

Interaktion des Cytomegalovirus mit dem IRE1-abhängigen ER-Stress-Signalweg

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

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

vorgelegt von

Florian Hinte

geboren in Neumünster

Hamburg, 2017

1. Gutachter: Prof. Dr. Wolfram Brune
2. Gutachter: Prof. Dr. Adam Grundhoff

Disputation am 26.01.2018

Diese Dissertation wurde am Heinrich-Pette-Institut, Leibniz Institut für experimentelle Virologie zwischen Januar 2013 bis November 2017 unter der Leitung von Prof. Dr. Wolfram Brune und Dr. Eva Herker durchgeführt.

Drei Dinge sind uns aus dem Paradies geblieben:

Die Sterne der Nacht,

Die Blumen des Tages

und die Augen der Kinder

(Dante Alighieri)

Inhaltsverzeichnis

Publikationen	I
Abkürzungsverzeichnis	I
Zusammenfassung.....	IV
Summary	VI
1 Einleitung	1
1.1 Herpesviren.....	1
1.1.1 Murines Cytomegalovirus (MCMV)	2
1.2 Endoplasmatisches Retikulum (ER) und die <i>Unfolded Protein Response</i> (UPR)	6
1.2.1 Inositol-requiring enzyme 1 (IRE1/ ERN1) Signalweg	8
1.2.2 Die Funktionen des XBP1s und XBP1u während der UPR.....	9
1.2.3 <i>Activating transcription factor 6</i> (ATF6) Signalweg	10
1.3 Modulation der IRE1- und ATF6-Signalwege durch virale Infektionen.....	12
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	13
2 Ergebnisse I	14
2.1 Replikationskinetik des murinen Cytomegalovirus (MCMV) in Abhängigkeit der IRE1-Expression	14
2.2 Einfluss einzelner Komponenten des IRE1-Signalweges auf die MCMV-Replikation	19
2.3 Komplementation der CRISPR/Cas9-IRE1 ko-Zellen mit Wildtyp IRE1 und der Einfluss auf die MCMV-Replikation	23
2.4 Replikationskinetik des MCMV in XBP1/IRE1-Doppelknockout Zellen.....	25
2.5 Komplementation der XBP1 ko-Zellen mit XBP1-Wildtyp, XBP1 _{stop} oder XBP1u und der Einfluss auf die MCMV-Replikation.....	26
2.6 ATF6 α -Knockout und der Einfluss auf die MCMV-Replikation und virale Genexpression	29
2.7 Replikationskinetik des MCMV in ATF6 α /XBP1-Doppelknockout Zellen.....	31
3 Ergebnisse II	33
3.1 Konstruktion von M50-Deletionsmutanten und deren funktionelle Charakterisierung	33
3.2 Konstruktion von M50-Alaninsubstitutionsmutanten und deren funktionelle Charakterisierung.....	36
3.3 Konstruktion von M50-Virusmutanten mit Alaninsubstitutionen und deren funktionelle Charakterisierung.....	40
3.4 Charakterisierung des M50-vermittelten IRE1-Abbaumechanismus	43
4 Diskussion	49
4.1 Identifizierung der M50-Domäne für die IRE1-Degradation	49

4.2	Virusrekonstitution der M50-Mutanten	51
4.3	M50-vermittelter IRE1-Abbaumechanismus	52
4.4	Einfluss des IRE1-Signalweges auf die MCMV Replikation	54
4.4.1	Dosis-abhängige Expression des IRE1	54
4.4.2	Einfluss der einzelnen Komponenten des IRE1-Signalweges	56
4.4.3	XBP1u inhibiert die MCMV-Replikation	57
4.5	Einfluss des ATF6-Signalweges auf die MCMV-Replikation	58
4.6	Schlussfolgerung	61
5	Materialien	62
5.1	Zelllinien	62
5.2	Modifizierte Zelllinien	63
5.3	Zellkulturmedien	64
5.4	Viren	64
5.5	Bakterien und Bakterienkulturmedium	64
5.6	Antibiotika	65
5.7	Plasmide	65
5.8	Oligonukleotide*	67
5.9	Größenstandards	69
5.10	Enzyme	69
5.11	Kit-Systeme	69
5.12	Antikörper	70
5.13	Verbrauchsmaterialien	71
5.14	Chemikalien	71
5.15	Zusammensetzung SDS-PAGE Gele	71
5.16	Puffer und Lösungen	72
5.17	Geräte	73
6	Methoden	75
6.1	Molekularbiologische Methoden	75
6.1.1	RNA-Isolierung aus Zellen	75
6.1.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	75
6.1.3	cDNA-Synthese	75
6.1.4	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	76
6.1.5	Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel	76
6.1.6	Extraktion von DNA-Fragmenten	76

6.1.7	Restriktionsverdau und Ligation	77
6.1.8	Herstellung elektrokompetenter Bakterien	77
6.1.9	Transformation	77
6.1.10	Extraktion von Plasmid-/BAC-DNA („Mini“ bzw. Midi“)	78
6.1.11	Anlegen eines Glycerolstocks	79
6.2	Zellbiologische Methoden.....	79
6.2.1	Passagieren von Zellen.....	79
6.2.2	Einfrieren	79
6.2.3	Auftauen	79
6.2.4	<i>In vitro</i> Transfektion.....	80
6.2.5	<i>In vitro</i> Infektion	80
6.2.6	Herstellung eines Virusstocks	81
6.2.7	Titration zur Bestimmung des Virustiters	81
6.2.8	Durchführung einer Viruswachstumskurve	82
6.2.9	<i>En Passant</i> BAC-Mutagenese.....	82
6.2.10	Herstellung von Retroviren und Transduktion	83
6.2.11	Bestimmung der Antibiotikakonzentration mittels eines <i>KillCurve Assays</i>	84
6.2.12	Herstellung von Knockout-Zellen mittels der CRISPR/Cas9 Methode.....	84
6.2.13	Herstellung einer stabil-exprimierenden Zelllinie	85
6.2.14	Immortalisierung von primären MEF Zellen	85
6.3	Proteinbiochemische Methoden	86
6.3.1	Probennahme	86
6.3.2	BCA-Assay	86
6.3.3	Co-Immunopräzipitation (IP)	86
6.3.4	Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	87
6.3.5	Western Blot	87
6.3.6	Immunnachweis.....	87
7	Literaturverzeichnis.....	89
8	Anhang.....	95
8.1	Gefahrenstoffe.....	95
8.2	Lebenslauf.....	97
8.3	Vorträge	98
8.4	Poster.....	98
8.5	Stipendien	98

Danksagung	99
Erklärung	100

Publikationen

1. Stahl S, Burkhart JM, **Hinte F**, et al. Cytomegalovirus Downregulates IRE1 to Repress the Unfolded Protein Response. Mohr I, ed. *PLoS Pathogens*. 2013;9(8):e1003544. doi:10.1371/journal.ppat.1003544.
2. **Hinte F**, Tirosh B, van Anken E, Brune W, Infection-induced activation of the Unfolded Protein Response relieves XBP1u-mediated repression of viral gene expression and replication – IN PREPARATION

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
ASK	apoptosis signal regulating kinase 1
ATF4	aktivierender Transkriptionsfaktor 4
ATF6	aktivierender Transkriptionsfaktor 6
BiP	Immunoglobulin bindendes Protein
BSA	Rinderserumalbumin
CHOP	C/EBP-homologous protein
CMV	Cytomegalovirus
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure - <i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ds	Doppelstrang
DTT	Dithiothreitol
E	früh - <i>early</i>
E. coli	Escherichia coli
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eIF2 α	eukaryotischen Initiationsfaktor 2 α
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	<i>ER Associated Degradierung</i>

EtOH	Ethanol
FCS	Fötale Kälberserum
g	Erdschwerebeschleunigungs-Konstante
gB	Glykoprotein B
gRNA	Guide RNA
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HCMV	humanes Cytomegalovirus
HFF	humane Vorhaut-Fibroblasten
hpi	Stunden nach Infektion
hpt	Stunden nach Transfektion
HRP	Meerrettichperoxidase
HSV-1	Herpes-Simplex-Virus Typ 1
IE	sehr früh – <i>immediate early</i>
IRE1	Inositol requiring Enzyme 1
JNK	Jun-amino-Terminal kinase
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KSHV	Kaposi-Sarkom-Herpesvirus
L	spät - <i>late</i>
LT	großes T-Antigen
MCMV	murines Cytomegalovirus
min	Minuten
MOI	Multiplicity of Infection
mRNA	Messenger RNA
NCS	Neugeborenes Kälber Serum
nt	Nukleotid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PERK	Proteinkinase R ähnliche ER-Kinase

RIPA	Radioimmunoprecipitation assay buffer
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris/Acetate/EDTA-Puffer
TCID	tissue culture infection dose
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tg	Thapsigargin
Tm	Hybridisierungstemperatur
Tun	Tunicamycin
TRAF2	TNF receptor-associated factor 2
UPR	<i>Unfolded Protein Response</i>
WB	Western Blot
Wt	Wildtyp
XBP-1	X-box binding protein 1

Zusammenfassung

Viele Viren, darunter das murine Cytomegalovirus, nutzen während einer Infektion die zelluläre Translations-Maschinerie aus, um große Menge an viralen Proteinen zu synthetisieren. Hierdurch kommt es zu einer Überlastung der Proteinfaltungsmaschinerie und einer Akkumulation von ungefalteten Proteinen im Endoplasmatischen Retikulum (ER). Dies führt zu einer ER-Stress-Reaktion der Wirtszelle. Zur Wiederherstellung der ER-Homöostase werden drei verschiedene Signalwege aktiviert, die als *Unfolded Protein Response* (UPR) zusammengefasst werden. Der IRE1-(*Inositol requiring enzyme 1*)-Signalweg ist evolutionär bedingt der konservierteste. Eine Aktivierung von IRE1 initiiert das Spleißen der zytosolischen *X-Box binding Protein 1* (*Xbp1*)-mRNA, was zur Translation des Transkriptionsfaktors XBP1s führt. XBP1s startet die Transkription von Proteindegradierungsfaktoren. Unter chronischen Stress Bedingungen kann IRE1 das Adapterprotein TRAF2 rekrutieren und die IRE1-abhängigen Apoptose über den ASK1-JNK-Signalweg aktivieren. Aus diesem Grund kann es für das MCMV vorteilhaft sein die UPR zu modulieren, um eine effiziente Virusreplikation zu gewährleisten und negative Auswirkungen zu blockieren. Die genauen Mechanismen oder welche Virusproteine in der Modulation der UPR eine Rolle spielen ist jedoch weitgehend unbekannt.

Zu Beginn der Arbeit konnten bereits publizierte Daten aus unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass MCMV den IRE1-XBP1-Signalweg zu frühen Infektionsphasen aktiviert. Die Gründe für diese kurzzeitige Aktivierung des Signalweges und die Auswirkungen auf die MCMV-Replikation sollte im ersten Teil der Arbeit näher untersucht werden. Eine genetische Entfernung von IRE1 aus Mausfibroblasten zeigte eine stark reduzierte Replikation und eine verminderte virale Genexpression. Komplementation der IRE1 Knockout (= ko)-Zellen resultierte in einer vollständigen Wiederherstellung der viralen Replikation. Der Knockout anderer Komponenten des IRE1-Signalweges, XBP1 oder TRAF2, hatten keinen Einfluss. IRE1 ko- und XBP1 ko-Zellen unterscheiden sich in zweierlei Hinsicht: die Anreicherung des ungespleißten XBP1-Proteins (XBP1u) in IRE1 ko- und das Fehlen einer XBP1-Expression in XBP1 ko-Zellen. Um den Einfluss der erhöhten XBP1u Expression auf die MCMV-Replikation zu analysieren wurden XBP1-defiziente Zellen mit einer „unspleißbaren“ *Xbp1*-mRNA komplementiert. Diese Überexpression von XBP1u führte zu einer stark verminderten Replikation. Außerdem wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass der Knockout des ATF6 α keine

Auswirkung auf die virale Replikation und Genexpression hatte. Ein ATF6 α /XBP1-Doppleknockout führte jedoch zu einem ähnlichen inhibierenden Effekt auf die MCMV-Replikation wie die Infektion der IRE1 ko-Zellen. Zusammenfassend konnten die Daten das XBP1u-Protein als Repressor der viralen MCMV-Replikation identifizieren. Somit konnte erstmals gezeigt werden, dass das MCMV die kurzzeitige Aktivierung des IRE1-XBP1-Signalwegs initiiert um seine eigene virale Replikation zu begünstigen und die negativen Folgen einer XBP1u-Anreicherung zu unterdrücken.

Das MCMV-Protein M50, Interaktionspartner von M53 und essentielle Komponente im Kernausschleusungskomplex, interagiert mit dem UPR-Sensor IRE1 zu späten Zeitpunkten der Replikation. Diese Interaktion führt zum Abbau des IRE1-Proteins und zur Inhibierung des *Xbp1*-mRNA Spleißens. Aufbauend auf den publizierten Daten unserer Arbeitsgruppe sollte im zweiten Teil dieser Arbeit eine minimale M50-Domäne identifiziert werden, welche für die IRE1-Interaktion und -Degradierung verantwortlich ist. Das Ziel war eine funktionelle Trennung der zwei M50-Funktionen: IRE1-Interaktion/-Degradierung und M53-Interaktion. Darüber hinaus sollte der M50-vermittelte IRE1-Abbaumechanismus aufgeklärt werden. Mit verschiedenen generierten M50-Mutanten konnte eine 5-Aminosäure kleine Region im M50 identifiziert werden, der für den IRE1-Abbau verantwortlich ist. Diese Mutation hatte keinen Einfluss auf die M50-IRE1-Interaktion. Rekonstitution einer M50-Virusmutante mit dem identifizierten Bereich war jedoch nicht möglich. Bestätigend hierfür konnte nur eine extrem schwache M53-Interaktion der M50-Mutante in Transfektion nachgewiesen werden. Die M50-M53-Interaktion ist für die Virusreplikation essentiell. Dementsprechend konnte keine weitere Charakterisierung und Auswirkung einer fehlenden IRE1-Degradierung auf die MCMV-Replikation erfolgen. Der M50-vermittelte IRE1-Abbaumechanismus wurde erfolgreich aufgeklärt und als proteasomal-abhängiger Mechanismus identifiziert. Eine Applikation verschiedener proteasomaler Inhibitoren wie MG132 konnte die IRE1-Expression in Transfektions- und Infektionsexperimenten wiederherstellen. Außerdem konnten Co-IP-Experimente zeigen, dass das IRE1-Protein durch die M50-Interaktion mit Ubiquitin markiert wird. Zusammenfassend zeigen die Daten, dass eine Trennung der zwei M50-Funktionen, auch nach Identifizierung einer minimalen Mutation im M50-Protein, nicht möglich war. Außerdem wird der IRE1-Abbau durch die Markierung des IRE1 mit Ubiquitin und anschließende proteasomale Degradierung durch das virale Protein M50 vermittelt.

Summary

During viral infection, a massive demand for viral glycoproteins can overwhelm the capacity of the protein folding and quality control machinery, leading to an accumulation of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum (ER). To restore ER homeostasis, cells initiate the unfolded protein response (UPR) by activating three ER-to-nucleus signaling pathways, of which the inositol-requiring enzyme 1 (IRE1)-dependent pathway is the evolutionary most conserved. Once activated, IRE1 splices the X-box binding protein 1 (XBP1) mRNA, leading to translation of the transcription factor XBP1s. In addition, IRE1 can recruit TRAF2 to activate JNK. Cytomegaloviruses, as other viral pathogens, modulate the UPR to their own advantage. However, the molecular mechanisms and the viral proteins responsible for UPR modulation remain poorly defined.

Previous studies of our group have shown that murine cytomegalovirus (MCMV) briefly activates the IRE1-XBP1 signaling pathway immediately after infection. Therefore, a detailed investigation of the impact of the IRE1-dependent signaling on murine cytomegalovirus (MCMV) infection and the answer why MCMV activates the IRE1-XBP1 pathway was the first part of this work. Genetic inactivation of IRE1 in murine embryonic fibroblasts resulted in reduced expression of viral proteins and a strong inhibition of viral replication, suggesting that IRE1 signaling is important for the viral life cycle. Re-introduction of IRE1 using a doxycycline-inducible system restored viral replication in a dose-dependent manner up to wildtype levels. By contrast, genetic ablation of XBP1 or TRAF2 had only minor effects on viral productivity. XBP1 and IRE1 knockout cells differ in that XBP1 ko cells express neither the spliced nor the unspliced XBP1 protein whereas IRE1 ko cells express only the unspliced XBP1 (XBP1u). To test whether XBP1u represses MCMV replication, expression of an “unspliceable” *Xbp1*-mRNA in XBP1 KO cells reduced MCMV replication massively. Moreover, this work shows that the knockout of ATF6 had no effect on viral replication but a double knockout of ATF6 and XBP1 did which further suggests an involvement of XBP1u as a potent repressor of MCMV replication. This data shows for the first time that MCMV activates the IRE1-XBP1 pathway to benefit its own replication and to avoid negative consequences by the translation of the XBP1u protein

Summary

Previous studies of our group have shown that the MCMV nuclear egress protein M50 interacts and downregulates the conserved UPR sensor IRE1 during late stages of infection. The precise domain for the reducing function and the mechanism of how M50 reduces IRE1 protein level is not yet known. The second part of this work was to find a minimal domain in the M50 protein which is responsible for IRE1 interaction and downregulation. The goal was to separate the two functions of the M50 protein: 1. IRE1 interaction/downregulation and M53 interaction, which is an essential part in the nuclear egress of viral capsids during MCMV replication. Moreover, the M50-dependent mechanism of IRE1 protein degradation remains to be identified. It was possible to define a small 5 amino acids region in the M50 conserved domain to be responsible for the downregulation of IRE1. Mutation of these 5 amino acids had no influence on the IRE1-M50 interaction. Moreover, introduction of this mutation into the BAC-derived M50 gene using *En passant* mutagenesis resulted in no virus reconstitution. In addition, Co-IP experiments could show that the plasmid-derived M50 mutant interacted very poorly with the viral protein M53. The interaction between M50 and M53 is essential to form the nuclear egress complex during MCMV replication and therefore a crucial step to produce new virus progenitors. Furthermore, it was shown that the reduction of IRE1 protein levels by M50 is dependent on the proteasomal pathway. Treatment of IRE1/M50 co-transfected or MCMV infected cells with various proteasomal inhibitors like MG132 or Lactacystein could restore IRE1 expression in a dose and time dependent manner. The mechanism of IRE1 downregulation is not only dependent on the proteasome. It could also be demonstrated that IRE1 is modified by ubiquitin. In summary, this data suggest that the two functions of M50 cannot be separated from each other. Moreover, it was shown for the first time that the M50 dependent IRE1 downregulation is mediated by IRE1 ubiquitination and proteasomal degradation. Still, there are some open questions which need to be answered by follow up experiments to complete the model of IRE1 downregulation by the viral protein M50.

1 Einleitung

1.1 Herpesviren

Die Familie der *Herpesviridae* gehört, bezüglich ihres Genom und Morphologie, zu den komplexesten Viren überhaupt. Die Bezeichnung „Herpes“ leitet sich von dem altgriechischen Wort *herpein* (= kriechen) ab, welches Bezug auf die latente und wiederkehrende lytische Infektion der Virusfamilie und die kriechende Ausbreitung der Hautläsionen der Herpes-Simplex Viren (= HSV) nimmt. Sie sind ubiquitär vertreten und können in nahezu jeder Wirbeltier-Spezies, darunter Säugetiere, Reptilien, Vögel und sogar Fische, nachgewiesen werden. Klassifiziert werden die Herpesviren in 3 Subfamilien, die Alpha-, Beta- und Gammaherpesviren (McGeoch et al., 2006). Die Einteilung in die drei Subfamilien beruht auf deren verschiedenen Eigenschaften hinsichtlich Pathogenität, Zelltropismus und Replikationszyklus (Fields et al., 2007; Mocarski, 1996; Mocarski et al., 2007). α -Herpesviren zeigen ein variables Wirtsspektrum und zeichnen sich durch einen relativ kurzen Replikationszyklus (~ 24 h) *in vitro* aus. Während einer Latenzphase *in vivo* persistieren sie in neuronalen Zellen bzw. sensorischen Ganglien. Bekannteste Vertreter dieser Gruppe sind das HSV-1 und -2 und das Varicella-Zoster-Virus. β -Herpesviren besitzen einen langsamen Replikationszyklus (~ 24 h beim Murinen Cytomegalovirus (- MCMV) und ~ 48 h beim Humanen Cytomegalovirus (- HCMV)) und hoch ausgeprägte Speziespezifität, d.h. sie replizieren nur in Zellen der eigenen oder nahe verwandten Art. Beispielsweise ist HCMV in der Lage Menschen und Mensch-ähnliche Primaten zu infizieren und produktiv zu replizieren, jedoch nicht in der Maus. Die Etablierung einer Latenz kann in variablen Zelltypen eintreten. Vertreter dieser Subfamilie sind das Humane Herpesvirus Typ 5 (HHV-5 oder HCMV) im Menschen und das MCMV in der Maus. Nach erfolgreicher Primärinfektion, welche meist asymptomatisch ist, persistiert HCMV bzw. MCMV lebenslang im Wirt. Die Reaktivierung durch verschiedene Stimuli ist jedoch jederzeit möglich. γ -Herpesviren verfügen ebenfalls über ein limitiertes Wirtsspektrum, haben aber unterschiedlich lange Replikationsphasen. Bekannte Vertreter sind das Humane Herpesvirus Typ 8 (HHV-8 oder KSHV) oder das Epstein-Barr-Virus (EBV) und das murine Gammaherpesvirus 68 (MHV68). Nach Erstinfektion etablieren diese Viren sehr schnell eine latente Infektion in B- oder T-Lymphozyten. Während der latenten Phase, liegt das Virusgenom als episomaler Vektor im

Einleitung

Nukleus vor und wird durch die Wirtszellteilung repliziert (Fields et al., 2007; Mocarski, 1996; Mocarski et al., 2007).

1.1.1 Murines Cytomegalovirus (MCMV)

1.1.1.1 Allgemeine Struktur

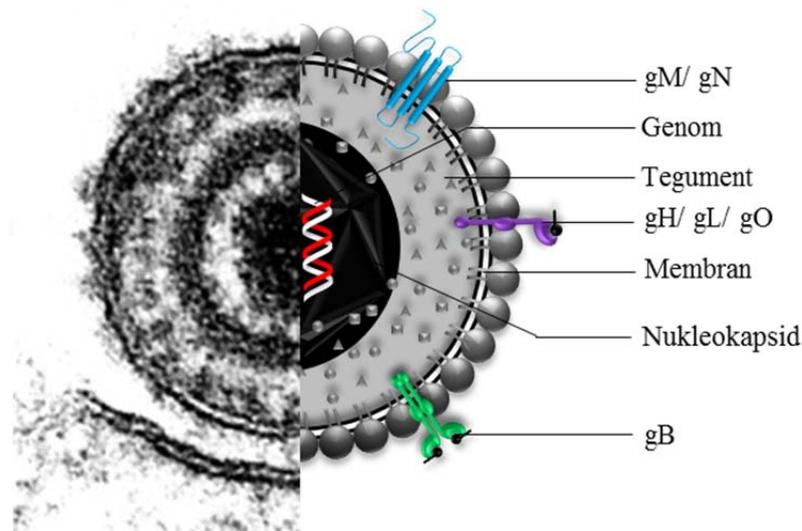


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Cytomegalovirus. Das doppelsträngige DNA-Genom (dsDNA) befindet sich in dem ikosaedrischen Nukleokapsid, welches vom inneren und äußeren Tegument umgeben ist. Dieses ist wiederum umgeben von einer Lipiddoppelmembran, in der Glykoproteine eingelagert sind. Diese fungieren als Rezeptoren für die Fusion oder Endozytose des Virus mit der Wirtszelle. EM Aufnahme eines Cytomegalovirus modifiziert nach http://www.rki.de/DE/Content/Kommissionen/AK_Blut/Stellungnahmen/download/stHCMV.pdf?blob=publicationFile und nach (Tomtishen III, 2012)

Das murine Cytomegalovirus (- MCMV), auch Murides Herpesvirus 1 bezeichnet, gehört zur Subfamilie der β -Herpesviren. Der Name leitet sich von der Eigenschaft ab, eine Vergrößerung der infizierten Zelle zu induzieren (= Cytomegalie). Der strukturelle Aufbau des Virus lässt sich mit den anderen Verwandten der Herpesviridaefamilie vergleichen und ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt: Der mittlere Durchmesser eines Virions beträgt in etwa 150-200 nm (Flint, 2009; Ryan et al., 2004). Das Viruspartikel besteht aus einer sphärischen Hülle in Form einer Lipiddoppelmembran, welche sich von intrazellulären Vesikeln, gebildet durch den Golgi, ableitet. In der Membran sind verschiedene Glykoproteine eingelagert, die bei der Rezeptorerkennung und Fusion mit der Wirtszelle von Bedeutung sind (Wang, 2005, 2003). Zwischen dem Nukleokapsid und Virusmembran befindet sich das Tegument, welches in das äußere und innere Tegument unterteilt wird. Es enthält eine Vielzahl an viralen und zellulären Proteinen, welche die virale DNA-Replikation fördern und das Wirtsimmunsystem beeinflussen können. Das Nukleokapsid besteht aus 162 Kapsomeren, besitzt eine

ikosaedrische Form und ist in etwa 100-110 nm im Durchmesser. Es umschließt das lineare doppelsträngige DNA-Genom (dsDNA). Das virale Genom hat eine ungefähre Größe von 235 kb und kodiert mehr als 160-200 Gene (Crough and Khanna, 2009).

