch, *Transmission of cytomegalovirus via breast milk to the prematurely born infant: a systematic review.* Clin Microbiol Infect, 2010. **16**(8): p. 1172-8.
- 52. Yinon, Y., D. Farine, and M.H. Yudin, *Screening, diagnosis, and management of cytomegalovirus infection in pregnancy.* Obstet Gynecol Surv, 2010. **65**(11): p. 736-43.
- 53. Klemola, E. and L. Kaariainen, *Cytomegalovirus as a possible cause of a disease resembling infectious mononucleosis.* Br Med J, 1965. **2**(5470): p. 1099-102.
- 54. Wyatt, J.P., J. Saxton, and et al., *Generalized cytomegalic inclusion disease*. J Pediatr, 1950. **36**(3): p. 271-94, illust.
- 55. Kenneson, A. and M.J. Cannon, *Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection.* Rev Med Virol, 2007. **17**(4): p. 253-76.
- 56. Alford, C.A., S. Stagno, R.F. Pass, and W.J. Britt, *Congenital and perinatal cytomegalovirus infections.* Rev Infect Dis, 1990. **12 Suppl 7**: p. S745-53.
- 57. Malm, G. and M.L. Engman, *Congenital cytomegalovirus infections*. Semin Fetal Neonatal Med, 2007. **12**(3): p. 154-9.
- 58. Drew, W.L., *Cytomegalovirus infection in patients with AIDS.* Clin Infect Dis, 1992. **14**(2): p. 608-15.
- 59. Yust, I., Z. Fox, M. Burke, A. Johnson, D. Turner, A. Mocroft, C. Katlama, B. Ledergerber, P. Reiss, and O. Kirk, *Retinal and extraocular cytomegalovirus end-organ disease in HIV-infected patients in Europe: a EuroSIDA study, 1994-2001.* Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2004. **23**(7): p. 550-9.
- 60. Steininger, C., E. Puchhammer-Stockl, and T. Popow-Kraupp, *Cytomegalovirus disease in the era of highly active antiretroviral therapy (HAART).* J Clin Virol, 2006. **37**(1): p. 1-9.
- 61. Pereyra, F. and R.H. Rubin, *Prevention and treatment of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients.* Curr Opin Infect Dis, 2004. **17**(4): p. 357-61.
- 62. Beam, E. and R.R. Razonable, *Cytomegalovirus in solid organ transplantation: epidemiology, prevention, and treatment.* Curr Infect Dis Rep, 2012. **14**(6): p. 633-41.
- 63. Dropulic, L.K., *The Impact of Cytomegalovirus Infection on Solid Organ Transplantation.* Adv. Stud. Med., 2006. **6:319-328**.
- 64. Sen, R. and D. Baltimore, *Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences.* Cell, 1986. **46**(5): p. 705-16.

- 65. Sen, R. and D. Baltimore, *Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism.* Cell, 1986. **47**(6): p. 921-8.
- 66. Baeuerle, P.A. and D. Baltimore, *A 65-kappaD subunit of active NF-kappaB is required for inhibition of NF-kappaB by I kappaB.* Genes Dev, 1989. **3**(11): p. 1689-98.
- 67. Urban, M.B., R. Schreck, and P.A. Baeuerle, *NF-kappa B contacts DNA by a heterodimer of the p50 and p65 subunit.* EMBO J, 1991. **10**(7): p. 1817-25.
- 68. Oeckinghaus, A. and S. Ghosh, *The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation.* Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009. **1**(4): p. a000034.
- 69. Kieran, M., V. Blank, F. Logeat, J. Vandekerckhove, F. Lottspeich, O. Le Bail, M.B. Urban, P. Kourilsky, P.A. Baeuerle, and A. Israel, *The DNA binding subunit of NF-kappa B is identical to factor KBF1 and homologous to the rel oncogene product.* Cell, 1990. **62**(5): p. 1007-18.
- 70. Blank, V., P. Kourilsky, and A. Israel, *NF-kappa B and related proteins: Rel/dorsal homologies meet ankyrin-like repeats.* Trends Biochem Sci, 1992. **17**(4): p. 135-40.
- 71. Zabel, U. and P.A. Baeuerle, *Purified human I kappa B can rapidly dissociate the complex of the NF-kappa B transcription factor with its cognate DNA.* Cell, 1990. **61**(2): p. 255-65.
- 72. Ghosh, S. and M. Karin, *Missing pieces in the NF-kappaB puzzle.* Cell, 2002. **109 Suppl**: p. S81-96.
- 73. Henkel, T., T. Machleidt, I. Alkalay, M. Kronke, Y. Ben-Neriah, and P.A. Baeuerle, *Rapid proteolysis of I kappa B-alpha is necessary for activation of transcription factor NF-kappa B.* Nature, 1993. **365**(6442): p. 182-5.
- 74. Mercurio, F., H. Zhu, B.W. Murray, A. Shevchenko, B.L. Bennett, J. Li, D.B. Young, M. Barbosa, M. Mann, A. Manning, and A. Rao, *IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkappaB kinases essential for NF-kappaB activation.* Science, 1997. **278**(5339): p. 860-6.
- 75. Rothwarf, D.M., E. Zandi, G. Natoli, and M. Karin, *IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the IkappaB kinase complex.* Nature, 1998. **395**(6699): p. 297-300.
- 76. Perkins, N.D., *Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kappa B pathway.* Oncogene, 2006. **25**(51): p. 6717-30.
- 77. Sun, S.C., *The noncanonical NF-kappaB pathway.* Immunol Rev, 2012. **246**(1): p. 125-40.
- 78. Diamant, G. and R. Dikstein, *Transcriptional control by NF-kappaB: elongation in focus.* Biochim Biophys Acta, 2013. **1829**(9): p. 937-45.
- 79. Hayden, M.S., A.P. West, and S. Ghosh, *NF-kappaB and the immune response.* Oncogene, 2006. **25**(51): p. 6758-80.
- 80. Pahl, H.L., Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. Oncogene, 1999. **18**(49): p. 6853-66.
- 81. Fan, Y., J. Dutta, N. Gupta, G. Fan, and C. Gelinas, *Regulation of programmed cell death by NF-kappaB and its role in tumorigenesis and therapy.* Adv Exp Med Biol, 2008. **615**: p. 223-50.
- Torchinsky, A. and V. Toder, *To die or not to die: the function of the transcription factor NF-kappaB in embryos exposed to stress.* Am J Reprod Immunol, 2004. **51**(2): p. 138-43.
- 83. Gutierrez, H. and A.M. Davies, *Regulation of neural process growth, elaboration and structural plasticity by NF-kappaB.* Trends Neurosci, 2011. **34**(6): p. 316-25.
- 84. Renner, F. and M.L. Schmitz, *Autoregulatory feedback loops terminating the NF-kappaB response.* Trends Biochem Sci, 2009. **34**(3): p. 128-35.
- 85. Kumar, A., Y. Takada, A.M. Boriek, and B.B. Aggarwal, *Nuclear factor-kappaB: its role in health and disease.* J Mol Med (Berl), 2004. **82**(7): p. 434-48.
- 86. Courtois, G. and T.D. Gilmore, *Mutations in the NF-kappaB signaling pathway: implications for human disease.* Oncogene, 2006. **25**(51): p. 6831-43.
- 87. Murphy, M., Janeway's Immunobiology, 8th edition. 2011.

