

**Modulation der Apoptose  
durch die Proteine m41 und m41.1  
des murinen Cytomegalievirus**

**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  
Wiebke Handke  
aus Quakenbrück

Hamburg, 2013

Die vorliegende Arbeit wurde am Robert Koch-Institut in Berlin (2008-2010) und am Heinrich-Pette-Institut in Hamburg (2010-2013) unter der Leitung von Prof. Dr. Wolfram Brune angefertigt. Während dieser Zeit wurde zu den hier aufgeführten Publikationen beigetragen. Ergebnisse aus Cam *et al.* (2010) und Handke *et al.* (2013) sind Teil der vorliegenden Arbeit.

Cam M, **Handke W**, Picard-Maureau M, Brune W (2010). "Cytomegaloviruses inhibit Bak- and Bax-mediated apoptosis with two separate viral proteins." *Cell Death Differ.* Apr; 17 (4): 655-65

Schumacher U, **Handke W**, Jurak I, Brune W (2010). "Mutations in the M112/ M113-coding region facilitate murine cytomegalovirus replication in human cells." *J Virol.* Aug; 84 (16): 7994-8006

**Handke W\***, Krause E\*, Brune W (2012). "Live or let die: manipulation of cellular suicide programs by murine cytomegalovirus" *Med Microbiol Immunol.* Nov; 201 (4): 475-86

**Handke W\***, Luig C\*, Popovic B\*, Krmpotic A, Jonjic S, Brune W (2013). "Viral inhibition of BAK promotes murine cytomegalovirus dissemination to salivary glands." *J Virol.* Mar; 87 (6): 3592-6

\*gleichberechtigte Erstautorenschaft

1. Gutachter: Prof. Dr. Wolfram Brune

2. Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Hahn

Tag der Disputation: 31. Mai 2013

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung /Summary .....</b>	<b>VI</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Das Cytomegalievirus.....	1
1.2 Untersuchung der CMV-Pathogenese mithilfe des MCMV-Maus-Modells.....	3
1.3 Die Rolle des programmierten Zelltods in der MCMV-Infektion.....	5
1.4 Die Rolle des Golgi-Apparats in der Apoptose und der MCMV-Infektion .....	10
1.5 Zielsetzungen in dieser Arbeit.....	13
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>14</b>
2.1 Material.....	14
2.1.1 Zelllinien und Zellkulturmedien.....	14
2.1.2 Viren .....	14
2.1.3 Bakterien und Bakterienkulturmedien.....	16
2.1.4 Hefe und Hefekulturmedien .....	16
2.1.5 Antibiotika.....	17
2.1.6 Oligonukleotide .....	17
2.1.7 Plasmide und BACs.....	20
2.1.8 Antikörper.....	21
2.1.9 Größenstandards .....	22
2.1.10 Enzyme .....	22
2.1.11 Kits.....	23
2.1.12 Puffer und Lösungen .....	23
2.1.13 Chemikalien.....	24
2.1.14 Verbrauchsmaterialien.....	25
2.1.15 Geräte.....	25
2.1.16 Programme.....	26
2.2 Methoden .....	27
2.2.1 Zellkulturmethoden und Virusanzucht .....	27
2.2.1.1 Zellkultur: Pflege, Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	27
2.2.1.2 Transfektion und Virusrekonstitution.....	27
2.2.1.3 Virusanzucht, Bestimmung der TCID <sub>50</sub> / ml und Infektion .....	28
2.2.1.4 Virusreplikationskinetik .....	29
2.2.1.5 Untersuchung der Viabilität von Zellen .....	30
2.2.2 Molekulargenetische Methoden .....	30
2.2.2.1 Extraktion von Plasmid- oder BAC-DNA.....	30
2.2.2.2 Extraktion von Hefe-DNA und Retransformation.....	31
2.2.2.3 Extraktion von Virion-DNA.....	31
2.2.2.4 Restriktionsverdau und DNA-Gelelektrophorese.....	32

2.2.2.5	RNA-Extraktion und Reverse Transkription.....	32
2.2.2.6	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) und Sequenzierung.....	33
2.2.2.7	Aufreinigung von DNA-Fragmenten, Bestimmung der DNA-Konzentration und Ligation.....	33
2.2.2.8	Herstellung elektrokompenter Bakterien, Lagerung und Elektroporation ....	33
2.2.2.9	MCMV-BAC-Mutagenese und Konstruktion der Virusmutanten .....	34
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden .....	38
2.2.3.1	Herstellung von Proteinlysaten und Bestimmung der Proteinkonzentration....	38
2.2.3.2	SDS-PAGE und Western Blot.....	39
2.2.3.3	Immunpräzipitation .....	41
2.2.3.4	Immunfluoreszenz .....	42
2.2.3.5	TUNEL-Assay .....	42
2.2.3.6	Messung der Caspase-2-Aktivierung.....	43
2.2.4	Suchverfahren zur Identifikation möglicher Bindungspartner des Proteins m41 .....	44
2.2.4.1	Die $\alpha$ -HA-Affinitätsaufreinigung und das Silbergel .....	45
2.2.4.2	Das <i>Yeast-two-Hybrid</i> -Verfahren .....	46
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>49</b>
3.1	m41 und m41.1 gehören zu den früh exprimierten Genen .....	49
3.2	Untersuchungen zur Charakterisierung des MCMV-Proteins m41 .....	51
3.2.1	<i>In silico</i> wird m41 als Typ-II-Transmembranprotein eingestuft und ist in der Immunfluoreszenz im cis-Golgi nachweisbar .....	51
3.2.2	Identifikation möglicher Interaktionspartner des Proteins m41 .....	52
3.2.2.1	Die Suche nach Interaktionspartnern des Proteins m41 mithilfe der $\alpha$ -HA-Affinitätsaufreinigung und einem <i>Yeast-two-Hybrid</i> -Verfahren.....	52
3.2.2.2	Die Caspase-2 als möglicher Interaktionspartner von m41 .....	59
3.2.3	Konstruktion und Charakterisierung der S <sup>§</sup> - und der S*-Virusmutanten .....	69
3.3	Funktionelle Charakterisierung von m41.1 <i>in vitro</i> .....	73
3.3.1	Das virale Protein m41.1 interagiert mit dem zellulären Protein BAK.....	73
3.3.2	m41.1 hemmt die virusinduzierte Apoptose.....	75
3.4	Vorarbeiten zur <i>in vivo</i> Charakterisierung von m41.1 .....	78
3.4.1	Konstruktion und Charakterisierung der K*-Virusmutanten .....	78
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>86</b>
4.1	Der Locus m41 des murinen Cytomegalievirus .....	86
4.2	Hinweise auf eine funktionelle Interaktion von UNC93B1, GTSE1, Basigin oder Caspase-2 mit m41 .....	87
4.3	m41 zeigt keinen antiapoptotischen Effekt in MCMV-infizierten Makrophagen .....	92
4.4	m41.1 hemmt die BAK-vermittelte Apoptose <i>in vitro</i> und unterstützt die Dissemination des Virus <i>in vivo</i> .....	93

---

4.5	Bilden die MCMV-Proteine m38.5 und m41.1 das funktionelle Homolog zum HCMV-Protein vMIA? .....	97
<b>5</b>	<b>Referenzen .....</b>	<b>100</b>
<b>6</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>111</b>
6.1	Auszug aus den Ergebnissen der Suchverfahren .....	111
6.2	Abkürzungen .....	116
6.3	Abbildungsverzeichnis .....	119
6.4	Tabellenverzeichnis .....	120
6.5	Gefahrenstoffe .....	121
6.6	Lebenslauf .....	123
6.7	Danksagung .....	125
6.8	Eidesstattliche Versicherung .....	125

## Zusammenfassung /Summary

### Zusammenfassung

Der Lokus m41 des murinen Cytomegalievirus (MCMV) kodiert für zwei Proteine, m41 und m41.1. Die Sequenz des Proteins m41.1 überlappt vollständig mit der Sequenz des Proteins m41, liegt jedoch in einem anderen Leserahmen. Bisherige Untersuchungen zeigten, dass beide Proteine in unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle lokalisiert sind. m41 wurde am Golgi-Apparat nachgewiesen, wohingegen m41.1 am Mitochondrium lokalisiert ist. Für beide Proteine wurde außerdem eine antiapoptotische Funktion in der MCMV-Infektion beschrieben.

In der vorliegenden Arbeit wurde die antiapoptotische Funktion der MCMV-Proteine m41 und m41.1 näher untersucht. Im ersten Schritt wurden zelluläre Interaktionspartner von m41 und m41.1 identifiziert. Im Fall des Proteins m41 wurden als Suchverfahren die  $\alpha$ -HA-Affinitätsaufreinigung gekoppelt an eine massenspektrometrische Analyse und ein *Yeast-two-Hybrid*-Verfahren angewandt. Dadurch identifizierte Kandidaten wurden weitergehend getestet. Für das Protein m41.1 konnte mithilfe der Koimmunpräzipitation das zelluläre, proapoptotische Protein BAK als Interaktionspartner identifiziert werden.

Im zweiten Schritt wurde die antiapoptotische Funktion von m41 und m41.1 in der MCMV-Infektion in Zellkultur näher charakterisiert. Interessanterweise konnte hierbei die beschriebene antiapoptotische Funktion des Proteins m41 nicht bestätigt werden. Das Protein m41.1 hingegen zeigte eine eindeutige antiapoptotische Funktion in infizierten Makrophagen und Fibroblasten. In Zusammenarbeit mit Maren Cam wurde detailliert gezeigt, dass m41.1 die BAK-vermittelte mitochondriale Apoptose *in vitro* hemmt.

Zusätzlich wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Virusmutanten konstruiert, mit denen die Rolle des Proteins m41.1 in der *in vivo* Infektion untersucht werden konnte. Die Infektionsexperimente mit diesen Virusmutanten wurden von Branka Popovic und Christina Luig durchgeführt und zeigten, dass m41.1 essentiell für eine optimale Dissemination von MCMV in der Maus ist.

## Summary

The m41 locus of the murine cytomegalovirus (MCMV) encodes two proteins, m41 and m41.1. The m41.1 coding sequence overlaps completely with the coding sequence of m41, whereas the resulting proteins are encoded in different frames. Previous studies have shown that both proteins are expressed in different cell compartments. The m41 protein is localized at the Golgi apparatus in contrast to the m41.1 protein, which is expressed at the mitochondria. However, it has been shown that both proteins possess an antiapoptotic function during MCMV infection.

In the present thesis the antiapoptotic function of both, the m41 and the m41.1 protein, was investigated in detail. For this purpose, firstly, cellular proteins were identified which interact with either m41 or m41.1. The search for m41 interaction partners was performed using two different screening methods, an  $\alpha$ -HA affinity purification coupled with mass spectrometry analysis and a yeast-two-hybrid screen. Subsequently putative interaction partners were verified. For the m41.1 protein the interaction with the cellular protein BAK was identified by immunoprecipitation.

In a second step the antiapoptotic effects of m41 and m41.1 were characterized in cell culture based experiments. Interestingly, the described antiapoptotic function of the m41 protein could not be confirmed. Nevertheless, the m41.1 protein showed a distinct antiapoptotic effect during MCMV infection of macrophages and fibroblasts. In cooperation with Maren Cam it could be shown that m41.1 inhibits mitochondria-mediated apoptosis in a BAK dependent manner *in vitro*.

Furthermore this thesis describes the construction of virus mutants for *in vivo* studies. Infection experiments using those mutants showed the importance of the m41.1 protein in the infection of mice. In collaboration with Branka Popovic and Christina Luig it could be shown that m41.1 is essential for the optimal dissemination of MCMV in infected mice.

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Cytomegalievirus

Das Cytomegalievirus (CMV) gehört zu der Unterfamilie der  $\beta$ -Herpesviren innerhalb der Familie der Herpesviren (1). Die Erbinformation der CMVs besteht aus einem linearen Doppelstrang(ds)-DNA-Genom von ca. 230 kb und weist ungefähr 200 offene Leserahmen (ORFs) auf (2). Die virale dsDNA liegt in einem ikosaedrischen Kapsid verpackt vor, das von Tegumentproteinen umgeben wird. Das Tegument wird umschlossen von einer Hüllmembran, in die virale Glykoproteine eingelagert sind (3).

### *Verbreitung und Pathogenese*

Die Infektion mit dem humanen CMV (HCMV) ist in der Bevölkerung weit verbreitet. Eine Erhebung in den USA zeigte, dass die Seroprävalenz bei 40-jährigen bei 50-85 % lag. Eine Seroprävalenz bis nahezu 100 % wurde für Entwicklungsländer angegeben (4). Die Übertragung von CMV erfolgt über verschiedene Körperflüssigkeiten wie Speichel, Urin, Blut, Tränen und Muttermilch. Nach Erstinfektion verbleibt das Virus lebenslang im Körper des Wirts. Hierbei befindet sich das Virus überwiegend in der Latenz. In der Latenz erfolgt keine produktive Virusreplikation. Jedoch reaktiviert das Virus sporadisch, wobei infektiöses Virus gebildet wird. Akut und latent infizierte Personen tragen so zur Verbreitung des Virus bei (5). Die Infektion immunkompetenter Personen verläuft meist unbemerkt aufgrund der schwachen Symptomatik wie einer Lymphknotenschwellung. Selten kann eine Erstinfektion zu Mononukleose-ähnlichen Symptomen wie Fieber und einer milden Hepatitis führen (6). Ernsthafte Folgen hat eine CMV-Infektion vor allem bei drei Risikogruppen: Personen mit geschwächtem Immunsystem wie AIDS-Patienten oder Organtransplantatempfänger und Ungeborene, deren Immunsystem noch nicht vollständig entwickelt ist. Bei Organtransplantatempfängern kann die Übertragung eines HCMV-positiven Stammzelltransplantats sowohl zur Reaktivierung einer latenten Infektion als auch zu einer komplikationsreichen Neuinfektion führen. Die Transplantation HCMV-positiver Organe in einen HCMV-negativen Rezipienten gilt ebenfalls als kritisch. Folgen für den immunsupprimierten Empfänger können eine schwere Pneumonie, die Erkrankung des Gastrointestinaltrakts oder des Zielorgans sein. Beschrieben wurde auch eine fiebrige Erkrankung, die als CMV-Syndrom bezeichnet wird. Um diesen Folgen entgegen zu wirken, wird prophylaktisch eine antivirale Therapie (Ganciclovir, Valganciclovir) angewandt, wodurch die Erkrankungswahrscheinlichkeit signifikant reduziert werden konnte. In HIV-Patienten erfolgt die antivirale Behandlung in Hinblick auf die Infektion mit dem HIV durch HAART (*highly active antiretroviral therapy*), wobei additiv auch

das Risiko einer HCMV-Erkrankung reduziert wird. Bei erhöhter Immunsuppression erkranken HIV- oder AIDS-Patienten vor allem an einer HCMV-verursachten Retinitis, aber auch an Entzündungen im Gastrointestinaltrakt, dem Gehirn oder der Lunge (4). Die Infektion des Ungeborenen kann erfolgen, wenn die werdende Mutter in der Schwangerschaft mit HCMV infiziert wird. Studien zeigten, dass bei einer Erstinfektion der Mutter eine 30-40 %ige Wahrscheinlichkeit der intrauterinen Transmission bestand. 10-15 % der kongenital Infizierten zeigten Symptome bei der Geburt. Hierzu zählten die Mikroenzephalie, verringertes Wachstum, Hepatosplenomegalie und Anämie. 20-30 % der symptomatischen Neugeborenen starben an Leberdysfunktion oder bakterieller Superinfektion. Auch zur Behandlung von Neugeborenen ist eine antivirale Therapie mit Ganciclovir in der Literatur als Mittel der Wahl genannt. Der größere Anteil infizierter Ungeborener zeigte bei der Geburt keine Symptome (85-90 %). Bei 5-15 % kam es jedoch zur Entwicklung von Spätfolgen, zu denen Hörverlust, Sehschäden und geistige Entwicklungsstörungen gehörten (7). Eine Impfung gegen HCMV existiert nicht. Zu den Präventionsmaßnahmen, die eine Ansteckung verhindern können, zählen v. a. Hygienemaßnahmen wie regelmäßiges Händewaschen und geschützter Geschlechtsverkehr. Die Ansteckung erfolgt meist schon in jungen Jahren entweder beim Spielen mit seropositiven Kindern, durch die Muttermilch oder im alltäglichen engen Kontakt mit einer seropositiven Mutter (6).

### *Infektion und Replikationszyklus*

HCMV weist einen speziellen Zelltropismus auf. Zum Beispiel können Fibroblasten-, Endothel-, Epithel-, Stroma- und Nervenzellen sowie Makrophagen und Monozyten infiziert werden. Das Virus kann allerdings nur in bestimmten Zelltypen wie CD34+ hämatopoetischen Vorläuferzellen in die Latenz gehen (8). In den Körper des Wirts gelangt das Virus meist durch die Infektion von Schleimhautzellen. Zu Beginn der Infektion binden Glykoproteine auf der Hüllmembran des Virus an Heparansulfat-Proteoglykane,  $\beta$ 1-Integrine und andere Rezeptoren auf der Zelloberfläche und medieren die Fusion mit der Plasmamembran oder die Endozytose, was zur Freisetzung des Nukleokapsids in das Cytoplasma führt (9-11). Das Nukleokapsid gelangt nach dem Eintritt in die Zelle über Mikrotubuli zum Zellkern. Hier bindet es an Kernporen, durch die die virale DNA in den Kern eingeschleust wird. Die virale DNA wird im Kern transkribiert und repliziert. Die Transkription erfolgt schrittweise. Sehr früh exprimierte Gene (*immediate early*; IE) dienen als Aktivatoren der frühen Gene (*early*; E). Die frühen Gene kodieren z. B. Komponenten der viralen DNA-Replikation und der Immunmodulation. Zuletzt werden die späten Gene (*late*, L) exprimiert. Hierzu zählen Strukturproteine für den Viruszusammenbau (*Assembly*) und die Freisetzung (*Egress*). In der Rolling-Circle-Replikation wird die neue virale DNA in Form von *Head-to-tail*-Konkatemeren gebildet. Die Abspaltung einer Einzelkopie erfolgt durch den Terminasekomplex, der an der Insertion der viralen DNA in die vorgefertigten

Prokapside beteiligt ist. Das Nukleokapsid wird aus dem Kern ins Cytoplasma entlassen. Im Cytoplasma erfolgt die Tegumentation und der Erhalt der finalen Membranhülle in sogenannten Assemblierungskompartimenten (*Assembly Compartments*; AC). Ein AC umfasst modifizierte, neu arrangierte Wirtsorganelle und Virusproteine, die zur Fertigstellung der Viruspartikel benötigt werden. In konzentrischen Kreisen umschließen zuerst Membranen des Trans-Golgi-Netzwerks (TGN) und der Endosomen den Ort des Viruszusammenbaus, wiederum umgeben von Golgi-Membranen und von Membranen des Endoplasmatischen Retikulums (ER). Das Tegument besteht vor allem aus viralen Proteinen, die für die initialen Stadien der Infektion einer Zelle benötigt werden, die dem Viruskapsid Strukturstabilität verleihen und die für Interaktionen benötigt werden, um die Verankerung der finalen Hüllmembran sowie die Virusfreisetzung zu ermöglichen. Die finale Hülle des Virus ist mit viralen Glykoproteinen gespickt, darunter das Glykoprotein B (gB) (9,12,13). Modifizierte Membranen aus Golgi-stämmigen, sekretorischen Vesikeln bilden mit hoher Wahrscheinlichkeit die Grundlage der finalen Virushülle (14-16). Die fertigen Viruspartikel werden durch Exozytose in den extrazellulären Raum entlassen (9,12), was die Infektion weiterer Zellen zur Folge hat. Ein Charakteristikum der CMVs ist hierbei, dass die Viren nur in speziesspezifischen Zellen, oder in Zellen nahe verwandter Spezies, produktiv replizieren können. So kann beispielsweise HCMV keine produktive Infektion in Mäusen etablieren (17). Auf die Speziespezifität der CMVs und die daraus resultierenden Methoden zur Studie der CMV-Pathogenese wird im folgenden Abschnitt näher eingegangen.

## 1.2 Untersuchung der CMV-Pathogenese mithilfe des MCMV-Maus-Modells

CMV ist innerhalb der Säugetiere weit verbreitet. Die hohe Speziespezifität der CMVs verhindert jedoch die wechselseitige Übertragung, z. B. der Nagetier-CMV auf den Menschen. Folglich kann auch die HCMV-Pathogenese nicht in Nagetieren wie der Maus untersucht werden. Das MCMV-Maus-Modell ist das am besten etablierte System, um die Pathogenese von CMV *in vivo* und *in vitro* zu untersuchen. Der Infektionsverlauf in der Maus und im Menschen durch das jeweilige CMV ähneln sich sehr. Studien zeigten, dass die Infektion immunkompetenter Mäuse bei geringer Infektionsdosis asymptomatisch verlief. Bei steigender Infektionsdosis konnten akute Symptome wie geminderte Leber- und Nierenfunktion, Immunsuppression und schockähnliche Symptome wie eine massive Cytokinexpression (u. a. TNF $\alpha$ ) beobachtet werden. Die Infektionsroute begann meist über das Epithel des Gastrointestinaltrakts oder der oberen Atemwege. In der systemischen Infektion gelangte das Virus u. a. in die Milz, Lunge, Leber und Nieren. Final befiel MCMV die Speicheldrüsen. Das Virus lag meist latent vor und replizierte nur sporadisch. Zur Zeit

der sporadischen Replikation wurde das Virus beispielsweise über den Speichel auf andere spezieeigene Wirte übertragen. Des Weiteren wurde beschrieben, dass vermutlich Monozyten und Makrophagen an der Ausbreitung und Verteilung des Virus im Organismus beteiligt sind. Makrophagen und Monozyten konnten von CMV infiziert werden. Sie gehören zu den Immunzellen und sind am Infektionsort anzutreffen. Anschließend durchlaufen sie weite Bereiche im Körper des Wirtes (Blut, Lymphe und Geweben), was sie als „Vesikel“ prädestiniert (17).

Das MCMV-Maus-Modell bietet methodisch weitreichende Möglichkeiten zur Studie der CMV-Pathogenese. Für *in vitro* Untersuchungen werden z. B. murine Zelllinien oder Primärzellen genutzt. Darüber hinaus erlauben die zahlreichen, etablierten Knockoutmäuse *in vivo* Experimente mit gentechnisch veränderten Viren zur Aufklärung von Infektionszusammenhängen (18).

Auch in dieser Arbeit wurden veränderte MCMVs konstruiert, charakterisiert und in Infektionsexperimenten eingesetzt. Die Manipulation des MCMV-Genoms zur Konstruktion gentechnisch veränderter Viren erfolgt in Bakterien. 1997 publizierten Messerle et al. (19) ein MCMV-Genom, das als *bacterial artificial chromosome* (BAC) kloniert im Bakterium *E. coli* vorlag und mit den konventionellen, bakteriellen Rekombinationstechniken mutagenisiert werden konnte. Das als BAC vorliegende, veränderte Virusgenom konnte durch Transfektion in Fibroblasten zu gezielt veränderten, infektiösen Viruspartikeln rekonstituiert werden (19,20). Derzeitige Verfahren der BAC-Mutagenese basieren auf dem Red-Rekombinationssystem des  $\lambda$ -Phagen. Zwei gängige Mutagenese-Verfahren sind die FRT-vermittelte Rekombination und die *Galk-Kan*-Mutagenese (21). In dieser Arbeit wurde gekennzeichnet, ob eine Virusmutante durch die FRT-vermittelte<sup>(§)</sup>- oder die *Galk-Kan*(\*)-Mutagenese hergestellt wurde. In beiden Methoden wird das Gen der Wahl zuerst durch einen Selektionsmarker ersetzt. Danach bietet sich die Möglichkeit die Sequenz des Selektionsmarkers zu entfernen oder durch eine veränderte Sequenz des Gens der Wahl zu ersetzen. Beide Schritte erfolgen über homologe Rekombination. Die zu inserierende Sequenz wird hierbei durch Sequenzen flankiert, die homolog zum Integrationsort sind. Unterschiede zeigen die beiden Methoden zum einen in der Verfügbarkeit der Rekombinationsenzyme. Bei der FRT-vermittelten Mutagenese müssen die bakteriellen Rekombinationsenzyme über das Plasmid pKD46 in *E. coli* eingebracht werden (22). In der *Galk-Kan*-Mutagenese liegen die Red-Rekombinationsenzyme hingegen stabil integriert im Genom des *E. coli*-Stamms SW102 vor (24). Zum anderen werden unterschiedliche Selektionsmethoden angewandt und hierbei verschiedene Strategien zur Entfernung der Selektionsmarkersequenz verfolgt. Im Fall der FRT-vermittelten Rekombination besteht der Selektionsmarker aus der Sequenz der Kanamycin-Resistenz, die von FRT-Rekombinationssequenzen flankiert wird (FRT-*Kan*-FRT). Zur Entfernung des Selektionsmarkers muss die plasmidkodierte FLP-Rekombinase in den

Bakterienzellen exprimiert werden. Die FLP-Rekombinase vermittelt durch homologe Rekombination zwischen den FRT-Sequenzen die Entfernung der Kanamycin-Resistenz unter Verbleiben einer FRT-Sequenz (22-24). Die *Galk-Kan*-Mutagenese hingegen bietet die elegante Möglichkeit der markerlosen Entfernung der eingebrachten Selektionsmarkersequenz durch eine Negativselektion. Der Selektionsmarker der *Galk-Kan*-Mutagenese besteht aus der Sequenz der Galaktokinase (*Galk*) und der Sequenz der Kanamycin-Resistenz (*Kan*). In der ersten homologen Rekombination wird die Selektionsmarkersequenz *Galk-Kan* eingebracht und auf die Anwesenheit der Kanamycin-Resistenz selektioniert. Im zweiten Schritt kann die *Galk-Kan*-Sequenz durch die Zielsequenz mittels homologer Rekombination ersetzt und auf die Abwesenheit der Galaktokinase selektioniert werden. Die Negativselektion auf *Galk* basiert auf der Umsetzungsreaktion der nicht toxischen 2-Desoxy-Galaktose (DOG) in toxisches DOG-1-Phosphat durch die *Galk*, so dass auf DOG-haltigen Selektionsmedien nur die Bakterien wachsen können, in denen die *Galk-Kan*-Sequenz aus dem BAC entfernt worden ist (25). In der vorliegenden Arbeit tragen die Virusmutanten aus der FRT-vermittelten Mutagenese die gesamte oder partielle Sequenz des Selektionsmarkers im Virusgenom. Die Virusmutanten der *Galk-Kan*-Mutagenese hingegen tragen keine Fremdsequenz im Virusgenom.

Die BAC-Mutagenese wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit zur Konstruktion von MCMVs angewandt, in denen die Expression der Gene *m41* und/ oder *m41.1* verhindert wurde (Knockoutvirus). Nachfolgend wurden die Veränderungen im Genom der Knockoutviren repariert (Revertante). Bei der Konstruktion einer Revertante wird die geänderte Sequenz gegen die natürliche Sequenz ausgetauscht. Das Virusgenom der Revertante entspricht also der Wildtyp-Sequenz. In den Infektionsexperimenten wurde die Revertante als Kontrolle mitgeführt. Die Untersuchung einer Revertante zeigt, ob bei der Klonierung des Knockoutvirus kein anderes Gen im Virusgenom beschädigt worden ist und somit der Phänotyp des Knockoutvirus allein auf das Fehlen des Proteins der Wahl zurückgeführt werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde die zelltodinhibitorische Funktion von *m41* und *m41.1* u. a. in Infektionsexperimenten mit diesen Knockout- und Kontroll-Viren untersucht. Daher wird im folgenden Kapitel das grundlegende Wissen zu den Signalwegen des Zelltods vermittelt und beschrieben, wie bekannte Zelltodinhhibitoren des MCMVs in die Signalwege des programmierten Zelltods eingreifen.

### **1.3 Die Rolle des programmierten Zelltods in der MCMV-Infektion**

Die Einleitung des Zelltods zählt zu den wichtigen zellulären Abwehrmechanismen gegen eine Virusinfektion. Eine tote Zelle kann weder ein Virus beherbergen (Latenz) noch zur Produktion von Virusnachkommen (lytische Replikation) beitragen. Ein

Charakteristikum der CMVs ist der lange Replikationszyklus. Um die Vollendung des Replikationszyklus und somit die Virusvermehrung vor dem Tod der Zelle sicherzustellen, haben sich potente Zelltodinhhibitoren in der CMV-Evolution entwickelt (26-28). Im Folgenden werden die, für diese Arbeit relevanten, Signalwege des Zelltods sowie zelltodinhibitorische Proteine des MCMVs beschrieben.

Der Zelltod wird klassischerweise in zwei Varianten unterteilt: die Nekrose und die Apoptose. Jedoch wurden zahlreiche Sonderformen beschrieben, die sich nicht eindeutig der Apoptose oder der Nekrose zuordnen lassen. Charakteristische Merkmale der Apoptose und Nekrose überlappen in diesen Varianten. Eine bestimmte Zelltodvariante wird durch eine Reihe von morphologischen und biochemischen Vorgängen in der Zelle charakterisiert (29,30).

#### *Signalwege der extrinsischen und intrinsischen Apoptose und die Inhibition der Apoptose durch MCMV*

Die Apoptose ist eine Form des programmierten Zelltods. Extrazelluläre (extrinsische) oder intrazelluläre (intrinsische), proapoptotische Stimuli setzen eine hoch geordnete Reaktionskette in Gang, deren Folge ist, dass die sterbende Zelle schrumpft und dass die DNA und Proteine enzymatisch abgebaut werden. Die charakteristische Gruppe der proteinabbauenden Enzyme sind die Caspasen. Caspasen sind Cysteinproteasen, die spezifisch nach Aspartatresten in einer individuellen Erkennungssequenz schneiden. In gesunden Zellen liegen die Caspasen in inaktiver Form vor (pro-Caspasen) und werden entsprechend ihres Aktivierungsmechanismus in Initiator- und Effektor-Caspasen eingeteilt. Aktivierende Stimuli führen zur Autoaktivierung der Initiator-Caspasen (z. B. Caspase-2,-8,-9) innerhalb hochmolekularer Aktivierungskomplexe (z. B. dem Piddosom, dem DISC und dem Apoptosom). Aktive Initiator-Caspasen aktivieren daraufhin bestimmte Effektor-Caspasen (z. B. Caspase-3 und Caspase-7) (31). Die Effektor-Caspasen degradieren die zellulären Substrate. Nach der Degradation werden sämtliche Bestandteile der sterbenden Zelle als membranumschlossene Vesikel (apoptotische Körperchen) abgeschnürt. Die apoptotischen Körperchen werden von Phagozyten abgebaut (29,30).

#### *Signalweiterleitung während der extrinsischen Apoptose*

Die extrinsische Apoptose wird meist über Todesrezeptoren induziert (z. B. TNFR, CD95, TRAILR). Die Todesrezeptoren erkennen ihre extrazellulären Liganden (z. B. TNF $\alpha$ , Fas-Ligand, TRAIL) und mediiieren die Bildung eines Caspase-8 (oder -10)-Aktivierungskomplexes, der DISC genannt wird (vgl. Abbildung 1). Aktivierte Caspase-8 leitet die apoptotischen Signale auf zwei unterschiedlichen Wegen weiter. Entsprechend des vorherrschenden Signalwegs werden Zellen in Typ-I- und Typ-II-Zellen eingeteilt (30,32). Thymozyten und reife T-Zellen gehören zu den Typ-I-Zellen. In Typ-I-Zellen aktiviert Caspase-8 direkt Caspase-3. Caspase-3 ist eine prominente

Effektor-Caspase, die direkt mit der Degradation der zellulären Proteine beginnt. Zu den Typ-II-Zellen gehören Hepatocyten und Pankreas- $\beta$ -Zellen. Caspase-8 spaltet hier das cytoplasmatische Protein BID zu tBID (*truncated Bid*). tBID transloziert zu den Mitochondrien und löst eine Reaktionsfolge aus, in der die Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran so stark erhöht wird (MOMP, *mitochondrial outermembrane permeabilisation*), dass Bestandteile aus dem Intermembranraum des Mitochondriums ins Cytoplasma gelangen. Cytochrom c ist ein hierbei freigesetzter, proapoptotischer Faktor, der im Cytoplasma die Aktivierung der Initiator-Caspase-9 ermöglicht. Pro-Caspase-9 wird u. a. mit den Proteinen APAF1 und Cytochrom c im Aktivierungskomplex, dem Apoptosom, gebunden und in Folge aktiviert. Aktive Caspase-9 spaltet die oben erwähnte Caspase-3 und führt somit zur Exekutionsphase der Apoptose (33-35).

#### *Signalweiterleitung während der intrinsischen Apoptose*

DNA-Schäden, ER-Stress, oxidativer Stress und chemische Reagenzien wie Staurosporin können die intrinsische Apoptose auslösen. Die Mitochondrien stehen im Zentrum der intrinsischen Apoptose (vgl. Abbildung 1). Nach einem intrinsischen, proapoptotischen Stimulus verschieben sich die Mengenverhältnisse der aktiven zellulären, antiapoptotischen und proapoptotischen Proteine, die maßgeblich für die Regulation der Apoptose verantwortlich sind und der Bcl-2-Proteinfamilie zugeordnet werden. Es gibt drei Gruppen in der Bcl-2-Proteinfamilie. Die erste Gruppe besteht aus antiapoptotischen Proteinen, die strukturell durch das Vorhandensein der BH1-4 (*Bcl-2 homology 1-4*)-Domänen gekennzeichnet sind. BCL-2, BCL<sub>XL</sub> und MCL-1 gehören zu dieser Gruppe. In Abbildung 1 sind diese antiapoptotischen Proteine als „Bcl-2“, stellvertretend für BCL-2-ähnliche Proteine, eingezeichnet. Die zweite Gruppe wird als BH3-*only* Proteine bezeichnet. Sie wirken proapoptotisch und weisen nur die BH3-Domäne auf. Vertreter der BH3-*only* Proteine sind BID, BIM, BAD, NOXA und PUMA. Die proapoptotischen Effektorproteine BAK und BAX bilden die dritte Gruppe. Die Frage wie diese Proteine zusammenwirken, ist ein stark diskutiertes Thema. Das aktuelle Modell beschreibt, dass die BH1-4-Proteine, die BH3-*only* Proteine und die Effektorproteine interagieren. Das Zusammenspiel der pro- und antiapoptotischen Proteine ist stimulus- und zelltypabhängig. Je nach vorliegender Menge aktiver pro- und antiapoptotischer Proteine, werden die Effektormoleküle BAK und BAX aktiv oder bleiben inaktiv. Überwiegen die proapoptotischen Proteine in Folge eines proapoptotischen Stimulus, lagern sich die Effektormoleküle in der äußeren Mitochondrienmembran ein (cytoplasmatisch-lokalisiertes BAX) und/ oder gehen direkt in einen aktiven Status über (mitochondrial-lokalisiertes BAK) (30,36,37). Die folgende Oligomerisierung der Effektormoleküle führt zu einer erhöhten Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran. Auf der Stufe von MOMP überschneiden sich die Signalwege der extrinsischen Apoptose der Typ-II-Zellen mit denen der intrinsischen

Signalweiterleitung. Das durch MOMP freigesetzte Cytochrom c resultiert auch hier in der Aktivierung der pro-Caspasen-9 und -3 und der Ausführung der Apoptose (30).

In Abbildung 1 ist zudem die Signalweiterleitung der Caspase-2-medierten Apoptose eingezeichnet. Es wurde beschrieben, dass Caspase-2 u. a. in Folge von DNA-Schäden aktiviert wird. Als Aktivierungskomplex konnte das Piddosom identifiziert werden (38). Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass die Effektor-Caspase-3 pro-Caspase-2 direkt aktivieren kann (39). Aktive Caspase-2 trägt auf unterschiedlichen Wegen zur proapoptotischen Signalweiterleitung bei. Beschrieben wurde, dass Caspase-2 BID zu tBid spaltet (40,41). Die Signalweiterleitung überlappt hier mit der proapoptotischen Signalkette der extrinsischen Apoptose in Typ-II-Zellen. Ausserdem wurde gezeigt, dass aktive Caspase-2 am Golgi-Apparat lokalisiert ist und hier zur Bildung von proapoptotischen Mediatoren beiträgt. Hierzu zählen die Spaltprodukte des Golgi-lokalisierten Proteins GOLGIN-160 (42).

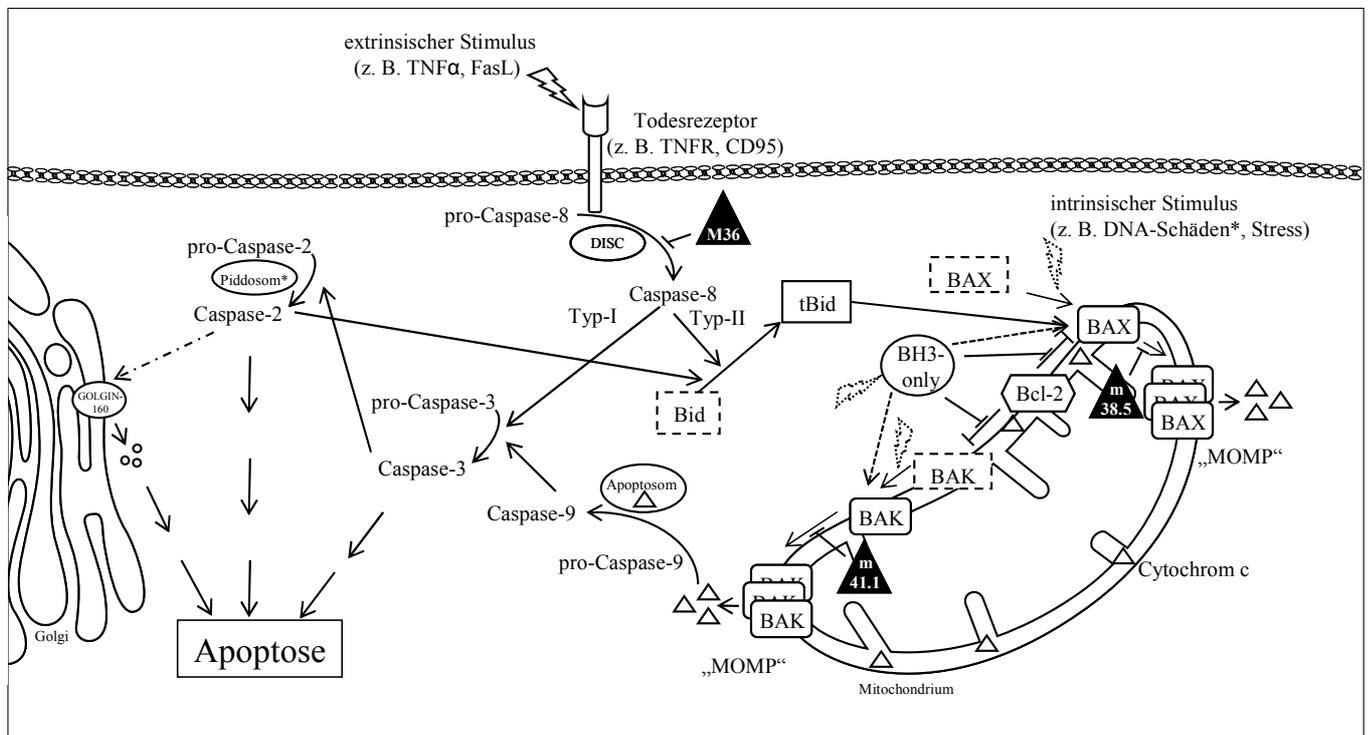


Abbildung 1: Schematische Übersicht zur intrinsischen und extrinsischen Apoptose

#### Die MCMV-Proteine M36, m38.5 und m41.1 hemmen die Apoptose

In der Evolution von CMV haben sich virale Inhibitoren der extrinsischen und intrinsischen Apoptose entwickelt. Sehr gut charakterisiert sind die antiapoptotischen Proteine des MCMVs. Die Angriffspunkte der antiapoptotischen MCMV-Proteine M36, m38.5 und m41.1 sind zusätzlich in Abbildung 1 dargestellt.

Die extrinsische Apoptose wird auf der Stufe der Caspase-8 gehemmt. Das virale Protein M36 bindet an Caspase-8 und hemmt dessen Aktivierung im DISC (43-45). Es

konnte gezeigt werden, dass die Infektion mit einem M36-Deletionsvirus in der Leber infizierter Mäuse und in Zellkultur-Makrophagen die Apoptose auslöst (45). Neben der Induktion der Apoptose wurde beschrieben, dass eine M36-Deletionsmutante nicht effizient in Mäusen oder Zellkultur-Makrophagen repliziert (44,45). Interessanterweise konnte der Replikationsdefekt aufgehoben werden, indem die Caspase-8-Aktivierung auf unterschiedliche Weise blockiert wurde. *In vitro* wurden hierzu die Zellen mit dem Pan-Caspase-Inhibitor zVAD-fmk behandelt. *In vivo* wurde anstelle des M36-Proteins eine dominant-negative Variante des Adapterproteins FADD exprimiert. FADD vermittelt die Bindung der pro-Caspase-8 an einem aktivierten Todesrezeptor und mediiert somit die Aktivierung der pro-Caspase-8 im DISC. Die Bindung an dominant-negatives FADD hingegen blockiert die Caspase-8-Aktivierung (45).

Die intrinsische Apoptose wird durch die antiapoptotischen MCMV-Proteine m38.5 und m41.1 verhindert. m38.5 und m41.1 sind in der Lage die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran zu verhindern (89). Ohne MOMP kommt es nicht zur Ausschüttung proapoptotischer Faktoren ins Cytoplasma, der nachfolgenden Aktivierung der Caspasen und zur Apoptose (30).

Das MCMV-Protein m38.5 konnte als spezifischer Inhibitor der Bax-vermittelten Apoptose identifiziert werden (46-48). Es wurde gezeigt, dass m38.5 an den Mitochondrien lokalisiert ist (49). m38.5 interagiert mit dem Effektorprotein BAX und rekrutiert es zu den Mitochondrien. Trotz der Rekrutierung von BAX zu den Mitochondrien wird die BAX-vermittelte MOMP durch m38.5 verhindert (46,47). Infektionsexperimente mit einem m38.5-Deletionsvirus resultierten zudem in einer erhöhten Empfindlichkeit der Zellen gegenüber chemisch- oder virusinduzierter Apoptose. Dieser Effekt zeigte sich kompensierbar durch die Expression des zellulären, antiapoptotischen Proteins BCL<sub>XL</sub>. BCL<sub>XL</sub> bindet in gesunden Zellen an die proapoptotischen Effektorproteine BAK und BAX und verhindert so die Aktivierung der Effektorproteine. Darüber hinaus konnte in infizierten, murinen, embryonalen Fibroblasten, die entweder kein BAK oder kein BAX exprimierten, gezeigt werden, dass m38.5-exprimierendes Virus spezifisch die BAX- aber nicht die BAK-vermittelte Apoptose hemmt (48). Der Phänotyp einer m38.5-Deletionsmutante wurde auch *in vivo* untersucht. Hierbei war die Virusreplikation der m38.5-Deletionsmutante in der Milz, Lunge und Leber nicht maßgeblich beeinträchtigt. Jedoch zeigten sich geringere Virustiter des m38.5-Deletionsvirus in den Speicheldrüsen infizierter Mäuse. Die Speicheldrüsen werden in der MCMV-Infektion zu späten Zeitpunkten infiziert (s. a. 1.2). Die Autoren schlussfolgerten, dass m38.5 einen entscheidenden Beitrag zur Virusdissemination in die Speicheldrüsen der Maus leistet (50).

Im Hinblick auf das Protein m41.1 zeigten Experimente aus der Promotionsarbeit von Maren Cam, dass m41.1 am Mitochondrium lokalisiert ist und den virusinduzierten Zelltod auf der Stufe der BAK-Oligomerisierung hemmt (51). Die detaillierte

Beschreibung der antiapoptotischen Funktion des Proteins m41.1 ist Teil der vorliegenden Arbeit.

#### *Die Inhibition der Nekroptose durch MCMV*

MCMV ist also in der Lage, die virusinduzierte Apoptose effektiv zu hemmen. Zu den Varianten des programmierten Zelltods zählt nicht nur die Apoptose sondern auch die Nekroptose. Die Nekroptose, auch programmierte Nekrose genannt, ist eine regulierte Sonderform der Nekrose.

Die klassische Nekrose ist als unregulierte Form des Zelltods bekannt. Chemische und physikalische Schäden oder mikrobielle Infektionen führen zum Anschwellen der Zelle, Verklumpung der DNA und finalem Zerplatzen der Zelle. Intrazelluläre Bestandteile werden unkontrolliert in den extrazellulären Raum freigesetzt und führen zu einer Entzündungsreaktion im umliegenden Gewebe (29).

Die Nekroptose erfolgt in eine hochgeordneten Signalfolge (52). Die Nekroptose wird durch Aktivierung der Todesrezeptoren in Kombination mit einer gehemmten Caspase-8 eingeleitet (30,53,54). Durch die Hemmung der Caspase-8 wird die nekroptotische Signalweiterleitung ermöglicht, jedoch die Signalweiterleitung der extrinsischen Apoptose blockiert. Wie bereits erläutert wurde, wird die Caspase-8-Aktivierung während der MCMV-Infektion durch das virale Proteine M36 gehemmt, so dass die Voraussetzung für die nekroptotische Signalweiterleitung in der MCMV-Infektion erfüllt ist. MCMV ist allerdings in der Lage auch die Nekroptose zu blockieren. Verantwortlich für die Unterbrechung der nekroptotischen Signalweiterleitung ist das MCMV-Protein M45 (55,56). Die zelltodinhistorische Funktion des Proteins M45 wurde erstmalig in der Infektion von Endothelzellen beschrieben. Endothelzellen, die mit einer MCMV-Mutante infiziert worden waren, in dessen M45-Gen ein Transposon inseriert war, starben (57). Spätere Untersuchungen stellten heraus, dass M45 mit den zellulären, pronekrotischen Proteinen RIP1 und RIP3 interagiert und dadurch die Signalweiterleitung in der Nekroptose hemmt (55,56,58).

## **1.4 Die Rolle des Golgi-Apparats in der Apoptose und der MCMV-Infektion**

Die antiapoptotischen Funktionen der MCMV-Proteine M36, m38.5 und m41.1 sind bereits gut aufgeklärt (s. 1.3). Ein weiteres MCMV-Protein, dem eine antiapoptotische Funktion zugeschrieben wurde, ist m41 (51,59,89). Die zugrunde liegenden Mechanismen der antiapoptotischen Funktion des MCMV-Proteins m41 sind bisher unbekannt und wurden daher im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Es ist jedoch bekannt, dass m41 am Golgi-Apparat lokalisiert ist (59). Daher wird der Golgi-Apparat (Syn. Golgi), v. a. in Bezug auf die MCMV-Infektion und die Apoptose, vorgestellt.

### *Struktur und Funktion des Golgi-Apparats*

Der Golgi-Apparat ist ein zentral gelegenes Organell im Endomembransystem der Zelle. Er ist in grundlegende metabolische und Transportfunktionen innerhalb der Zelle involviert. Weitere Aufgaben schließen die Beteiligung in der Signalverarbeitung, beispielsweise der Regulation der Mitose, der intrazellulären Ionenhomeostase und des Zelltods ein. Die hervorstechende Rolle des Golgi-Apparats ist jedoch die posttranslationale Modifikation von Proteinen und Lipiden sowie deren Transport und Verteilung bis hin zum Bestimmungsort. Reifende Proteine werden im Golgi-Apparat N- und O-glykosyliert, sulfoniert und proteolytisch gespalten. Die Modifikationen im Golgi-Apparat tragen zur funktionellen Reifung, der korrekten Lokalisation, Aktivierung und Stabilität der Proteine bei. Auch spezielle Lipide werden ausgehend von einer Präkursor-Struktur aus dem ER durch Golgi-lokalisierte Enzyme zu fertigen Lipiden prozessiert; beispielsweise Sphingolipide, die ausgehend von Ceramiden synthetisiert werden (60,61). In der Zelle befindet sich der Golgi in der Nähe des Zellkerns, des Centrosoms und des Mikrotubuli-Organisationszentrums. Mikrotubuli und die Interaktion mit dem Aktin-Cytoskelett halten den Golgi-Apparat an genannter Position und tragen zur typischen Form des Golgi-Apparats bei. Der Aufbau des Golgi-Apparats ist hoch strukturiert. Es wird in die Kompartimente cis-, medialen-, trans-Golgi und das TGN unterteilt. Jedes Kompartiment besteht aus membranumhüllten Reaktionsräumen, den Zisternen. Hierbei bilden 5-8 Zisternen einen Stapel, wobei die Zisternen untereinander mikrotubuliabhängig verbunden sind. Innerhalb eines Stapels liegt interessanterweise eine ähnliche Komposition aus Enzymen und Lipiden vor. Die enzymatische Ausstattung ist in den Kompartimenten des Golgi-Apparats unterschiedlich und spiegelt wieder, welche posttranslationalen Modifikationsprozesse in einem Kompartiment erfolgen. Typischerweise durchschreitet ein Protein nach dem Verlassen des ERs zunächst den ERGIC (ER-Golgi *intermediate compartment*) und gelangt anschließend zum cis-Golgi. Von dort gelangt es über den medialen-Golgi in den trans-Golgi und wird abschließend im TGN prozessiert und durch Vesikel zum Bestimmungsort gebracht. Zu den Bestimmungsorten zählen verschiedene Bereiche der Plasmamembran, der Endosomen, der Lysosomen oder der sekretorischen Granuli. Viele Varianten des typischen Transportwegs sind möglich. Ein abweichendes Beispiel ist der vesikuläre, rückwärts gerichtete Transport der Golgi- und ER-ständigen Proteinen. Wie der Transport durch den Golgi-Apparat im Detail erfolgt, ist nicht eindeutig geklärt (60,62-64). Bislang wurden Modelle beschrieben, die den intra-Golgi Transport nur teilweise erklären können (61,65).

### *Beteiligung des Golgi-Apparats in der Apoptose*

Auch die Rolle des Golgi-Apparats in der Apoptose ist noch weitgehend unklar. Während der Apoptose kommt es zum Abbau des Golgis. In diesem Prozess werden Strukturproteine des Golgi-Apparats wie GOLGIN-160, GRASP65 und GM130 durch

spezielle Enzyme, darunter die Caspasen, gespalten. Der Golgi-Apparat fragmentiert und verliert seine zusammenhängende Struktur, so dass es zur Unterbrechung des intrazellulären Proteintransports kommt (42,66-68). Einige Spaltprodukte der Golgi-lokalisierten Proteine stehen in der Diskussion proapoptotische Mediatoren zu sein. Die Publikation von Mancini *et al.* (42) zeigt, dass aktive Caspase-2 am Golgi nachgewiesen werden kann und GOLGIN-160 spaltet. GOLGIN-160-Fragmente, die durch aktive Caspase-2, -3 und -7 entstehen, wurden als proapoptotische Mediatoren beschrieben. GOLGIN-160-Fragmente allein können keine Apoptose induzieren, aber die Expression des Caspase-resistenten GOLGIN-160-Proteins verleiht der Zelle Resistenz gegenüber Todesrezeptor- und ER-Stress-induzierter Apoptose (68). Die Frage, ob der Golgi-Apparat Apoptosesignale initial erkennen kann oder ausschließlich in der Durchführung der Apoptose beteiligt ist, ist Gegenstand aktueller Untersuchungen. So wurde gezeigt, dass einige Apoptose-assoziierte Proteine wie die Todesrezeptoren TNFR1, CD95 sowie TRAIL-Rezeptor und das Protein Beclin vorübergehend und meist in inaktiver Form an Golgi-Membranen gelagert wurden. Nach proapoptotischen Stimuli änderte sich jedoch die intrazelluläre Lokalisation der Proteine (66,69). Beispielsweise kam es zur Translokation des CD95 vom Golgi zur Plasmamembran nach Stimulation der p53-abhängigen Apoptose (66). Ebenso konnte der aktive TNFR1 nach TNF- $\alpha$ -Stimulation an der Plasmamembran nachgewiesen werden, wohingegen der Rezeptor bei fehlender Stimulation in inaktiver Form am Golgi vorlag (69). In der Literatur wurde bislang nur ein antiapoptotisches, Golgi-lokalisiertes Protein ausser dem MCMV-Protein m41 beschrieben. Gubser *et al.* entdeckten das virale und das humane, Golgi-lokalisierte, antiapoptotische Protein (v/hGAAP). GAAP ist ein Multitransmembranprotein im Golgi, das Zellen vor extrinsischen und intrinsischen Apoptosestimuli schützt. vGAAP wurde im Vaccinia und Camelpox Virus nachgewiesen. vGAAP konnte funktionell hGAAP ersetzen und das Fehlen von hGAAP führte zur Apoptose (70). Mattia *et al.* publizierten, dass hGAAP die intrazellulären Calciumströme und -speicher moduliert und so die Sensitivität der Zellen gegenüber proapoptotischen Signalen senkt (71). Die detaillierten Mechanismen der antiapoptotischen Funktion der GAAPs konnten jedoch noch nicht gezeigt werden.

#### *Rolle des Golgi-Apparats in der CMV-Infektion*

In der CMV-Infektion ist der Golgi-Apparat in unterschiedlichen Prozessen beteiligt. In Abschnitt 1.1 wurde bereits auf die modifizierten Golgi-stämmigen Membranen eingegangen, die vermutlich zur Bildung der finalen Virushülle benötigt werden. Für einige Proteine des CMVs, z. B. Gykoproteine, wurde gezeigt, dass sie im Golgi prozessiert werden (10,72-76). Das CMV kodiert auch für Proteine, die im Golgi-Apparat lokalisiert sind. Beispielsweise ist das MCMV-Protein m152 im cis-Golgi/ERGIC lokalisiert und hält reife MHC-I-Moleküle im ERGIC zurück. Ungehindert würden die MHC-I-Moleküle virale Antigene auf der Zelloberfläche

präsentieren und zur Lyse der infizierten Zelle durch zytotoxische T-Zellen führen (77,78). Nach einem ähnlichen Prinzip verhindert das Protein UL142 des HCMVs die Präsentation des Natürlichen Killer (NK)-Zellliganden MICA auf der Zelloberfläche. Der Rückhalt von MICA im cis-Golgi schützt die infizierte Zelle vor der Lyse durch NK-Zellen (79). Auch die HCMV-Proteine pUL138, pUL133, pUL135 und pUL136 konnten im Golgi nachgewiesen werden. Derzeit noch weitgehend uncharakterisiert wird ihre Rolle u. a. in der zelltypspezifischen Virusreplikation und der Latenz untersucht (80). Ebenfalls weitgehend uncharakterisiert ist das MCMV-Protein m41. m41 wurde als antiapoptotisches, golgi-lokalisiertes Protein beschrieben (51,59,89). Der Mechanismus, durch den m41 am Golgi-Apparat der Apoptose entgegenwirkt, konnte bislang nicht aufgedeckt werden.