1.1.1.2 Replikationszyklus

Der Replikationszyklus bei Herpesviren bzw. der Cytomegaloviren kann in zwei Phasen unterschieden werden: der latenten und lytischen Phase. Bei der charakteristischen lebenslangen latenten Infektion persistiert das Virusgenom als zirkuläres Episom in Vorläuferzellen des hämatopoetischen Systems. Nur wenige virale Gene werden während der latenten Phase exprimiert. Durch sekundär Erkrankungen, Suppression des Immunsystems oder andere Faktoren, kann das Virus in die lytische Phase eintreten (Tarrant-Elorza et al., 2014). Der lytische Replikationszyklus ist die produktive Phase der Infektion und führt meist zu einer Lyse der Wirtszelle. Von Infektion bis zur Virusknospung, was auch als *budding* bezeichnet wird, dauert es bei MCMV ca. 24 h und bei HCMV ca. 48 h. Bei der Virusinfektion kommt es zu einer Interaktion zwischen den viralen Glykoproteinen, wie gL, gH und gB, und einem zellulären Rezeptor z.B. dem *platelet-derived growth factor α* (PDGF α)-Rezeptor (Crough and Khanna, 2009). Nach Fusion der viralen Doppel- mit der Zellmembran werden die Tegumentproteine und das Nukleokapsid ins Zytoplasma freigesetzt. Das Kapsid wird über die Mikrotubuli zum Nukleus transportiert (Ogawa-Goto et al., 2003). Dort angekommen, wird die doppelsträngige-virale DNA durch eine Kernpore in den Nukleus freigesetzt. Charakteristisch für die Herpesviren bzw. der Cytomegaloviren ist die typische kaskadenartige Genexpression. Sie lässt sich anhand des Protein-Expressionsmodells leicht verfolgen. Die viralen Gene werden, hinsichtlich der zeitlichen Expression, in *immediate early* (IE), *early* (E) und *late* (L) eingeordnet. Sofort nach Infektion werden die sehr frühen Gene (= IE-Gene) exprimiert. Die mRNA wird von der zellulären Maschinerie im Zytoplasma translatiert (Mocarski et al., 2007; Tomtishen III, 2012). Diese und die Tegumentproteine wirken als Modulatoren der zellulären Immunantwort und stimulieren gleichzeitig die Transkription der frühen Gene (= E-Gene). Diese kodieren hauptsächlich für Proteine der viralen DNA-Replikation, die nach dem Rolling-Circle-Mechanismus abläuft. Nach der DNA-Replikation wird die Transkription und Translation der späten Gene (= *Late*-Gene) initiiert. Diese kodieren hauptsächlich für Strukturproteine und Proteine, die für den Export der Kapside aus dem Nukleus verantwortlich sind. Glyko- und Transmembranproteine werden nach Translation im ER posttranslational modifiziert. Von

dort aus werden die Proteine in einen Komplex (*Assembly Compartment* (- AC) bezeichnet) transportiert, der aus modifizierten und umstrukturierten Teilen des Golgi-Netzwerks besteht (Alwine, 2012; Britt, 2007; Das and Pellett, 2011; Tandon and Mocarski, 2008, 2012). Die vollständig-replizierte virale DNA wird im Nukleus in neu-entstandene Kapside verpackt. Durch die enorme Größe der Kapside (100-110 nm), wird dieses aktiv, mit Hilfe des Kernexportkomplexes (*Nuclear egress complex; NEC*), durch die Kernmembran transportiert. Die *Late*-Proteine UL50 und UL53 in HCMV bzw. M50 und M53 in MCMV werden hierfür an die innere Kernmembran rekrutiert. Sie bilden zusammen mit weiteren viralen und zellulären Proteinen, wie Proteinkinase C, den NEC (Krech, 1973; Milbradt et al., 2007; Muranyi et al., 2002). Das Resultat ist eine Permeabilisierung der Kernlamina und eine primäre Umhüllung der Kapside, wodurch der Transport durch die Kernmembran ins Zytoplasma erst möglich ist. Anschließend werden die Kapside über das Mikrotubulinetzwerk zum *Assembly Compartment* weiter transportiert (Ogawa-Goto et al., 2003; Tandon and Mocarski, 2012). Die Tegumentproteine werden an das Kapsid angelagert und mit einer sekundären bzw. finalen Doppelmembran, in der die synthetisierten Glykoproteine integriert sind, umhüllt (Homman-Loudiyi et al., 2003). Anschließend wird das Virion an die Zellmembran transportiert und es kommt zur Virusknospung (Crough and Khanna, 2009).

1.1.1.3 Pathogenese

Infektionen mit HCMV sind sehr weit verbreitet und zeigen eine variable Seroprävalenz, die in den USA, Australien und Europa zwischen 36-77 % liegt. In Entwicklungsländern, speziell in der subsaharischen Region liegt die Durchseuchungsrate bei nahezu 100% (Krech, 1973). Allgemein verhält sich das Cytomegalovirus als ein opportunistischer Krankheitserreger, der gesunden Menschen wenig anhaben kann, bei immunsupprimierten Patienten jedoch bisweilen lebensbedrohliche Krankheiten auslöst. Eine Primärinfektion mit HCMV, erfolgt meist durch Körperflüssigkeiten, wie beispielsweise Blut, Speichel, Urin oder Genitalsekret. Weitere Übertragungsmöglichkeiten sind kongenital in der Gebärmutter oder postnatal über die Muttermilch (Crough and Khanna, 2009). Die Inkubationszeit bis zum Auftreten von Symptomen liegt bei ungefähr zwei bis sechs Wochen. In immunkompetenten Personen ist die Infektion meist inapparent, wobei es, wie bei allen Gruppen der Herpesviren, zu einer lebenslangen Latenz kommt, welche sich ausschließlich durch die Expression der Latenz-Gene auszeichnet (Mocarski, 1996; Mocarski et al., 2007). CD34-positive hämatopoetische Progenitorzellen oder auch CD13-/ CD14-positive Monozyten werden als Reservoir für

Einleitung

latentes HCMV diskutiert (Movassagh et al., 1996; Zhuravskaya et al., 1997). In immunsupprimierten Personen (HIV-Infizierte, Transplantationspatienten, oder bei denen die T-Zell-vermittelte Immunantwort geschwächt oder medikamentös unterdrückt ist), kann das Virus schwere Erkrankungen auslösen, wie beispielsweise Enzephalitiden, Retinitiden oder Lungenentzündungen (Steininger, 2007). Insbesondere stellt eine Infektion oder Reaktivierung von HCMV während der Schwangerschaft eine große Gefahr für den Fötus dar. Hierdurch kann eine kongenitale Erkrankung des Neugeborenen auftreten. Außerdem ist HCMV ein Teil des sogenannten *STORCH*-Komplex (**S**yphilis, **T**oxoplasmose, **A**ndere (= **O**ther z.B. HBV, HCV, HIV), **R**öteln, **C**ytomegalovirus, **H**erpes-Simplex-Viren 1&2) für pränatale oder perinatale Infektionen. Bleibende neuronale Störungen, wie geistige Retardierung, motorische Defizite oder auch Blindheit sind einige schwere Folgen für Neugeborene (Fowler et al., 1992; Kinney, 1988; Syggelou et al., 2010). In besonders kritischen Fällen kann eine kongenitale Infektion tödlich enden. Als Prophylaxe gegen eine HCMV-Infektion kommt die Gabe von intravenös applizierten Immunglobulinen (IVIG) oder HCMV-spezifischen IgG zum Einsatz. Antivirale Substanzen, wie die Nukleosidanaloga Ganciclovir oder Cidofovir sowie das Pyrophosphat analogon Foscarnet-Natrium, werden zur Behandlung eingesetzt und hemmen die virale DNA-Polymerase (Chrip and Clissold, 1991; Sullivan et al., 1992). Einige Studien der letzten Jahre experimentieren mit präventiven Impfungen gegen eine HCMV-Infektion. Jedoch zeigen keine dieser Ansätze Erfolge in Bezug auf eine vollständige Viruselimination (Adler et al., 1995; Griffiths, 2011; Pass, 2009).

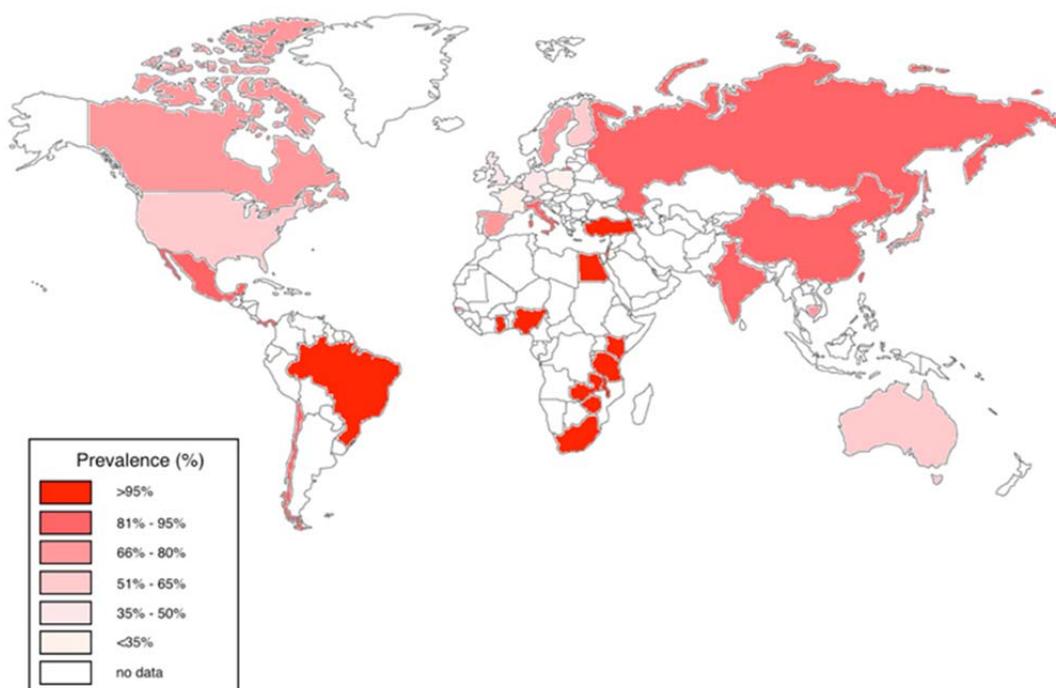


Abbildung 2: Weltweite Seroprävalenz von HCMV bei Erwachsenen. Zusammenfassung mehrere Studien zur Durchseuchungsraten von Erwachsenen im Alter von 16-50 Jahren in den Jahren 2005-2015 (Adland et al., 2015).

1.2 Endoplasmatisches Retikulum (ER) und die *Unfolded Protein Response* (UPR)

Eukaryotische Zellen besitzen verschiedenste Zellorganellen, unter anderem auch das Endoplasmatische Retikulum (ER). Unterschieden wird zwischen glattem und rauem ER. Im glatten ER werden beispielsweise Lipide und Cholesterone synthetisiert. Im Gegensatz dazu ist das raue ER von zahlreichen Ribosomen bedeckt, an denen die Translation von sekretorische, Membran- und Zell-spezifische Proteine stattfindet (Lodish, 2007). 30 % aller zellulären Proteine werden im ER gefaltet und erhalten eventuelle posttranslationale Modifikationen. Zudem ist das ER eine Art Qualitätskontrolle für modifizierte Proteine. Außerdem werden Transmembran- und sekretorische Proteine durch das ER zur Plasmamembran transportiert, mittels Exozytose aus der Zelle oder durch den endozytotischen Signalweg zu verschiedenen Kompartimenten der Zelle geschleust (Gething and Sambrook, 1992; Kaufman et al., 2002). Eine weitere essentielle Aufgabe des ER ist die Speicherung von Calcium-Ionen, welche maßgeblich an den Signalübertragungen von Muskeln und Nerven beteiligt sind. Um eine korrekte Faltung oder Aggregation von Proteinen zu regulieren, befinden sich im ER verschiedene Proteine, wie Chaperone und Foldasen, welche die Proteinhomöostase sicherstellen und auf Stresssituationen reagieren (Rapoport, 1992). Oxidativer Stress, virale Infektionen oder auch Zellgifte wie z.B. Tunicamycin, welches die N-Glykosylierung von Proteinen inhibiert, können Störungen in der Homöostase bewirken. Weitere Zellgifte und relevant für die vorliegende Arbeit sind Thapsigargin, welches die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration durch nicht-kompetitive Inhibierung der sarkoplasmatische/ endoplasmatische Retikulum Ca^{2+} ATPase erhöht oder Dithiothreitol (DTT), dass die Disulfidbrücken von Proteinen zerstört (Naidoo, 2009; Ron, 2002; Ron, 2008). Die Konsequenz dessen ist eine Anhäufung ungefalteter oder fehlgefalteter Proteine. Eine kontinuierliche Akkumulation von ungefalteten Proteinen im ER-Lumen, bewirkt eine Stressantwort der Zelle, die sogenannte *Unfolded Protein Response* (UPR) (Gething and Sambrook, 1992).

Einleitung

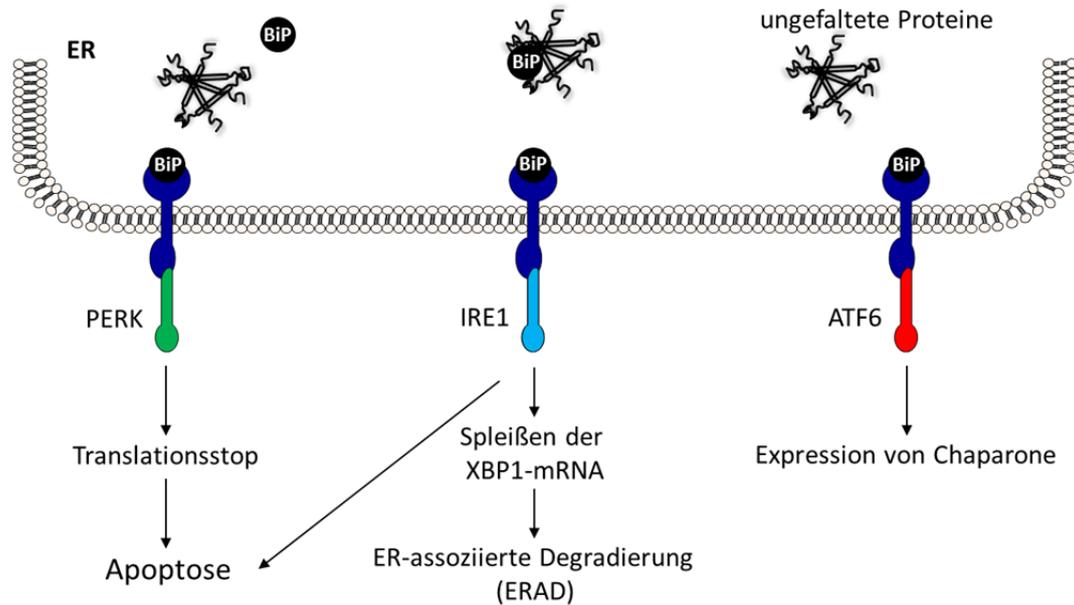


Abbildung 3: Unfolded Protein Response (UPR). Die Akkumulation von ungefalteten Proteinen im ER und die ausgelöste Stressreaktion wird durch drei ER-Transmembranproteinen detektiert: PERK, IRE1 und ATF6. Die Aktivierung von PERK führt zu einem Translationsstopp und kann mit der Initiierung der Apoptose enden. Eine Aktivierung von IRE1 resultiert in einer Expression von Degradierungsfaktoren, die einen Abbau von ungefalteten Proteinen ermöglichen und ATF6 induziert die Transkription von Chaperonen und Foldasen.

Ausgelöst wird die UPR durch drei verschiedene ER-Transmembranrezeptoren: ATF6 (*activating transcription factor 6*), PERK (*double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase*) und IRE1 (*inositol requiring enzyme 1*) (Chakrabarti et al., 2011; Ma and Hendershot, 2001). Im inaktiven Zustand sind diese Rezeptoren an das regulatorische Chaperon BiP bzw. GRP78 (= *immunoglobulin heavy chain binding protein* bzw. *glucose related protein 78*) gebunden. Mit dem Auftreten von Stresssituationen dissoziiert BiP von den Rezeptoren und bindet ungefaltete Proteine, um einer Aggregation dieser entgegen zu wirken. Dieser Vorgang bewirkt die Aktivierung der spezifischen Signalwege und Transkription und Translation von Effektorproteinen. Die Folgen einer Aktivierung sind u.a. eine Expressionserhöhung von Chaperonen, Foldasen und Enzyme für die Degradierung ungefalteter Proteine (ERAD = *ER associated Degradierung*) sowie die Initiierung eines Translationsstops. All diese Maßnahmen dienen zur Wiederherstellung der Proteinhomöostase im Endoplasmatischen Retikulum. Bei anhaltendem oder chronischem ER-Stress kann der programmierte Zelltod (= Apoptose) initiiert werden (Calton et al., 2002; Chakrabarti et al., 2011; Kaufman et al., 2002). Im Folgenden, wird der Fokus auf den IRE1- und ATF6-Signalweg gelegt, da diese für die vorliegende Arbeit besonders relevant sind.

1.2.1 Inositol-requiring enzyme 1 (IRE1/ ERN1) Signalweg

IRE1 ist unter Pflanzen und Säugetieren der konservierteste der drei ER Stresssensoren. Es besitzt als Typ-I-Transmembranprotein eine N-terminale, dem ER-Lumen zugewandte Domäne, und einen C-terminalen zytoplasmatischen Teil, bestehend aus einer Kinase- und Endoribonuklease-Domäne (Mori, 2009). Im Gleichgewicht zwischen Proteinsynthese und Proteinfaltung, ist das Chaperon BiP an den luminalen Teil des IRE1 gebunden (Cox, 1996; Gülow, 2002). Durch eine Stressinduktion, wie beispielsweise virale Infektionen oder Zellgifte und die daraus resultierende Erhöhung von ungefalteten Proteinen im ER Lumen, kommt es zu einer Dissoziation von BiP. Daraufhin homodimerisiert IRE1 über seine N-terminale Domäne, was eine Autophosphorylierung des IRE1, katalysiert durch die eigene Kinase-Domäne, zur Folge hat. Dieser Vorgang aktiviert die IRE1-Endoribonuklease-Domäne. Das Resultat ist ein unkonventionelles Spleißen der zytoplasmatischen *Xbp1*-mRNA (*X-Box binding protein 1*), wobei ein 26nt-kleines Intron entfernt wird (Cox et al., 1993; Kimata et al., 2007; Papa et al., 2003; Shamu and Walter, 1996). Die gespleißte mRNA wird translatiert und der daraus entstandene Transkriptionsfaktor XBP1s transloziert in den Nukleus. Dort bindet das XBP1s an Promotoren über das UPR-Element (UPRE). Dies hat eine verstärkte Transkription von Genen zur Folge, die bei der Proteinfaltung und beim ER-assoziierten Proteinabbau (*ER associated protein Degradierung*, ERAD) eine Rolle spielen (Yoshida et al., 2001). Wenn die ER Homöostase nicht wiederhergestellt werden kann, wird Apoptose initiiert. Dabei oligomerisiert das IRE1 und bindet das Adapterprotein TRAF2 (= *TNF receptor-associated factor 2*). Hierdurch wird der pro-apoptotische ASK1 (= *apoptosis signal-regulating kinase*)-JNK Signalweg aktiviert [(Rao et al., 2004; Todd et al., 2008; Urano et al., 2000); Abbildung 4].

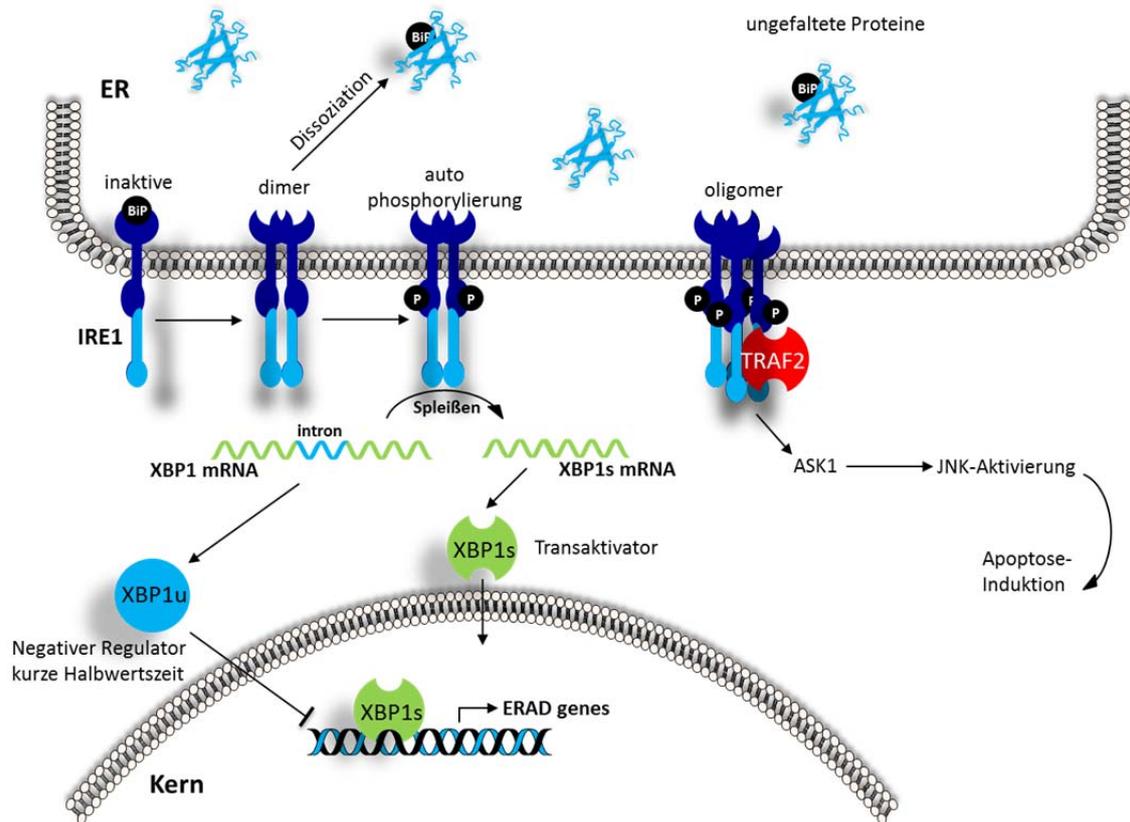


Abbildung 4: Inositol-requiring enzyme 1 Signalweg (IRE1). Die Akkumulation von ungefalteten Proteinen im ER führt zu einer Dissoziation des Chaperons BiP von IRE1. Die Folge ist eine Homodimerisierung und Autophosphorylierung von IRE1. Die aktivierte Endoribonuklease-Domäne spleißt ein 26bp-Intron aus der zytosolisch-ständigen Xbp1-mRNA. Der Transkriptionsfaktor XBP1s transloziert in den Nukleus und bindet an das ER Response Element (ERSE). Dies hat eine Expression von Faktoren zur Folge, die die ungefalteten Proteine degradieren. Aus der ungespleißten Xbp1-mRNA wird ein kleiner Anteil in ein XBP1u Protein translatiert, welches unter chronischen ER Stress ein negativer Regulator von XBP1s darstellt. Ein weiterer Zweig des IRE1 Signalweges ist die Bindung des IRE1 mit dessen Adapterprotein TRAF2, welches ASK1 phosphoryliert. Dies resultiert in einer Aktivierung von JNK, welches wiederum für die Initiierung der Apoptose über Bcl-2 verantwortlich ist.