- 88. Zasloff, M., Antimicrobial peptides of multicellular organisms. Nature, 2002. **415**(6870): p. 389-95.
- 89. Hayden, M.S. and S. Ghosh, *NF-kappaB in immunobiology.* Cell Res, 2011. **21**(2): p. 223-44.
- Scharf, S., S. Hippenstiel, A. Flieger, N. Suttorp, and P.D. N'Guessan, Induction of human beta-defensin-2 in pulmonary epithelial cells by Legionella pneumophila: involvement of TLR2 and TLR5, p38 MAPK, JNK, NF-kappaB, and AP-1. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2010. 298(5): p. L687-95.
- Zhu, C., H. Qin, T. Cheng, H.L. Tan, Y.Y. Guo, S.F. Shi, D.S. Chen, and X.L. Zhang, Staphylococcus aureus supernatant induces the release of mouse beta-defensin-14 from osteoblasts via the p38 MAPK and NF-kappaB pathways. Int J Mol Med, 2013.
 31(6): p. 1484-94.
- 92. Vila-del Sol, V., M.D. Diaz-Munoz, and M. Fresno, *Requirement of tumor necrosis factor alpha and nuclear factor-kappaB in the induction by IFN-gamma of inducible nitric oxide synthase in macrophages.* J Leukoc Biol, 2007. **81**(1): p. 272-83.
- 93. Farlik, M., B. Reutterer, C. Schindler, F. Greten, C. Vogl, M. Muller, and T. Decker, Nonconventional initiation complex assembly by STAT and NF-kappaB transcription factors regulates nitric oxide synthase expression. Immunity, 2010. **33**(1): p. 25-34.
- 94. Sabroe, I., L.R. Prince, E.C. Jones, M.J. Horsburgh, S.J. Foster, S.N. Vogel, S.K. Dower, and M.K. Whyte, *Selective roles for Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in the regulation of neutrophil activation and life span.* J Immunol, 2003. **170**(10): p. 5268-75.
- 95. Gerondakis, S., A. Banerjee, G. Grigoriadis, A. Vasanthakumar, R. Gugasyan, T. Sidwell, and R.J. Grumont, *NF-kappaB subunit specificity in hemopoiesis*. Immunol Rev, 2012. **246**(1): p. 272-85.
- 96. Sen, G.C., Viruses and interferons. Annu Rev Microbiol, 2001. 55: p. 255-81.
- 97. Kawai, T. and S. Akira, *The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors.* Nat Immunol, 2010. **11**(5): p. 373-84.
- 98. Chang, Z.L., *Important aspects of Toll-like receptors, ligands and their signaling pathways.* Inflamm Res, 2010. **59**(10): p. 791-808.
- 99. Thompson, M.R., J.J. Kaminski, E.A. Kurt-Jones, and K.A. Fitzgerald, *Pattern* recognition receptors and the innate immune response to viral infection. Viruses, 2011. **3**(6): p. 920-40.
- Lagos, D., R.J. Vart, F. Gratrix, S.J. Westrop, V. Emuss, P.P. Wong, R. Robey, N. Imami, M. Bower, F. Gotch, and C. Boshoff, *Toll-like receptor 4 mediates innate immunity to Kaposi sarcoma herpesvirus.* Cell Host Microbe, 2008. 4(5): p. 470-83.
- 101. Villalba, M., M. Hott, C. Martin, B. Aguila, S. Valdivia, C. Quezada, A. Zambrano, M.I. Concha, and C. Otth, *Herpes simplex virus type 1 induces simultaneous activation of Toll-like receptors 2 and 4 and expression of the endogenous ligand serum amyloid A in astrocytes.* Med Microbiol Immunol, 2012. **201**(3): p. 371-9.
- 102. Barbalat, R., L. Lau, R.M. Locksley, and G.M. Barton, *Toll-like receptor 2 on inflammatory monocytes induces type I interferon in response to viral but not bacterial ligands*. Nat Immunol, 2009. **10**(11): p. 1200-7.
- 103. Boehme, K.W., M. Guerrero, and T. Compton, *Human cytomegalovirus envelope glycoproteins B and H are necessary for TLR2 activation in permissive cells.* J Immunol, 2006. **177**(10): p. 7094-102.
- 104. Vercammen, E., J. Staal, and R. Beyaert, *Sensing of viral infection and activation of innate immunity by toll-like receptor 3.* Clin Microbiol Rev, 2008. **21**(1): p. 13-25.
- 105. Weber, F., V. Wagner, S.B. Rasmussen, R. Hartmann, and S.R. Paludan, *Double-stranded RNA is produced by positive-strand RNA viruses and DNA viruses but not in detectable amounts by negative-strand RNA viruses.* J Virol, 2006. **80**(10): p. 5059-64.
- 106. Iwakiri, D., L. Zhou, M. Samanta, M. Matsumoto, T. Ebihara, T. Seya, S. Imai, M. Fujieda, K. Kawa, and K. Takada, *Epstein-Barr virus (EBV)-encoded small RNA is released from EBV-infected cells and activates signaling from Toll-like receptor 3.* J Exp Med, 2009. **206**(10): p. 2091-9.

- 107. Zhang, S.Y., E. Jouanguy, S. Ugolini, A. Smahi, G. Elain, P. Romero, D. Segal, V. Sancho-Shimizu, L. Lorenzo, A. Puel, C. Picard, A. Chapgier, S. Plancoulaine, M. Titeux, C. Cognet, H. von Bernuth, C.L. Ku, A. Casrouge, X.X. Zhang, L. Barreiro, J. Leonard, C. Hamilton, P. Lebon, B. Heron, L. Vallee, L. Quintana-Murci, A. Hovnanian, F. Rozenberg, E. Vivier, F. Geissmann, M. Tardieu, L. Abel, and J.L. Casanova, *TLR3 deficiency in patients with herpes simplex encephalitis.* Science, 2007. **317**(5844): p. 1522-7.
- 108. Tabeta, K., P. Georgel, E. Janssen, X. Du, K. Hoebe, K. Crozat, S. Mudd, L. Shamel, S. Sovath, J. Goode, L. Alexopoulou, R.A. Flavell, and B. Beutler, *Toll-like receptors 9* and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(10): p. 3516-21.
- 109. Edelmann, K.H., S. Richardson-Burns, L. Alexopoulou, K.L. Tyler, R.A. Flavell, and M.B. Oldstone, *Does Toll-like receptor 3 play a biological role in virus infections?* Virology, 2004. **322**(2): p. 231-8.
- 110. Hornung, V., W. Barchet, M. Schlee, and G. Hartmann, *RNA recognition via TLR7 and TLR8*. Handb Exp Pharmacol, 2008(183): p. 71-86.
- 111. Hemmi, H., O. Takeuchi, T. Kawai, T. Kaisho, S. Sato, H. Sanjo, M. Matsumoto, K. Hoshino, H. Wagner, K. Takeda, and S. Akira, *A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA*. Nature, 2000. **408**(6813): p. 740-5.
- 112. Hoelzer, K., L.A. Shackelton, and C.R. Parrish, *Presence and role of cytosine methylation in DNA viruses of animals*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(9): p. 2825-37.
- Xie, Q., H.C. Shen, N.N. Jia, H. Wang, L.Y. Lin, B.Y. An, H.L. Gui, S.M. Guo, W. Cai, H. Yu, Q. Guo, and S. Bao, *Patients with chronic hepatitis B infection display deficiency of plasmacytoid dendritic cells with reduced expression of TLR9.* Microbes Infect, 2009. **11**(4): p. 515-23.
- 114. Lund, J., A. Sato, S. Akira, R. Medzhitov, and A. Iwasaki, *Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells.* J Exp Med, 2003. **198**(3): p. 513-20.
- 115. Krug, A., A.R. French, W. Barchet, J.A. Fischer, A. Dzionek, J.T. Pingel, M.M. Orihuela, S. Akira, W.M. Yokoyama, and M. Colonna, *TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function.* Immunity, 2004. **21**(1): p. 107-19.
- 116. Botos, I., D.M. Segal, and D.R. Davies, *The structural biology of Toll-like receptors.* Structure, 2011. **19**(4): p. 447-59.
- 117. Jenkins, K.A. and A. Mansell, *TIR-containing adaptors in Toll-like receptor signalling.* Cytokine, 2010. **49**(3): p. 237-44.
- 118. Flannery, S. and A.G. Bowie, *The interleukin-1 receptor-associated kinases: critical regulators of innate immune signalling.* Biochem Pharmacol, 2010. **80**(12): p. 1981-91.
- 119. Kawai, T. and S. Akira, *Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors.* Trends Mol Med, 2007. **13**(11): p. 460-9.
- 120. Newton, K. and V.M. Dixit, *Signaling in innate immunity and inflammation*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. **4**(3).
- 121. Wertz, I.E. and V.M. Dixit, *Signaling to NF-kappaB: regulation by ubiquitination.* Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(3): p. a003350.
- 122. Skaug, B., X. Jiang, and Z.J. Chen, *The role of ubiquitin in NF-kappaB regulatory pathways.* Annu Rev Biochem, 2009. **78**: p. 769-96.
- 123. Liu, S. and Z.J. Chen, *Expanding role of ubiquitination in NF-kappaB signaling.* Cell Res, 2011. **21**(1): p. 6-21.
- 124. Sebban-Benin, H., A. Pescatore, F. Fusco, V. Pascuale, J. Gautheron, S. Yamaoka, A. Moncla, M.V. Ursini, and G. Courtois, *Identification of TRAF6-dependent NEMO polyubiquitination sites through analysis of a new NEMO mutation causing incontinentia pigmenti.* Hum Mol Genet, 2007. **16**(23): p. 2805-15.
- 125. Laplantine, E., E. Fontan, J. Chiaravalli, T. Lopez, G. Lakisic, M. Veron, F. Agou, and A. Israel, *NEMO specifically recognizes K63-linked poly-ubiquitin chains through a new bipartite ubiquitin-binding domain.* EMBO J, 2009. **28**(19): p. 2885-95.