## 1.5 Zielsetzungen in dieser Arbeit

Im Lokus m41 des murinen Cytomegalievirus werden überlappend die Proteine m41 und m41.1 kodiert (81). Für beide Proteine wurde eine antiapoptotische Funktion in der MCMV-Infektion beschrieben (51,59,89). Ziel der vorliegenden Arbeit ist die nähere Charakterisierung der antiapoptotischen Funktion der MCMV-Proteine m41 und m41.1. Um dies zu erreichen, sollen zuerst zelluläre Proteine identifiziert werden, die mit m41 oder m41.1 interagieren. Hierzu werden Immunpräzipitationen und zusätzlich zwei Suchverfahren, die  $\alpha$ -HA-Affinitätsaufreinigung gekoppelt an eine massenspektrometrische Analyse und ein *Yeast-two-Hybrid*-Verfahren, durchgeführt. Bestätigte Interaktionen sollen im Folgenden näher untersucht werden, um zu klären, ob die identifizierte Protein-Protein-Interaktion funktionell mit der antiapoptotischen Funktion von m41 und m41.1 verknüpft ist. Des Weiteren sollen im Rahmen der vorliegenden Arbeit Virusmutanten mit einem veränderten Lokus m41 konstruiert und charakterisiert werden. Infektionsexperimente mit diesen Virusmutanten ermöglichen es, beispielsweise die Bedeutung des Proteins m41.1 in der *in vivo* Infektion zu untersuchen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Zelllinien und Zellkulturmedien

Tabelle 1: verwendete Zelllinien

Zelllinie	Medium	Beschreibung	Referenz
NIH/3T3	D-MEM 5 % NCS 1 % PS	immortalisierte Zelllinie aus murinen, embryonalen Fibroblasten (MEFs)	ATCC-Nr. CRL-1658
10.1	D-MEM  10 % FCS 1 % PS	spontan immortalisierte Zelllinie aus MEFs von Balb/c Mäusen, p53 wird nicht exprimiert (Deletion in beiden Allelen)	(82)
RAW264.7		Abelson-Maus-Leukämie-Virus-transformierte, murine Makrophagen-ähnliche Zelllinie	ACTT-Nr. TIB-71
HEK293		transformierte, humane Nierenzelllinie, die stabil das E1-Protein des Adenovirus exprimiert	Invitrogen: R705-07
BAK <sup>-/-</sup> MEFs		SV-40 transformierte MEFs, die kein BAK-Protein exprimieren	(83,84)
BAX <sup>-/-</sup> MEFs		SV-40 transformierte MEFs, die kein BAX-Protein exprimieren	

Dulbeccos Modified Eagles Medium (D-MEM) mit Glukose (PAA Laboratories GmbH)

Dulbeccos PBS 1x (PAA Laboratories GmbH)

Trypsin (1:250) (PAA Laboratories GmbH)

Fötale Kälberserum (FCS) (Pan Biotech GmbH)

Serum von neugeborenen Kälbern (NCS) (Pan Biotech GmbH)

Penicillin/Streptomycin (PS) (100x) (PAA Laboratories GmbH)

#### 2.1.2 Viren

Tabelle 2: verwendete Viren

Virus	Abkürzung	Beschreibung (nähere Erläuterung unter 2.2.2.9)	Referenz
MCMV Smith GFP wt	S <sup>GFP</sup> -wt	BAC-basiertes, GFP-exprimierendes MCMV Wildtyp des Stamms Smith	(85)
MCMV Smith GFP m41HA	S <sup>GFP</sup> -m41HA	BAC-basiertes, GFP-exprimierendes MCMV Smith, das ein C-terminal HA-markiertes m41 exprimiert	M. Cam
MCMV Smith <sup>§</sup> GFP HA-Tev m41	S <sup>GFP</sup> -HATEV m41	BAC-basiertes, GFP-exprimierendes MCMV Smith; N-terminal des ORFs m41 wurde ein HA-Marker und einer TEV-Protease-Schnittstelle kloniert und	Abbildung 4

rep. M11L		die M11L-Sequenz wurde im Replacer-Lokus eingesetzt	
MCMV Smith <sup>§</sup> GFP $\Delta$ M45 m41ko	S <sup>§</sup> GFP- $\Delta$ M45-m41ko	BAC-basiertes, GFP-exprimierendes MCMV Smith, in dem die endständige Sequenz des Gens m41 durch die FRT-Kan-FRT-Sequenz ersetzt ist und der ORF M45 durch eine Zeocin-Resistenz; die m41.1-Sequenz ist unverändert	Abbildung 12
MCMV Smith wt	S-wt	BAC-basiertes MCMV Wildtyp des Stamms Smith	(19,86), s. a. Abbildung 20
MCMV Smith <sup>§</sup> m41ko	S <sup>§</sup> -m41ko	BAC-basiertes MCMV Smith, in dem die endständige m41-Sequenz durch die FRT-Kan-FRT-Sequenz ersetzt wurde; die m41.1-Sequenz ist unverändert	M. Cam; s. a. Abbildung 20
MCMV Smith* m41/m41.1 dko	S* $\Delta$ m41	BAC-basiertes MCMV Smith, in dem die Sequenz des Lokus m41 durch die <i>Galk-Kan</i> -Kassette ersetzt wurde	Abbildung 20
MCMV Smith* m41ko	S*m41ko	BAC-basiertes MCMV Smith, mit zusätzlichem Stoppkodon hinter der m41.1-Sequenz und Startkodon-Mutation im Leserahmen von m41; die m41.1-Sequenz ist unverändert	
MCMV Smith* m41.1ko	S*m41.1ko	BAC-basiertes MCMV Smith, in dem durch drei Startkodon-Mutationen die Expression des Proteins m41.1 verhindert wird	
MCMV Smith* Rev	S*R	BAC-basiertes MCMV Smith; revertiertes MCMV S* $\Delta$ m41, d.h. die Wildtyp-Sequenz des Lokus m41 wurde anstelle der <i>Galk-Kan</i> -Kassette eingesetzt	
MCMV K181 wt	K-wt	BAC-basiertes MCMV Wildtyp des Stamms K181	(87); s. a. Abbildung 24
MCMV K181* $\Delta$ m157	K*-wt <sup><math>\Delta</math>m157</sup>	BAC-basiertes MCMV K181, in dem das Gen m157 mit einer Zeocin-Resistenz partiell ersetzt wurde	modifiziert beschrieben in (88); s. a. Abbildung 24
MCMV K181* $\Delta$ m157 m41/m41.1 dko	K* <sup><math>\Delta</math>m157</sup> - $\Delta$ m41	BAC-basiertes MCMV K181 mit Deletion im Gen m157 und der Lokus m41 ist durch die <i>Galk-Kan</i> -Sequenz ersetzt	Abbildung 24
MCMV K181* $\Delta$ m157 m41/m41.1 dko Rev	K* <sup><math>\Delta</math>m157</sup> - $\Delta$ m41/R	BAC-basiertes MCMV K181 mit Deletion im Gen m157; revertiertes K* <sup><math>\Delta</math>m157</sup> - $\Delta$ m41, d.h. die Wildtyp-Sequenz des Lokus m41 wurde anstelle der <i>Galk-Kan</i> -Kassette eingesetzt	
MCMV K181* $\Delta$ m157 m41ko	K* <sup><math>\Delta</math>m157</sup> -m41ko	BAC-basiertes MCMV K181 mit Deletion im Gen m157 und nur die m41.1-Sequenz liegt im Lokus m41 vor	
MCMV K181* $\Delta$ m157 m41ko Rev	K* <sup><math>\Delta</math>m157</sup> -m41ko/R	BAC-basiertes MCMV K181 mit Deletion im Gen m157; revertiertes K* <sup><math>\Delta</math>m157</sup> -m41ko, d.h. die Wildtyp-Sequenz wurde anstelle der <i>Galk-Kan</i> -Kassette (nötiger Zwischenschritt) eingesetzt	
MCMV K181* $\Delta$ m157 m41.1 ko	K* <sup><math>\Delta</math>m157</sup> -m41.1ko	BAC-basiertes MCMV K181 mit Deletion im Gen m157 und drei Startkodon-Mutationen im m41.1, so dass die Expression von m41.1 verhindert wird	
MCMV	K* <sup><math>\Delta</math>m157</sup> -	BAC-basiertes MCMV K181 mit Deletion im Gen	

K181* $\Delta$ m157 m41.1 ko Rev	m41.1ko/R	m157; revertiertes K* $\Delta$ m157-m41.1ko, d.h. die Wildtyp-Sequenz wurde anstelle der <i>Galk-Kan</i> -Kassette (nötiger Zwischenschritt) eingesetzt	
MCMV Smith GFP wt	wt	entspricht S <sup>GFP</sup> -wt	(89)
MCMV Smith GFP $\Delta$ m41	$\Delta$ m41	BAC-basiertes, GFP-exprimierendes MCMV Smith, das anstelle des Lokus m41 die Sequenz der Zeocin-Resistenz trägt	
MCMV Smith GFP m41ko	m41ko	BAC-basiertes, GFP-exprimierendes MCMV Smith, das anstelle des Lokus m41 die Sequenz der Zeocin-Resistenz trägt und in der Replacer-Region die m41.1-Sequenz unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors kodiert	
MCMV Smith GFP m41.1ko	m41.1ko	BAC-basiertes, GFP-exprimierendes MCMV Smith, das eine veränderte Variante des Lokus m41 trägt, in der m41 C-terminal HA-markiert ist und die drei Startkodone des m41.1 verändert wurden.	
MCMV Smith GFP $\Delta$ /M11L	$\Delta$ /M11L	BAC-basiertes, GFP-exprimierendes MCMV Smith, das anstelle des Lokus m41 die Sequenz der Zeocin-Resistenz trägt und in der Replacer-Region das Protein M11L unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors exprimiert	

§ FRT-vermittelte Rekombination

\* *Galk-Kan* -Mutagenese

### 2.1.3 Bakterien und Bakterienkulturmedien

Tabelle 3: verwendete Bakterien

<i>E. coli</i> -Stamm	Beschreibung	Referenz
DH10B	<i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) $\Phi$ 80 <i>dlacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>araD139</i> $\Delta$ ( <i>ara, leu</i> )7697 <i>galU</i> <i>pgl</i> $\Delta$ 8 <i>rpsL</i> <i>nupG</i>	(21,90)
DY380	DH10B $\lambda$ ( <i>cI857ind1</i> ) $\Delta$ {( <i>cro</i> - <i>bioA</i> )<> <i>tetRA</i> } ( <i>TetR</i> ) <i>gal490</i>	(21,24)
SW102	DY380 $\Delta$ <i>galK</i>	(21,25)

**Luria-Bertani Flüssigmedium (LB)** LB-Medium (Lennox)

**Luria-Bertani Agar-Platten** LB-Medium (Lennox), 15 g/ l Agar-Agar

**M9-Medium** 6 g/ l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 g/ l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g/ l NH<sub>4</sub>Cl, 0,5 g/ l NaCl

**5x M36-Medium** 10 g/ l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 68 g/ l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,5 mg/ l FeSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O pH7 mit KOH

**MacConkey-Agar mit Kanamycin** MacConkey-Agar, 50 µg/ ml Kanamycin

**M63/DOG-Minimalplatten** M63 Medium, 1 mM MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, 0,2% Glycerol, 1 mg/ ml D-Biotin, 45 mg/ l L-Leucin, 0,2 % Desoxy-Galaktose (DOG), 15 µg/ ml Chloramphenicol, 15 g/ l Agar-Agar

Die genannten Komponenten wurden von Roth, Sigma-Aldrich, AppliChem oder Merck bezogen.

### 2.1.4 Hefe und Hefekulturmedien

Tabelle 4: verwendete Hefe

Hefe	Beschreibung	Referenz
NMY51	MATa <i>his3delta200</i> <i>trp1-901</i> <i>leu2-3,112</i> <i>ade2</i> <i>LYS2::(lexAop)4-HIS3</i> <i>ura3::(lexAop)8-lacZ</i> ( <i>lexAop</i> )8-ADE2 <i>GAL4</i>	Dualsystems-Biotech

**Hefe-Vollmedium** YPAD-Medium (DualsystemsBiotech) oder YPD-Medium (Roth)

**Hefe-Minimalmedium** SD-AHWL Medium (DualsystemsBiotech) oder Yeast Nitrogen Base Without Amino Acids (Sigma-Aldrich)

Tabelle 5: Zusätze für Hefe-Minimalmedien

Aminosäure/ Chemikalie	Beschreibung	Endkonzentration
Adenin	Adenin-Auxotrophie als Selektionsmarker; spiegelt die Stärke einer Protein-Protein-Interaktion (von <i>Bait</i> und <i>Prey</i> ) im <i>Yeast-two-Hybrid</i> -Verfahren wieder	10 mg/l
L-Leucin	Leucin-Auxotrophie als Selektionsmarker; wird durch das Vorhandensein des <i>Bait</i> -Plasmids kompensiert	100 mg/l
L-Histidin	Histidin-Auxotrophie als Selektionsmarker; die Histidin-Expression wird durch die Interaktion zwischen <i>Bait</i> - und <i>Prey</i> -Protein ausgelöst	20 mg/l
L-Tryptophan	Tryptophan-Auxotrophie als Selektionsmarker; wird durch das Vorhandensein des <i>Prey</i> -Plasmids kompensiert	20 mg/l
3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT)	kompetitiver Inhibitor des Histidin-3-Genprodukts; eingesetzt zur Erhöhung der Selektionsstringenz in Bezug auf die <i>Bait-Prey</i> -Interaktion	5 mM in SD-LWHA/10 mM in SD-LWH

Diese Komponenten wurden bei DualsystemsBiotech (Media Starter Kit 1) oder bei Roth bestellt.

## 2.1.5 Antibiotika

Tabelle 6: verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Arbeitskonzentration	Selektionsorganismus
Ampicillin (Roth)	100 µg/ml	<i>E. coli</i> ; Plasmidselektion
Chloramphenicol (Roth)	15 µg/ml	<i>E. coli</i> ; BAC-Selektion
Kanamycin (Roth)	50 µg/ml	<i>E. coli</i> ; Plasmid- und BAC-Selektion
Zeocin (Invitrogen)	25 µg/ml	<i>E. coli</i> ; Plasmidselektion
Penicillin (PAA)	100 U/ml	Zellkulturmediumzusatz
Streptomycin (PAA)	100 µg/ml	Zellkulturmediumzusatz

## 2.1.6 Oligonukleotide

Tabelle 7: Primer-Sequenzen

Primer	Sequenz 5'→3'	Beschreibung
M45-Zeo fw	GCTAGAGAAGTTCTACGTCGACGTCGGGCC CCTCGTCGAGTTCGCGTGAGAATTCAGTCCT GCTCCTCGGCCA	Die M45-Sequenz wird durch die Sequenz der Zeocin-Resistenz ersetzt; beschrieben in (59)
M45-Zeo rev	TCGTGCAGGCGATGGGGCTCGATCTTGACG GAGCGCACGCACTCATCGAGTGTGACAAT TAATCATCGGCAT	
UNC93B-Flag fw	AAAGGATCCATGGAGGTGGAGCCTCCG	Die UNC93B1-Sequenz wird durch die Primer am 5' mit einer Kozak- und 3' mit einer Flag-Sequenz, flankiert von BamHI- und
UNC93B-Flag rev	AAAGAATTCACCTTGTCATCGTCGTCCTTGTA	

	GTCCTGCTCCTCAGGCCATC	EcoRI-Schnittstellen, ergänzt; zur Klonierung in pcDNA (pcDNA Flag-UNC93B1)
HAm41m41.1ko fw	GGATCCACCATGTACCCATACGACGTCCCA GACTACGCTGGAGACGACGATCGTCGCGG	In der m41-Sequenz wird der Leserahmen von m41.1 durch Mutation der ersten 3 ATGs zu ACGs zerstört. Zur Klonierung in pcDNA wird, mit oder ohne HA-Markierung, die m41-m41.1ko-Sequenz mit BamHI- und EcoRI-Schnittstellen flankiert und am 5' mit einer Kozak-Sequenz ergänzt (pcDNA/HA m41 m41.1ko/HA) vgl. (51)
HAm41m41.1ko rev	GAATTCTCATCTGTCAATGATCACGACGAT CAGGATGACG	
m41HAm41.1ko fw	GGATCCACCATGGGAGACGACGATCGTCGCGG	
m41HAm41.1ko rev	GAATTCTCAAGCGTAGTCTGGGACGTCGTA TGGGTATCTGTCAATGATCACGACGATCAG GATGACG	
m41nt m41.1ko fw	GGATCCACCATGGGAGACGACGATCGTCGCGG	
m41nt m41.1ko rev	GAATTCTCATCTGTCAATGATCACGACGAT CAGGATGACG	
MCMV HA TEV m41 fw	AATAGTCATCCGATGATCGTGTGCGCCGCC GACCGCCCTCCTCCCCAATGAATTCGAAG TTCCTATACT	Primer zur Amplifikation der HA-TEV-m41-FRT-Kan-FRT-Kassette mit homologen Bereichen beidseitig zur Sequenz von $\Delta$ m41; modifiziert beschrieben in (59)
MCMV HA TEV m41 rv	CGCCGTTTCCTCACATTCCGTTGTCGTGCGC AGGTTCCCTCCGAACCTTTGCCACCATGTACC CATACGAC	
m41 in pBT3N fw	ATTAACAAGGCCATTACGGCCATGGGAGAC GATGATCGTCGCGG	Primer zur Klonierung der m41-Sequenz in den <i>Bait</i> -Vektor pBT3N für das <i>Yeast-two-Hybrid</i> -Verfahren
m41 in pBT3N rv	AACTGATTGGCCGAGGCGGCCTCATCTGTC AATGATCACGACGATCAGGATGACG	
x-NubG Bib fw	TTTCTGCACAATATTTCAAGC	Primer zur Sequenzierung des Inserts in den isolierten <i>Prey</i> -Vektoren nach dem Bibliotheksscreen; beschrieben von DualsystemsBiotech
x-NubG Bib rv	CTTGACGAAAATCTGCATGG	
K181 $\Delta$ m157:zeo fw	CGTGGTCAAGCCGGTCGTGTTGTACCAGAA CTCGACTTCGGTCGCGTTCATGTTGACAATT AATCATCGGCAT	Primer zur Generierung des $\Delta$ m157 in den K*-Virusmutanten; modifiziert beschrieben in (88)
K181 $\Delta$ m157:zeo rv	CCTAGTAAAATTACTCTTGATTGTGTTTATC TCGGAACGTGCTGTAACAATCAGTCCTGCT CCTCGGCCA	
fw1 <i>Galk</i> in m41	GTCATCCGATGATCGTGTGCGCCGCCGACC GCCCTCCTCCCCAATTCATCCTGTTGACAA TTAATCATC	Primer um den Lokus m41 durch die <i>Galk</i> - <i>Kan</i> -Sequenz in den K*-Virusmutanten zu ersetzen
rev1 <i>Galk</i> in m41	ACGCCGTTTCCTCACATTCCGTTGTCGTGCG CAGGTTCCCTCCGAACCTTTGCTCAGCAAAA GTTTCGATTTA	
K181 m41ko fw	ACGCCGTTTCCTCACATTCCGTTGTCGTGCG CAGGTTCCCTCCGAACCTTTGATGATCGTCGC GGCGATGAC	Primer um die <i>Galk</i> - <i>Kan</i> -Sequenz im Lokus m41 durch die m41.1-Sequenz

K181 m41ko rv richtig	GTCATCCGATGATCGTGTGCGCCGCCGACC GCCCTCCTCCCCAATTCATCTAACGACGG CGTAGAGCCCC	in den K*-Virusmutanten zu ersetzen
K181 m41.1ko PCR rev	GTCATCCGATGATCGTGTGCGCCGCCGACC GCCCTCCTCCCCAATTCATCTGTCAATGAT CACGACGAT	Primer um die <i>Galk-Kan</i> -Sequenz im Lokus m41 durch die m41-m41.1 ko-Sequenz in den K*-Virusmutanten zu ersetzen
K181 m41.1ko PCR fw	ACGCCGTTTCTCACATTCCGTTGTCGTGCG CAGGTTCTCCGAACCTTTGATGGGAGACG ACGATCG	
fw2 m41 Rev	TCAGAGAGATAATTTGGGTTTA	Primer um den veränderten Lokus m41 durch die m41-Sequenz von MCMV Smith in den K*-Virusmutanten zu ersetzen
rev2 m41 Rev	AACAAACCTTACAAACTATTTTAA	
fw3 m41 Rev Kontrolle	AGACCCGATTGATTTTTATTGA	Primer um den Lokus m41 der K*-Virusmutanten zu sequenzieren
rev3 m41 Rev Kontrolle	TTGATACAAAACCTACACTACTACTA	
<i>Galk</i> in m41.1 CTG m41 fwd	TCACATTCCGTTGTCGTGCGCAGGTTCTCC GAACCTTTGCTGGGAGACGCTGTTGACAA TTAATCATC	Primer um die m41.1-Sequenz durch die <i>Galk-Kan</i> -Sequenz in den S*-Virusmutanten zu ersetzen. Zusätzlich wird eine Mutation des m41-Startkodons und ein zusätzlichen Stoppkodon nach der m41.1-Sequenz eingefügt.
<i>Galk</i> in m41.1 Stopp m41 rev	TCGGGCATGATCTCCGACGAAGATGACGCC TTCCGAGAAACGTTTCATCCTCAG CAAAAGTTCGATTTA	
Smith m41 ko <i>Galk</i> in m41.1 fwd	TCACATTCCGTTGTCGTGCGCAGGTTCTCC GAACCTTTGCTGGGAGACGATGATCGTCCG GGCGATGAC	Primer um die <i>Galk-Kan</i> -Sequenz durch die m41.1-Sequenz in den S*-Virusmutanten zu ersetzen
Smith m41 ko <i>Galk</i> in m41.1 rev	TCGGGCATGATCTCCGACGAAGATGACGCC TTCCGAGGAAACGTTTCATCCTAACGACGG CGTAGAGCCC	
m41.1ko RT-PCR fw	ATGATCGTCGCGGCGAT	Primer zur selektiven Amplifikation der m41.1-Sequenz, aber nicht der m41.1ko-Sequenz bei $T_A=75^\circ\text{C}$
m41.1ko RT-PCR rev	GGAGGGCGCGACGAAAG	

Tabelle 8: Linker-Sequenzen

Linker	Sequenz	Beschreibung
HA-TEV-Linker fw	GTACCACCATGTACCCATACGACGTCCCAG ACTACGCTGGCGGCGGCGAGAACCTCTATT TTCAGG	HA-TEV-Linker zur Klonierung C-terminal von m41 im Plasmid pcDNAm41-FRT-Kan-FRT mit den Sequenzbausteinen: KpnI-Start-HA-Spacer-TEV-BamHI
HA-TEV-Linker rv	GATCCCTGAAAATAGAGGTTCTCGCCGCCG CCAGCGTAGTCTGGGACGTCGTATGGGTAC ATGGTGGTACGTAC	

## 2.1.7 Plasmide und BACs

Tabelle 9: verwendete Plasmide

Plasmid	Abkürzung/ Größe	Bakterium	Beschreibung	Referenz
pSLFRT-Kan		DH10B	Plasmid zur Amplifikation der FRT-Km <sup>R</sup> -FRT-Sequenz (FRT-Kan-FRT); 4,3kb, high copy, Km <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>	(91)
pKD46		DH10B	Plasmid zur Arabinose-abhängigen Expression der $\lambda$ -Red-Phagengene gam, bet und exo; 6 kb, high copy, Ap <sup>R</sup>	(22,23)
pCP20		DH10B	Plasmid zur Temperatur-abhängigen Expression der Flp-Rekombinase; 9,4 kb, high copy, Ap <sup>R</sup>	(22,23)
pGalK-Kan		DH10B	Plasmid zur Amplifikation der <i>Galk</i> -Km <sup>R</sup> -Sequenz ( <i>Galk</i> -Kan) 5,4kb, high copy, Km <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>	D. Yu <sup>1</sup>
pZeo		DH10B	Plasmid zur Amplifikation der Zeo <sup>R</sup> -Sequenz; 2,8kb, high copy, Zeo <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>	W. Bresnahan <sup>2</sup>
pCAGGS mCasp2	pC-Casp2/ 51, 32-33, 19 kDa	DH10B	Plasmid zur Expression der murinen Caspase-2 in Säugerzellen, 8,4 kb, high copy, Ap <sup>R</sup>	(92)
pcDNA3	pc	DH10B	Plasmid zur Proteinexpression in Säugerzellen, 5,4 kb, high copy, Ap <sup>R</sup> , Neo <sup>R</sup>	Invitrogen
pcDNA HAm41 m41.1ko	pc-HA-m41/ 15-20 kDa	DH10B	Plasmid zur Expression des N-terminal HA-markierten Proteins m41; m41.1 wird nicht exprimiert, da die ersten drei Startkodone mutiert sind. 5,8kb, high copy, Ap <sup>R</sup> , Neo <sup>R</sup>	diese Arbeit
pcDNA m41 m41.1ko	pc-m41/ 15-20 kDa	DH10B	Plasmid zur Expression des Proteins m41; m41.1 wird nicht exprimiert, da die ersten drei Startkodone mutiert sind. 5,8kb, high copy, Ap <sup>R</sup> , Neo <sup>R</sup>	diese Arbeit
pcDNA m41 HA m41.1ko	pc-m41-HA/ 15-20 kDa	DH10B	Plasmid zur Expression des C-terminal HA-markierten Proteins m41; m41.1 wird nicht exprimiert, da die ersten drei Startkodone mutiert sind. 5,8kb, high copy, Ap <sup>R</sup> , Neo <sup>R</sup>	diese Arbeit
pcDNA HA BCL <sub>XL</sub>	pc-HA-BCL <sub>XL</sub> / 30 kDa	DH10B	Plasmid zur Expression des HA-markiertem BCL <sub>XL</sub> -Proteins; 6,1 kb, high copy, Ap <sup>R</sup> , Neo <sup>R</sup>	M. Cam <sup>3</sup>
pcDNA IRE1 Tev-HA	pc-IRE1-HA/ 130 kDa	DH10B	Plasmid zur Expression des HA-markierten, TEV-Schnittstelle fusionierten IRE-1 Proteins; 8,7 kb, high copy, Ap <sup>R</sup> , Neo <sup>R</sup>	S. Stahl <sup>3</sup>
pcDNA UNC93B1-Flag		DH10B	Plasmid zur Expression des Flag-markierten UNC93B1-Proteins; 7,2 kb, high copy, Ap <sup>R</sup> , Neo <sup>R</sup>	diese Arbeit
pcDNA Flag-BAK	pc Flag-BAK/ 23 kDa	DH10B	Plasmid zur Expression des Flag-markierten Proteins BAK; high copy, Ap <sup>R</sup> , Neo <sup>R</sup>	(89)
pcDNA HA m41.1	pc HA-m41.1/ <10 kDa	DH10B	Plasmid zur Expression des HA-markierten Proteins m41.1; high copy, Ap <sup>R</sup> , Neo <sup>R</sup>	(89)
pcDNA HA	pc HA-Kontrolle	DH10B	Plasmid zur Expression eines HA-markierten Proteins, das nicht exprimiert	(89)

Kontrolle			wird; verwendet als pcDNA Kontrolle; high copy, Ap <sup>R</sup> , Neo <sup>R</sup>	
pcDNA HA m41	pc HA-m41/ 15-20 kDa	DH10B	Plasmid zur Expression des HA-markierten Proteins m41; 6,1 kb, high copy, Ap <sup>R</sup> , Neo <sup>R</sup>	(89)

Ap<sup>R</sup>: Ampicillin-Resistenz      Km<sup>R</sup> (*Kan*): Kanamycin-Resistenz      Zeo<sup>R</sup>: Zeocin-Resistenz

Cm<sup>R</sup>: Chloramphenicol-Resistenz      *GalK*: Galaktokinase

1: Washington University School of Medicine, USA

2: University of Texas Medical Branch, Galveston, USA

3: Arbeitsgruppe von Wolfram Brune, HPI, Hamburg

*Tabelle 10: verwendete BACs*

BAC (Beschreibung und Referenz s. Tabelle 2: verwendete Viren)	Bakterium
BAC Smith GFP wt	DY380
BAC Smith <sup>§</sup> GFP Δm41 rep. Flag-M11L	DH10B
BAC Smith <sup>§</sup> GFP HA-Tev m41 FRT-Kan-FRT rep. Flag-M11L	DH10B
BAC Smith <sup>§</sup> GFP m41 in situ ko FRT Kan FRT	DH10B
BAC Smith <sup>§</sup> GFP ΔM45 m41ko	DH10B
BAC Smith wt	DY380
BAC Smith <sup>§</sup> m41ko	SW102
BAC Smith* m41/m41.1 dko	SW102
BAC Smith* m41ko	SW102
BAC Smith* m41.1ko	SW102
BAC Smith* Rev	SW102
BAC K181 wt	SW102
BAC K181* Δm157	SW102
BAC K181* Δm157 m41/m41.1 dko	SW102
BAC K181* Δm157 m41/m41.1 dko Rev	SW102
BAC K181* Δm157 m41ko	SW102
BAC K181* Δm157 m41ko Rev	SW102
BAC K181* Δm157 m41.1 ko	SW102
BAC K181* Δm157 m41.1 ko Rev	SW102

## 2.1.8 Antikörper

*Tabelle 11: verwendete Primärantikörper*

Antigen	Abkürzung, Klon	hergestellt in	Verdünnung	Beschreibung/Referenz
β-Aktin	Aktin, Ac74	Maus	WB: 1:1000	Sigma
Caspase-2	pro-C2, C2-p19, 11B4	Ratte	WB: 1:200 IP: 1:500	Millipore

Caspase-3	pro-C3, C3-p17, 8G10	Kaninchen	WB: 1:1000	Cell Signaling
IE1	IE1, Croma 101	Maus	WB: 1:1000	Stipan Jonic, University of Rijeka, Croatia
E1	E1, Croma 103	Maus	WB: 1:1000	Stipan Jonic, University of Rijeka, Croatia
gB	gB, 2E8	Maus	WB: 1:1000	Lambert Loh, University of Saskatchewan, Canada
HA	HA, 16B12	Maus	WB: 1:1000	Hiss Diagnostics
HA	HA, 3F10	Ratte	IF: 1:200	Roche
HA	HA, Kaninchen	Kaninchen	IP: 1:500	Sigma
Flag	Flag, M2	Maus	WB: 1:1000 IF: 1:500	Invitrogen
gs-28	gs-28, FL-250 Golgi SNARE 28 kDa	Kaninchen	IF: 1:200	Santa Cruz
M45	M45, crude serum	Kaninchen	WB: 1:1000	(93)
m41	m41, 2A6	Maus	WB: 1:1000 IF: 1:500	(51)

Tabelle 12: verwendete Sekundärantikörper

Antigen	Bezeichnung	Verdünnung	Quelle
IgG aus Maus	anti Maus-HRP	WB: 1:1000	Dianova, Dako
IgG aus Ratte	anti Ratte-HRP	WB: 1:1000	Dianova, Dako
IgG aus Kaninchen	anti Kaninchen-HRP	WB: 1:1000	Dianova, Dako
IgG aus Maus	anti Maus-Alexa 488	IF: 1:1000	Invitrogen
IgG aus Ratte	anti Ratte-Alexa 568	IF: 1:1000	Invitrogen
IgG aus Kaninchen	anti Kaninchen-Alexa 594	IF: 1:1000	Invitrogen

## 2.1.9 Größenstandards

DNA-Marker: GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas)

Protein-Marker: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas)

### 2.1.10 Enzyme

AcTEV-Protease (Invitrogen)

FastDigest Restriktionsenzyme (Fermentas)

T4 DNA-Ligase (Fermentas)

DreamTaq Green DNA Polymerase (Fermentas)

Proteinase K (Fermentas)

Platinum® Taq DNA Polymerase recombinant (Invitrogen)

RNaseA (Roth)

### 2.1.11 Kits

innuPREP RNA Mini Kit (Analytic Jena AG)  
 NucleoSpin<sup>®</sup> ExtractII (Machery-Nagel)  
 NukleoBond<sup>®</sup> Xtra Midi (Machery-Nagel)  
 In situ Cell Death Detection Kit (TMRred/TUNEL) (Roche)  
 ECL Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare)  
 ECL Advance Western Blotting Detection Kit (GE Healthcare)  
 BCA Protein Assay Kit (Perbio)  
 Protease Inhibitor Cocktail "Complete Mini" (Roche)  
 QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen)

### 2.1.12 Puffer und Lösungen

#### DNA-Extraktion

S1-Resuspension	50 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 µg/ ml RNaseA Lagerung bei 4°C
S2-Lyse	200 mM NaOH; 1% SDS Lagerung bei RT
S3-Neutralisation	2,8 M Kaliumacetat pH 5,1 (mit KOH) Lagerung bei 4°C
TE-Puffer	10 mM Tris/ HCl pH 7,5, 1 mM EDTA

#### Gelelektrophorese

50x TAE	2 M Tris Base; 5,7 % Essigsäure; 50 mM EDTA pH 8 Lagerung bei RT
5x TBE	445 mM Tris Base; 445 mM Borsäure; 20 mM EDTA pH 8 Lagerung bei RT (wird 1:10 verdünnt)
6x Orange Ladepuffer	0,2 % OrangeG, 60 mM EDTA, 60 % Glycerin Lagerung bei -20°C

#### SDS-PAGE & Western Blot

Tritonpuffer	0,15 M NaCl, 0,05 M Tris-HCl pH 7,5, 1 % Triton-X-100 Lagerung bei 4°C kurz vor der Verwendung 1 Tablette Complete Mini in 10 ml Puffer lösen
Tricin-Gelpuffer	3 M Tris-HCl pH 8,5, 0,3 % SDS Lagerung bei 4°C oder RT
10x Anodenpuffer	2 M Tris-HCl pH 8,9 Lagerung bei RT
5x Kathodenpuffer	0,5 M Tris, 0,5 M Tricin, 0,5% SDS Lagerung bei RT
2x Proteinprobenpuffer	125 mM Tris/HCl, 4 % SDS, 20 % Glycerin, 10 % β-Mercaptoethanol, 0,05 % Bromphenolblau
4x Proteinprobenpuffer	0,3 M Tris pH 6,8, 12 % SDS, 40 % Glycerin, 200 mM DTT, 1 Spatelspitze Bromphenolblau

Transferpuffer für Nitrocellulose-Membranen	50 mM Tris, 40 mM Glycin, 0,04 % SDS, 20 % Methanol Lagerung bei RT
Transferpuffer für PVDF-Membranen	AnodeI: 0,3 M Tris pH 10,4, 40 % Methanol AnodeII: 25 mM Tris pH 10,4, 40 % Methanol Kathode: 25 mM Tris pH 9,4, 40 mM Glycin, 10 % Methanol Lagerung bei RT
Ponceau S-Lösung	0,1 % Ponceau S, 5 % Essigsäure Lagerung bei RT
Waschpuffer für Western Blot-Membranen	PBS mit 0,1-0,5 % Tween-20 Lagerung bei RT
Block-Lösung	5 % Magermilchpulver oder BSA in PBS

#### **Immunfluoreszenz/TUNEL-Assay**

Beschichtungs-Lösung	0,4 % Gelatine in PBS
Fixier-Lösung	3 % Paraformaldehyd in PBS
Aldehyd-Block-Lösung	50 mM Ammoniumchlorid
Permeabilisierungs-Lösung	0,3 % Triton-X-100 in PBS
Block-Lösung	0,2 % Gelatine in PBS

#### **Silbergel**

Fixier-Lösung	50 % Ethanol (absolut), 12 % Essigsäure, 0,05 % Formaldehyd (35 %) gelöst in Aqua bidest.
Wasch-Lösung	20 % Ethanol (absolut) gelöst in Aqua bidest.
Sensibilisierungs-Lösung	0,02 % (w/v) Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> gelöst in Aqua bidest.
Färbe-Lösung	0,2 % (w/v) AgNO <sub>3</sub> , 0,076 % Formaldehyd (35 %) gelöst in Aqua bidest. und auf 4 °C kühlen
Entwickler-Lösung	6 % (w/v) Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 0,004 % (w/v) Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , 0,05 % Formaldehyd (35 %) gelöst in Aqua bidest.
Stopper-Lösung	12 % Essigsäure gelöst in Aqua bidest.
Trocknungs-Lösung	20 % Ethanol (absolut) gelöst in Aqua bidest.

### **2.1.13 Chemikalien**

Die aufgeführten Chemikalien wurden, insofern nicht abweichend erwähnt, von Roth, Sigma-Aldrich oder AppliChem in Analysequalität bezogen.

Actinomycin D	Kaliumhydroxid-Lösung (KOH)
Agar-Agar	Kaliumphosphat
Agarose	Magnesiumsulfat
Ammoniumchlorid	Methanol
Ammoniumsulfat	Milchpulver (Sucofin)
Aqua Poly/Mount (Polyscience Inc.)	Natriumcarbonat
β-Mercaptoethanol	Natriumchlorid
Borsäure	Natriumdodecylsulfat (SDS)
Bromphenolblau	Natriumhydrogenphosphat

Calciumchlorid	Natriumthiosulfat
DAPI	Natronlauge (NaOH)
D-Biotin	Orange G
Desoxy-D-Galaktose (DOG)	Paraformaldehyd
D-Galaktose	Polybrene
Doxorubicin (DXR)	Polyfect
Dimethylsulfoxid	Ponceau S
EDTA	Rinderserumalbumin (BSA)
Eisensulfat	Roti®-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol
Essigsäure	Rotiphorese Gel 30:1
Ethanol absolut (Geyer Th. GmbH & Co.KG)	Salzsäure (HCl)
Ethidiumbromid	Staurosporin (STS)
Formaldehyd	Silbernitrat
Gelatine	TEMED
Glycerol	Trizma (Tris)
Glycin	Triton-X-100
Isopropanol	Tween-20
Kaliumacetat	

#### 2.1.14 Verbrauchsmaterialien

Cryo-Röhrchen 2ml steril (Roth)  
Deckgläser Dmr. 18mm (Roth)  
Elektroporationsküvetten 2mm (Eurogentec)  
Hybond ECL/ Nitrocellulose (GE Healthcare)  
Objektträger 76x26mm (Roth)  
Pipettenspitzen (VWR, Roth, Greiner)  
PVDF-Membran 0,22µm (Millipore)  
Reaktionsgefäße (Roth, Hartenstein, Biozym, VWR)  
Röntgenfilme (X-Ray Retina)  
Spritzenfilter 0,22µm oder 0,45µm (Roth, Hartenstein)  
Whatman Papier 3mm (Roth)  
Wasserbadschutz-Lösung (Hartenstein)  
Zellkulturschaber (VWR)  
Zellkulturwaren (Greiner, Nunc, Sarstedt, TPP, Renner, Biochrom)

#### 2.1.15 Geräte

Axiovert Mikroskope 25, 200M, PrimoVert (Zeiss)  
Bakterienbrutschränke  
Bakterienschüttelinkubator  
Bioruptor UCD-200TM (Diagenade)

Chemilumineszenzdetektion Fusion (Peqlab)  
Finnpette® Multistep (ThermoFisher)  
Geldokumentation XR+ & Image Lab (Bio-Rad)  
GeneAmp® PCR System 2400  
Gene Pulser XCell (Bio-Rad)  
Glaspipetten (Brandt)  
Impfösen (Hartenstein)  
Konfokales Laserscan Mikroskop Axioplan LSM510 META (Zeiss)  
-20°C Kühlblöcke (Neolab)  
Magnetrührer (IKA Werke)  
Mikrozentrifugen (Eppendorf, Hereus)  
Mini-Protean Tetra Campignon (BioRad)  
Multiplate Absorbance/Fluorescence Reader (Tecan, Omega)  
Nanodrop (Peqlab)  
PerfectBlue Gelsystem Mini S & Maxi S (Peqlab)  
pH-Meter 211 (Hanna Instruments)  
Photometer Ultraspec 10 (GE Healthcare)  
Pipettboy acu (IBS)  
Pipetten (0,2-1000 µl) (Gilson)  
Röntgenfilmentwickler X-Omat (Kodak)  
Röntgenfilm-Kassette (Dr. Goos-Suprema)  
SL-4 3500 WL Molecular Imaging  
Spannungsgenerator Electrophoresis Power Supply EPS 301 (GE Healthcare)  
TC10 Automated Cell Counter (Bio-Rad)  
Thermomixer (Eppendorf)  
Transblot® Semi-dry Transfer Cell (Bio-Rad)  
Überkopfschüttler Rotator SB2 (Stuart)  
vertikale SDS-PAGE mit Höfer SE 400 Vertical Unit (GE Healthcare)  
Vortex Mixer (Neolab, Scientific Industries)  
Zellkulturinkubator CO<sub>2</sub> HeraCell (ThermoFisher)  
Zellkulturwerkbank HeraSafe (ThermoFisher)  
Zellkulturzentrifuge 5810R (Eppendorf)  
Zentrifuge Sorvall® RC 5C Plus (ThermoFisher)

### 2.1.16 Programme

ABI Viewer (Applied Biosystems)	LSM Image Browser (Carl Zeiss)
Adobe Photoshop CS5 (Adobe)	Microsoft Office 2003/2007 (Microsoft)
BLAST (NCBI)	NEB cutter (New England Biolabs)
CLC DNAWorkbench 5 (CLCbio)	

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkulturmethoden und Virusanzucht

Die Zellkultur wurde stets unter sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Die Zellkultivierung erfolgte in Zellkulturinkubatoren bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>.

#### 2.2.1.1 Zellkultur: Pflege, Einfrieren und Auftauen von Zellen

Alle verwendeten Zelllinien (s. Tabelle 1) wurden in DMEM (4,5 g Glukose/ l) mit L-Glutamin, ergänzt durch 10 % fötales Kälberserum (FCS) oder 5 % Serum aus neugeborenen Kälbern (NCS) und 1 % Penicillin/Streptomycin (PS), kultiviert. Die Zellen wurden regelmäßig gesplittet, sobald sie in den verwendeten Zellkulturschalen nahezu konfluent gewachsen waren. Das Ablösen der Zellen erfolgte mittels Trypsinieren oder durch Abschaben mit einem Zellkulturschaber. Alle Zellen wurden zuvor vom Medium befreit und mit PBS gewaschen. HEK293, 10.1-, NIH/3T3-Fibroblasten und MEFs wurden mit Trypsin abgelöst. RAW264.7-Makrophagen wurden durch Abschaben in Suspension gebracht. Das Splitverhältnis variierte nach dem Zustand der Zellen und der gewünschten Verwendungshäufigkeit. Es war nur bei den RAW264.7-Makrophagen darauf zu achten, dass sie nicht unter 10 %iger Konfluenz wieder ausgesät wurden.

Zur Langzeitlagerung wurden die verwendeten Zelllinien in flüssigem Stickstoff eingefroren. Hierfür wurden die Zellen wie oben beschrieben von einer subkonfluent bewachsenen 15cm-Schale abgelöst, in Medium aufgenommen und bei 1065 g fünf Minuten lang bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Das Pellet einer 15cm-Schale wurde in 3 ml FCS/ DMSO (9:1) aufgenommen und je 1 ml in ein Kryoröhrchen aliquotiert. Die Kryoröhrchen wurden zuerst für 2-4 Tage in einem Styroporbehälter bei -80 °C gefrostet und anschließend in den flüssigen Stickstofftank (-196 °C) zur Langzeitlagerung überführt. Aufgetaut wurden die Zellen eines Kryoröhrchens, indem die Zellen bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut wurden, um umgehend in 50 ml DMEM (10 % FCS, 1 % PS) aufgenommen zu werden. Die Zellen wurden abermals pelletiert und in 10 ml frischem DMEM (10 % FCS, 1 % PS) aufgenommen und in einer 10cm-Schale ausgesät.

#### 2.2.1.2 Transfektion und Virusrekonstitution

Drei unterschiedliche Transfektionsmethoden wurden in dieser Arbeit angewandt. Plasmid-DNA wurde durch Polyethylenimin (PEI)- und Calcium-Phosphat (CaPO<sub>4</sub>)-vermittelte Transfektion in HEK293-Zellen transfiziert. Die Transfektion der HEK293 für die Immunpräzipitation des Proteins m41.1 wurde mit CaPO<sub>4</sub> durchgeführt. Alle anderen Transfektionen der HEK293 wurden durch PEI vermittelt. BAC-DNA zur

Rekonstitution der Virusmutanten wurde mittels Polyfect in 10.1-Fibroblasten transfiziert.

#### *Transfektion von HEK293 mit PEI oder CaPO<sub>4</sub>*

Zur CaPO<sub>4</sub>-vermittelten Transfektion der HEK293-Zellen wurden  $1,5 \times 10^6$  Zellen in einer 10cm-Zellkulturschale mit 20 µg Plasmid-DNA transfiziert. Für die Transfektion wurde die DNA mit Wasser auf 1103 µl ergänzt und mit 164 µl CaCl<sub>2</sub> gemischt. Das DNA/ CaCl<sub>2</sub>-Gemisch wurde unter vortexen in 1350 µl 2 x HBS getropft und 30 Minuten lang bei RT inkubiert. Danach wurde das Transfektionsgemisch auf die Zellen aufgetropft. Frühestens nach 6 Stunden wurde die 10 ml DMEM (10 % FCS, 1 % PS) durch frisches Medium ersetzt.

Zur PEI-vermittelten Transfektion von HEK293 wurden Plasmid-DNA und PEI im Verhältnis 1:4 eingesetzt. So wurden zur Transfektion einer subkonfluent bewachsenen 10cm-Schale 8 µg Plasmid-DNA und 32 µl PEI separat in 500 µl DMEM aufgenommen, gevortext und für 5 Minuten bei RT inkubiert. Der DNA-Mix wurde dem PEI-Mix hinzugefügt, gevortext und abermals 25 Minuten lang bei RT stehen gelassen. Der Transfektions-Mix wurde anschließend auf die HEK293-Zellen, kultiviert in 9 ml DMEM (10 % FCS, 1 % PS), aufgetropft. Die Ernte der transfizierten HEK293 erfolgt zwischen 25 und 48 Stunden nach der Transfektion. Frühe Zeitpunkte wurden nach der Transfektion proapoptotischer Proteine wie BAK gewählt und späte Zeitpunkte bei geringem Expressionslevel der transfizierten Proteine.

#### *Transfektion von 10.1-Fibroblasten mit Polyfect*

Die Erstellung der Virusmutanten wurde am Virusgenom durchgeführt, das als BAC in *E. coli*-Bakterien vorlag. Um ein Virus aus einem BAC zu rekonstituieren, wurde das BAC in murine 10.1-Fibroblasten transfiziert. In der Zelle entspricht das BAC einem zirkularisierten Zwischenprodukt der viralen DNA in der Virus-Replikation und führt zur Expression infektiöser Viren (19). Die Transfektion wurde entsprechend der Herstellerangaben von Polyfect (Qiagen) für die Transfektion von NIH/3T3-Zellen in einer 6-Loch-Platte durchgeführt. Abweichend wurden pro 6-Loch-Ansatz 3 µg BAC-DNA eingesetzt. Die transfizierten Zellen wurden bis auf eine 15cm-Schale expandiert und hier einmal 1:10 gesplittet. Hatten sich bis dahin keine Virusplaques gebildet, wurde der Ansatz wiederholt. Positive Transfektionen mit Virusplaques wurden auf acht bis zehn 15cm-Schalen expandiert und als initialer Virusstock geerntet und titriert.

#### 2.2.1.3 Virusanzucht, Bestimmung der TCID<sub>50</sub>/ ml und Infektion

Zur Virusanzucht wurden meist zehn 15cm-Schalen 5-7 Tage lang kultiviert. Für jede Schale wurden  $1,5 \times 10^6$  10.1-Fibroblasten in gut 20 ml DMEM (10 % FCS, 1 % PS) aufgenommen und in Suspension mit einer MOI (*multiplicity of infection*) von TCID<sub>50</sub>= 0,02 infiziert. In der folgenden Zellkultivierung über 3-5 Tage wurde ein konfluent, zu

100 % infizierter Zellrasen angestrebt und ggf. durch hinzufügen von Zellen oder Virus erreicht. Nach 3-5 Tagen wurde das Medium gewechselt und nach 2 weiteren Tagen wurde das Virus aus dem Zellkulturüberstand geerntet. Die Ernte erfolgte durch zwei Zentrifugationsschritte. Im ersten Zentrifugationsschritt (5500 g; 10 Minuten; 4 °C) wurden die Zelltrümmer pelletiert. Der Überstand wurde in der zweiten Zentrifugation (25000 g; mind. 3 Stunden; 4 °C) genutzt, um das Virus zu pelletieren. Das Pellet wurde in 1 ml DMEM (10 % FCS, 1 % PS) für mind. 3 Stunden gequollen und à 50-100 µl aliquotiert. Die Aliquots wurden bei -80 °C gelagert. Zur Bestimmung des erreichten Virustiters wurde die TCID<sub>50</sub>-Methode angewandt. Die TCID<sub>50</sub>-Methode ermöglicht die Bestimmung der Virusmenge, die sich in einem Milliliter befindet und in 50% der Zellen einen zytopathischen Effekt (CPE) hervorruft. Der CPE beschreibt im Fall von MCMV, dass sich infizierte, adhärenz Zellen abrunden und sich im weiteren Verlauf ablösen, so dass ein Virusfokus entsteht. Zur Bestimmung des Virustiters wurden 1000 10.1-Fibroblasten pro 96er-Loch in 100 µl Medium ausgesät. Das Virus wurde ausgehend von einer initialen 1:1000 Verdünnung achtmal dekadisch verdünnt. Mit jeder Verdünnungsstufe wurden 2 x 12 96er-Loch mit 100 µl infiziert. Dieser Doppelansatz wurde durchgeführt, um den Virustiter mit und ohne *centrifugal enhancement* zu bestimmen. Ein Ansatz wurde bei 1065 g 30 Minuten lang bei 37 °C zentrifugiert. Der andere Ansatz wurde nach der Infektion direkt inkubiert. Das *centrifugal enhancement* ermöglicht es, die Infektionseffizienz um bis zu eine log-Stufe zu erhöhen, im Vergleich zu nicht zentrifugierten Infektionen (94). 5-7 Tage nach der Infektion wurde am Mikroskop ausgelesen, wie viele 96er-Loch pro Verdünnungsstufe CPE aufwiesen. Die Datenauswertung erfolgte nach der Spearman-Kärber-Analyse (95,96). Insofern nicht anders aufgeführt, wurden in dieser Arbeit 10.1-Fibroblasten mit einer MOI von TCID<sub>50</sub>= 3 oder 5 infiziert, MEFs mit einer MOI von TCID<sub>50</sub>= 7 und RAW264.7-Makrophagen mit einer MOI von TCID<sub>50</sub>= 10.

#### 2.2.1.4 Virusreplikationskinetik

Eine Replikationskinetik ist die Methode zur Untersuchung von Wachstumsdefekten einer Virusmutante in einem speziellen Zelltyp. In dieser Arbeit wurde das Replikationsverhalten in 10.1-Fibroblasten untersucht. Hierfür wurden je 10000 10.1-Zellen in einem 6-Loch ausgesät und mit der MOI von TCID<sub>50</sub>= 0,02 infiziert. Vier Stunden nach der Infektion (hpi) wurde viermal mit PBS gewaschen und neues Medium auf die Zellen gegeben. An den Tagen 1, 3, 5, 7, 9, 11 und 13 nach der Infektion (dpi) wurden bei jedem 6-Loch-Ansatz zweimal 500 µl Überstand abgenommen und das Medium gewechselt. Die Überstände wurden bei -80 °C gelagert. Der Virustiter in den Überständen wurde wie unter 2.2.1.3 beschrieben ermittelt und graphisch als Wachstumskurve dargestellt.

### 2.2.1.5 Untersuchung der Viabilität von Zellen

Der Viabilitäts-Assay (oft auch MTS-Assay genannt) spiegelt die Viabilität, genauer gesagt, die Verfügbarkeit reduzierter Reduktionsäquivalente, der Zellen wieder. In diesem Assay wird ein gelbes Substrat durch den Zellmetabolismus zu einem braunen Produkt reduziert. Der Farbumschlag wird gemessen und als Maß für die Viabilität der Zellen im Balkendiagramm ausgewertet. Die Durchführung erfolgte entsprechend der Herstellerangaben (Promega) zum *CellTiter 96<sup>®</sup> One Solution Cell Proliferation Assay*.

## 2.2.2 Molekulargenetische Methoden

### 2.2.2.1 Extraktion von Plasmid- oder BAC-DNA

Die Extraktion von Plasmid- und BAC-DNA im kleinen Maßstab erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse mit anschließender Alkoholfällung. Die Präparation im mittleren Maßstab umfasste dem Herstellerprotokoll entsprechend die alkalische Lyse und eine Anionentauscher-Matrix zur Extraktion der DNA.

#### *Extraktion von Plasmid- oder BAC-DNA im kleinen Maßstab*

Zur Extraktion von Plasmid-DNA (BAC-DNA) im kleinen Maßstab wurden 2 ml (4 ml) Bakterienkultur für 10 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit in der Tischzentrifuge und 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 150 µl (300 µl) S1-Puffer aufgenommen. Die Lyse erfolgte durch hinzufügen von 150 µl (300 µl) S2-Puffer und Inkubation bei RT für 5 Minuten. 150 µl (300 µl) S3-Puffer neutralisierten die Reaktion während der Inkubation auf Eis über 7 Minuten. Ausgeflockte Substanzen wurden durch Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit und 4 °C präzipitiert. Der Überstand wurde mit der 0,8fachen Menge Isopropanol gemischt, um die DNA durch eine weitere Zentrifugation bei 4 °C und maximaler Geschwindigkeit in 30 Minuten zu fällen. Das DNA-Pellet wurde mit 300 µl 70 %igem Ethanol gewaschen und anschließend bei 50 °C getrocknet. Resuspendiert wurde in 50 µl TE-Puffer.

Die DNA-Präparation im kleinen Maßstab wurde für Restriktionsanalysen eingesetzt. Insofern eine reinere DNA-Präparation gebraucht wurde, z. B. zur Transfektion, Bestimmung der DNA-Konzentration oder zur Sequenzierung, wurde die DNA im mittleren Maßstab aufgearbeitet.