1.2.2 Die Funktionen des XBP1s und XBP1u während der UPR

Während einer akuten Stressphase wird ein hoher Prozentsatz an ungespleißter *Xbp1*-mRNA durch die RNase-Domäne des IRE1 gespleißt. Das Spleißen führt zu einer Verschiebung im Sequenzleseraster, wodurch ein potenter Transkriptionfaktor entsteht: XBP1s. Ein relativ kleiner Anteil der ungespleißten *Xbp1*-mRNA wird ebenfalls in ein funktionelles Protein translatiert: XBP1u [(Tsuru et al., 2016), Abbildung 5]. XBP1u besitzt eine kurze Halbwertszeit und wird zügig proteasomal degradiert. Strukturell unterscheiden sich beide Proteine in ihrem C-terminalen Bereich. XBP1s besitzt ausschließlich eine *transactivation domain* (TD). Wo hingegen XBP1u mehrere Domänen aufzuweisen hat: ein *translational pausing signal* (TP), eine *Degradation domain* (DD), ein nukleäres Exportsignal (NES) und eine hydrophobe Region (HR). Der N-terminale Teil beider Proteine ist identisch und beinhaltet ein Kernlokalisierungssignal (NLS) und eine sogenannte Basic Leucine Zipper Domain (= bZIP-

Domäne) [Abbildung 5, (Hetz et al., 2011)]. Obwohl das XBP1u relativ schnell degradiert wird, reguliert es das Spleißen der *Xbp1*-mRNA. Es wird vermutet, dass die TP-Domäne ein transienten Translationsstop initiiert. Dadurch kann der Komplex, bestehend aus *Xbp1*-mRNA, Ribosom und XBP1u-Polypeptidkette, in räumliche Nähe der RNase-Domäne des IRE1 kommen, was die Effizienz des Spleißens erhöhen kann (Yanagitani et al., 2009). Ferner konnten einige Studien zeigen, dass das XBP1u, durch die hydrophobe Region im C-terminalen Bereich, an die ER-Membran binden kann, was die Prozessierung seiner mRNA zusätzlich erhöht (Hetz, 2012; Yanagitani et al., 2009; Yanagitani et al., 2011). Kommt es zu einer chronischen bzw. persistierenden Stressphase, wird die Translation der ungespleißten mRNA erhöht und interagiert mit XBP1s als Heterodimer. Der Komplex wird schließlich sehr schnell über das Proteasom degradiert (Yoshida et al., 2006). Die Degradierung des XBP1s stellt eine regulatorische Feedbackschleife dar, um die anhaltende Transkription und Translation von UPR- und ERAD-abhängigen Genen zu unterdrücken.

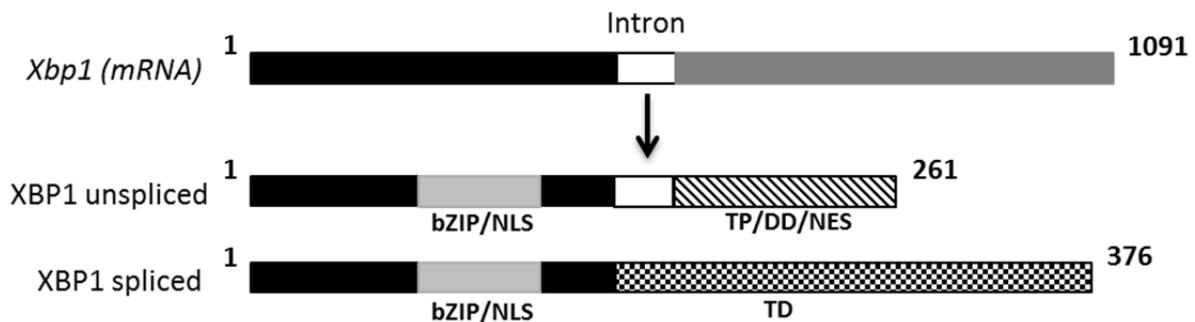


Abbildung 5: Struktur und Domänen des XBP1s und XBP1u. Die *Xbp1*-mRNA kodiert zwei unterschiedliche Proteine. Das XBP1u wird aus der ungespleißten mRNA und das XBP1s aus der gespleißten mRNA translatiert. Beide Proteine haben ein Kernlokalisierungssignal (NLS) und eine bZIP-Domäne im N-terminalen Teil. XBP1u besitzt im C-terminalen Teil ein *translational pausing signal* (TP), eine *Degradierung domain* (DD) und ein nukleäres Exportsignal (NES). XBP1s aktiviert durch seine C-terminale *transactivation domain* die Transkription von ERAD Genen.

1.2.3 Activating transcription factor 6 (ATF6) Signalweg

ATF6 ist ein Mitglied der ATF/CREB basic Leucine Zipper (bZIP) DNA-bindenden Proteinfamilie von Transkriptionsfaktoren. Im Gegensatz zu IRE1 und PERK, ist ATF6 ein Transmembranprotein vom Typ II, was bedeutet, dass der N-terminale aktive Teil des Proteins zytoplasmatisch und der C-terminale Teil im ER-Lumen lokalisiert ist (Hai et al., 1989). Wie alle ER-Stressrezeptoren, ist ATF6 im inaktiven Zustand luminal an BiP gebunden. Von ATF6 existieren zwei Isoformen: ATF6 α und ATF6 β . Beide Isoformen werden auf die gleiche Weise prozessiert und binden den ERSE in Form von Homodimeren oder Heterodimeren. Sie reagieren unterschiedlich schnell auf ER-Stress Induktionen, wobei

Einleitung

ATF6 β ist ein sehr schwacher und ATF6 α ein sehr starker Transaktivator ist (Thuerauf et al., 2007). Im nachfolgenden Abschnitt wird ausschließlich ATF6 α behandelt, da dieses Protein für die vorliegende Arbeit relevant ist. Kommt es nun zu einer Akkumulation von ungefalteten Proteinen im ER, dissoziiert BiP von ATF6 α ab, wodurch dieser in den Golgi transloziert. Dort wird der Rezeptor zuerst von Site-1-Proteasen gespalten, wodurch ein großer Teil des C-Terminus entfernt wird; ist jedoch weiter im Golgi verankert. Im zweiten Schritt spalten Site-2-Proteasen den N-terminalen aktiven Teil ab, was in einem hoch potenten Transkriptionsfaktor resultiert (Haze et al., 1999; Thuerauf et al., 2007; Zhu et al., 1997). Dieser transloziert in den Nukleus und bindet als Homodimer an Promotoren von UPR-induzierbaren Genen, wie das ER-Chaperonen BiP oder XBP1 [(Lee et al., 2002; Shang and Lehrman, 2004), Abbildung 6]. All diese Promotoren weisen eine typische Sequenz auf, bestehend aus 19 Nukleotiden (CCAAT-N₉-CCACG), die als ER-Stress response element (ERSE) bezeichnet werden (Wang et al., 2000; Yoshida et al., 1998). Ferner kann ATF6 α , zusammen mit XBP1, ein Heterodimer bilden, welches die Expression von Proteinen induziert, die bei der ER assoziierten Degradierung eine Rolle spielen (Inagi et al., 2014).

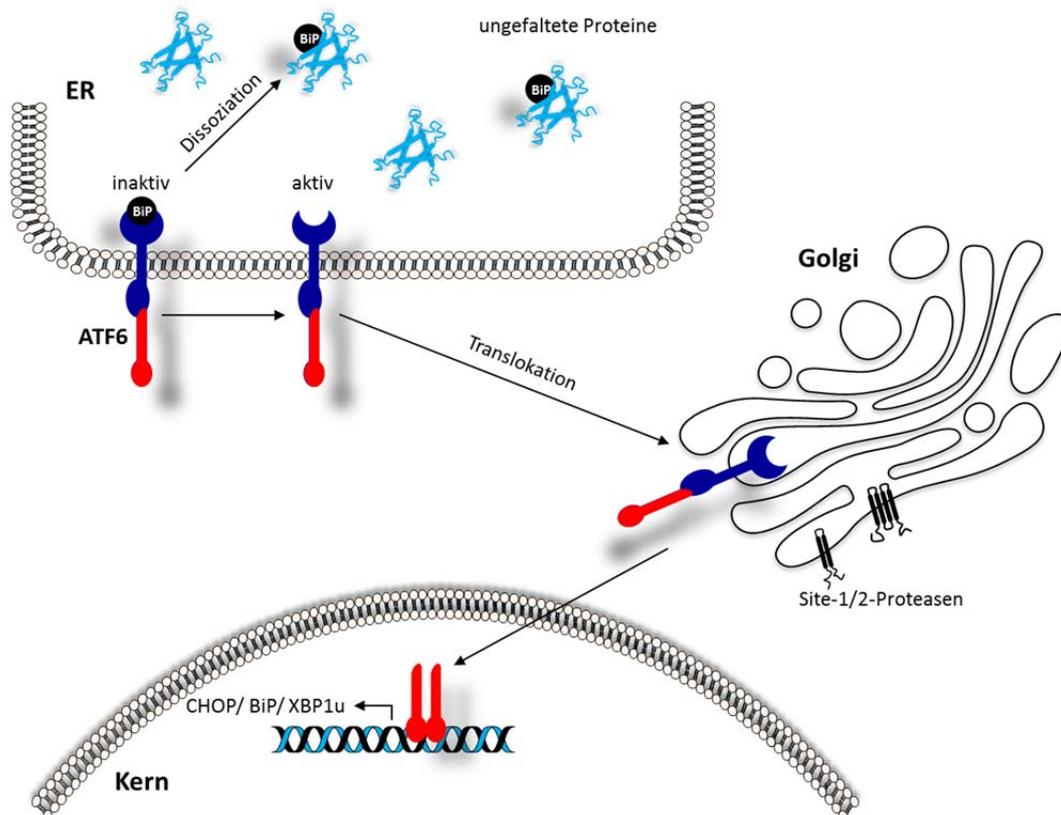


Abbildung 6: Activating transcription factor 6 (ATF6) Signalweg. Die Akkumulation von ungefalteten Proteinen im ER führt zu einer Dissoziation des BiP von ATF6. Die aktive Form transloziert in den Golgi. Dort wird das 90-kDa große Protein erst durch S1- und schließlich durch S2-Proteasen gespalten, wobei ein etwa 50-kDa großes Protein entsteht. Dieser aktive Transkriptionsfaktor wandert in den Kern und initiiert die Transkription von Chaperonen, Foldasen und XBP1.

1.3 Modulation der IRE1- und ATF6-Signalwege durch virale Infektionen

Aufgrund der Masse an viralen Proteinen, die während einer Infektion synthetisiert und teilweise posttranslational im ER modifiziert werden müssen, können Viren eine ER-Stress-Reaktion induzieren (He, 2006). Infolgedessen haben eine viele Viren Mechanismen entwickelt, um negative Folgen einer UPR-Aktivierung zu blockieren oder auch zu ihrem Vorteil beeinflussen können (Baltzis et al., 2004; Proud, 1995). Im Falle des Hepatitis C Virus (HCV) konnte bereits gezeigt werden, dass das Virus den ATF6-Signalweg aktiv beeinflusst und die Expression von Chaperonen und die Lipidbiogenese erhöht (Tardif et al., 2002). Ferner konnten Ambrose und Mackenzie zeigen, dass eine effiziente Replikation des West Nile Virus von ATF6 abhängig, jedoch IRE1 unabhängig war. Eine Infektion von ATF6 Knock-out-Zellen resultierte in einer stark verminderten Replikation, ausgelöst durch eine Erhöhung der CHOP-vermittelten Apoptose, gesteigerten Type-I-Interferon Antwort und IFN-vermittelte STAT1-Phosphorylierung (Ambrose and Mackenzie, 2011, 2013). Das humane Cytomegalovirus beeinflusst alle drei ER-Stress-Sensoren auf verschiedene Weise, um seine Replikation zu begünstigen. Beispielsweise konnte in einer Arbeit gezeigt werden, dass in HCMV-infizierten Zellen der IRE1-Signalweg aktiviert wird, jedoch die Transkription von ERAD-Genen blockiert wird. Ferner konnte nachgewiesen werden, dass die Aktivierung von ATF6 unterdrückt, aber die Expression von ATF6-abhängigen Chaperonen erhöht war (Isler et al., 2005). Buchkovich et al. konnte weiterhin dokumentieren, dass die Expression von BiP in HCMV-infizierten Zellen in den ersten 72 h gesteigert ist. Darüber hinaus wurde vermutet, dass die erhöhte BiP-Expression vom Virus genutzt wird, um die Aktivierung der Sensoren abzuschwächen (Buchkovich et al., 2008). Das HCMV-Protein UL38 konnte identifiziert werden als Suppressor der Phosphorylierung und Aktivierung der *c-Jun N-Terminal kinase* (JNK). Die Blockierung von JNK verhindert, dass die IRE1-vermittelte Apoptose in der infizierten Zelle ausgelöst werden kann (Qian et al., 2011; Terhune et al., 2007; Xuan et al., 2009). Daten aus unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass MCMV die Aktivität des IRE1-XBP1-Signalwegs zu späten Zeitpunkten einer Infektion inhibiert. Das NEC-Protein M50 interagiert mit IRE1 und diese Interaktion resultierte in einer Reduktion des IRE1-Proteinlevels. In Folge dessen wird das Spleißen der *Xbp1*-mRNA und Transkription von ausgewählten ERAD-Genen inhibiert. Darüber hinaus konnten wir in der Studie zeigen, dass der konservierte N-terminale Teil des M50 für die IRE1-Interaktion und IRE1-Degradierung verantwortlich ist (Stahl et al., 2013). Ein ähnlicher Mechanismus konnte ich während

meiner Masterarbeit für das HCMV-Homolog UL50 in Transfektion- und Infektionsexperimenten nachweisen. In beiden Fällen konnten wir den verantwortlichen Abbau-mechanismus des humanen und murinen IRE1 durch das UL50 bzw. M50 noch nicht identifizieren (Stahl et al., 2013).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

MCMV, wie auch HCMV, regulieren die UPR auf verschiedenste Weise um die eigene Replikation zu begünstigen. Die viralen Proteine oder die regulatorischen Mechanismen sind weitgehend unbekannt. In den letzten Jahren konnten jedoch einige Virusproteine und Mechanismen identifiziert werden, welche die verschiedenen ER-Signalwege beeinflussen. In Bezug auf den IRE1-XBP1-Signalweg wurde von unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass die MCMV-Infektion eine kurzzeitige Aktivierung des IRE1-XBP1-Signalweges zu frühen Infektionsphasen induziert (Stahl et al., 2013). Des Weiteren wurde gezeigt, dass das IRE1-Protein zu späten Infektionsphasen durch das virale Protein M50 abgebaut wird. Die IRE1-Degradierung, wie auch die resultierende Inhibierung des *Xbp1*-mRNA-Spleißens verhindert die Transkription von schädlichen Zielgenen, wie Protein Degradierungsfaktoren (Stahl et al., 2013).

Eine Erklärung warum das MCMV kurz nach Infektion ein Spleißen der *Xbp1*-mRNA induziert war zu Beginn der Arbeit noch nicht bekannt. Aus diesem Grund war das Ziel im ersten Teil dieser Arbeit herauszufinden, ob das Spleißen und die daraus resultierende Translation des XBP1s-Proteins für eine produktive MCMV-Replikation relevant sind. Darüber hinaus war es von Interesse, die Auswirkungen auf die Virusvermehrung zu analysieren, wenn ein oder mehrere essentielle Proteine des IRE1-Signalweges genetisch entfernt wurden. Falls der zugrundeliegende Mechanismus identifiziert wurde, sollte dieser ggf. näher charakterisiert werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten nachfolgende Experimente basierend auf die publizierten Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe mit dem Fokus auf die späte Phase einer MCMV-Infektion durchgeführt werden. Zum einen sollte der M50-vermittelte IRE1-Abbaumechanismus aufgedeckt werden. Zum anderen war es von Interesse, eine Domäne im M50-Protein zu identifizieren, die für den IRE1-Abbau und -Interaktion verantwortlich ist. Diese sollte dann näher charakterisiert werden. Falls eine oder mehrere spezifische Domänen identifiziert wurden, sollte ggf. eine M50-Virusmutante hergestellt und die Auswirkungen einer fehlenden IRE1-Degradierung auf die MCMV-Replikation analysiert werden.

2 Ergebnisse I

2.1 Replikationskinetik des murinen Cytomegalovirus (MCMV) in Abhängigkeit der IRE1-Expression

Aus einer Studie unserer Arbeitsgruppe ist bekannt, dass der hoch-konservierte UPR-Sensor IRE1 zu späten Zeitpunkten einer murinen bzw. humanen Cytomegalovirusinfektion degradiert wird. Verursacht wird dies durch das virale Protein M50 in MCMV bzw. UL50 in HCMV der Viren ist (Stahl et al., 2013). Außerdem konnte mittels quantitativer Real-Time-PCR (qRT-PCR) belegt werden, dass das Spleißen der *Xbp1*-mRNA und Transkription von ERAD-Genen zu späten Zeitpunkten der Virusinfektion gehemmt werden, welches eine Konsequenz aus der Degradierung von IRE1 darstellte. Im Gegensatz dazu konnte zu frühen Infektionszeitpunkten (2-4 hpi) ein geringer Anstieg des *Xbp1*-mRNA Spleißens beobachtet werden (Stahl et al., 2013). Die kurzzeitige Aktivierung des IRE1-XBP1-Signalweges sollte in diesem Teil der Arbeit näher betrachtet werden. In dieser Hinsicht sollten die Auswirkungen bei An- und Abwesenheit essentieller Proteine des IRE1-Signalweges in Bezug auf die MCMV-Replikation und virale Genexpression im Detail untersucht werden.

Um diese Fragen näher zu erläutern, wurden embryonale Mausfibroblasten mit einem Knockout des IRE1-Gens verwendet [MEF-IRE1 ko; Exons 12 Deletion, welches für die Transmembrandomäne kodiert (Urano et al., 2000)]. In diese Zellen wurde als erster Schritt durch eine lentivirale Transduktion ein TetOn-Element eingefügt. Darüber hinaus wurden die MEF-IRE1 ko Fibroblasten mit einem Tet-induzierbarem IRE1-GFP-Plasmid komplementiert (IRE1-GFP_{ind}). Das Grün-fluoreszierende Protein (GFP) wurde in die Linker-Region zwischen der Transmembran- und der Kinasedomäne eingesetzt. Durch ein Einsetzen des GFP in die Linker-Region wird die Funktionalität des IRE1-Proteins nicht beeinflusst. Das bakterielle Antibiotikum Doxycyclin dient zur Induktion des TetOn-Elements und der Expression des IRE1-GFPs. Von einem Kooperationspartner (Dr. Eelco van Anken, San Raffaele Scientific Institute, Mailand, Italien) wurden mir die IRE1-GFP_{ind}-Zellen zur Verfügung gestellt [(Aragon et al., 2009; Han et al., 2009a; Li et al., 2010), Abbildung 7].

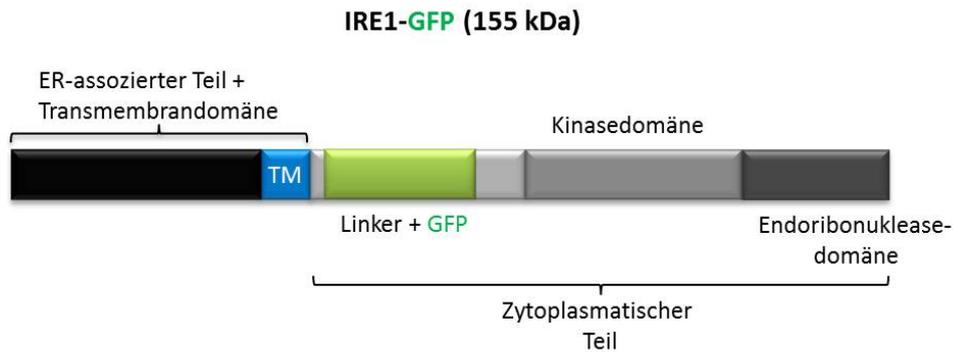


Abbildung 7: Schematische Darstellung des IRE1-GFP. Das Grün-fluoreszierenden Protein (GFP) wurde als Tag zwischen die Transmembrandomäne (TM) und der Kinase Domäne, in die sogenannte Linker-Region des IRE1, inkliniert. Modifiziert nach Han et al., 2010.

Zuerst wurden die IRE1-GFP_{ind}-Zellen funktionell analysiert. Hierfür wurde die Expression des IRE1-GFPs in Abhängigkeit von steigenden Konzentrationen an Doxycyclin (0, 0,1, 1,0, 5,0, 10,0, 15,0 und 25,0 nM) mittels Western Blot überprüft. Mit Lösungsmittel (H₂O)-behandelte IRE1-GFP_{ind}-Zellen dienten als Negativkontrolle und zeigen die Abwesenheit einer IRE1-Expression. Mit Lösungsmittel (H₂O) behandelte MEF_{wt}-Zellen dienten als Positivkontrolle und exprimieren endogenes IRE1. Als Ladekontrolle diente β -Aktin. Abbildung 8A zeigt das IRE1-Expressionsmuster im Western Blot. Ein Anstieg der IRE1-GFP-Expression konnte mit steigender Konzentration des Doxycyclins erreicht werden. Im Gegensatz zum endogenen IRE1 (~130 kDa), hat das IRE1-GFP eine ungefähre Größe von 155 kDa. Die Bandenverschiebung ist deutlich in Abbildung 8A erkennbar. Eine vergleichbare Expressionsstärke mit dem endogenen IRE1 konnte bereits mit einer Doxycyclinkonzentration von 0,1-1,0 nM erreicht werden. Jedoch konnte erst bei einer Konzentration von 1,0 nM das GFP nachgewiesen werden (Abbildung 8A). Im Gegensatz dazu zeigten nicht induzierte IRE1-GFP_{ind}-Zellen keine Expression von IRE1 und GFP, welches den Knockout von IRE1 bestätigt (Abbildung 8A). Für die weitere Analyse der Zellen wurden nicht-induzierte (0,0 nM) und induzierte Zellen (10,0 nM) mit MCMV-GFP und einer MOI von 3 TCID₅₀/Zelle infiziert und das Spleißen der *Xbp1*-mRNA mittels quantitative Real-Time-PCR über einen Zeitraum von 48 Stunden analysiert. Zusätzlich wurde mit Thapsigargin (Tg) ER-Stress ausgelöst. Die Ergebnisse sind in Abbildung 8B dargestellt. Erwartungsgemäß konnte kein Spleißen der *Xbp1*-mRNA in nicht-induzierten und infizierten Zellen gemessen werden. Durch die Inkubation mit Thapsigargin, konnte allerdings ein leichter Anstieg des Spleißens beobachtet werden (Abbildung 8B). Im Gegensatz dazu wurde bereits in nicht-infizierten/induzierten Zellen eine massive Steigerung des *Xbp1*-mRNA-Spleißens nachgewiesen, welche

Ergebnisse

nach Inkubation mit Tg noch weiter anstieg. Es ist deutlich zu erkennen, dass eine Inhibition des Spleißens nach 24 h und 48 h nach Infektion auftritt, ebenso in Gegenwart von Thapsigargin. Dieser Nachweis steht im Einklang mit früheren Daten der Arbeitsgruppe und bestätigt die Funktionalität der Zellen [(Stahl et al., 2013), Abbildung 8B].