- 126. Kanayama, A., R.B. Seth, L. Sun, C.K. Ea, M. Hong, A. Shaito, Y.H. Chiu, L. Deng, and Z.J. Chen, *TAB2 and TAB3 activate the NF-kappaB pathway through binding to polyubiquitin chains.* Mol Cell, 2004. **15**(4): p. 535-48.
- 127. Hayden, M.S. and S. Ghosh, *Shared principles in NF-kappaB signaling.* Cell, 2008. **132**(3): p. 344-62.
- 128. Wang, C., L. Deng, M. Hong, G.R. Akkaraju, J. Inoue, and Z.J. Chen, *TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK*. Nature, 2001. **412**(6844): p. 346-51.
- 129. Jiang, Z., T.W. Mak, G. Sen, and X. Li, *Toll-like receptor 3-mediated activation of NF-kappaB and IRF3 diverges at Toll-IL-1 receptor domain-containing adapter inducing IFN-beta.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(10): p. 3533-8.
- 130. Meylan, E., K. Burns, K. Hofmann, V. Blancheteau, F. Martinon, M. Kelliher, and J. Tschopp, *RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation.* Nat Immunol, 2004. **5**(5): p. 503-7.
- 131. Cusson-Hermance, N., S. Khurana, T.H. Lee, K.A. Fitzgerald, and M.A. Kelliher, *Rip1* mediates the Trif-dependent toll-like receptor 3- and 4-induced NF-{kappa}B activation but does not contribute to interferon regulatory factor 3 activation. J Biol Chem, 2005. **280**(44): p. 36560-6.
- 132. Gohda, J., T. Matsumura, and J. Inoue, *Cutting edge: TNFR-associated factor* (*TRAF*) 6 is essential for MyD88-dependent pathway but not toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor-inducing IFN-beta (*TRIF*)-dependent pathway in *TLR* signaling. J Immunol, 2004. **173**(5): p. 2913-7.
- 133. Chang, M., W. Jin, and S.C. Sun, *Peli1 facilitates TRIF-dependent Toll-like receptor signaling and proinflammatory cytokine production.* Nat Immunol, 2009. **10**(10): p. 1089-95.
- 134. Ea, C.K., L. Deng, Z.P. Xia, G. Pineda, and Z.J. Chen, *Activation of IKK by TNFalpha requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO.* Mol Cell, 2006. **22**(2): p. 245-57.
- 135. Honda, K. and T. Taniguchi, *IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors.* Nat Rev Immunol, 2006. **6**(9): p. 644-58.
- 136. Chau, T.L., R. Gioia, J.S. Gatot, F. Patrascu, I. Carpentier, J.P. Chapelle, L. O'Neill, R. Beyaert, J. Piette, and A. Chariot, *Are the IKKs and IKK-related kinases TBK1 and IKK-epsilon similarly activated*? Trends Biochem Sci, 2008. **33**(4): p. 171-80.
- 137. Schlee, M., *Master sensors of pathogenic RNA RIG-I like receptors.* Immunobiology, 2013. **218**(11): p. 1322-35.
- 138. Ng, C.S., H. Kato, and T. Fujita, *Recognition of viruses in the cytoplasm by RLRs and other helicases--how conformational changes, mitochondrial dynamics and ubiquitination control innate immune responses.* Int Immunol, 2012. **24**(12): p. 739-49.
- 139. Kato, H., K. Takahasi, and T. Fujita, *RIG-I-like receptors: cytoplasmic sensors for non-self RNA.* Immunol Rev, 2011. **243**(1): p. 91-8.
- 140. Nie, Y. and Y.Y. Wang, *Innate immune responses to DNA viruses.* Protein Cell, 2013. **4**(1): p. 1-7.
- 141. Liu, S., J. Chen, X. Cai, J. Wu, X. Chen, Y.T. Wu, L. Sun, and Z.J. Chen, *MAVS* recruits multiple ubiquitin *E3* ligases to activate antiviral signaling cascades. Elife, 2013. **2**: p. e00785.
- 142. Michallet, M.C., E. Meylan, M.A. Ermolaeva, J. Vazquez, M. Rebsamen, J. Curran, H. Poeck, M. Bscheider, G. Hartmann, M. Konig, U. Kalinke, M. Pasparakis, and J. Tschopp, *TRADD protein is an essential component of the RIG-like helicase antiviral pathway.* Immunity, 2008. **28**(5): p. 651-61.
- 143. Bhat, N. and K.A. Fitzgerald, *Recognition of cytosolic DNA by cGAS and other STING-dependent sensors.* Eur J Immunol, 2014. **44**(3): p. 634-40.
- 144. Takaoka, A., Z. Wang, M.K. Choi, H. Yanai, H. Negishi, T. Ban, Y. Lu, M. Miyagishi, T. Kodama, K. Honda, Y. Ohba, and T. Taniguchi, DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. Nature, 2007. 448(7152): p. 501-5.

- 145. Kaiser, W.J., J.W. Upton, and E.S. Mocarski, *Receptor-interacting protein homotypic interaction motif-dependent control of NF-kappa B activation via the DNA-dependent activator of IFN regulatory factors.* J Immunol, 2008. **181**(9): p. 6427-34.
- 146. Rebsamen, M., L.X. Heinz, E. Meylan, M.C. Michallet, K. Schroder, K. Hofmann, J. Vazquez, C.A. Benedict, and J. Tschopp, *DAI/ZBP1 recruits RIP1 and RIP3 through RIP homotypic interaction motifs to activate NF-kappaB.* EMBO Rep, 2009. **10**(8): p. 916-22.
- 147. Furr, S.R., V.S. Chauhan, M.J. Moerdyk-Schauwecker, and I. Marriott, A role for DNA-dependent activator of interferon regulatory factor in the recognition of herpes simplex virus type 1 by glial cells. J Neuroinflammation, 2011. **8**: p. 99.
- 148. DeFilippis, V.R., D. Alvarado, T. Sali, S. Rothenburg, and K. Fruh, *Human cytomegalovirus induces the interferon response via the DNA sensor ZBP1.* J Virol, 2010. **84**(1): p. 585-98.
- 149. DeFilippis, V.R., T. Sali, D. Alvarado, L. White, W. Bresnahan, and K.J. Fruh, *Activation of the interferon response by human cytomegalovirus occurs via cytoplasmic double-stranded DNA but not glycoprotein B.* J Virol, 2010. **84**(17): p. 8913-25.
- 150. Unterholzner, L., S.E. Keating, M. Baran, K.A. Horan, S.B. Jensen, S. Sharma, C.M. Sirois, T. Jin, E. Latz, T.S. Xiao, K.A. Fitzgerald, S.R. Paludan, and A.G. Bowie, *IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA*. Nat Immunol, 2010. **11**(11): p. 997-1004.
- 151. Gariano, G.R., V. Dell'Oste, M. Bronzini, D. Gatti, A. Luganini, M. De Andrea, G. Gribaudo, M. Gariglio, and S. Landolfo, *The intracellular DNA sensor IFI16 gene acts as restriction factor for human cytomegalovirus replication.* PLoS Pathog, 2012. **8**(1): p. e1002498.
- 152. Ishikawa, H. and G.N. Barber, *STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling.* Nature, 2008. **455**(7213): p. 674-8.
- 153. Tanaka, Y. and Z.J. Chen, STING specifies IRF3 phosphorylation by TBK1 in the cytosolic DNA signaling pathway. Sci Signal, 2012. **5**(214): p. ra20.
- 154. Cai, X., Y.H. Chiu, and Z.J. Chen, *The cGAS-cGAMP-STING Pathway of Cytosolic DNA Sensing and Signaling.* Mol Cell, 2014. **54**(2): p. 289-296.
- 155. Dunne, A. and L.A. O'Neill, *The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily:* signal transduction during inflammation and host defense. Sci STKE, 2003. **2003**(171): p. re3.
- 156. Hsu, H., J. Xiong, and D.V. Goeddel, *The TNF receptor 1-associated protein TRADD* signals cell death and NF-kappa B activation. Cell, 1995. **81**(4): p. 495-504.
- 157. Hsu, H., J. Huang, H.B. Shu, V. Baichwal, and D.V. Goeddel, *TNF-dependent* recruitment of the protein kinase *RIP* to the *TNF* receptor-1 signaling complex. Immunity, 1996. **4**(4): p. 387-96.
- 158. Shu, H.B., M. Takeuchi, and D.V. Goeddel, *The tumor necrosis factor receptor 2 signal transducers TRAF2 and c-IAP1 are components of the tumor necrosis factor receptor 1 signaling complex.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(24): p. 13973-8.
- 159. Tada, K., T. Okazaki, S. Sakon, T. Kobarai, K. Kurosawa, S. Yamaoka, H. Hashimoto, T.W. Mak, H. Yagita, K. Okumura, W.C. Yeh, and H. Nakano, *Critical roles of TRAF2 and TRAF5 in tumor necrosis factor-induced NF-kappa B activation and protection from cell death.* J Biol Chem, 2001. **276**(39): p. 36530-4.
- Workman, L.M. and H. Habelhah, *TNFR1 signaling kinetics: spatiotemporal control of three phases of IKK activation by posttranslational modification*. Cell Signal, 2013. 25(8): p. 1654-64.
- 161. Cabal-Hierro, L. and P.S. Lazo, *Signal transduction by tumor necrosis factor receptors*. Cell Signal, 2012. **24**(6): p. 1297-305.
- 162. Crough, T. and R. Khanna, *Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside.* Clin Microbiol Rev, 2009. **22**(1): p. 76-98, Table of Contents.
- 163. Krmpotic, A., I. Bubic, B. Polic, P. Lucin, and S. Jonjic, *Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection*. Microbes Infect, 2003. **5**(13): p. 1263-77.