#### *Extraktion von Plasmid- oder BAC-DNA im mittleren Maßstab*

Die Extraktion im mittleren Maßstab wurde entsprechend der Herstellerangaben zum *NucleoBond Xtra Midi Kit* durchgeführt. BAC-DNA wurde folgend der Anleitung für *low-copy* Plasmide aufgearbeitet.

Die abschließende Aufnahme des DNA-Pellets erfolgte in 100-500 µl Wasser oder TE je nach erwarteter Ausbeute und anschließendem Verwendungszweck.

#### 2.2.2.2 Extraktion von Hefe-DNA und Retransformation

Im Rahmen des *Y2H*-Verfahrens wurde Plasmid-DNA aus Hefen isoliert. Die aus Hefen zu gewinnende Plasmid-DNA-Menge ist sehr gering. Deshalb wurde die Plasmid-DNA zur Amplifikation in Bakterien retransformiert, um eine ausreichende Menge der Plasmid-DNA für eine Restriktions- und Sequenzanalyse zur Verfügung zu haben.

Die Extraktion der Plasmid-DNA aus Hefen wurde nach dem Protokoll von Tim Finsterbusch (RKI, Berlin) durchgeführt. Hierzu wurden 6 ml Hefekultur in Selektionsmedium über 36 Stunden im Schüttelinkubator bei 37 °C angezogen. Die Hefen wurden in einer Tischzentrifuge pelletiert und in 50 µl Wasser aufgenommen. Zum Abbau der Hefezellwand wurden 10 µl Lyticase (5 µg/ µl) hinzugefügt, gevortext und 1 Stunde lang bei 37 °C inkubiert. Anschließend ergänzten 10 µl 20 %iges SDS den Ansatz. Eine Minute lang wurde gevortext, die Proben wurden bei -20 °C eingefroren, bei RT aufgetaut und erneut gevortext. Diese Suspension wurde mit P1-Puffer aus dem *QIAprep Spin Miniprep Kit* auf 250 µl aufgefüllt. Die folgende Plasmid-DNA Extraktion erfolgte entsprechend der Herstellerangaben. Die Plasmid-DNA wurde in 30-50 µl Elutionspuffer eluiert, in *E. coli* DH10B elektroporiert (s. 2.2.2.8) und am nächsten Tag konnten Klone zur Anfertigung von DNA-Präparationen im kleinen Maßstab (Amplifikationsschritt) angesetzt werden (beschrieben unter 2.2.2.1). Die extrahierte Plasmid-DNA wurde im Restriktionsverdau analysiert (s. 2.2.2.4).

#### 2.2.2.3 Extraktion von Virion-DNA

Mithilfe der BAC-Mutagenese wurde das Virusgenom in *E. coli*-Bakterien verändert. Das veränderte Virusgenom wurde in Fibroblasten zu veränderten Viren rekonstituiert. Die Extraktion der Virion-DNA ermöglicht die direkte Kontrolle der Klonierung und der DNA-Integrität rekonstituierter Viren.

Virion-DNA wurde durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion mit anschließender Präzipitation der viralen DNA durch Salz und Alkohol gewonnen. Begonnen wurde mit der Herstellung eines Virusstocks in fünf bis acht 15cm-Schalen. Das geerntete Viruspellet (vgl. 2.2.1.3) wurde in 2,7 ml TE9-Puffer aufgenommen und über Nacht auf Eis gequollen. 10 µl Proteinase K (900 u/ ml; Fermentas), 150 µl Wasser und 150 µl 20 %iges SDS wurden dem Ansatz hinzugefügt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 3 ml Roti<sup>®</sup>-Phenol. Die Mischung wurde in ein *Phase Lock Gel Light* 15ml-Röhrchen pipettiert und 10 Minuten bei 3220 g und RT zentrifugiert. Die obere, DNA-beinhaltende, wässrige Phase wurde mit 300 µl 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,2) und 7 ml eiskaltem, purem Ethanol ergänzt, um die DNA bei 15000 g und 4 °C innerhalb von 30 Minuten durch Zentrifugation zu fällen.

Das DNA-Pellet wurde in ein 1,5ml-Gefäß überführt, 300 µl 70 %iger Ethanol wurden hinzugefügt und bei maximaler Geschwindigkeit in der Tischzentrifuge für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bei 50 °C getrocknet. Entsprechend der weiteren Verwendung wurde die extrahierte Virion-DNA in 100 µl Wasser oder TE-Puffer gelöst.

#### 2.2.2.4 Restriktionsverdau und DNA-Gelelektrophorese

Präparierte Plasmid-, Virion- und BAC-DNA wurden durch Restriktionsverdau kontrolliert. Ein Restriktionsansatz bestand aus 1 µg Plasmid-DNA, 5 µl Plasmid-DNA Mini-Präparation, 2,5-3 µg BAC- oder Virion-DNA oder 26 µl BAC-DNA Mini-Präparation in einem 30 µl Ansatz der *FastDigest* Restriktionsenzyme im einfachen, grünen *FastDigest* Puffer und 1 µl *FastDigest* Enzym. Plasmid-DNA-Verdaue wurden 15 Minuten lang bei 37 °C inkubiert, Verdaue mit BAC- oder Virion-DNA hingegen 30-60 Minuten lang. Nach dem enzymatischen Verdau erfolgte die Auftrennung der DNA-Fragmente in der Gelelektrophorese. Bei der Agarose-Gelelektrophorese wurde zwischen der Gelelektrophorese im kleinen, mittleren und großen Maßstab unterschieden. Erstere wurden im *PerfectBlue Gelsystem Mini* oder *Midi* in einfachem TAE-Puffer durchgeführt, Letztere in der *Maxi* Version in 0,5fachem TBE-Puffer. Der kleine Maßstab wurde zur Auftrennung von verdauten Plasmid- und PCR-Ansätzen oder zur Gelaufreinigung von PCR-Produkt verwendet (meist bei 90 V). Der große Maßstab wurde zur Auftrennung geschnittener BAC-DNA (meist 45 V über Nacht und 120 V bei Auftrennungen über 6-8 Stunden) verwendet.

#### 2.2.2.5 RNA-Extraktion und Reverse Transkription

RNA wurde aus infizierten 10.1-Fibroblasten extrahiert, in cDNA umgeschrieben und als Expressionskontrolle, z. B. auf die Anwesenheit von m41.1-Transkript, getestet. Zur RNA-Extraktion wurden die infizierten Zellen einer 6-Loch-Platte mit 1 ml PBS gewaschen und der Zellrasen in 400 µl RL-Puffer des *innuPREP RNA Mini Kits* abgeschabt und resuspendiert. Im Folgenden wurden die Anweisungen des Kits befolgt und die RNA in 44 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Ein nachträglicher DNA-Verdau wurde entsprechend der Anweisungen des *Turbo DNA-free<sup>TM</sup> Kits* im gesamten Ansatz durchgeführt. Die RNA-Konzentration wurde mit Hilfe des Nandrops bestimmt und 2 µg der RNA wurden umgeschrieben. Der Reverse Transkriptionsansatz bestand aus Wasser, Oligo(dT)<sub>18</sub>-Primern (100 pmol), dNTPs (1 mM), RNase-Inhibitor (*RiboLock RNase Inhibitor*, 20 u), der Reversen-Transkriptase (*RevertAID H Minus Reverse Transcriptase*, 200 u) und dem dazugehörigen Puffer. Der Ansatz wurde eine Stunde lang bei 42 °C inkubiert und folgend für 10 min bei 70 °C inaktiviert. Die cDNA wurde als Matrize in der PCR eingesetzt (vgl. 2.2.2.6).

#### 2.2.2.6 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) und Sequenzierung

Die PCR wurde angewandt, um DNA-Bereiche zu vervielfältigen, die in der Rekombinationsreaktion zur Herstellung von Virusmutanten oder zur Klonierung von Plasmiden benötigt wurden. Des Weiteren wurde die PCR durchgeführt, um basierend auf cDNA die Transkription bestimmter Gene nachzuweisen. Ein PCR-Ansatz und – Lauf wurden entsprechend der Anleitung durchgeführt, die der *DreamTaq Green DNA Polymerase* oder der *Platinum<sup>®</sup> Taq Polymerase* beigelegt waren. Insofern nicht abweichend genannt, wurden die Anlagerungstemperaturen und Strangverlängerungszeiten entsprechend der Berechnungsformel in der Herstelleranleitung ermittelt. Konnte unter diesen Bedingungen kein PCR-Produkt für die homologe Rekombination generiert werden, wurde die Anlagerungstemperatur auf 50 °C gesenkt und die Bande der erwarteten Größe mittels einer Aufreinigung aus dem Agarose-Gel isoliert (s. 2.2.2.7).

Sequenzierungen im Rahmen dieser Arbeit wurde als Auftragsarbeiten, z. B. von der Firma SeqLab, angefertigt. Hierbei wurden die vorgegebenen Mengen an Plasmid- oder BAC-DNA und der Sequenzierprimer an SeqLab übergeben. Die Sequenzierungen wurden mit den PC-Programmen *ABI-Viewer* oder *CLC DNA Workbench 5* analysiert.

#### 2.2.2.7 Aufreinigung von DNA-Fragmenten, Bestimmung der DNA-Konzentration und Ligation

In der PCR amplifizierte oder aus der Restriktion resultierende DNA-Fragmente wurden in der Gelelektrophorese aufgetrennt und aus dem Gel entsprechend der Anleitung des *NucleoSpin<sup>®</sup> PCR Clean-up Kits* aufgereinigt. Die DNA-Konzentration wurde am Nanodrop bestimmt. Ligationsansätze wurden nach dem Standardprotokoll der *T4 DNA Ligase* durchgeführt.

#### 2.2.2.8 Herstellung elektrokompenter Bakterien, Lagerung und Elektroporation

Es wurden vier unterschiedliche Protokolle zur Herstellung elektrokompenter Bakterien verwendet. Die Prozedur variierte in folgenden Ansätzen: elektrokompente „leere“ DH10B, elektrokompente „leere“ SW102, elektrokompente, rekombinationsbereite DH10B mit einem BAC und dem Plasmid pKD46 sowie elektrokompente, rekombinationsbereite SW102 mit einem BAC.

##### *Herstellung elektrokompenter „leerer“ E. coli DH10B (SW102)*

Zur Herstellung elektrokompenter *E. coli* DH10B (SW102) wurden 5 ml LB mit einer Kolonie oder einer Impföse Glycerolstock über Nacht bei 37 °C (30 °C) im Schüttelinkubator angezogen. Am nächsten Tag wurden die 5 ml in 250 ml vorgewärmtes LB überführt und bis zur OD<sub>600</sub> zwischen 0,5 und 0,6 im Schüttelinkubator bei 37 °C (30 °C) angezogen. Die Schüttelkultur wurde mindestens

20 Minuten und maximal 45 Minuten auf Eis abgekühlt. Die Bakterien wurden bei 5000 g über 10 Minuten bei 4 °C pelletiert und der Überstand wurde verworfen. Die Bakterien wurden zweimal mit 100 ml sterilem Wasser gewaschen. Hiernach wurde das Pellet in 10 % Glycerol (in Wasser) resuspendiert und abermals bei o. g. Bedingungen zentrifugiert. Abschließend wurde das Pellet in 1 ml 10 % Glycerol aufgenommen, Aliquots à 130 µl wurden schockgefrostet und bei -80 °C gelagert.

#### *Herstellung elektrokompetenter und rekombinationsbereiter E. coli DH10B mit einem BAC und dem Plasmid pKD46*

DH10B, die bereits ein BAC und das für Rekombinationsenzyme kodierende Plasmid pKD46 beinhalten, wurden weitgehend wie eben beschrieben für eine weitere Rekombination vorbereitet. Abweichend wurden alle Inkubationsschritte bei 30°C und in LB-Medium, dem Ampicillin (pKD46) und Chloramphenicol (BAC) zugesetzt worden war, ausgeführt. Die Elektrokompetenz wurde durch o. g. Waschschrte erreicht. Um die Arabinose-induzierbaren Rekombinationsenzyme zu exprimieren, wurde die Kultur anfänglich nur bis zur OD<sub>600</sub> zwischen 0,2 bis 0,3 wachsen gelassen. Dann wurden 1 mg/ ml L-Arabinose (sterilfiltriert) zugesetzt und erneut bis zur Ernte beim Erreichen der OD<sub>600</sub> von 0,5 bis 0,6 inkubiert.

#### *Herstellung elektrokompetenter und rekombinationsbereiter E. coli SW102 mit einem BAC*

SW102 haben die Gene für die Rekombinationsenzyme im Genom integriert. Diese Gene werden temperaturabhängig exprimiert. SW102, die bereits einen BAC beinhalten und für eine weitere Rekombination vorbereitet werden sollten, wurde in LB-Chloramphenicol angezogen und wie o. b. elektrokompetent gemacht. Die Expression der Rekombinationsenzyme wurde bei einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bis 0,6 durch eine 15minütige Inkubation im 42 °C warmen Schüttel-Wasserbad erreicht.

#### *Elektroporation*

Für die Elektroporation wurden meist 2 µl Plasmid-DNA oder PCR-Produkt in 40 µl elektrokompetente *E. coli* DH10B (SW102) transformiert. Die Elektroporation wurde durch Anlegen einer Spannung von 2500 V in einer 2,5 mm Elektroporationsküvette durchgeführt. Nach dem Elektroschock wurden die Bakterien in 800 µl LB-Medium aufgenommen und 1 Stunde bei 37 °C (30 °C) schüttelnd inkubiert. Ausplattiert wurde auf LB-Agar, dem die geeigneten Antibiotika zur Selektion zugesetzt worden waren. Bei 37 °C (30 °C) erfolgte die Inkubation der LB-Agar-Platten für 16-72 Stunden, bis Einzelkolonien gut sichtbar waren.

#### 2.2.2.9 MCMV-BAC-Mutagenese und Konstruktion der Virusmutanten

Die Klonierung des MCMV-Genoms in Form eines BACs durch Messerle *et. al.* (19) ermöglicht die gezielte Erstellung rekombinanter Viren über Nutzung der bakteriellen

Rekombinationssysteme. Das MCMV-BAC wird in *E. coli* Bakterien verändert und in Fibroblasten zu infektiösen Virusmutanten rekonstituiert. In dieser Arbeit wurden drei Varianten des MCMV-BACs für Mutagenesen verwendet, das BAC des MCMV-Stamms Smith, genannt pSM3fr (19,86), das BAC des GFP (grün fluoreszierendes Protein)-exprimierenden MCMV-Stamms Smith (85) und das BAC des MCMV-Stamms K181 (87). Das K181-BAC wurden für die Klonierung der K\*-Virusmutanten gewählt, die für *in vivo* Infektionen verwendet werden sollten. K181-basierte Virusmutanten wurden *in vivo* als virulenter beschrieben und wiesen höhere Titer in den Speicheldrüsen infizierter Mäuse auf als Smith (pSM3fr)-basierte Virusmutanten (97-99). Kürzlich wurde der Grund für den *in vivo*-Defekt der auf pSM3fr-basierenden Viren publiziert und korrigiert (100-102). In dieser Arbeit wurde mit dem fehlerbehafteten pSM3fr-BAC gearbeitet (S<sup>§</sup>- und S\*-Virusmutanten). Jedoch wurden die S<sup>§</sup>- und S\*-Virusmutanten nur in *in vitro* Experimenten eingesetzt.

Die Methoden zur BAC-Mutagenese werden bis heute weiterentwickelt (21,103). In dieser Arbeit wurden die einfache, homologe Rekombination, die FRT-vermittelte Rekombination und die *Galk-Kan*-Mutagenese zur Konstruktion der Virusmutanten angewandt (s. 1.2).

#### *Mittels einfacher, homologer Rekombination erstellte Virusmutanten*

Mit der einfachen, homologen Rekombination wurde die Genfunktion m157 in den K\*-Virusmutanten zerstört. Der partielle Leserahmen von m157 wurde durch die Sequenz einer Zeocin-Resistenz ersetzt. Die Durchführung wurde leicht modifiziert bereits beschrieben (88). Die Deletion des Gens m157 war notwendig, um eine effiziente Infektion der sonst MCMV-resistenten C57BL/6-Mäuse zu ermöglichen. Es wurde beschrieben, dass C57BL/6-Mäuse den Rezeptor Ly49H auf NK-Zellen exprimieren. m157 kodiert für den aktivierenden Ly49H-Liganden, so dass infizierte Zellen durch NK-Zellen zerstört werden (104,105).

Desweiteren wurde die einfache, homologe Rekombination zur Klonierung des M45-m41-Doppelknockoutvirus (S<sup>§GFP</sup>-ΔM45-m41ko) angewandt, in dem die Sequenz des M45-Gens durch die Sequenz einer Zeocin-Resistenz ersetzt wurde. Die Durchführung wurde bereits beschrieben (59). Als Ausgangsprodukt diente das S<sup>§GFP</sup>-m41ko, in dem die endständige m41-Sequenz des Locus m41 durch eine FRT-*Kan*-FRT-Sequenz ersetzt worden war (zur Verfügung gestellt von M. Cam).

#### *Mittels FRT-vermittelter Rekombination und der Galk-Kan-Mutagenese erstellte Virusmutanten*

Die von Cam zur Verfügung gestellten m41-Knockoutviren S<sup>§GFP</sup>-m41ko und S<sup>§</sup>-m41ko waren durch die FRT-vermittelte Rekombination hergestellt worden. In der vorliegenden Arbeit wurde nur das HATEVm41-Virus (S<sup>§GFP</sup>-HATEVm41: MCMV Smith<sup>§</sup> GFP HA-TEV m41 rep. M11L) mithilfe der FRT-vermittelten Rekombination

kloniert. Im HATEVm41-Virus wurde das m41 an seinem natürlichen Locus im Virusgenom N-terminal mit der Sequenz des HA-Markers und der Erkennungssequenz der *Tobacco Etch Virus* (TEV)-Protease markiert. Vorarbeiten hatten gezeigt, dass eine N-terminale Markierung am Locus m41 zur Folge hat, dass das überlappend kodierte Protein m41.1 verändert exprimiert wird (mündliche Kommunikation mit M. Cam). Um die Funktion des Proteins m41.1 zu komplementieren, wurde das funktionelle Homolog M11L im Replacer-Locus eingesetzt (durchgeführt von M. Cam). Es wurde beschrieben, dass der Replacer-Locus die Gene m02 bis m06 im MCMV-Genom umfasst (106). Dieser Bereich war für Zellkultur-basierende Untersuchungen entbehrlich. Das antiapoptotische Protein M11L schützt vor BAK- und BAX-vermittelter Apoptose (107-109) und es wurde gezeigt, dass M11L die antiapoptotische, BAK-spezifische Funktion des Proteins m41.1 kompensieren kann (89).

Zur Konstruktion der HATEVm41-BAC-DNA wurde zuerst das Plasmid pcDNAm41 (zur Verfügung gestellt von M. Cam) geschnitten und ein FRT-*Kan*-FRT-Restriktionsfragment aus dem Plasmid pSL-FRT*Kan* hinter die m41-Sequenz ligiert. Das Plasmid wurde *blunt* geschnitten. HATEV-Sequenz-Oligos wurden verwendet, um einen Linker zu generieren (95°C, 10 min, abkühlen auf Eis). Der HATEV-Linker wurde in das geschnittene Plasmid ligiert. Die Ligation ergab das Plasmid pcDNA-HATEVm41-FRT-*Kan*-FRT. Mit einer PCR wurden dem Locus m41 angrenzende, homologe Bereiche (beschrieben in (59)) beidseitig an die HATEVm41-FRT-*Kan*-FRT-Sequenz angefügt und das Konstrukt wurde amplifiziert. Nach der Aufreinigung des PCR-Produkts aus dem Agarosegel (s. 2.2.2.7) wurde das PCR-Produkt zusammen mit dem Plasmid pKD46 in elektrokompetente DH10B transformiert, in denen bereits das BAC MCMV Smith<sup>S<sup>GFP</sup></sup>Δm41 rep.M11L (zur Verfügung gestellt von M. Cam) vorlag. Die Rekombination erfolgte wie bereits unter 2.2.2.8 beschrieben. Das Produkt wurde mit S<sup>S<sup>GFP</sup></sup>-HATEVm41 bezeichnet. Die Entfernung des Plasmids pKD46 aus den S<sup>S<sup>GFP</sup></sup>-HATEVm41 tragenden DH10B erfolgte durch Inkubation bei 43°C über zwei Passagen. Der Selektionsdruck (Zugabe von Chloramphenicol und Kanamycin) wurde nur auf das BAC gerichtet und die erhöhte Temperatur verhinderte die Replikation des Plasmids pKD46 (temperatursensitiver Replikationsorigin).

Mit der *Galk-Kan*-Mutagenese wurden alle S\*- und K\*-MCMV-Varianten konstruiert. Um der Klonierungsstrategie besser folgen zu können, ist in Abbildung 2 der Aufbau des Locus m41 dargestellt. Die skizzierten Genotypen der Virusmutanten sind in Abbildung 20 (S\*) und Abbildung 24 (K\*) zu finden.

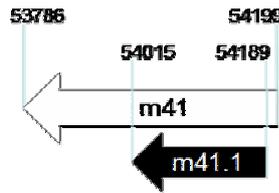


Abbildung 2: schematische Darstellung des Lokus m41

Der Lokus m41 im MCMV-Genom kodiert für zwei Proteine m41 (138 AS) und m41.1 (57 AS). Der kodierende Bereich für das Protein m41.1 liegt innerhalb der kodierenden Sequenz des m41, jedoch in einem anderen Leserahmen. Die angegebenen Positionen der kodierenden Genomabschnitte der Proteine m41 und m41.1 basieren auf der Genomsequenz des MCMV-Stamms Smith (Accession NC\_004065) und den publizierten Daten zum Lokus m41 (81,89).

Wie in Abbildung 20 gezeigt, wurden vier S\*-Virusmutanten konstruiert. In der S\*- $\Delta$ m41-Mutante wurden die Sequenzen der Galaktokinase (*Galk*) und der Kanamycin-Resistenz (*Kan*) in den ORF m41.1 eingesetzt. Am Anfang der eingesetzten *Galk-Kan*-Sequenz wurde via PCR eine Startkodon-Mutation eingefügt. Hierzu wurde das ATG des Gens m41 zu einem CTG mutiert. Das Protein m41 konnte nicht mehr gebildet werden. Zusätzlich wurde nach dem Stopp des Gens m41.1 ein vorzeitiger Stopp im Leserahmen des Gens m41 eingefügt. Die Start- und Stopp-Mutationen wurden mit dem Selektionsmarker eingefügt, da die Positivselektion auf Kanamycin meist effizienter verläuft als die nachfolgende Negativselektion auf *Galk* (25). Basierend auf der S\*- $\Delta$ m41 wurden die drei markerlosen S\*-Virusmutanten S\*-m41ko (m41-Stoppmutante), S\*-m41.1ko (m41.1-Stoppmutante) und S\*-R (Revertante) hergestellt. In allen drei Fällen wurden die Sequenz des Selektionsmarkers *Galk-Kan* mittels homologer Rekombination durch die gewünschte Sequenz ersetzt. Im Fall der S\*-m41ko wurde die Sequenz des Selektionsmarkers durch die PCR-amplifizierte m41.1-Sequenz ersetzt. Die Start- und Stopp-Mutationen des S\*- $\Delta$ m41 verblieben im Genom. Die Virusmutanten S\*-m41.1ko und S\*-R wurden durch Insertion von Restriktionsfragmenten erstellt. Das Restriktionsfragment zur Generierung der Revertante stammte aus dem Expressionsplasmid pcDNA m42-m41HA und umfasste den Sequenzbereich m42 bis m41 aus dem MCMV-Smith-Genom. Die S\*-m41.1ko Mutante wurde analog mithilfe des Plasmids pcDNA m42-m41HAMut (zur Verfügung gestellt von M. Cam) hergestellt. In diesem Plasmid waren die ersten drei ATGs des Proteins m41.1 zu ACGs geändert worden. Die ersten drei ATGs befinden sich innerhalb der Nukleotide 1 bis 33 des ORFs m41.1. Es ist nicht bekannt, welches das Startkodon des Proteins m41.1 ist. Die Mutation der Startkodone verhinderte die Expression des Proteins m41.1, verändert aber nicht die Expression des überlappend kodierten Proteins m41 (51,89).

Abbildung 24 zeigt die konstruierten K\*-Virusmutanten. Die Veränderung des ORFs m157 wurde bereits unter der einfachen, homologen Rekombination erklärt. Die

Variationen des Lokus m41 erfolgten durch die *Galk-Kan*-Mutagenese. Im ersten Schritt wurde der gesamte Lokus m41 durch die *Galk-Kan*-Sequenz ersetzt ( $K^{*\Delta m157}$ - $\Delta m41$ ). Die Selektion erfolgte auf LB-Agar mit Kanamycin und zur Kontrolle einer funktionellen *Galk*-Expression auf MacConkey-Agar, der entsprechend der Herstelleranweisungen zubereitet wurde. Ausgehend von dieser Mutante wurden die Mutanten  $K^{*\Delta m157}$ -m41ko,  $K^{*\Delta m157}$ -m41.1ko und die Revertante  $K^{*\Delta m157}$ - $\Delta m41/R$  konstruiert. Alle zur Rekombination verwendeten PCR-Produkte basierten auf der Sequenz des MCMV-Stamms Smith. Zur Erstellung des BACs von  $K^{*\Delta m157}$ -m41ko wurde ein PCR-Produkt generiert, das ausschließlich für das Protein m41.1 kodierte und anstelle der *Galk-Kan*-Sequenz in das BAC eingesetzt. Das  $K^{*\Delta m157}$ -m41.1ko-BAC wurde mithilfe eines PCR-Produkts generiert, das auf oben beschriebenen pcDNA m42-m41HAmut basierte. Folglich beschrieb dieses PCR-Produkt den Lokus m41, in dem die drei ATGs des m41.1-Leserahmens zu ACGs verändert worden waren, was die Expression des Proteins m41.1 unterband, jedoch nicht die Expression des Proteins m41 behinderte. Alle Revertanten der  $K^*$ -Virusmutanten wurden durch PCR-Produkte erstellt, die ausgehend vom MCMV-BAC pSM3fr amplifiziert worden waren. Die Reversion der BAC-DNA von  $K^{*\Delta m157}$ -m41ko und  $K^{*\Delta m157}$ -m41.1ko wurden separat in zwei Schritten generiert. Zuerst wurde die *Galk-Kan*-Sequenz wieder eingesetzt, um positiv auf *Galk* und *Kan* selektieren zu können. Im zweiten Schritt wurde *Galk-Kan* durch die natürliche Sequenz des Lokus m41 ersetzt (Negativselektion). Die Durchführung der *Galk-Kan*-Mutagenese wurde hier nur grob beschrieben. Die detaillierte Durchführung wurde von Warming *online* im *Protocol #3-BAC Recombineering using the modified DH10B strain SW102 and a galk positive/counterselection cassette* und in (25) beschrieben.

### 2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

#### 2.2.3.1 Herstellung von Proteinlysaten und Bestimmung der Proteinkonzentration

Proteinlysate wurden durch zwei verschiedene Protokolle hergestellt. Proteinlysate für die Immunpräzipitation (IP) oder den direkten Proteinnachweis im Western Blot wurden mit Tritonpuffer hergestellt. Die Lyse mit Tritonpuffer ermöglicht das Herauslösen von Membranproteinen und die Denaturierung der cytoplasmatischen Proteine. Für die Lyse mit Tritonpuffer wurde der Tritonpuffer mit Protease-Inhibitor (*complete Mini Protease Inhibitor*) ergänzt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und in einem geeigneten Volumen Tritonpuffer abgeschabt. Im Fall stark infizierter Makrophagen oder Fibroblasten wurden die Zellen im Medium abgeschabt und bei 1065 g für 5 Minuten bei RT zentrifugiert. Das Pellet wurde gewaschen und in Tritonpuffer resuspendiert. Die Lyse erfolgte über 45 Minuten auf Eis. In der anschließenden Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit in der Tischzentrifuge wurden Zelltrümmer pelletiert. Der Überstand wurde zur weiteren Analyse verwendet.

Die Proteinkonzentration konnte nur in den Überständen der Tritonpuffer-Lysate gemessen werden. Die Durchführung erfolgte wie in den Anweisungen des *BCA Protein Assay Kits* beschrieben. Proteinlysate, die direkt im Western Blot analysiert werden sollten, wurden auch mit kochendem Proteinprobenpuffer (PPP) erstellt. Mit kochendem PPP wurde die gesamte Zelle aufgeschlossen. Die Durchführung erfolgte wie oben beschrieben, nur dass die Zellen oder das Zellpellet in einem geeignetem Volumen kochendem PPP (95 °C) aufgenommen wurden. Die Zellen wurden durch die Zugabe des PPPs direkt lysiert. Da die Proteinkonzentration in PPP lysierten Zellen nicht bestimmt werden kann, wurde die ausgesäte bzw. geerntete Zellzahl als Maß verwendet.

#### 2.2.3.2 SDS-PAGE und Western Blot

In der denaturierenden Gelelektrophorese (SDS-PAGE/ Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) wurden die Proteine der Proteinlysate im Gel aufgetrennt. Der anschließende Western Blot diente dazu, die Proteine aus dem Gel durch Anlegen eines elektrischen Feldes auf eine Membran zu übertragen. Hier immobilisiert, konnten die Proteine durch spezifische Primär- und HRP-gekoppelte Sekundärantikörper über eine Chemilumineszenzreaktion nachgewiesen werden. Es wurde mit Tris-Tricin-Gelen in der SDS-PAGE gearbeitet. Hierzu wurde meist ein 12,5 %ige Trenngel mit einem 4 %igem Sammelgel kombiniert. Der Ansatz für das Trenngel bestand aus 4,2 ml 30 % Acrylamid-, Bisacrylamid-Stammlösung, 3,3 ml Tricin-Gelpuffer, 1,2 ml Glycerol, 1,3 ml Wasser, 100 µl 10 % APS (in Wasser gelöst) und 10 µl TEMED. Die Reagenzien wurden kalt oder auf Eis gemischt und in eine *Mini-Protean* Vorrichtung zum Gelegießen gegossen und mit Wasser überschichtet. Nach ca. 30minütigem Aushärten bei RT wurde das Wasser abgegossen und mit kalter Sammelgel-Mischung, bestehend aus 0,7 ml 30 % Acrylamid-, Bisacrylamid-Stammlösung, 1,3 ml Tricin-Gelpuffer, 3 ml Wasser, 50 µl 10 % APS und 5 µl TEMED, überschichtet und der Kamm eingesetzt. Meist wurde das Gel über Nacht bei 4 °C ausgehärtet und am nächsten Morgen zur Proteinseparation eingesetzt. Hierzu wurden die Gele in ein *Mini-Protean Tetra Companion Running Module* eingesetzt. Die innere Kammer wurde mit einfachem Kathodenpuffer gefüllt und die äußere Kammer mit einfachem Anodenpuffer. Die Vorbereitung der Proteinlysate umfasste bei den Tritonpuffer-Lysaten, die Zugabe von PPP und das Inkubieren für 7 Minuten bei 95°C. In kochendem PPP lysierte Zellen wurden direkt 7 Minuten lang bei 95°C erhitzt. Anschließend wurden die Proben auf Eis abgekühlt. Im Fall hochviskoser Proteinlysate wurden die Proben für 5 Minuten mit Ultraschall im *Bioruptor UCD-200<sup>TM</sup>* auf maximaler Stufe behandelt. Das geeignete Volumen der Proteinlysate wurde in die Taschen der Gele pipettiert. Im Anschluss wurde an die SDS-PAGE eine Spannung zwischen 80 V und 85 V angelegt und so lange gehalten, bis die Lauffront die untere Kante des Gels erreicht hatte (ca. 3 Stunden). Bei der Auftrennung wurde die Gel-

Apparatur im Eisbad gekühlt. Nach der Auftrennung wurden die Gele im *semidry* Western Blot eingesetzt. Für den Western Blot wurden zwei Methoden angewandt. Zum Nachweis des kleinen, HA-markierten Proteins m41.1 (~7 kDa) wurde auf kleinmaschiger PVDF-Membran (0,2 µm) geblottet. Alle anderen Proteintransfere erfolgten auf Nitrocellulose-Membranen. Der Western Blot auf die PVDF-Membran umfasste in der Vorbereitung, dass je 3 Whatmanpapiere in Membrangröße (8,5 x 5 cm) in PVDF-Kathodenpuffer, PVDF-Anodenpuffer I und PVDF-Anodenpuffer II getränkt wurden. Das Gel wurde 15 Minuten lang in PVDF-Kathodenpuffer bei RT auf einem Schwenker inkubiert. Die PVDF-Membran wurde 30 Sekunden lang in Methanol aktiviert, zwei Minuten lang in Wasser gewaschen und abschließend für mindestens 3 Minuten in PVDF-Anodenpuffer II gelagert. Der Aufbau des *semidry* Blots erfolgte in der Reihenfolge (von unten nach oben) PVDF-Anodenpuffer-I getränkte Whatmanpapiere, PVDF-Anodenpuffer-II getränkte Whatmanpapiere, PVDF-Anodenpuffer-II gelagerte Membran, in PVDF-Kathodenpuffer präinkubiertes Gel und PVDF-Kathodenpuffer getränkte Whatmanpapiere. Nach dem Zusammenbau floss bei einer maximalen Spannung von 25 V der Strom von 1 mA/ cm<sup>2</sup> über 2 Stunden. Der Western Blot auf Nitrocellulose-Membranen benötigte nur zweimal vier Transferpuffer getränkte Whatmanpapiere sowie die Membran und das Gel, welche kurz vor dem Zusammenbau des Blots in Transferpuffer geschwenkt wurden. Der Zusammenbau umfasste, dass das Gel auf die Membran gelegt wurde, umschlossen von Whatmanpapieren. Nach dem Zusammenbau wurde ein Strom von 2 mA/ cm<sup>2</sup> angelegt und eine maximale Spannung von 25 V eingestellt. Der Proteintransfer erfolgte über 2 Stunden. Nach dem Proteintransfer wurden die Membranen in 5 % Milchpulver oder BSA gelöst in PBS (Milch) über eine Stunde bei RT geschwenkt. Dieser Blockierungsschritt sorgte für die Abdeckung unspezifischer Bindungsstellen. Die folgende Inkubation mit dem spezifischen Primäantikörper (s. Tabelle 11) verdünnt in Milch erfolgte unter Schwenken über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurde die Antikörperlösung abgenommen und zur Wiederverwendung bei -20 °C gelagert und die Membran mit 0,1 % Tween-20 in PBS dreimal 5 Minuten lang gewaschen. Die Membran wurde daraufhin mit HRP-gekoppeltem Sekundäantikörper (s. Tabelle 12) verdünnt in Milch für eine Stunde bei RT auf einem Schwenker inkubiert. Die abschließenden Waschschrte umfassten dreimal 10 Minuten langes Schwenken mit o. g. Waschlösung. Die präparierte Membran wurde bis zur Detektion, aber maximal eine Stunde lang, in PBS gelagert. Zur Detektion wurden bei schwachen Signalen die Lösungen aus dem *ECL Advanced Western Blotting Detection Kit* verwendet und bei normalen bis starken Signalen wurden die Lösungen des *ECL Western Blotting Detection Reagents* genutzt. Je 350 µl der beiden Lösungen eines Kits wurden pro Membran in ein Reaktionsgefäß pipettiert und auf die Membran gegeben. Nach kurzer Inkubation wurde die Membran mit einer Folie abgedeckt. Die Detektion erfolgte entweder durch die Belichtung eines medizinischen Röntgenfilms in einer Filmkassette

mit anschließender Entwicklung des Röntgenfilms in der Röntgenfilm-Entwicklermaschine *X-Omat* oder im Chemilumineszenz-Detektor *Fusion SL-4 3500 WL Molecular Imaging*. Röntgenfilme wurden eingescannt und Bilder des Chemilumineszenz-Detektors wurden direkt in *Adobe Photoshop CS5* ausgewertet.

### 2.2.3.3 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation (IP) ermöglicht, ausgewählte Proteine mithilfe ihrer spezifischen Antikörper aus einem Gesamtzellysate aufzukonzentrieren. Die Co-Immunpräzipitation (Co-IP) wurde angewandt, um Protein-Protein-Interaktionen nachzuweisen. Nach der Aufkonzentration des gewünschten Proteins und von Proteinkomplexen, in denen das gewünschte Protein mit anderen Proteinen interagiert, konnten die interagierenden Proteine im Western Blot über ihre spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. Die Methode setzt voraus, dass die interagierenden Proteine bekannt sind und entweder spezifische Antikörper existieren oder markierte Proteinvarianten. In dieser Arbeit wurden Co-IPs nach Transfektion von HEK293-Zellen ( $\sim 3 \times 10^6$ / Ansatz) oder nach Infektion von RAW264.7-Makrophagen ( $1,2 \times 10^7$ / Ansatz) durchgeführt. Zellysate wurden pro Ansatz mit 1 ml Tritonpuffer erstellt (vgl. 2.2.3.1). 50-100  $\mu$ l Lysat wurden als Lysatkontrolle bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert. Das verbleibende Lysat wurde über Nacht mit dem Primärantikörper inkubiert. Am nächsten Tag wurden 80  $\mu$ l in Lysepuffer umgepufferte und 1:2 verdünnte Protein-A oder G-Sepharose (PAS/ PGS) zu den Ansätzen pipettiert und mindestens 1 Stunde lang im Überkopfschüttler bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach diesem Schritt sollte das gewünschte Protein an den Primärantikörper-Protein-Sepharose-Komplexen gebunden worden sein. Um möglichst eine hohe Komplexbildungsrate zu erreichen, wurden spezielle Konzentrationen der Primärantikörper mit der Protein-Sepharose eingesetzt. Der Caspase-2-Antikörper 11B4 wurde 1:500 eingesetzt und mit PGS komplexiert. Für den m41-Antikörper 2A6 wurde PAS verwendet und der m41-Antikörper wurde 1:200 eingesetzt. Flag-M2-Antikörper (1:500) wurde an PGS gebunden und der HA-Antikörper (gegen Kaninchen, Sigma) (1:500) an PAS. Die Komplexe wurden durch Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit über 1 Minute bei  $4^\circ\text{C}$  pelletiert, der Überstand wurde entfernt und die Pellets wurden sechs Mal in Folge durch Zugabe von 1 ml Tritonpuffer, kurzem vortexen und wiederholter Zentrifugation gewaschen. Die Protein-Sepharose wurde trocken gelegt und in 100  $\mu$ l PPP 7 Minuten lang bei  $95^\circ\text{C}$  erhitzt. Nach kurzer Zentrifugation wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur Analyse im Western Blot bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert. Nicht verwendete Protein-Sepharose wurde viermal mit 1 ml 20 %igem Ethanol (in Wasser) wie oben beschrieben gewaschen und in 20 %igem Ethanol bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert.

#### 2.2.3.4 Immunfluoreszenz

Mit der Immunfluoreszenz wurden Proteine in Zellen angefärbt, um ihre intrazelluläre Lokalisation zu bestimmen. Um diese Methode anwenden zu können, werden der spezifische Antikörper für das gewünschte Protein oder einer markierten Proteinvariante sowie spezifische Antikörper der betrachteten Zellkompartimente benötigt. In dieser Arbeit wurde der m41-Antikörper 2A6 (1:200) mit dem Sekundärantikörper *Anti-Maus IgG Alexa Fluor 488* (1:750), die Kombination 3F10-HA-Antikörper (1:200) mit *Anti-Ratte IgG Alexa Fluor 488* (1:1000) sowie M2-Flag-Antikörper (1:500) mit *Anti-Maus IgG Alexa Fluor 568* (1:500) und der cis-Golgi-spezifische Antikörper gs28 (1:50) in Kombination mit dem Sekundärantikörper *Anti-Kaninchen IgG Alexa Fluor 594* (1:750) eingesetzt. Für die Immunfluoreszenz wurden  $1 \times 10^5$  transfizierte, murine Fibroblasten auf sterilen Deckgläschen ausgesät. Die Transfektion der Zellen erfolgte mit pcDNA-m41 oder pcDNA-HAm41 plus pcDNA-UNC93B1-Flag. Am nächsten Tag wurden das Medium entfernt, die Zellen wurden zweimal mit 1 ml PBS (ein Waschschrift) gewaschen und für 20 Minuten bei RT in 3 %iger Paraformaldehydlösung fixiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen für 10 Minuten bei RT in 50 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  in PBS inkubiert, gewaschen und in 0,3 % Triton-X-100 in PBS über 10 Minuten permeabilisiert. Die Reaktion wurde durch abermaliges Waschen unterbrochen und unspezifische Bindungen wurden durch 10minütige Inkubation bei RT in 0,2 % Gelatine in PBS (Blockierlösung) abgedeckt. Die Primärantikörper wurden in der Blockierlösung verdünnt und 80  $\mu\text{l}$  wurden je Deckglas eingesetzt. Die Inkubation erfolgte in einer Nassbettkammer über Nacht bei 4 °C. Der nächste Schritt war ein Waschschrift, gefolgt von einem Waschschrift mit höherer Stringenz (Zugabe von 0,1 % Tween-20 zum PBS). Danach erfolgte die Inkubation mit dem Chromophor-markierten Sekundärantikörper 1 Stunde lang bei RT in Dunkelheit. Auch der Sekundärantikörper wurde zuvor in Blockierlösung verdünnt und 80  $\mu\text{l}$  wurden pro Deckglas eingesetzt. Abschließend wurde noch eine Kern- bzw. DNA-Färbung mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) durchgeführt. Hierzu wurden die Deckgläschen abermals gewaschen und 10 Minuten lang mit DAPI (1:20000 verdünnt in PBS) bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach vier abschließenden Waschschriften, wobei in den letzten beiden mit Wasser gewaschen wurde, wurden die Deckgläschen mit der behandelten Seite nach unten durch *Mounting Medium* auf Objektträgern aufgebracht und zum Aushärten über Nacht bei RT im Dunkeln gelagert. Die Auswertung erfolgte am konfokalen Laserscan Mikroskop (cLSM). Bilder wurden mit dem *LSM Image Browser* und *Adobe Photoshop CS5* verwaltet und bearbeitet.

#### 2.2.3.5 TUNEL-Assay

Der TUNEL(*terminal desoxynucleotidyl transferase dUTP nick ending labeling*)-Assay diente zum Nachweis fragmentierter, chromosomaler DNA. In der späten Phase der

Apoptose zerschneiden Endonukleasen die chromosomale DNA. Im TUNEL-Assay wurden die dabei entstehenden, freie Hydroxylgruppen an den DNA-Enden durch eine terminale Desoxynucleotidyl-Transferase mit fluoreszenzmarkierten Nukleotiden markiert. Die Anzahl TUNEL-positiver Zellkerne war somit direkt proportional zum Anteil der toten Zellen. Die Auswertung erfolgte am Mikroskop durch Auszählen der TUNEL-positiven Zellen in Bezug auf die Gesamtzellzahl. Die Gesamtzellzahl wurde durch Auszählen mit DAPI gefärbter Zellkerne erfasst. Der TUNEL-Assay wurde mit infizierten, murinen 10.1-Fibroblasten und RAW264.7-Makrophagen durchgeführt. 10.1-Fibroblasten wurden auf Deckgläschen ausgesät und über 48 Stunden infiziert. Hingegen wurden 20 Stunden lang infizierte RAW264.7 mit einer Cytospin4-Zentrifuge auf Deckgläschen zentrifugiert. Die Menge der infizierten Zellen wurde so gewählt, dass die Deckgläschen subkonfluent bedeckt waren. Im Anschluss wurden die Zellen auf dem Deckgläschen wie unter 2.2.3.4 beschrieben fixiert. Die TUNEL-Färbung erfolgte entsprechend der Angaben zum TUNEL-Assay *In Situ Cell Death Detection Kit (TMR red)*. Die Zellen wurden wie in 2.2.3.4 beschrieben mit DAPI gefärbt und auf Objektträger aufgebracht, über Nacht ausgehärtet und am nächsten Tag unter dem Fluoreszenz-Mikroskop ausgewertet. Hierbei wurden fünf oder mehr zufällig ausgewählte Gesichtsfelder pro Probe gezählt, was einer Gesamtzahl von 280 bis 500 Zellkernen entsprach. Die große Spanne ergab sich durch einem hohen Anteil an apoptotischen und bereits zerstörten Zellen in bestimmten Proben, in denen nur eine geringere Gesamtzahl ausgezählt werden konnte. Der prozentuale Anteil TUNEL-positiver Zellen wurde berechnet, indem auf Wildtyp-Virus-infizierte Zellen bezogen wurde.

#### 2.2.3.6 Messung der Caspase-2-Aktivierung

Caspase-2 liegt in den meisten Geweben und Zelllinien als Zymogen vor (110). Wie alle Initiator-Caspasen ist Caspase-2 zur autokatalytischen Aktivierung fähig. Der erste Schritt im Aktivierungsprozess ist die Dimerisierung zweier Caspase-2-Volllängen-Monomere (pro-Caspase-2; pro-C2). Die pro-Caspase-2 besteht aus einer CARD-Domäne, dem p19- und dem p12-Fragment wie in Abbildung 3A zu sehen ist. Nach der Dimerisierung wurde die Spaltung am D333 beschrieben (Zymogenaktivierung). Die Abspaltung der CARD-Domänen (D169) und eine weitere Proteolyse an D347 sowie die Verknüpfung der Caspase-2-Fragmente vervollständigen die Prozessierung zur aktiven Caspase-2 (C2) (111).

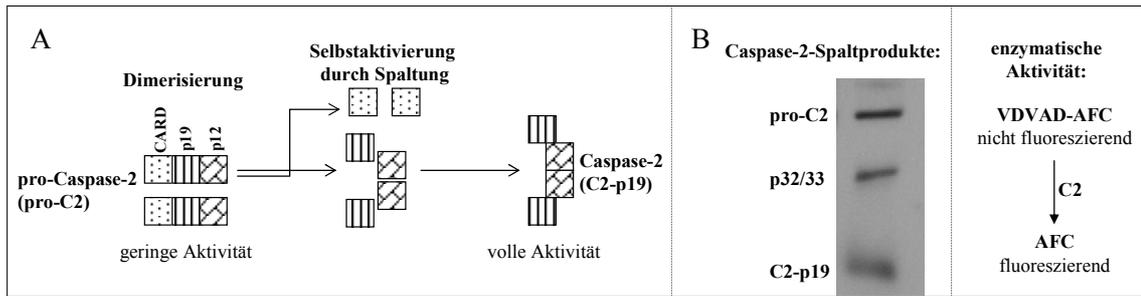


Abbildung 3: Schema und Methoden zum Nachweis der Caspase-2-Aktivierung

Der Nachweis der Caspase-2-Aktivierung erfolgte zum einen anhand der prozessierten bzw. nicht prozessierten Caspase-2-Fragmente im Western Blot und zum anderen anhand der enzymatischen Aktivität der Caspase-2 im Fluoreszenzassay. Wie in Abbildung 3B dargestellt ist, erkennt der verwendete Caspase-2-Antikörper 11B4 alle drei Prozessierungsstufen p51, p32/33 und p19. Der Antikörper ist gegen einen Bereich im p19-Fragment gerichtet (Aminosäuren 167-333). Es handelt sich um monoklonale Antikörper aus einem Hybridom (Ratte) (110). Die Messung der enzymatischen Aktivität von Caspase-2 wurde entsprechend der Herstellerangaben mit dem *Caspase-2 Fluorometric Assay Kit* in infizierten RAW264.7-Makrophagen durchgeführt. In diesem Assay wurde die Spaltung des Caspase-2-Substrats VDVAD-AFC in VDVAD und freies, nach Anregung gelb-grün fluoreszierendes AFC gemessen. Die Messungen wurden stets auf die Werte Wildtyp-Virus-infizierter Zellen bezogen und stellte somit ein Maß für die Caspase-2-Aktivierung in Folge der Infektion mit unterschiedlichen Virusmutanten dar. Als Positivkontrollen zur Caspase-2-Aktivierung wurden Doxorubicin (DXR) und Staurosporin (STS) verwendet. DXR ist ein Anthracyclin-Antibiotikum, das durch Interkalation in der DNA die DNA-Synthese hemmt (112). Es wurde beschrieben, dass hohe DXR-Konzentrationen nach der Behandlung von Zellen u. a. im Golgi vorliegen (113) und dass DXR in Zellkultur zum Caspase-2-abhängigen Zelltod führt (114). Für STS ist bekannt, dass es an die ATP-Bindungsstellen unterschiedlicher Kinasen anlagert (115). Der Kinaseinhibitor STS wurde hier als Induktor für die Caspase-abhängige, mitochondriale Apoptose eingesetzt (116). Im Zuge der mitochondrial-vermittelten Apoptose wird Caspase-9 aktiviert, die wiederum zur Caspase-3-Aktivierung führt. Caspase-3 ist in der Lage direkt pro-Caspase-2 zu aktivieren (39) (s. a. 1.3). Als Negativkontrollen wurden unbehandelte oder mit Lösungsmittel behandelte Zellen (mock) verwendet.

#### 2.2.4 Suchverfahren zur Identifikation möglicher Bindungspartner des Proteins m41

Für das MCMV-Protein m41 waren keine interagierenden Proteine bekannt. Die beiden Suchverfahren, die  $\alpha$ -HA-Affinitätsaufreinigung gekoppelt an eine

massenspektrometrische Analyse und das *Yeast-two-Hybrid-Verfahren* (Y2H-Verfahren), wurden durchgeführt, um mögliche Interaktionspartner des Proteins m41 zu identifizieren.

#### 2.2.4.1 Die $\alpha$ -HA-Affinitätsaufreinigung und das Silbergel

In der Vorbereitungsphase der  $\alpha$ -HA-Affinitätsaufreinigung wurde das HATEVm41-Virus kloniert, das m41 im Virusgenom mit einem HA-Marker und der Erkennungssequenz für die AcTEV-Protease exprimiert. Die AcTEV-Protease ist eine Variante der TEV-Protease, die laut des Herstellers in Bezug auf Spezifität, Aktivität und Stabilität verbessert wurde. Die Klonierung des HATEVm41-BACs ( $S^{\text{GFP}}$ -HATEVm41) wurde unter 2.2.2.9 beschrieben. Nach der Klonierung wurde das HATEVm41-BAC zum HATEVm41-Virus ( $S^{\text{GFP}}$ -HATEVm41) rekonstituiert. Abbildung 4 gibt einen schematischen Überblick über den Ablauf der  $\alpha$ -HA-Affinitätsaufreinigung.

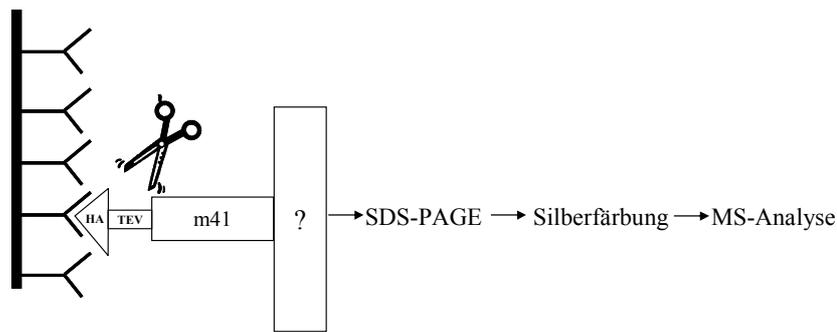


Abbildung 4: Schema zur  $\alpha$ -HA-Affinitätsaufreinigung

RAW264.7-Makrophagen wurden mit der HATEVm41-Virusmutante oder der Kontrolle  $S^{\text{GFP}}$ -wt (85) infiziert und in Tritonpuffer lysiert. Die Zellysate wurden zur  $\alpha$ -HA-Affinitätsaufreinigung verwendet. Die  $\alpha$ -HA-Affinitätsaufreinigung wurde weitgehend nach der Anleitung zur *Anti-HA Affinity Matrix* (Roche) durchgeführt. Das gesamte Protokoll wurde bei 4 °C durchgeführt. Abweichend zur generellen Anleitung wurde nach der Beladung und dem Waschen der Matrix, die Matrix mit 1 ml AcTEV-Protease-Puffer umgepuffert. Im Anschluss wurde mit 250 U AcTEV<sup>TM</sup> Protease (10 U/ $\mu$ l) in 1,5 ml AcTEV-Protease-Puffer über Nacht verdaut. Am nächsten Tag wurde entsprechend der Anleitung zur *Anti-HA Affinity Matrix* eluiert und die Matrix wurde regeneriert. Die Hälfte des Eluats wurde bei -80 °C für die spätere massenspektrometrische (MS) Analyse gelagert. Die Proteine in der anderen Hälfte des Eluats wurden durch Zugabe von 100  $\mu$ l Kunstharz-Granulat und Inkubation über 20 Minuten im Überkopfschüttler gebunden. Das beladene Kunstharz-Granulat wurde eine Minuten lang bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Proteine wurde vom Kunstharz-Granulat gelöst, indem 70  $\mu$ l PPP

hinzugefügt wurden und 10 Minuten lang auf 95 °C erhitzt wurde. Nach kurzer Zentrifugation wurde der Überstand in der SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung analysiert. Die Silberfärbung wurde wie bereits beschrieben durchgeführt (117). Dies ermöglichte eine hochsensitive Anfärbung aller Proteine. Es zeigten sich Unterschiede in den Bandenmustern der Eluate von S<sup>GFP</sup>-HATEVm41- und S<sup>GFP</sup>-wt-infizierten RAW264.7-Makrophagen (dargestellt in Abbildung 10A), so dass die zweite Hälfte des Eluats an das Labor des Kooperationspartners Albert Sickmann in Dortmund (ISAS) geschickt wurde. Dort wurde abermals ein Silbergel angefertigt. Dieses ist in Abbildung 10B dargestellt. Die Unterschiede im Bandenmuster wurden von Mitarbeitern des Kooperationspartners ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert (118).