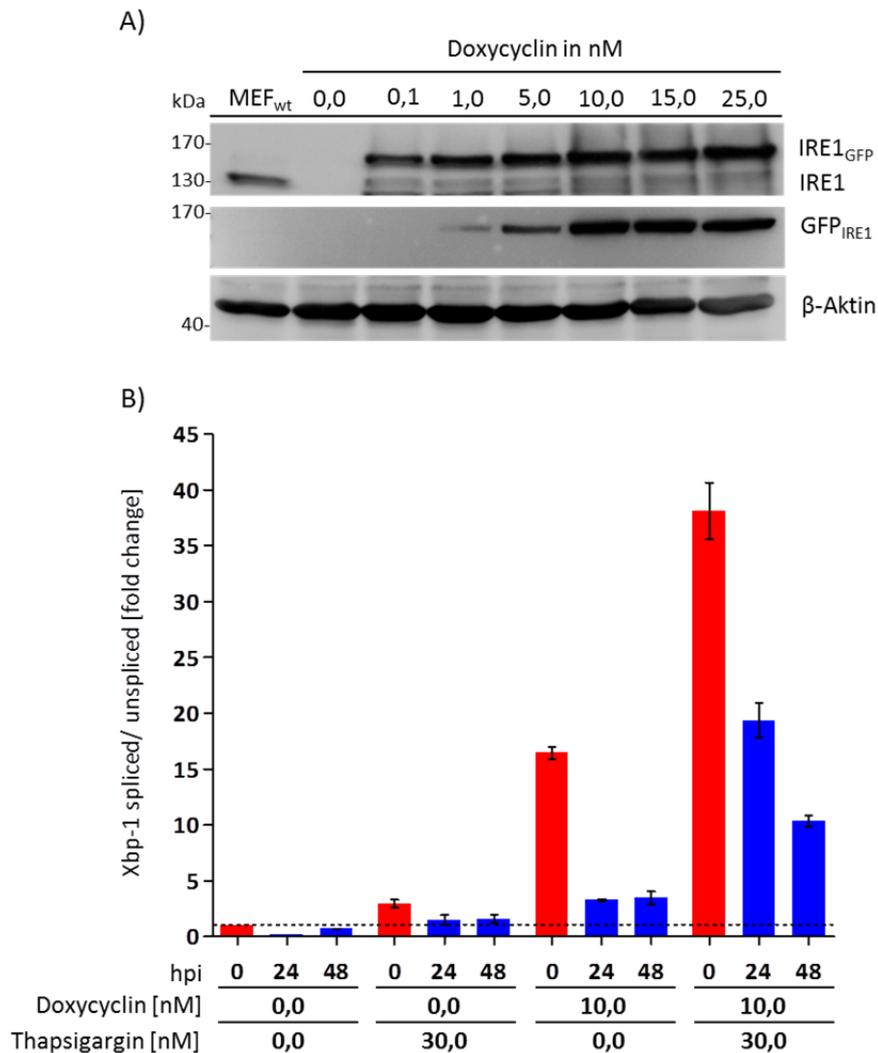


Abbildung 8: Charakterisierung der IRE1-GFP_{ind} Zellen. A) IRE1-GFP_{ind} Zellen wurden ausgesät und mit steigenden Konzentrationen an Doxycyclin für 24 h inkubiert. Proben wurden mittels RIPA-Lyse hergestellt und ein Expressionsnachweis anhand der SDS-PAGE durchgeführt. Die Detektion erfolgte mit GFP- und IRE1-spezifischen Antikörpern. Als Ladekontrolle diente β-Aktin. MEF_{wt}-Zellen als IRE1-Expressionskontrolle. B) qRT-PCR Analyse des *Xbp1*-mRNA-Spleißens nach Induktion der IRE1-GFP-Expression durch 0,0 oder 10,0 nM Doxycyclin und Infektion mit MCMV (MOI 3). Die Zellen wurden zusätzlich für 4 h vor Zellyse mit 30 nM Thapsigargin inkubiert, um den Nachweis des *Xbp1*-mRNA-Spleißens zu erleichtern. Für die Normalisierung der Messung diente die Expressionsstärke von GAPDH. kDa: Kilodalton, hpi: Stunden nach Infektion, nM: Nanomol

Ergebnisse

Die IRE1-GFP_{ind}-Zellen wurden im folgenden Schritt verwendet, um die Auswirkungen einer ansteigenden Expression von IRE1 auf die MCMV Replikationskinetik zu untersuchen. Hierfür wurden Wachstumskurven nach Infektion mit niedriger oder hoher MOI durchgeführt, um die Virusvermehrung über einen definierten Zeitraum zu verfolgen (siehe 6.2.8). Infiziert wurden die Zellen mit einem GFP-markierten MCMV (MCMV_{GFP}), wodurch die abschließende Virustitration erleichtert wurde. Die Expression des IRE1-Proteins wurde am Tag der Aussaat mit ansteigenden Doxycyclinkonzentrationen induziert (siehe Abbildung 8A). Wiederholt wurde die Induktion an Tag 0 und den nachfolgenden Tagen 1, 3, 5, 7 und 9, bei denen jeweils Virusüberstand in Triplikaten genommen wurde. Abbildung 9A zeigt die Auswertung der Multistep-Wachstumskurve (MOI 0,1 TCID₅₀/Zelle). Bis einschließlich Tag 3 konnte kein Unterschied in der Effizienz und Kinetik der Virusreplikation nachgewiesen werden. Jedoch zeigte sich ab Tag 5 eine massive Verminderung des Viruswachstums in nicht-induzierten Zellen (= IRE1 ko, 0,0 nM). Der höchste Titer wurde an Tag 7 mit einem Wert von ca. 1×10^4 TCID₅₀/ml gemessen (Abbildung 9A). Im Gegensatz dazu erhöhte sich der maximal erreichte Virustiter mit steigenden Doxycyclinkonzentrationen (= erhöhte IRE1-Expression). Mit einer 10,0 nM Induktion konnte der höchste Virustiter (3×10^6 TCID₅₀/ml) erreicht werden. Dementsprechend war der Titer um mehr als den Faktor 100 höher im Vergleich zu nicht-induzierten Zellen (Abbildung 9A). Eine Induktion mit hoher Doxycyclinkonzentration (15,0 nM) verursachte wieder ein Abfall der Virusreplikation, welche durch eine Applikation von 25,0 nM Doxycyclin weiter verstärkt wurde. Der erreichte Virustiter war vergleichbar mit nicht-induzierten Zellen. Ähnliche Resultate konnte mit einer Singlestep-Wachstumskurve (MOI 3 TCID₅₀/Zelle) erreicht werden (Abbildung 9B). Ein Unterschied war jedoch, dass bereits an Tag 3 (d3) ein Replikationsdefizit in nicht-induzierten (0,0 nM) und hoch-induzierten Zellen (25,0 nM) nachgewiesen werden konnte (Abbildung 9B).

Um sicherzustellen, dass der Zeitpunkt der erstmaligen Doxycyclininduktion und daher der IRE1-Expression keinen Einfluss auf die Virusreplikation hatte, wurde ein Pool von IRE1-GFP_{ind}-Zellen 6 Tage vor Infektion mit 10,0 nM Doxycyclin behandelt und jeden zweiten Tag erneuert. Zum Vergleich wurde ein weiterer Zellpool erst 1 Tag vor Infektion mit 10,0 nM Doxycyclin behandelt. Als Positivkontrolle dienten MEF_{wt}-Zellen. Abbildung 9C zeigt die Auswertung der Niedrig-MOI-Wachstumskurve. Es konnte während des gesamten Untersuchungszeitraums keine Veränderung in der Virusreplikation festgestellt werden, unabhängig vom Zeitpunkt der Doxycyclininduktion. Auch wenn die IRE1-Expression in

Ergebnisse

MEF_{wt}- und 10,0-nM-induzierten IRE1-GFP_{ind}-Zellen sich deutlich voneinander unterschieden (siehe Abbildung 8A), konnte ein vergleichbares Viruswachstum beobachtet werden. Die maximalen Titer wurden nach 9 Tagen erreicht und wichen mit Werten zwischen $1 - 4 \times 10^6$ TCID₅₀/ml nur geringfügig voneinander ab (Abbildung 9C).

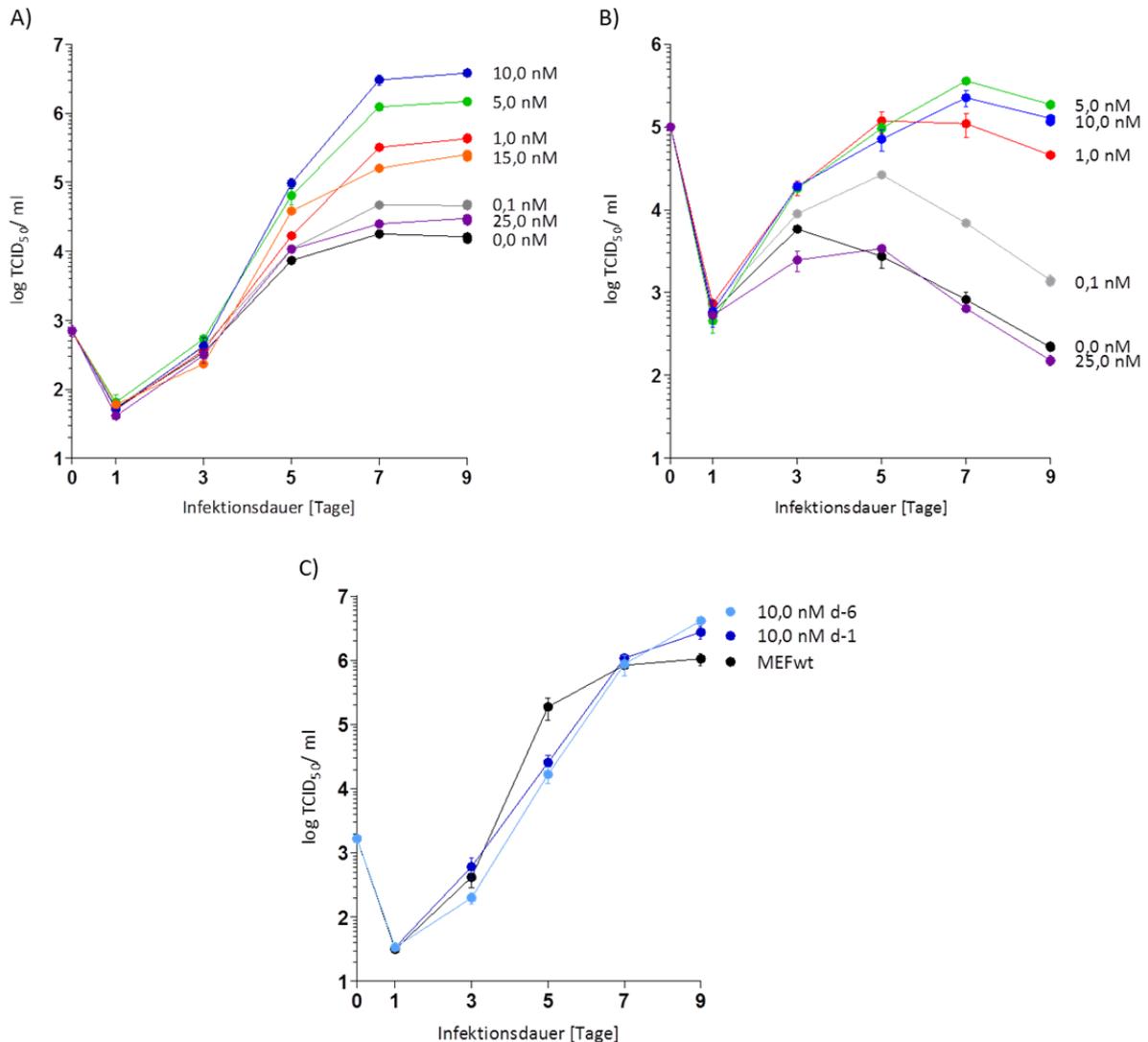


Abbildung 9: Wachstumsanalysen mit MCMV-GFP in IRE1-GFP_{ind}-Zellen. Hierzu wurden Zellen jeweils in Triplikaten ausgesät und mit einer niedrigen MOI von 0,1 TCID₅₀/Zelle (**A/ C**) oder mit einer hohen MOI von 3 TCID₅₀/Zelle (**B**) infiziert. Probenahme und Wechsel des Mediums, sowie Zugabe der Doxycyclinkonzentration wurde an den angegebenen Tagen durchgeführt. Der Virustiter im Überstand wurde durch Titration auf murinen 10.1-Zellen bestimmt. Als Kontrollzellen wurden in (**C**) murine embryonale Fibroblasten (MEFwt) verwendet. nM: Nanomol, d: Days = Tage

2.2 Einfluss einzelner Komponenten des IRE1-Signalweges auf die MCMV-Replikation

Die Ergebnisse aus Abbildung 9 zeigten deutlich, dass der IRE1-Signalweg oder das IRE1 selbst von essentieller Bedeutung für die Virusreplikation ist. Im nachfolgenden Schritt wurde die CRISPR/Cas9-Methode angewendet, welche zur Erzeugung von gentechnisch-veränderten Zelllinien dient (siehe Methoden 6.2.12 für genauere Details). Der Grund für die Erzeugung zusätzlicher Knockout-Zellen war, um die Daten mit den IRE1-GFP_{ind}-Zellen mittels einer unabhängigen Quelle zu überprüfen. Außerdem konnten verschiedene Komponenten des IRE1-Signalweges (IRE1, XBP1 und TRAF2) unter Verwendung einer identischen parentalen Zelllinie (immortalisierte embryonale Mausfibroblasten – MEF_{wt}) ausgeknockt und die Replikation von MCMV in den jeweiligen Zelllinien miteinander verglichen werden. MEF_{wt}-Zellen wurden im weiteren Verlauf als Positivkontrolle in den Experimenten verwendet.

Nach Erzeugung von je zwei Knockout-Zelllinien von IRE1, XBP1 und TRAF2 wurde die Abwesenheit der Proteine im Western Blot untersucht. Der Grund für die Verwendung von 2 Knockout-Zelllinien für jedes Gen war, um sogenannte Off-Target-Hits (-ein zufälliges Schneiden des Cas9-Proteins an einer ungewollten Position im Genom) zu vermeiden und mögliche Fehlinterpretationen der gewonnenen Ergebnisse zu minimieren. Für die Bestätigung des XBP1 Knockouts erfolgte eine Aktivierung des IRE1-Signalweges durch eine Zugabe von 2 µM Thapsigargin für 6 h vor Zelllyse. Hiermit konnte eine ausreichende starke Expression des XBP1s in der parentalen Zelllinie gewährleistet werden. Abbildung 10B zeigt das Resultat der Proteinexpression in den jeweiligen Zelllinien. Der Normalzustand des IRE1-Signalweges vor dem jeweiligen Knockout ist in Abbildung 10A schematisch dargestellt. Erwartungsgemäß konnten in Kontrollzellen das IRE1-, XBP1s-, welches durch Thapsigargin induziert wurde, und TRAF2-Protein detektiert werden. Das ungespleißte XBP1-Protein (XBP1u) wurde nur sehr schwach nachgewiesen (Abbildung 10B). Des Weiteren konnte ein Knockout in jeweils zwei Zellklonen bestätigt werden. Die Abwesenheit des IRE1-Proteins resultierte in einer Deaktivierung des *Xbp1*-mRNA-Spleißens und keiner Expression des XBP1s-Proteins. Jedoch wurde eine deutlich erhöhte Expression des XBP1u-Proteins, im Gegensatz zu Kontrollzellen, nachgewiesen (Abbildung 10B). In TRAF2 ko-Zellen, wurde ebenso wie in den Kontrollzellen eine erhöhte Expression des XBP1s-Proteins beobachtet. Jedoch wurde auch in diesem Fall keine Expression des XBP1u-Proteins detektiert. Eine vollständige Abwesenheit des XBP1s- und XBP1u-Proteins konnte wiederum nur in XBP1

Ergebnisse

ko-Zellen festgestellt werden. Die gleichmäßige Expression von β -Aktin zeigte, dass ähnliche Mengen an Gesamtprotein geladen wurden. (Abbildung 10B).

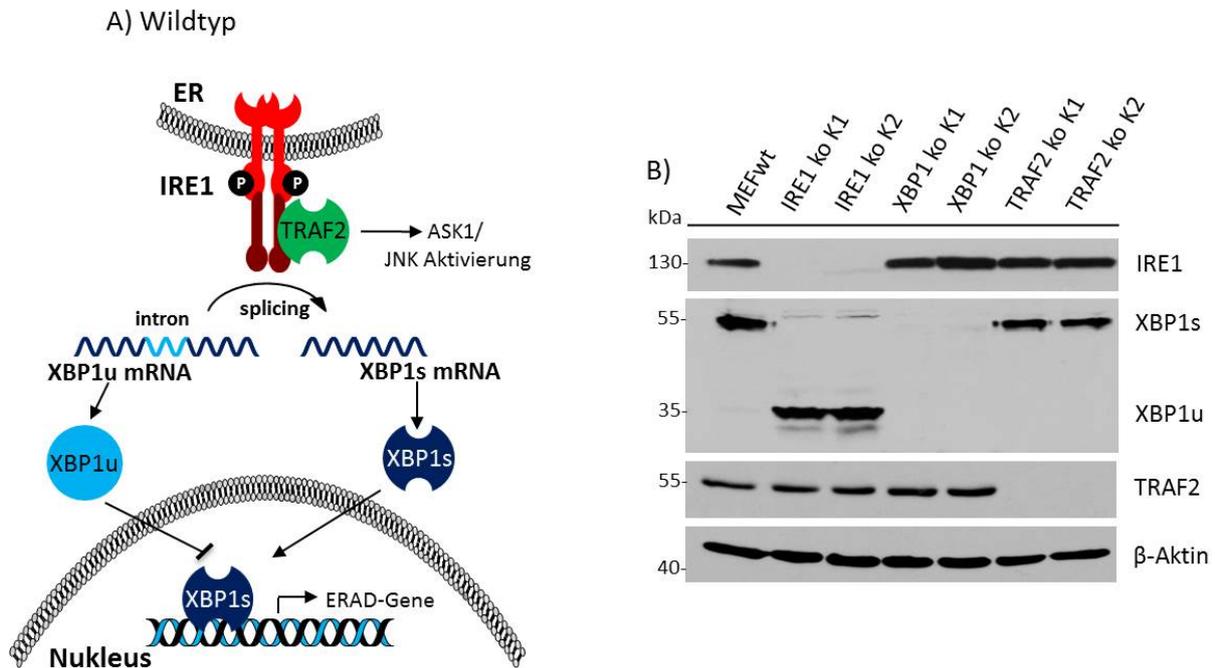


Abbildung 10: (A) Graphische Darstellung des IRE1-Signalweges vor Knockout von IRE1, XBP1 oder TRAF2. (B) Expressionskontrolle der CRISPR/ Cas9-Knockout Zelllinien von IRE1, XBP1 und TRAF2. Hierfür wurden die jeweiligen Zelllinien ausgesät und nach 24 h mit 2 μ M Thapsigargin für 6 h inkubiert. Proben wurden entweder mit RIPA-Puffer oder mit dem Kernextraktionsprotokoll, für den Nachweis des XBP1s und XBP1u Proteins, lysiert. Als Positivkontrolle dienen MEF_{w_t}-Zellen und als Ladekontrolle β -Aktin. kDa: Kilodalton, K1/2: Einzelzellklon 1 und 2

Im nachfolgenden Schritt wurden mehrerer Niedrig-MOI-Wachstumskurven durchgeführt, um die Auswirkungen des Gen-Knockouts auf die MCMV-Replikation zu untersuchen. Abbildung 11A/B zeigt die Auswertung der Titration. Bis Tag 3 konnte kein Unterschied in der Replikationskinetik in den jeweiligen Knockout-Zellen im Vergleich zur parentalen Zelllinie festgestellt werden. Ab Tag 5 zeigte jedoch die Virusreplikation in IRE1 ko-Zellen eine deutliche Verminderung, im Gegensatz zum Viruswachstum in XBP1 ko-Zellen. Der maximale Titer in IRE1 ko-Zellen wurde an Tag 7 mit ca. 1×10^5 TCID₅₀/ml ermittelt. Im Vergleich dazu, wurde in den Kontroll- und XBP1 ko-Zellen ein um den Faktor 100-fach höherer Titer zum gleichen Zeitpunkt bestimmt (Abbildung 11A). Das Viruswachstum in TRAF2 ko-Zellen verlief mit ähnlicher Replikationskinetik wie in Kontrollzellen ab. An Tag 7 konnte der maximale Virustiter von ca. 5×10^6 TCID₅₀/ml erreicht werden (Abbildung 11B).

Ergebnisse

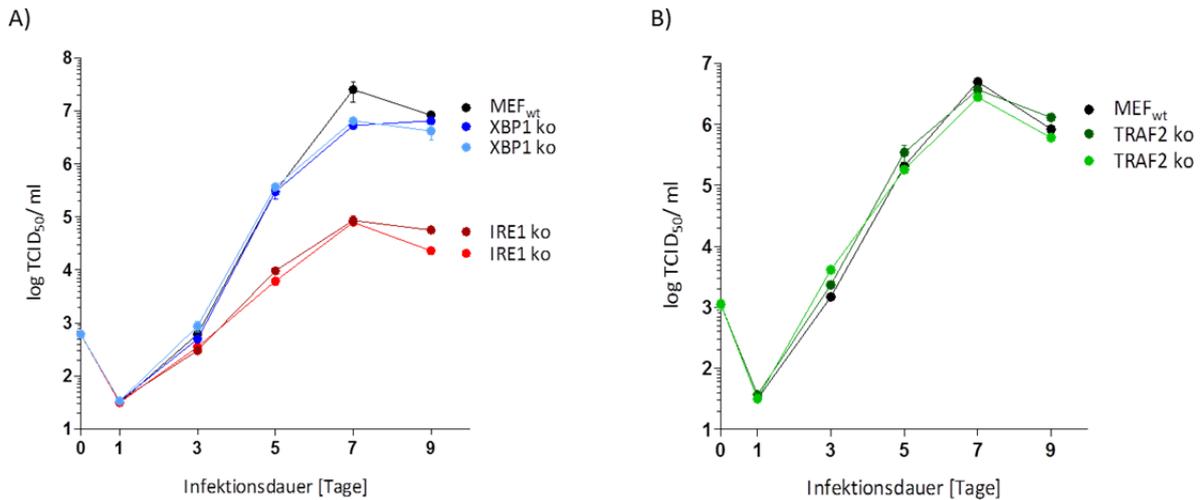


Abbildung 11: Multistep-Wachstumsanalyse in MEF_{wt}- oder CRISPR/ Cas9-Knockout-Zellen. (A) Wachstumskurve in IRE1 ko- und XBP1 ko-Zellen. **(B)** Wachstumskurve in TRAF2 ko-Zellen. Hierzu wurden die jeweiligen Zelllinien in Triplikaten ausgesät und mit einer MOI von 0,1 TCID₅₀/Zelle infiziert. Das Medium wurde zu den angegebenen Tagen ausgetauscht und der Virustiter im Überstand mittels Titration bestimmt. Als Kontrolle für eine funktionelle Replikation von MCMV dienen MEF_{wt}-Zellen. Je zwei Zelllinien von jedem Knockout wurden in den Wachstumskurven verwendet.

Um eine erfolgreiche Infektion und Virusverbreitung zu etablieren, muss eine vollständige Expression der viralen Gene gewährleistet sein. In Herpesviren werden Gene kaskadenartig exprimiert. Kurz nach Infektion findet die Expression der *Immediate-early* Gene (IE) statt, die als Aktivatoren der *early* Gene (E) fungieren. Die *late* Gene (L) werden letztlich aktiviert, nachdem die Genomreplikation begonnen hat. Aus den Wachstumskurven geht hervor, dass ein deutliches Replikationsdefizit von MCMV in den IRE1 ko-Zellen vorliegt (Abbildung 11A). Somit wäre ebenfalls zu erwarten, dass die Expression der viralen Proteine beeinträchtigt ist. Um dies zu untersuchen, wurde eine Proteinexpressionsanalyse mit den jeweiligen Knockout-Zellen durchgeführt. Proben zur Analyse der viralen Proteinexpression wurden nach 0, 2, 5, 7, 9, 24 und 48 h nach Infektion genommen. Untersucht wurde die Expression von IE1, M57 und Glykoprotein B (gB) als jeweiliger Vertreter der IE, E und L Genexpressionsklasse. β -Aktin diente als Ladekontrolle. Die Auswertung mittels Immunoblot ist in Abbildung 12A-C wiedergegeben. Erwartungsgemäß zeigte die Infektion der MEF_{wt}-Zellen die typische kaskadenartige Genexpression. Im Vergleich dazu konnte zwar nach Infektion der IRE1 ko-Zellen ebenfalls eine Expressionskaskade beobachtet werden, diese zeigte jedoch eine verspätete und schwächere Proteinexpression der untersuchten Gene im Infektionszeitraum. Hierbei ist das M57, welches erst 7 h nach Infektion und das gB, welches erst 48 h nach Infektion exprimiert wurde, hervorzuheben (Abbildung 12A). Die Infektionen der XBP1 ko- und TRAF2 ko-Zellen zeigten eine ähnliche Expression der Virusproteine wie in

Ergebnisse

Kontrollzellen (Abbildung 12B/C). Somit konnte das Replikationsdefizit von MCMV in IRE1 ko-Zellen bestätigt werden.