- 164. Miller-Kittrell, M. and T.E. Sparer, *Feeling manipulated: cytomegalovirus immune manipulation.* Virol J, 2009. **6**: p. 4.
- 165. Spencer, J.V., K.M. Lockridge, P.A. Barry, G. Lin, M. Tsang, M.E. Penfold, and T.J. Schall, *Potent immunosuppressive activities of cytomegalovirus-encoded interleukin-10.* J Virol, 2002. **76**(3): p. 1285-92.
- Saederup, N., S.A. Aguirre, T.E. Sparer, D.M. Bouley, and E.S. Mocarski, *Murine cytomegalovirus CC chemokine homolog MCK-2 (m131-129) is a determinant of dissemination that increases inflammation at initial sites of infection.* J Virol, 2001. **75**(20): p. 9966-76.
- 167. Skaletskaya, A., L.M. Bartle, T. Chittenden, A.L. McCormick, E.S. Mocarski, and V.S. Goldmacher, *A cytomegalovirus-encoded inhibitor of apoptosis that suppresses caspase-8 activation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(14): p. 7829-34.
- 168. Menard, C., M. Wagner, Z. Ruzsics, K. Holak, W. Brune, A.E. Campbell, and U.H. Koszinowski, *Role of murine cytomegalovirus US22 gene family members in replication in macrophages.* J Virol, 2003. **77**(10): p. 5557-70.
- 169. McCormick, A.L., A. Skaletskaya, P.A. Barry, E.S. Mocarski, and V.S. Goldmacher, Differential function and expression of the viral inhibitor of caspase 8-induced apoptosis (vICA) and the viral mitochondria-localized inhibitor of apoptosis (vMIA) cell death suppressors conserved in primate and rodent cytomegaloviruses. Virology, 2003. **316**(2): p. 221-33.
- 170. Goldmacher, V.S., L.M. Bartle, A. Skaletskaya, C.A. Dionne, N.L. Kedersha, C.A. Vater, J.W. Han, R.J. Lutz, S. Watanabe, E.D. Cahir McFarland, E.D. Kieff, E.S. Mocarski, and T. Chittenden, *A cytomegalovirus-encoded mitochondria-localized inhibitor of apoptosis structurally unrelated to Bcl-2.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(22): p. 12536-41.
- 171. Arnoult, D., L.M. Bartle, A. Skaletskaya, D. Poncet, N. Zamzami, P.U. Park, J. Sharpe, R.J. Youle, and V.S. Goldmacher, *Cytomegalovirus cell death suppressor vMIA blocks Bax- but not Bak-mediated apoptosis by binding and sequestering Bax at mitochondria.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(21): p. 7988-93.
- 172. Karbowski, M., K.L. Norris, M.M. Cleland, S.Y. Jeong, and R.J. Youle, *Role of Bax and Bak in mitochondrial morphogenesis.* Nature, 2006. **443**(7112): p. 658-62.
- 173. Jurak, I., U. Schumacher, H. Simic, S. Voigt, and W. Brune, *Murine cytomegalovirus* m38.5 protein inhibits Bax-mediated cell death. J Virol, 2008. **82**(10): p. 4812-22.
- 174. Arnoult, D., A. Skaletskaya, J. Estaquier, C. Dufour, and V.S. Goldmacher, *The murine cytomegalovirus cell death suppressor m38.5 binds Bax and blocks Bax-mediated mitochondrial outer membrane permeabilization.* Apoptosis, 2008. **13**(9): p. 1100-10.
- 175. Cam, M., W. Handke, M. Picard-Maureau, and W. Brune, *Cytomegaloviruses inhibit Bak- and Bax-mediated apoptosis with two separate viral proteins.* Cell Death Differ, 2010. **17**(4): p. 655-65.
- 176. Yurochko, A.D., T.F. Kowalik, S.M. Huong, and E.S. Huang, *Human cytomegalovirus* upregulates *NF-kappa B activity by transactivating the NF-kappa B p105/p50 and p65* promoters. J Virol, 1995. **69**(9): p. 5391-400.
- 177. Yurochko, A.D., E.S. Hwang, L. Rasmussen, S. Keay, L. Pereira, and E.S. Huang, The human cytomegalovirus UL55 (gB) and UL75 (gH) glycoprotein ligands initiate the rapid activation of Sp1 and NF-kappaB during infection. J Virol, 1997. **71**(7): p. 5051-9.
- 178. Compton, T., E.A. Kurt-Jones, K.W. Boehme, J. Belko, E. Latz, D.T. Golenbock, and R.W. Finberg, *Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2.* J Virol, 2003. **77**(8): p. 4588-96.
- Nogalski, M.T., J.P. Podduturi, I.B. DeMeritt, L.E. Milford, and A.D. Yurochko, *The human cytomegalovirus virion possesses an activated casein kinase II that allows for the rapid phosphorylation of the inhibitor of NF-kappaB, IkappaBalpha.* J Virol, 2007. 81(10): p. 5305-14.

- 180. DeMeritt, I.B., L.E. Milford, and A.D. Yurochko, *Activation of the NF-kappaB pathway in human cytomegalovirus-infected cells is necessary for efficient transactivation of the major immediate-early promoter.* J Virol, 2004. **78**(9): p. 4498-507.
- 181. Yurochko, A.D., M.W. Mayo, E.E. Poma, A.S. Baldwin, Jr., and E.S. Huang, *Induction* of the transcription factor Sp1 during human cytomegalovirus infection mediates upregulation of the p65 and p105/p50 NF-kappaB promoters. J Virol, 1997. **71**(6): p. 4638-48.
- 182. Sambucetti, L.C., J.M. Cherrington, G.W. Wilkinson, and E.S. Mocarski, *NF-kappa B* activation of the cytomegalovirus enhancer is mediated by a viral transactivator and by *T* cell stimulation. EMBO J, 1989. **8**(13): p. 4251-8.
- 183. Murayama, T., N. Mukaida, H. Sadanari, N. Yamaguchi, K.S. Khabar, J. Tanaka, K. Matsushima, S. Mori, and Y. Eizuru, *The immediate early gene 1 product of human cytomegalovirus is sufficient for up-regulation of interleukin-8 gene expression.* Biochem Biophys Res Commun, 2000. **279**(1): p. 298-304.
- 184. Poole, E., C.A. King, J.H. Sinclair, and A. Alcami, *The UL144 gene product of human cytomegalovirus activates NFkappaB via a TRAF6-dependent mechanism.* EMBO J, 2006. **25**(18): p. 4390-9.
- 185. Poole, E., I. Groves, A. MacDonald, Y. Pang, A. Alcami, and J. Sinclair, *Identification* of *TRIM23* as a cofactor involved in the regulation of *NF-kappaB* by human cytomegalovirus. J Virol, 2009. **83**(8): p. 3581-90.
- 186. Casarosa, P., R.A. Bakker, D. Verzijl, M. Navis, H. Timmerman, R. Leurs, and M.J. Smit, *Constitutive signaling of the human cytomegalovirus-encoded chemokine receptor US28.* J Biol Chem, 2001. **276**(2): p. 1133-7.
- 187. Boomker, J.M., T.H. The, L.F. de Leij, and M.C. Harmsen, *The human cytomegalovirus-encoded receptor US28 increases the activity of the major immediate-early promoter/enhancer.* Virus Res, 2006. **118**(1-2): p. 196-200.
- 188. Le, V.T., M. Trilling, A. Zimmermann, and H. Hengel, *Mouse cytomegalovirus inhibits* beta interferon (*IFN-beta*) gene expression and controls activation pathways of the *IFN-beta enhanceosome*. J Gen Virol, 2008. **89**(Pt 5): p. 1131-41.
- 189. Marcinowski, L., M. Lidschreiber, L. Windhager, M. Rieder, J.B. Bosse, B. Radle, T. Bonfert, I. Gyory, M. de Graaf, O. Prazeres da Costa, P. Rosenstiel, C.C. Friedel, R. Zimmer, Z. Ruzsics, and L. Dolken, *Real-time transcriptional profiling of cellular and viral gene expression during lytic cytomegalovirus infection.* PLoS Pathog, 2012. 8(9): p. e1002908.
- 190. Gribaudo, G., S. Ravaglia, L. Guandalini, R. Cavallo, M. Gariglio, and S. Landolfo, *The murine cytomegalovirus immediate-early 1 protein stimulates NF-kappa B activity by transactivating the NF-kappa B p105/p50 promoter.* Virus Res, 1996. **45**(1): p. 15-27.
- 191. Waldhoer, M., T.N. Kledal, H. Farrell, and T.W. Schwartz, *Murine cytomegalovirus* (*CMV*) M33 and human CMV US28 receptors exhibit similar constitutive signaling activities. J Virol, 2002. **76**(16): p. 8161-8.
- 192. Benedict, C.A., A. Angulo, G. Patterson, S. Ha, H. Huang, M. Messerle, C.F. Ware, and P. Ghazal, *Neutrality of the canonical NF-kappaB-dependent pathway for human and murine cytomegalovirus transcription and replication in vitro.* J Virol, 2004. **78**(2): p. 741-50.
- 193. Eickhoff, J.E. and M. Cotten, *NF-kappaB activation can mediate inhibition of human cytomegalovirus replication.* J Gen Virol, 2005. **86**(Pt 2): p. 285-95.
- 194. DeMeritt, I.B., J.P. Podduturi, A.M. Tilley, M.T. Nogalski, and A.D. Yurochko, Prolonged activation of NF-kappaB by human cytomegalovirus promotes efficient viral replication and late gene expression. Virology, 2006. **346**(1): p. 15-31.
- 195. Caposio, P., A. Luganini, M. Bronzini, S. Landolfo, and G. Gribaudo, The Elk-1 and serum response factor binding sites in the major immediate-early promoter of human cytomegalovirus are required for efficient viral replication in quiescent cells and compensate for inactivation of the NF-kappaB sites in proliferating cells. J Virol, 2010. 84(9): p. 4481-93.