#### 2.2.4.2 Das *Yeast-two-Hybrid*-Verfahren

Im *Y2H*-Verfahren wurden das zu untersuchende Protein m41 (genannt Fänger oder *Bait*) durch ein Plasmid und die möglichen Interaktionspartner (genannt Beute oder *Prey*) ausgehend von einer cDNA-Bank in Hefezellen exprimiert. Das Vorliegen einer *Bait-Prey*-Interaktion führte zur Interaktion koexprimierter Markermoleküle, was die Expression eines Selektionsmarkers zur Folge hatte und somit die Selektion auf Klone ermöglichte, in denen eine Interaktion vorlag. Das *Y2H*-Verfahren wurde nach der Anleitung des *DUALmembrane Starter Kits* von DualsystemsBiotech durchgeführt. Der Versuchsansatz dieses *Y2H*-Verfahrens basiert auf dem Split-Ubiquitin-Prinzip (119) und wurde vom Hersteller für Interaktionsstudien mit Membranproteinen optimiert. Das Prinzip des hier angewandten *Y2H*-Verfahrens ist in Abbildung 5A dargestellt und besteht darin, dass das *Bait* mit einem C-terminalen Ubiquitin-Fragment fusioniert wird und das *Prey* mit einem leicht veränderten N-terminalen Ubiquitin-Rest. Die Mutation verringert die Affinität der Ubiquitinreste, so dass nur eine Fusion der Ubiquitin-Fragmente zustande kommt, wenn *Bait* und *Prey* interagieren. Das *Bait*-Fusionsprotein trägt zusätzlich Transkriptionsfaktoren, die nach der Interaktion der Proteine und Ubiquitinreste durch eine Ubiquitin-spezifische (Ubi.-spez.) Protease abgespalten werden. Der hier verwendete *VP16*-Transkriptionsfaktor transloziert in den Nukleus der Hefe und induziert die Expression der Aminosäure Histidin. Der verwendete histidinauxotrophe Hefestamm *NMY51* kann so unter optimalen Selektionsbedingungen nur dann wachsen, wenn eine Interaktion vorliegt. Die optimalen Selektionsbedingungen sind abhängig vom verwendeten *Bait* und wurden entsprechend der Vorgaben ausgetestet und angewandt.

Im klassischen *Y2H*-Verfahren erfolgt die Expression und Interaktion von *Bait* und *Prey* im Zellkern der Hefe. Mit hoher Wahrscheinlichkeit können hydrophoben Membranproteine nicht in den Kern importiert werden oder liegen hier falsch gefaltet vor, z. B. aufgrund fehlender Membranständigkeit, dem nukleären Milieu und nicht

vorhandener posttranslationalen Modifikationen (120,121). Die Anpassung des *Y2H*-Verfahrens an die Interaktion mit Membranproteinen wurde laut Herstellerangaben verwirklicht, indem *Bait* und *Prey* in der Plasmamembran der Hefe exprimiert werden. Die Expression im Cytoplasma und die posttranslationalen Modifikationen durch die Hefe sollen Interaktionsstudien zwischen Membranprotein und Membranprotein oder cytoplasmatischem Protein ermöglichen.

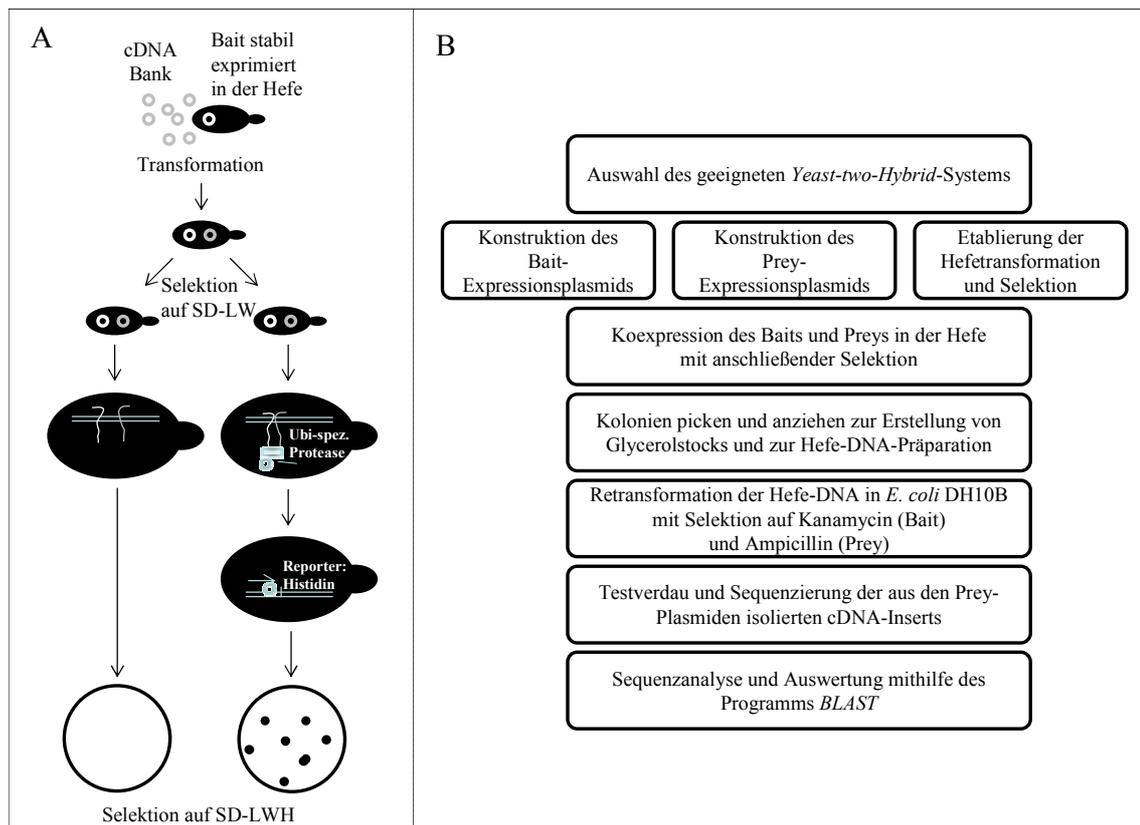


Abbildung 5: Prinzip und Verlaufsschema des *Y2H*-Verfahrens

In Abbildung 5B ist der Ablauf des durchgeführten *Y2H*-Verfahrens dargestellt. Die Auswahl des geeigneten *Y2H*-Ansatzes begann mit der Wahl der Expressionsplasmide. Die Expressionsplasmide von *Bait* und *Prey* mussten im *Y2H*-Verfahren entsprechend der Proteinstruktur des *Baits* ausgewählt werden. Denn nur wenn *Bait* und *Prey* richtig orientiert in der Plasmamembran vorliegen, ist eine Interaktion der Proteine und der Marker möglich. Für das Protein m41 wurde vorhergesagt, dass der N-Terminus ins Cytoplasma ragt (vgl. Abbildung 8). Demzufolge wurde als *Bait*-Expressionsvektor das Plasmid pBT3N gewählt. Die Klonierung erfolgte entsprechend der Herstelleranweisungen und die Expression des *Baits* wurde im „funktionellen Assay“ überprüft. Zur Expression der *Prey*-Proteine wurde eine kompatible cDNA-Bibliothek von DualsystemsBiotech gewählt. Diese Bibliothek umfasste cDNAs aus der Milz erwachsener Mäuse und war nicht standardisiert (*Mouse adult spleen x-NubG cDNA*

*library*). Die Wahl fiel auf diese cDNA-Bibliothek, weil der antiapoptotische Phänotyp des Proteins m41 ausschließlich in RAW264.7-Makrophagen beschrieben worden war (51,59,89) und angenommen wurde, dass in einer cDNA-Bank aus der Milz auch cDNAs von Makrophagen vorliegen. Während der Durchführung des *Y2H*-Verfahrens wurden die Hefetransformation ausgetestet und die optimale Selektionsstringenz bestimmt. Die Medien wurde mit Hilfe des *Media Package 1* und *2* von DualsystemsBiotech angefertigt und die optimale Selektionsstringenz wurde durch Zugabe von 5 mM 3-AT in SD-LWHA Medium und 10 mM 3-AT in SD-LWH Medium erreicht. SD steht für das Minimalmedium, in dem die Aminosäuren Leucin (L), Tryptophan (W), Histidin (H) und das Nukleosid Adenin (A) fehlen und bei Bedarf zugesetzt wurden. Die verwendete Hefe ist auxotroph für die drei Aminosäuren. Das fehlende Nukleosid ermöglicht eine zusätzliche Selektion aufgrund der Farbe der Hefekolonie, die über die Bindungsstärke der Interaktion eine Aussage zulässt, was in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht angewandt wurde. Die Selektionsmarker Leucin und Tryptophan werden durch das *Bait(L)*- oder *Prey(W)*-Plasmid exprimiert. Die Interaktion von *Bait* und *Prey* induziert die Expression von Histidin. Das 3-AT (3-Aminotriazol) ist als kompetitiver Inhibitor des Histidingenproduktes vom Hersteller beschrieben. Der Zusatz von 3-AT reduziert die falsch positiven Kolonien, und die benötigte Menge wurde durch die Verwendung des *Baits* und einer vorgegebenen Kontrollen ausgetestet. Die Stringenz wurde so hoch angesetzt, dass im Fall einer Negativkontrolle des *Preys* kein Kolonienwachstum zu verzeichnen war.

Die finale Durchführung des *Y2H*-Verfahrens ergab eine ca. zweifache Abdeckung der cDNA-Bibliothek. Die Komplexität der Bibliothek liegt laut DualsystemsBiotech bei  $2 \times 10^6$  und eine Transformationseffizienz von  $2 \times 10^6$  reiche aus, um eine 2-3fache Abdeckung zu erlangen. Die ermittelte Transformationseffizienz betrug  $1,6 \times 10^6$  Hefe-Kolonien (gewachsen ohne Selektionsdruck) pro  $\mu\text{g}$  transformierter cDNA. Insgesamt wurden 77 Kolonien gepickt und ausgewertet. Die Auswertung umfasste die Extraktion der *Bait*- und *Prey*-Plasmid-DNA aus der Hefe, die Amplifikation der Plasmid-DNA in *E. coli* sowie die Sequenzierung der cDNA-Inserts. Die Analyse der Sequenzdaten erfolgte mithilfe des frei zugänglichen Programms *BLAST*<sup>1</sup>.

---

<sup>1</sup> <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 m41 und m41.1 gehören zu den früh exprimierten Genen

Die Expression der CMV-Gene erfolgt kaskadenartig. Die sehr frühen Genprodukte (IE) dienen als Aktivatoren der frühen Gene (E). Die Expressionskinetik eines Proteins gibt oft einen Hinweis auf seine Funktion. So werden immunmodulatorische Gene häufig früh exprimiert und spielen in der Replikation eine Rolle. Zu den Genprodukten der späten Gene zählen u. a. Proteine des Viruspartikels (vgl. 1.1). Die Proteine m41 und m41.1 werden im MCMV-Genom überlappend kodiert (s. a. Abbildung 2). Cam *et al.* konnten zeigen, dass m41 und m41.1 auf einer mRNA transkribiert werden und dass das im Virus-Genom HA-markierte m41.1 fünf Stunden nach der Infektion von Mausfibroblasten im Western Blot nachweisbar ist. Wie in Abbildung 6 gezeigt, trifft dies auch für das Protein m41 zu. m41 konnte hierbei mit einem spezifischen Antikörper fünf Stunden nach der Infektion (hpi) detektiert werden.

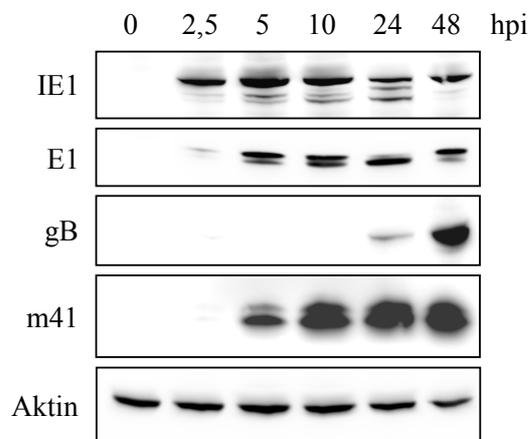


Abbildung 6: Expressionskinetik des Proteins m41 im Western Blot

Murine 10.1-Fibroblasten wurden mit einer  $TCID_{50}$  von 5 infiziert. 0, 2,5, 5, 10, 24 und 48 hpi wurden Proteinlysate mit kochendem Proteinprobenpuffer hergestellt. Im Western Blot sind die Markerproteine für sehr früh (*immediate early*; IE1), früh (*early*; E1) und spät (*late*; gB) exprimierte MCMV-Proteine sowie m41 nachgewiesen. Als Ladekontrolle diente Aktin.

Die Expressionskinetik eines CMV-Proteins kann, wie oben gezeigt, durch den Expressionsvergleich mit Markerproteinen bestimmt werden. Zur Verifikation der Expressionskinetik von m41 und m41.1 wurde ein weiteres Experiment durchgeführt, dessen Ergebnis in Abbildung 7 dargestellt ist.

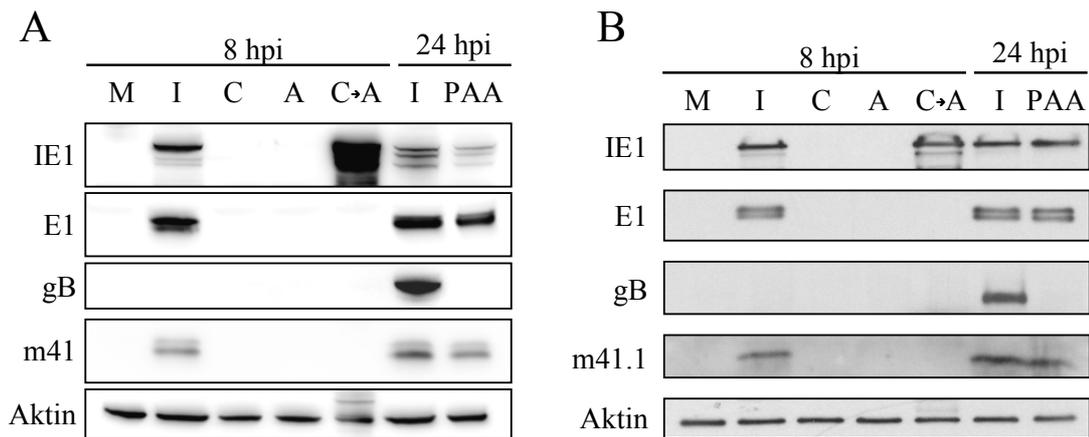


Abbildung 7: Expressionskinetik der Proteine m41 und m41.1 im Western Blot

Murine 10.1-Fibroblasten wurden mit einer  $TCID_{50}$  von 5 für 8 sowie 24 Stunden (I) oder nicht (mock, (M)) infiziert. Die virale Genexpression wurde durch die Behandlung mit Cycloheximid (C) oder Actinomycin D (A) beeinträchtigt und die virale Replikation mit Phosphonoessigsäure (PAA) unterbunden. Der Nachweis der Expression sehr früher MCMV-Gene wurde durch den Behandlungswechsel von C→A vier hpi ermöglicht. Früh exprimierte Gene waren 8 hpi zu detektieren. Die Expression der späten Gene wurde in der mock behandelten Probe 24 hpi nachgewiesen, wobei die Expression unter PAA-Behandlung ausblieb. Die MCMV-Proteine IE1 (sehr früh), E1 (früh), gB (spät), m41 (A) und im Virusgenom HA-markiertes m41.1 (B) wurden mit Antikörpern nachgewiesen. Als Ladekontrolle diente Aktin.

In diesem Experiment wurden unterschiedliche Stadien des viralen Replikationszyklus inhibiert. Die Behandlung mit Actinomycin D (A) hemmt die Transkription, Cycloheximid (C) hingegen die Translation und Phosphonoessigsäure (PAA) verhindert die virale DNA-Replikation. Wurde zuerst mit Cycloheximid behandelt und vier Stunden nach der Infektion auf Actinomycin D umgestellt (C→A), konnten nur die Transkripte translatiert werden, die in den ersten vier Stunden (sehr früh) nach der Infektion transkribiert worden waren. Die ungehemmte Infektion resultierte acht Stunden nach der Infektion (I) in der Expression der sehr früh (IE1) und früh (E1) exprimierten Gene. Die PAA-Behandlung verhindert die Expression der späten Genprodukte wie dem viralen Glykoprotein gB. In unbehandelte Zellen konnten hingegen 24 Stunden nach der Infektion (I) sehr frühe, frühe und späte Genprodukte nachgewiesen werden. Die Ergebnisse des Western Blots in Abbildung 7 zeigen, dass die Proteine m41 (A) und m41.1 (B) acht Stunden nach der Infektion, unabhängig von der viralen DNA-Replikation nachgewiesen werden konnten, jedoch nicht nach Transkriptions- bzw. Translationshemmung. Dadurch lässt sich bestätigen, dass m41 und m41.1 zu den früh exprimierten Genprodukten des MCMVs zählen.

## 3.2 Untersuchungen zur Charakterisierung des MCMV-Proteins m41

### 3.2.1 *In silico* wird m41 als Typ-II-Transmembranprotein eingestuft und ist in der Immunfluoreszenz im cis-Golgi nachweisbar

Das Protein m41 besteht aus 138 Aminosäuren (AS). Es wurde beschrieben, dass es im Golgi-Apparat lokalisiert ist. Um eine Vorstellung zu bekommen, wie das Protein m41 in der Zelle vorliegt, wurden Proteinstrukturvorhersage-Programme wie SOSU<sup>2</sup> und TMHMM2.0<sup>3</sup> verwendet. Weder die Orientierung noch die Lokalisation des Proteins konnten eindeutig vorhergesagt werden, da Signalsequenzen und Motive fehlen. Jedoch gab es Hinweise für eine Typ-II-Transmembranproteinstruktur mit dem N-Terminus im Cytoplasma und dem C-Terminus im Lumen. Abbildung 8A zeigt ein Resultat aus der Analyse mit dem Programm SOSUI. Hier wurde eine C-terminale Transmembrandomäne vorhergesagt. Abbildung 8B zeigt eine vereinfachte, graphische Darstellung.

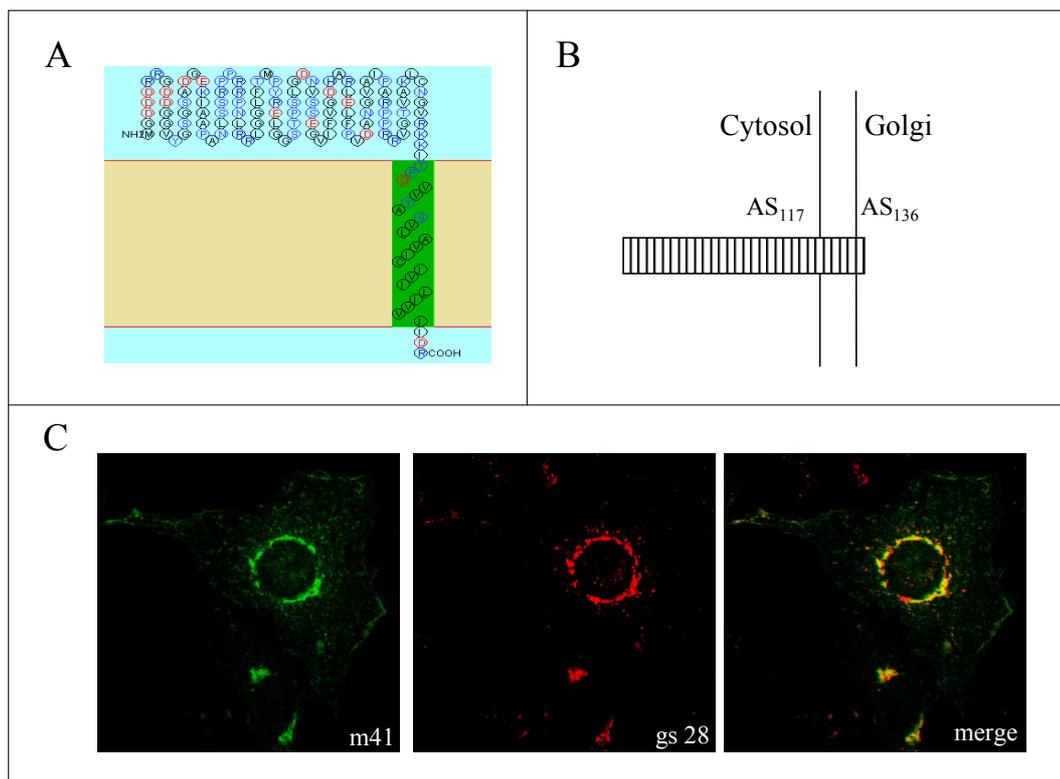


Abbildung 8: Modell und Immunfluoreszenz zur intrazellulären Lokalisation von m41

A) Ein Auszug der Ergebnisse aus der *in silico* Analyse der Aminosäuresequenz des Proteins m41 mithilfe des Vorhersageprogramms SOSUI ist dargestellt. B) In der graphischen Darstellung sind die

<sup>2</sup> <http://www.tuat.ac.jp/mitaku/sosui/>

<sup>3</sup> <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/7>

Lokalisation und das Ergebnis aus den Vorhersageprogrammen vereinfacht dargestellt. Das Protein m41 wird als Typ-II-Transmembranprotein eingestuft. Eine vorhergesagte 22 Aminosäuren-umfassende, C-terminale Transmembrandomäne trennt den langen cytoplasmatischen, N-terminalen Bereich vom luminalen Bereich, der nur wenige Aminosäuren umfasst. Die Proteingröße von 138 Aminosäuren resultiert aus dem annotierten Bereich im Genom des MCMV-Stamms Smith. C) NIH/3T3-Fibroblasten wurden für die Immunfluoreszenz präpariert. m41 wurde mit dem m41-Antikörper detektiert und ist hier in grün sichtbar. Der cis-Golgi-Marker gs28 wurde in Rot markiert. In der Überlagerung (merge) zeigt die Gelbfärbung die Kolo-kalisation von m41 mit dem cis-Golgi-Marker. Die Primärantikörper zeigten hierbei keine Crossreaktivität mit den Sekundärantikörpern der anderen Spezies (nicht abgebildet). Die Bilder wurden an einem cLSM aufgenommen.

Die intrazelluläre Lokalisation von m41 wurde mittels einer Immunfluoreszenz auf den cis-Golgi spezifiziert. Abbildung 8C zeigt, dass das Protein m41 nach Transfektion mit dem cis-Golgi-Marker gs-28 überlagert. Die Anfärbung des Proteins m41 erfolgte hier mit dem spezifischen m41-Antikörper 2A6. Die Untersuchungen zeigen, dass m41 vermutlich als Transmembranprotein im cis- Golgi lokalisiert ist.

### 3.2.2 Identifikation möglicher Interaktionspartner des Proteins m41

#### 3.2.2.1 Die Suche nach Interaktionspartnern des Proteins m41 mithilfe der $\alpha$ -HA-Affinitätsaufreinigung und einem *Yeast-two-Hybrid*-Verfahren

Für das Protein m41 wurde eine antiapoptotische Funktion beschrieben (51,59,89). Der zugrunde liegende Mechanismus ist jedoch nicht bekannt. Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der antiapoptotischen Funktion von m41. Die Identifikation einer Protein-Protein-Interaktion zwischen m41 und einem zellulären Protein könnte aufzeigen, wie m41 die Apoptose in der Zelle verhindert. Deshalb wurden zwei Suchverfahren durchgeführt: die  $\alpha$ -HA-Affinitätsaufreinigung in Kombination mit einer massenspektrometrischen Analyse und ein *Yeast-two-Hybrid*-Verfahren (Y2H).

*Die Suche nach Interaktionspartnern des Proteins m41 mithilfe der  $\alpha$ -HA-Affinitätsaufreinigung gekoppelt an eine massenspektrometrische Analyse*

Die  $\alpha$ -HA-Affinitätsaufreinigung ermöglicht die Aufkonzentration von spezifischen Proteinkomplexen. Hierzu wird das Protein der Wahl mit einem HA-Markermolekül fusioniert. Zusätzlich wird eine Protease-Erkennungssequenz angefügt. Das markierte Protein der Wahl wird in seiner natürlichen Umgebung exprimiert, so dass Bindungspartner an das Protein der Wahl binden können. Die entstehenden Proteinkomplexe werden an einer Matrix aufkonzentriert. Der HA-Marker bindet hierbei an HA-Antikörper, die an der Matrix gebunden sind. Nach der Aufkonzentration der Proteinkomplexe an der Matrix können die Proteinkomplexe über die Protease-Erkennungssequenz mittels Proteolyse abgespalten werden. Das entstandene Eluat wird in einem Silbergel aufgetrennt. Im Vergleich mit einer Kontrolle zeigt sich, welche

Banden durch unspezifische Bindungen an der Säule entstanden sind und welche nur in Anwesenheit des markierten Proteins der Wahl auftreten und folglich einen Bindungspartner des Proteins der Wahl beinhalten könnten. Diese Banden werden massenspektrometrisch zur Identifikation des Bindungspartners analysiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde vorbereitend für die  $\alpha$ -HA-Affinitätsaufreinigung die HATEVm41-Virusmutante ( $S^{\text{GFP}}$ -HATEVm41) konstruiert. In Abbildung 9A ist schematisch dargestellt, dass die HATEVm41-Virusmutante das Protein m41 fusioniert mit einem HA-Marker und einer TEV-Protease-Erkennungssequenz am natürlichen Locus im Virusgenom exprimiert. Zusätzlich musste das Protein M11L in das Virusgenom eingesetzt werden, zumal Vorarbeiten gezeigt hatten, dass das überlappend mit m41 kodierte m41.1 (vgl. Abbildung 2) nicht korrekt exprimiert wird, wenn m41 N-terminal markiert ist (mündliche Kommunikation mit M. Cam). M11L ist ein antiapoptisches Protein des Myxoma Virus und hemmt die BAX- und BAK-medierte Apoptose (107-109). Dass M11L in der Lage ist, das Fehlen von m41.1 zu kompensieren, wurde 2010 von Cam *et al.* (89) gezeigt. Nähere Erläuterungen zum Klonierungsverfahren und zur Konstruktion der HATEVm41-Virusmutante sind unter 2.2.2.9 nachzulesen. Die Klonierung der HATEVm41-BAC-DNA wurde durch Restriktion und Sequenzierung kontrolliert (nicht abgebildet). Anschließend wurde das HATEVm41-Virus rekonstituiert. Im Infektionsexperiment wurde untersucht, ob HATEV-markiertes m41 (HATEVm41) korrekt exprimiert wird. Hierbei wurde neben der erwarteten Größe des Proteins überprüft, ob der HA-Marker und das Protein m41 durch ihre spezifischen Antikörper erkannt werden und ob die TEV-Protease in der TEV-Erkennungssequenz spalten kann. Die Expression wurde getestet, indem RAW264.7-Makrophagen mit der HATEVm41-Virusmutante oder dem Wildtyp-Virus ( $S^{\text{GFP}}$ -wt) infiziert wurden. Das Protein HATEVm41 wurde aus dem Zelllysat an einer  $\alpha$ -HA-gekoppelte Matrix (PAS) gebunden und das m41 wurde durch die TEV-Protease abgespalten. Drei Fraktionen wurden im Western Blot auf die Anwesenheit des Proteins m41 getestet. Die infizierten Zelllysate sind in Abbildung 9B mit L gekennzeichnet. Der aufgetragene Überstand nach dem Verdau mit der TEV-Protease wurde mit ÜS abgekürzt. Verbleibende („leere“) PAS wurde ebenfalls analysiert (P). Der Western Blot in Abbildung 9B zeigt, dass nach der Infektion mit der HATEVm41-Virusmutante und dem TEV-Verdau m41 in allen drei Fraktionen nachweisbar ist. Dieser Ansatz zeigt, dass HATEVm41 an der Matrix gebunden wurde und dass der Verdau mit der TEV-Protease zur Abspaltung des Proteins m41 geführt hat. Allerdings konnten große Mengen an nicht entlassenem HATEVm41-Protein trotz des erfolgten Verdau mit der TEV-Protease in der P-Fraktion detektiert werden (unvollständiger Verdau). Die Analyse der Kontrollansätze zeigte wie erwartet, dass nach der Infektion mit Wildtyp-Virus m41 nur im Lysat detektiert wurde. Des Weiteren wurde ohne Verdau mit der TEV-Protease kein m41 im Überstand nachgewiesen. Die Ergebnisse zeigen, dass die

neu generierte HATEVm41-Virusmutante das Protein HATEVm41 korrekt exprimiert und für die  $\alpha$ -HA-Affinitätsaufreinigung eingesetzt werden kann.

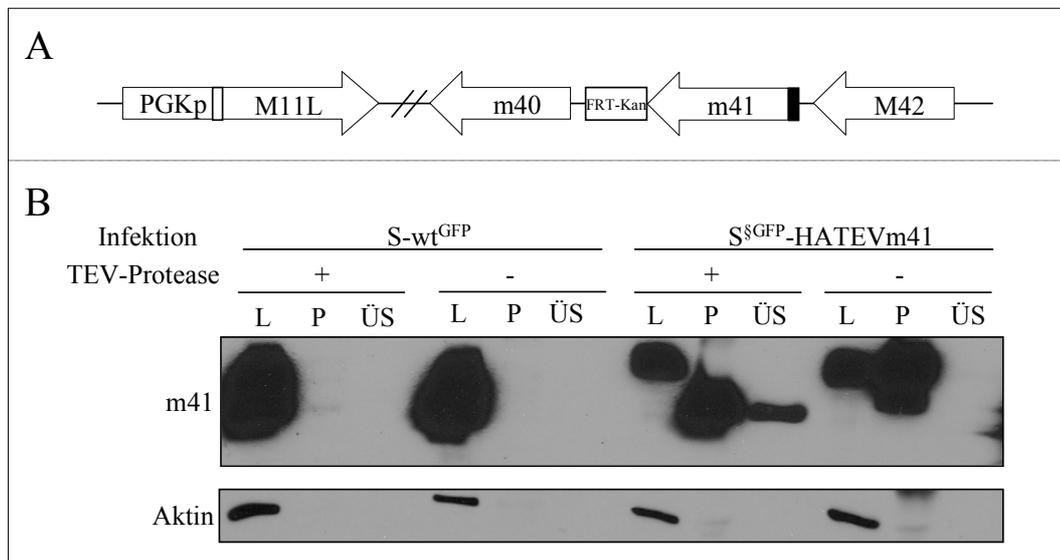


Abbildung 9: Schematische Darstellung und Kontrolle der HATEVm41-Virusmutante

A) Schematisch dargestellt sind die veränderten Genombereiche des HATEVm41-Virus. M11L ist ein antiapoptisches Protein des Myxoma Virus und ersetzt funktionell das fehlerhaft exprimierte m41.1 (s. Text). PGKp steht für den konstitutiv exprimierten Promotor der Phosphoglyceratkinase. FRT-Kan steht für die Sequenz des Selektionsmarkers, d. h. der Kanamycin-Resistenz, die durch die Sequenzen der FRT-Rekombinationsstellen flankiert wird. Das schwarze Rechteck am Protein m41 symbolisiert die HA-Markierung fusioniert mit der Erkennungssequenz der TEV-Protease (HATEV). B) RAW264.7-Makrophagen wurden mit Wildtyp-Virus (S-wt<sup>GFP</sup>) oder der HATEVm41-Virus (S<sup>GFP</sup>-HATEVm41) infiziert. 24 hpi wurden Zelllysate mit Tritonpuffer hergestellt. Ein Aliquot des Lysats (L) wurde abgenommen. Im verbleibenden Lysat wurde das Protein HATEVm41 mit  $\alpha$ -HA-gekoppelter PAS präzipitiert. Die beladene PAS wurde mit Tritonpuffer gewaschen und auf den Puffer der TEV-Protease umgepuffert. Nach dem anschließenden Verdau mit der TEV-Protease wurde der Überstand (ÜS) von der PAS (P) getrennt. Die Lysat (L)-, PAS (P)- und Überstand (ÜS)-Fraktionen wurden im Western Blot auf das Vorhandensein des Proteins m41 untersucht. Aktin diente als Ladekontrolle.

Daraufhin wurden wiederum RAW264.7-Makrophagen mit HATEVm41-Virus oder dem Wildtyp-Virus infiziert. Die Lysate der infizierten Zellen wurden für die  $\alpha$ -HA-Affinitätsaufreinigung eingesetzt. Die  $\alpha$ -HA-Affinitätsaufreinigung wurde wie unter 2.2.4.1 beschrieben durchgeführt. Das resultierende Eluat aus der  $\alpha$ -HA-Affinitätsaufreinigung der HATEVm41-infizierten Zellen sollte hierbei das aufkonzentrierte m41 und dessen Bindungspartner beinhalten. Die Probe aus Wildtyp-Virus-infizierten Zellen sollte hingegen nur unspezifisch gebundene, eluierte Proteine beinhalten. Beide Eluate wurden halbiert. Eine Hälfte wurde direkt im Silbergel aufgetrennt (s. Abbildung 10A).

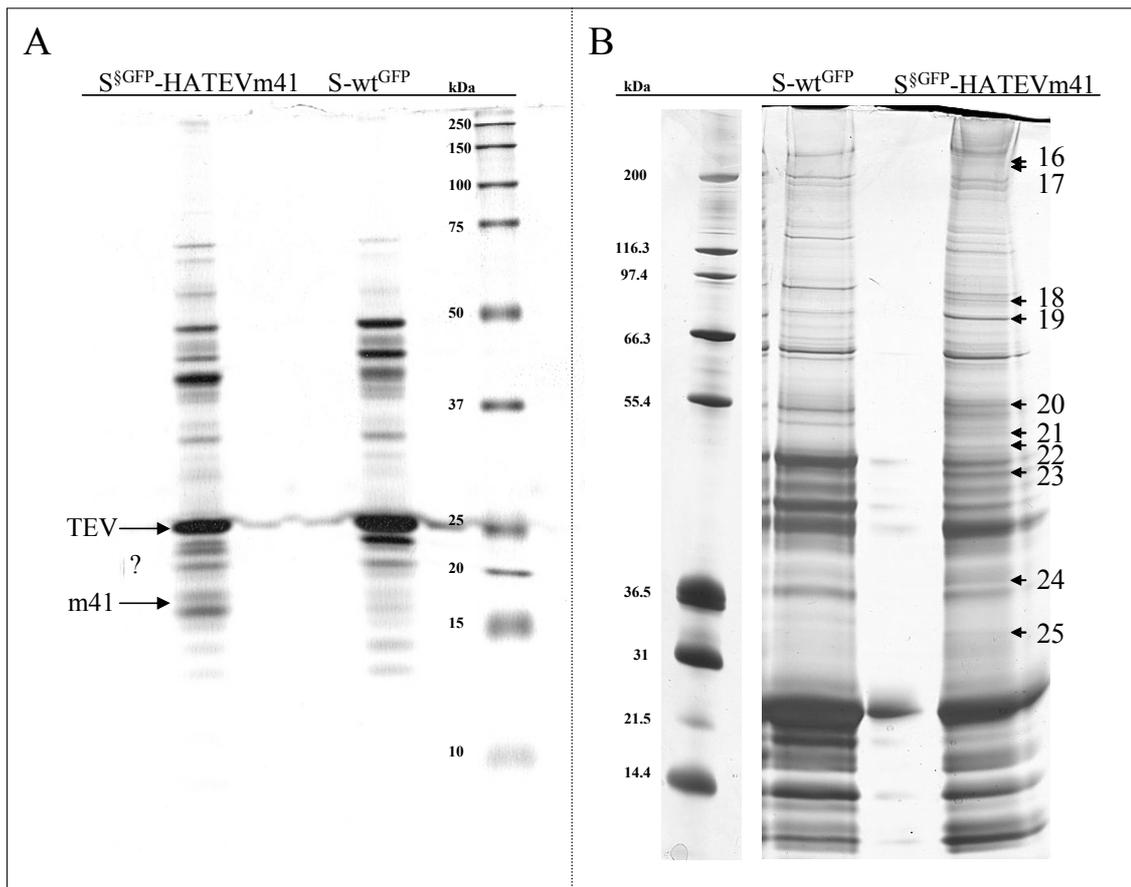


Abbildung 10: Silbergele der  $\alpha$ -HA-Affinitätsaufreinigung

A) Das Silbergel wurde wie unter 2.2.4.1 beschrieben aus einer Hälfte der Eluate der  $\alpha$ -HA-Affinitätsaufreinigung angefertigt. Es wurde vermutet, dass die gekennzeichneten Banden der TEV-Protease (TEV; 25 kDa) und dem Protein m41 entsprechen (m41; 15-20 kDa). B) Die andere Hälfte der Eluate wurde im Labor des Kooperationspartners Albert Sickmann untersucht und dort ebenfalls in einem Silbergel aufgetrennt. Die Auswahl der zu analysierenden Banden erfolgte anhand des Bildes. Die mit Pfeilen markierten Banden 16-25 wurden im Labor des Kooperationspartners ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert.

Das Silbergel in Abbildung 10A zeigt das resultierende Bandenmuster der Ansätze nach der Infektion mit Wildtyp-Virus und HATEVm41-Virus. Auf der Höhe von 25 kDa ist eine prominente Bande in beiden Spuren zu erkennen. Aufgrund der Größe wurde vermutet, dass es sich hierbei um die TEV-Protease (TEV) handelt. Exklusiv in der HATEVm41-Spur konnte eine Bande knapp oberhalb der 15 kDa-Marke (m41) detektiert werden. Es wurde angenommen, dass diese Bande das Protein m41 beinhaltet, denn im Western Blot ist das Protein m41 zwischen 15 und 20 kDa nachweisbar. Die zweite Hälfte des Eluates wurde in der Arbeitsgruppe des Kooperationspartners Albert Sickmann (ISAS, Dortmund) analysiert. Hier wurde das in Abbildung 10B dargestellte Silbergel angefertigt. Auffällig an Abbildung 10 ist, dass die dargestellten Silbergele sich nicht gleichen, obwohl sie aus den identischen Eluates hergestellt wurden. Dies kann durch die unterschiedlichen Gelsysteme begründet sein (mündliche

Kommunikation mit Albert Sickmann). Aus dem in Abbildung 10B dargestellten Gel wurden Unterschiede im Bandenmuster der beiden Ansätze identifiziert. Diese sind in Abbildung 10B mit Pfeilen und den Nummern 16 bis 25 gekennzeichnet und wurden im Labor des Kooperationspartners ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert. Eine Liste der identifizierten Proteinefragmente aus jeder Bande wurde erstellt und ein Auszug dieser Daten ist im Anhang unter 6.1 aufgeführt. Die Auswertung erfolgte zusammen mit dem Ergebnissen des *Y2H*-Verfahrens.

#### *Die Suche nach Interaktionspartnern des Proteins m41 mithilfe des Y2H-Verfahrens*

Als zweite Strategie wurde ein von DualsystemsBiotech entwickeltes *Y2H*-Verfahren durchgeführt. In diesem *Y2H*-Verfahren werden das Protein der Wahl und mögliche Bindungspartner in der Plasmamembran der Hefe exprimiert. Die Sequenz des Proteins der Wahl und der möglichen Bindungspartner liegen hierbei auf speziellen Plasmiden in der Hefe vor. Nur wenn eine Interaktion zwischen dem Protein der Wahl und einem möglichen Bindungspartner vorliegt, kommt es zur Expression eines Selektionsmarkers, die der Hefe das Wachstum auf einem Selektionsmedium erlaubt. Nach der Selektion erfolgt die Isolation der Plasmide, die die Sequenz des Bindungspartners tragen. Die kodierende Sequenz des Bindungspartners wird über Sequenzierung ermittelt und mithilfe der *BLAST*-Analyse einem Protein zugeordnet.

Das in der vorliegenden Arbeit durchgeführte *Y2H*-Verfahren resultierte nach der Selektion in 77 Hefe-Kolonien. In diesen 77 Hefe-Kolonien hatte das Protein m41 mit einem Bindungspartner interagiert. Die möglichen Bindungspartner wurden von Plasmiden einer cDNA-Bank kodiert (vgl. 2.2.4.2). Die Plasmide wurden isoliert und die Sequenzen der Bindungspartner ermittelt. Hierbei wurden 63% der ermittelten Sequenzen mithilfe des Programms *BLAST*<sup>4</sup> Proteinen zugeordnet. Eine Liste der identifizierten Proteine ist im Anhang unter 6.1 aufgeführt. Die Auswertung der *Y2H*-Ergebnisse erfolgte zusammen mit dem Ergebnissen der  $\alpha$ -HA-Affinitätsaufreinigung.

#### *Favorisierte Interaktionspartner für m41 aus der $\alpha$ -HA-Affinitätsaufreinigung und dem Y2H-Verfahren*

Durch beide Verfahren konnten mögliche Interaktionspartner des Proteins m41 identifiziert werden. Es wird hierbei von „möglichen Interaktionspartnern“ gesprochen, da in Suchverfahren auch mit falsch positiven Treffern zu rechnen ist. Um dies auszuschließen, müssen die identifizierten Interaktionen mit anderen Methoden bestätigt werden. Aus der  $\alpha$ -HA-Affinitätsaufreinigung und dem *Y2H*-Verfahren wurden die Proteine UNC93B1<sup>5</sup>, GTSE1<sup>6</sup> und Basigin<sup>7</sup> als die drei vielversprechendsten

---

<sup>4</sup> [http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE\\_TYPE=BlastHome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome)

<sup>5</sup> *Y2H*: Klon 18

<sup>6</sup> *Y2H*: Klon 3 & 4; Bande 18 im Silbergel bei 70-80 kDa, erwartete Größe 76 kDa

<sup>7</sup> *Y2H*: Klon 9; Bande 23 im Silbergel unterhalb von 50kDa, erwartete Größe 43kDa

Kandidaten ausgewählt. GTSE1 und Basigin wurden ausgewählt, weil sie in beiden Suchverfahren nachgewiesen werden konnten (s. 6.1). UNC93B1 wurde als Interaktionspartner im *Y2H*-Verfahren identifiziert. Das Protein UNC93B1 war bereits im Zusammenhang mit der MCMV-Infektion beschrieben worden, so dass zuerst die Interaktion von UNC93B1 und m41 näher untersucht wurde.

*Zeigen m41 und UNC93B1 eine funktionelle Interaktion?*

Zuerst wurde untersucht, ob die Proteine m41 und UNC93B1 in der Zelle kolokalisieren. Hierzu wurde eine Immunfluoreszenz angefertigt. In Abbildung 11 ist die Immunfluoreszenz zur Untersuchung der intrazellulären Lokalisation von m41 und UNC93B1 gezeigt. NIH/3T3-Zellen wurden mit Plasmiden transfiziert, die für Flag-markiertes UNC93B1 und HA-markiertes m41 kodierten. 24 Stunden später wurden die Zellen für die mikroskopische Analyse am cLSM präpariert. In der Überlagerung (merge) der Aufnahmen von HA-markiertem m41 (grün) und Flag-markiertem UNC93B1 (rot) zeigt sich eine partielle Kolokalisation.

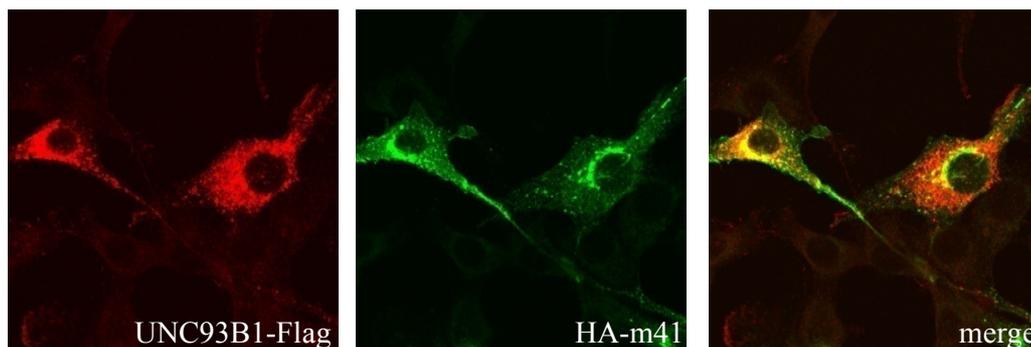


Abbildung 11: Immunfluoreszenz von UNC93B1 und m41

NIH/3T3-Fibroblasten wurden mit pcDNA-Konstrukten kodierend für UNC93B1-Flag und HA-m41 transfiziert und auf Deckgläschen umgesetzt. Am nächsten Tag wurden die Proben für die Immunfluoreszenz präpariert. Die Detektion des HA-markierten Proteins m41 erfolgte über die Bindung an Alexa-488-gekoppelte Sekundärantikörper (grün). Zum Nachweis von UNC93B1-Flag wurde Alexa-568-gekoppelter Sekundärantikörper (rot) verwendet. Die Spezifität der Sekundärantikörper wurde kontrolliert (nicht abgebildet). Nach der Aufnahme am cLSM wurden die Aufnahmen überlagert (merge).

Anschließend wurde die Interaktion von m41 und UNC93B1 im Rahmen der MCMV-Infektion betrachtet. UNC93B1 ist ein ER-ständiges Transmembranprotein, das essentiell für die Prozessierung und/ oder Aktivierung von endosomalen Toll-like Rezeptoren (TLRs) ist. TLRs erkennen Strukturen von Pathogenen und tragen zur Aktivierung der Immunantwort bei (122). Die Kooperationspartnerin Melanie Brinkmann untersucht u. a. die Inhibition der TLR-Signalwegaktivierung durch das MCMV. Brinkmann und Kollegen hatten gezeigt, dass ein anderes MCMV-Protein, das M45, direkt die Aktivierung dieser TLRs inhibiert (123). Versuche mit einem M45-

Knockoutvirus zeigten jedoch, dass die Inhibition allein durch das Fehlen des M45-Proteins nicht vollständig aufgehoben werden konnte (mündliche Kommunikation zwischen M. Brinkmann und W. Brune). Demzufolge musste ein weiteres MCMV-Protein existieren, dass zur Inhibition der UNC93B1-abhängigen TLR-Aktivierung beitrug. Aufgrund der Interaktion von m41 und UNC93B1 im *Y2H*-Verfahren wurde m41 als möglicher Kandidat untersucht. Hierfür wurde ein Doppelknockoutvirus konstruiert, das weder m41 noch M45 exprimiert (vgl. 2.2.2.9). Im Infektionsexperiment mit dem M45-m41-Doppelknockoutvirus ( $S^{\text{GFP}}\text{-}\Delta\text{M45-m41ko}$ ) sollte sich zeigen, ob die MCMV-vermittelte Inhibition der TLR-Aktivierung durch das Fehlen der Proteine M45 und m41 vollständig aufgehoben werden kann. Dies wäre ein Hinweis auf eine mögliche funktionelle Interaktion von UNC93B1 und m41. Die Abbildung 12A stellt die Veränderungen im Virusgenom des M45-m41-Doppelknockoutvirus graphisch dar.

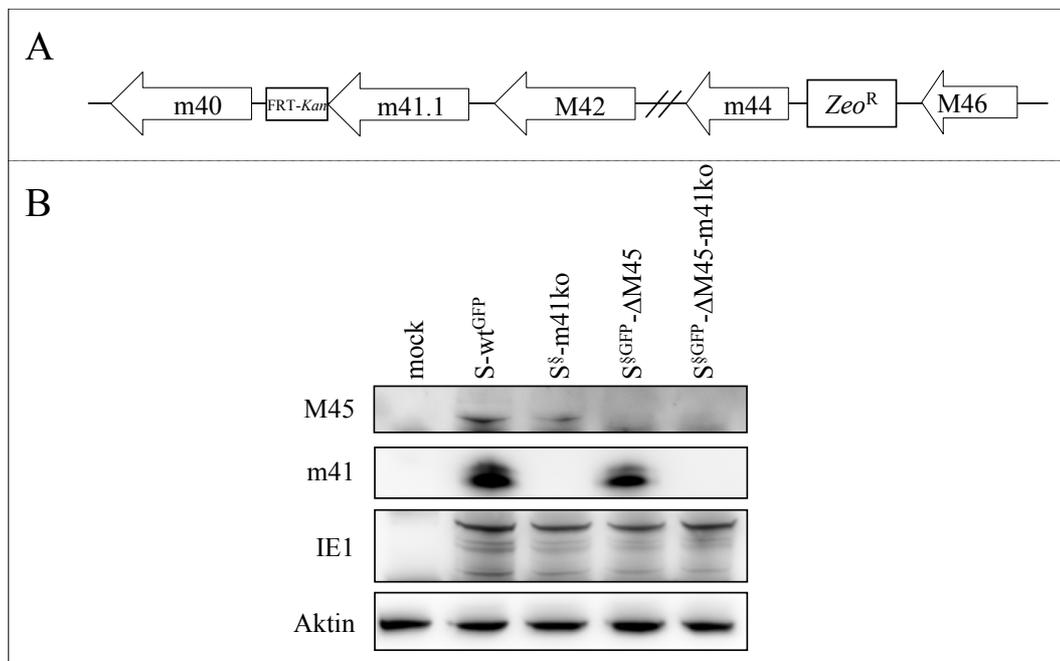


Abbildung 12: Schematische Darstellung und Kontrolle des M45-m41-Doppelknockoutvirus

A) Das M45-m41-Doppelknockoutvirus (MCMV  $S^{\text{GFP}}\text{-}\Delta\text{M45-m41ko}$ ) wurde ausgehend von einer m41-Knockoutmutante (MCMV Smith<sup>GFP</sup>-m41ko; angefertigt von M. Cam) kloniert. Das Ersetzen der M45-Sequenz gegen die Sequenz der Zeocin-Resistenz erfolgte wie zuvor beschrieben (59). In der Abbildung ist die Sequenz des FRT-*Kan*-Selektionsmarkers eingezeichnet und steht für die Sequenz der Kanamycin-Resistenz flankiert von FRT-Erkennungssequenzen. *Zeo<sup>R</sup>* bezeichnet die Sequenz der Zeocin-Resistenz.

B) 10.1-Fibroblasten wurden mit den aufgeführten Virusmutanten infiziert und 18 hpi wurden Zelllysate mit kochendem Proteinprobenpuffer hergestellt. In der folgenden Expressionsanalyse im Western Blot wurden die Proteine M45 und m41 mittels spezifischer Antikörper detektiert. Der Nachweis von IE1 und Aktin wurde als Infektions- bzw. Ladekontrolle verwendet.

Im Genom des Wildtyp-Virus werden die Proteine m41 und m41.1 überlappend im Locus m41 kodiert (s. Abbildung 2). Im M45-m41-Doppelknockoutvirus wurde der Locus m41 durch die Sequenz des Selektionsmarkers (FRT-Kan) gekoppelt an die Sequenz des Proteins m41.1 ersetzt, so dass die kodierende Sequenz des Proteins m41.1, aber nicht die des Proteins m41, im Locus m41 vorlag. Zusätzlich wurde der M45-Leserahmen durch die Sequenz der Zeocin-Resistenz ausgetauscht. Die Veränderungen in der BAC-DNA des M45-m41-Doppelknockoutvirus wurden durch Restriktion und Sequenzierung kontrolliert (nicht abgebildet). Anschließend wurde daraus das M45-m41-Doppelknockoutvirus rekonstituiert. Um sicherzustellen, dass das M45-m41-Doppelknockoutvirus die Proteine m41 und M45 nicht exprimiert, wurden Zelllysate infizierter Fibroblasten im Western Blot analysiert. Abbildung 12B zeigt das Ergebnis. Der Western Blot zeigt, dass nach Infektion mit dem M45-m41-Doppelknockoutvirus kein M45 und kein m41 im Western Blot nachweisbar waren. Die Kontrollen zeigten die erwarteten Ergebnisse. In Wildtyp-Virus (S-wt<sup>GFP</sup>)-infizierten Zelllysaten waren im Western Blot beide Proteine, m41 und M45, nachweisbar. Die Infektion mit M45- oder m41- Einzelknockoutvirus (S<sup>§GFP</sup>-ΔM45 und S<sup>§</sup>-m41ko) hingegen zeigte im Western Blot nur die Expression des Proteins m41 bzw. des Proteins M45. Daraufhin wurde das M45-m41-Doppelknockoutvirus an M. Brinkmann geschickt. Sie führte die Infektionsexperimente mit dem M45-m41-Doppelknockoutvirus im Vergleich zum M45-Einzelknockoutvirus durch und konnte keinen Unterschied nach der Infektion mit M45-m41-Doppelknockoutvirus und M45-Einzelknockoutvirus feststellen (mündliche Kommunikation zwischen M. Brinkmann und W. Brune). Aufgrund dieser negativen Daten lässt sich eine funktionelle Interaktion zwischen m41 und UNC93B1 zwar nicht komplett ausschließen, sie erscheint aber als unwahrscheinlich. Daher wurde ein anderer möglicher Interaktionspartner von m41 untersucht, die Caspase-2.

### 3.2.2.2 Die Caspase-2 als möglicher Interaktionspartner von m41

#### *Spielt m41 in der Caspase-2-abhängigen, Golgi-vermittelten Apoptose eine Rolle?*

Diese Frage ergab sich, als in der Literatur nach einem möglichen Interaktionspartner gesucht wurde. m41 wurde als antiapoptotisches, Golgi-lokalisiertes Protein beschrieben (51,59,89) und Caspase-2 wurde in der Literatur mit der Golgi-mediierten Apoptose in Verbindung gebracht. Hierbei ist die Rolle des Golgis sowie der Caspase-2 im Zelltodgeschehen weitgehend noch nicht geklärt (s. 1.3 und 1.4). Mancini *et al.* konnten jedoch zeigen, dass aktive Caspase-2 am Golgi-Apparat lokalisiert und an der Golgi-mediierten Apoptose beteiligt ist (42). In der vorliegenden Arbeit wurde die Arbeitshypothese aufgestellt, dass m41 die Aktivierung der Caspase-2 bzw. der Apoptose am Golgi-Apparat hemmt. Abbildung 13 stellt die Arbeitshypothese graphisch dar.

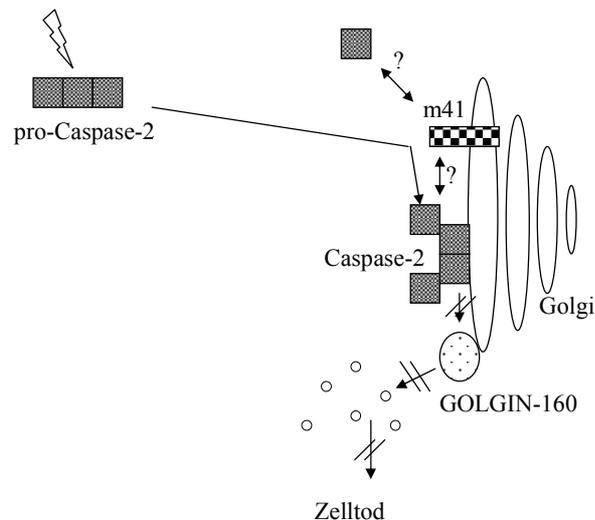


Abbildung 13: Graphische Darstellung der Arbeitshypothese zur Interaktion zwischen den Proteinen m41 und der Caspase-2

Mancini *et al.* beschrieben, dass nach proapoptotischer Stimulation aktive Caspase-2 am Golgi-Apparat lokalisiert. Caspase-2 fragmentiert das Golgi-lokalisierte Protein GOLGIN-160 (42). Für die GOLGIN-160-Fragmente konnte eine proapoptotische Funktion gezeigt werden (68). Das Protein m41 ist am Golgi-Apparat lokalisiert und wurde als antiapoptotisches Protein beschrieben (51,59,89). Die Arbeitshypothese wirft die Frage auf, ob das MCMV-Protein m41 mit der Caspase-2 interagiert und dessen proapoptotische Funktion inhibiert.