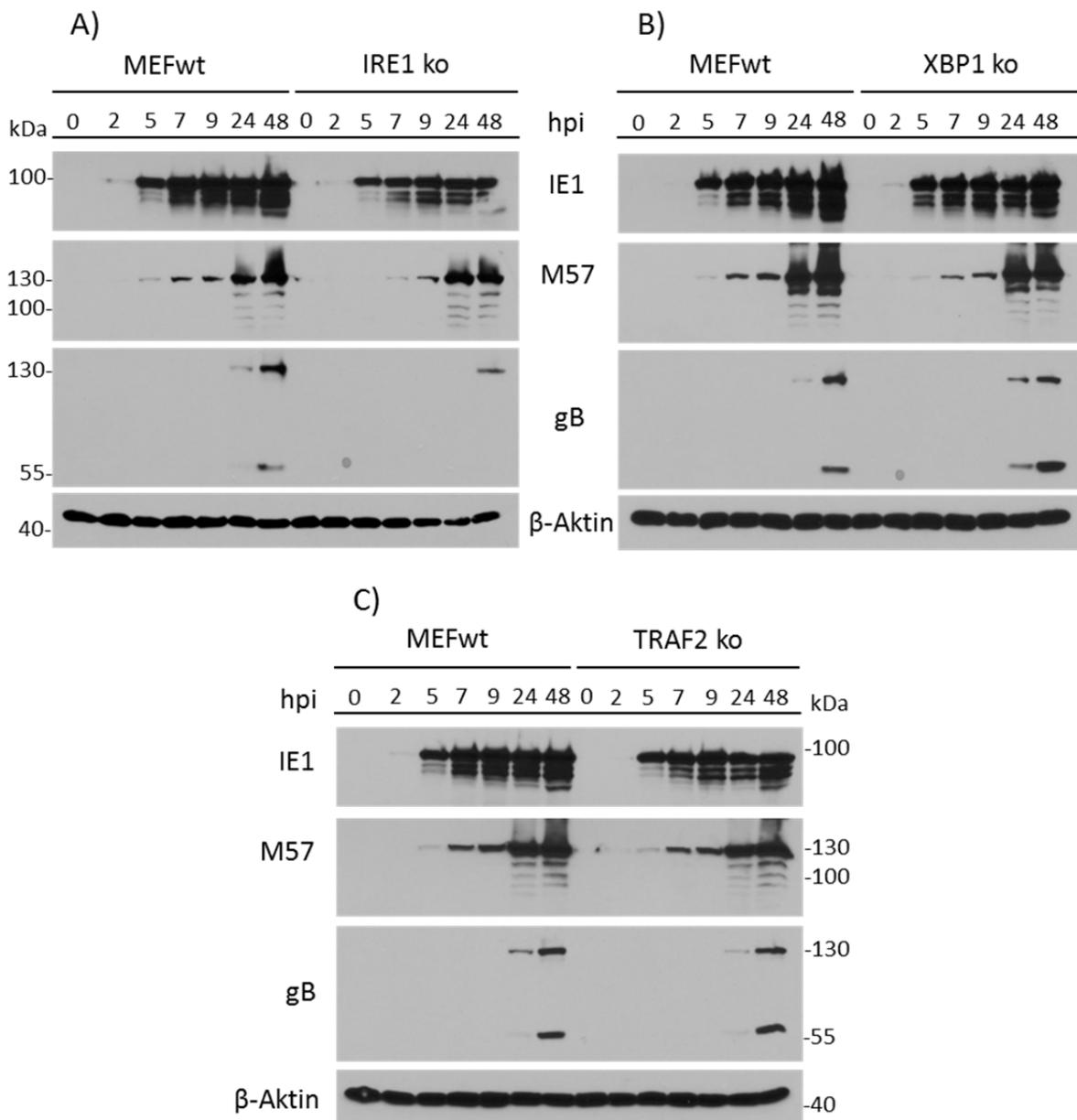


Abbildung 12: Expressionsanalyse von viralen Proteinen in den CRISPR/ Cas9-Knockout-Zelllinien. (A) MEF_{wt} vs. IRE1 ko, (B) MEF_{wt} vs. XBP1 ko und (C) MEF_{wt} vs. TRAF2 ko. Die Zelllinien wurden mit MCMV und einer MOI von 0,5 TCID₅₀/Zelle infiziert. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen mit RIPA-Puffer lysiert. Analysiert wurde die Expression von IE1, M57 und gB. Mit dem gB-Antikörper werden zwei Banden detektiert. Die höhere Bande mit ~130 kDa ist das glykolisierte Vorläuferprotein und die niedrigere Bande mit ~55 kDa detektiert ein Teil des gespaltenen gB-Heterodimerprotein. β-Aktin diente als Ladekontrolle. kDa: Kilodalton

2.3 Komplementation der CRISPR/Cas9-IRE1 ko-Zellen mit Wildtyp IRE1 und der Einfluss auf die MCMV-Replikation

Die Wachstumskurven aus Abbildung 11 haben bestätigt, dass ausschließlich der Verlust von IRE1 eine Verminderung der viralen Replikation und eine schwächere virale Proteinexpression auslöst. Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob eine Komplementation der IRE1 ko-Zellen mit Wildtyp-IRE1 die virale Replikation wiederherstellt. Für die Komplementation musste die Gensequenz des IRE1 modifiziert werden, dass sie nicht mehr von der gRNA erkannt und von dem Cas9-Protein geschnitten werden kann. Mittels PCR wurde zuerst das IRE1-Gen amplifiziert. Anschließend wurden die ersten 531 bp des IRE1 mittels einer *Sma*I-Schnittstelle entfernt. Dieses Genstück trug die Erkennungssequenzen des Cas9-Proteins. Der ca. 2450 bp große Rest des IRE1 wurde im weiteren Schritt mit einer modifizierten 531 bp-langen-Sequenz amplifiziert (siehe 5.8). Im modifizierten Teil des IRE1 wurden die Erkennungssequenzen (PAM) für das Cas9-Protein zerstört. Die Aminosäuresequenz des IRE1-Proteins wurde dadurch nicht kompromittiert. Das modifizierte IRE1 (= IRE1_{wt-mod}, Abbildung 13) wurde in ein retrovirales Plasmid ligiert und in IRE1 ko-Zellen transduziert. Des Weiteren wurde in das IRE1_{wt-mod} eine Punktmutation in die Endoribonukleasedomäne mittels *QuikChange*-Mutagenese eingefügt (= IRE1_{K907A}, Abbildung 13). Diese Mutation verhindert das Spleißen der *Xbp1*-mRNA. Mit dieser Mutante sollte geklärt werden, ob die IRE1-Expression oder das Spleißen für die Virusreplikation von Bedeutung ist.

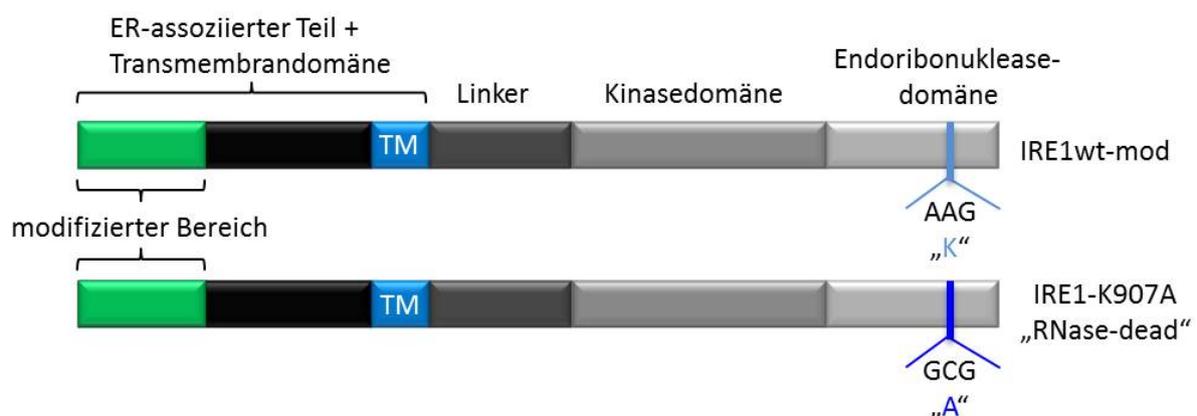


Abbildung 13: Schematische Darstellung des IRE1_{wt-mod} und IRE1_{K907A}. Dargestellt ist der Unterschied zwischen dem modifizierten Wildtyp-IRE1 und der IRE1-K907A-Mutante, bei der das Lysin (K) 907 in ein Alanin (A) durch *QuikChange*-Mutagenese verändert wurde. Zusätzlich ist der modifizierte Bereich in dem ER-assoziierten Teil grün markiert. TM: Transmembrandomäne, RNase-dead: Funktionsverlust des IRE1 das Spleißen der *Xbp1*-mRNA durchzuführen

Ergebnisse

Nach erfolgreicher Transduktion und Selektion wurde im nächsten Schritt die Expression des IRE1- und XBP1-Proteins im Western Blot bestätigt. MEF_{wt}-Zellen dienten als Positiv- und IRE1 ko-Zellen als Negativkontrolle der Proteinexpression. Zusätzlich wurde mit Thapsigargin stimuliert, um eine Aktivierung des IRE1-Signalweges zu erhalten. Wie erwartet konnte in MEF_{wt}-Zellen eine Expression des IRE1-Proteins und eine starke Bande des XBP1s-Proteins nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigten die IRE1 ko-Zellen keine IRE1-Expression und eine starke XBP1u-Proteinbande (Abbildung 14A). Mittels IRE1-Komplementation konnte die IRE1- und XBP1s-Expression wiederhergestellt werden. In den IRE1_{K907A}-komplementierten Zellen wurde ebenfalls eine starke Expression des IRE1-Proteins festgestellt. Erwartungsgemäß führte die Mutation in der IRE1-Endoribonukleasedomäne zu einem Verlust des *Xbp1*-mRNA-Spleißens und einer entsprechend starken Expression des XBP1u-Proteins (Abbildung 14A).

Im weiteren Schritt wurden die Zelllinien mit MCMV infiziert und die Virusreplikation mit Hilfe einer Niedrig-MOI-Wachstumskurve in einem definierten Untersuchungszeitraum analysiert. Abbildung 14B zeigt die Auswertung der Titration. Die Virusreplikation in MEF_{wt}-Zellen und in den IRE1 ko + IRE1wt-mod-Zellen verlief mit ähnlicher Wachstumskinetik, wobei keine signifikanten Unterschiede im Titer ermittelt wurden. Der maximale Titer konnte an Tag 7 mit ca. 2×10^5 TCID₅₀/ml bestimmt werden (Abbildung 14B). Im Gegensatz dazu führte eine MCMV-Infektion der IRE1 ko- und IRE1 ko + IRE1-K907A-Zellen bereits an Tag 3 zu einem verminderten Viruswachstum. Im weiteren Infektionsverlauf konnte zwar eine Steigerung der Virusreplikation in beiden Zelllinien festgestellt werden, jedoch zu deutlich geringeren Virustitern. Die höchsten Titer wurden an Tag 7 mit ca. 4×10^3 TCID₅₀/ml bestimmt und waren ca. 100-fach niedriger als in den IRE1wt-exprimierenden Zellen (Abbildung 14B).

Ergebnisse

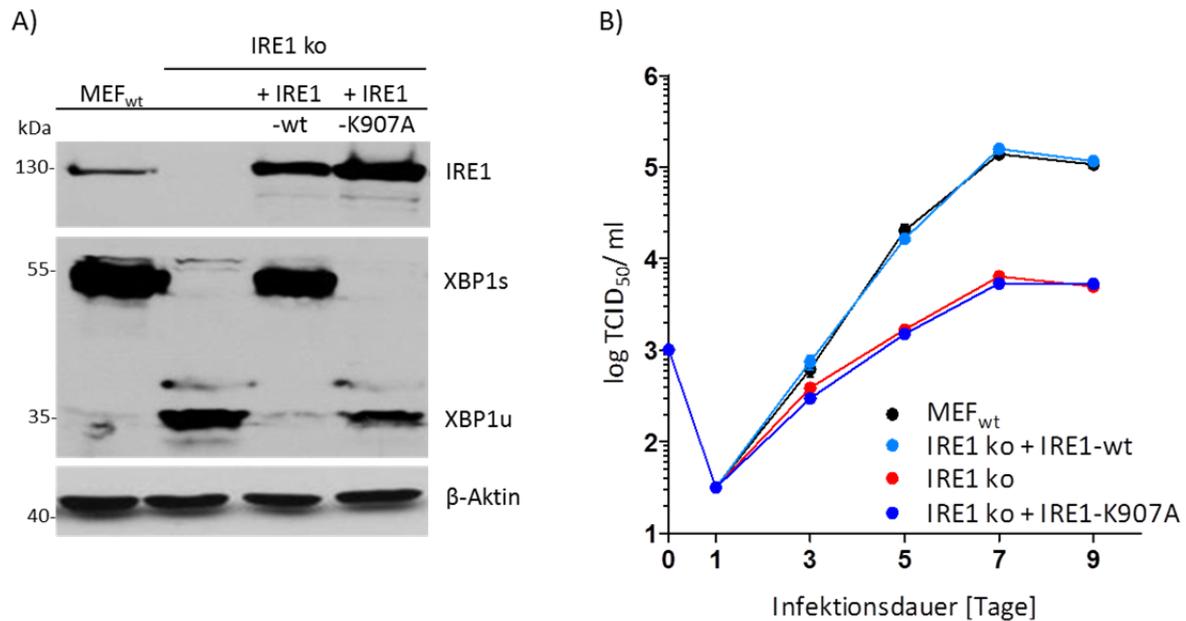


Abbildung 14: Expressions- und Replikationsanalyse nach Komplementation der IRE1 ko-Zellen. (A) Hierzu wurden Zellen in einer 6-Loch-Platte ausgesät und nach 24 h mit 2 μ M Thapsigargin behandelt. Zum Lysieren wurde entweder RIPA-Puffer oder das Kernextraktionsprotokoll angewendet. Als Kontrolle dienten MEF_{wt}-Zellen und als Ladekontrolle β -Aktin. (B) Hierzu wurden die jeweiligen Zelllinien in Triplikaten ausgesät und mit einer MOI von 0,1 TCID₅₀/Zelle infiziert. Das Medium wurde zu den angegebenen Tagen ausgetauscht und der Virustiter im Überstand mittels Titration bestimmt. kDa: Kilodalton

2.4 Replikationskinetik des MCMV in XBP1/IRE1-Doppelknockout Zellen

Die bisherigen Ergebnisse bewiesen, dass ein Gen-Knockout von XBP1 keinen wesentlichen Effekt auf die virale Replikation und Proteinexpression hatte. Im Gegensatz dazu hatte der Gen-Knockout von IRE1 einen drastischen Effekt auf die MCMV-Replikation. Die Hauptunterschiede zwischen den Zelllinien bestehen erstens aus der Expression des IRE1-Proteins in XBP1 ko-Zellen und zweitens aus der starken XBP1u-Proteinexpression in IRE1 ko-Zellen (Abbildung 10B). Daher wollte ich prüfen, ob IRE1 oder XBP1u der entscheidende Faktor für die Verminderung der viralen Replikation in IRE1 ko-Zellen ist. Für die Analyse wurde die Expression des IRE1-Proteins mittels der CRISPR/Cas9-Methode aus MEF-XBP1-ko-Zellen entfernt. Nach Transduktion, Selektion und Einzelzellklonierung wurden zwei Zellklone auf die Abwesenheit des IRE1-Proteins untersucht. MEF_{wt}⁻ und IRE1 ko-Zellen dienten als Positivkontrollen für die Expression des IRE1, des XBP1s und des XBP1u. Die MEF-XBP1-ko-Zellen dienten als Kontrolle für die Abwesenheit der XBP1-Expression. Zusätzlich wurde mit Thapsigargin stimuliert, um eine Aktivierung des IRE1-Signalweges zu erhalten. Abbildung 15A zeigt die Auswertung der Proteinexpression im Western Blot. In beiden Doppelknockout-Zelllinien konnte keine Expressionen der IRE1- und XBP1-Proteine festgestellt werden. Die Positivkontrollen bestätigten die Expression des XBP1s-Proteins in

Ergebnisse

den MEF_{wt}-Zellen und des XBP1u-Proteins in IRE1 ko-Zellen (Abbildung 15A). Der Nachweis von β -Aktin zeigte, dass vergleichbare Mengen an Protein geladen wurden.

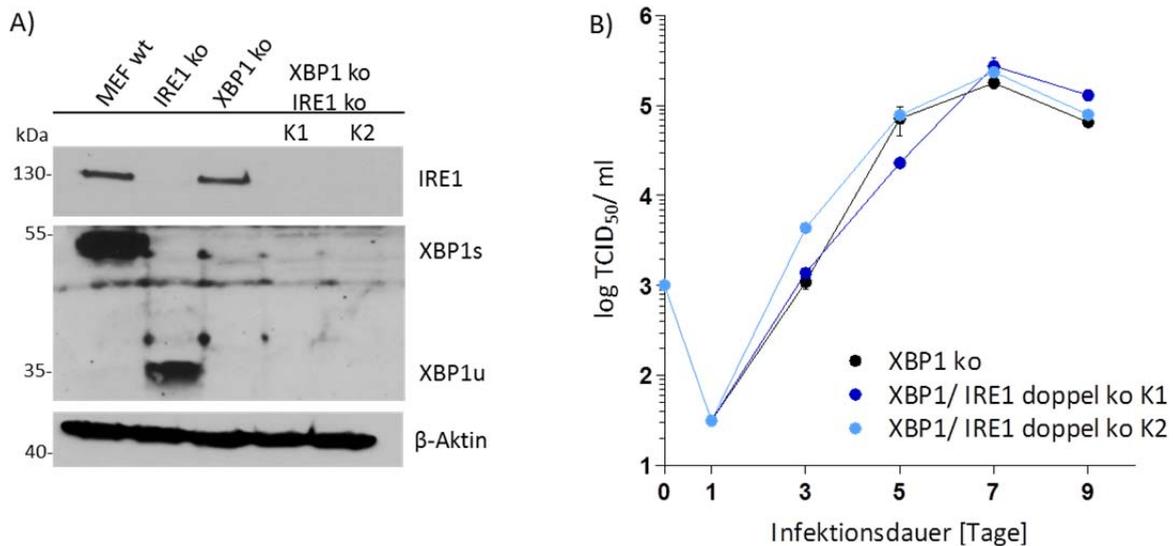


Abbildung 15: Expressions- und Replikationsanalyse nach Doppelknockout von XBP1 und IRE1. (A) Hierzu wurden Zellen in einer 6-Loch-Platte ausgesät und nach 24 h mit 2 μ M Thapsigargin behandelt um ER-Stress auszulösen. Zum Lysieren wurde entweder RIPA-Puffer oder das Kernextraktionsprotokoll angewendet. Als Kontrolle dienten MEF_{wt}-Zellen und IRE1 ko-Zellen für die Kontrolle der IRE1- und XBP1s/ u Proteinexpression. Als Ladekontrolle diente β -Aktin. (B) Die jeweiligen Zelllinien wurden in Triplikaten ausgesät und mit einer MOI von 0,1 TCID₅₀/Zelle infiziert. Das Medium wurde zu den angegebenen Tagen ausgetauscht und der Virustiter im Überstand mittels Titration bestimmt. K1 = Zellklon 1; K2 = Zellklon 2 – zwei unabhängige Zellklone aus unterschiedlichen gRNAs, kDa: Kilodalton

Der Doppelknockout konnte im Western Blot erfolgreich bestätigt werden. Anschließend wurden die XBP1-ko-/IRE1-ko-Zellen infiziert, um die MCMV-Replikation anhand einer Niedrig-MOI-Wachstumskurve zu untersuchen. Als Kontrolle dienten die parentalen MEF-XBP1-ko-Zellen. Proben zur Bestimmung des Virustiters wurden an den angegebenen Tagen in Triplikaten genommen. Abbildung 15B zeigt den Verlauf der Virusreplikation in den untersuchten Zelllinien. Es konnten keine signifikanten Unterschiede im Virustiter im gesamten Untersuchungszeitraum beobachtet werden. Der maximale Titer wurde an Tag 7 mit ca. 2×10^5 TCID₅₀/ml gemessen.

2.5 Komplementation der XBP1 ko-Zellen mit XBP1-Wildtyp, XBP1_{stop} oder XBP1u und der Einfluss auf die MCMV-Replikation

Die funktionelle MCMV-Replikation nach IRE1-ko/XBP1-ko hat verdeutlicht, dass eine Abwesenheit des IRE1-Proteins, bei zeitgleicher Abwesenheit des XBP1-Proteins, keinen Einfluss auf das MCMV-Wachstum hatte. Daraus lässt sich schließen, dass eine Überexpression des XBP1u-Proteins ein negativer Faktor in Bezug auf die MCMV-Replikation

Ergebnisse

darstellt. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden MEF-XBP1-ko-Zellen mit unterschiedlichen Varianten des XBP1-Gen komplementiert. Diese Varianten sind in Abbildung 16A-C dargestellt. Die Zellen wurden mit der Wildtypsequenz des XBP1 ($XBP1_{wt}$, A), mit einer Verkürzungsmutante von XBP1 ($XBP1_{stop}$, B) und mit einer Sequenz komplementiert, welche zwei stille Mutationen in der Intron-Spleißstelle trägt ($XBP1_{unspl}$, C). Die Mutationen verhindern, dass die *Xbp1*-mRNA durch die IRE1-Endoribonukleasedomäne gespleißt werden kann, sie wird dadurch „unspleißbar“. Dies resultiert in einer alleinigen Expression des XBP1u-Proteins. Um die Detektion der XBP1-Proteine zu erleichtern wurden die Proteine mit einem N-terminalen HA-Tag markiert.

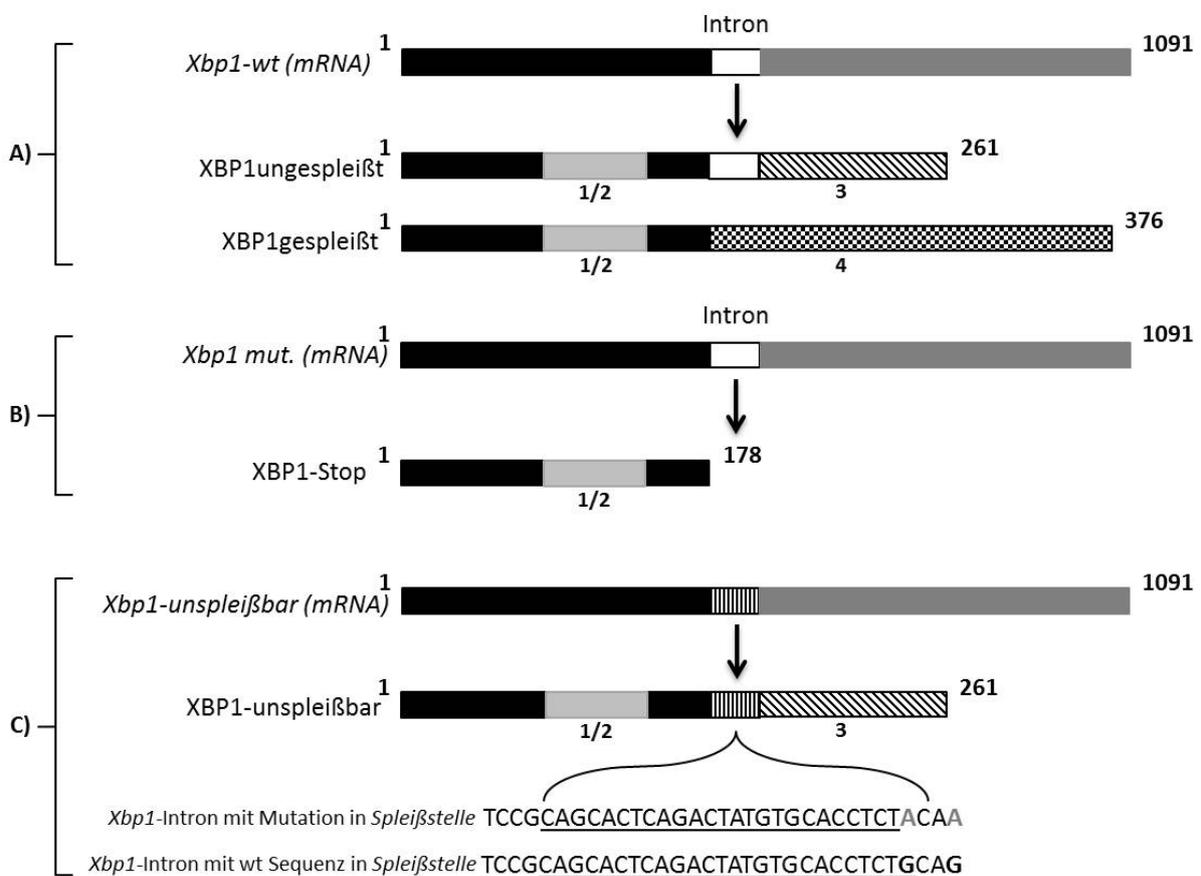


Abbildung 16: Schematische Darstellung der XBP1-Varianten. A) XBP1-wt, B) XBP1 Stop; nach 531bp wurde ein Stopcodon eingefügt. Dadurch wird nur den N-terminalen Teil des XBP1-Proteins exprimiert, C) XBP1-unspleißbar; Zwei stille Mutationen wurden in die Intron-Spleißstelle eingefügt, welches das Spleißen der *Xbp1*-mRNA blockiert. Zum Nachweis wurde ein N-terminaler HA-Tag angefügt. 1/2 = BASIC Domäne + NLS/ Leucin Zipper Domäne, 3 = NES/ Translationsstop + Degradierungsdomäne, 4 = Transaktivatordomäne.