- 196. Isern, E., M. Gustems, M. Messerle, E. Borst, P. Ghazal, and A. Angulo, *The activator* protein 1 binding motifs within the human cytomegalovirus major immediate-early enhancer are functionally redundant and act in a cooperative manner with the NF-{kappa}B sites during acute infection. J Virol, 2011. **85**(4): p. 1732-46.
- 197. Caposio, P., A. Luganini, G. Hahn, S. Landolfo, and G. Gribaudo, Activation of the virus-induced IKK/NF-kappaB signalling axis is critical for the replication of human cytomegalovirus in quiescent cells. Cell Microbiol, 2007. **9**(8): p. 2040-54.
- 198. Montag, C., J. Wagner, I. Gruska, and C. Hagemeier, *Human cytomegalovirus blocks tumor necrosis factor alpha- and interleukin-1beta-mediated NF-kappaB signaling.* J Virol, 2006. **80**(23): p. 11686-98.
- 199. Jarvis, M.A., J.A. Borton, A.M. Keech, J. Wong, W.J. Britt, B.E. Magun, and J.A. Nelson, *Human cytomegalovirus attenuates interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha proinflammatory signaling by inhibition of NF-kappaB activation.* J Virol, 2006. **80**(11): p. 5588-98.
- 200. Baillie, J., D.A. Sahlender, and J.H. Sinclair, *Human cytomegalovirus infection inhibits tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) signaling by targeting the 55-kilodalton TNF-alpha receptor.* J Virol, 2003. **77**(12): p. 7007-16.
- Nachtwey, J. and J.V. Spencer, HCMV IL-10 suppresses cytokine expression in monocytes through inhibition of nuclear factor-kappaB. Viral Immunol, 2008. 21(4): p. 477-82.
- 202. Taylor, R.T. and W.A. Bresnahan, *Human cytomegalovirus IE86 attenuates virus- and tumor necrosis factor alpha-induced NFkappaB-dependent gene expression.* J Virol, 2006. **80**(21): p. 10763-71.
- Gealy, C., C. Humphreys, V. Dickinson, M. Stinski, and R. Caswell, An activationdefective mutant of the human cytomegalovirus IE2p86 protein inhibits NF-kappaBmediated stimulation of the human interleukin-6 promoter. J Gen Virol, 2007. 88(Pt 9): p. 2435-40.
- 204. Mack, C., A. Sickmann, D. Lembo, and W. Brune, *Inhibition of proinflammatory and innate immune signaling pathways by a cytomegalovirus RIP1-interacting protein.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(8): p. 3094-9.
- 205. Fliss, P.M., T.P. Jowers, M.M. Brinkmann, B. Holstermann, C. Mack, P. Dickinson, H. Hohenberg, P. Ghazal, and W. Brune, *Viral mediated redirection of NEMO/IKKgamma to autophagosomes curtails the inflammatory cascade.* PLoS Pathog, 2012. **8**(2): p. e1002517.
- 206. Rawlinson, W.D., H.E. Farrell, and B.G. Barrell, *Analysis of the complete DNA sequence of murine cytomegalovirus.* J Virol, 1996. **70**(12): p. 8833-49.
- 207. Lembo, D. and W. Brune, *Tinkering with a viral ribonucleotide reductase*. Trends Biochem Sci, 2009. **34**(1): p. 25-32.
- 208. Lembo, D., M. Donalisio, A. Hofer, M. Cornaglia, W. Brune, U. Koszinowski, L. Thelander, and S. Landolfo, *The ribonucleotide reductase R1 homolog of murine cytomegalovirus is not a functional enzyme subunit but is required for pathogenesis.* J Virol, 2004. **78**(8): p. 4278-88.
- 209. Vanlangenakker, N., T. Vanden Berghe, and P. Vandenabeele, *Many stimuli pull the necrotic trigger, an overview.* Cell Death Differ, 2012. **19**(1): p. 75-86.
- 210. Upton, J.W., W.J. Kaiser, and E.S. Mocarski, *DAI/ZBP1/DLM-1 complexes with RIP3* to mediate virus-induced programmed necrosis that is targeted by murine cytomegalovirus vIRA. Cell Host Microbe, 2012. **11**(3): p. 290-7.
- 211. Moriwaki, K. and F.K. Chan, *RIP3: a molecular switch for necrosis and inflammation.* Genes Dev, 2013. **27**(15): p. 1640-9.
- 212. Mocarski, E.S., W.J. Kaiser, D. Livingston-Rosanoff, J.W. Upton, and L.P. Daley-Bauer, *True grit: programmed necrosis in antiviral host defense, inflammation, and immunogenicity.* J Immunol, 2014. **192**(5): p. 2019-26.
- 213. Upton, J.W., W.J. Kaiser, and E.S. Mocarski, *Cytomegalovirus M45 cell death* suppression requires receptor-interacting protein (*RIP*) homotypic interaction motif (*RHIM*)-dependent interaction with *RIP1*. J Biol Chem, 2008. **283**(25): p. 16966-70.

- 214. Upton, J.W., W.J. Kaiser, and E.S. Mocarski, *Virus inhibition of RIP3-dependent necrosis.* Cell Host Microbe, 2010. **7**(4): p. 302-13.
- 215. Adachi, O., T. Kawai, K. Takeda, M. Matsumoto, H. Tsutsui, M. Sakagami, K. Nakanishi, and S. Akira, *Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function.* Immunity, 1998. **9**(1): p. 143-50.
- 216. Li, Z.W., W. Chu, Y. Hu, M. Delhase, T. Deerinck, M. Ellisman, R. Johnson, and M. Karin, *The IKKbeta subunit of IkappaB kinase (IKK) is essential for nuclear factor kappaB activation and prevention of apoptosis.* J Exp Med, 1999. **189**(11): p. 1839-45.
- 217. Swift, S., J. Lorens, P. Achacoso, and G.P. Nolan, *Rapid production of retroviruses for efficient gene delivery to mammalian cells using 293T cell-based systems.* Curr Protoc Immunol, 2001. **Chapter 10**: p. Unit 10 17C.
- Kelliher, M.A., S. Grimm, Y. Ishida, F. Kuo, B.Z. Stanger, and P. Leder, *The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF-kappaB signal.* Immunity, 1998. 8(3): p. 297-303.
- 219. Newton, K., X. Sun, and V.M. Dixit, *Kinase RIP3 is dispensable for normal NF-kappa Bs, signaling by the B-cell and T-cell receptors, tumor necrosis factor receptor 1, and Toll-like receptors 2 and 4.* Mol Cell Biol, 2004. **24**(4): p. 1464-9.
- 220. Henneke, P., O. Takeuchi, R. Malley, E. Lien, R.R. Ingalls, M.W. Freeman, T. Mayadas, V. Nizet, S. Akira, D.L. Kasper, and D.T. Golenbock, *Cellular activation, phagocytosis, and bactericidal activity against group B streptococcus involve parallel myeloid differentiation factor 88-dependent and independent signaling pathways.* J Immunol, 2002. **169**(7): p. 3970-7.
- Alexopoulou, L., A.C. Holt, R. Medzhitov, and R.A. Flavell, *Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3.* Nature, 2001. 413(6857): p. 732-8.
- 222. Peschon, J.J., D.S. Torrance, K.L. Stocking, M.B. Glaccum, C. Otten, C.R. Willis, K. Charrier, P.J. Morrissey, C.B. Ware, and K.M. Mohler, *TNF receptor-deficient mice reveal divergent roles for p55 and p75 in several models of inflammation.* J Immunol, 1998. **160**(2): p. 943-52.
- 223. Lomaga, M.A., W.C. Yeh, I. Sarosi, G.S. Duncan, C. Furlonger, A. Ho, S. Morony, C. Capparelli, G. Van, S. Kaufman, A. van der Heiden, A. Itie, A. Wakeham, W. Khoo, T. Sasaki, Z. Cao, J.M. Penninger, C.J. Paige, D.L. Lacey, C.R. Dunstan, W.J. Boyle, D.V. Goeddel, and T.W. Mak, *TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling.* Genes Dev, 1999. **13**(8): p. 1015-24.
- 224. Hoebe, K., X. Du, P. Georgel, E. Janssen, K. Tabeta, S.O. Kim, J. Goode, P. Lin, N. Mann, S. Mudd, K. Crozat, S. Sovath, J. Han, and B. Beutler, *Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling.* Nature, 2003. **424**(6950): p. 743-8.
- 225. Wagner, M., S. Jonjic, U.H. Koszinowski, and M. Messerle, Systematic excision of vector sequences from the BAC-cloned herpesvirus genome during virus reconstitution. J Virol, 1999. **73**(8): p. 7056-60.
- 226. Jordan, S., J. Krause, A. Prager, M. Mitrovic, S. Jonjic, U.H. Koszinowski, and B. Adler, *Virus progeny of murine cytomegalovirus bacterial artificial chromosome pSM3fr show reduced growth in salivary Glands due to a fixed mutation of MCK-2.* J Virol, 2011. **85**(19): p. 10346-53.
- 227. Tischer, B.K., G.A. Smith, and N. Osterrieder, *En passant mutagenesis: a two step markerless red recombination system.* Methods Mol Biol, 2010. **634**: p. 421-30.
- 228. Mohr, H., C.A. Mohr, M.R. Schneider, L. Scrivano, B. Adler, S. Kraner-Schreiber, A. Schnieke, M. Dahlhoff, E. Wolf, U.H. Koszinowski, and Z. Ruzsics, *Cytomegalovirus replicon-based regulation of gene expression in vitro and in vivo.* PLoS Pathog, 2012. **8**(6): p. e1002728.
- 229. Tischer, B.K., J. von Einem, B. Kaufer, and N. Osterrieder, *Two-step red-mediated recombination for versatile high-efficiency markerless DNA manipulation in Escherichia coli.* Biotechniques, 2006. **40**(2): p. 191-7.