Gestützt wurde diese Hypothese dadurch, dass der Phänotyp eines Caspase-2-Knockouts *in vivo* und *in vitro* als stark zelltyp- und stimulusabhängig beschrieben wurde (124), was den schwachen antiapoptotischen Effekt von m41 exklusiv in der infizierten Makrophagen-ähnlichen Zelllinie RAW264.7 (51,89) erklären könnte. Die Fragestellung, ob das Protein m41 und die Caspase-2 in Wechselwirkung stehen, wurde in zwei Stufen bearbeitet. Zuerst wurde untersucht, ob m41 mit Caspase-2 interagiert. Hierfür wurde zum einen das Eluat der  $\alpha$ -HA-Affinitätsaufreinigung im Western Blot auf die Anwesenheit von Caspase-2 untersucht. Zum anderen wurde die Interaktion in der Koimmunpräzipitation nach Transfektion und Infektion analysiert. Im zweiten Schritt wurde untersucht, ob m41 im Rahmen der MCMV-Infektion einen Einfluss auf die Aktivierung der Caspase-2 hat. Hierbei wurden die Caspase-2-Aktivierung nach der Infektion mit Wildtyp-Virus (S-wt) und m41-Knockoutvirus ( $S^{\delta}$ -m41ko) verglichen.

#### *Caspase-2 ist im HATEVm41-Eluat der $\alpha$ -HA-Affinitätsaufreinigung nachweisbar*

Die  $\alpha$ -HA-Affinitätsaufreinigung wurde bereits unter 3.2.2.1 und 2.2.4.1 vorgestellt. Abweichend wurden hier die Eluate aus den Kontroll-Virus ( $S^{\text{GFP}}$ -m41HA)- und HATEVm41-Virus ( $S^{\text{GFP}}$ -HATEVm41)-infizierten Ansätzen nicht im Silbergel analysiert, sondern im Western Blot. Durch die Verwendung eines gegen Caspase-2 gerichteten Antikörpers war der direkte Nachweis der Caspase-2 in den Eluaten möglich. Hierfür wurden Proteine aus den Eluaten mit Kunstharz-Granulat extrahiert

und im Western Blot analysiert. Abbildung 14 stellt das Versuchsprinzip graphisch dar sowie das Ergebnis des Western Blots. Hier zeigt sich, dass Caspase-2 und m41 in den Lysaten der Kontroll-Virus- und HATEVm41-Virus-infizierten Zellen wie erwartet detektiert wurden. In den Eluaten wurden die Proteine m41 und Caspase-2 jedoch nur in der HATEVm41-Probe nachgewiesen. Dieses Ergebnis wurde als Hinweis auf eine Interaktion zwischen m41 und der pro-Caspase-2 gewertet, den es in der Koimmunpräzipitation zu bestätigen galt.

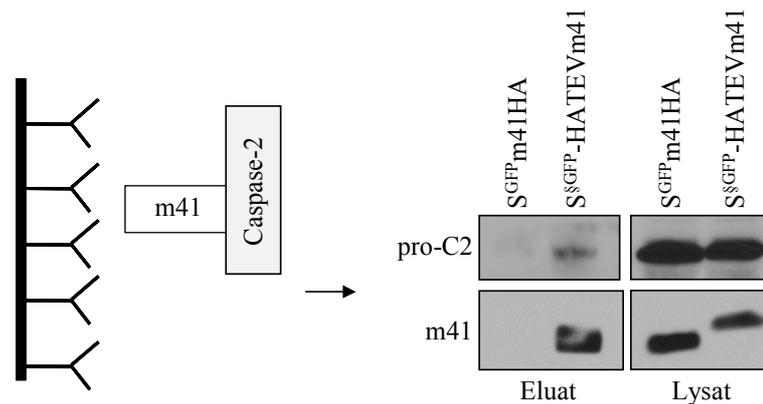


Abbildung 14: Nachweis von Caspase-2 im Eluat der  $\alpha$ -HA-Affinitätsaufreinigung

Wie in 2.2.4.1 beschrieben wurde die  $\alpha$ -HA-Affinitätsaufreinigung durchgeführt. Für die Analyse im Western Blot wurden die Proteine aus den Eluaten mit Kunstharz-Granulat gefällt und mit kochendem Proteinprobenpuffer vom Kunstharz-Granulat gelöst. Aliquots der Lysate wurden direkt mit kochendem Proteinprobenpuffer ergänzt. m41 und Caspase-2 wurden mithilfe der spezifischen Antikörper im Western Blot detektiert.

#### *Caspase-2 und m41 interagieren nach Transfektion und Infektion*

In den Koimmunpräzipitationen (Co-IPs) von Caspase-2 und m41 wurde untersucht, ob eine Interaktion der beiden Proteine bestätigt werden kann. Zum einen wurden murine Caspase-2 und m41 von Plasmidkonstrukten aus exprimiert (Transfektion). Zum anderen wurden Zellen u. a. mit MCMV-Wildtyp (S-wt) infiziert. In diesem Ansatz wurde die Interaktion der endogenen pro-Caspase-2 mit virusexprimiertem m41 untersucht. In beiden Ansätzen wurde Caspase-2 mit dem Caspase-2-spezifischen Antikörper 11B4 präzipitiert. Im anschließenden Western Blot erfolgte der Nachweis von m41 und den Kontrollen.

In Abbildung 15 sind die Ergebnisse der Co-IPs nach Transfektion dargestellt. Das Caspase-2-Expressionsplasmid pCAGGSmCasp2 (pC-Casp2) und unterschiedliche pcDNA-Konstrukte zur Expression von m41 sowie der Negativkontrollen IRE-1 und BCL<sub>XL</sub> wurden in HEK293-Zellen transfiziert. IRE-1 ist ein membranständiges Protein

im ER, das in der Erkennung von ER-Stress eine wichtige Rolle spielt (125). BCL<sub>XL</sub> ist ein zelluläres, antiapoptotisches Protein, das an der Regulation der mitochondrial-vermittelten Apoptose beteiligt ist (126). Es wurde keine Protein-Protein-Interaktion von Caspase-2 und IRE-1 oder BCL<sub>XL</sub> beschrieben. Abbildung 15 zeigt die Analyse der Zelllysate im Western Blot. In den Lysaten wurden alle transfizierten Proteine wie erwartet detektiert. Durch die analysierten Immunpräzipitate (IP) in der Abbildung 15A wird gezeigt, dass nur markiertes und nicht markiertes m41-Protein nachgewiesen bzw. mit Caspase-2 präzipitiert wurde. Dieses Ergebnis unterstützt die Annahme, dass m41 mit der Caspase-2 interagiert. Da in diesem Ansatz nur eine Kontrolle (IRE-1) mitgeführt wurde, wurden die Co-IPs unter Hinzunahme einer weiteren Kontrolle, dem HA-markierten Protein BCL<sub>XL</sub>, angefertigt. Abbildung 15B zeigt das Ergebnis des Western Blots. In der IP bestätigte sich die bestehende Annahme. Nur das Protein m41 war nach der Präzipitation von Caspase-2 nachweisbar.

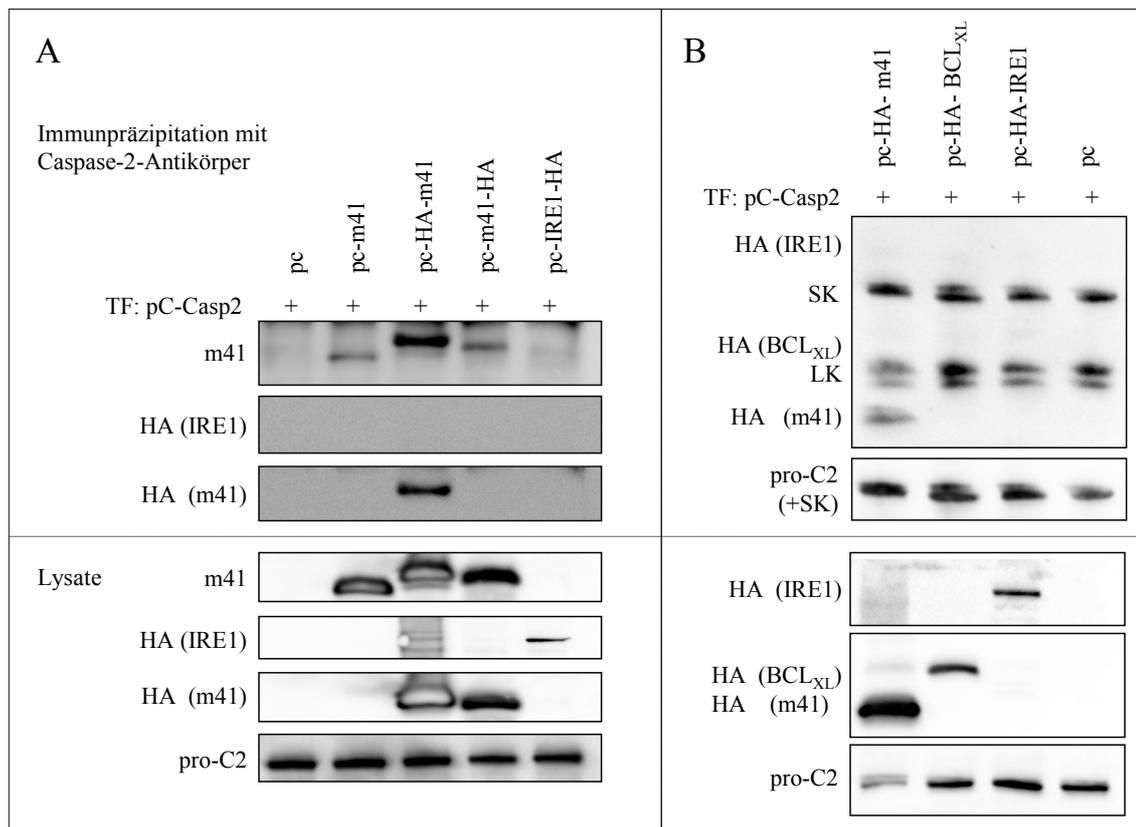


Abbildung 15: Immunpräzipitation von Caspase-2 und m41 nach Transfektion

pcDNA-Konstrukte kodierend für HA-markiertes m41, BCL<sub>XL</sub> oder IRE-1 wurden zusammen mit pCAGGSmCasp2 (pC-Casp2) in HEK293-Zellen transfiziert (TF). 24 Stunden später wurden Zelllysate mit Tritonpuffer hergestellt. Caspase-2 wurden mit dem Caspase-2-Antikörper 11B4 präzipitiert. Im Western Blot wurden HA, m41 und Caspase-2 durch Antikörper nachgewiesen. In A) wurden unterschiedlich markierte Varianten des Proteins m41 detektiert. Anzumerken ist, dass Vorarbeiten bereits gezeigt hatten, dass C-terminal HA-markiertes m41 oft nur durch den m41-spezifischen Antikörper erkannt wird. Der Ansatz in B) beschränkt sich auf HA-markiertes m41, führt jedoch zwei

HA-markierte Kontrollen mit. Die erwarteten und detektierten Größen der Proteine sind: m41 (15-20 kDa), BCL<sub>XL</sub> (30 kDa), IRE-1 (130 kDa) und pro-Caspase-2 (51 kDa).

Die Interaktion von m41 und Caspase-2 wurde daraufhin im Rahmen der MCMV-Infektion untersucht. Es sollte sich zeigen, ob auch die endogene Caspase-2 mit dem virusexprimierten m41 interagiert. Hierzu wurden Zellen (RAW264.7-Makrophagen) mit MCMV-Wildtyp (S-wt), m41-Knockoutvirus (S<sup>Δ</sup>-m41ko) oder nicht (mock) infiziert. 24 Stunden nach der Infektion wurden die Co-IPs wie o. b. durchgeführt. Abbildung 16 zeigt die Analyse der Proben im Western Blot. In den Lysaten waren die pro-Caspase-2 und m41 nach der Infektion mit Wildtyp-Virus nachweisbar. Das Lysat aus m41-Knockoutvirus-infizierten Zellen zeigte wie erwartet keine m41-Expression und im Lysat der unbehandelten Zellen war ebenfalls nur die endogene pro-Caspase-2 nachweisbar. Die Präzipitation von Caspase-2 aus dem Wildtyp-Virus-infizierten Zelllysate zeigte auch hier, dass das Protein m41 mit der pro-Caspase-2 präzipitiert werden konnte.

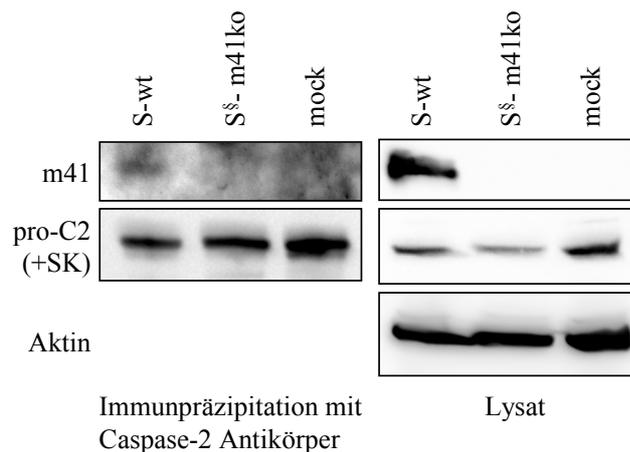


Abbildung 16: Immunpräzipitation von Caspase-2 und m41 nach Infektion

RAW264.7-Makrophagen wurden mit Wildtyp-Virus (S-wt), m41-Knockoutvirus (S<sup>Δ</sup>-m41ko) oder nicht (mock) infiziert. 24 hpi wurden Zelllysate hergestellt und Caspase-2 wurde präzipitiert. Im Western Blot wurden m41 (15-20 kDa), Aktin (43 kDa) und pro-Caspase-2 (51 kDa) durch spezifische Antikörper nachgewiesen. SK beschreibt, dass die Signale der pro-Caspase-2 und der schweren Kette (SK) des Antikörpers bei ca. 50 kDa überlagern.

In diesem Abschnitt konnte bisher gezeigt werden, dass das Protein m41 und die pro-Caspase-2 in unterschiedlichen Co-IPs interagieren. Im Folgenden sollte geklärt werden, ob diese Interaktion funktionell ist. Dazu wurde untersucht, ob m41 einen Einfluss auf die Aktivierung der pro-Caspase-2 hat.

*Caspase-2 wird durch die Infektion mit einer MCMV-Mutante aktiviert, die anstelle der m41-spezifischen Sequenz die Sequenz eines Selektionsmarkers im Genom trägt*

Die Interaktion zweier Proteine ist nur relevant, wenn diese Interaktion eine funktionelle Auswirkung hat. Im vorliegenden Fall könnte die Aktivierung der proapoptotischen Caspase-2 und somit dessen proapoptotische Funktion durch das antiapoptotischen Protein m41 inhibiert werden. Um diese Frage zu klären, wurde die Aktivierung der Caspase-2 in An- und Abwesenheit des Proteins m41 während der MCMV-Infektion bestimmt. Die Messung der Caspase-2-Aktivierung erfolgte durch zwei Methoden. Im Fluoreszenzassay wurde die enzymatische Aktivität der Caspase-2 gemessen. Im Western Blot wurden die unterschiedlichen Spaltprodukte der Caspase-2 nachgewiesen, die im Aktivierungsprozess der Caspase-2 entstehen (s. 2.2.3.6). Für beide Experimente wurden Makrophagen mit Wildtyp-Virus oder m41-Knockoutvirus 24 Stunden lang infiziert. Als Negativkontrolle wurden die Zellen nicht behandelt. In den Zellen der Positivkontrolle wurde die endogene Caspase-2 hingegen chemisch durch die Behandlung mit STS oder DXR aktiviert (s. a. 2.2.3.6).

Abbildung 17A zeigt die Resultate des Fluoreszenzassays, dargestellt in einem Balkendiagramm. Alle Messwerte wurden auf den Messwert der Wildtyp-Virus-infizierten Probe bezogen. Die Negativkontrolle zeigt wie erwartet eine geringere Caspase-2-Aktivierung im Gegensatz zur Positivkontrolle (STS). Die starke Schwankung in der Positivkontrolle ist vermutlich auf den unterschiedlichen Anteil toter Zellen zurückzuführen (Beobachtung am Mikroskop; nicht abgebildet). Das Balkendiagramm zeigt ausserdem, dass Caspase-2 in m41-Knockoutvirus-infizierten Zellen stärker aktiviert ist als in Wildtyp-Virus-infizierten Zellen (ca. 5-fach). Folglich hemmt das Protein m41 die Caspase-2-Aktivierung in infizierten RAW264.7-Makrophagen unter den dargestellten Bedingungen.

Die Untersuchung der Caspase-2-Spaltprodukte im Western Blot sollte zeigen, ob sich die inhibitorische Funktion des Proteins m41 auf die Caspase-2-Aktivierung bestätigen lässt. Hierfür wurden infizierte oder behandelte Zelllysate im Western Blot analysiert. In Abbildung 17B ist das Ergebnis dargestellt. Der Nachweis des p19-Fragments der Caspase-2 gilt als Nachweis der aktiven Caspase-2, hingegen stellt die pro-Caspase-2 die nicht aktivierte Form der Caspase-2 dar (s. a. 2.2.3.6). In der Positivkontrolle (DXR) konnten, im Gegensatz zur Negativkontrolle, die Spaltprodukte der aktiven Caspase-2 nachgewiesen werden. Ausserdem war nach der Infektion mit Wildtyp-Virus kein p19-Fragment der Caspase-2 nachweisbar. In m41-Knockoutvirus-infizierten Zelllysaten wurde hingegen das Fragmentmuster der aktiven Caspase-2 nachgewiesen. Auch in diesem Experiment zeigte sich, dass die Expression des Proteins m41 die Caspase-2-Aktivierung in MCMV-infizierten Zellen unterdrückt.

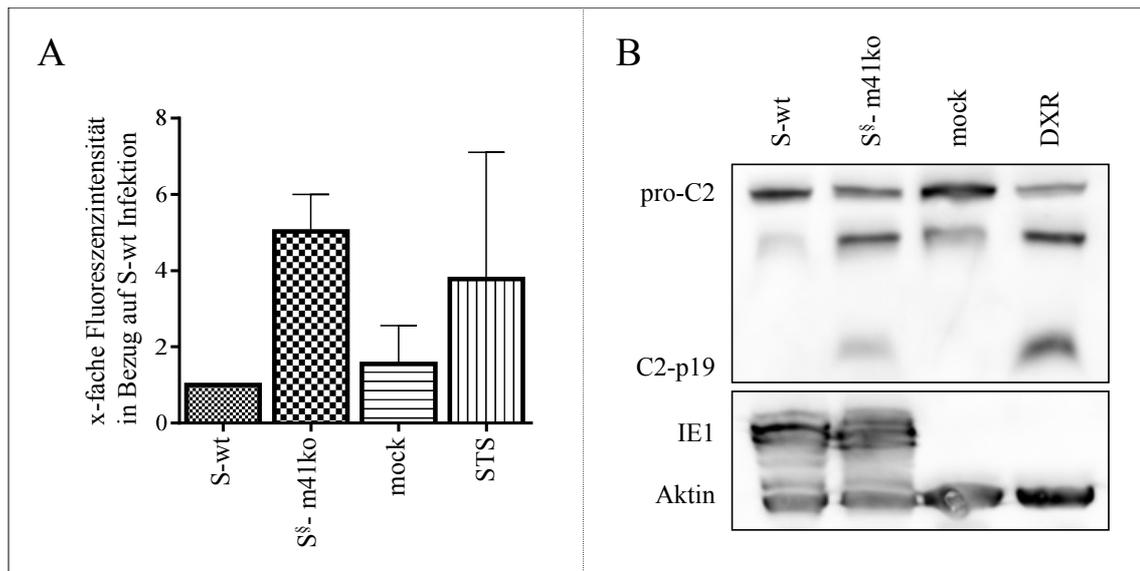


Abbildung 17: Caspase-2-Aktivierung nach Infektion mit dem Wildtyp-Virus und dem m41-Knockoutvirus

RAW264.7-Makrophagen wurden mit Wildtyp-Virus (S-wt) und m41-Knockoutvirus (S<sup>§</sup>-m41ko) oder nicht (mock) infiziert bzw. mit A) 500 nM-1  $\mu$ M Staurosporin (STS) für 24 Stunden oder B) mit 10  $\mu$ M Doxorubicin (DXR) über 5 Stunden behandelt. Die infizierten Zellen wurden nach 24 Stunden geerntet. A) Entsprechend der Anweisungen des *Caspase-2 Fluorometric Assays* wurden die Zellen präpariert und analysiert. Alle Werte wurden auf den Wert der Wildtyp-Virus-infizierten Zellen bezogen und in einem Balkendiagramm dargestellt. B) Die Zellysate wurden mit Tritonpuffer erstellt und im Western Blot untersucht. Caspase-2 wurde mit dem spezifischen 11B4-Antikörper nachgewiesen, der die pro-Caspase-2 (p51) und die beiden Spaltprodukte der Caspase-2 (p32 und p19) erkennt. Der Nachweis von IE1 und Aktin diente als Infektions- bzw. Ladekontrolle. Der Nachweis, dass m41 nur nach der Infektion mit Wildtyp-Virus, aber nicht nach der Infektion mit dem m41-Knockoutvirus exprimiert wurde, wurde bereits in Abbildung 12 dargestellt.

Auf den ersten Blick erscheint dieser Befund eindeutig. Allerdings muss an dieser Stelle auf die Konstruktion des m41-Knockoutvirus eingegangen werden. Im m41-Knockoutvirus wurde die m41-Expression durch die Insertion eines Selektionsmarkers unterbunden (vgl. Abbildung 20 und 1.2). Das m41-Knockoutvirus trägt die Sequenz des Selektionsmarkers im Genom. Deshalb bestand die Möglichkeit, dass sich die Anwesenheit der Fremdsequenz auf die Expression benachbarter Gene (Promotoreffekte) oder auf die Expression des überlappend kodierten m41.1-Gens (s. Abbildung 2) auswirken könnte. Die Sequenz des Gens m41.1 war durch die Insertion des Selektionsmarkers jedoch nicht verändert worden und eine m41.1-Proteinexpression konnte in einem funktionellen Assay nachgewiesen werden (s. Abbildungen 20 und 21). m41.1 wurde als antiapoptotisches Protein beschrieben (51,89). In der vorliegenden Arbeit wird unter 3.3.2 gezeigt, dass das Fehlen von m41.1 zu einer Caspase-3-Aktivierung in MCMV-infizierten Zellen führt. Es ist bekannt, dass Caspase-3 die pro-Caspase-2 aktivieren kann (s. 1.3). Um auszuschließen, dass ein

Defizit an m41.1 zur Aktivierung der Caspase-3 und somit zur Caspase-2-Aktivierung in m41-Knockoutvirus-infizierten Zellen führte, wurden Virusmutanten mithilfe einer Mutagenese-Methode konstruiert, die es erlaubte, Virusmutanten zu generieren, die keine Fremdsequenz im Virusgenom tragen und in der minimale Veränderungen im Virusgenom zum Ausschalten einer Genfunktion genügen (vgl. *Galk-Kan*-Mutagenese unter 1.2). Die Konstruktion und Charakterisierung der Mutanten wird ausführlich im Kapitel 3.2.3 beschrieben. Hier sollen zuerst die Ergebnisse zur Caspase-2-Aktivierung vorgestellt werden. In den folgenden Infektionsexperimenten wurde mit den „neuen“, fremdsequenzfreien Virusmutanten (S\*) und mit Wildtyp-Virus infiziert. Die S\*-Virusmutanten exprimieren aufgrund von Start- und/ oder Stoppkodon-Mutationen entweder kein m41- (S\*-m41ko) oder kein m41.1- (S\*-m41.1ko) Protein. Sie werden als m41- oder m41.1-Stoppmutante bezeichnet. In der Revertante (S\*-R) wurden die zerstörten Genfunktionen repariert (vgl. 1.2). Die m41/m41.1-Deletionsmutante (S\*- $\Delta$ m41) exprimierte weder das m41 noch das m41.1.

*Caspase-2 wird nicht durch die Infektion mit einer MCMV-Mutante aktiviert, in der die m41-Expression nur durch eine Stopp- und Startkodon-Mutation unterbunden ist*

Die Caspase-2-Aktivierung nach der Infektion mit den S\*-Virusmutanten wurde in infizierten Zelllysaten im Western Blot wie bereits beschrieben untersucht. Im Western Blot wurden die Aktivierung der Caspase-2 und der Caspase-3 sowie die Expression des Proteins m41 nachgewiesen. In Abbildung 18 sind die Ergebnisse dargestellt. Wie erwartet zeigten die Negativkontrolle (mock) sowie die Infektion mit Wildtyp-Virus und der Revertante, dass sowohl Caspase-2 als auch Caspase-3 nicht aktiviert wurden. Außerdem wurden in der Positivkontrolle (STS) und nach der Infektion mit Virus, das kein m41.1 exprimierte (m41/m41.1-Deletionsmutante und m41.1-Stoppmutante) die Spaltprodukte der aktiven Caspase-2 (p19) und der aktiven Caspase-3 (p17) nachgewiesen. Allerdings zeigt der Western Blot auch, dass nach der Infektion mit der m41-Stoppmutante keine Aktivierung der Caspasen-2 und -3 detektiert wurde.

Die Infektion mit der m41-Stoppmutante führte im Gegensatz zur Infektion mit dem „alten“ m41-Knockoutvirus nicht zur Caspase-2-Aktivierung. Interessanterweise konnte in m41-Stoppmutante-infizierten Zellen auch keine Caspase-3-Aktivierung detektiert werden. Die Caspase-3-Aktivierung ist ein gängiger Marker dafür, dass eine Zelle durch Apoptose stirbt (vgl. 1.3). Für das Protein m41 wurde jedoch eine antiapoptotische Funktion beschrieben (51,59,89). Das Fehlen des antiapoptotischen Proteins m41 sollte zur Apoptose im hier gewählten Zelltyp (RAW264.7-Makrophagen) führen, was gleichbedeutend mit einer aktiven Caspase-3 ist.

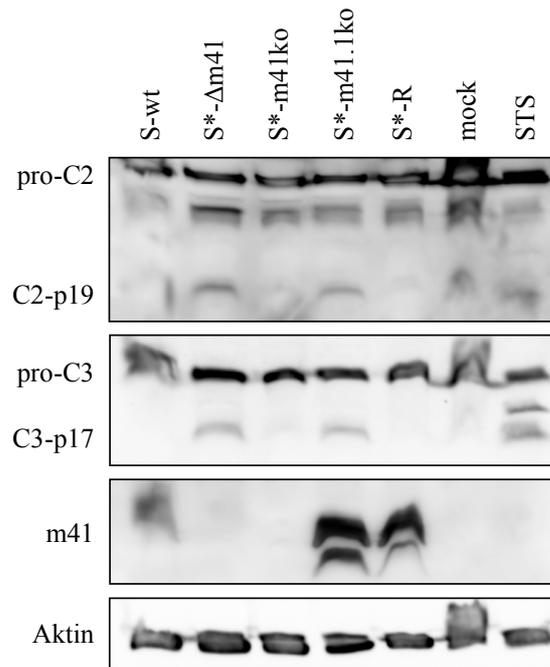


Abbildung 18: Aktivierung der Caspase-2 und der Caspase-3 nach der Infektion mit den S\*-Virusmutanten

RAW264.7-Makrophagen wurden mit den S\*-Virusmutanten infiziert. 24 hpi wurden die Zellysate mit Tritonpuffer hergestellt und im Western Blot auf die Aktivierung der Caspase-2 (p19) und -3 (p17) sowie die Expression des Proteins m41 durch Verwendung der spezifischen Antikörper untersucht. Der Nachweis von Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet.

*Infektion mit dem m41-Knockoutvirus reduziert die Viabilität von RAW264.7-Makrophagen im Gegensatz zur Infektion mit der m41-Stoppmutante*

Aufgrund der fehlenden Caspase-3-Aktivierung wurde untersucht, ob die Infektion mit der m41-Stoppmutante die Viabilität von Makrophagen reduziert wie für andere m41-Knockoutmutanten beschrieben worden war (51,89). Hierfür wurden Makrophagen mit den S\*-Virusmutanten, der m41-Knockoutmutante (S<sup>§</sup>-m41ko) und dem Wildtyp-Virus infiziert. 24, 40 und 72 Stunden nach der Infektion wurde die Zellviabilität bestimmt. Bei der Bestimmung der Zellviabilität wird die Umsetzungsreaktion eines farblosen Substrats zu einem farbigen Produkt durch zelluläre Enzyme gemessen (s. 2.2.1.5). Die Darstellung der Messwerte erfolgt in den Balkendiagrammen in Abbildung 19. Die Höhe der Balken spiegelt den Anteil metabolisch aktiver Zellen wieder.

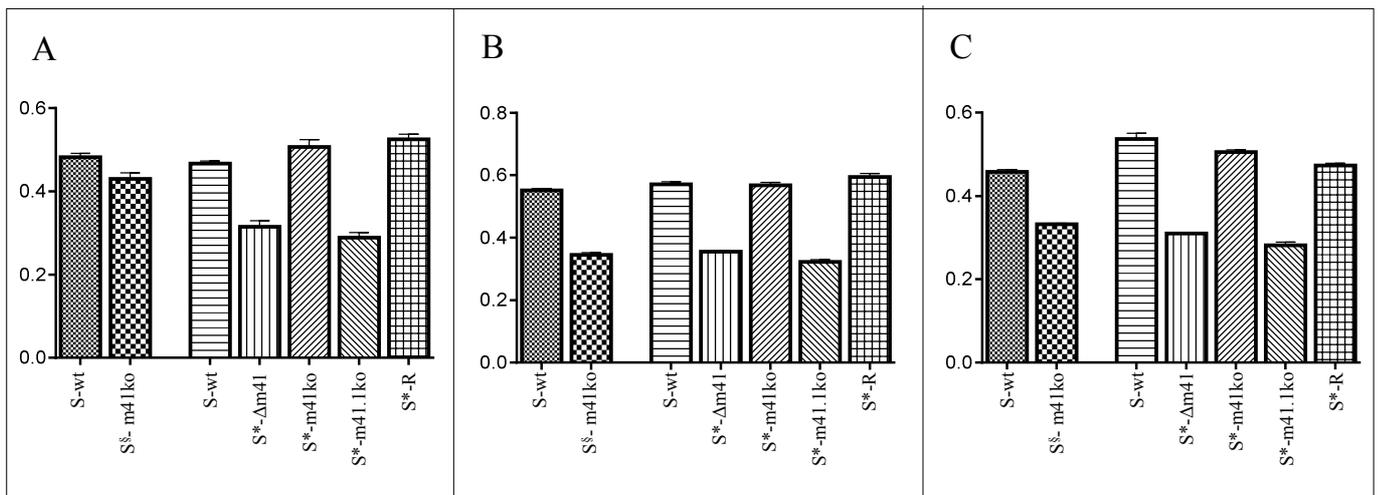


Abbildung 19: Viabilitätsmessung der RAW264.7-Makrophagen, die mit den S<sup>S</sup>- und S\*-Virusmutanten infiziert wurden

RAW264.7-Makrophagen wurden mit genannten S<sup>S</sup>- und S\*-Virusmutanten infiziert. A) 24 hpi, B) 40 hpi und C) 72 hpi wurde die Zellviabilität mit dem *CellTiter 96<sup>®</sup> Aqueous One Solution Cell Proliferation Assays* bestimmt und ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Balkendiagrammen dargestellt. Auf der y-Achse sind hier die ermittelten Werte der Absorptionsmessung aufgetragen.

Die Balkendiagramme zeigen, dass nach der Infektion mit dem m41-Knockoutvirus (S<sup>S</sup>-m41ko) die Zellviabilität, wie zuvor beschrieben wurde (51,59,89), reduziert war. Die Infektion mit m41.1-defizienten Viren (S\*-Δm41 und S\*-m41.1ko) resultierte ebenfalls in der Reduktion der Zellviabilität. Auch nach den Kontroll-Infektionen mit Wildtyp-Virus (S-wt) und der Revertante (S\*-R) zeigte sich das erwartete Ergebnis. Hier wurde die Zellviabilität zu keinem Zeitpunkt beeinträchtigt. Die Zellviabilitätswerte nach der Infektion mit der m41-Stoppmutante ähnelten jedoch den Ergebnissen aus den Kontroll-Infektionen. In diesem Experiment konnte für die m41-Stoppmutante kein proapoptotischer Effekt gezeigt werden.

Zusammengefasst konnte in diesem Kapitel gezeigt werden, dass die Proteine m41 und Caspase-2 unter den dargestellten Bedingungen interagieren. Die Infektion von RAW264.7-Makrophagen mit einem m41-defizienten MCMV hatte jedoch in Abhängigkeit von der Konstruktion der Virusmutante unterschiedliche Folgen. Die Infektion mit m41-Knockoutvirus (S<sup>S</sup>-m41ko) resultierte in einer Reduktion der Zellviabilität sowie in der Caspase-2-Aktivierung (s. Abbildung 19 und Abbildung 17). Die Infektion mit einer markerlos konstruierten m41-Stoppmutante (S\*-m41ko) führte hingegen nicht zur Reduktion der Zellviabilität und auch nicht zur Caspase-2-Aktivierung (s. Abbildung 19 und Abbildung 18).

### 3.2.3 Konstruktion und Charakterisierung der S<sup>§</sup>- und der S\*-Virusmutanten

In den bereits vorgestellten Experimenten wurden die markerbehafteten S<sup>§</sup>- und die fremdsequenzfreien S\*-Virusmutanten in Infektionsexperimenten verwendet. In diesem Kapitel werden die genetischen Veränderungen dieser Viren und die dazugehörigen Kontroll-Experimente beschrieben.

Die m41-Knockoutmutante, S<sup>§</sup>-m41ko, wurde mithilfe der FRT-vermittelten Rekombination von M. Cam generiert, überprüft und zur Verfügung gestellt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden alle S\*-Virusmutanten mittels der *GalK-Kan*-Mutagenese konstruiert (vgl 1.2 und 2.2.2.9). In Abbildung 20 sind die Veränderungen im Locus m41 der S<sup>§</sup>- und S\*-Virusmutanten schematisch dargestellt.

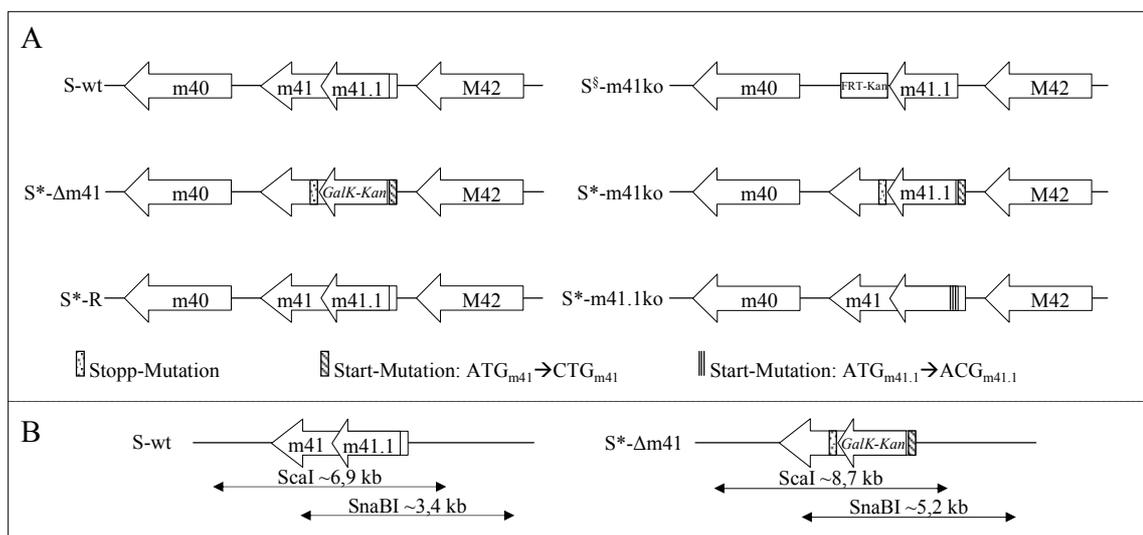


Abbildung 20: schematische Darstellung der Veränderungen im Genom der S<sup>§</sup>- und der S\*-Virusmutanten mit Restriktionsschema

A) Die Organisation des Locus m41 im Genom der S<sup>§</sup>- und S\*-Virusmutanten ist dargestellt. Die ineinander gezeichneten Leserahmen der Gene von m41 und m41.1 kennzeichnen eine überlappende Kodierung, jedoch in anderen Leserahmen. In der m41-Knockoutmutante S<sup>§</sup>-m41ko liegt die Sequenz des Selektionsmarkers FRT-Kan vor. FRT-Kan steht für eine Kanamycin-Resistenz-Sequenz, die von FRT-Sequenzen flankiert wird. Sie ersetzt den m41-spezifischen Bereich nach dem m41.1-Leserahmen. Das § symbolisiert, dass die Mutante durch FRT-vermittelte Rekombination erstellt wurde. Das Schema zeigt des Weiteren die Organisation des Locus m41 in den erstellten S\*-Virusmutanten. Die Klonierung erfolgte anhand der BAC-DNA des MCMV-Wildtyps des Stamms Smith (S-wt), genannt pSM3fr (19)(86). Methodisch wurde die *GalK-Kan*-Mutagenese angewandt, was durch den \* im Namen der Virusmutanten symbolisiert wird. Die Klonierungsstrategie der S\*-Mutanten ist unter 2.2.2.9 und die resultierenden Veränderungen sind im Text dieses Kapitels beschrieben. B) Die Klonierung der BAC-DNA wurde mittels Restriktionsanalysen kontrolliert. Hier dargestellt sind die Restriktionsfragmente im Locus m41 nach dem Verdau mit den Restriktionsenzymen ScaI und SnaBI. Der *in silico* Verdau der BAC-DNA wurde mit Hilfe des Programms *NEB cutter*<sup>8</sup> und der publizierten Genomsequenz des

<sup>8</sup> <http://tools.neb.com/NEBcutter2/>

MCMV-Stamms Smith (*Accession* NC\_004065) durchgeführt. Eindeutig sichtbare Unterschiede entstanden nur, wenn die *Galk-Kan*-Sequenz anstelle der m41.1-Sequenz eingesetzt wurde. Die Sequenz des m41.1 umfasst 174 Nukleotide, wohingegen die Sequenz des *Galk-Kan*-Selektionsmarkers ca. 1965 Nukleotide zählt. Wie dargestellt wurden die Restriktionsfragmente im ScaI- und SnaBI-Verdau in Anwesenheit der *Galk-Kan*-Sequenz um ca. 1,8 kb größer. In der Darstellung sind die gerundeten Größen der resultierenden Fragmente in kb angegeben.

Das Wildtyp-Virus (S-wt) zeigt den natürlichen Locus m41. Hier werden überlappend das größere Protein m41 und das kleinere Protein m41.1 kodiert.

Das m41-Knockoutvirus (S<sup>§</sup>-m41ko) kodiert für kein Protein m41. Wie in Abbildung 20 gezeigt, wurde dies durch die Insertion der FRT-Kan-Selektionsmarkersequenz hinter die vollständige, kodierende Sequenz des Proteins m41.1 erreicht.

Auch die fremdsequenzfreie m41-Stoppmutante (S\*-m41ko) kodiert für kein Protein m41. Hier wurde das Startkodon des m41-Leserahmens durch eine Punktmutation in eine andere Aminosäure geändert und zusätzlich wurde ein frühzeitiges Stoppkodon durch eine weitere Punktmutation generiert. Die Sequenz des m41.1-Gens wurde nicht verändert.

Hingegen trägt die m41/m41.1-Deletionsmutante (S\*-Δm41) anstelle der m41.1-Sequenz die Sequenz des Selektionsmarkers *Galk-Kan*. Es liegt weder die kodierende Sequenz des Proteins m41 noch des Proteins m41.1 vor.

Der Locus m41 in der m41.1-Stoppmutante (S\*-m41.1ko) weist drei Startkodon Mutationen im Leserahmen des Proteins m41.1 auf, zumal die m41.1-Sequenz mit drei nahe aufeinander folgenden Startkodonen beginnt. Die Punktmutationen verändern nicht die Aminosäuresequenz des Proteins m41.

Die Revertante (S\*-R) basiert wie auch die Stoppmutanten auf der m41/m41.1-Deletionsmutante. Hier wurde die Sequenz der Selektionsmarkers *Galk-Kan* durch die Wildtyp-Sequenz ersetzt. S\*-R kodiert wie das Wildtyp-Virus für beide Proteine des Locus m41, m41 und m41.1.

Die Mutagenese der MCMVs erfolgte anhand des Virusgenoms, das als BAC in *E. coli* Bakterien vorlag. Die veränderte BAC-DNA wurde zu infektiösem Virus rekonstituiert (s. 1.2). Die erste Kontrolle nach der Klonierung der S\*-Mutanten war dementsprechend der enzymatische Verdau der veränderten BAC-DNA im Vergleich zur BAC-DNA des Wildtyps. Für einen BAC-Verdau werden Restriktionsenzyme ausgewählt, die in Abhängigkeit vom Klonierungserfolg einen Unterschied im Restriktionsmuster zeigen. Zur Analyse des Locus m41 wurden die Restriktionsenzyme SnaBI und ScaI gewählt. Wie in Abbildung 20B gezeigt, schneidet ScaI flankierend vom Locus m41. SnaBI hingegen schneidet in der kodierenden Sequenz des Proteins m41. Dieser Bereich überlappt nicht mit der m41.1-Sequenz. Die schematische

Darstellung der Restriktionsmuster in Abbildung 20B beschränkt sich auf die Beschreibung des Lokus m41 im Genom des Wildtyps und der m41/m41.1-Deletionsmutante. Die minimalen Veränderungen im Virusgenom der Stoppmutanten resultierten in keinem Restriktionsmusterunterschied. Das Restriktionsmuster am Lokus m41 im Genom der m41-Stoppmutante, der m41.1-Stoppmutante und der Revertante entspricht dem des Wildtyp-Virus. Abbildung 20B verdeutlicht den Größenunterschied zwischen der m41.1-Sequenz (174 bp) im Wildtyp-Lokus und der eingesetzten *Galk-Kan*-Sequenz (1965 bp). Dies sollte in einer detektierbaren Änderung im Bandenmuster resultieren, wenn beidseitig des (*ScaI*) oder im (*SnaBI*) Lokus m41 mit Restriktionsenzymen geschnitten wurde. In Abbildung 21A sind die im Gel aufgetrennten BAC-DNA-Restriktionen gezeigt. Die Unterschiede sind mit Pfeilen markiert. Es ist zu erkennen, dass nur in Anwesenheit der *Galk-Kan*-Sequenz ( $S^*$ - $\Delta m41$ ) die Restriktionsmuster verändert waren. Nach dem Verdau mit *ScaI* resultierte eine Wildtyp-Bande von 6,9 kb. In Anwesenheit des Selektionsmarkers war diese Bande ca. 8,7 kb groß. Nach dem *SnaBI*-Verdau wurde aus einer ungefähr 3,4 kb großen Wildtyp-Bande eine ca. 5,2 kb große Bande im Verdau der m41/m41.1-Deletionsmutanten-BAC-DNA. Der BAC-Verdau zeigte das erwartete Ergebnis. Ergänzend wurde bei jeder  $S^*$ -Virusmutante die Sequenz des Lokus m41 durch Sequenzierung kontrolliert (nicht abgebildet). Zusammengefasst konnten keine Fehler in der BAC-DNA der  $S^*$ -Mutanten festgestellt werden.

Nach der Kontrolle der BAC-DNA wurde die Expression der MCMV-Proteine m41 und m41.1 in Infektionsexperimenten mit den  $S^*$ -Virusmutanten getestet.

Die Expression des Proteins m41 wurde in infizierten Zelllysaten im Western Blot durch den m41-Antikörper nachgewiesen. Hierfür wurden Zellen mit den  $S^*$ -Virusmutanten infiziert. 24 Stunden nach der Infektion wurde geerntet und die Lysate wurden im Western Blot untersucht. Der Western Blot ist in Abbildung 21B dargestellt. Das Protein m41 wurde nach der Infektion mit dem Wildtyp-Virus, der m41.1-Stoppmutante und der Revertante nachgewiesen. Nach der Infektion mit der m41/m41.1-Deletionsmutante und der m41-Stoppmutante, in denen die m41-Sequenz verändert worden war, wurde kein Protein m41 detektiert. Der Nachweis von Aktin im Western Blot zeigte, dass in allen Spuren vergleichbare Mengen an Zelllysate aufgetragen worden waren.

Gegen das Protein m41.1 existierte kein Antikörper. Deshalb wurde die Expression von m41.1 in einem funktionellen Assay untersucht. Cam beschrieb einen Assay, in dem die Proteinexpression von m41.1 proportional zur Hemmung der STS-induzierten Apoptose in infizierten Mausfibroblasten verlief. Hierzu wurden 10.1-Fibroblasten infiziert und 6 Stunden nach der Infektion mit STS behandelt. Die STS-Behandlung induziert die Apoptose in den infizierten Zellen. Nur wenn das antiapoptotische Protein m41.1 durch das Virus exprimiert wurde, konnte die Apoptose blockiert werden und die Zellen

überlebten. Abschließend wurde die Zellviabilität mittels des MTT-Assays gemessen. Die Zellviabilität wurde folglich als Maß für die Expression des Proteins m41.1 ausgewertet (51).

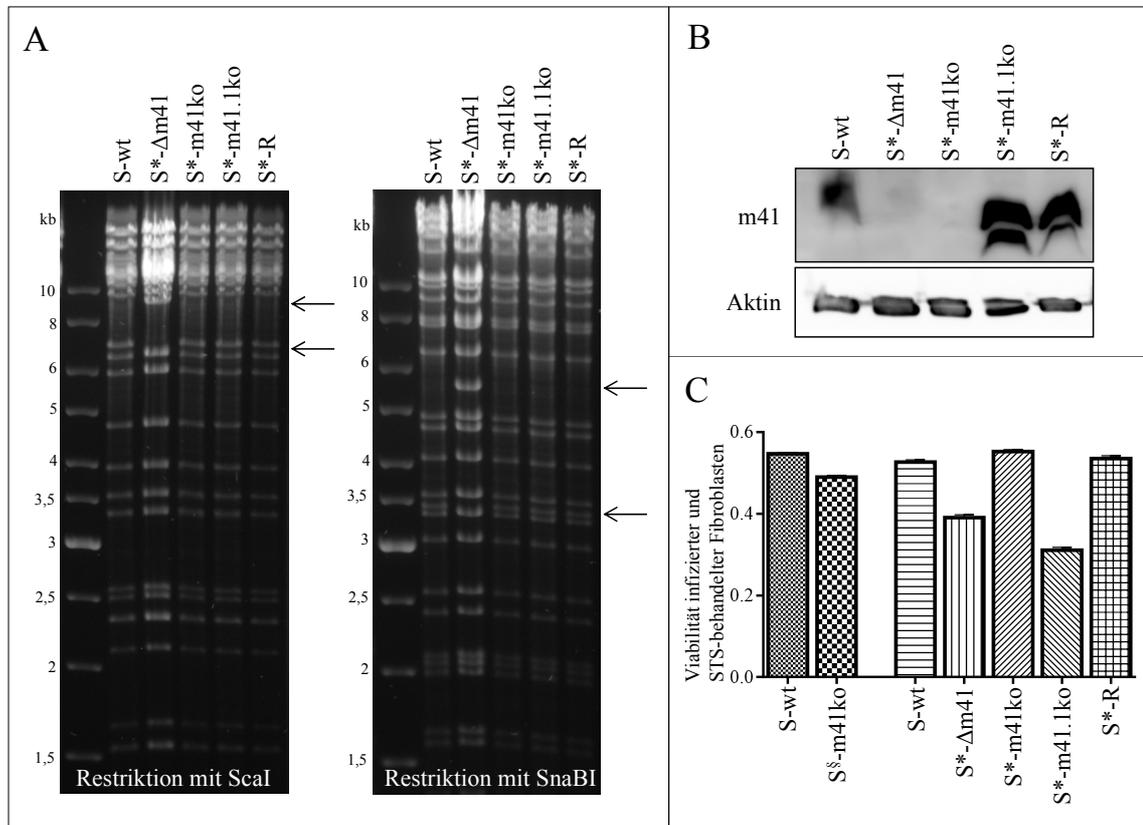


Abbildung 21: Kontrolle der S\*-Virusmutanten

A) BAC-DNA wurde isoliert und 2,5 µg wurden mit den Restriktionsenzymen Scal oder SnaBI verdaut. Die Auftrennung der Restriktionsfragmente erfolgte im 0,6%igen Agarose-Gel. Die erwarteten Veränderungen sind in Abbildung 20B schematisch dargestellt und hier neben den Gelen mit Pfeilen gekennzeichnet. Spezifische Unterschiede im Locus m41 der Virusmutanten S\*-m41ko, S\*-m41.1ko und S\*-R ließen sich im Verdau nicht zeigen, da die minimalen Änderungen im Genom keine Schnittstelle änderten. Als Größenstandard wurde der *GeneRuler<sup>TM</sup> DNA Ladder Mix* verwendet. B) RAW264.7-Makrophagen wurden mit den S\*-Virusmutanten infiziert. 24 hpi wurden die Zelllysate mit Tritonpuffer hergestellt und im Western Blot auf die Anwesenheit des Proteins m41 untersucht. Die Detektion erfolgte mit dem m41-Antikörper. Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet. C) 10.1-Fibroblasten wurden mit S\*- und S<sup>S</sup>-Virusmutanten infiziert und 6 hpi mit 500 nM STS behandelt. 24 hpi wurde die Zellviabilität durch den *CellTiter 96<sup>®</sup> Aqueous One Solution Cell Proliferation Assays* bestimmt. Die Ergebnisse der ausgewerteten Absorptionsmessung sind im Balkendiagramm dargestellt und spiegeln direkt die Viabilität der Zellen wieder.

Dieser Test wurde mit den hier untersuchten Virusmutanten durchgeführt. Abbildung 21C zeigt die graphische Auswertung der Viabilitätsmessung im Balkendiagramm. Die Höhe der Balken ist proportional zur Zellviabilität bzw. hier zur m41.1-Proteinexpression. Das Balkendiagramm stellt dar, dass die Infektion mit Viren, die

eine veränderte m41.1-Sequenz trugen, in geringeren Viabilitätswerten der Zellen resultierten (S\*- $\Delta$ m41, S\*-m41.1ko). Hingegen zeigten Zellen, die mit Virusmutanten mit unveränderter m41.1-Sequenz infiziert worden waren, konstant hohe Viabilitätswerte (S-wt, S<sup>s</sup>-m41ko, S\*-m41ko, S\*-R). Auffällig ist jedoch, dass die Infektion mit dem m41-Knockoutvirus (S<sup>s</sup>-m41ko) im Vergleich zu den anderen m41.1-exprimierenden Virusmutanten zu einer geringfügig geringeren Viabilität der Zellen führte. Die Infektion mit den Virusmutanten, in denen das m41.1-Gen verändert worden war, resultierte jedoch in einer weitaus stärkeren Reduktion der Zellviabilität. Aufgrund der Schwäche des m41-Knockoutvirus-vermittelten Effekts wurde angenommen, dass das m41.1 ausreichend exprimiert wurde. Dass eine m41.1-Expression in m41-Knockoutvirus-infizierten Zellen stattfand, zeigen die Messungen eindeutig. Die Kontrolle der m41- und m41.1-Proteinexpression in S\*-Virusmutanten-infizierten Zellen zeigen ohne Auffälligkeiten das erwartete Ergebnis. Somit konnten keine Fehler in den BAC-Konstrukten oder der m41- und m41.1- Proteinexpression der S\*-Virusmutanten festgestellt werden.

### 3.3 Funktionelle Charakterisierung von m41.1 *in vitro*

In diesem Kapitel werden Arbeiten vorgestellt, die unter *Cytomegaloviruses inhibit BAK- and BAX-mediated apoptosis with two separate viral proteins* 2010 in *Cell Death and Differentiation* von Maren Cam, Wiebke Handke, Marcus Picard-Maureau und Wolfram Brune publiziert wurden (89). Cam konnte zeigen, dass das MCMV-Protein m41.1 mitochondrial-lokalisiert ist und hier die BAK-Oligomerisierung sowie den BAK-abhängigen Zelltod nach Virusinfektion und/ oder chemischer Stimulation hemmt (51). In der Promotionsarbeit von Cam konnten jedoch nicht alle Fragen zur funktionellen Charakterisierung des Proteins m41.1 geklärt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden diese bearbeitet und beantwortet.

#### 3.3.1 Das virale Protein m41.1 interagiert mit dem zellulären Protein BAK

Die mitochondrial-vermittelte Apoptose wird beispielsweise durch Virusinfektion oder chemische Stimuli induziert. Im Verlauf der Apoptose wird mitochondrial-lokalisiertes BAK aktiviert. Aktiviertes BAK oligomerisiert, was zu einer erhöhten Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran und somit zur Freisetzung proapoptotischer Faktoren wie Cytochrom c führt. Die freigesetzten, proapoptotischen Faktoren induzieren die Exekutionsphase der Apoptose (vgl. 1.3). Für das Protein m41.1 konnte Cam zeigen, dass m41.1 während der Infektion die BAK-Oligomerisierung und die Cytochrom c-Freisetzung verhindert. Die initiale Aktivierung von BAK wurde jedoch nicht inhibiert. Wie m41.1 die BAK-Oligomerisierung blockiert, war nicht bekannt. Vorstellbar ist, dass m41.1 an BAK bindet und dass die BAK-Proteine daraufhin nicht mehr

oligomerisieren können. Um die Frage zu klären, ob die Proteine m41.1 und BAK interagieren, wurde die Interaktion von m41.1 und BAK mithilfe der Co-IP getestet. Hierfür wurden Flag-markiertes BAK mit einem Gemisch aus HA-markiertem und nicht markiertem m41.1 oder mit Kontroll-Proteinen koexprimiert. Die Expression erfolgte über transiente Transfektion. Das Gemisch aus markiertem und nicht markiertem m41.1 wurde verwendet, da Vorarbeiten von Cam gezeigt hatten, dass markiertes m41.1 nicht funktionell exprimiert wurde und die Co-IP mit HA-markiertem m41.1 nicht erfolgreich war (nicht abgebildet). Falls nun das funktionelle Protein m41.1 und das HA-markierte m41.1 mit BAK interagieren würden, wäre ein Nachweis der Interaktion zwischen m41.1 und BAK ohne einen m41.1-Antikörper möglich. Als Kontrollen wurden HA-markiertes m41 exprimiert sowie eine Vektorkontrolle mitgeführt (pc-Kontrolle). Das Experiment wurde im Doppelansatz angefertigt, um in der Co-IP HA-markierte Proteine oder Flag-markierte Proteine aus den Zelllysaten präzipitierten zu können (s. 2.2.3.3). Die Lysate und Immunpräzipitate wurden im Western Blot auf Flag- und HA-markierte Proteine getestet. Abbildung 22 zeigt die Western Blot Ergebnisse.