Nach erfolgreicher Transduktion und Selektion wurden mittels Western Blot die Expression der XBP1-Proteine überprüft. MEF-XBP1-ko-Zellen dienten als Positivkontrolle für die Abwesenheit von XBP1. Abbildung 17A zeigt die Expression der unterschiedlichen XBP1-

Ergebnisse

Varianten nach zusätzlicher Induktion des ER-Stresses mit Thapsigargin. Eine XBP1_{wt}-Komplementation zeigte eine schwache Bande des XBP1u- und eine starke Bande des XBP1s-Proteins mit dem HA- und XBP1-Antikörper. Die Komplementation mit der unspleißbaren XBP1-Variante resultierte in einer erhöhten Expression des XBP1u-Proteins. In den MEF-XBP1-ko-Zellen, welche mit der Verkürzungsmutante XBP1_{stop} komplementiert wurden, konnte eine sehr starke Bande nachgewiesen werden. Diese lief im Western Blot deutlich unterhalb der XBP1u-Bande (Abbildung 17A). In Kontrollzellen konnte kein Protein mit dem endogenen XBP1- oder HA-Antikörper nachgewiesen werden. Die gleichmäßige Expression von β -Aktin bestätigte, dass identische Mengen an Gesamtprotein geladen wurden.

Anschließend wurde mittels einer Niedrig-MOI-Wachstumskurve überprüft, welche Auswirkungen die verschiedenen XBP1-Komplementationen auf die MCMV-Replikation hatten. Als Kontrolle dienten MEF-XBP1-ko-Zellen, welche mit einem Leervektor transduziert wurden. Proben zur Bestimmung des Virustiters wurden an den angegebenen Tagen genommen. Abbildung 17B zeigt den Verlauf des Viruswachstums in den untersuchten Zelllinien. Die Infektion der XBP1 ko + Leervektor- und XBP1 ko + XBP1_{wt}-Zellen zeigten ein Viruswachstum mit ähnlicher Kinetik und vergleichbaren Virustitern im gesamten Untersuchungszeitraum. Der maximale Titer wurde an Tag 7 mit ca. 4×10^5 TCID₅₀/ml bestimmt (Abbildung 17B). Die Komplementation mit XBP1_{unspl.} und XBP1_{stop} der XBP1 ko-Zellen resultierte in einer deutlichen Verminderung im Viruswachstum, ähnlich der Replikation in IRE1 ko-Zellen (siehe Abbildung 11A). Bereits ab Tag 5 konnte eine verlangsamte Kinetik der Virusreplikation festgestellt werden. An Tag 7 wurde der höchste Titer mit ca. 8×10^3 TCID₅₀/ml gemessen und war um etwa 1,5 Log-Stufen geringer als der Titer in den Leervektor-transduzierten Zellen (Abbildung 17B).

Ergebnisse

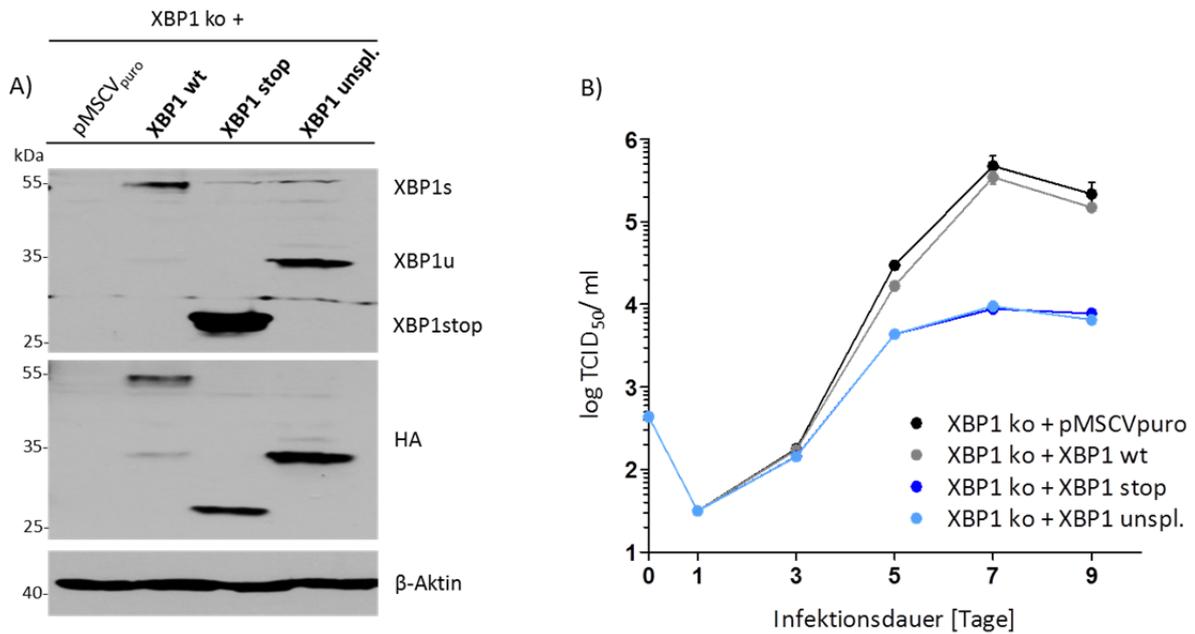


Abbildung 17: Expressions- und Replikationsanalyse der XBP1 ko-Zellen nach Komplementation mit verschiedenen XBP1-Varianten. (A) Die transduzierten Zellen wurden in einer 6-Loch-Platte ausgesät und mit 2 μ M Thapsigargin inkubiert. Zum Lysieren wurde entweder RIPA-Puffer oder das Kernextraktionsprotokoll angewendet. Als Kontrolle dienten XBP1 ko-Zellen, welche mit einem Leervektor (pMSCV_{Puro}) transduziert wurden. Als Ladekontrolle diente β -Aktin. **(B)** Die jeweiligen Zelllinien wurden in Triplikaten ausgesät und mit einer MOI von 0,1 TCID₅₀/Zelle infiziert. Das Medium wurde zu den angegebenen Tagen ausgetauscht und der Virustiter im Überstand durch Titration auf 10.1-Zellen bestimmt. kDa: Kilodalton, wt: Wildtyp, unspl: Unspleißbar

2.6 ATF6 α -Knockout und der Einfluss auf die MCMV-Replikation und virale Genexpression

Die Ergebnisse aus Abbildung 17B zeigen deutlich, dass eine Überexpression des XBP1u-Proteins eine Verminderung der viralen Replikation verursacht. Jedoch stellt sich die Frage, wie das XBP1u- oder der N-Terminale Teil des XBP1-Proteins (XBP1-Stop) das Viruswachstum negativ beeinflussen könnte. Beispielsweise ist aus früheren Studien bekannt, dass das XBP1s-Protein und die aktive Form des ATF6 α synergistisch innerhalb bestimmter Promotoren wirken können. Diese Synergie verstärkt die Transkription von verschiedenen ER-Stress-induzierten Genen, beispielsweise BiP und XBP1. Es könnte vermutet werden, dass die Überexpression des XBP1u-Proteins und die Abwesenheit des IRE1-Proteins die ATF6 α -vermittelte Aktivierung der Transkription beeinflussen könnte. Ein ATF6 α -Knockout könnte die Theorie bestätigen. Dafür wurden mir primäre ATF6 α +/+ und ATF6 α -/- Zellen von unserem Kooperationspartner (Prof. Thomas Rutkowski, University of Iowa) bereitgestellt. Die Zellen wurden mit Hilfe retroviraler Transduktion des *Large-T*-Antigens von SV40 immortalisiert (= LT, siehe 6.2.14, (Wu et al., 2007)). Nach erfolgreicher Immortalisierung

Ergebnisse

wurden die Zellen auf die An- oder Abwesenheit des ATF6 α -Proteins überprüft. Es kamen verschiedene Antikörper gegen das endogene ATF6 α -Protein zum Einsatz. Jedoch konnten auch nach mehreren Experimenten, Testung verschiedener Zellyseprotokolle und Antikörperverdünnungen keine Bande des ATF6 α -Proteins und des Spaltproduktes im Western Blot nachgewiesen werden (Daten nicht abgebildet). Deswegen wurde eine Genotypisierung mit spezifischen Primern für die Wildtyp- und Knockout-Zellen durchgeführt ((Wu et al., 2007), siehe 5.8). Abbildung 18 zeigt das Resultat der PCR. Es konnte eine ca. 215 bp große Bande in ATF6 α +/+ aber nicht in ATF6 α -/- Zellen nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurde ein ca. 300 bp große Amplifikat in ATF6 α -/- Zellen detektiert (Abbildung 18). Diese Ergebnisse decken sich mit den beschriebenen Daten aus der Publikation von Wu et al.

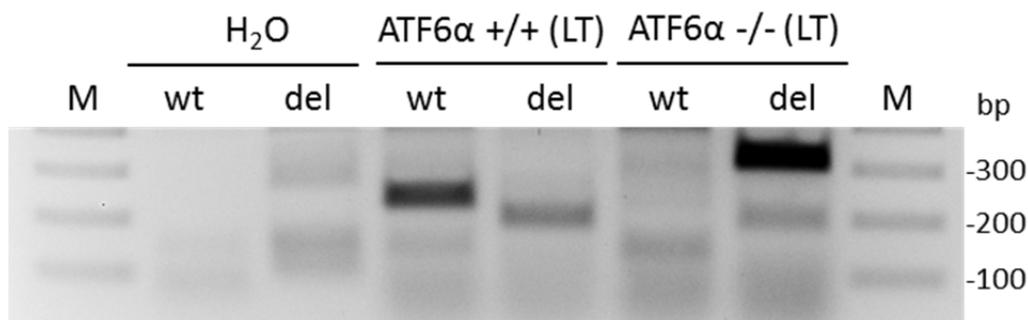


Abbildung 18: Genotypisierung der ATF6 α +/+ und -/- Zellen. Hierfür wurden ATF6 α +/+ und -/- Zellen ausgesät und die RNA nach 24 h extrahiert, in cDNA umgeschrieben und die An- oder Abwesenheit von ATF6 α mittels PCR Amplifikation überprüft. Die erwarteten PCR-Produkte sind ca. 215 bp (wt = Wildtyp ATF6) und 300 bp (del = Knockout ATF6 α) groß. Die Primersequenzen sind in 5.8 aufgelistet und die PCR wie von Wu et al beschrieben durchgeführt. LT: immortalisiert durch das Große-T-Antigen (-Large-T-Antigene) von SV40, bp: Basenpaare, wt: Wildtyp, del: Deletion

Im nachfolgenden wurden die erfolgreich-immortalisierten Zelllinien verwendet, um die Replikationseffizienz des MCMV mittels einer Niedrig-MOI-Wachstumskurve zu analysieren. Proben zur Bestimmung des Virustiters wurden an den angegebenen Tagen genommen und im Anschluss auf 10.1-Zellen titriert. Abbildung 19B zeigt den Verlauf des Viruswachstums. Es konnte gezeigt werden, dass die MCMV-Replikation in ATF6 α +/+ und ATF6 α -/- Zellen mit ähnlicher Kinetik verlief. Der maximale Titer wurde an Tag 9 mit einem Wert von ca. 7×10^5 TCID₅₀/ml gemessen (Abbildung 19B). Als Bestätigung wurde die virale Genexpression im Western Blot analysiert. Untersucht wurden IE1, M57 und gB als virale Proteine und β -Aktin als Ladekontrolle. Es konnte kein Unterschied in der viralen Proteinexpression in den ATF6 α +/+ und ATF6 α -/- Zellen festgestellt werden (Abbildung 19A). Einziger Unterschied zeigte die gB-Expression. 24 h nach Infektion konnte eine schwache Bande in ATF6 α +/+

Ergebnisse

Zellen detektiert werden. Jedoch erst 48 h nach Infektion in ATF6 α -/- Zellen. Der gleichmäßige Nachweis von β -Aktin zeigte, dass vergleichbare Mengen an Gesamtprotein geladen wurden (Abbildung 19A). Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass der Verlust von ATF6 α die MCMV-Replikation in Maus-Fibroblasten nicht negativ beeinflusst.

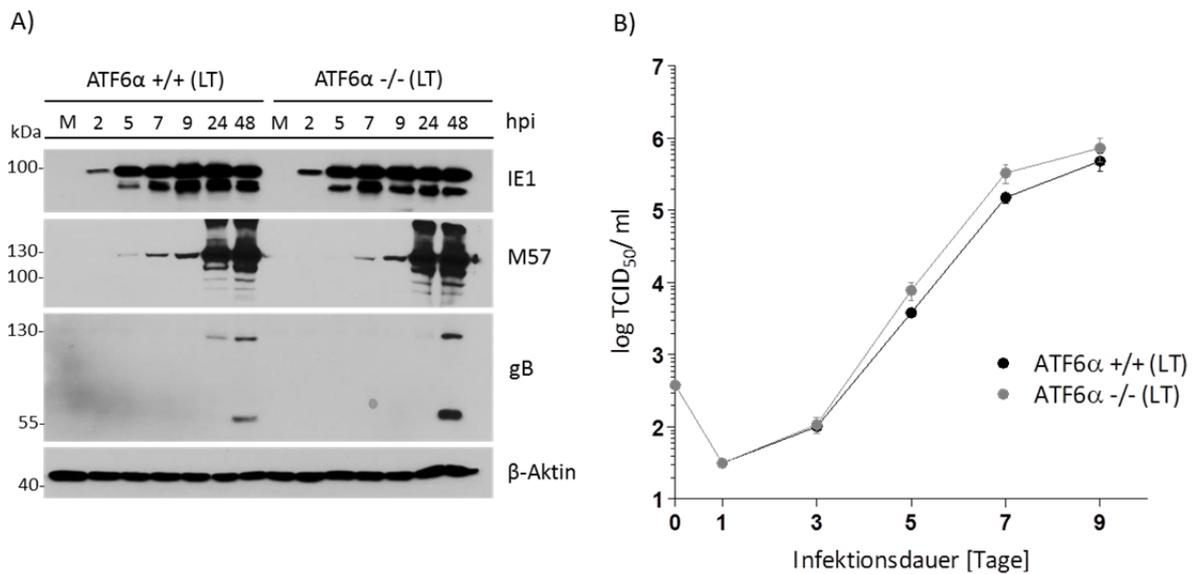


Abbildung 19: Expressions- und Replikationsanalyse von ATF6 α +/+ und ATF6 α -/- Zellen. (A) Die Zelllinien wurden mit MCMV und einer MOI von 0,5 TCID₅₀/ ml infiziert. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen mit RIPA-Puffer lysiert. Analysiert wurde die Expression der viralen Proteine IE1, M57 und gB. β -Aktin diente als Ladekontrolle. (B) Hierzu wurden die jeweiligen Zelllinien in Triplikaten ausgesät und mit einer MOI von 0,1 TCID₅₀/ ml infiziert. Das Medium wurde zu den angegebenen Tagen ausgetauscht und der Virustiter im Überstand durch Titration auf 10.1-Fibroblasten bestimmt. LT: immortalisiert durch das Große-T-Antigen von SV40, kDa: Kilodalton, hpi: Stunden nach Infektion (-hours post infection)

2.7 Replikationskinetik des MCMV in ATF6 α /XBP1-Doppelknockout Zellen

Wie bereits von mehreren Gruppen beschrieben bilden beide Proteine, ATF6 α und XBP1s, eine Synergie während einer akuten ER-Stresssituation aus, um die Transkription bestimmter Gene, beispielsweise BiP und XBP1, zu verstärken. Ein Einzelknockout von ATF6 α oder XBP1 hatte jedoch keinen Effekt auf die virale Replikation. Aus diesem Grund wollte ich überprüfen, ob ein Doppelknockout beider Proteine die MCMV-Replikation hemmt. Die ATF6 α -/- Zellen wurden verwendet, um ein Doppelknockout herzustellen. Hierfür wurde abermals die CRISPR/Cas9-Methode und die in Abbildung 10 verwendeten gRNAs für das XBP1 angewendet. Nach Selektion und Einzelzellklonierung wurde der XBP1-Knockout im Western Blot bestätigt. Abbildung 20A zeigt die Auswertung. Nach ER-Stressinduktion mit Thapsigargin und Aktivierung des IRE1-XBP1-Signalweges konnte eine starke XBP1s-Proteinbande in den ATF6 α -/- Zellen aber keine für das XBP1u-Protein nachgewiesen werden. In dem Doppelknockout-Zellklon K2 konnte keine sichtbare Bande für das XBP1s-

Ergebnisse

und XBP1u-Protein detektiert werden. Zellklon K1 zeigte trotz Einzelzellklonierung immer noch eine starke Bande für das XBP1s. Aus diesem Grund wurde für die nachfolgende Multistep-Wachstumskurve nur der Zellklon K2 verwendet, um die Replikationseffizienz von MCMV zu analysieren. Abbildung 20B zeigt die Auswertung der Wachstumskurve nach Titration. Das Viruswachstum war in den ATF6 α -/-/XBP1 ko-Zellen bereits ab Tag 3 deutlich vermindert. Der maximale Titer wurde an Tag 9 mit ca. 4×10^3 TCID₅₀/ml gemessen (Abbildung 20B). Die Replikationseffizienz von MCMV in den Kontrollzellen war vergleichbar mit dem Ergebnis aus Abbildung 19B und der höchste Titer wurde ebenfalls an Tag 9 mit einem Wert von ca. 1×10^5 TCID₅₀/ml gemessen. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass ein Doppelknockout von ATF6 α und XBP1 zu einer deutlichen Verminderung in der MCMV-Replikation führt.

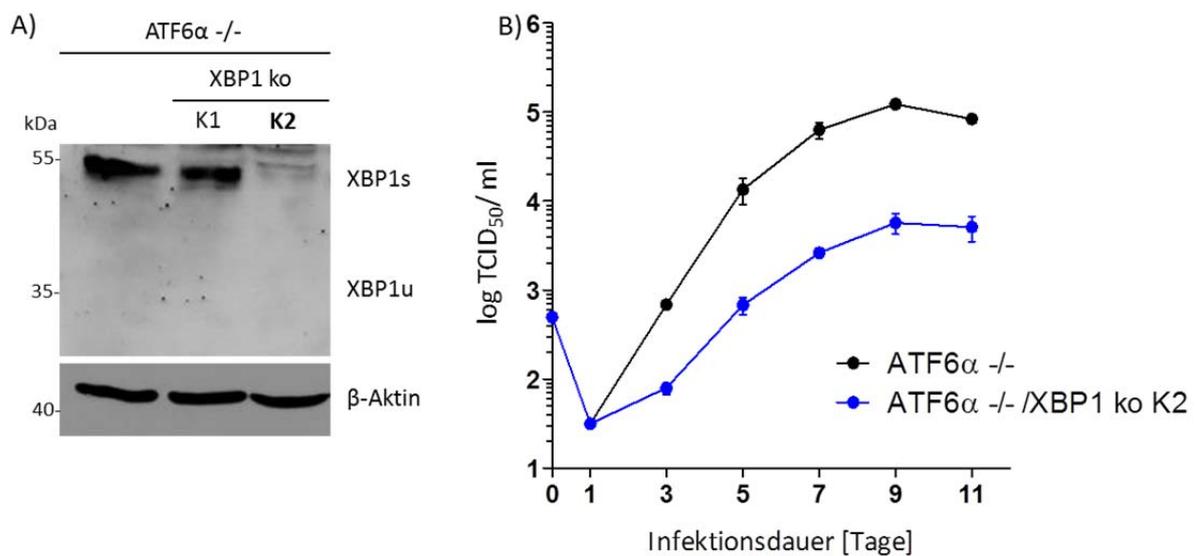


Abbildung 20: Expressions- und Replikationsanalyse nach Knockout von XBP1 in ATF6 α -/- Zellen. (A) Die Einzelzellklone wurden in einer 6-Loch-Platte ausgesät und nach 24 h mit 2 μ M Thapsigargin behandelt. Zum Lysieren wurde entweder RIPA-Puffer oder das Kernextraktionsprotokoll angewendet. Als Kontrolle dienten ATF6 α -/- Zellen. Als Ladekontrolle diente β -Aktin. **(B)** Hierzu wurden die jeweiligen Zelllinien in Triplikaten ausgesät und mit einer MOI von 0,1 TCID₅₀/Zelle infiziert. Das Medium wurde zu den angegebenen Tagen ausgetauscht und der Virustiter im Überstand durch Titration auf 10.1 Fibroblasten bestimmt. kDa: Kilodalton, K: Klon

3 Ergebnisse II

Bereits publizierte Ergebnisse aus unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass der UPR-Sensor IRE1 zu späten Zeitpunkten einer murinen Cytomegalovirusinfektion degradiert wird. Verursacht wird dies durch eine Interaktion zwischen IRE1 und dem viralen Protein M50 (Stahl et al., 2013). M50 ist zusammen mit M53 ein Bestandteil des Kernausschleusungskomplexes (NEC – *Nuclear Export Complex*), der dazu dient neu-gebildete Viruskapside aus dem Kern in das Zytoplasma zu transportieren. Er ist daher essentiell für die produktive MCMV-Replikation (Muranyi et al., 2002). Für die Degradierung der IRE1-Proteinmenge konnte Stahl et al. bereits zeigen, dass der N-terminale Bereich von M50 verantwortlich ist. Die M50-Domäne und der Mechanismus waren zu Beginn der Arbeit noch nicht im Detail aufgeklärt (Stahl et al., 2013).

Basierend auf den publizierten Ergebnissen von Stahl et al. waren die nachfolgenden Ziele meiner Arbeit wie folgt: 1. Aufklärung des M50-vermittelte IRE1-Abbaumechanismus und 2. Identifikation einer minimale M50-Domäne, welche für die IRE1- Interaktion und -Degradierung verantwortlich ist. Der Hintergrund war die funktionelle Trennung der zwei publizierten M50-Funktionen während einer MCMV-Infektion, a. Interaktion mit M53 und essentieller Bestandteil des NEC und b. IRE1-Interaktion/ -Degradierung. Diese Trennung sollte zu einer Virusmutante führen, die nicht mehr in der Lage wäre das IRE1-Protein abzubauen aber immer noch mit M53 zu interagieren. Hierdurch könnte ich Rückschlüsse ziehen, ob ein funktioneller IRE1-XBP1-Signalweg in späten Phasen für die MCMV-Replikation schädlich ist.

3.1 Konstruktion von M50-Deletionsmutanten und deren funktionelle Charakterisierung

Basierend auf den Bereich des M50, der für die Degradierung der IRE1-Proteinmenge verantwortlich ist, wurden weitere Deletionsmutanten konstruiert. Zum einen, wurde der Bereich zwischen Aminosäure 120 – 170 der konservierten Region komplett deletiert und in 10er-Schritten verkleinert. Zum anderen, wurde der N-terminale-konservierte Bereich des M50 bis Aminosäure 34 oder 68 deletiert. Um die Proteine leichter zu detektieren und Immunpräzipitationen durchzuführen wurden alle M50-Mutanten mit einer C-terminalen Flag-Markierung versehen (Abbildung 21).