- 230. Ishida, T., S. Mizushima, S. Azuma, N. Kobayashi, T. Tojo, K. Suzuki, S. Aizawa, T. Watanabe, G. Mosialos, E. Kieff, T. Yamamoto, and J. Inoue, *Identification of TRAF6, a novel tumor necrosis factor receptor-associated factor protein that mediates signaling from an amino-terminal domain of the CD40 cytoplasmic region.* J Biol Chem, 1996. **271**(46): p. 28745-8.
- 231. Birnboim, H.C. and J. Doly, *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. Nucleic Acids Res, 1979. **7**(6): p. 1513-23.
- 232. Radle, B., A.J. Rutkowski, Z. Ruzsics, C.C. Friedel, U.H. Koszinowski, and L. Dolken, Metabolic labeling of newly transcribed RNA for high resolution gene expression profiling of RNA synthesis, processing and decay in cell culture. J Vis Exp, 2013(78).
- 233. Mahy, B. and K. HO., *Virology methods manual.* 1996: Academic Press, San Diego, CA.
- 234. Osborn, J.E. and D.L. Walker, *Enhancement of infectivity of murine cytomegalovirus in vitro by centrifugal inoculation.* J Virol, 1968. **2**(9): p. 853-8.
- 235. Talbot, P. and J.D. Almeida, *Human cytomegalovirus: purification of enveloped virions and dense bodies.* J Gen Virol, 1977. **36**(2): p. 345-9.
- 236. Gallagher, S.R., *One-dimensional SDS gel electrophoresis of proteins.* Curr Protoc Mol Biol, 2006. **Chapter 10**: p. Unit 10 2A.
- 237. Jurak, I. and W. Brune, *Induction of apoptosis limits cytomegalovirus cross-species infection.* EMBO J, 2006. **25**(11): p. 2634-42.
- 238. Brownell, J., J. Bruckner, J. Wagoner, E. Thomas, Y.M. Loo, M. Gale, Jr., T.J. Liang, and S.J. Polyak, *Direct, Interferon-Independent Activation of the CXCL10 Promoter by NF-kappaB and Interferon Regulatory Factor 3 during Hepatitis C Virus Infection.* J Virol, 2014. **88**(3): p. 1582-90.
- 239. Kattenhorn, L.M., R. Mills, M. Wagner, A. Lomsadze, V. Makeev, M. Borodovsky, H.L. Ploegh, and B.M. Kessler, *Identification of proteins associated with murine cytomegalovirus virions.* J Virol, 2004. **78**(20): p. 11187-97.
- 240. Cai, M., M. Li, K. Wang, S. Wang, Q. Lu, J. Yan, K.L. Mossman, R. Lin, and C. Zheng, *The herpes simplex virus 1-encoded envelope glycoprotein B activates NF-kappaB through the Toll-like receptor 2 and MyD88/TRAF6-dependent signaling pathway.* PLoS One, 2013. **8**(1): p. e54586.
- 241. Ariza, M.E., R. Glaser, P.T. Kaumaya, C. Jones, and M.V. Williams, *The EBV-encoded dUTPase activates NF-kappa B through the TLR2 and MyD88-dependent signaling pathway.* J Immunol, 2009. **182**(2): p. 851-9.
- 242. Kurt-Jones, E.A., F. Sandor, Y. Ortiz, G.N. Bowen, S.L. Counter, T.C. Wang, and R.W. Finberg, *Use of murine embryonic fibroblasts to define Toll-like receptor activation and specificity.* J Endotoxin Res, 2004. **10**(6): p. 419-24.
- 243. Zanoni, I. and F. Granucci, *Role of CD14 in host protection against infections and in metabolism regulation.* Front Cell Infect Microbiol, 2013. **3**: p. 32.
- 244. van Bergenhenegouwen, J., T.S. Plantinga, L.A. Joosten, M.G. Netea, G. Folkerts, A.D. Kraneveld, J. Garssen, and A.P. Vos, *TLR2 & Co: a critical analysis of the complex interactions between TLR2 and coreceptors.* J Leukoc Biol, 2013. **94**(5): p. 885-902.
- 245. Gianni, T., V. Leoni, and G. Campadelli-Fiume, *Type I interferon and NF-kappaB* activation elicited by herpes simplex virus gH/gL via alphavbeta3 integrin in epithelial and neuronal cell lines. J Virol, 2013. **87**(24): p. 13911-6.
- 246. Zanoni, I., R. Ostuni, L.R. Marek, S. Barresi, R. Barbalat, G.M. Barton, F. Granucci, and J.C. Kagan, *CD14 controls the LPS-induced endocytosis of Toll-like receptor 4.* Cell, 2011. **147**(4): p. 868-80.
- 247. Hodivala-Dilke, K.M., K.P. McHugh, D.A. Tsakiris, H. Rayburn, D. Crowley, M. Ullman-Cullere, F.P. Ross, B.S. Coller, S. Teitelbaum, and R.O. Hynes, *Beta3-integrin-deficient mice are a model for Glanzmann thrombasthenia showing placental defects and reduced survival.* J Clin Invest, 1999. **103**(2): p. 229-38.
- 248. Scrivano, L., J. Esterlechner, H. Muhlbach, N. Ettischer, C. Hagen, K. Grunewald, C.A. Mohr, Z. Ruzsics, U. Koszinowski, and B. Adler, *The m74 gene product of*

murine cytomegalovirus (MCMV) is a functional homolog of human CMV gO and determines the entry pathway of MCMV. J Virol, 2010. **84**(9): p. 4469-80.

- 249. Nogalski, M.T., G.C. Chan, E.V. Stevenson, D.K. Collins-McMillen, and A.D. Yurochko, *The HCMV gH/gL/UL128-131 complex triggers the specific cellular activation required for efficient viral internalization into target monocytes.* PLoS Pathog, 2013. **9**(7): p. e1003463.
- 250. Wagner, F.M., I. Brizic, A. Prager, T. Trsan, M. Arapovic, N.A. Lemmermann, J. Podlech, M.J. Reddehase, F. Lemnitzer, J.B. Bosse, M. Gimpfl, L. Marcinowski, M. MacDonald, H. Adler, U.H. Koszinowski, and B. Adler, *The viral chemokine MCK-2 of murine cytomegalovirus promotes infection as part of a gH/gL/MCK-2 complex.* PLoS Pathog, 2013. **9**(7): p. e1003493.
- 251. Poyet, J.L., S.M. Srinivasula, J.H. Lin, T. Fernandes-Alnemri, S. Yamaoka, P.N. Tsichlis, and E.S. Alnemri, *Activation of the Ikappa B kinases by RIP via IKKgamma /NEMO-mediated oligomerization.* J Biol Chem, 2000. **275**(48): p. 37966-77.
- 252. Inohara, N., T. Koseki, J. Lin, L. del Peso, P.C. Lucas, F.F. Chen, Y. Ogura, and G. Nunez, *An induced proximity model for NF-kappa B activation in the Nod1/RICK and RIP signaling pathways.* J Biol Chem, 2000. **275**(36): p. 27823-31.
- 253. Yamaoka, S., G. Courtois, C. Bessia, S.T. Whiteside, R. Weil, F. Agou, H.E. Kirk, R.J. Kay, and A. Israel, *Complementation cloning of NEMO, a component of the IkappaB kinase complex essential for NF-kappaB activation.* Cell, 1998. **93**(7): p. 1231-40.
- 254. Clark, K., S. Nanda, and P. Cohen, *Molecular control of the NEMO family of ubiquitinbinding proteins.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2013. **14**(10): p. 673-85.
- 255. Ivins, F.J., M.G. Montgomery, S.J. Smith, A.C. Morris-Davies, I.A. Taylor, and K. Rittinger, *NEMO oligomerization and its ubiquitin-binding properties.* Biochem J, 2009. **421**(2): p. 243-51.
- 256. Zhang, S.Q., A. Kovalenko, G. Cantarella, and D. Wallach, *Recruitment of the IKK signalosome to the p55 TNF receptor: RIP and A20 bind to NEMO (IKKgamma) upon receptor stimulation.* Immunity, 2000. **12**(3): p. 301-11.
- 257. Bist, P., S.C. Leow, Q.H. Phua, S. Shu, Q. Zhuang, W.T. Loh, T.H. Nguyen, J.B. Zhou, S.C. Hooi, and L.H. Lim, *Annexin-1 interacts with NEMO and RIP1 to constitutively activate IKK complex and NF-kappaB: implication in breast cancer metastasis.* Oncogene, 2011. **30**(28): p. 3174-85.
- 258. Field, N., W. Low, M. Daniels, S. Howell, L. Daviet, C. Boshoff, and M. Collins, *KSHV vFLIP binds to IKK-gamma to activate IKK.* J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 18): p. 3721-8.
- 259. Xiao, G., E.W. Harhaj, and S.C. Sun, *Domain-specific interaction with the I kappa B kinase (IKK)regulatory subunit IKK gamma is an essential step in tax-mediated activation of IKK*. J Biol Chem, 2000. **275**(44): p. 34060-7.
- 260. Poyet, J.L., S.M. Srinivasula, and E.S. Alnemri, *vCLAP, a caspase-recruitment* domain-containing protein of equine Herpesvirus-2, persistently activates the Ikappa *B kinases through oligomerization of IKKgamma.* J Biol Chem, 2001. **276**(5): p. 3183-7.
- 261. Bagneris, C., A.V. Ageichik, N. Cronin, B. Wallace, M. Collins, C. Boshoff, G. Waksman, and T. Barrett, *Crystal structure of a vFlip-IKKgamma complex: insights into viral activation of the IKK signalosome.* Mol Cell, 2008. **30**(5): p. 620-31.
- 262. Xiao, G. and S.C. Sun, Activation of IKKalpha and IKKbeta through their fusion with HTLV-I tax protein. Oncogene, 2000. **19**(45): p. 5198-203.
- 263. Challa, S., M. Woelfel, M. Guildford, D. Moquin, and F.K. Chan, Viral cell death inhibitor MC159 enhances innate immunity against vaccinia virus infection. J Virol, 2010. **84**(20): p. 10467-76.
- 264. Rahman, M.M. and G. McFadden, *Modulation of NF-kappaB signalling by microbial pathogens*. Nat Rev Microbiol, 2011. **9**(4): p. 291-306.
- 265. Hiscott, J., T.L. Nguyen, M. Arguello, P. Nakhaei, and S. Paz, *Manipulation of the nuclear factor-kappaB pathway and the innate immune response by viruses.* Oncogene, 2006. **25**(51): p. 6844-67.