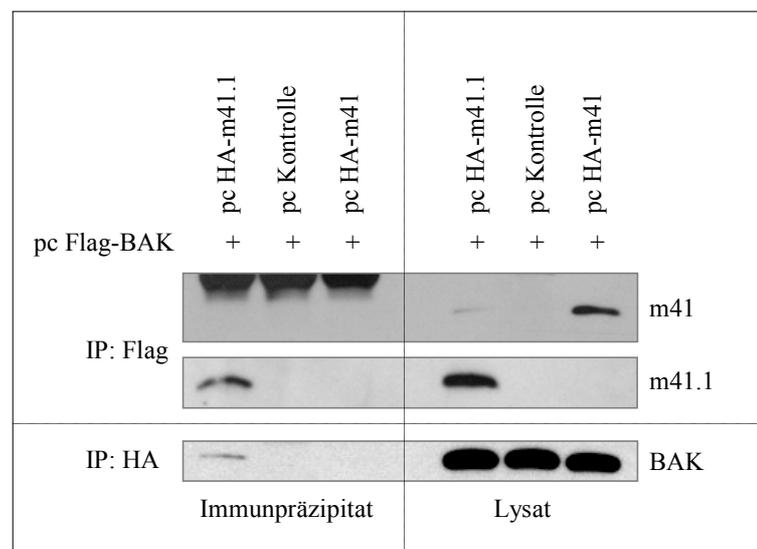


Abbildung 22: Immunpräzipitation von m41.1 und BAK nach Transfektion

Ein Gemisch aus nicht markiertem m41.1 und HA-markiertem m41.1 (in pcDNA) wurde zusammen mit Flag-markiertem BAK (in pcDNA) transfiziert. In den Kontrollen wurden eine Vektorkontrolle (pc Kontrolle) oder HA-markiertes m41 (in pcDNA) mit Flag-markiertem BAK kotransfiziert. 25 Stunden später wurden die Lysate mit Tritonpuffer hergestellt. Zum einen wurden Flag-markierte BAK-Proteinkomplexe mit  $\alpha$ -Flag-gekoppelter Protein-Sepharose präzipitiert (IP: Flag) und zum anderen HA-markierte m41.1-Proteinkomplexe mit  $\alpha$ -HA-gekoppelter Protein-Sepharose (IP: HA). Im Western Blot wurden die Immunpräzipitate und die Lysate auf die Anwesenheit von HA-markiertem m41.1 bzw. m41 und Flag-markiertem BAK-Protein untersucht.

In den Lysaten konnten die transfizierten Proteine wie erwartet nachgewiesen werden. Nach der Präzipitation von Flag-markiertem BAK konnte nur das HA-markierte Protein m41.1 im Western Blot detektiert werden. Die Kontrollen zeigten keine Signale. Nach der Präzipitation der HA-markierten Proteine m41.1 oder m41 wurde ein Flag- bzw. BAK-spezifisches Signal nur im Fall der Koexpression mit m41.1 gemessen. Die Ergebnisse der Co-IPs lassen keine Aussage über die Beschaffenheit der BAK-m41.1-Komplexe zu, zeigen aber eindeutig, dass das virale Protein m41.1 mit dem zellulären Protein BAK nach Transfektion in HEK293-Zellen interagiert.

### **3.3.2 m41.1 hemmt die virusinduzierte Apoptose**

Dass die Interaktion zwischen den Proteinen BAK und m41.1 eine funktionelle Auswirkung hat, war bereits anhand der m41.1-vermittelten Inhibition der BAK-Oligomerisierung und der damit einhergehenden verhinderten Ausschüttung von Cytochrom c von Cam gezeigt worden. Weiterhin wurde beschrieben, dass das Fehlen des Proteins m41.1 in der MCMV-Infektion eine starke Reduktion der Zellviabilität zur Folge hatte (51). Diese Beobachtungen sollten miteinander verknüpft werden. Im Verlauf der Apoptose führt freigesetztes Cytochrom c zur Aktivierung verschiedener Caspasen, darunter Caspase-3. Des Weiteren kommt es zur Degradation der chromosomalen DNA und zur Bildung apoptotischer Vesikel (s. 1.3). Um zu prüfen, ob das Protein m41.1 während der MCMV-Infektion die vollständige Apoptosesignalkette blockieren kann, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit charakteristische Stadien der Apoptose in Infektionsexperimenten untersucht. Hierfür wurden Virusmutanten verwendet, die in der Promotionsarbeit von M. Cam charakterisiert wurden (51). Folgend werden diese Virusmutanten nur beschrieben, um den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit folgen zu können.

Alle Virusmutanten basierten auf dem GFP (grün fluoreszierendes Protein)-exprimierendem Wildtyp-Virus des MCMV-Stamms Smith (wt). Das Delta-m41-Virus ( $\Delta$ m41) exprimiert weder das m41 noch das m41.1. Hingegen wird vom m41-Einzelknockoutvirus (m41ko) bzw. dem m41.1-Einzelknockoutvirus (m41.1ko) nur das Protein m41.1 bzw. das Protein m41 gebildet. Die funktionelle Revertante ( $\Delta$ /M11L) basiert auf dem Delta-m41-Virus. Hier wurde das Fehlen der m41.1-Expression durch die Expression des BAK-Inhibitors des Myxoma Virus, dem Protein M11L, funktionell kompensiert. Als Positivkontrolle wurde Apoptose-induzierendes STS verwendet (vgl. 2.2.3.6) und als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen (mock).

#### *Die m41.1-Expression hemmt die Apoptose in infizierten RAW264.7-Makrophagen und 10.1-Fibroblasten*

Zuerst wurde untersucht, ob das Fehlen des Proteins m41.1 in MCMV-infizierten Zellen zur Caspase-3-Aktivierung führt. Hierzu wurden 10.1-Fibroblasten sowie RAW264.7-

Makrophagen mit o. b. Virusmutanten infiziert. Die Caspase-3-Aktivierung wurde anhand der Zelllysate im Western Blot untersucht. In Abbildung 23A und B sind die Ergebnisse der Western Blot-Analyse gezeigt.

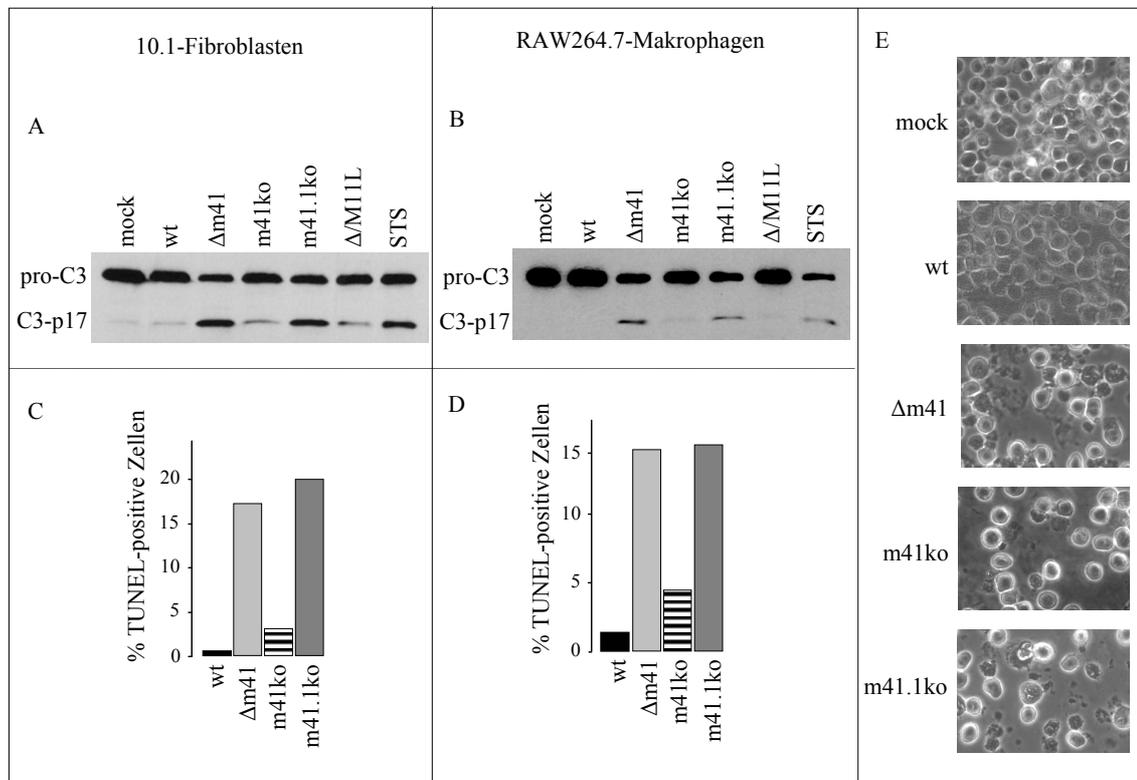


Abbildung 23: Untersuchungen zur m41.1-vermittelten Zelltod-inhibition in infizierten Fibroblasten und Makrophagen

A) 10.1-Fibroblasten oder B) RAW264.7-Makrophagen wurden infiziert, mock oder mit STS behandelt. 24 hpi (A) bzw. 18 hpi (B) erfolgte die Anfertigung der Zelllysate mit kochendem Proteinprobenpuffer und die Analyse im Western Blot auf die Caspase-3-Aktivierung. Der verwendete Caspase-3-Antikörper 8G10 weist die pro-Caspase-3 bei 35 kDa und das Spaltprodukt der aktiven Caspase-3 bei 17 kDa nach. C) 10.1-Fibroblasten oder D) RAW264.7-Makrophagen wurden infiziert. 48 hpi bzw. 18 hpi wurden die infizierten Zellen mit einer Cytopsin auf Objektträger zentrifugiert. Entsprechend der Anleitung des *In situ cell death detection Kits (TMR red)* erfolgte die Präparation für die Analyse am Fluoreszenz-Mikroskop. Zellkerne wurden zusätzlich mit DAPI angefärbt. TUNEL-positive Zellen wurden ausgezählt und auf die Gesamtzellzahl bezogen, wobei zwischen 280 und 500 „Zellkerne“ (bzw. Zellen) pro Ansatz in repräsentativen Bildausschnitten gezählt wurden. Die starke Schwankung in der Menge ausgezählter Zellen war durch das Zellsterben, vor allem in den m41.lko- und  $\Delta$ m41-infizierten Proben, begründet. In den Balkendiagrammen wurden die prozentualen Anteile TUNEL-positiver Zellen in Bezug auf Wildtyp-Virus-infizierte Zellen dargestellt. E) RAW264.7-Makrophagen wurden mit genannten Virusmutanten infiziert. 18 hpi wurden die infizierten Zellen auf Objektträger aufgetropft und luftgetrocknet. Die Bilder zeigen repräsentative Bildausschnitte aus der Durchlichtmikroskopie.

In den Spuren der Kontrollen zeigt sich, dass die pro-Caspase-3 bei 35 kDa und das Fragment der aktivierten Caspase-3 bei 17 kDa detektiert wurden. Nach der Infektion

mit m41.1-defizienten Virusmutanten (m41.1ko,  $\Delta$ m41) konnte das p17-Fragment der aktiven Caspase-3 in den Lysaten infizierter Fibroblasten (A) und Makrophagen (B) nachgewiesen werden. In Folge der Infektion mit m41.1-exprimierenden Virusmutanten (wt, m41ko) oder der funktionellen Revertante wurde hingegen kein oder nur ein schwaches Signal der p17-Bande gemessen. Folglich führte das Fehlen des Proteins m41.1 in der Infektion zur Caspase-3-Aktivierung. Zu späten Zeitpunkten in der Apoptose kommt es neben dem Abbau der zellulären Proteine zur Degradation der chromosomalen DNA. Die Degradation der chromosomalen DNA wurde in infizierten Zellen mittels des TUNEL-Assays nachgewiesen. Im TUNEL-Assay wurden freie DNA-Enden angefärbt und mithilfe eines Mikroskop im Vergleich zur Gesamtzellzahl durch Auszählen quantifiziert (s. 2.2.3.5). Der Anteil TUNEL-positiver Zellen verhält sich proportional zum Anteil der sterbenden bzw. toten Zellen. Das Ergebnis der Quantifizierung ist in den Balkendiagrammen der Abbildung 23C und D dargestellt. Hier zeigt sich, dass die Infektion mit m41.1-defizientem Virus zu einem höheren Anteil TUNEL-positiver Fibroblasten (C) und Makrophagen (D) führte als die Infektion mit m41.1-exprimierenden Virusmutanten oder der funktionellen Revertante. Folglich führte das Fehlen des Proteins m41.1 während der MCMV-Infektion auch zur Degradation der chromosomalen DNA. Abschließend wurden untersucht, ob die Infektion mit m41.1-defizientem Virus auch zur Entstehung morphologischer Apoptose-Kennzeichen führt. Hierzu wurden Makrophagen mit den o. b. Virusmutanten oder mock infiziert. 18 Stunden nach der Infektion wurden Präparate für die Durchlichtmikroskopie angefertigt und im Durchlichtmikroskop betrachtet. In Abbildung 23E sind repräsentative Bildausschnitte aus der Durchlichtmikroskopie abgebildet. Zu den morphologischen Kennzeichen der Apoptose gehören das Schrumpfen der Zelle und die Abschnürung apoptotischer Vesikel. Diese Merkmale waren in der Durchlichtmikroskopie schwer nachzuweisen. Es war jedoch zu beobachten, dass die Infektion mit m41.1-defizientem Virus zu einem höheren Anteil an vermeintlichen Zelltrümmern und einer geringeren Konfluenz der Zellen im Vergleich zur Infektion mit m41.1-exprimierendem Virus oder der nicht infizierten Kontrolle führte. Auch dieses Ergebnis unterstützt die Aussage, dass in Zellkulturexperimenten das Protein m41.1 MCMV-infizierte Fibroblasten und Makrophagen vor der Apoptose schützt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ergänzen die funktionelle *in vitro* Charakterisierung von m41.1 durch Cam (51) und zeigen, dass das antiapoptotische MCMV-Protein m41.1 mit dem zellulären, proapoptotischen Protein BAK interagiert. Während der MCMV-Infektion hemmt das Protein m41.1 die Apoptose in infizierten Makrophagen und Fibroblasten.

### 3.4 Vorarbeiten zur *in vivo* Charakterisierung von m41.1

*In vitro* zeigt m41.1 einen BAK-abhängigen, antiapoptotischen Effekt in infizierten Makrophagen und Fibroblasten (51,89 und 3.3). Die Frage, ob der antiapoptotische Effekt des Proteins m41.1 auch in der Infektion einer Maus zum Tragen kommt und so zu einer effizienten *in vivo* Infektion beiträgt, blieb noch zu beantworten. Der erste Schritt war die Konstruktion geeigneter MCMV-Mutanten für eine *in vivo* Analyse. Die Konstruktion dieser Mutanten, genannt K\*-Virusmutanten, wurde in der vorliegenden Arbeit abgeschlossen und wird im folgenden Kapitel beschrieben.

#### 3.4.1 Konstruktion und Charakterisierung der K\*-Virusmutanten

Die Anforderungen an die K\*-Virusmutanten ergaben sich aus den experimentellen Absichten. Von Interesse war die *in vivo* Charakterisierung von m41.1 in infizierten Wildtyp-Mäusen (C57BL/6, BL6-Mäuse) und in Mäusen, die kein BAK-Protein exprimieren (*BAK1*<sup>-/-</sup>: B6.129-*BAK1*<sup>tm1Thsn</sup>/J), zumal m41.1 in Zellkulturexperimenten spezifisch die BAK-abhängige Apoptose hemmt. Hierbei sollten die Virustiter von Wildtyp-Virus, m41.1-Knockout und einer Revertante in bestimmten Organen der Mäuse verglichen werden. Die Virustiter in den Zielorganen Milz, Lunge, Leber und Speicheldrüsen sind wichtige Indikatoren in der *in vivo* Analyse von MCMV-Mutanten. Die Speicheldrüsen sind die finalen Zielorgane in der Dissemination des MCMVs in der Maus. Zeigt eine Mutation im Virusgenom beispielsweise Auswirkungen auf die Dissemination und/ oder die virale Replikation kann dies u. a. an den Virustitern in den Speicheldrüsen gemessen werden (s. 1.2). Deshalb erfolgte die Klonierung zum einen basierend auf einem BAC-Genom des MCMV-Wildtyps, das gut geeignet für *in vivo* Analysen ist. Dieses BAC umfasst das Genom des MCMV-Stamms K181 (87). Es wurde beschrieben, dass Wildtyp-Virus K181 in den Zielorganen der Maus zu höheren Virustitern repliziert als Wildtyp-Virus Smith (97-99). Ausserdem wurde kürzlich eine Mutation im BAC des MCMV-Stamms Smith (pSM3fr) nachgewiesen, die zu reduzierten Titern der rekonstituierten Viren in den Speicheldrüsen führt (100), so dass die Verwendung der auf pSM3fr-basierenden S<sup>§</sup>- und S\*-Virusmutanten nicht in Frage kam. Zum anderen war aufgrund der Verwendung von BL6-Mäusen der Knockout des Gens m157 im MCMV-Genom bei allen K\*-Virusmutanten erforderlich. BL6-Mäuse wurden gewählt, da BAK-Knockoutmäuse nur im BL6-Genom-Hintergrund existieren. Die BL6-Mäuse zählen jedoch zu den MCMV-resistenten Mausstämmen (104). Diese Resistenz basiert auf der Interaktion des Virusproteins m157 mit dem Mausezeptor Ly49H. Es wurde beschrieben, dass m157 für ein virales Protein kodiert, das von Rezeptoren (Ly49H) auf den NK-Zellen der Maus erkannt wird. Die Bindung des Proteins m157 an den Rezeptor löst die NK-Zell-vermittelte Tötung der infizierten Zelle aus. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der Rezeptor Ly49H nicht von allen Mausstämmen exprimiert wurde, jedoch aber in BL6-Mäusen (88,104,127). Um eine hohe

Empfindlichkeit der BL6-Mäuse gegenüber der Infektion mit den K\*-Virusmutanten zu erreichen, wurde die Genfunktion des m157 im MCMV-Genom zerstört (s. 2.2.2.9). Zusätzlich zur m157-Mutation ( $\Delta m157$ ) in allen K\*-Mutanten wurde der Locus m41 auf unterschiedliche Weise verändert. In Abbildung 24 sind die eingebrachten Veränderungen im Genom der K\*-Virusmutanten schematisch dargestellt.

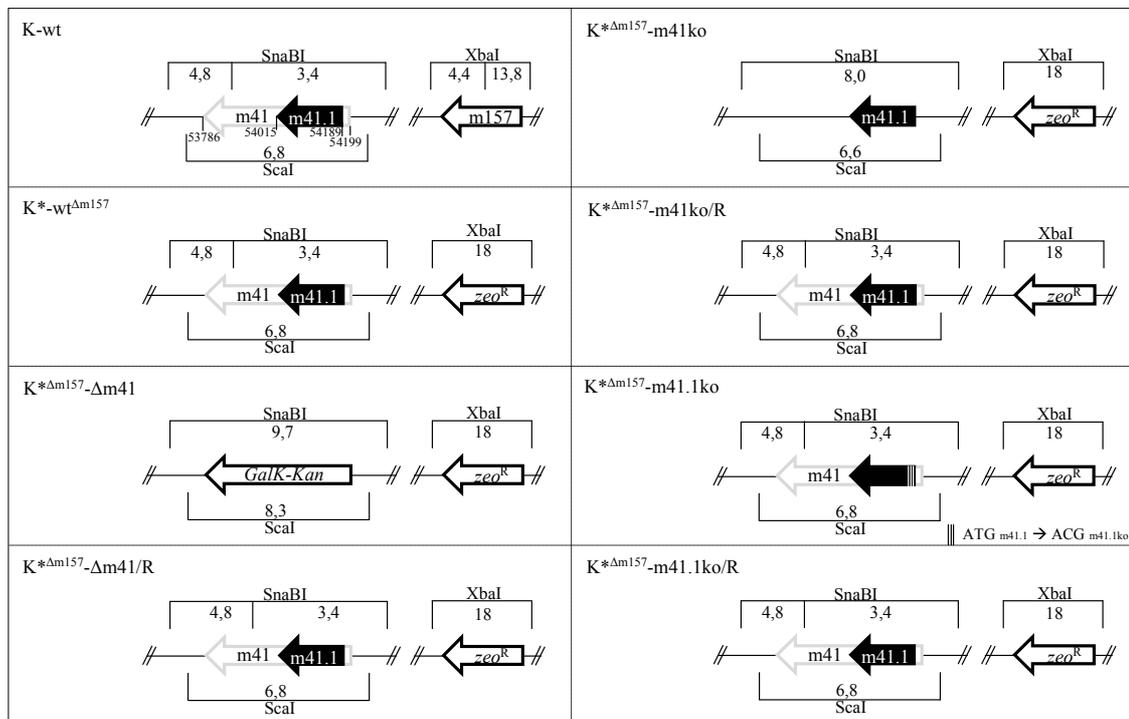


Abbildung 24: schematische Darstellung der Veränderungen im Genom der K\*-Virusmutanten mit Restriktionsschema

Die dargestellten Virusmutanten basieren auf dem BAC des MCMV-Stamms K181 (87). Der Knockout des Gens m157 in allen Virusmutanten erfolgte leicht modifiziert nach der Beschreibung von Bubic *et al.* (88). Die Modifikationen der BAC-DNA am Locus m41 wurden mithilfe der *Galk-Kan*-Mutagenese durchgeführt (symbolisiert durch \*). Die m41 (m41ko)- und m41.1 (m41.1ko)-Einzelknockoutmutante wurden hierbei ausgehend von der m41/m41.1-Doppelknockoutmutante (K\* $\Delta m157$ - $\Delta m41$ ) generiert. Die detaillierte Klonierungsstrategie ist unter 2.2.2.9 nachzulesen. In dieser Abbildung sind zusätzlich die Restriktionsmuster der verwendeten Enzyme *ScaI* und *SnaBI*, die zur Kontrolle der Mutationen im Locus m41 verwendet wurden, und *XbaI*, das zur Untersuchung der Mutation im ORF m157 diente, schematisch eingezeichnet. Die Schnittstellen sind nicht maßstabsgetreu eingetragen und die resultierenden Fragmentgrößen sind gerundet in kb angegeben. Der *in silico* Verdau der BAC-DNA-Varianten wurde mit dem Computerprogramm *NEB cutter*<sup>9</sup> unter Verwendung der publizierten Sequenz des MCMV-Stamms K181 (Accession AM886412) durchgeführt.

Der Locus m41 im Genom des Wildtyp-Virus (K-wt), des Wildtyp-ähnlichen Virus (K\*-wt $\Delta m157$ ) und der Revertante (/R) kodiert beide Proteine, m41 und m41.1.

<sup>9</sup> <http://tools.neb.com/NEBcutter2/>

Hingegen trägt die m41/m41.1-Doppelknockoutmutante ( $K^{*\Delta m157}\text{-}\Delta m41$ ) anstelle der m41-Sequenz die Sequenz des Selektionsmarkers *Galk-Kan*, folglich liegt weder die kodierende Sequenz des m41- noch die des m41.1-Proteins vor.

Die m41-Knockoutmutante ( $K^{*\Delta m157}\text{-}m41ko$ ) kodiert für kein m41. Hier wurde die Sequenz des m41-Gens durch die Sequenz des m41.1-Gens ersetzt.

Der Locus m41 in der m41.1-Knockoutmutante ( $K^{*\Delta m157}\text{-}m41.1ko$ ) weist drei Startkodon-Mutationen im Leserahmen des Proteins m41.1 auf, zumal die m41.1-Sequenz mit drei nahe aufeinander folgenden Startkodonen beginnt. Die Punktmutationen verändern nicht die Aminosäuresequenz des Proteins m41.

Zur Kontrolle der konstruierten  $K^*$ -Virusmutanten wurde im ersten Schritt die BAC-DNA der  $K^*$ -Virusmutanten im Restriktionsverdau überprüft. Danach wurde die Proteinexpression der überlappenden Gene m41 und m41.1 untersucht.

Die BAC-DNA aller  $K^*$ -Virusmutanten wurde enzymatisch mit drei Enzymen verdaut. Es ergaben sich Unterschiede in den Bandenmustern der BAC-DNA. Die Restriktionsfragmente, bei denen eine Änderung zu erwarten war, sind in Abbildung 24 schematisch eingezeichnet. In Abbildung 25A sind diese veränderten Bereiche mit Pfeilen neben den Bildern der im Agarose-Gel aufgetrennten Restriktionsverdau markiert. Hierbei waren nicht alle Änderungen der Restriktionsfragmente im Gel sichtbar, da Überlagerungen von Banden Unterschiede verdeckten. Nur die sichtbaren Veränderungen wurden ausgewertet und mit Pfeilen markiert. Der Verdau mit XbaI zeigte, ob die Mutation des Locus m157 erfolgreich verlaufen war. XbaI schneidet in der Sequenz des Gens m157, nicht aber in der Sequenz der Zeocin-Resistenz. Der Verdau mit XbaI resultierte in einer ca. 18kb großen Bande, wenn die Sequenz der Zeocin-Resistenz für einen Teil des Gens m157 eingesetzt wurde. Das 4,4 kb große Fragment der m157-Sequenz war dann nicht mehr detektierbar. Wie erwartet wurde das 4,4 kb große Fragment nur in der verdauten BAC-DNA des Wildtyps detektiert. SnaBI und ScaI wurden verwendet, um die Klonierung am Locus m41 zu untersuchen. Im Locus m41 wurde mittels SnaBI geschnitten. Wenn die *Galk-Kan*- oder die m41.1-Sequenz die m41-Sequenz ersetzten, verschwand die SnaBI-Schnittstelle und somit die 4,8 kb und 3,4 kb großen Fragmente. Die BAC-DNA der m41/m41.1-Doppelknockoutmutante und der m41.1-Knockoutmutante wiesen diese Banden wie erwartet nicht mehr auf. Zusätzlich wurde mit ScaI im flankierenden Bereich des Locus m41 geschnitten. Das Ersetzen der m41-Sequenz durch die *Galk-Kan*-Sequenz resultierte im Verdau der m41/m41.1-Doppelknockoutmutanten-BAC-DNA in einer Vergrößerung des ScaI-Restriktionsfragments um ca. 1,5 kb von ca. 6,8 kb auf 8,3 kb. Das Einsetzen der m41.1-Sequenz hingegen führte zu einer um 0,24 kb kleineren Bande wie im Verdau der BAC-DNA der m41-Knockoutmutante bestätigt wurde. Zusätzlich zu der Restriktionsanalyse wurden die veränderten m41-Loki durch Sequenzierung

analysiert. Es zeigten sich ausschließlich die beabsichtigten Änderungen (nicht abgebildet).

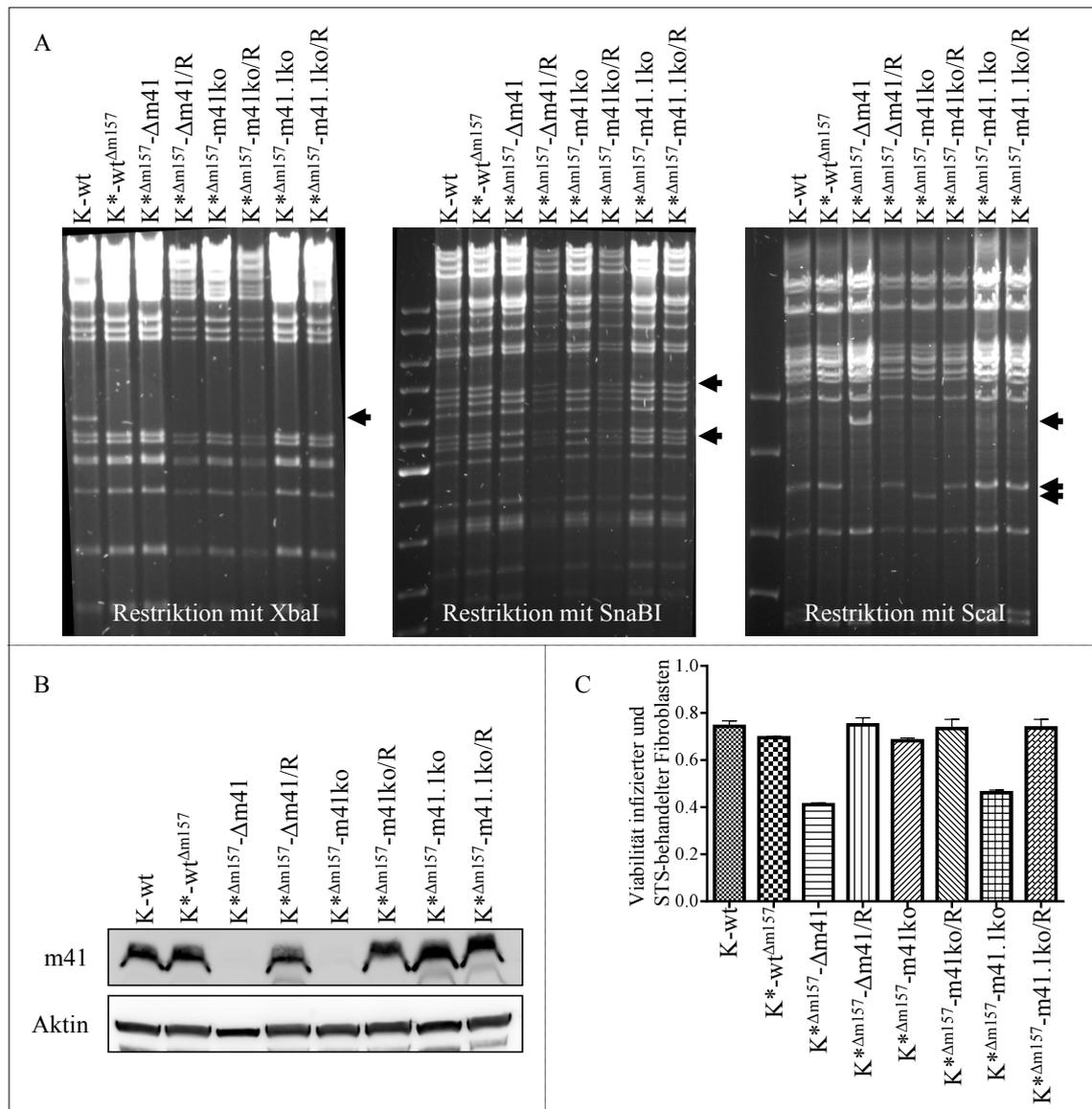


Abbildung 25: Kontrolle der K\*-Virusmutanten I

A) Die BAC-DNAs wurden isoliert und je 2,5  $\mu$ g wurden mit XbaI, SnaBI oder Scal verdaut. Die Auftrennung der Restriktionsfragmente erfolgte im Agarose-Gel. Die Veränderungen in den Restriktionsfragmenten sind mit Pfeilen gekennzeichnet (vgl. Schema in Abbildung 24). Als Größenstandard wurde der *GeneRuler<sup>TM</sup> DNA Ladder Mix* verwendet. B) RAW264.7-Makrophagen wurden mit den K\*-Virusmutanten infiziert. 24 hpi wurden die Zelllysate geerntet und im Western Blot auf die Anwesenheit des Proteins m41 untersucht. Die Detektion erfolgte mithilfe des m41-Antikörpers. Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet C) 10.1-Fibroblasten wurden mit den K\*-Virusmutanten infiziert und 6 hpi mit 500 nM STS behandelt. 24 hpi wurde die Zellviabilität mit dem *CellTiter 96<sup>®</sup> Aqueous One Solution Cell Proliferation Assays* bestimmt und ausgewertet. Die Ergebnisse der ausgewerteten Absorptionmessung sind im Balkendiagramm dargestellt und spiegeln direkt die Viabilität der Zellen wieder.

Nun wurde die BAC-DNA der K\*-Virusmutanten in Fibroblasten rekonstituiert und die Proteinexpression von m41 und m41.1 in Infektionsexperimenten getestet. Die Expression der Proteine m41 und m41.1 wurde auf die gleiche Weise durchgeführt, wie bereits bei der Kontrolle der S\*-Virusmutanten unter 3.2.3 beschrieben wurde.

Die Proteinexpression von m41 wurde in Lysaten infizierter Zellen im Western Blot analysiert. Abbildung 25B zeigt den Western Blot zur m41-Expressionskontrolle in Zelllysaten infizierter RAW264.7-Makrophagen. Wie erwartet konnte kein m41 nach der Infektion mit der m41-Knockoutmutante und der m41/m41.1-Doppelknockoutmutante detektiert werden, jedoch aber nach der Infektion mit den verbleibenden K\*-Virusmutanten.

Die m41.1-Proteinexpression konnte wiederum nur indirekt in dem von Cam (51,89) beschriebenen, funktionellen Assay nachgewiesen werden, da kein m41.1-spezifischer Antikörper existierte. In diesem Assay hemmt m41.1 die STS-induzierte Apoptose in infizierten Fibroblasten. Die m41.1-Proteinexpression wurden somit anhand der Zellviabilität infizierter und STS-behandelten Fibroblasten untersucht (s. a. 3.2.3). Die Messergebnisse sind im Balkendiagramm in Abbildung 25C dargestellt und zeigen, dass die Infektion mit dem m41/m41.1-Doppelknockoutvirus und dem m41.1-Knockoutvirus zu einer geringeren Viabilität der Zellen führte. Die Infektion mit den anderen K\*-Virusmutanten resultierte nicht in einer reduzierten Viabilität der STS-behandelten Zellen im Vergleich zur Infektion mit Wildtyp-Virus.

Insgesamt belegte die Konstruktions-Kontrolle der K\*-Virusmutanten, dass die BAC-DNA der K\*-Virusmutanten die erwarteten Restriktionsmuster aufwies und dass die Proteine m41 und m41.1 durch die K\*-Virusmutanten wie erwartet exprimiert wurden. In Hinblick auf die geplanten Experimente zur Klärung der Rolle von m41.1 *in vivo* konzentrierte sich die weitere *in vitro* Charakterisierung auf das Wildtyp-ähnliche Virus (K\*-wt<sup>Δm157</sup>), die m41.1-Knockoutmutante (K\*<sup>Δm157</sup>-m41.1ko) und die dazugehörige Revertante (K\*<sup>Δm157</sup>-m41.1ko/R). Das Wildtyp-ähnliche Virus wurde als Kontrolle anstelle des Wildtyp-Virus mitgeführt, da in allen K\*-Virusmutanten die m157-Genfunktion zerstört worden war. Die weiterführende *in vitro* Charakterisierung der drei K\*-Virusmutanten umfasste die Kontrolle der rekonstituierten Virion-DNA, eine zusätzliche m41.1-Expressionskontrolle auf Transkriptionsebene, das Replikationsverhalten der K\*-Virusmutanten in Fibroblasten und die Auswirkungen der Infektion auf die Viabilität von BAK- oder BAX-defizienten MEFs, um die BAK-Abhängigkeit der m41.1-vermittelten Apoptoseinhibition zu prüfen.

Abbildung 26A zeigt die Restriktionsanalyse der Virion-DNA. Die Virion-DNA wurde mit SnaBI verdaut und im Agarose-Gel aufgetrennt. Aufgrund der minimalen Veränderung im Locus m41 der drei K\*-Virusmutanten wurden keine Unterschiede in den Restriktionsmustern erwartet (vgl. Abbildung 24). Dies zeigt sich im Agarose-Gel

zur SnaBI-Restriktionsanalyse in Abbildung 26A bestätigt. Zusätzlich konnte durch den Restriktionsverdau die Integrität der Virion-DNA kontrolliert werden, zumal keine Unterschiede festzustellen waren. Daraufhin wurde mit der Untersuchung der m41.1-Expression auf Transkriptionsebene fortgefahren. In Abbildung 25C wurde bereits gezeigt, dass die Infektion mit der m41.1-Knockoutmutante Zellen nicht vor STS-induzierter Apoptose schützen konnte, was als Indikator für die fehlende Expression des Proteins m41.1 gilt. In Abbildung 26B wurde zusätzlich das Vorliegen der m41.1-mRNA mittels Reverser Transkriptase-PCR kontrolliert.

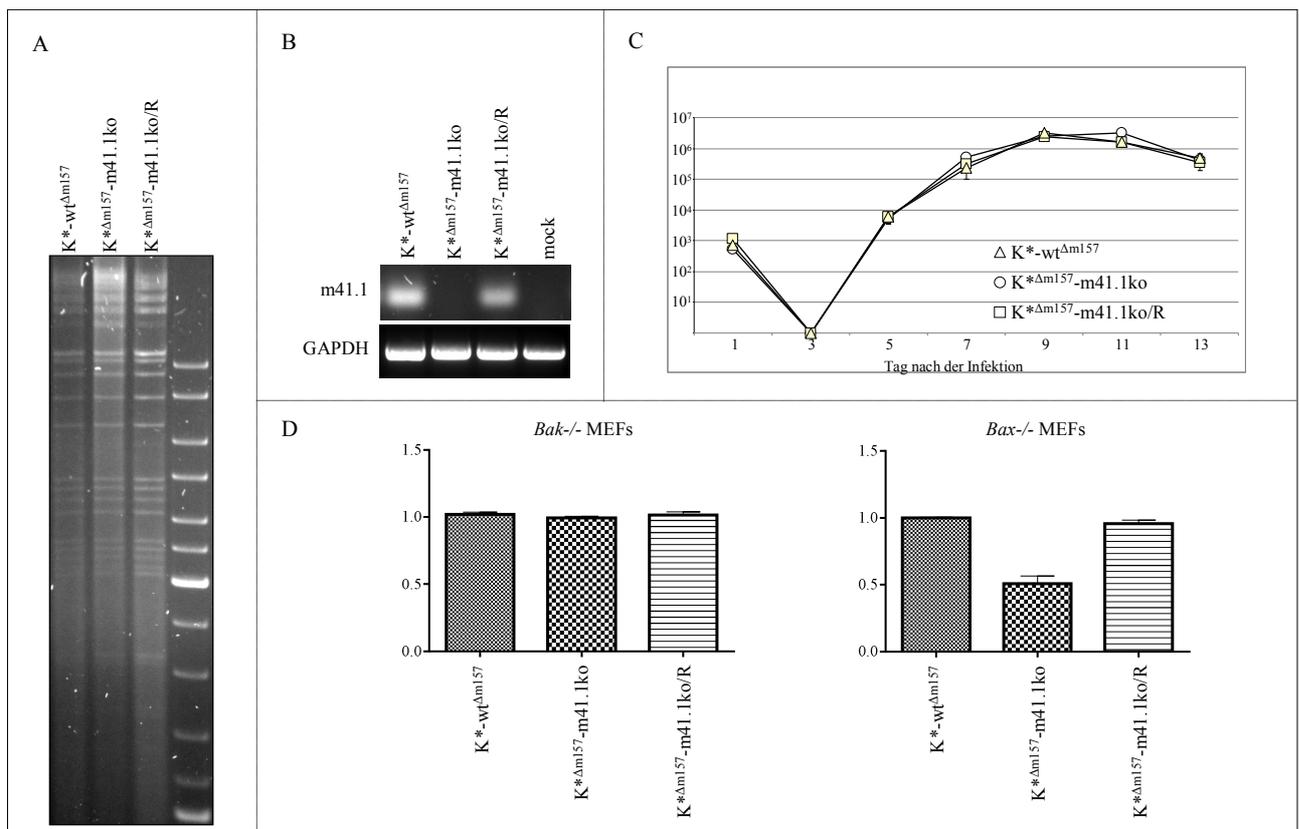


Abbildung 26: Kontrolle der K\*-Virusmutanten II

A) Virus-Stocks der drei genannten K\*-Virusmutanten wurden angezogen, geerntet und für die Präparation der Virion-DNA verwendet. Jeweils 3  $\mu$ g der Virion-DNA wurden mit SnaBI verdaut und im Agarose-Gel analysiert. Wie erwartet zeigten sich keine Unterschiede im Restriktionsverdau. Als Größenstandard wurde der *GeneRuler<sup>TM</sup> DNA Ladder Mix* verwendet. B) 10.1-Fibroblasten wurden infiziert und 24 Stunden später erfolgte die Präparation der RNA mit Hilfe des *innuPREP RNA Mini Kits*. Nach der cDNA-Synthese wurden PCRs mit unterschiedlichen Anlagerungstemperaturen durchgeführt. Dargestellt sind die Ansätze mit der Anlagerungstemperatur von 75°C. Das m41.1-spezifische PCR-Produkt und als Kontrolle das PCR-Produkt des konstitutiv exprimierten, zellulären GAPDH-Transkripts sind dargestellt (vgl. 2.2.2.5 und 2.2.2.6). C) Murine 10.1-Fibroblasten wurden mit einer MOI von 0,05 durch die drei K\*-Virusmutanten infiziert. An den aufgeführten Tagen nach der Infektion wurden die Virustiter über Titration bestimmt und in der Kurve eingetragen. D) MEFs, die kein BAK (*Bak*<sup>-/-</sup>)- oder kein BAX (*Bax*<sup>-/-</sup>)- Protein exprimieren, wurden mit den drei K\*-Virusmutanten infiziert. 48 hpi wurde

die Zellviabilität mit dem *CellTiter 96<sup>®</sup> Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay* bestimmt und ausgewertet. Die Ergebnisse der Absorptionsmessung, die die Zellviabilität proportional widerspiegeln, wurden als Balkendiagramme dargestellt.

Die überlappenden Sequenzen der Gene m41 und m41.1 erschwerten diesen Nachweis, da sich die Sequenz der m41.1-Knockoutmutante nur in drei Nukleotiden von der Sequenz der dazugehörigen Revertante und des Wildtyp-ähnlichen Virus unterscheidet. In der Reversen Transkriptase-PCR wurde ein Primer eingesetzt, der zwei Fehlpaarungen bei der Anlagerung an die Sequenz der m41.1-Knockoutmutante aufwies, wobei eine Fehlpaarung am 3'-Ende des Primers lag. Die PCR wurde mit hoher Stringenz in Bezug auf die Anlagerungstemperatur durchgeführt. Bei der Anlagerungstemperatur von 75°C ergab sich das dargestellte Bandenmuster. Abbildung 26B zeigt, dass nach der Infektion mit der m41.1-Knockoutmutante kein m41.1-spezifisches Transkript zu detektieren war, nach der Infektion mit der dazugehörigen Revertante und dem Wildtyp-ähnlichen Virus hingegen schon. Das Resultat der Reverse Transkriptase-PCR wurde als weiteres Indiz für die korrekte m41.1-Proteinexpression in den drei K\*-Virusmutanten gewertet. Zusätzlich wurde das Replikationsverhalten der drei K\*-Virusmutanten in Fibroblasten untersucht. Cam *et al.* hatten gezeigt, dass ein m41.1-Knockoutvirus keinen Replikationsdefekt in 10.1-Fibroblasten zeigt (89). Die drei K\*-Virusmutanten wurden ebenfalls daraufhin getestet. In Abbildung 26C sind die Wachstumskurven nach Infektion von 10.1-Fibroblasten mit den drei K\*-Virusmutanten dargestellt. Der Erwartung entsprechend wurden keine Unterschiede in den Virustiter im Untersuchungszeitraum festgestellt. Abschließend wurde untersucht, ob die Infektion mit der m41.1-Knockoutmutante, wie bereits beschrieben (89), exklusiv den BAK-abhängigen Zelltod auslöst. Um diese Frage zu klären, wurden MEFs, die entweder kein BAK-Protein oder kein BAX-Protein exprimieren, mit den drei K\*-Virusmutanten infiziert und die Zellviabilität wurde 48 Stunden nach der Infektion bestimmt. Die Messwerte spiegeln die Zellviabilität wieder, sind als Balkendiagramme in der Abbildung 26D dargestellt und zeigen, dass keine reduzierte Viabilität in m41.1-Knockoutmutante-infizierten, BAK-defizienten MEFs zu verzeichnen war, jedoch aber in BAX-defizienten MEFs. In BAX-defizienten MEFs wird BAK exprimiert und die mitochondrial-vermittelte Apoptose konnte nicht ohne m41.1 inhibiert werden, so dass die Infektion mit der m41.1-Knockoutmutante in einer starken Reduktion der Zellviabilität resultierte. Wurde hingegen nach der Infektion mit der dazugehörigen Revertante oder dem Wildtyp-ähnlichen Virus das Protein m41.1 exprimiert, schützte m41.1 vor der BAK-vermittelten Apoptose, was sich in den konstant hohen Viabilitätswerten zeigte.

Zusammengefasst zeigen auch die Ergebnisse der weiterführenden Charakterisierung, dass sich das Wildtyp-ähnliche Virus, die m41.1-Knockoutmutante und die

dazugehörige Revertante wie erwartet in den durchgeführten *in vitro* Experimenten verhielten. Sie wurden daraufhin in der *in vivo* Charakterisierung von m41.1 eingesetzt.

Die *in vivo* Charakterisierung wurde in Kooperation mit dem Labor von Stipan Jonic durchgeführt. Branka Popovic und Christina Luig führten die *in vivo* Versuche in Kroatien durch. Wildtyp-Mäuse und Mäuse, die kein BAK-Protein exprimieren, wurden mit Wildtyp-ähnlichem Virus, der m41.1-Knockoutmutante oder der dazugehörigen Revertante infiziert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Infektion wurden die Virustiter in den Organen der infizierten Tiere bestimmt. Zu frühen Zeitpunkten der Infektion wurden u. a. die Virustiter in der Milz gemessen. Hier zeigten sich keine Unterschiede in den Virustitern der drei K\*-Virusmutanten. Zu späten Zeitpunkten der Infektion wurden die Virustitern in den Speicheldrüsen analysiert. Interessanterweise führte die Infektion mit der m41.1-Knockoutmutante, im Vergleich zur Infektion mit den beiden Kontroll-Viren, zu reduzierten Virustiter in den Speicheldrüsen der Wildtyp-Mäuse. Hingegen wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den K\*-Virustitern in den Speicheldrüsen infizierter, BAK-defizienter Mäuse beobachtet. Die Studie zeigte, dass m41.1 in Abhängigkeit von BAK zu einer optimalen Dissemination des MCMVs in der Maus beiträgt.

Die in diesem Kapitel dargestellten Daten zu den drei K\*-Virusmutanten und die Ergebnisse der *in vivo* Studie wurden im Januar 2013 unter dem Titel *Viral inhibition of BAK promotes murine cytomegalovirus dissemination to salivary glands* in *Journal of Virology* von Wiebke Handke, Christina Luig, Branka Popovic, Astrid Krmpotic, Stipan Jonic und Wolfram Brune veröffentlicht.

## 4 Diskussion

### 4.1 Der Lokus m41 des murinen Cytomegalievirus

Der Lokus m41 wurde erstmalig 1996 bei der Annotation des MCMV-Genoms durch Rawlinson *et al.* beschrieben (128). Beschrieben wurde ein offener Leserahmen auf dem Komplementärstrang. Dieser erstreckt sich von Position 53786 bis Position 54199 und kodiert für ein 138 Aminosäuren langes Protein. Es wurde ein Molekulargewicht von 14,6 kDa vorhergesagt und kein Positionshomolog konnte im Genom des HCMVs gefunden werden. Funktionell blieb der ORF unbeschrieben. Dies änderte sich 2003, als Brune *et al.* dem ORF m41 ein Golgi-lokalisierendes, antiapoptotisches Protein zuschrieben (59). Es konnte gezeigt werden, dass das Genprodukt des ORFs m41 den Caspase-abhängigen und p53-unabhängigen Zelltod in Fibroblasten, Endothel- und Stroma-Zellen verhindert. Der antiapoptotische Mechanismus blieb unklar. Die Betrachtung des Lokus m41 bekam einen weiteren Impuls, als 2005 Brocchieri *et al.* eine weitere Annotation des MCMV-Genoms durchführten (81). Sie legten andere Ausschlusskriterien, so dass auch kleinere und stark überlappende ORFs erkannt wurden. Innerhalb des ORFs von m41 wurde ein weiterer ORF, das m41.1, vorhergesagt (vgl. Abbildung 2). Für das 57 Aminosäuren große Protein m41.1 wurde beschrieben, dass es 10 Nukleotide hinter dem Startkodon des m41-Leserahmens beginnt und somit durch die Genomsequenz im Bereich von 54189 bis 54015 auf dem Komplementärstrang kodiert wird. Die ORFs von m41 und m41.1 überlappen vollständig, werden jedoch in einem anderen Leserahmen kodiert. Die Frage blieb offen, ob das Protein m41.1 exprimiert wird. Cam *et al.* konnten 2010 diese und weitere Fragen beantworten (89). Sie zeigten, dass der gesamte Lokus m41 auf einer mRNA transkribiert wird. Die Proteine m41 und m41.1 konnten direkt (m41) oder indirekt (m41.1) zu frühen Zeitpunkten in der Infektion nachgewiesen werden (s. a. 3.1). In funktionellen Untersuchungen stellte sich zudem heraus, dass die antiapoptotische Funktion des Lokus m41 weitgehend der m41.1-Proteinexpression zugeschrieben werden musste. Nur in der Makrophagenzelllinie RAW264.7 führte die Infektion mit m41-Knockoutvirus im Vergleich zur Infektion mit Wildtyp-Virus zu einer reduzierten Zellviabilität. Der antiapoptotische Effekt des Proteins m41.1 hingegen konnte detailliert in Zellkultur-basierenden Experimenten charakterisiert werden. Cam *et al.* zeigten, dass m41.1 im Mitochondrium lokalisiert ist und hier die BAK-Oligomerisierung nach Aktivierung der intrinsischen Apoptose hemmt. Die alleinige Expression von m41.1 konnte zudem die BAK-vermittelte Apoptose selektiv verhindern, nachdem sie durch Virusinfektion oder chemisch induziert worden war.

Teile der vorliegenden Arbeit trugen zur Charakterisierung von m41.1 in Cam *et al.* bei. In einer Immunpräzipitation konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass das Protein m41.1 mit dem zellulären, proapoptotischen Protein BAK interagiert (s. 3.3.1). Ausserdem belegten die Ergebnisse aus Zelltod-charakterisierenden Infektionsexperimenten, dass m41.1 die Apoptose während der MCMV-Infektion hemmt (s. 3.3.2). Zusätzlich wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Virusmutanten für die *in vivo* Charakterisierung des Proteins m41.1 konstruiert und charakterisiert (3.4). Die *in vivo* Untersuchungen erfolgten in Kooperation mit dem Labor von Stipan Jonic und zeigten, dass m41.1 die Dissemination des Virus in der Maus unterstützt und dass auch *in vivo* ein Fehlen des zellulären, proapoptotischen Proteins BAK die Abwesenheit des Proteins m41.1 kompensiert (129).

Im Gegensatz zum gut charakterisierten Protein m41.1, blieb die Funktion des Proteins m41 unklar. Für das Golgi-lokalisierte Protein m41 wurde in der Infektion von RAW264.7-Makrophagen ein antiapoptotischer Effekt beschrieben (51,59,89). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Lokalisation des Proteins m41 auf den cis-Golgi spezifiziert (s. 3.2.1) und mögliche Interaktionspartner wurden mithilfe der  $\alpha$ -HA-Affinitätsaufreinigung in Kombination mit einer massenspektrometrischen Analyse, des *Y2H*-Verfahrens sowie der Koimmunpräzipitation identifiziert (s. 3.2.2). Ein funktioneller Zusammenhang zwischen m41 und den näher untersuchten Interaktionspartner-Kandidaten UNC93B1 (s. 3.2.2.1) und Caspase-2 (s. 3.2.2.2) konnte in den durchgeführten Experimenten jedoch nicht gezeigt werden. Interessanterweise stellte sich aber im Laufe der Untersuchungen heraus, dass die antiapoptotische Funktion von m41 in der Infektion von RAW264.7-Makrophagen nicht bestätigt werden konnte (vgl. Abbildung 18 und Abbildung 19).

## **4.2 Hinweise auf eine funktionelle Interaktion von UNC93B1, GTSE1, Basigin oder Caspase-2 mit m41**

In der vorliegenden Arbeit wurden mögliche Interaktionspartner für das MCMV-Protein m41 über eine  $\alpha$ -HA-Affinitätsaufreinigung gekoppelt an eine massenspektrometrische Analyse und durch ein *Y2H*-Verfahren ermittelt. Als interessante Interaktionspartner-Kandidaten wurden GTSE1, Basigin und UNC93B1 ausgewählt, zumal GTSE1 und Basigin in beiden Suchverfahren nachgewiesen wurden und UNC93B1 bereits mit der MCMV-Infektion in Verbindung gebracht worden war. GTSE1 und Basigin wurden nicht weiter untersucht. Eine kurze Vorstellung der beiden Proteine soll aufzeigen, inwiefern sich eine funktionelle Interaktion theoretisch begründet lässt. Die Klärung, ob eine funktionelle Interaktion mit m41 vorliegt, bleibt Gegenstand weiterführender Untersuchungen zur Charakterisierung des Proteins m41.