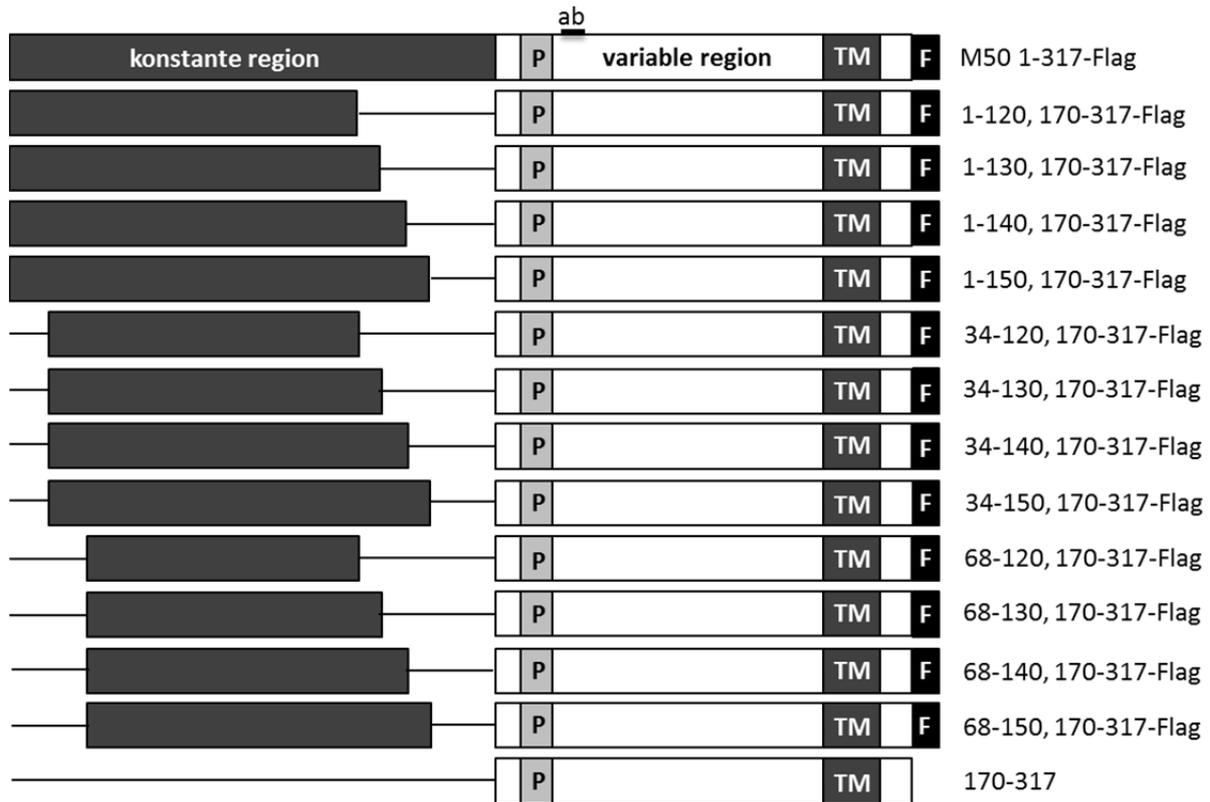


Abbildung 21: Schematische Darstellung der konstruierten M50-Verkürzungs- und Deletionsmutanten. Das M50 besitzt eine N-terminale konstante Region und einen variablen C-terminalen Bereich. In die Region zwischen Aminosäure 120-170 wurden verschieden-große Deletionen eingefügt. Außerdem wurde das M50 in der Region 1-67 verkürzt. P: Prolin-reiche Region, TM: Transmembrandomäne, ab: Bindestelle für den endogenen M50-Antikörper, F: Flag-Markierung

Nachdem alle Konstrukte erfolgreich kloniert waren wurden diese auf ihre Fähigkeit zur Reduktion der IRE1-Proteinmenge analysiert. In 3T3-Fibroblasten wurden die Plasmidkonstrukte von IRE1 und je eine M50-Deletionsmutante co-transfiziert. Die Expression der Proteine wurde im Western Blot untersucht. Die Expression der M50-Verkürzungsmutante 170-317 und das UL56, ein Transmembranproteins aus HSV-1, dienten in den Experimenten als Negativkontrollen. Beide Proteine reduzieren weder die IRE1-Menge noch interagieren sie mit IRE1. Das Volllängen-M50-Plasmid (M50 1-317) diente in den Experimenten als Positivkontrolle (Stahl et al., 2013). Abbildung 22 zeigt ein repräsentatives Resultat eines Co-Transfektionsexperiments. Die Co-Transfektionen der M50-Mutanten mit den deletierten Aminosäuren 120-170 und 130-170 resultierten in einer Inhibition des IRE1-Abbaus ähnlich der Negativkontrolle. Die 140-170-M50-Deletionsmutante zeigte im Experiment einen intermediären Phänotyp bezüglich des IRE1-Abbaus (Abbildung 22). Durch die Verkleinerung des deletierten Bereiches um weitere 10 Aminosäuren, M50-Mutante 150-170, konnte die IRE1-Degradierung vollständig

Ergebnisse

wiederhergestellt werden. Vergleichbare Ergebnisse wurden mit den N-terminalen Verkürzungsmutanten erzielt (Daten nicht abgebildet). Somit deuten die Ergebnisse daraufhin, dass der Bereich zwischen den Aminosäuren 120-150 im M50-Protein für die IRE1-Degradierung verantwortlich ist.

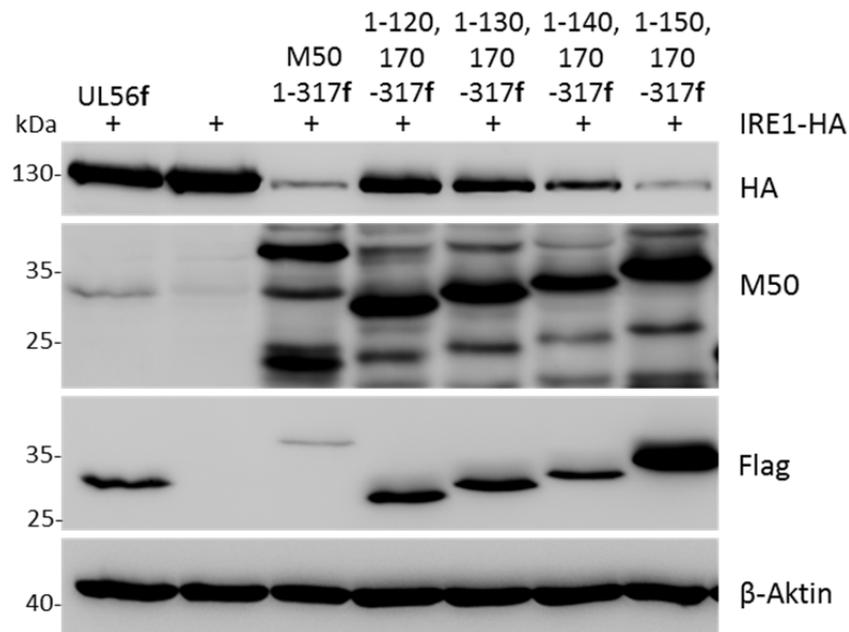


Abbildung 22: Analyse der IRE1-Degradierung der M50-Verkürzungs- und -Deletionsmutanten. Die verschiedenen M50-Mutanten wurden zusammen mit HA-markiertem IRE1 in NIH3T3-Zellen co-transfiziert. Als Kontrollen dienten der Leervektor und das UL56 von HSV-1. Nach 24 h wurden Lysate mittels RIPA-Puffer hergestellt und mit Hilfe der SDS-Page elektrophoretisch getrennt. Die Detektion der Proteine erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen das HA, M50 und Flag. β-Aktin diente als Ladekontrolle. f: Flag-Markierung, kDa: Kilodalton

Anschließend wurde eine Co-Immunopräzipitation durchgeführt, um zu überprüfen, ob eine funktionelle Interaktion zwischen IRE1 und den M50-Deletionsmutanten vorlag. Hierfür wurden HA-markiertes IRE1-Plasmid mit den M50-Plasmidmutanten in HEK-293A-Zellen co-transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden Proteinlysate hergestellt und das IRE1 mittels anti-HA-Antikörper präzipitiert. Die co-präzipitierten Proteine wurden mit einem M50-spezifischen Antikörper im Western Blot nachgewiesen. Abbildung 23 stellt die Expression der transfizierten Proteine dar. Sämtliche M50-Deletionsmutanten zeigten eine starke Interaktion mit IRE1-HA ähnlich der Interaktion mit dem Vollängen-M50 (1-317f). Die Negativkontrolle wurde wie erwartet nicht mit IRE1 co-präzipitiert (Abbildung 23). Die Co-IPs mit den N-terminalen M50-Verkürzungsmutanten zeigten ähnliche Ergebnisse (Daten nicht abgebildet). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die IRE1-M50-Interaktion und die IRE1-Degradierung von zwei unterschiedlichen Domänen im M50 vermittelt werden.

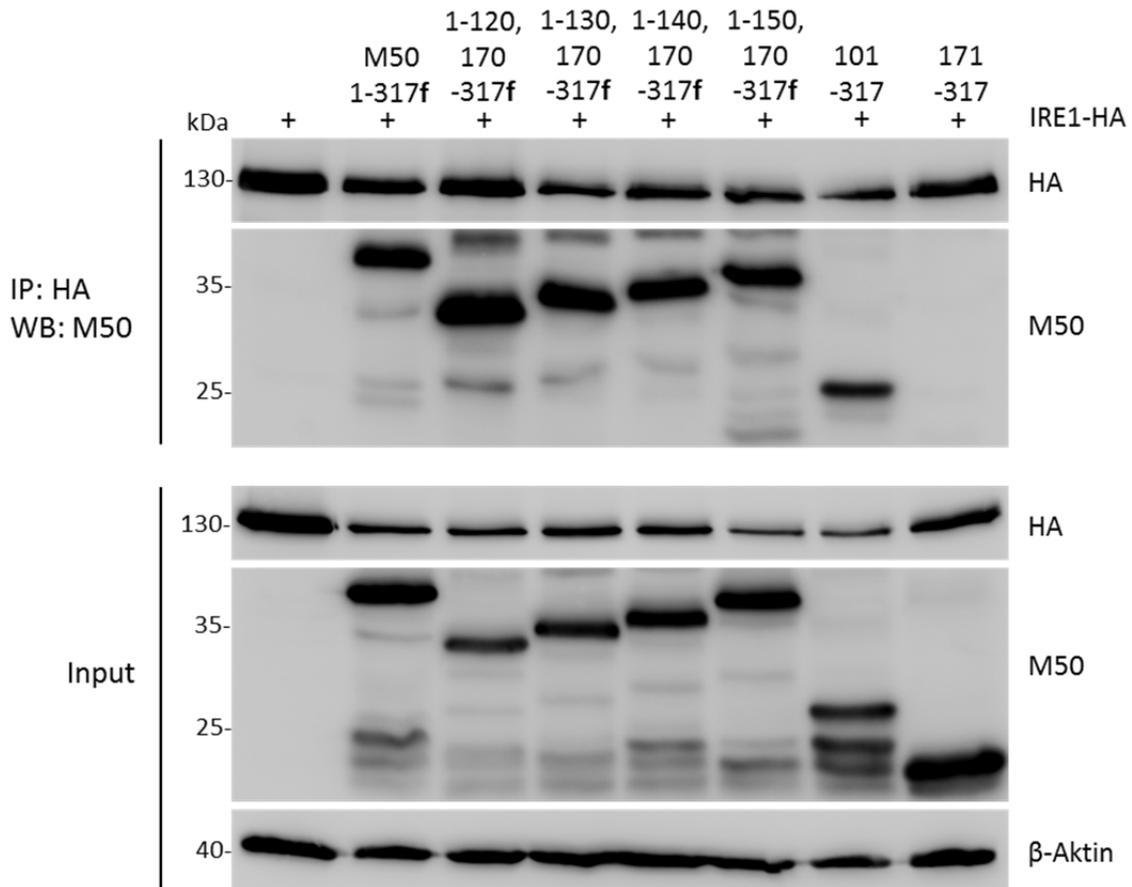


Abbildung 23: Co-Immunopräzipitation der M50-Deletionsmutanten mit IRE1. Die M50-Mutanten und das HA-markierte IRE1 wurden in HEK-293A-Zellen co-transfiziert. Nach 24 h wurden Lysate mittels RIPA-Puffer hergestellt und das IRE1 durch den anti-HA-Antikörper präzipitiert. Co-präzipitierte Proteine wurden mit Hilfe des M50-spezifischen Antikörpers nach Auftrennung im SDS-Gel nachgewiesen. Als Kontrolle dienten zwei M50-Verkürzungsmutanten aus der Publikation von Stahl et al. IP: Immunopräzipitation, WB: Western Blot, kDa: Kilodalton, f: Flag-Markierung

3.2 Konstruktion von M50-Alaninsubstitutionsmutanten und deren funktionelle Charakterisierung

Basierend auf den 30-Aminosäuren-Bereich im M50, der in Abbildung 22 identifiziert wurde und für die Reduzierung der IRE1-Proteinmenge verantwortlich ist, wurden weitere M50-Mutanten konstruiert. Anstatt von Aminosäuredeletionen wurden definierte Bereiche in Alanine substituiert. Der Austausch von Aminosäuren mit Alaninen erleichtert die Charakterisierung von kleineren Proteinregionen. Folgende Aminosäuren des M50-Protein wurden modifiziert: 131-140, 134-138, 141-150, 140-144 und 144-148. Die Bereiche wurden anhand der Daten aus der Publikation von Bubeck et al. ausgewählt, um die M50-M53-Interaktion durch die entsprechenden Alaninsubstitutionen nicht zu beeinträchtigen (Bubeck et al., 2004). Der M50-Aminosäurebereich 120-130 wurde ganz ausgeschlossen, da bereits von Bubeck und Kollegen eine potentiell hohe Dichte an M53-Interaktionsstellen identifiziert

Ergebnisse

werden konnte. Mit dem Austausch dieser Aminosäureregion bestand die Gefahr die M50-M53-Interaktion zu inhibieren. Um die Proteine leichter zu detektieren und Immunpräzipitationen durchzuführen wurden alle M50-Mutanten mit einer C-terminalen Flag-Markierung versehen. In Abbildung 24 sind die verschiedenen M50-Varianten und das Volllängen-M50 (1-317) schematisch dargestellt.

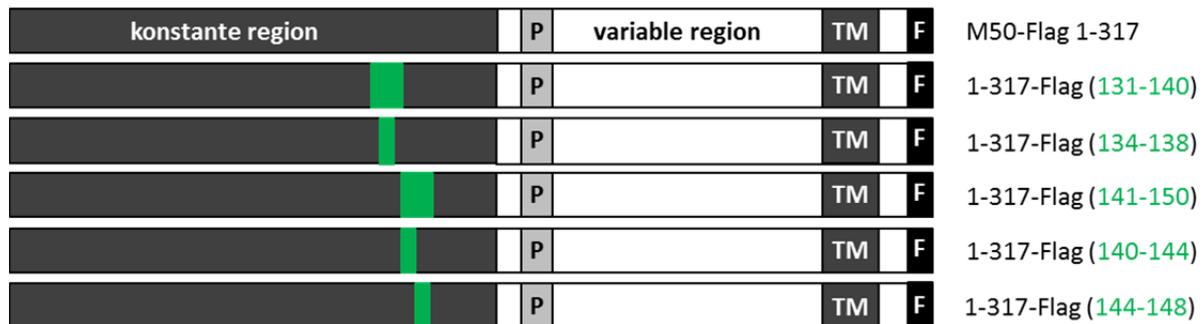


Abbildung 24: Schematische Darstellung der konstruierten M50-Alaninsubstitutionsmutanten. Verschiedene Bereiche der Aminosäuresequenz 131-148 wurden mittels PCR in Alanine mutiert und in den pcDNA3-Expressionsvektor ligiert. Grün: Alanin-substituierter Bereich im M50, P: Prolin-reiche Region, TM: Transmembrandomäne, F: Flag-Markierung

Nachdem alle Plasmidvektoren erfolgreich kloniert waren wurden diese in Bezug auf die Reduktion der IRE1-Proteinmenge hin analysiert. In 3T3-Fibroblasten wurde das Myc-markierte IRE1 und je eine M50-Mutante co-exprimiert. Die Expression der Proteine wurde im Western Blot nachgewiesen. Die M50-Verkürzungsmutanten 171-317 oder 1-276 dienten in den nachfolgenden Experimenten als Negativkontrolle. Sie zeigen weder einen Abbaueffekt auf die IRE1-Menge noch interagieren sie mit IRE1 (Stahl et al., 2013). Das Volllängen-M50-Protein (1-317) diente als Positivkontrolle. Abbildung 25 zeigt die Auswertung des Transfektionsexperiments. Es konnte gezeigt werden, dass die M50-Alaninsubstitutionsmutanten 131-140, 134-138 und 141-150 nicht mehr in der Lage waren die IRE1-Proteinmenge zu reduzieren. Im Gegensatz dazu zeigten die M50-Mutanten mit den Substitutionen des Aminosäurebereichs 140-144 und 144-148 einen intermediären Phänotyp. Die M50-Mutante 140-144 konnte hierbei das Myc-markierte IRE1 geringfügig stärker degradieren (Abbildung 25).

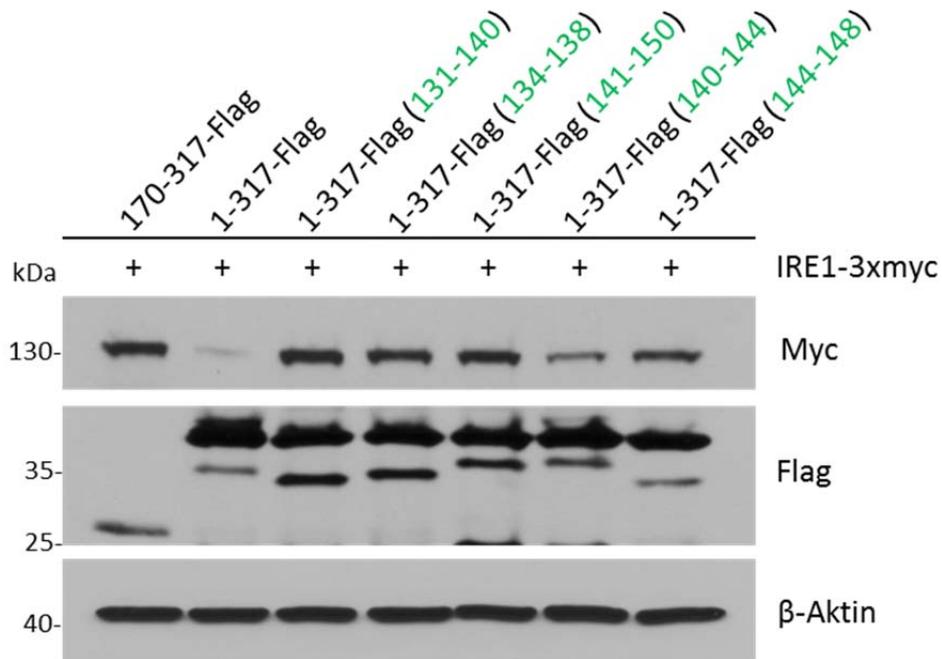


Abbildung 25: Untersuchung der Alaninsubstitutionsmutanten in Bezug auf die IRE1-Degradierung. Die Flag-markierten M50-Mutanten wurden zusammen mit Myc-markiertem IRE1 in NIH3T3-Zellen co-transfiziert. Als Kontrolle diente die M50-Verkürzungsmutante 170-317aa. Nach 24 h wurden die Lysate mittels RIPA-Puffer hergestellt und mit Hilfe der SDS-Page elektrophoretisch getrennt. Die Detektion der Proteine erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen das Myc und Flag. β -Aktin diente als Ladekontrolle. Grün: Alanin-substituierter Bereich im M50, kDa: Kilodalton

Zusammengefasst führte die Alaninsubstitution von 5 Aminosäuren zu einem Verlust der M50-vermittelten Degradation des IRE1-Proteins. Eine Co-Immunopräzipitation wurde durchgeführt, um abschließend zu überprüfen ob die mutierten Bereiche ebenso die IRE1-Interaktion inhibieren. Dafür wurde Myc-markiertes IRE1 mit je einer M50-Mutante in 3T3-Zellen co-exprimiert. 24 h nach Transfektion wurden Proteinlysate hergestellt und IRE1-Myc mit Hilfe des anti-Myc-Antikörpers präzipitiert. Die co-präzipitierten Proteine wurden mit einem Flag-spezifischen Antikörper nachgewiesen. Abbildung 26 stellt das Resultat der Co-IP dar. Die Expressionskontrolle (Input) und die Detektion von β -Aktin zeigten, dass sämtliche transfizierte Proteine exprimiert und gleichmäßige Mengen an Gesamtprotein geladen wurden. Erwartungsgemäß zeigte das Vollängen-M50-Protein eine starke IRE1-Interaktion. Im Gegensatz dazu konnte keine IRE1-Interaktion mit der Negativkontrolle M50-1-276 nachgewiesen werden. Bei der Co-Expression der M50-Mutanten mit IRE1 zeigte einzig die M50-Mutante 141-150 eine etwas abgeschwächte IRE1-Interaktion. Alle weiteren M50-Mutanten zeigten eine vergleichbare Interaktion wie das Vollängen-M50-Protein (Abbildung 26). Somit bestätigen die Ergebnisse, dass die IRE1-M50-Interaktion und die IRE1-Degradierung von zwei unterschiedlichen Domänen im M50 vermittelt werden.

Ergebnisse

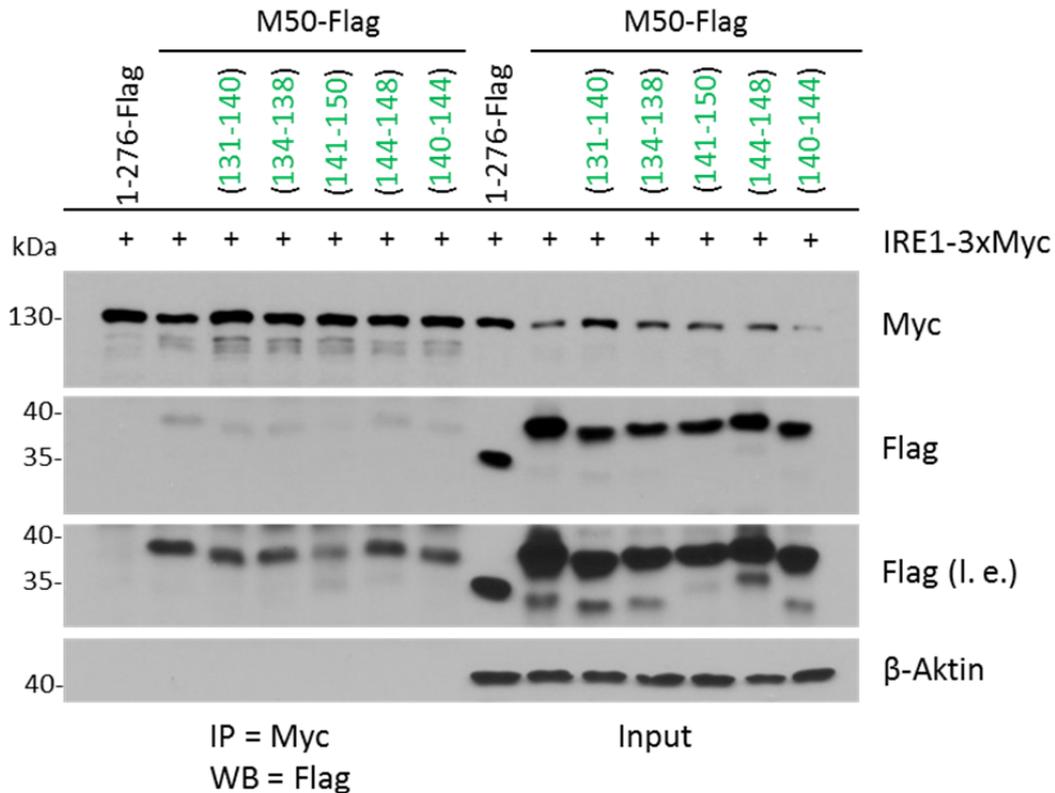


Abbildung 26: Co-Immunopräzipitation der M50-Alaninsubstitutionsmutanten mit IRE1. Die M50-Mutanten und das Myc-markierte IRE1 wurden in NIH3T3-Zellen co-transfiziert. Nach 24 h wurden Lysate mittels RIPA-Puffer hergestellt und das IRE1-Myc durch den anti-Myc-Antikörper präzipitiert. Co-präzipitierte Proteine wurden mit Hilfe des Flag-spezifischen Antikörpers nach Auftrennung im SDS-Gel nachgewiesen. Als Kontrolle diente die C-terminale M50-Verkürzungsmutanten 1-276 aus der Publikation von Stahl et al. kDa: Kilodalton, Grün: Alanin-substituierter Bereich im M50, l.e.: längere Expositionszeit

Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob die Interaktion der M50-Mutanten mit M53 noch Bestand hatte. Die M50-M53-Interaktion ist ein essentieller Bestandteil der Cytomegalovirusreplikation und entscheidend für die nachfolgenden Experimente. Um die M50-M53-Interaktion zu bestätigen, wurde eine Co-IP durchgeführt. Hierfür wurde HA-markiertes M53 mit je einer M50-Substitutionsmutante in 3T3-Zellen co-exprimiert. 24 h nach Transfektion wurden Proteinlysate hergestellt und M53 mittels anti-HA-Antikörper präzipitiert. Die co-präzipitierten Proteine wurden mit einem Flag-spezifischen Antikörper nachgewiesen. Abbildung 27 stellt die Ergebnisse der Co-IP dar. Erwartungsgemäß konnte das Volllängen-M50 mit M53 co-präzipitiert werden. Die M50-Mutanten 131-140, 134-138, 141-150 und 140-144 zeigten entweder keine oder nur eine sehr schwache M53-Interaktion (Abbildung 27). Im Gegensatz konnte eine vergleichbare M53-Interaktion mit der M50-Mutante 144-148 nachgewiesen werden. Die Expressionskontrolle (Input) und der Nachweis von β -Aktin bewiesen, dass sämtliche transfizierte Proteine exprimiert und gleichmäßige Mengen an Gesamtprotein geladen wurden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die

Ergebnisse

M50-M53-Interaktion und die M50-vermittelte IRE1-Degradation von einer ähnlichen Domäne im M50 vermittelt werden.