- 266. Jin, H., Y. Ma, Z. Yan, B.S. Prabhakar, and B. He, Activation of NF-kappaB in CD8+ dendritic cells Ex Vivo by the gamma134.5 null mutant correlates with immunity against herpes simplex virus 1. J Virol, 2012. **86**(2): p. 1059-68.
- Wang, J., S.H. Basagoudanavar, X. Wang, E. Hopewell, R. Albrecht, A. Garcia-Sastre, S. Balachandran, and A.A. Beg, *NF-kappa B RelA subunit is crucial for early IFN-beta expression and resistance to RNA virus replication.* J Immunol, 2010. 185(3): p. 1720-9.
- 268. Rubio, D., R.H. Xu, S. Remakus, T.E. Krouse, M.E. Truckenmiller, R.J. Thapa, S. Balachandran, A. Alcami, C.C. Norbury, and L.J. Sigal, *Crosstalk between the type 1 interferon and nuclear factor kappa B pathways confers resistance to a lethal virus infection.* Cell Host Microbe, 2013. **13**(6): p. 701-10.
- 269. Haase, A.T., *Targeting early infection to prevent HIV-1 mucosal transmission.* Nature, 2010. **464**(7286): p. 217-23.
- 270. Li, Q., J.D. Estes, P.M. Schlievert, L. Duan, A.J. Brosnahan, P.J. Southern, C.S. Reilly, M.L. Peterson, N. Schultz-Darken, K.G. Brunner, K.R. Nephew, S. Pambuccian, J.D. Lifson, J.V. Carlis, and A.T. Haase, *Glycerol monolaurate prevents mucosal SIV transmission.* Nature, 2009. **458**(7241): p. 1034-8.
- 271. Chan, J.K. and W.C. Greene, *Dynamic roles for NF-kappaB in HTLV-I and HIV-1 retroviral pathogenesis.* Immunol Rev, 2012. **246**(1): p. 286-310.
- 272. Santoro, M.G., A. Rossi, and C. Amici, *NF-kappaB and virus infection: who controls whom.* EMBO J, 2003. **22**(11): p. 2552-60.
- 273. Schwarz, E.M., C. Badorff, T.S. Hiura, R. Wessely, A. Badorff, I.M. Verma, and K.U. Knowlton, *NF-kappaB-mediated inhibition of apoptosis is required for encephalomyocarditis virus virulence: a mechanism of resistance in p50 knockout mice.* J Virol, 1998. **72**(7): p. 5654-60.
- Kwon, H., N. Pelletier, C. DeLuca, P. Genin, S. Cisternas, R. Lin, M.A. Wainberg, and J. Hiscott, *Inducible expression of IkappaBalpha repressor mutants interferes with NF-kappaB activity and HIV-1 replication in Jurkat T cells.* J Biol Chem, 1998.
 273(13): p. 7431-40.
- 275. Marianneau, P., A. Cardona, L. Edelman, V. Deubel, and P. Despres, *Dengue virus* replication in human hepatoma cells activates *NF-kappaB* which in turn induces apoptotic cell death. J Virol, 1997. **71**(4): p. 3244-9.
- 276. Danthi, P., G.H. Holm, T. Stehle, and T.S. Dermody, *Reovirus receptors, cell entry, and proapoptotic signaling.* Adv Exp Med Biol, 2013. **790**: p. 42-71.
- 277. Sun, S.C. and E. Cesarman, *NF-kappaB as a target for oncogenic viruses.* Curr Top Microbiol Immunol, 2011. **349**: p. 197-244.
- 278. Amici, C., G. Belardo, A. Rossi, and M.G. Santoro, *Activation of I kappa b kinase by herpes simplex virus type 1. A novel target for anti-herpetic therapy.* J Biol Chem, 2001. **276**(31): p. 28759-66.
- 279. Konrad, A., E. Wies, M. Thurau, G. Marquardt, E. Naschberger, S. Hentschel, R. Jochmann, T.F. Schulz, H. Erfle, B. Brors, B. Lausen, F. Neipel, and M. Sturzl, *A systems biology approach to identify the combination effects of human herpesvirus 8 genes on NF-kappaB activation.* J Virol, 2009. **83**(6): p. 2563-74.
- Lagos, D., M.W. Trotter, R.J. Vart, H.W. Wang, N.C. Matthews, A. Hansen, O. Flore, F. Gotch, and C. Boshoff, *Kaposi sarcoma herpesvirus-encoded vFLIP and vIRF1 regulate antigen presentation in lymphatic endothelial cells*. Blood, 2007. **109**(4): p. 1550-8.
- 281. Zhu, N., A. Khoshnan, R. Schneider, M. Matsumoto, G. Dennert, C. Ware, and M.M. Lai, *Hepatitis C virus core protein binds to the cytoplasmic domain of tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 and enhances TNF-induced apoptosis.* J Virol, 1998. **72**(5): p. 3691-7.
- 282. You, L.R., C.M. Chen, and Y.H. Lee, *Hepatitis C virus core protein enhances NF-kappaB signal pathway triggering by lymphotoxin-beta receptor ligand and tumor necrosis factor alpha.* J Virol, 1999. **73**(2): p. 1672-81.

- 283. Chung, Y.M., K.J. Park, S.Y. Choi, S.B. Hwang, and S.Y. Lee, *Hepatitis C virus core* protein potentiates *TNF-alpha-induced NF-kappaB activation through TRAF2-IKKbeta-dependent pathway.* Biochem Biophys Res Commun, 2001. **284**(1): p. 15-9.
- 284. Yoshida, H., N. Kato, Y. Shiratori, M. Otsuka, S. Maeda, J. Kato, and M. Omata, Hepatitis C virus core protein activates nuclear factor kappa B-dependent signaling through tumor necrosis factor receptor-associated factor. J Biol Chem, 2001. **276**(19): p. 16399-405.
- 285. Shrivastava, A., S.K. Manna, R. Ray, and B.B. Aggarwal, *Ectopic expression of hepatitis C virus core protein differentially regulates nuclear transcription factors.* J Virol, 1998. **72**(12): p. 9722-8.
- 286. Joo, M., Y.S. Hahn, M. Kwon, R.T. Sadikot, T.S. Blackwell, and J.W. Christman, Hepatitis C virus core protein suppresses NF-kappaB activation and cyclooxygenase-2 expression by direct interaction with IkappaB kinase beta. J Virol, 2005. **79**(12): p. 7648-57.
- 287. Ray, R.B., R. Steele, A. Basu, K. Meyer, M. Majumder, A.K. Ghosh, and R. Ray, *Distinct functional role of Hepatitis C virus core protein on NF-kappaB regulation is linked to genomic variation.* Virus Res, 2002. **87**(1): p. 21-9.
- 288. Mann, E.A., S. Stanford, and K.E. Sherman, *Prevalence of mutations in hepatitis C virus core protein associated with alteration of NF-kappaB activation.* Virus Res, 2006. **121**(1): p. 51-7.
- 289. Hargett, D., S. Rice, and S.L. Bachenheimer, *Herpes simplex virus type 1 ICP27dependent activation of NF-kappaB.* J Virol, 2006. **80**(21): p. 10565-78.
- 290. Kim, J.C., S.Y. Lee, S.Y. Kim, J.K. Kim, H.J. Kim, H.M. Lee, M.S. Choi, J.S. Min, M.J. Kim, H.S. Choi, and J.K. Ahn, *HSV-1 ICP27 suppresses NF-kappaB activity by stabilizing IkappaBalpha.* FEBS Lett, 2008. **582**(16): p. 2371-6.
- 291. Randall, C.M., J.A. Jokela, and J.L. Shisler, *The MC159 protein from the molluscum contagiosum poxvirus inhibits NF-kappaB activation by interacting with the lkappaB kinase complex*. J Immunol, 2012. **188**(5): p. 2371-9.
- 292. Nichols, D.B. and J.L. Shisler, *The MC160 protein expressed by the dermatotropic poxvirus molluscum contagiosum virus prevents tumor necrosis factor alpha-induced NF-kappaB activation via inhibition of I kappa kinase complex formation.* J Virol, 2006. **80**(2): p. 578-86.
- 293. Murao, L.E. and J.L. Shisler, *The MCV MC159 protein inhibits late, but not early, events of TNF-alpha-induced NF-kappaB activation.* Virology, 2005. **340**(2): p. 255-64.
- 294. Chaudhary, P.M., A. Jasmin, M.T. Eby, and L. Hood, *Modulation of the NF-kappa B* pathway by virally encoded death effector domains-containing proteins. Oncogene, 1999. **18**(42): p. 5738-46.
- 295. Gribaudo, G., S. Ravaglia, M. Gaboli, M. Gariglio, R. Cavallo, and S. Landolfo, Interferon-alpha inhibits the murine cytomegalovirus immediate-early gene expression by down-regulating NF-kappa B activity. Virology, 1995. **211**(1): p. 251-60.
- 296. Giorgetti, L., T. Siggers, G. Tiana, G. Caprara, S. Notarbartolo, T. Corona, M. Pasparakis, P. Milani, M.L. Bulyk, and G. Natoli, *Noncooperative interactions between transcription factors and clustered DNA binding sites enable graded transcriptional responses to environmental inputs.* Mol Cell, 2010. **37**(3): p. 418-28.