*GTSE1 ist an der Regulation des p53-abhängigen Zellzyklusarrets in der DNA-Schadensantwort beteiligt*

GTSE1 steht für „in G2- und S-Phase exprimiertes Protein 1“. Für humanes GTSE1 (hGTSE1) und murines GTSE1 (GTSE1; B99) wurde beschrieben, dass es Zellzyklus-abhängig in nicht transformierten Zellen (S, G2) und transformierten Zellen (S, G2, G1) exprimiert wird (130,131). Der Zellzyklus-abhängige Abbau des GTSE1 erfolgt nach Hyperphosphorylierung in der M-Phase (132). Lokalisiert ist GTSE1 an den Mikrotubuli, wobei beobachtet wurde, dass hGTSE1 auch im Zellkern und Cytoplasma zu finden ist (130,133). Funktionell wurde für hGTSE1 beschrieben, dass es in der Regulation des p53-abhängigen Zellzyklusarrests nach DNA-Schädigung involviert ist (132,133). p53 ist ein Transkriptionsfaktor, der nach DNA-Schädigung aktiviert wird. p53 transaktiviert die Expression p53-induzierbarer Gene, deren Genprodukte im Zellkern u. a. einen Zellzyklusarrest bewirken, so dass Zeit für die Reparatur der DNA-Schäden gewonnen wird (134). Für hGTSE1 wurde beschrieben, dass es mit p53 im Kern interagiert und p53 zum Abbau ins Cytoplasma relokalisiert. Zu späten Phasen des Zellzyklusarrests akkumuliert hGTSE1 im Zellkern. Die Autoren vermuten, dass hGTSE1 durch die negative Regulation von p53 eine Fortsetzung des Zellzyklus ermöglicht (132,133).

Laufende Untersuchungen in der Arbeitsgruppe von Wolfram Brune zeigen, dass die MCMV-Infektion die p53-abhängige DNA-Schadensantwort in Zellkultur induziert. Ob m41 in diese Signalwege durch Bindung an GTSE1 eingreift, bleibt jedoch fraglich und bedarf weiterer Untersuchungen.

*Basigin vermittelt Cyclophilin A-abhängig den Eintritt von SARS-CoV und HIV-1 in die Zelle*

Basigin wurde als glykosyliertes Transmembranprotein in der Plasmamembran, z.B. auf Epithel-, Endothelzellen und Monozyten beschrieben. Die Glykosylierung findet im Golgi-Apparat statt. Verschiedene Bindungspartner wurden für Basigin nachgewiesen und Basigin selbst wurde als multifunktionelles Protein bezeichnet (135-137). In Bezug auf eine Virusinfektion konnte in zwei Publikationen gezeigt werden, dass Basigin über die Interaktion mit zellulärem Cyclophilin A mit viralen Proteinen interagiert. So wurde für das *Severe acute respiratory syndrome* (SARS) *coronavirus* (CoV) gezeigt, dass das virale Nukleokapsidprotein mit Cyclophilin A interagiert. Das Cyclophilin A wiederum interagiert mit Basigin. Diese Komplexbildung steht laut den Autoren in der Diskussion den Eintritt des Virus in die Zelle zu erleichtern (138). Für das Humane Immundefizienz Virus-1 (HIV-1) wurde hingegen beschrieben, dass Cyclophilin A inkorporiert im Virion vorliegt. Das inkorporierte Cyclophilin A bindet an Basigin auf der Zelloberfläche und erleichtert auch hier den Viruseintritt in die Zelle (139). In

Anbetracht des derzeitigen Wissens zu Basigin, das nur Auszugsweise hier aufgeführt wurde, stellt sich kein offensichtlicher Bezug zu dem Golgi-lokaliserten m41 dar.

*m41 zeigt keinen Einfluss auf die UNC93B1-abhängige Aktivierung endosomaler TLRs in MCMV-infizierten, stimulierten RAW264.7-Makrophagen*

Der Zeitrahmen erlaubte nur die nähere Betrachtung eines Kandidaten aus den Suchverfahren. UNC93B1 wurde ausgewählt, da UNC93B1 bereits mit der MCMV-Infektion in Verbindung gebracht worden war.

UNC93B1 ist ein Transmembranprotein, das im ER und in Endosomen lokalisiert ist. Es ist für den Transport bestimmter Toll-like Rezeptoren (TLRs) ins Endosom verantwortlich (122,140). TLRs sind Rezeptoren des angeborenen Immunsystems. Sie erkennen Strukturen von Mikroorganismen und aktivieren die frühe Immunantwort. TLR3, TLR7 und TLR9 bilden die Gruppe der endosomalen TLRs. In unstimulierten Zellen befinden sich TLR3, 7, und 9 im ER. Nach ihrer Aktivierung werden sie zu den Endosomen gebracht, wo sie für die Signalweiterleitung bereit stehen. Es wurde gezeigt, dass UNC93B1 über seine Transmembrandomäne mit TLR3, 7 und 9 interagiert. Während des UNC93B1-abhängigen TLR-Transports oder der -Prozessierung wurde in unterschiedlichen Studien gezeigt, dass UNC93B1-TLR-Komplexe mit dem Golgi in Kontakt kommen (140-142). Für TLR7 und 9 wurde dazu beschrieben, dass UNC93B1 die Freisetzung vom ER in die Endosomen mediiert und hierbei vermutlich den Golgi durchläuft (141). Neu synthetisiertes TLR3 hingegen wird nach Stimulation vom ER über den Golgi zu den Endosomen transportiert und hier durch Spaltung aktiviert. Die Spaltung und somit die Aktivität von TLR3 ist abhängig von der UNC93B1-Expression (142). Weiterhin wurde gezeigt, dass UNC93B1 im Golgi glykosyliert wird (122). Für MCMV ist gezeigt worden, dass es die frühe Immunantwort auf unterschiedlichen Wegen blockiert, um eine Virusinfektion etablieren zu können (27,28,52). Studien zeigten, dass MCMV die TLR-Signalweiterleitung durch das MCMV-Protein M45 blockiert (55,123). Melanie Brinkmann untersucht u. a. den Einfluss von M45 speziell auf die Aktivierung der endosomalen TLRs. Durch Infektionsexperimente mit einem M45-Knockoutvirus konnte dem Protein M45 ein signifikanter, aber nicht vollständiger inhibitorischer Effekt zugeschrieben werden (mündliche Kommunikation zwischen M. Brinkmann und W. Brune). Aus diesem Ergebnis wurde geschlossen, dass ein weiteres MCMV-Protein an der Hemmung beteiligt sein muss. Aufgrund der Interaktion von UNC93B1 mit m41, der Lokalisation im Golgi und der Bedeutung von UNC93B1 für die Aktivierung der endosomalen TLRs, erschien m41 als geeigneter Kandidat. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein Doppelknockoutvirus, das kein m41 und kein M45 exprimiert, generiert (s. Abbildung 12). Brinkmann untersuchte, ob die Inhibition der Aktivierung der endosomalen TLRs nach der Infektion mit dem Doppelknockoutvirus vollständig aufgehoben werden konnte. Sie konnte jedoch keinen Unterschied in den

Ergebnissen nach der Infektion mit dem M45-Knockoutvirus und dem M45-m41-Doppelknockoutvirus feststellen (mündliche Kommunikation zwischen M. Brinkmann und W. Brune). Somit wurde eine Beteiligung von m41 unter den betrachteten Bedingungen ausgeschlossen. Zusätzlich wurde in der vorliegenden Arbeit nur eine partielle Kolo-kalisation von m41 und UNC93B1 in der Immunfluoreszenz festgestellt (s. Abbildung 11). Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Interaktion von UNC93B1 und m41 im *Y2H*-Verfahren mit hoher Wahrscheinlichkeit ein falsch positiver Befund ist.

*m41 interagiert mit Caspase-2, zeigt aber im untersuchten Kontext keine Hemmung der Caspase-2-Aktivierung*

Zur Identifikation eines Interaktionspartners von m41 wurde neben den Suchverfahren eine Arbeitshypothese entwickelt, die auf Literaturrecherche basierte. In diesem Modell wurde postuliert, dass m41 die Caspase-2-abhängige, Golgi-mediierte Apoptose hemmt (vgl. Abbildung 13). Die Idee basiert darauf, dass zum einen m41 am cis-Golgi lokalisiert ist (s. Abbildung 8) und dass m41 eine antiapoptotische Funktion in infizierten RAW264.7-Makrophagen zugeschrieben worden war (51,59,89). Mancini *et al.* publizierten zum anderen, dass Caspase-2 an der cytoplasmatischen Seite des Golgis (cis-Golgi) nachgewiesen werden kann und hier die Apoptose über die Generierung von GOLGIN-160-Spaltprodukten mediiert (42). In der Arbeitshypothese stand die Frage im Zentrum, ob eine Interaktion der Proteine m41 und Caspase-2 vorliegt und ob diese Interaktion die Caspase-2-Aktivierung und somit die Apoptose hemmen kann. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass m41 und Caspase-2 in der Infektion und nach Transfektion interagieren (s. Abbildung 15 und Abbildung 16). Ob m41 die Caspase-2-Aktivierung hemmt, wurde in Infektionsexperimenten mit unterschiedlich konstruierten m41-Knockoutviren getestet. Es zeigte sich, dass die Infektion mit einem markersequenztragenden m41-Knockoutvirus zur Aktivierung der Caspase-2 in RAW264.7-Makrophagen führt, die Infektion mit einer markersequenzfreien m41-Stoppmutante jedoch nicht (s. Abbildung 17 und Abbildung 18). In Kontroll-Experimenten wurde überprüft, dass beide m41-Knockoutviren kein m41 exprimieren (s. Abbildung 12 und Abbildung 21). Im Gegensatz zur m41-Stoppmutante trägt das m41-Knockoutvirus noch die Selektionsmarkersequenz im Locus m41. Die Insertion zerstört den Leserahmen des m41-Gens, aber nicht den ORF des überlappend kodierten Gens m41.1 (vgl. Abbildung 20). Im Kontroll-Experiment zur m41.1-Expression, in dem die m41.1-Expression indirekt bestimmt wurde, fiel auf, dass nach Infektion mit dem m41-Knockoutvirus ein leichtes Defizit der m41.1-Expression vorlag (s. Abbildung 21). Eine eindeutige Aussage über die Expressionsstärke des Proteins m41.1 kann nicht getroffen werden, da keine quantitativen Untersuchungen durchgeführt wurden. Die Annahme, dass das m41-Knockoutvirus m41.1 schwächer exprimiert, könnte jedoch die Caspase-2-Aktivierung, nach Infektion mit dem m41-Knockoutvirus, nicht aber nach Infektion mit der m41-Stoppmutante, erklären. Das Protein m41.1

hemmt die Apoptose. Während der Apoptose wird Caspase-3 aktiviert. Caspase-3 aktiviert direkt Caspase-2 (vgl. 1.3). Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, führte die Infektion von RAW264.7-Makrophagen mit Virusmutanten, die kein m41.1 exprimieren, zur Caspase-2- und zur Caspase-3-Aktivierung. Die Infektion mit m41.1-exprimierenden Virusmutanten resultierte weder in der Caspase-2- noch in der Caspase-3-Aktivierung (s. Abbildung 18). Ob eine unvollständige m41.1-Expression die Caspase-3- und Caspase-2-Aktivierung nach der Infektion mit m41-Knockoutvirus begründet hat, kann anhand der Ergebnisse nur gemutmaßt werden. Allerdings zeigte sich eindeutig, dass die Infektion mit der markerlosen m41-Stoppmutante nicht zur Caspase-2- und Caspase-3-Aktivierung führte, d. h. die Interaktion von m41 und Caspase-2 führte in diesen Experimenten nicht zur Hemmung der Caspase-2-Aktivierung, so dass die anfänglich aufgestellte Arbeitshypothese widerlegt worden war.

Trotz des fehlenden funktionellen Zusammenhangs im Zelltodgeschehen bleibt die hier gezeigte Interaktion zwischen m41 und Caspase-2 interessant. Caspase-2 ist die am stärksten konservierte Caspase. Es ist bekannt, dass Caspase-2 in vielen zellulären Prozessen involviert ist. Beschrieben wurde die Beteiligung der Caspase-2 in der Zelltodregulation, der Zellalterung, in Prozessen nach DNA-Schädigung sowie in der Regulation des Zellzyklus und der Tumorentwicklung (124). Die Funktion der Caspase-2 wird als stark zelltypspezifisch und stimulusspezifisch beschrieben und funktionell kann Caspase-2 von anderen Caspasen partiell kompensiert werden (110,143). Die Untersuchungen von Caspase-2-Knockoutmäusen ergaben, dass Caspase-2-defiziente Mäuse eine erhöhte Anzahl an Oozyten aufweisen und dass Caspase-2-negative Oozyten resistent gegenüber dem Zelltod sind, der durch DNA-Schädigung hervorgerufen wird (144). Ausserdem wurde gezeigt, dass Caspase-2 *in vivo* an der oxidativen Stressantwort beteiligt ist (145,146). Es ist bekannt, dass die Infektion mit dem großen dsDNA-Virus CMV mit der DNA-Schadens-Antwort einhergeht (147,148) und den Stoffwechsel reaktiver Sauerstoffspezies moduliert (149). Ob die Interaktion von m41 und Caspase-2 hier, oder in einem anderen Caspase-2-abhängigen Geschehen, eine Rolle spielt, können nur zukünftige Untersuchungen klären. Ein funktioneller Zusammenhang zwischen Caspase-2 und CMV wurde noch nicht gezeigt.

Im Hinblick auf künftige Untersuchungen muss erwähnt werden, dass die Methoden zur Untersuchung der Caspase-2-Aktivierung in der Entwicklung stehen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Aktivierung der Caspase-2 durch das Erscheinen des p19-Fragments der aktivierten Caspase-2 im Western Blot oder anhand der Umsetzung des Substrats VDVAD-AFC im Fluoreszenzassay gemessen (s. a. 2.2.3.6). Die Publikationen der letzten Jahre zeigen immer deutlicher, dass die spezifische Messung der Caspase-2-Aktivität eine experimentelle Herausforderung darstellt (beispielsweise

in 111,124,150,151). Kürzlich erschienene Publikationen zeigen dazu, dass die Spezifität von Caspase-2 für das Substrat VDVAD nicht so hoch ist wie angenommen (143) und dass vor allem die Substratspezifität von Caspase-2, -3 und -7 einander sehr stark ähneln (152). Eine Crossreaktivität mit der apoptosespezifischen Effektor-Caspase-3 im Fluoreszenzassay kann demnach in den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nicht ausgeschlossen werden. Caspase-3 ist zudem in der Lage, direkt Caspase-2 zu aktivieren (39). Auch der Nachweis des p19-Fragments im Western Blot spiegelte nur bedingt den enzymatischen Aktivitätsgrad der Caspase-2 wieder. Es wurde gezeigt, dass Caspase-2 in hochmolekularen Aktivierungskomplexen aktiviert wird. Innerhalb dieser Komplexe werden inaktive pro-Caspase-2-Monomere in räumliche Nähe gebracht (38,151). Nach der Dimerisierung zeigten die unprozessierten Caspase-2-Dimere bereits eine 20 %ige Aktivität. Diese ermöglicht u. a. die zweifache autokatalytischen Spaltung in die voll aktive Caspase-2 (111). Die Dimerisierung, als Caspase-2-spezifischer Aktivierungsprozess, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht gemessen werden. Jedoch wurde von Bouchier-Hayes *et al.* eine Methode beschrieben, in der die Caspase-2-Dimerisierung gemessen wird. Diese Methode bietet die Möglichkeit die Caspase-2-Aktivierung spezifisch zu messen (150) und sollte für weitere Untersuchungen zur Caspase-2-Aktivierung im Labor etabliert werden.

### **4.3 m41 zeigt keinen antiapoptotischen Effekt in MCMV-infizierten Makrophagen**

Für das Protein m41 wurde eine antiapoptotische Funktion in infizierten RAW264.7-Makrophagen beschrieben (51,59,89). Daten aus der vorliegenden Arbeit (Abbildung 18 und Abbildung 19) und den kürzlich erschienenen Publikationen von Crosby *et al.* (153) und Fleming *et al.* (154) zeigen, dass die antiapoptotische Aktivität des Proteins m41 nicht bestätigt werden konnte. Im Unterschied zu der initialen Beschreibung des m41-Phänotyps wurden hier Virusmutanten verwendet, in denen die m41-Expression durch eine Startkodon-Mutation und/ oder das Generieren eines verfrühten Stoppkodons unterbunden wurde. Die Sequenzumgebung der nachbarten Gene und des überlappenden Gens m41.1 wurden so weitestgehend unverändert belassen. In allen drei Studien wurde die Viabilität infizierter Makrophagen bestimmt. In der vorliegenden Arbeit und in der Arbeit von Crosby *et al.* konnte hierbei gezeigt werden, dass die Infektion mit dem m41-Knockoutvirus die Viabilität von RAW264.7-Makrophagen nicht reduziert. Crosby *et al.* konnten zusätzlich ausschließen, dass m41 einen Einfluss auf die Viabilität infizierter J774.1-Makrophagen und primärer Knochenmarksmakrophagen (*bone marrow derived macrophages*, BMDMs) hat. Des Weiteren zeigten ihre Untersuchungen, dass in der Infektion von Balb/c Mäusen das Fehlen des Proteins m41 keine Auswirkung auf die Virusreaktivierung und Virusdissemination hat (153). Die Ergebnisse von Fleming *et al.* bestätigten die

Beobachtung, dass m41 keine antiapoptotische Aktivität aufweist. Neben dem Beleg, dass die Infektion mit m41-Knockoutvirus nicht zur reduzierten Viabilität von IC-21-Makrophagen führt, konnten sie zusätzlich die Identität der zwei m41-Genprodukte, die in infizierten Zellen auftreten, aufklären. Die beiden m41-Genprodukte konnte auch in der vorliegenden Arbeit als Doppelbande des Proteins m41 nach Wildtyp-Infektion im Western Blot beobachtet werden (s. beispielsweise Abbildung 6). Fleming *et al.* zeigten, dass das größere m41-Genprodukt, genannt m41L, durch alternatives Spleißen entsteht. m41L stellt somit eine N-terminal verlängerte Variante des Proteins m41 dar. Aber auch für m41L konnte keine antiapoptotische Aktivität beobachtet werden. *In vivo* Studien in infizierten Balb/c Mäusen zeigten jedoch, dass die Infektion mit einer Virusmutante, die beide m41-Genprodukte nicht exprimiert, in einer ca. 5fach reduzierten Viruslast in der Lunge ab dem zehnten Tag nach der Infektion im Vergleich zur Wildtyp-Virus-Infektion resultierte. Die Virustiter in der Milz, der Leber und den Speicheldrüsen wiesen allerdings keine Abweichungen zur Wildtyp-Virus-Infektion auf. Die Autoren schlussfolgerten, dass die m41-Genprodukte wichtig für die Replikation des Virus in der Lunge seien. Crosby *et al.* hingegen stellten keinen Einfluss des Proteins m41 auf die Virusdissemination fest. Zudem wurde für die Infektionsroute des MCMVs gezeigt, dass MCMV zuerst die Milz, dann die Leber und die Lunge durchschreitet und schließlich in den Speicheldrüsen vorliegt (17). Man würde folglich bei einem Replikationsdefekt in den Lungen auch eine Auswirkung auf die Virustitern in den Speicheldrüsen erwarten. In Anbetracht dieser Unstimmigkeiten wäre eine Bestätigung der Aussage, dass die Proteine m41 und m41L essentiell für eine effiziente Virusreplikation in der Lunge sind, wünschenswert.

Die vorliegende Arbeit sowie die Arbeiten von Crosby *et al.* (153) und Fleming *et al.* (154) zeigen jedoch übereinstimmend, dass dem Protein m41 keine antiapoptotische Aktivität in infizierten Makrophagen zugeschrieben werden kann.

#### **4.4 m41.1 hemmt die BAK-vermittelte Apoptose *in vitro* und unterstützt die Dissemination des Virus *in vivo***

Daten aus der Promotionsarbeit von Maren Cam (51) und Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit wurden in der Publikation von Cam *et al.* (89) veröffentlicht. Cam *et al.* konnten zeigen, dass das MCMV-Protein m41.1 infizierte Zellen vor der BAK-vermittelten Apoptose schützt. Der *in vitro* Charakterisierung folgte die *in vivo* Charakterisierung von m41.1. Die Konstruktion und Überprüfung der Virusmutanten für die *in vivo* Experimente wurde in Kapitel 3.4 der vorliegenden Arbeit beschrieben. Das Wildtyp-ähnliche Virus, die m41.1-Knockoutmutante und die dazugehörige Revertante wurden im Labor von Stipan Jonjic durch Branka Popovic und Christina Luig in Maus-Infektionsexperimenten untersucht. Die Ergebnisse dieser Studie wurden

im Januar dieses Jahres veröffentlicht (Handke *et al.* (129)). Fast zeitgleich erschienen Daten zu Maus-Infektionsexperimenten mit einem m41.1-Knockoutvirus aus der Arbeitsgruppe von Edward Mocarski (Crosby *et al.* (153)). Zwei Monate später wurde eine weitere Studie zu diesem Thema aus der Arbeitsgruppe von Christopher Andouniou (Fleming *et al.* (154)) veröffentlicht. In den drei Publikationen wurde u. a. die Virusdissemination des m41.1-Knockoutvirus in der Maus bestimmt. Zusätzlich wurde die BAK-Abhängigkeit des m41.1-vermittelten Effekts *in vivo* untersucht. Um dies zu erreichen, wählten die drei Arbeitsgruppen unterschiedliche Ansätze. Handke *et al.* verwendete ausschließlich BL6-Mäuse (C57BL6; Wildtyp) und BAK-defiziente Mäuse ( $BAKI^{-/-}$ : B6.129- $BAKI^{tm1Thsn}/J$ ) in den Infektionsexperimenten, zumal die BAK-defizienten Mäuse auf dem Genom-Hintergrund der BL6-Mäuse basieren. In Kombination mit den BL6-Mäusen wurden MCMV-Mutanten verwendet, in denen der NK-Zell-aktivierende Ligand im MCMV-Genom (Lokus m157) deletiert worden war (vgl. 3.4). BL6-Mäuse exprimieren im Gegensatz zu Balb/c Mäusen den NK-Zell-Rezeptor Ly49H. Dieser wird durch das Genprodukt von m157 aktiviert und vermittelt die Lyse der infizierten Zelle (88,104,105,127). Die Deletion des m157-Leserahmens im MCMV-Genom stellte sicher, dass die MCMV-resistenten BL6-Mäuse empfänglich für die Infektion mit MCMV waren. Crosby *et al.* und Fleming *et al.* nutzten Balb/c Mäuse für die Untersuchung der Virusdissemination. Nur für die vergleichenden Experimente mit BAK-defizienten Mäusen wurden BL6-Mäuse gewählt. Fleming *et al.* depletierten allerdings in den auf BL6-Genom-Hintergrund-basierenden Mäusen vor der Infektion die NK-Zellen mithilfe von NK-Zell-spezifischen Antikörpern. Crosby *et al.* hingegen verwendeten im Vergleich zu den BAK-defizienten Mäusen unveränderte BL6-Mäuse und im m157-Lokus unveränderte MCMVs.

Crosby *et al.*, Fleming *et al.* und Handke *et al.* untersuchten die Dissemination des m41.1-Knockoutvirus in Wildtyp-Mäusen. Hierzu wurden, unter Beachtung der Infektionsroute von MCMV in der Maus (s. 1.2), zu frühen Zeitpunkten in der Infektion die Virustiter u. a. in der Milz bestimmt, gefolgt von den Virustitern in der Lunge und in der Leber. Zu späten Zeitpunkten in der Infektion wurden die Virustiter in den Speicheldrüsen gemessen. Die Infektion erfolgte stets mit einem Wildtyp-Virus, einem m41.1-Knockoutvirus und einer Revertante. Zu frühen Zeitpunkten konnten keine Unterschiede zwischen den Virustitern in der Milz oder der Lunge gezeigt werden. Allerdings konnten Crosby *et al.* und Fleming *et al.* zeigen, dass bereits fünf Tage nach der Infektion Unterschiede in den Virustitern infizierter Lymphozyten aus peripherem Blut gemessen werden konnten. Hier waren die Virustiter in m41.1-Knockoutvirus-infizierten Lymphozyten 20fach bzw. 50fach reduziert. Übereinstimmend wurde von den drei Arbeitsgruppen beschrieben, dass sich im späteren Infektionsverlauf reduzierte Virustiter des m41.1-Knockoutvirus in der Leber und/ oder der Lunge zeigten. Zu späten Zeitpunkten wurden die Virustiter in den Speicheldrüsen bestimmt. Im Vergleich

zu den Kontroll-Viren, Wildtyp und Revertante, waren hier die Virustiter nach der Infektion mit m41.1-Knockoutvirus am stärksten beeinträchtigt (Crosby *et al.*: ~5-10fach; Fleming *et al.*: ~50fach; Handke *et al.*: ~10-50fach). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Daten von Crosby *et al.*, Fleming *et al.* und Handke *et al.* nur in der Effektstärke leicht variieren. Es konnte jedoch übereinstimmend gezeigt werden, dass m41.1 wichtig für eine optimale Dissemination in der Maus ist.

Unterschiedliche Ergebnisse zeigten sich hingegen in den Untersuchungen zur BAK-Abhängigkeit des m41.1-abhängigen Phänotyps *in vivo*. Es wurden BAK-defiziente Mäuse und BL6-Mäuse mit Wildtyp-Virus und m41.1-Knockoutvirus sowie einer Revertante (bei Fleming *et al.* und Handke *et al.*) infiziert. Die Virustiter in den Speicheldrüsen wurden zu späten Zeitpunkten in der Infektion von BAK-defizienten Mäusen und BL6-Mäusen bestimmt. Crosby *et al.* konnten keine Unterschiede in den Virustitern von m41.1-Knockoutvirus und Wildtyp-Virus in BAK-defizienten Mäusen und BL6-Mäusen feststellen. Hingegen konnten Fleming *et al.* und Handke *et al.* zeigen, dass unter der Bedingung der unterdrückten NK-Zellantwort die Virustiter des m41.1-Knockoutvirus in den Speicheldrüsen von BL6-Mäusen im Vergleich zu den Virustitern der Kontroll-Viren reduziert waren. Dieser Effekt wurde jedoch in BAK-defizienten Mäusen kompensiert. Hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den Virustitern in den Speicheldrüsen nach der Infektion mit m41.1-Knockoutvirus, Wildtyp-Virus und der Revertante. Crosby *et al.* und Handke *et al.* isolierten abschließend BMDMs aus BL6- und BAK-defizienten Mäusen, infizierten sie mit Wildtyp-Virus, m41.1-Knockoutvirus oder der Revertante und betrachteten, ob sich Unterschiede in der Replikation der drei Viren zeigten. Die Untersuchungen ergaben übereinstimmend, dass die Replikation des m41.1-Knockoutvirus in BL6-BMDMs im Gegensatz zur Replikation des Wildtyp-Virus und der Revertante beeinträchtigt war und dass sich in BAK-defizienten BMDMs abermals keine Unterschiede zeigten. Diese Ergebnisse unterstützen, dass der m41.1-mediierte Effekt auch *in vivo* BAK-abhängig ist und dass die m41.1-Proteinexpression für die effiziente Replikation in den vorgeschlagenen Vesikeln der Virusinfektion in der Maus, den Makrophagen (s. a. 1.2), wichtig ist. Fleming *et al.* konnten diese Annahme unterstützen. Sie isolierten u. a. die Leukozyten aus der Milz infizierter Mäuse und konnten zeigen, dass m41.1-Knockoutvirus hier zu geringeren Virustitern replizierte als das Wildtyp-Virus.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse der drei Arbeitsgruppen übereinstimmend, dass m41.1 wichtig ist für die optimale Dissemination des MCMVs *in vivo* und dass der m41.1-vermittelte Effekt auch *in vivo* abhängig vom zellulären Protein BAK ist. Die Unterschiede in den Ergebnissen erklären sich vermutlich durch die unterschiedlichen Virusmutanten und Mausstämme, die in den Experimenten verwendet wurden. Allerdings erscheinen die gezeigten Effektstärken in allen drei Studien sehr gering. Um eine fundierte Bewertung der Effektstärke durchführen zu können, werden zum

Vergleichen die Untersuchungen zu zwei anderen MCMV-Knockoutmutanten angeführt, bei denen ebenfalls ein antiapoptotisches Protein deletiert worden war, m38.5 oder M36.

Die MCMV-Proteine m38.5 und m41.1 hemmen die intrinsische Apoptose. Hierbei blockiert m38.5 die BAX-abhängige und m41.1 die BAK-abhängige mitochondriale Apoptose (89,46-50) (s. a. 1.3). Das Verhalten der m38.5-Deletionsmutante wurde von Manzur *et al.* in Balb/c Mäusen untersucht. Hierfür wurden Balb/c Mäuse mit Wildtyp-Virus, dem m38.5-Deletionsvirus oder der Revertante infiziert. Die Virustiter in den Speicheldrüsen wurden gemessen und es stellte sich heraus, dass sich erst zu späten Zeitpunkten in der Infektion mit m38.5-Deletionsvirus 50-100fach geringere Virustiter im Vergleich zur Infektion mit Wildtyp-Virus oder der Revertante zeigten. In der Milz, der Lunge und der Leber wurden keine signifikanten Unterschiede nach der Infektion mit dem Wildtyp-Virus und dem m38.5-Deletionsvirus bis zum 18ten Tag nach der Infektion gemessen. Ausserdem wurde die Viruslast einer Makrophagen-beinhaltenen Zellpopulation aus infizierten Tieren bestimmt. Leukozyten wurden aus der Milz infizierter Mäuse isoliert. Die Infektion mit dem m38.5-Deletionsvirus führte hier zu geringeren Virustitern im Vergleich zur Infektion mit Wildtyp-Virus (50).

M36 wird als viraler Caspase-8-Inhibitor beschrieben und hemmt folglich die extrinsische Apoptose (43-45) (vgl. a. 1.3). Der Phänotyp eines M36-Deletionsvirus wurde im Vergleich zum Wildtyp-Virus ebenfalls in Balb/c Mäusen untersucht. Die Tiere wurden infiziert und die Virustiter wurden zu verschiedenen Zeitpunkten in der Milz, der Leber, der Lunge und den Speicheldrüsen verglichen. In der Milz und der Leber konnten keine signifikanten Unterschiede gezeigt werden. In der Lunge hingegen wurde sieben Tage nach der Infektion festgestellt, dass das M36-Deletionsvirus kaum detektierbar war, wobei Wildtyp-Virus bis zu Titern von  $10^4$  PFU/ Organ (~1000fach) replizieren konnte. Der stärkste Unterschied wurde bei den Virustitern in den Speicheldrüsen beobachtet. Während das M36-Deletionsvirus nicht mehr nachweisbar war, wurden für die Infektion mit Wildtyp-Virus bis zum Tag 21 nach der Infektion steigende Titer bis ca.  $10^5$  PFU/ Organ (~10000fach) nachgewiesen (45).

Allein der Vergleich der maximalen Unterschiede in den Speicheldrüsen von Wildtyp-Mäusen zu späten Zeitpunkten in der Infektion zeigt, dass die Deletion des viralen Caspase-8-Inhibitors M36 eine stärkere Reduktion der Virustiter (10000fach (45)) zur Folge hatte als die Deletion des BAX-Inhibitors m38.5 (50-100fach (50)) und des BAK-Inhibitors m41.1 (10-50fach (129) bzw. 50-100fach (154)). Das Ergebnis ist nicht unerwartet, da m38.5 und m41.1 alleine nur einen Teil der intrinsischen Apoptose hemmen, M36 hingegen hemmt die komplette extrinsische Apoptose (vgl. 1.3).

Cam führte in ihrer Promotionsarbeit erste Untersuchungen zum Verhalten eines m38.5/m41.1-Doppelknockoutvirus in Zellkultur durch. Sie infizierte BAK-defiziente

MEFs, BAX-defiziente MEFs, BAX- /BAK-doppeldefiziente MEFs und Wildtyp-MEFs mit Knockoutviren, die entweder kein m41.1 oder kein m38.5 exprimierten, oder mit einem m38.5/m41.1-Doppelknockoutvirus. Über die Messung der Zellviabilität der infizierten MEFs konnte sie zeigen, dass die Infektion mit einem m38.5/m41.1-Doppelknockoutvirus in BAK-defizienten MEFs, BAX-defizienten MEFs und Wildtyp-MEFs zur Reduktion der Zellviabilität führte. Nur die BAX- /BAK-doppeldefizienten MEFs waren geschützt vor der Zellviabilitätsminderung, die durch die Infektion verursacht wurde. Nach der Infektion mit dem m41.1-Knockoutvirus hingegen zeigten BAK-defiziente MEFs und BAX- /BAK-doppeldefiziente MEFs ähnliche Viabilitätswerte; nach Infektion mit dem m38.5-Knockoutvirus galt dies analog in BAX-defizienten MEFs und BAX- /BAK-doppeldefizienten MEFs (51). Es ist bekannt, dass m38.5 und m41.1 selektiv die BAX- bzw. BAK-medierte mitochondriale Apoptose *in vitro* hemmen. BAK und BAX sind proapoptotische Mediatoren, die durch zahlreiche Proteine reguliert werden und die intrinsische Apoptose durch die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran medieren (155,156). Es wurde beschrieben, dass BAX und BAK funktionell redundant agieren, jedoch zelltypspezifisch und stimulusspezifisch reguliert werden (157,158) (vgl. auch 1.3). Derzeit laufende Studien im Labor von Edward Mocarski, die in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Wolfram Brune durchgeführt werden, untersuchen den Effekt eines m38.5/m41.1-Doppelknockoutvirus *in vivo*. Es ist zu vermuten, dass ein m38.5/m41.1-Doppelknockoutvirus, das weder die BAX- noch die BAK-vermittelte Apoptose hemmen kann, die virusinduzierte, intrinsische Apoptose ungehemmt auslösen wird und somit in einer starken Reduktion der m38.5/m41.1-Doppelknockoutvirustiter in den Zielorganen, vor allem in den Speicheldrüsen, resultieren sollte.

#### **4.5 Bilden die MCMV-Proteine m38.5 und m41.1 das funktionelle Homolog zum HCMV-Protein vMIA?**

Die Frage nach einem funktionellen Homolog beim MCMV zum HCMV-Protein vMIA (*viral mitochondria-localized inhibitor of apoptosis*) ist interessant, weil *in vivo* Untersuchungen der HCMV-Proteine aufgrund der strikten Spezifität der CMVs nicht möglich sind und somit der Bedarf nach einem geeigneten MCMV-Maus-Modell besteht (s. 1.2). In der HCMV-Infektion wird die intrinsische Apoptose durch nur ein virales Protein, das vMIA, gehemmt (159). Für das Protein vMIA wurde gezeigt, dass es Signalwege moduliert, die entweder abhängig oder unabhängig von den zellulären Proteinen BAX und BAK sind. Hier werden nur die BAX- und BAK-abhängigen Effekte diskutiert. In Bezug auf die antiapoptotische Funktion des Proteins vMIA wurde beschrieben, dass vMIA den virusinduzierten Zelltod hemmt, indem es die BAX- und/oder BAK-abhängige Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran verhindert. Um die volle antiapoptotische Aktivität zu erreichen, wurde zusätzlich eine

Interaktion zwischen vMIA und zellulärem GADD45 beschrieben (160). Ob vMIA ausschließlich die BAX- oder auch die BAK-medierte mitochondriale Apoptose hemmen kann, ist umstritten. Einige Studien stellen heraus, dass vMIA die BAX- und BAK-medierte Apoptose hemmt (47,161). Andere Veröffentlichungen verneinen den Einfluss von vMIA auf die BAK-medierte Apoptose und/ oder klassifizieren vMIA als BAX-spezifischen Inhibitor (46,49,162). Am besten untersucht wurde die Interaktion zwischen vMIA und BAX. Ungehindert wird stimuliertes, cytosolisches BAX zu den Mitochondrien rekrutiert und durchläuft eine Konformationsänderung, so dass es in die äußere Mitochondrienmembran inserieren kann. Anschließend oligomerisiert BAX in hochmolekularen Komplexen, die als porenähnlich postuliert werden (163-165) und die die Freisetzung proapoptotischer Faktoren ermöglichen, was unwiderruflich zur Apoptose der Zelle führt (vgl. 1.3). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass vMIA cytosolisches BAX zu den Mitochondrien rekrutiert und dass vMIA nicht die initiale Aktivierung und Oligomerisierung von BAX verhindert, aber trotzdem vor der BAX-medierten Apoptose schützt (162,166-168). Die detaillierten Mechanismen, wie vMIA die BAX- und ggf. BAK-medierte Apoptose inhibiert, konnten noch nicht gezeigt werden. Unabhängig von der antiapoptotischen Funktion von vMIA wurde beobachtet, dass die Expression von vMIA zu der Zerstörung des mitochondrialen Netzwerks führt. In humanen Fibroblasten wurde eine Zerstörung des mitochondrialen Netzwerks bereits 24 Stunden nach der Infektion beobachtet (168,169), wobei ein voller Replikationszyklus bei HCMV zwischen 48 und 72 Stunden dauert. Die Bedeutung der Zerstörung des mitochondrialen Netzwerks für die CMV-Infektion konnte noch nicht geklärt werden. Dass die Zerstörung des mitochondrialen Netzwerks nicht isoliert von der BAX-abhängigen, antiapoptotischen Funktion von vMIA betrachtet werden kann, zeigten Untersuchungen, in denen die Überexpression von BAX vor der Zerstörung des mitochondrialen Netzwerks schützte (161). BAK und BAX sind auch wichtige Regulatorproteine der Mitochondrien-Morphologie. Es wurde gezeigt, dass in gesunden Zellen die Mitochondrien in einer dynamischen, netzwerkartigen Struktur angeordnet sind, die sich aus stetiger Mitochondrienfusion und -fission ergibt. Die Anwesenheit von BAK und BAX ist nötig, um ein strukturiertes Netzwerk der Mitochondrien aufzubauen. Zudem verläuft die Zerstörung des mitochondrialen Netzwerks in der Apoptose parallel zur Freisetzung proapoptotischer Faktoren (170,171). Wie die Zerstörung des mitochondrialen Netzwerks mit der Apoptose kausal zusammenhängt, konnte jedoch noch nicht geklärt werden.

In der Zelle wird die proapoptotische Aktivität der Proteine BAK und BAX durch Proteine der BCL-2-Proteinfamilie reguliert (s. 1.3). Für vMIA konnte keine Sequenzähnlichkeit zu zellulären Proteinen festgestellt werden, obwohl vMIA wie das zelluläre, antiapoptotische Protein BCL-2 agiert (159). Mithilfe einer Strukturanalyse wurde jedoch die strukturelle Ähnlichkeit zum zellulären, antiapoptotischen Protein

BCL<sub>XL</sub> vorhergesagt (168). Innerhalb der CMVs ist vMIA nur im Genom der CMVs, die Primaten infizieren können, konserviert, nicht aber bei den Nagetier-infizierenden CMVs wie MCMV (172). Im Genom von MCMV und HCMV werden oftmals funktionell identische Proteine an analogen Positionen kodiert, z. B. der virale Caspase-8-Inhibitor M36 (MCMV)/ UL36 (HCMV) (172). Der Leserahmen des MCMV-Proteins m38.5 wurde als Positionshomolog zu vMIA (auch UL37ex1) beschrieben. Auch geringe Sequenzähnlichkeiten zwischen vMIA und m38.5 wurden festgestellt und das Protein m38.5 als partiell funktioneller Gegenpart vorgeschlagen (46-49). Für m38.5 wurde jedoch gezeigt, dass es nur die BAX-medierte Apoptose inhibiert, nicht aber die BAK-medierte Apoptose (46-48). Zusätzlich zeigte sich, dass die Überexpression des Proteins m38.5 in BAK-defizienten MEFs zur Zerstörung des mitochondrialen Netzwerks führt. m38.5 allein zeigt jedoch keinen Effekt in Wildtyp-MEFs oder BAX-defizienten MEFs (47).

Die Entdeckung, dass ein weiteres MCMV-Protein, das m41.1, die BAK-medierte Apoptose hemmt, bestätigt, dass sich bei den Nagetier-infizierenden CMVs ein anderer Lösungsweg zur Inhibition der BAK- und BAX-abhängigen Apoptose entwickelt hat als bei den CMVs der Primaten (89,172). Die Tatsache, dass m38.5 und m41.1 spezifisch die BAX- bzw. BAK-abhängige Apoptose hemmen, wirft die Frage auf, ob beide Proteine ebenfalls selektiv auf die BAX- und BAK-abhängige Modulation der Mitochondrien-Morphologie einwirken können. Bis heute wurden jedoch keine Belege publiziert, dass die Expression des Proteins m41.1 oder die MCMV-Infektion in Wildtyp-Zellen zur Zerstörung des mitochondrialen Netzwerks führt. Zu erwähnen ist noch, dass auch keine funktionellen Homologe beim MCMV für die BAK- und BAX-unabhängigen Effekte von vMIA beschrieben wurden (173-180).

Abschließend wird vermutet, dass ein m38.5/m41.1-Doppelknockoutvirus kein funktionelles Homolog zum vMIA-Deletionsvirus darstellen sollte. Es erscheint jedoch als möglich, dass die BAK- und BAX-abhängigen Prozesse, wie die mitochondriale Apoptose und ggf. auch die Modulation der Mitochondrien-Morphologie, durch die Infektion mit einem m38.5/m41.1-Doppelknockoutvirus in ähnlicher Weise beeinflusst werden könnten wie durch eine Infektion mit einem vMIA-Deletionsvirus. Hinzukommend bietet die Untersuchung der MCMV-Knockoutmutanten, die entweder kein m38.5 und/ oder kein m41.1 exprimieren, in der Kombination mit dem etablierten Knockoutmaus-Modell der BAK- und/ oder BAX-defizienten Mäuse, die einzigartige Gelegenheit, die komplexen BAK- und/ oder BAX-abhängigen Vorgänge im Kontext der Virusinfektion differenziert *in vivo* und *in vitro* studieren zu können.

## 5 Referenzen

1. Modrow S, Falke D, Truyen U. *Molekulare Virologie*. 2nd ed. Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg; 2003.
2. Mocarski ES. *Cytomegaloviruses and their replication*. Fields Virology. Lippincott-Raven, Philadelphia; 1996.
3. Mettenleiter TC, Klupp BG, Granzow H. Herpesvirus assembly: an update. *Virus Res*. 2009 Aug;143(2):222–34.
4. Boeckh M, Geballe AP. Cytomegalovirus: pathogen, paradigm, and puzzle. *J. Clin. Invest*. 2011 May;121(5):1673–80.
5. Campbell AE, Cavanaugh VJ, Slater JS. The salivary glands as a privileged site of cytomegalovirus immune evasion and persistence. *Med. Microbiol. Immunol*. 2008 Jun;197(2):205–13.
6. CDC. *Cytomegalovirus (CMV) Infection*. National Center of Infectious Diseases; 2005.
7. SOGC. *Cytomegalovirus Infection in Pregnancy*. 2010.
8. Noriega V, Redmann V, Gardner T, Tortorella D. Diverse immune evasion strategies by human cytomegalovirus. *Immunologic research* [Internet]. 2012 Mar 28 [cited 2012 Sep 20]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22454101>
9. Johnson DC, Baines JD. Herpesviruses remodel host membranes for virus egress. *Nat. Rev. Microbiol*. 2011 May;9(5):382–94.
10. Vanarsdall AL, Chase MC, Johnson DC. Human cytomegalovirus glycoprotein gO complexes with gH/gL, promoting interference with viral entry into human fibroblasts but not entry into epithelial cells. *J. Virol*. 2011 Nov;85(22):11638–45.
11. Compton T, Feire A. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*; Chapter 16: Early events in human cytomegalovirus infection [Internet]. Arvin AA, Campadelli-Fiume GG, Mocarski EE, Moore PPS, Roizman BB, Whitley RR, et al., editors. Cambridge: Cambridge University Press; 2007 [cited 2012 Sep 20]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21348067>
12. Tandon R, Mocarski ES. Viral and host control of cytomegalovirus maturation. *Trends Microbiol*. 2012 Aug;20(8):392–401.
13. Manley K, Anderson J, Yang F, Szustakowski J, Oakeley EJ, Compton T, et al. Human cytomegalovirus escapes a naturally occurring neutralizing antibody by incorporating it into assembling virions. *Cell Host Microbe*. 2011 Sep 15;10(3):197–209.
14. Theiler RN, Compton T. Distinct glycoprotein O complexes arise in a post-Golgi compartment of cytomegalovirus-infected cells. *J. Virol*. 2002 Mar;76(6):2890–8.
15. Homman-Loudiyi M, Hultenby K, Britt W, Söderberg-Nauclér C. Envelopment of human cytomegalovirus occurs by budding into Golgi-derived vacuole compartments positive for gB, Rab 3, trans-golgi network 46, and mannosidase II. *J. Virol*. 2003 Mar;77(5):3191–203.
16. Novoa RR, Calderita G, Arranz R, Fontana J, Granzow H, Risco C. Virus factories: associations of cell organelles for viral replication and morphogenesis. *Biol. Cell*. 2005 Feb;97(2):147–72.
17. Krmpotic A, Bubic I, Polic B, Lucin P, Jonjic S. Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection. *Microbes Infect*. 2003 Nov;5(13):1263–77.

18. Brune W, Hengel H, Koszinowski UH. A mouse model for cytomegalovirus infection. *Curr Protoc Immunol.* 2001 Aug;Chapter 19:Unit 19.7.
19. Messerle M, Crnkovic I, Hammerschmidt W, Ziegler H, Koszinowski UH. Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1997 Dec 23;94(26):14759–63.
20. Brune W, Messerle M, Koszinowski UH. Forward with BACs: new tools for herpesvirus genomics. *Trends Genet.* 2000 Jun;16(6):254–9.
21. Sharan SK, Thomason LC, Kuznetsov SG, Court DL. Recombineering: a homologous recombination-based method of genetic engineering. *Nat Protoc.* 2009;4(2):206–23.
22. Doublet B, Douard G, Targant H, Meunier D, Madec J-Y, Cloeckaert A. Antibiotic marker modifications of lambda Red and FLP helper plasmids, pKD46 and pCP20, for inactivation of chromosomal genes using PCR products in multidrug-resistant strains. *J. Microbiol. Methods.* 2008 Oct;75(2):359–61.
23. Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000 Jun 6;97(12):6640–5.
24. Lee EC, Yu D, Martinez de Velasco J, Tessarollo L, Swing DA, Court DL, et al. A highly efficient *Escherichia coli*-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA. *Genomics.* 2001 Apr 1;73(1):56–65.
25. Warming S, Costantino N, Court DL, Jenkins NA, Copeland NG. Simple and highly efficient BAC recombineering using galK selection. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(4):e36.
26. Engel P, Angulo A. Viral immunomodulatory proteins: usurping host genes as a survival strategy. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2012;738:256–76.
27. Brune W. Inhibition of programmed cell death by cytomegaloviruses. *Virus Res.* 2011 May;157(2):144–50.
28. Handke W, Krause E, Brune W. Live or let die: manipulation of cellular suicide programs by murine cytomegalovirus. *Med. Microbiol. Immunol.* [Internet]. 2012 Sep 11 [cited 2012 Sep 22]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22965170>
29. Galluzzi L, Aaronson SA, Abrams J, Alnemri ES, Andrews DW, Baehrecke EH, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death Differ.* 2009 Aug;16(8):1093–107.
30. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* 2012 Jan;19(1):107–20.
31. Park HH. Structural features of caspase-activating complexes. *Int J Mol Sci.* 2012;13(4):4807–18.
32. Kantari C, Walczak H. Caspase-8 and bid: caught in the act between death receptors and mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* 2011 Apr;1813(4):558–63.
33. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, et al. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 1998 Mar 16;17(6):1675–87.
34. Hao Z, Mak TW. Type I and type II pathways of Fas-mediated apoptosis are differentially controlled by XIAP. *J Mol Cell Biol.* 2010 Apr;2(2):63–4.
35. Kaufmann T, Strasser A, Jost PJ. Fas death receptor signalling: roles of Bid and XIAP. *Cell Death Differ.* 2012 Jan;19(1):42–50.

36. Llambi F, Moldoveanu T, Tait SWG, Bouchier-Hayes L, Temirov J, McCormick LL, et al. A unified model of mammalian BCL-2 protein family interactions at the mitochondria. *Mol. Cell*. 2011 Nov 18;44(4):517–31.
37. Shamas-Din A, Brahmabhatt H, Leber B, Andrews DW. BH3-only proteins: Orchestrators of apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta*. 2011 Apr;1813(4):508–20.
38. Janssens S, Tinel A. The PIDDosome, DNA-damage-induced apoptosis and beyond. *Cell Death Differ*. 2012 Jan;19(1):13–20.
39. Guerrero AD, Chen M, Wang J. Delineation of the caspase-9 signaling cascade. *Apoptosis*. 2008 Jan;13(1):177–86.
40. Gao Z, Shao Y, Jiang X. Essential roles of the Bcl-2 family of proteins in caspase-2-induced apoptosis. *J. Biol. Chem*. 2005 Nov 18;280(46):38271–5.
41. Bonzon C, Bouchier-Hayes L, Pagliari LJ, Green DR, Newmeyer DD. Caspase-2-induced apoptosis requires bid cleavage: a physiological role for bid in heat shock-induced death. *Mol. Biol. Cell*. 2006 May;17(5):2150–7.
42. Mancini M, Machamer CE, Roy S, Nicholson DW, Thornberry NA, Casciola-Rosen LA, et al. Caspase-2 is localized at the Golgi complex and cleaves golgin-160 during apoptosis. *J. Cell Biol*. 2000 May 1;149(3):603–12.
43. Skaletskaya A, Bartle LM, Chittenden T, McCormick AL, Mocarski ES, Goldmacher VS. A cytomegalovirus-encoded inhibitor of apoptosis that suppresses caspase-8 activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001 Jul 3;98(14):7829–34.
44. Ménard C, Wagner M, Ruzsics Z, Holak K, Brune W, Campbell AE, et al. Role of murine cytomegalovirus US22 gene family members in replication in macrophages. *J. Virol*. 2003 May;77(10):5557–70.
45. Cicin-Sain L, Ruzsics Z, Podlech J, Bubić I, Menard C, Jonjić S, et al. Dominant-negative FADD rescues the in vivo fitness of a cytomegalovirus lacking an antiapoptotic viral gene. *J. Virol*. 2008 Mar;82(5):2056–64.
46. Arnoult D, Skaletskaya A, Estaquier J, Dufour C, Goldmacher VS. The murine cytomegalovirus cell death suppressor m38.5 binds Bax and blocks Bax-mediated mitochondrial outer membrane permeabilization. *Apoptosis*. 2008 Sep;13(9):1100–10.
47. Norris KL, Youle RJ. Cytomegalovirus proteins vMIA and m38.5 link mitochondrial morphogenesis to Bcl-2 family proteins. *J. Virol*. 2008 Jul;82(13):6232–43.
48. Jurak I, Schumacher U, Simic H, Voigt S, Brune W. Murine cytomegalovirus m38.5 protein inhibits Bax-mediated cell death. *J. Virol*. 2008 May;82(10):4812–22.
49. McCormick AL, Meiering CD, Smith GB, Mocarski ES. Mitochondrial cell death suppressors carried by human and murine cytomegalovirus confer resistance to proteasome inhibitor-induced apoptosis. *J. Virol*. 2005 Oct;79(19):12205–17.
50. Manzur M, Fleming P, Huang DCS, Degli-Esposti MA, Andoniou CE. Virally mediated inhibition of Bax in leukocytes promotes dissemination of murine cytomegalovirus. *Cell Death Differ*. 2009 Feb;16(2):312–20.
51. Cam M. Die antiapoptotische Funktion des m41 Locus des murinen Cytomegaliviruses. 2009.
52. Fliss PM, Brune W. Prevention of cellular suicide by cytomegaloviruses. *Viruses*. 2012 Oct;4(10):1928–49.
53. O'Donnell MA, Perez-Jimenez E, Oberst A, Ng A, Massoumi R, Xavier R, et al. Caspase 8 inhibits programmed necrosis by processing CYLD. *Nat. Cell Biol*. 2011 Dec;13(12):1437–42.

54. Mocarski ES, Upton JW, Kaiser WJ. Viral infection and the evolution of caspase 8-regulated apoptotic and necrotic death pathways. *Nat. Rev. Immunol.* 2012 Feb;12(2):79–88.
55. Mack C, Sickmann A, Lembo D, Brune W. Inhibition of proinflammatory and innate immune signaling pathways by a cytomegalovirus RIP1-interacting protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008 Feb 26;105(8):3094–9.
56. Upton JW, Kaiser WJ, Mocarski ES. Virus inhibition of RIP3-dependent necrosis. *Cell Host Microbe.* 2010 Apr 22;7(4):302–13.
57. Brune W, Ménard C, Heesemann J, Koszinowski UH. A ribonucleotide reductase homolog of cytomegalovirus and endothelial cell tropism. *Science.* 2001 Jan 12;291(5502):303–5.
58. Upton JW, Kaiser WJ, Mocarski ES. Cytomegalovirus M45 cell death suppression requires receptor-interacting protein (RIP) homotypic interaction motif (RHIM)-dependent interaction with RIP1. *J. Biol. Chem.* 2008 Jun 20;283(25):16966–70.
59. Brune W, Nevels M, Shenk T. Murine cytomegalovirus m41 open reading frame encodes a Golgi-localized antiapoptotic protein. *J. Virol.* 2003 Nov;77(21):11633–43.
60. Sengupta D, Linstedt AD. Control of organelle size: the Golgi complex. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2011 Nov 10;27:57–77.
61. Wilson C, Venditti R, Rega LR, Colanzi A, D’Angelo G, De Matteis MA. The Golgi apparatus: an organelle with multiple complex functions. *Biochem. J.* 2011 Jan 1;433(1):1–9.
62. De Matteis MA, Luini A. Exiting the Golgi complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2008 Apr;9(4):273–84.
63. Jarvela T, Linstedt AD. Irradiation-induced protein inactivation reveals Golgi enzyme cycling to cell periphery. *J. Cell. Sci.* 2012 Feb 15;125(Pt 4):973–80.
64. Bankaitis VA, Garcia-Mata R, Mousley CJ. Golgi membrane dynamics and lipid metabolism. *Curr. Biol.* 2012 May 22;22(10):R414–424.
65. Mironov AA, Beznoussenko GV. The Kiss-and-Run Model of Intra-Golgi Transport. *Int J Mol Sci.* 2012;13(6):6800–19.
66. Ferri KF, Kroemer G. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat. Cell Biol.* 2001 Nov;3(11):E255–263.
67. Hicks SW, Machamer CE. Golgi structure in stress sensing and apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta.* 2005 Jul 10;1744(3):406–14.
68. Maag RS, Mancini M, Rosen A, Machamer CE. Caspase-resistant Golgin-160 disrupts apoptosis induced by secretory pathway stress and ligation of death receptors. *Mol. Biol. Cell.* 2005 Jun;16(6):3019–27.
69. Jones SJ, Ledgerwood EC, Prins JB, Galbraith J, Johnson DR, Pober JS, et al. TNF recruits TRADD to the plasma membrane but not the trans-Golgi network, the principal subcellular location of TNF-R1. *J. Immunol.* 1999 Jan 15;162(2):1042–8.
70. Gubser C, Bergamaschi D, Hollinshead M, Lu X, van Kuppeveld FJM, Smith GL. A new inhibitor of apoptosis from vaccinia virus and eukaryotes. *PLoS Pathog.* 2007 Feb;3(2):e17.
71. de Mattia F, Gubser C, van Dommelen MMT, Visch H-J, Distelmaier F, Postigo A, et al. Human Golgi antiapoptotic protein modulates intracellular calcium fluxes. *Mol. Biol. Cell.* 2009 Aug;20(16):3638–45.

72. Oliveira SA, Shenk TE. Murine cytomegalovirus M78 protein, a G protein-coupled receptor homologue, is a constituent of the virion and facilitates accumulation of immediate-early viral mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001 Mar 13;98(6):3237–42.
73. Jarvis MA, Jones TR, Drummond DD, Smith PP, Britt WJ, Nelson JA, et al. Phosphorylation of human cytomegalovirus glycoprotein B (gB) at the acidic cluster casein kinase 2 site (Ser900) is required for localization of gB to the trans-Golgi network and efficient virus replication. *J. Virol.* 2004 Jan;78(1):285–93.
74. Britt WJ, Vugler LG. Processing of the gp55-116 envelope glycoprotein complex (gB) of human cytomegalovirus. *J. Virol.* 1989 Jan;63(1):403–10.
75. Sanchez V, Sztul E, Britt WJ. Human cytomegalovirus pp28 (UL99) localizes to a cytoplasmic compartment which overlaps the endoplasmic reticulum-golgi-intermediate compartment. *J. Virol.* 2000 Apr;74(8):3842–51.
76. Shikhagaie M, Mercé-Maldonado E, Isern E, Muntasell A, Albà MM, López-Botet M, et al. The human cytomegalovirus-specific UL1 gene encodes a late-phase glycoprotein incorporated in the virion envelope. *J. Virol.* 2012 Apr;86(8):4091–101.
77. Ziegler H, Thale R, Lucin P, Muranyi W, Flohr T, Hengel H, et al. A mouse cytomegalovirus glycoprotein retains MHC class I complexes in the ERGIC/cis-Golgi compartments. *Immunity.* 1997 Jan;6(1):57–66.
78. Holtappels R, Gillert-Marien D, Thomas D, Podlech J, Deegen P, Herter S, et al. Cytomegalovirus encodes a positive regulator of antigen presentation. *J. Virol.* 2006 Aug;80(15):7613–24.
79. Ashiru O, Bennett NJ, Boyle LH, Thomas M, Trowsdale J, Wills MR. NKG2D ligand MICA is retained in the cis-Golgi apparatus by human cytomegalovirus protein UL142. *J. Virol.* 2009 Dec;83(23):12345–54.
80. Umashankar M, Petrucelli A, Cicchini L, Caposio P, Kreklywich CN, Rak M, et al. A novel human cytomegalovirus locus modulates cell type-specific outcomes of infection. *PLoS Pathog.* 2011 Dec;7(12):e1002444.
81. Brocchieri L, Kledal TN, Karlin S, Mocarski ES. Predicting coding potential from genome sequence: application to betaherpesviruses infecting rats and mice. *J. Virol.* 2005 Jun;79(12):7570–96.
82. Harvey DM, Levine AJ. p53 alteration is a common event in the spontaneous immortalization of primary BALB/c murine embryo fibroblasts. *Genes Dev.* 1991 Dec;5(12B):2375–85.
83. Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, et al. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science.* 2001 Apr 27;292(5517):727–30.
84. Willis SN, Chen L, Dewson G, Wei A, Naik E, Fletcher JI, et al. Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev.* 2005 Jun 1;19(11):1294–305.
85. Angulo A, Ghazal P, Messerle M. The major immediate-early gene ie3 of mouse cytomegalovirus is essential for viral growth. *J. Virol.* 2000 Dec;74(23):11129–36.
86. Wagner M, Jonjic S, Koszinowski UH, Messerle M. Systematic excision of vector sequences from the BAC-cloned herpesvirus genome during virus reconstitution. *J. Virol.* 1999 Aug;73(8):7056–60.
87. Redwood AJ, Messerle M, Harvey NL, Hardy CM, Koszinowski UH, Lawson MA, et al. Use of a murine cytomegalovirus K181-derived bacterial artificial chromosome as a vaccine vector for immunocontraception. *J. Virol.* 2005 Mar;79(5):2998–3008.

88. Bubić I, Wagner M, Krmpotić A, Saulig T, Kim S, Yokoyama WM, et al. Gain of virulence caused by loss of a gene in murine cytomegalovirus. *J. Virol.* 2004 Jul;78(14):7536–44.
89. Cam M, Handke W, Picard-Maureau M, Brune W. Cytomegaloviruses inhibit Bak- and Bax-mediated apoptosis with two separate viral proteins. *Cell Death Differ.* 2010 Apr;17(4):655–65.
90. Grant SG, Jessee J, Bloom FR, Hanahan D. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1990 Jun;87(12):4645–9.
91. Atalay R, Zimmermann A, Wagner M, Borst E, Benz C, Messerle M, et al. Identification and expression of human cytomegalovirus transcription units coding for two distinct Fcγ receptor homologs. *J. Virol.* 2002 Sep;76(17):8596–608.
92. Van de Craen M, Vandenabeele P, Declercq W, Van den Brande I, Van Loo G, Molemans F, et al. Characterization of seven murine caspase family members. *FEBS Lett.* 1997 Feb 10;403(1):61–9.
93. Lembo D, Donalisio M, Hofer A, Cornaglia M, Brune W, Koszinowski U, et al. The ribonucleotide reductase R1 homolog of murine cytomegalovirus is not a functional enzyme subunit but is required for pathogenesis. *J. Virol.* 2004 Apr;78(8):4278–88.
94. Hudson JB, Misra V, Mosmann TR. Cytomegalovirus infectivity: analysis of the phenomenon of centrifugal enhancement of infectivity. *Virology.* 1976 Jul 1;72(1):235–43.
95. LaBarre DD, Lowy RJ. Improvements in methods for calculating virus titer estimates from TCID50 and plaque assays. *J. Virol. Methods.* 2001 Aug;96(2):107–26.
96. Brownie C, Statt J, Bauman P, Buczynski G, Skjolaas K, Lee D, et al. Estimating viral titres in solutions with low viral loads. *Biologicals.* 2011 Jul;39(4):224–30.
97. Misra V, Hudson JB. Minor base sequence differences between the genomes of two strains of murine cytomegalovirus differing in virulence. *Arch. Virol.* 1980;64(1):1–8.
98. Hudson JB, Walker DG, Altamirano M. Analysis in vitro of two biologically distinct strains of murine cytomegalovirus. *Arch. Virol.* 1988;102(3-4):289–95.
99. Boname JM. Characterization of a strain of murine cytomegalovirus which fails to grow in the salivary glands of mice. Dissertation; 1991.
100. Jordan S, Krause J, Prager A, Mitrovic M, Jonjic S, Koszinowski UH, et al. 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 Oct;85(19):10346–53.
101. Fleming P, Davis-Poynter N, Degli-Esposti M, Densley E, Papadimitriou J, Shellam G, et al. The murine cytomegalovirus chemokine homolog, m131/129, is a determinant of viral pathogenicity. *J. Virol.* 1999 Aug;73(8):6800–9.
102. Daley-Bauer LP, Wynn GM, Mocarski ES. Cytomegalovirus impairs antiviral CD8+ T cell immunity by recruiting inflammatory monocytes. *Immunity.* 2012 Jul 27;37(1):122–33.
103. Tischer BK, von Einem J, Kaufer B, Osterrieder N. Two-step red-mediated recombination for versatile high-efficiency markerless DNA manipulation in *Escherichia coli*. *BioTechniques.* 2006 Feb;40(2):191–7.
104. Voigt V, Forbes CA, Tonkin JN, Degli-Esposti MA, Smith HRC, Yokoyama WM, et al. Murine cytomegalovirus m157 mutation and variation leads to immune evasion of natural killer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003 Nov 11;100(23):13483–8.
105. Babić M, Krmpotić A, Jonjić S. All is fair in virus-host interactions: NK cells and cytomegalovirus. *Trends Mol Med.* 2011 Nov;17(11):677–85.

106. Jurak I, Brune W. Induction of apoptosis limits cytomegalovirus cross-species infection. *EMBO J.* 2006 Jun 7;25(11):2634–42.
107. Everett H, Barry M, Lee SF, Sun X, Graham K, Stone J, et al. M11L: a novel mitochondria-localized protein of myxoma virus that blocks apoptosis of infected leukocytes. *J. Exp. Med.* 2000 May 1;191(9):1487–98.
108. Wang G, Barrett JW, Nazarian SH, Everett H, Gao X, Bleackley C, et al. Myxoma virus M11L prevents apoptosis through constitutive interaction with Bak. *J. Virol.* 2004 Jul;78(13):7097–111.
109. Su J, Wang G, Barrett JW, Irvine TS, Gao X, McFadden G. Myxoma virus M11L blocks apoptosis through inhibition of conformational activation of Bax at the mitochondria. *J. Virol.* 2006 Feb;80(3):1140–51.
110. O'Reilly LA, Ekert P, Harvey N, Marsden V, Cullen L, Vaux DL, et al. Caspase-2 is not required for thymocyte or neuronal apoptosis even though cleavage of caspase-2 is dependent on both Apaf-1 and caspase-9. *Cell Death Differ.* 2002 Aug;9(8):832–41.
111. Baliga BC, Read SH, Kumar S. The biochemical mechanism of caspase-2 activation. *Cell Death Differ.* 2004 Nov;11(11):1234–41.
112. Mukhopadhyay P, Rajesh M, Bátkai S, Kashiwaya Y, Haskó G, Liaudet L, et al. Role of superoxide, nitric oxide, and peroxynitrite in doxorubicin-induced cell death in vivo and in vitro. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2009 May;296(5):H1466–1483.
113. Fabbri F, Zoli W, Carloni S, Ulivi P, Arienti C, Briigliadori G, et al. Activity of different anthracycline formulations in hormone-refractory prostate cancer cell lines: role of Golgi apparatus. *J. Cell. Physiol.* 2011 Nov;226(11):3035–42.
114. Panaretakis T, Laane E, Pokrovskaja K, Björklund A-C, Moustakas A, Zhivotovsky B, et al. Doxorubicin requires the sequential activation of caspase-2, protein kinase Cdelta, and c-Jun NH2-terminal kinase to induce apoptosis. *Mol. Biol. Cell.* 2005 Aug;16(8):3821–31.
115. Meggio F, Donella Deana A, Ruzzene M, Brunati AM, Cesaro L, Guerra B, et al. Different susceptibility of protein kinases to staurosporine inhibition. Kinetic studies and molecular bases for the resistance of protein kinase CK2. *Eur. J. Biochem.* 1995 Nov 15;234(1):317–22.
116. Zhang XD, Gillespie SK, Hersey P. Staurosporine induces apoptosis of melanoma by both caspase-dependent and -independent apoptotic pathways. *Mol. Cancer Ther.* 2004 Feb;3(2):187–97.
117. Gromova I, Celis JE. Protein Detection in Gels by Silver Staining: A Procedure Compatible with Mass-Spectrometry. *Cell Biology: A Laboratory Handbook*. 3rd ed. 2006.
118. Winkler C, Denker K, Wortelkamp S, Sickmann A. Silver- and Coomassie-staining protocols: detection limits and compatibility with ESI MS. *Electrophoresis.* 2007 Jun;28(12):2095–9.
119. Johnsson N, Varshavsky A. Split ubiquitin as a sensor of protein interactions in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994 Oct 25;91(22):10340–4.
120. Thaminy S, Miller J, Stagljar I. The split-ubiquitin membrane-based yeast two-hybrid system. *Methods Mol. Biol.* 2004;261:297–312.
121. Stagljar I, Fields S. Analysis of membrane protein interactions using yeast-based technologies. *Trends Biochem. Sci.* 2002 Nov;27(11):559–63.
122. Kim Y-M, Brinkmann MM, Paquet M-E, Ploegh HL. UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes. *Nature.* 2008 Mar 13;452(7184):234–8.
123. Fliss PM, Jowers TP, Brinkmann MM, Holstermann B, Mack C, Dickinson P, et al. Viral mediated redirection of NEMO/IKK $\gamma$  to autophagosomes curtails the inflammatory cascade. *PLoS Pathog.* 2012 Feb;8(2):e1002517.

124. Bouchier-Hayes L. The role of caspase-2 in stress-induced apoptosis. *J. Cell. Mol. Med.* 2010 Jun;14(6A):1212–24.
125. Parmar VM, Schröder M. Sensing endoplasmic reticulum stress. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2012;738:153–68.
126. Cheng EH, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, Lindsten T, et al. BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol. Cell.* 2001 Sep;8(3):705–11.
127. Scalzo AA, Fitzgerald NA, Simmons A, La Vista AB, Shellam GR. *Cmv-1*, a genetic locus that controls murine cytomegalovirus replication in the spleen. *J. Exp. Med.* 1990 May 1;171(5):1469–83.
128. Rawlinson WD, Farrell HE, Barrell BG. Analysis of the complete DNA sequence of murine cytomegalovirus. *J. Virol.* 1996 Dec;70(12):8833–49.
129. Handke W, Luig C, Popovic B, Krmpotic A, Jonjic S, Brune W. Viral inhibition of BAK promotes murine cytomegalovirus dissemination to salivary glands. *J. Virol.* 2013 Jan 9;
130. Utrera R, Collavin L, Lazarević D, Delia D, Schneider C. A novel p53-inducible gene coding for a microtubule-localized protein with G2-phase-specific expression. *EMBO J.* 1998 Sep 1;17(17):5015–25.
131. Monte M, Collavin L, Lazarevic D, Utrera R, Dragani TA, Schneider C. Cloning, chromosome mapping and functional characterization of a human homologue of murine *gtse-1* (B99) gene. *Gene.* 2000 Aug 22;254(1-2):229–36.
132. Liu XS, Li H, Song B, Liu X. Polo-like kinase 1 phosphorylation of G2 and S-phase-expressed 1 protein is essential for p53 inactivation during G2 checkpoint recovery. *EMBO Rep.* 2010 Aug;11(8):626–32.
133. Monte M, Benetti R, Collavin L, Marchionni L, Del Sal G, Schneider C. hGTSE-1 expression stimulates cytoplasmic localization of p53. *J. Biol. Chem.* 2004 Mar 19;279(12):11744–52.
134. Suzuki K, Matsubara H. Recent advances in p53 research and cancer treatment. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011;2011:978312.
135. Yurchenko V, Constant S, Bukrinsky M. Dealing with the family: CD147 interactions with cyclophilins. *Immunology.* 2006 Mar;117(3):301–9.
136. Iacono KT, Brown AL, Greene MI, Saouaf SJ. CD147 immunoglobulin superfamily receptor function and role in pathology. *Exp. Mol. Pathol.* 2007 Dec;83(3):283–95.
137. Sangwung P, Greco TM, Wang Y, Ischiropoulos H, Sessa WC, Iwakiri Y. Proteomic identification of S-nitrosylated Golgi proteins: new insights into endothelial cell regulation by eNOS-derived NO. *PLoS ONE.* 2012;7(2):e31564.
138. Chen Z, Mi L, Xu J, Yu J, Wang X, Jiang J, et al. Function of HAb18G/CD147 in invasion of host cells by severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J. Infect. Dis.* 2005 Mar 1;191(5):755–60.
139. Pushkarsky T, Zybarth G, Dubrovsky L, Yurchenko V, Tang H, Guo H, et al. CD147 facilitates HIV-1 infection by interacting with virus-associated cyclophilin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001 May 22;98(11):6360–5.
140. Brinkmann MM, Spooner E, Hoebe K, Beutler B, Ploegh HL, Kim Y-M. The interaction between the ER membrane protein UNC93B and TLR3, 7, and 9 is crucial for TLR signaling. *J. Cell Biol.* 2007 Apr 23;177(2):265–75.
141. McGettrick AF, O'Neill LAJ. Localisation and trafficking of Toll-like receptors: an important mode of regulation. *Curr. Opin. Immunol.* 2010 Feb;22(1):20–7.

142. Garcia-Cattaneo A, Gobert F-X, Müller M, Toscano F, Flores M, Lescure A, et al. Cleavage of Toll-like receptor 3 by cathepsins B and H is essential for signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2012 Jun 5;109(23):9053–8.
143. Maillard MC, Brookfield FA, Courtney SM, Eustache FM, Gemkow MJ, Handel RK, et al. Exploiting differences in caspase-2 and -3 S<sub>2</sub> subsites for selectivity: structure-based design, solid-phase synthesis and in vitro activity of novel substrate-based caspase-2 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* 2011 Oct 1;19(19):5833–51.
144. Bergeron L, Perez GI, Macdonald G, Shi L, Sun Y, Jurisicova A, et al. Defects in regulation of apoptosis in caspase-2-deficient mice. *Genes Dev.* 1998 May 1;12(9):1304–14.
145. Shalini S, Dorstyn L, Wilson C, Puccini J, Ho L, Kumar S. Impaired antioxidant defence and accumulation of oxidative stress in caspase-2-deficient mice. *Cell Death Differ.* 2012 Aug;19(8):1370–80.
146. Dorstyn L, Puccini J, Wilson CH, Shalini S, Nicola M, Moore S, et al. Caspase-2 deficiency promotes aberrant DNA-damage response and genetic instability. *Cell Death Differ.* 2012 Aug;19(8):1288–98.
147. Shen YH, Utama B, Wang J, Raveendran M, Senthil D, Waldman WJ, et al. Human cytomegalovirus causes endothelial injury through the ataxia telangiectasia mutant and p53 DNA damage signaling pathways. *Circ. Res.* 2004 May 28;94(10):1310–7.
148. Luo MH, Rosenke K, Czornak K, Fortunato EA. Human cytomegalovirus disrupts both ataxia telangiectasia mutated protein (ATM)- and ATM-Rad3-related kinase-mediated DNA damage responses during lytic infection. *J. Virol.* 2007 Feb;81(4):1934–50.
149. Tilton C, Clippinger AJ, Maguire T, Alwine JC. Human cytomegalovirus induces multiple means to combat reactive oxygen species. *J. Virol.* 2011 Dec;85(23):12585–93.
150. Bouchier-Hayes L, Oberst A, McStay GP, Connell S, Tait SWG, Dillon CP, et al. Characterization of cytoplasmic caspase-2 activation by induced proximity. *Mol. Cell.* 2009 Sep 24;35(6):830–40.
151. Manzl C, Krumschnabel G, Bock F, Sohm B, Labi V, Baumgartner F, et al. Caspase-2 activation in the absence of PIDDosome formation. *J. Cell Biol.* 2009 Apr 20;185(2):291–303.
152. Wejda M, Impens F, Takahashi N, Van Damme P, Gevaert K, Vandenabeele P. Degradomics reveals that cleavage specificity profiles of caspase-2 and effector caspases are alike. *J. Biol. Chem.* 2012 Oct 5;287(41):33983–95.
153. Crosby LN, McCormick AL, Mocarski ES. Gene products of the embedded m41/m41.1 locus of murine cytomegalovirus differentially influence replication and pathogenesis. *Virology.* 2013 Jan 4;
154. Fleming P, Kvensakul M, Voigt V, Kile BT, Kluck RM, Huang DCS, et al. MCMV-mediated Inhibition of the Pro-apoptotic Bak Protein Is Required for Optimal In Vivo Replication. *PLoS Pathog.* 2013 Feb;9(2):e1003192.
155. Westphal D, Dewson G, Czabotar PE, Kluck RM. Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochim. Biophys. Acta.* 2011 Apr;1813(4):521–31.
156. Hollville E, Martin SJ. Greasing the path to BAX/BAK activation. *Cell.* 2012 Mar 2;148(5):845–6.
157. Degenhardt K, Sundararajan R, Lindsten T, Thompson C, White E. Bax and Bak independently promote cytochrome C release from mitochondria. *J. Biol. Chem.* 2002 Apr 19;277(16):14127–34.
158. Wang C, Youle RJ. Predominant requirement of Bax for apoptosis in HCT116 cells is determined by Mcl-1's inhibitory effect on Bak. *Oncogene.* 2012 Jun 28;31(26):3177–89.

159. Goldmacher VS, Bartle LM, Skaletskaya A, Dionne CA, Kedersha NL, Vater CA, et al. A cytomegalovirus-encoded mitochondria-localized inhibitor of apoptosis structurally unrelated to Bcl-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999 Oct 26;96(22):12536–41.
160. Smith GB, Mocarski ES. Contribution of GADD45 family members to cell death suppression by cellular Bcl-xL and cytomegalovirus vMIA. *J. Virol.* 2005 Dec;79(23):14923–32.
161. Karbowski M, Norris KL, Cleland MM, Jeong S-Y, Youle RJ. Role of Bax and Bak in mitochondrial morphogenesis. *Nature.* 2006 Oct 12;443(7112):658–62.
162. Arnoult D, Bartle LM, Skaletskaya A, Poncet D, Zamzami N, Park PU, et al. 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 May 25;101(21):7988–93.
163. Epand RF, Martinou J-C, Montessuit S, Epand RM, Yip CM. Direct evidence for membrane pore formation by the apoptotic protein Bax. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002 Nov 15;298(5):744–9.
164. Oh KJ, Singh P, Lee K, Foss K, Lee S, Park M, et al. Conformational changes in BAK, a pore-forming proapoptotic Bcl-2 family member, upon membrane insertion and direct evidence for the existence of BH3-BH3 contact interface in BAK homo-oligomers. *J. Biol. Chem.* 2010 Sep 10;285(37):28924–37.
165. Tatulian SA, Garg P, Nemecek KN, Chen B, Khaled AR. Molecular basis for membrane pore formation by Bax protein carboxyl terminus. *Biochemistry.* 2012 Nov 20;51(46):9406–19.
166. Poncet D, Larochette N, Pauleau A-L, Boya P, Jalil A-A, Cartron P-F, et al. An anti-apoptotic viral protein that recruits Bax to mitochondria. *J. Biol. Chem.* 2004 May 21;279(21):22605–14.
167. Ma J, Edlich F, Bermejo GA, Norris KL, Youle RJ, Tjandra N. Structural mechanism of Bax inhibition by cytomegalovirus protein vMIA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2012 Dec 18;109(51):20901–6.
168. Pauleau A-L, Larochette N, Giordanetto F, Scholz SR, Poncet D, Zamzami N, et al. Structure-function analysis of the interaction between Bax and the cytomegalovirus-encoded protein vMIA. *Oncogene.* 2007 Nov 1;26(50):7067–80.
169. McCormick AL, Smith VL, Chow D, Mocarski ES. Disruption of mitochondrial networks by the human cytomegalovirus UL37 gene product viral mitochondrion-localized inhibitor of apoptosis. *J. Virol.* 2003 Jan;77(1):631–41.
170. Martinou J-C, Youle RJ. Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. *Dev. Cell.* 2011 Jul 19;21(1):92–101.
171. Cleland MM, Norris KL, Karbowski M, Wang C, Suen D-F, Jiao S, et al. Bcl-2 family interaction with the mitochondrial morphogenesis machinery. *Cell Death Differ.* 2011 Feb;18(2):235–47.
172. McCormick AL, Skaletskaya A, Barry PA, Mocarski ES, Goldmacher VS. 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 Nov 25;316(2):221–33.
173. Kaarbø M, Ager-Wick E, Osenbroch PØ, Kilander A, Skinnes R, Müller F, et al. Human cytomegalovirus infection increases mitochondrial biogenesis. *Mitochondrion.* 2011 Nov;11(6):935–45.
174. Poncet D, Pauleau A-L, Szabadkai G, Voza A, Scholz SR, Le Bras M, et al. Cytopathic effects of the cytomegalovirus-encoded apoptosis inhibitory protein vMIA. *J. Cell Biol.* 2006 Sep 25;174(7):985–96.

175. Seo J-Y, Yaneva R, Hinson ER, Cresswell P. Human cytomegalovirus directly induces the antiviral protein viperin to enhance infectivity. *Science*. 2011 May 27;332(6033):1093–7.
176. Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. Viperin turns coat in cytomegalovirus infection. *Dev. Cell*. 2011 Jun 14;20(6):737–8.
177. Sharon-Friling R, Goodhouse J, Colberg-Poley AM, Shenk T. Human cytomegalovirus pUL37x1 induces the release of endoplasmic reticulum calcium stores. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006 Dec 12;103(50):19117–22.
178. Mavinakere MS, Colberg-Poley AM. Dual targeting of the human cytomegalovirus UL37 exon 1 protein during permissive infection. *J. Gen. Virol.* 2004 Feb;85(Pt 2):323–9.
179. Bozidis P, Williamson CD, Colberg-Poley AM. Mitochondrial and secretory human cytomegalovirus UL37 proteins traffic into mitochondrion-associated membranes of human cells. *J. Virol.* 2008 Mar;82(6):2715–26.
180. Williamson CD, Zhang A, Colberg-Poley AM. The human cytomegalovirus protein UL37 exon 1 associates with internal lipid rafts. *J. Virol.* 2011 Mar;85(5):2100–11.

## 6 Anhang

### 6.1 Auszug aus den Ergebnissen der Suchverfahren

#### Auszug aus den Ergebnissen der Massenspektrometrie zur $\alpha$ -HA-Affinitätsaufreinigung

Diese Daten wurden im Labor von Albert Sickmann ermittelt (ISAS, Dortmund; ID der Analyse: ISAS 060 01 02 Banden 16 – 25).

Analyse der Bande 18: GTSE1 ist hervorgehoben.

Protein	Score	Anzahl der identifizierten Peptide	identifizierter Bereich des Proteins in % (Coverage)
Elongation factor 2	1942,56	58	38,58
Endoplasmin	1139,46	31	35,54
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	1103,35	24	26,69
Similar to valosin isoform 1	1024,50	25	28,59
Transferrin receptor protein 1	899,29	23	25,16
Importin subunit beta-1	838,77	23	25,68
DNA replication licensing factor MCM3	808,12	22	28,69
DNA replication licensing factor MCM6	709,02	21	26,19
Cold shock domain-containing protein E1	597,33	19	23,31
MCG18238	571,57	14	15,47
ribosome binding protein 1 isoform a	520,80	14	10,04
Nucleolin	505,94	16	24,89
Heat shock protein HSP 90-alpha	503,31	13	15,83
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2	472,31	12	11,78
Hexokinase-3	456,84	10	13,67
Putative uncharacterized protein	425,72	16	16,65
Keratin complex 1, acidic, gene 10	401,22	9	9,63
Transportin-1	364,92	11	14,72
60 kDa protein	340,65	9	12,26
Isoform 1 of Transcription intermediary factor 1-beta	334,26	9	13,91
Far upstream element-binding protein 2	317,92	9	14,17
Isoform p93 of Disabled homolog 2	314,07	9	13,69
Coatomer subunit beta'	311,57	7	7,96
Putative uncharacterized protein	307,52	8	10,02
Isoform 1 of La-related protein 5	307,11	7	12,42
Glycogen phosphorylase, brain form	303,66	10	12,69
Keratin, type II cytoskeletal 1	300,79	8	4,87
Cullin-5	280,29	8	11,28
Isoform 1 of CysteinyI-tRNA synthetase, cytoplasmic	260,94	9	11,31
Hspa8 protein	259,93	6	11,80
Keratin, type I cytoskeletal 14	245,57	7	7,64
Isoform 2 of Lymphocyte-specific helicase	244,60	8	10,40
Niban-like protein 1	240,77	6	6,81
Integrin beta	226,25	7	10,78
Hexokinase-2	215,40	6	7,52
Aspartyl beta-hydroxylase	204,57	4	9,88
Aconitase 1	183,04	5	6,41
Isoform M2 of Pyruvate kinase isozymes M1/M2	174,51	7	12,81
AMP deaminase 2	171,06	6	6,27

Proto-oncogene vav	170,53	6	6,63
Keratin, type I cytoskeletal 42	167,73	4	7,96
Isoform 3 of Pyridoxal-dependent decarboxylase domain-containing protein 1	158,10	5	8,31
ElaC homolog 2	154,94	5	6,56
Cytoplasmic activation/proliferation-associated protein 1 isoform c	151,01	4	6,50
Putative uncharacterized protein (Fragment)	150,47	4	7,33
71 kDa protein	145,00	5	4,28
Transient receptor potential cation channel subfamily V member 2	144,87	3	4,23
Isoform 1 of Ankyrin repeat and zinc finger domain-containing protein 1	138,86	4	6,42
Putative uncharacterized protein	135,49	3	4,63
FtsJ methyltransferase domain-containing protein 2	130,09	4	4,66
Putative uncharacterized protein	126,92	4	6,86
NMDA receptor-regulated protein 1	124,43	3	3,35
CD166 antigen	114,28	5	8,58
Actin, gamma, cytoplasmic 1	112,40	4	13,56
Annexin A2	111,77	4	12,09
ATP-binding cassette sub-family B member 6, mitochondrial	110,41	3	4,63
Protein PAT1 homolog 1	110,29	2	2,99
Isoform 2 of Intercellular adhesion molecule 1	106,13	4	7,53
Leukosialin	104,20	2	6,84
Putative uncharacterized protein	101,92	3	5,01
Putative uncharacterized protein	98,77	5	9,55
DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 15 isoform 1	95,25	2	3,13
Isoform 1 of SMEK homolog 1	92,39	2	2,80
16 kDa protein	91,63	4	23,70
Isoform 3 of Rho GTPase-activating protein 10	88,88	2	3,13
Isoform 2 of Tetratricopeptide repeat protein 27	88,45	2	2,48
lysosomal membrane glycoprotein 2 isoform 2	88,23	4	8,67
Isoform 2 of Poly(A) polymerase alpha	86,50	2	6,13
<b>G2 and S phase-expressed protein 1</b>	<b>84,19</b>	<b>2</b>	<b>3,24</b>
Non-SMC condensin I complex, subunit H	83,35	2	2,90
Lysosome-associated membrane glycoprotein 1	82,24	2	5,67
Ubiquitin B	80,60	2	32,79
60S ribosomal protein L18	78,80	2	10,11
Isoform 2 of Vacuolar protein sorting-associated protein 53 homolog	75,36	2	3,05
Puromycin-sensitive aminopeptidase	74,61	3	3,26
Argonaute 2 protein (Fragment)	73,77	2	3,22
Isoform 2 of Protein sel-1 homolog 1	72,85	2	3,65
Similar to optic atrophy 1	71,53	2	2,42
Integrin beta-1	71,52	2	2,51
Putative uncharacterized protein	68,68	2	2,84
ATP-dependent RNA helicase DDX1	67,20	2	2,70
Isoform 2 of Sperm antigen with calponin homology and coiled-coil domains 1	67,18	2	2,03
Stress-70 protein, mitochondrial	59,65	2	3,39
Isoform 1 of Probable E3 ubiquitin-protein ligase HECTD3	59,44	2	2,44
Isoform 2 of Heat shock 70 kDa protein 4L	59,06	2	2,08
Amyloid beta A4 precursor protein-binding family B member 1-interacting protein	58,42	2	2,99
Isoform 1 of V-type proton ATPase 116 kDa subunit a isoform 2	56,21	2	2,34
Histone H1.2	54,85	2	10,85

Analyse der Bande 23: Basigin ist hervorgehoben.

Protein	Score	Anzahl der identifizierten Peptide	identifizierter Bereich des Proteins in % (Coverage)
Alpha-enolase	1668,03	52	52,53
Elongation factor 1-alpha 1	1526,93	42	17,10
Proliferation-associated protein 2G4	645,80	22	34,26
Tubulin beta-5 chain	615,66	18	36,26
Elongation factor 1-gamma	480,07	12	22,65
Actin-related protein 3	418,91	13	37,08
Multifunctional protein ADE2	412,25	13	28,71
Isoform 2 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	397,45	9	24,56
Beta-enolase	395,38	8	18,20
Isoform 2 of Lymphocyte-specific protein 1	395,14	7	28,96
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11	394,15	9	21,56
Similar to Protein disulfide isomerase associated 6	378,83	9	26,85
Tubulin alpha-1C chain	363,95	10	27,62
Isoform 1 of Elongation factor Tu, mitochondrial	354,99	9	22,35
Isoform 2 of Rab GDP dissociation inhibitor beta	341,76	10	27,87
Tubulin alpha-4A chain	336,20	8	25,67
Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	335,70	9	18,54
Keratin complex 1, acidic, gene 10	329,45	8	9,63
Brain acid soluble protein 1	312,44	2	12,39
60 kDa protein	308,77	11	12,26
Annexin A7	304,03	8	15,77
Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 2	289,57	8	30,82
Coronin-1A	287,42	11	21,26
Isoform Cytoplasmic of Fumarate hydratase, mitochondrial	284,70	7	19,27
Dynactin subunit 2	280,23	6	16,92
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F	274,41	9	19,67
50 kDa protein	272,63	9	18,36
Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial	254,55	10	18,11
Hsc70-interacting protein	248,97	5	13,21
Proteasome (Prosome, macropain) 26S subunit ATPase 3	241,77	7	20,25
Putative uncharacterized protein	241,33	7	16,21
Hsp90 co-chaperone Cdc37	236,89	6	22,69
Isoform 1 of N-acetylneuraminidase cytidyltransferase	234,64	5	14,58
Keratin, type I cytoskeletal 14	219,41	6	6,40
6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	210,45	5	14,29
Isoform Rpn10B of 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 4	200,55	5	16,36
Mitochondrial-processing peptidase subunit beta	195,00	6	12,27
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	184,34	5	14,25
Sorting nexin-5	181,77	5	13,37
Fructose-bisphosphate aldolase A	178,46	5	15,11
Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog	177,43	3	11,08
71 kDa protein	172,76	6	5,42
Isoform 1 of tRNA-nucleotidyltransferase 1, mitochondrial	170,92	6	15,44
Spliceosome RNA helicase Bat1	157,61	3	7,48
Keratin, type I cytoskeletal 42	153,24	3	6,64
cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit	148,04	3	9,97
Eukaryotic initiation factor 4A-I	143,11	3	8,13
Isoform 2 of DAZ-associated protein 1	131,20	2	7,65
Hspa8 protein	130,09	3	5,74
Ribonuclease inhibitor	127,72	4	9,21
Isoform 3 of ADP-dependent glucokinase	122,45	3	9,09
Isoform 1 of Ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein 50	120,24	4	11,83

CD2 antigen cytoplasmic tail-binding protein 2	117,97	4	12,57
Tumor susceptibility gene 101 protein	113,27	3	8,18
26S protease regulatory subunit 6B	109,06	5	11,24
Actin, gamma, cytoplasmic 1	109,03	3	8,81
THUMP domain-containing protein 1	108,94	3	8,86
Histone-binding protein RBBP4	107,44	3	7,53
Putative uncharacterized protein	106,05	2	5,18
PC4 and SFRS1 interacting protein 1	91,67	2	6,42
Isoform 1 of Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 3	89,33	2	4,88
Alanyl-tRNA synthetase domain-containing protein 1	88,08	2	4,85
Adenylosuccinate synthetase isozyme 2	87,44	2	4,82
Coronin-1C	84,77	2	4,01
DnaJ homolog subfamily A member 2	83,76	2	5,58
Isoform 1 of C-terminal-binding protein 2	83,03	3	6,52
Isoform 1 of FK506-binding protein 8	77,93	2	5,97
Isoform 2 of Src kinase-associated phosphoprotein 2	77,40	2	5,41
Isoform M2 of Pyruvate kinase isozymes M1/M2	68,91	2	3,58
Thyroid receptor-interacting protein 13	66,85	2	5,32
<b>Isoform 2 of Basigin</b>	<b>63,94</b>	<b>2</b>	<b>6,59</b>
Notchless protein homolog 1	57,82	2	4,74
Ubiquitin B	57,63	2	32,79

### Ergebnistabelle des *Yeast-two-Hybrid-Verfahrens*:

GTSE1, Basigin und UNC93B1 sind hervorgehoben.

Klon	Blast-Ergebnis
2	LTV1 homolog
<b>3</b>	<b>G two S phase expressed protein Gtse1</b>
<b>4</b>	<b>G two S phase expressed protein Gtse1</b>
5	Serine/Threonine kinase 10
6	Hypothetical protein LOC100048810; profilin 1
8	8.1: Chromosome 16 8.2: SREBF chaperone (Scap)
<b>9</b>	<b>Basigin (Bsg)</b>
13	Similar to Ac1147 (Loc672857); misc RNA
14	Integral membrane protein 2B
<b>18</b>	<b>Unc93 homolog B1</b>
19	Zinc finger protein 426
20	Structural basis of antigen mimics Loc 10047628/ 100046973/ 10046676
21	21.1: Tropomyosin4 21.2: Rad54 like
22	Fatty acid synthase (Fasn)
24	Selectin, platelet (p-selectin) ligand (Selplg)
25	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 (Enpp1)
28	28.1: Homeodomain interacting kinase 1 (Hipk1)
30	Transferrin receptor (Tfrc)
31	(C-X-C motif) ligand 13 (Cxcl13)
34	Vesicle associated membrane protein, associated protein A (Vapa)
35	Sialophorin (Spn)
36	36.1: IKAROS family zinc finger 1 36.2: x chromosome
40	Zinc finger protein 36, C3H type-like1
43	SMC4 protein (LOC100044651)
44	NIMA (never in mitosis gene a)- related expressed kinase 9 (Nek9)
46	Coiled-coil domain containing 97 (Ccdc97)
47	Scotin
48	cDNA sequence BC010304
49	High mobility group box transcription factor 1 (Hbp1)

50	cDNA sequence BC043098
53	Similar to amylase 2 pancreatic
54	APR3 actin-related protein 3
55	Forkhead box K2 (Foxk2)
56	Interleukin-1 receptor-associated kinase-1 (IRAK1)
59	Histocompatibility 2 (H2-Q6)
64	Catenin alpha 1 (Cadherin associated protein)
65	Eukaryotic translation elongation factor2
66	Hemoglobin (Hbb-b1)
67	Ornithine decarboxylase antizyme (Oaz1)
68	Zink finger protein 746
69	Ferritin light chain 1
70	Hemoglobin (Hbb-b1)
71	71.1: Hypothetical LOC627695 71.2: Zinc finger protein 655; predicted gene EG622116; LOC677268
72	72.1: Forkhead box M1 72.1: Chromosome 12
73	Microtubule-associated pretein 1 light chain 3 beta
75	Leukocyte receptor cluster (LCR) member 8
76	Actin related protein 2/3 complex
77	Lectin, galactose binding, soluble 9
Die Sequenzierung der DNA aus den Klonen 1, 7, 10-12, 15-17, 23, 26, 27, 28.2, 29, 32, 33, 37-39, 41, 42, 45, 51, 52, 57, 58, 60-63 und 74 war nicht auswertbar.	

## 6.2 Abkürzungen

°C	Grad Celsius
μ	Micro
3-AT	3-Amino-1,2,4-Triazol
A	Alanin
AFC	7-Amino-4-Trifluoromethyl-Coumarin
AIDS	erworbenes Immundefizienz Syndrom
APAF-1	<i>apoptotic peptidase activating factor 1</i>
Ap <sup>R</sup>	Ampicillin-Resistenz
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
BAD	<i>Bcl<sub>XL</sub>/Bcl-2-associated death promoter</i>
BAK	<i>B-cell lymphoma-2 antagonist/ killer</i>
BAX	<i>B-cell lymphoma-associated X</i>
BCL-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BCL <sub>XL</sub>	<i>B-cell lymphoma extra large</i>
BID	<i>BH3-interacting domain death agonist</i>
BIM	<i>Bcl-2 interacting mediator</i>
BL6	C57BL6 Wildtyp-Mäuse
BMDM	<i>bone marrow derived macrophage</i>
bp	Basenpaare
ca.	circa
CaPO <sub>4</sub>	Calcium-Phosphat
CD95	<i>cluster of differentiation 95</i>
cLSM	konfokales Laserscan Mikroskop
Cm <sup>R</sup>	Chloramphenicol-Resistenz
CMV	Cytomegalievirus
Co-IP	Koimmunpräzipitation
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOG	2-desoxy-Galaktose
ds	doppelsträngig
DXR	Doxorubicin
E1	<i>Early 1</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERGIC	<i>ER-Golgi intermediate compartment</i>
FADD	<i>Fas-associating protein with death domain</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
g	Gramm
<i>Galk</i>	Galaktokinase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
gB	Glykoprotein B

---

GFP	grün fluoreszierendes Protein/ <i>green fluorescent protein</i>
H	Histidin
HBS	<i>HEPES-buffered saline</i>
HCMV	humanes Cytomaglievirus
hGAAP	humanes, Golgi-lokalisierendes, antiapoptotisches Protein
hpi	<i>hours post infection</i>
HPI	Heinrich-Pette-Institut
IE1	<i>Immediate Early 1</i>
ISAS	Institut für Analytische Wissenschaften
k	Kilo
<i>Kan</i>	Kanamycin-Resistenz
Km <sup>R</sup>	Kanamycin-Resistenz
ko	Knockout
l	Liter
L	Leucin
m	Milli
M11L	Myxoma Virus Protein 11L
max.	maximal
MCL-1	<i>myeloid cell leukemia sequence 1</i>
MCMV	murines Cytomegalievirus
MEFs	<i>mouse embryonic fibroblasts</i>
MHC	Major Histocompatibility Complex
MICA	<i>MHC I related chain A</i>
mind.	mindestens
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MS	Massenspektrometrie
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NOXA	<i>NADPH oxidase activator</i>
o. b.	oben beschrieben
o. g.	oben genannt
ORF	offener Leserahmen/ <i>open reading frame</i>
PAA	Phosphonoessigsäure
PAS	Protein-A-Sepharose
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion/ <i>polymerase chain reaction</i>
PEI	Polyethylenimin
PFU	<i>plaque-forming units</i>
PGKp	Promotor der Phosphoglyceratkinase
PGS	Protein-G-Sepharose
PS	Penicillin Streptomycin
PUMA	<i>p53-upregulated modulator of apoptosis</i>
R	Revertante
RKI	Robert Koch-Institut
RT	Raumtemperatur
SD	<i>synthetic defined</i>

---

SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SK	Schwere Kette
STS	Staurosporin
Syn.	Synonym
TCID <sub>50</sub>	<i>tissue culture infection dose 50</i>
TNFR	<i>tumor necrosis factor receptor</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
TUNEL	<i>terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick ending labeling</i>
u. a.	unter anderem
VDVAD-AFC	Valin Aspartat Valin Alanin Aspartat-AFC
vGAAP	virales, Golgi-lokalisiertes, antiapoptotisches Protein
vMIA	<i>viral mitochondria-localized inhibitor of apoptosis</i>
W	Tryptophan
wt	Wildtyp
Y2H	<i>Yeast-two-Hybrid</i>
z. B.	zum Beispiel
Zeo <sup>R</sup>	Zeocin-Resistenz

### 6.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Übersicht zur intrinsischen und extrinsischen Apoptose.....	8
Abbildung 2: schematische Darstellung des Lokus m41 .....	37
Abbildung 3: Schema und Methoden zum Nachweis der Caspase-2-Aktivierung .....	44
Abbildung 4: Schema zur $\alpha$ -HA-Affinitätsaufreinigung .....	45
Abbildung 5: Prinzip und Verlaufsschema des <i>Y2H</i> -Verfahrens .....	47
Abbildung 6: Expressionskinetik des Proteins m41 im Western Blot.....	49
Abbildung 7: Expressionskinetik der Proteine m41 und m41.1 im Western Blot.....	50
Abbildung 8: Modell und Immunfluoreszenz zur intrazellulären Lokalisation von m41 .....	51
Abbildung 9: Schematische Darstellung und Kontrolle der HATEVm41- Virusmutante .....	54
Abbildung 10: Silbergele der $\alpha$ -HA-Affinitätsaufreinigung.....	55
Abbildung 11: Immunfluoreszenz zur von UNC93B1 und m41 .....	57
Abbildung 12: Schematische Darstellung und Kontrolle des M45-m41- Doppelknockoutvirus .....	58
Abbildung 13: graphische Darstellung der Arbeitshypothese zur Interaktion zwischen den Proteinen m41 und der Caspase-2 .....	60
Abbildung 14: Nachweis von Caspase-2 im Eluat der $\alpha$ -HA-Affinitätsaufreinigung....	61
Abbildung 15: Immunpräzipitation von Caspase-2 und m41 nach Transfektion.....	62
Abbildung 16: Immunpräzipitation von Caspase-2 und m41 nach Infektion.....	63
Abbildung 17: Caspase-2-Aktivierung nach Infektion mit dem Wildtyp-Virus und dem m41-Knockoutvirus.....	65
Abbildung 18: Aktivierung der Caspase-2 und der Caspase-3 nach der Infektion mit den S*-Virusmutanten.....	67
Abbildung 19: Viabilitätsmessung der RAW264.7-Makrophagen, die mit den S <sup>§</sup> - und S*-Virusmutanten infiziert wurden.....	68
Abbildung 20: schematische Darstellung der Veränderungen im Genom der S <sup>§</sup> - und der S*-Virusmutanten mit Restriktionsschema.....	69
Abbildung 21: Kontrolle der S*-Virusmutanten .....	72
Abbildung 22: Immunpräzipitation von m41.1 und BAK nach Transfektion.....	74
Abbildung 23: Untersuchungen zur m41.1-vermittelten Zelltod inhibition in infizierten Fibroblasten und Makrophagen .....	76
Abbildung 24: schematische Darstellung der Veränderungen im Genom der K*- Virusmutanten mit Restriktionsschema .....	79
Abbildung 25: Kontrolle der K*-Virusmutanten I .....	81
Abbildung 26: Kontrolle der K*-Virusmutanten II .....	83

## 6.4 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: verwendete Zelllinien</i> .....	14
<i>Tabelle 2: verwendete Viren</i> .....	14
<i>Tabelle 3: verwendete Bakterien</i> .....	16
<i>Tabelle 4: verwendete Hefe</i> .....	16
<i>Tabelle 5: Zusätze in Hefe-Minimalmedien</i> .....	17
<i>Tabelle 6: verwendete Antibiotika</i> .....	17
<i>Tabelle 7: Primer-Sequenzen</i> .....	17
<i>Tabelle 8: Linker-Sequenzen</i> .....	19
<i>Tabelle 9: verwendete Plasmide</i> .....	20
<i>Tabelle 10: verwendete BACs</i> .....	21
<i>Tabelle 11: verwendete Primärantikörper</i> .....	21
<i>Tabelle 12: verwendete Sekundärantikörper</i> .....	22

## 6.5 Gefahrenstoffe

Gefahrenstoff	Gefahrensymbol	R-Sätze	S-Sätze
2-Mercaptoethanol	T, N	R 22-24-34-51/53	S 26-36/37/39-45-61
Actinomycin D	T+	R 28	S 22-28-36/37-45
Acrylamid	T	R 45-46-20/21-25-36/38-43-48/23/24/25-62	S 53-45-24-36/37
Ammoniumpersulfat	O, Xn	R 8-22-36/37/38-42/43	S 22-24-26-37
Ampicillin	T	R 21/22-36/37/38-46-60-61	S 24-26-36/37/39-45-46-53
Bisacrylamid	Xn	R 22-20/21/22	S 24/25-36/37
<i>CellTiter96 AQueous Solution (MTS)</i>	Xi	R 36/37/38/	
Chloramphenicol	T	R 45-46-22-63	S 53-45
Dimethylsulfoxid	Xi	R 20/22-36/37/38	S 23-26-36/37/39
Dithiothreitol	Xn	R 22-36/38	S 24/25
Doxorubicin	T	R 45-22.1	S 53-45
EDTA	Xi	R 36	S (2)-26
Essigsäure	C	R 10-35	S 1/2-23-26-36/37/39-45
Ethanol	F	R 11	S 2-7-16
Ethidiumbromid	T+	R 20-22-26-36/37/38-40-68	S 1/2-20/21-26-28-36/37-45-63
flüssiger Stickstoff	-	-	S 9-36/37/39-51
Formaldehydlösung	T	R 23/24/25-34-40-43	S 1/2-26-36/37/39-45-51
Glycin	-	-	S 22-24/25
Isopropanol	F, Xi	R 11-36-67	S 7-16-23-24/25/26-51
Kanamycin	T	R 61	S 53/45
Methanol	F, T	R 11-23/24/25-39/23/24/25	S 7-16-36/37-45
Natriumazid	T+, N	R 28-32-50/53	S 28.1-45-60-61
Natriumdodecylsulfat	F, Xn	R 11-21/22-36/37/38	S 26-36/37
Natriumhydroxid	C	R 35	S 1/2-26-37/39-45
Paraformaldehyd	O, Xn	R 20/22-36/37/38-40-43	S 22-26-36/37

Phenol (Roti-Phenol)	T	R 24-/25-34	S 2-28.1-44
Penicillin	Xi	R 42/43	S 36/37/38-45
Protein-A-Sepharose	F	R 10	-
Protein-G-Sepharose	F	R 10	-
Salzsäure 37%	C	R 34-37	S 1/2-26-36/37/39-45
Silbernitrat	C, N, O	R 30-50/53	S 26-45-60-61
Staurosporin	T	R 45/45	S 53/45
Streptomycin	Xi	R 42/43	S 36/37/38
TEMED	C, O	R 11-20/22-34	S (1/2)-16-26-36/37/39-45
<i>TMR red</i>	T	R 49-23/25	-
Tris	Xn	R 36/37/38	-
Triton-X-100	Xn	R 22-41	S 24-26-39
Zeocin	-	R 22	S64

## 6.6 Lebenslauf

von Wiebke Handke; geboren am 19.01.1979 in Quakenbrück

### Ausbildung

1985 - 1989	Grundschule Otterndorf
1989 - 1991	Orientierungsstufe Otterndorf
1991 - 1998	Gymnasium Otterndorf
1998	Abitur
Februar 1999 bis August 1999	freiwillige, soziale Tätigkeit in der Röntgenabteilung der Park-Klinik Weißensee in Berlin
Oktober 1999 bis Juli 2007	Studium zur Diplom-Ingenieurin der Biotechnologie an der TU Berlin Abschlussnote: 1,1 (mit Auszeichnung)
Oktober 2006 bis Juli 2007	Diplomarbeit zum Thema „Aktivierung des Interferon-Systems durch Hantaviren <i>in vitro</i> “ im Institut für Virologie der Charité in Berlin
September 2007 bis April 2008	Wissenschaftliche Mitarbeit in der AG Schlaich am Institut für Pflanzenphysiologie der RWTH Aachen
Mai 2008 bis voraussichtlich Juni 2013	Promotion unter der Leitung von Prof. Dr. W. Brune am Robert Koch- Institut in Berlin und am Heinrich-Pette-Institut in Hamburg zum Thema „Weiterführende Charakterisierung des murinen Cytomegalievirus Lokus m41“; Titel der Dissertation „Modulation der Apoptose durch die Proteine m41 und m41.1 des murinen Cytomegalievirus“

### Poster, Vorträge, Publikationen

Poster	September 2007: Third European Congress of Virology: Handke, W; Krüger, DH; <u>Rang, A</u> : TLR3-dependent activation of the IFN system by the pathogenic Hantaan virus.
	März 2008: 18. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie: Handke, W; Pohl, B; Oelschlegel, R; Krüger, DH; <u>Rang, A</u> : Defective particles can Manipulate results of virus neutralization tests.
	März 2009: 18. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie: Cam, M; Handke, W; Picard-Maureau, M; <u>Brune, W</u> : Cytomegaloviruses inhibit Bak- and Bax-mediated apoptosis with two separate viral proteins.
	März 2013: 23. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie: Cam, M; Handke, W; Picard-Maureau, M; <u>Brune, W</u> : Viral inhibition of BAK promotes murine cytomegalovirus dissemination to salivary glands.
Vorträge	Juni 2007: 7. International Conference on HFRS, HPS and Hantaviruses: Handke W; Heinrich M; Krüger DH; <u>Rang, A</u> : Hantaan virus and Prospect Hill virus activate innate immune responses via different

pathways.

Oktober 2011: Joint Scientific Retreat, Heinrich-Pette-Institut, Hamburg:  
Handke W: Cytomegalovirus inhibition of Caspase-2-mediated macrophage cell death.

Oktober 2012: Joint Scientific Retreat, Heinrich-Pette-Institut, Hamburg:  
Handke W, Luig C, Popović B, Krmpotic A, Jonjić S, Brune W: Viral inhibition of BAK promotes murine cytomegalovirus dissemination to salivary glands.

#### Publikationen

Handke, W; Oelschlegel, R; Franke, R; Krüger, DH; Rang, A: Hantaan virus triggers TLR3-dependent innate immune responses. *J. Immunol.* 2009 Mar 1; 182(5):2849-58

Handke, W; Krüger, DH; Rang, A: Defective particles can lead to underestimated antibody titers in virus neutralization tests. *Intervirology.* 2009;52(6):335-9

Cam, M; Handke, W; Picard-Maureau, M; Brune, W: Cytomegaloviruses inhibit Bak- and Bax-mediated apoptosis with two separate viral proteins. *Cell Death Differ.* 2010 Apr;17(4):655-65

Schumacher U, Handke W, Jurak I, Brune W: Mutations in the M112/M113 coding region facilitate murine cytomegalovirus replication in human cells. *J Virol.* 2010 Aug;84(16):7994-8006.

Handke W, Oelschlegel R, Franke R, Wiedemann L, Krüger DH, Rang A: Generation and characterisation of genetic reassortants between Puumala and Prospect Hill hantavirus in vitro. *J Gen Virol.* 2010 Sep;91:2351-9

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

Handke W, Luig C, Popovic B, Krmpotic A, Jonjic S, Brune W.: Viral Inhibition of BAK Promotes Murine Cytomegalovirus Dissemination to Salivary Glands. *J Virol.* 2013 Mar;87(6):3592-6

## **6.7 Danksagung**

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Wolfram Brune für die Betreuung dieser Arbeit und die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe promovieren zu dürfen.

Herrn Prof. Dr. Hahn danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens sowie Frau Prof. Dr. Oetjen und Herrn Dr. Perbandt für die Bereitschaft meiner mündlichen Prüfungskommission anzugehören.

Ein besonderer Dank gilt meinen Kollegen am RKI und HPI für die hilfreichen Diskussionen und die gute Zusammenarbeit.

## **6.8 Eidesstattliche Versicherung**

Hiermit erkläre ich, Wiebke Handke, geboren am 19.01.1979 in Quakenbrück, 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, April 2013

Wiebke Handke