6 Anhang

6.1 Publikationen und Vorträge

Publikationen:

Handke W, Krause E, Brune W.

Live or let die: manipulation of cellular suicide programs by murine cytomegalovirus Med Microbiol Immunol. 2012 Nov;201(4):475-86

Eva Krause, Miranda de Graaf, Patricia Fliss, Lars Dölken, Wolfram Brune Murine cytomegalovirus virion-associated protein M45 mediates rapid NF-κB activation after infection akzeptiert zur Publikation bei J Virol., Juni 2014

Vorträge:

Eva Krause, Patricia Fliss, Lars Dölken, and Wolfram Brune Dual role of the murine cytomegalovirus protein M45 in regulating NF-κB activation during viral infection

23. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie (GfV), Kiel, März 2013

Eva Krause, Patricia Fliss, Lars Dölken, and Wolfram Brune Dual role of the murine cytomegalovirus protein M45 in regulating NF-κB activation during viral infection

8th Mini-Herpesvirus Workshop, Robert Koch Institute, Berlin, September 2013

Eva Krause, Miranda de Graaf, Patricia Fliss, Lars Dölken, and Wolfram Brune Murine cytomegalovirus virion-associated protein M45 induces NF-kB activation immediately after infection

24. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie (GfV), Alpbach, März 2014

6.2 Abkürzungen

AIDS	Aquired Immune Deficiency Syndrome		
AP-1	Aktivatorprotein-1		
cGAS	cyclic-GMP-AMP synthase		
cGAMP	cyclic-GMP-AMP		
cIAP	cellular inhibitor of apoptosis		
CMV	Cytomegalovirus		
DAI	DNA-dependent activator of IRFs		
DD	death domain		
dsDNA	doppelsträngige DNA		
dsRNA	doppelsträngige RNA		
E	Early		
EBV	Epstein-Barr-Virus		
EMCV	Encephalomyocarditis-Virus		
ER	Endoplasmatisches Retikulum		
FADD	Fas-associated death domain protein		
GFP	grün fluoreszierendes Protein		
HAART	hochaktive antiretrovirale Therapie		
HBV	Hepatitis B-Virus		
HCMV	humanes Cytomegalovirus		
HCV	Hepatitis C-Virus		
HIV	Humanes Immundefizienzvirus		
hpi	hours postinfection		
HSV	Herpes-simplex-Virus		
HTLV	Humanes T-Zell-Leukämievirus		
IAV	Influenza A-Virus		
IE	Immediate-Early		
IF	Immunfluoreszenz		
IFI16	IFNy-inducible protein 16		
IFN	Interferon		
IKK	IkB-Kinase		
IL-1R	Interleukin-1-Rezeptor		
IL-1β	Interleukin-1β		
IP	Immunpräzipitation		
IRAK	IL-1 receptor-associated kinase		
IRF	Interferon-regulierender Faktor		

lκB	Inhibitor of NF-κB		
JNK	c-Jun N-terminal kinase		
KSHV	Kaposi-Sarkoma-assoziiertes Herpesvirus		
L	Late		
LMP-1	Latenz-assoziiertes Membranprotein 1		
LPS	Lipopolysaccharide		
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase		
MAVS	mitochondrial antiviral signaling		
MCMV	murines Cytomegalovirus		
MCV	Molluscum contagiosum-Virus		
MDA5	melanoma differentiation-associated factor 5		
MHC	major histocompatibility complex		
MIEP	major immediate-early promoter		
MOI	multiplicity of infection		
MyD88	myeloid differentiation factor 88		
NEMO	NF-κB essential modulator		
NF-κB	nukleärer Faktor kappa B		
NLS	nukleäre Lokalisationssequenz		
PAMP	pathogen-associated molecular pattern		
PCR	Polymerase Chain Reaction		
PRR	pattern recognition receptor		
Rev	Revertante		
RHIM	RIP-homotypisches Interaktionsmotiv		
RIG-I	retinoic acid inducible gene-l		
RIP	Rezeptor-interagierendes Protein		
RLR	RIG-I-like receptor		
RNR	Ribonukleotid-Reduktase		
RSV	Respiratorisches Syncytialvirus		
ssRNA	einzelsträngige RNA		
STING	stimulator of interferon genes		
ТАВ	TAK1-associated binding protein		
TAK1	TGFβ-activated kinase 1		
TBK1	TANK-binding kinase 1		
TCID ₅₀	tissue culture infectious dose 50%		
TIR	Toll/IL-1-Rezeptor		
TIRAP	TIR-containing adaptor protein		
TLR	Toll-like-Rezeptor		

TNFR1	Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1
ΤΝFα	Tumornekrosefaktor α
TRADD	TNFR-associated death domain protein
TRAF	TNF receptor-associated factor
TRAM	TRIF-related adapter molecule
TRIF	TIR domain-containing adaptor inducing $\mbox{IFN}\beta$
VSV	Vesikuläres Stomatitis-Virus
Wt	Wildtyp

6.3 Gefahrstoffe

Gefahrstoff	Gefahren- symbol	H-Sätze	P-Sätze
2-Mercaptoethanol	T, N	H 301-310-330-315-318- 410	P 26-36+37+39-45-61
Acrylamid	т	H 350-340-361f-301-372 -332-312-319-315-317	P 201-280-301+310-305+ 351+338-308+313
Ammoniumpersulfat	O, Xn	H 272-302-315-319-335- 334-317	P 280-305+351+338-302+ 352-304+341-342+311
Ampicillin	Т	H 315-317-319-334-335	P 261-280-305+351+338- 342+311
Bisacrylamid	Xn	H 302	P 264-301+312-330
Borsäure	Xn	H 360FD	P 201-308+313
CellTiter96 AQueous Solution (MTS)	Xi	H 315-319-335	-
Chloramphenicol	т	H 350	P 201-308+313
Dithiothreitol	Xn	H 302-315-319	P 302+352-305+351+338
Draq5	Xi	H 315- 319- 335	P 280-264-305+351+338- 312-332+313-362
EDTA	Xi	H 319	P 305+351+338
Essigsäure	F, C	H 226-314	P 280-301+330+331-307+ 310-305+351+338
Ethanol	F	H 225	P 210
Ethidiumbromid	T+	H 341-330-302	P 281-302+352-305+351 +338-304+340-309-310
flüssiger Stickstoff	-	H 281	P 282-336+315-403
Geneticin	Xn	H 317-334-316	P 285-304+341-305+351 +338-332+313-261-280
----------------------	-----------	---------------------------------------	---------------------------------------------------------------
Isopropanol	F, Xi	H 225-319-336	P 210-233-305+351+338
Kanamycin	Xn	Н 360	P 201-308+313
Methanol	F, T	H 225-331-311-301-370	P 210-233-280-302+352
Natriumdodecylsulfat	F, Xn	H 228-311-302-335-315- 319	P 210-280-304+340-305+ 351+338-309+310
Natriumhydroxid	С	H 314-290	P 280-301+330+331-309+ 310-305+351+338
Nonidet-P40	Xi, N, C	H 318-411-302	P 280-305+351+338-301+ 312
Paraformaldehyd	F, Xn, Xi	H 228-302-332-351-335- 315-319-317	P 281-302+352-305+351+ 338-308+313-304+340
Penicillin	Xi	H 317	P 280
Salzsäure	C, Xi	H 290-314-335	P 234-260-304+340-303+ 361+353-305+351+338- 309+311-501
Streptomycin	Xi	H 302	-
TEMED	C, F, Xi	H 225-332-302-314	P 210-233-280-301+330+ 331-305+351+338-309+310
Tris	Xi	H 315-319-335	P 261-305+351+338
Triton-X-100	Xi, C	H 318-302	P 262-305+351+338-313
Zeocin	Xi, Xn	H 302-341	P 264-301+312

6.4 Lebenslauf

entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

6.5 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Wolfram Brune für die Zurverfügungstellung des Forschungsthemas und die stete wissenschaftliche Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Heisig danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens, Frau Prof. Dr. Oetjen und Herrn Dr. Perbandt für die Begutachtung der Disputation.

Ein großes Dankeschön gilt allen meinen Kollegen am RKI und HPI, ganz besonders Patricia, Wiebke, Sebastian, Jette und Tim für die gute Zusammenarbeit, die vielen hilfreichen Diskussion, für ganz viel Spaß innerhalb und außerhalb des Labors und Hilfe in allen Lebenslagen.

Vielen Dank auch an meine Familie und Freunde für die anhaltende Unterstützung und für viel Spaß, Abenteuer und Musik.

6.6 Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, Eva Krause, geboren am 07.09.1983 in Dresden, dass ich diese Arbeit selbstständig und allein mithilfe der angegebenen Mittel angefertigt habe. Diese Arbeit wurde bislang noch nicht als Dissertation bei einer anderen Hochschule eingereicht oder veröffentlicht.

Hamburg, Juni 2014

Eva Krause