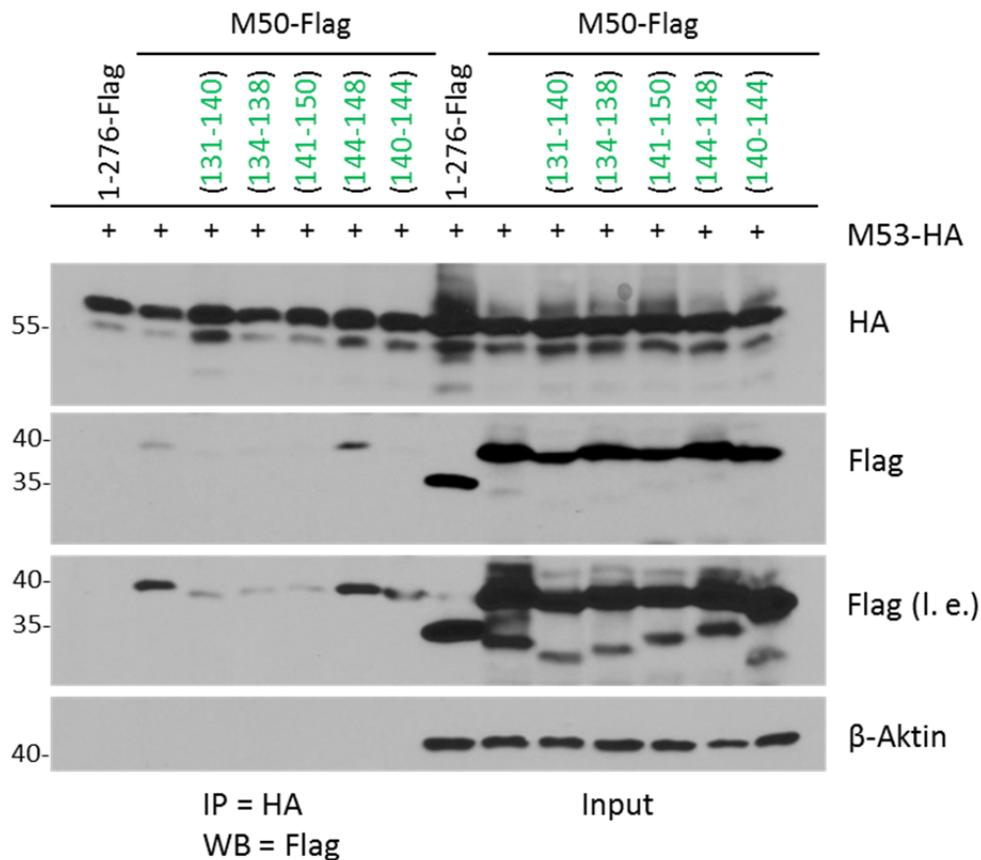


Abbildung 27: Co-Immunopräzipitation der M50-Alaninsubstitutionsmutanten mit M53. Die M50-Mutanten und das HA-markierte M53 wurden in NIH3T3 Zellen co-transfiziert. Nach 24 h wurden Lysate mittels RIPA-Puffer hergestellt und das M53 durch den anti-HA-Antikörper präzipitiert. Co-präzipitierte Proteine wurden mit Hilfe des Flag-spezifischen Antikörpers nach Auftrennung im SDS-Gel nachgewiesen. Als Kontrolle diente die C-terminale M50-Verkürzungsmutanten 1-276 aus der Publikation von Stahl et al. kDa: Kilodalton, Grün: Alanin-substituierter Bereich im M50, l.e.: längere Expositionszeit

3.3 Konstruktion von M50-Virusmutanten mit Alaninsubstitutionen und deren funktionelle Charakterisierung

Ein Ziel dieser Arbeit war, die funktionelle Trennung der zwei M50-Funktionen während einer MCMV-Replikation durchzuführen: IRE1-Degradation und M50-M53-Interaktion. Die Interaktionsstudie zwischen M53 und den M50-Mutanten konnte nur eine relativ schwache Interaktion nachweisen, jedoch bestand potentiell die Möglichkeit einer erfolgreichen Rekonstitution von M50-Virusmutanten. Aus diesem Grund wurden die einzelnen Bereiche, die in Abbildung 24 schematisch dargestellt sind, im nachfolgenden Schritt mittels *En passant* BAC-Mutagenese im Virus mutiert [siehe dafür 6.2.9]. Für die Mutagenese des M50 wurde ein MCMV-BAC (BAC = Bacterial Artificial Chromosome) verwendet, der das M50 und das M53 in HA- bzw. Flag-markierter Form exprimiert. Im weiteren Verlauf wird dieser

Ergebnisse

BAC mit MCMV-M50-HA bezeichnet. Dieser BAC wurde gewählt, um die Detektion der Proteine in Infektions- und Interaktionsexperimenten zu erleichtern. In dem Methodenteil unter 6.2.9 ist das Protokoll der *En passant* Mutagenese ausführlich beschrieben. Vereinfacht sind die einzelnen Schritte wie folgt: 1. Amplifikation eines PCR-Produktes bestehend aus einer Kanamycin-Resistenz und duplizierte Gen-Bereiche, 2. Transformation des PCR-Produktes in MCMV-M50-HA-BAC-tragende Bakterien, 3. Selektion von erfolgreich transformierten Bakterien über Doppelresistenz, 4. Überprüfung der ersten Rekombination über enzymatischen Verdau, in diesem Fall mit HindIII (Abbildung 28A), 5. Entfernung der Kanamycin-Resistenz und homologe Rekombination des mutierten Bereichs, 6. Überprüfung der Rekombination über enzymatischen Verdau, in diesem Fall mit HindIII (Abbildung 28B) und abschließende Sequenzierung von positiv-mutierten MCMV-M50-HA-BAC Klone.

Die Ergebnisse des ersten Rekombinationsschritts (Schritt 2-4) sind in Abbildung 28A dargestellt. Es konnten zwei zusätzliche Banden im Vergleich zum unveränderten Wildtyp MCMV-M50-HA-BAC identifiziert werden. Diese Bandenveränderung konnten durch *in silico* Vorhersagen des Restriktionsmusters bestätigt werden (Daten nicht abgebildet). Somit konnte eine erfolgreiche Insertion des PCR-Produktes bestätigt werden. Für den zweiten Rekombinationsschritt wurden je zwei positive Klone aus der ersten Rekombination ausgewählt und Schritt 5. angewendet. Die Auswertung des zweiten enzymatischen Verdau mit HindIII (Schritt 6.) ist in Abbildung 28B dargestellt. Wegen dem Austausch sehr kleiner Bereiche im M50-Gen wird ein Restriktionsmuster ähnlich dem MCMV-M50-HA-BAC erwartet. Alle, bis auf zwei BAC-Klone (-markiert durch rote Pfeile), waren positiv. Mittels Sequenzierung einzelner BAC-Klone konnte der Restriktionsverdau und die mutierte Sequenz bestätigt werden. Somit kann von einer erfolgreichen BAC-Mutagenese ausgegangen werden.

Ergebnisse

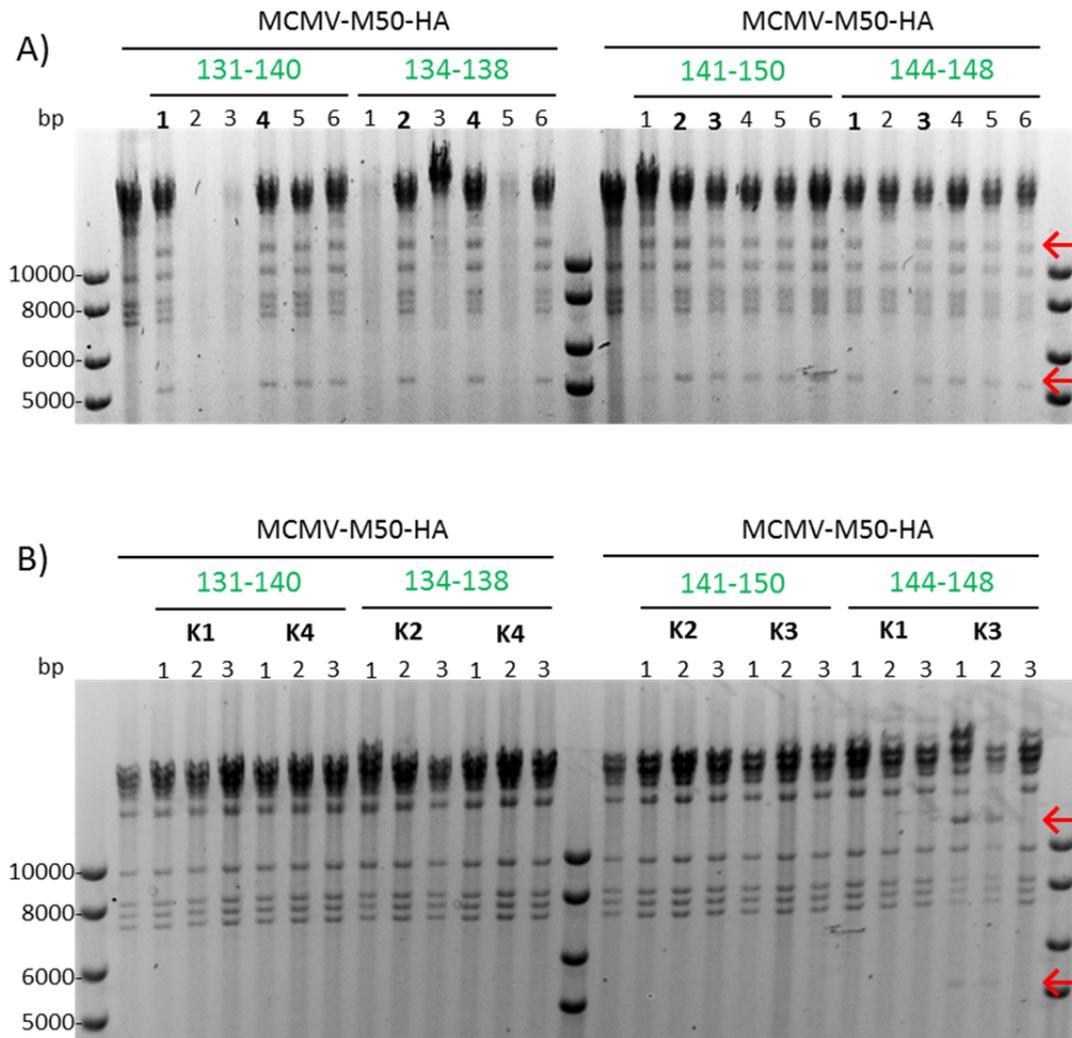


Abbildung 28: HindIII Restriktionsmuster der mutierten BAC-DNA. A) Erster Rekombinationsschritt nach Integration der Kanamycinkassette in den MCMV-M50-HA-BAC, **B)** Zweiter Rekombinationsschritt nach enzymatischer Entfernung der Kanamycinkassette. Als Kontrolle wurde der unveränderte MCMV-M50-HA-BAC verwendet. Beide Agarose-Gele zeigen das Restriktionsmuster nach enzymatischem Verdau mit HindIII. ←: Unterschiede im Restriktionsmuster im Vergleich zum unveränderten MCMV-M50-HA-BAC, bp: Basenpaare, K: BAC-Klon, Nummerierung: Nummer des BAC-Klons, Grün: Alanin-substituierter Bereich im M50

Im Anschluss wurden zwei positive MCMV-M50-HA-BAC-Mutanten in 3T3-Zellen transfiziert. Die Transfektion von Virus-BAC-DNA in permissive Zellen führt zu einer Rekonstitution des Virus. Der MCMV-M50-HA-BAC diente als Positivkontrolle für eine effiziente und erfolgreiche Virusrekonstitution (Daten nicht abgebildet). Die Virusverbreitung wurde alle zwei Tage unter einem Durchlichtmikroskop ausgewertet. Nach mehreren Transfektionsversuchen konnte jedoch keine Virusmutante aus den Zellen isoliert werden. Der Grund hierfür ist wahrscheinlich die fehlerhafte Interaktion der mutierten M50-Proteine mit M53. Diese Interaktion ist Teil des NEC und essentiell für die produktive Virusreplikation. Nichtsdestotrotz wollte ich eine weitere Möglichkeit der Virusrekonstitution überprüfen. Von einem Kooperationspartner (Dr. Zsolt Ruzsics, Universitätsklinikum Freiburg) hat unsere

Arbeitsgruppe eine Zelllinie erhalten, in der es möglich ist ein M50-defizientes MCMV anzuziehen. Die Zelllinie enthält ein Trans-Komplementationssystem, welches auf einer M50-Gen-Stillegung durch einen Histon-Deacetylase abhängigen Mechanismus basiert. Die Reaktivierung erfolgt durch eine MCMV-Infektion und es kann ein M50-mutiertes oder M50-Deletionsvirus isoliert werden (Mohr et al., 2012). Die Zelllinie wurde für die Transfektion der BAC-Mutanten verwendet. Die Anzucht von Virusmutanten war in der Zelllinie möglich. Zur Bestätigung wurde die Virus-DNA isoliert und der mutierte Bereich durch eine Sequenzierung überprüft. Jedoch war das Ergebnis der Sequenzierung die Identifikation einer Virusmischpopulation. Diese bestand zu einem großen Anteil aus dem Wildtyp-MCMV und zu einem kleinen Anteil aus der Virusmutante. Deswegen konnte keine weitere Charakterisierung der Virusmutanten vorgenommen werden. Somit deuten die Ergebnisse daraufhin, dass es mit diesem Ansatz nicht möglich ist die zwei Funktionen des M50 voneinander zu trennen.

3.4 Charakterisierung des M50-vermittelten IRE1-Abbaumechanismus

Es wurde mehrfach gezeigt, dass die IRE1-Proteinmenge in Transfektions- und Infektionsexperimenten durch das M50 reduziert wird. Es stellt sich jedoch die Frage, wie das M50 den IRE1-Abbau vermittelt. Stahl et al. hatten bereits gezeigt, dass ein lysosomaler Abbau des IRE1-Proteins ausgeschlossen werden konnte. Außerdem konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass der M50-vermittelte IRE1-Abbau nicht mit Proteasom-Inhibitoren gehemmt werden konnte (Stahl et al., 2013). Mit eigenen Experimenten bezüglich des lysosomalen Abbaus konnten die Daten aus der Studie von Stahl et al. bestätigt werden (Daten nicht abgebildet). Jedoch wollte ich überprüfen, ob sich der IRE1-Abbau nicht doch mit Proteasom-inhibitoren hemmen lässt. Hierfür habe ich unterschiedliche Bedingungen getestet, da aus anderen Arbeiten bekannt war, dass die Inhibitoren für einen proteasomalen Abbau, MG132 oder Lactacystein, sensitiv auf Inkubationszeit und applizierter Menge reagieren (Fenteany et al., 1995; Gastaldello et al., 2008; Han et al., 2009b).

Um die Hypothese zu überprüfen wurden Co-Transfektionsexperimente in NIH3T3-Zellen mit Myc-markiertem IRE1 und Flag-markiertem M50 durchgeführt. Lactacystein und MG132 dienten in den Experimenten als proteasomale Inhibitoren. Lactacystin ist ein weitverbreiteter Inhibitor für die Inhibierung der katalytischen Untereinheiten des Proteasoms (Fenteany et al., 1995). Dieser wurde 24 h nach Transfektion in aufsteigenden

Ergebnisse

Konzentrationen (10-40 μM) für 6 oder 24 h zu den Zellen gegeben. Abbildung 29 zeigt die Auswertung im Western Blot. UL56f und der Leervektor dienten als Negativkontrollen und das Vollängen-M50 als Positivkontrolle. Die Kontrollen wurden mit dem Lösungsmittel (= DMSO) behandelt. Eine 24-h-Inkubation mit Lactacystin hatte zur Folge, dass die Expressionen des IRE1- und M50-Proteins allgemein sehr schwach bis kaum noch nachweisbar waren. Im Gegensatz dazu konnte die 6-h-Inkubation mit Lactacystin den IRE1-Abbau inhibieren vergleichbar mit den Negativkontrollen. Die Inhibition war unabhängig von der applizierten Lactacystinkonzentration. Der Nachweis von p53 diente als Kontrolle für die Wirksamkeit des Inhibitors. Durch die Inhibition der katalytischen Untereinheit des Proteasoms akkumuliert das Protein in Zellen (Abbildung 29).

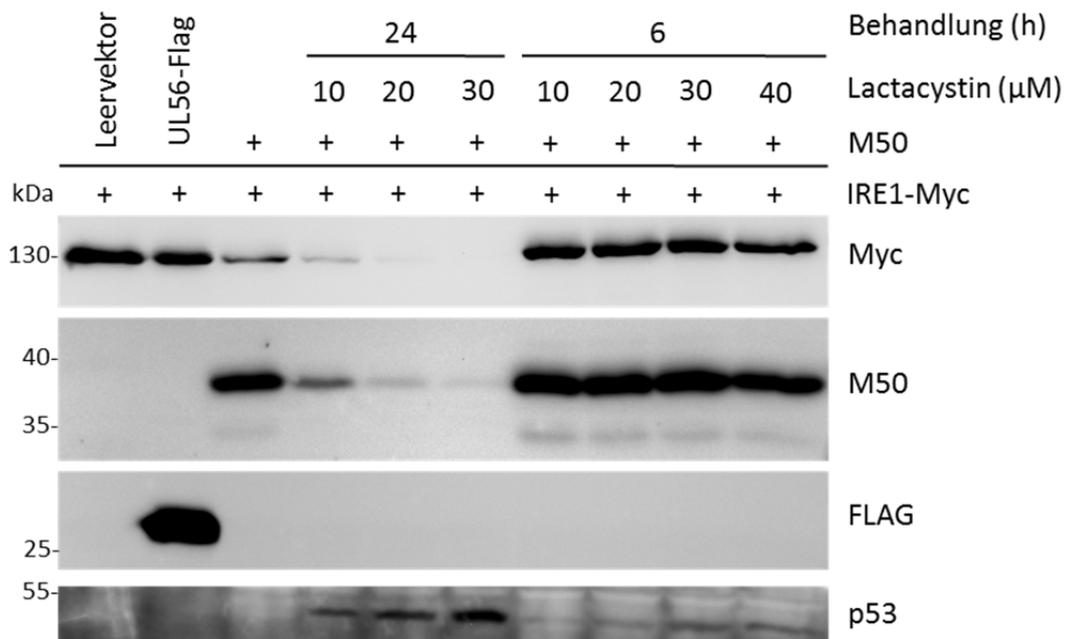


Abbildung 29: Untersuchung der IRE1-Degradierung nach Zugabe des Proteaseinhibitors Lactacystein. M50 und Myc-markiertes IRE1 wurden in NIH3T3-Zellen co-transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen mit ansteigenden Konzentrationen an Lactacystin für weitere 6 oder 24 h inkubiert. Lysate wurden mittels RIPA-Puffer hergestellt und die Proteine durch die SDS-Page im Western Blot mit M50-, Flag- oder Myc-spezifischen Antikörper nachgewiesen. Als Kontrolle dienten der Leervektor und das UL56 von HSV-1. p53 diente als Nachweis für die Funktionalität des Proteaseinhibitors Lactacystin. kDa: Kilodalton, h: Stunde, μM : Mikromol

Um die Ergebnisse mit einem anderen Inhibitor (MG132) zu bestätigen, wurde im Folgenden eine weitere Co-Transfektion mit IRE1 und M50 durchgeführt. MG132 ist ein potent wirkender und reversibler Inhibitor, welcher die Degradierung von ubiquitinierten Proteine reduziert (Han et al., 2009b). Abbildung 30 zeigt ein repräsentatives Ergebnis nach Testung verschiedener Inhibitorkonzentrationen und Inkubationszeiten. Eine C-terminale M50-Verkürzungsmutante 1-276 und der Leervektor dienten als Negativkontrollen. Nach Zugabe

Ergebnisse

des Lösungsmittels (= H₂O) konnte eine effektive IRE1-Degradierung durch das M50 detektiert werden. Im Gegensatz dazu zeigte die Zugabe von 25 µM MG132 für 5,5 h eine Wiederherstellung der IRE1-Expression in Gegenwart von M50. Einen Einfluss durch die verwendete MG132-Konzentration und Inkubationszeit auf die Proteinexpression konnte nicht festgestellt werden. β-Aktin diente als Ladekontrolle.

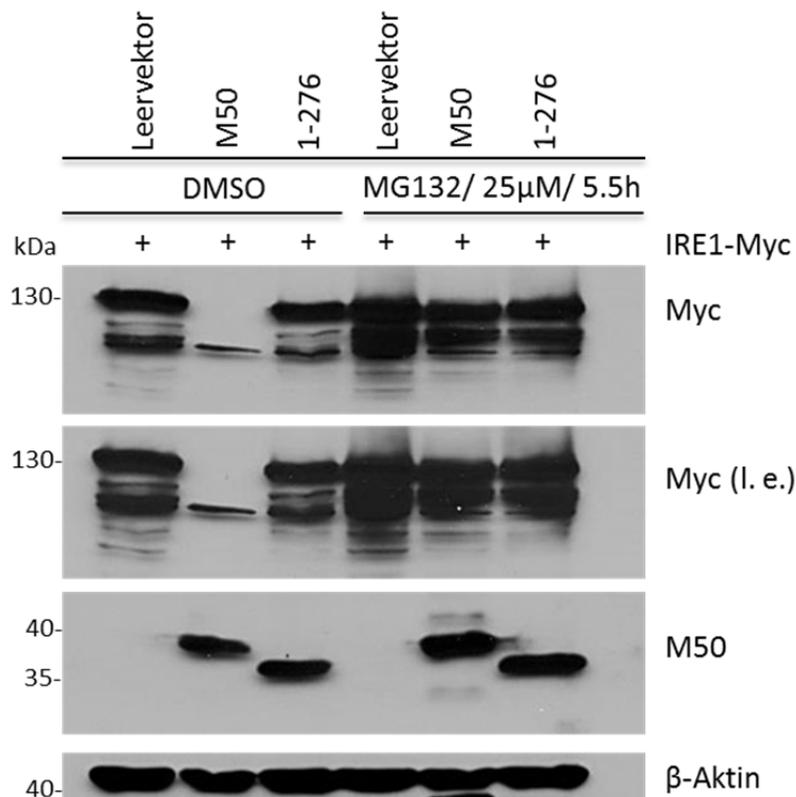


Abbildung 30: Untersuchung der IRE1-Degradierung nach Zugabe des Proteaseinhibitors MG132. M50 und Myc-markiertes IRE1 wurden in NIH3T3-Zellen co-transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen mit 25 µM MG132 für 5 ½ h inkubiert. Lysate wurden mittels RIPA-Puffer hergestellt und die Proteine durch die SDS-Page im Western Blot mit M50-, Flag- oder Myc-spezifischen Antikörper nachgewiesen. Als Kontrolle dienen der Leervektor und das UL56 von HSV-1. p53 diente als Nachweis für die Funktionalität des Proteaseinhibitors Lactacystin. kDa: Kilodalton, h: Stunde, µM: Mikromol, l.e.: längere Expositionszeit

Als abschließende Frage sollte überprüft werden, ob sich die Resultate der Transfektionen auf die Infektion übertragen lassen können. Für das Experiment wurden IRE1_{GFP}-induzierbare Zellen verwendet und die IRE1-Expression mit 0,1 nM Doxycyclin induziert. Der Grund für die Verwendung der Zellen war der einfachere Nachweis von IRE1. Die Zellen wurden mit MCMV-M50-HA und einer MOI 4 TCID₅₀/Zelle infiziert. 24, 48 und 72 h nach Infektion wurde die Zellen für 6 h mit MG132 in aufsteigenden Konzentrationen (0-30 µM) inkubiert. Abbildung 31 zeigt die Auswertung der Infektion. Die MG132-Konzentrationen zeigten keinen Effekt auf die Menge des Gesamtproteins im Vergleich zu infizierten und DMSO-

Ergebnisse

behandelten Zellen. Es konnte eine Reduzierung der IRE1-Proteinmenge über Zeit in DMSO-behandelten infizierten Zellen festgestellt werden (-Positivkontrolle). Bereits eine Zugabe von 10 μM MG132 konnte eine Erhöhung der IRE1-Proteinmenge nach 24 und 48 h nach Infektion nachweisen. Die effektivste Inhibierung des IRE1-Abbaus konnte durch Zugabe von 20 μM MG132 erreicht werden (Abbildung 31). Zwar konnte eine leichte IRE1-Degradation 72 h nach Infektion festgestellt werden jedoch war die IRE1-Bande deutlich stärker im Vergleich zur Positivkontrolle. Eine weitere Steigerung der Konzentration auf 30 μM zeigte nur eine geringfügige Veränderung nach 72 h. Somit lässt sich sagen, dass der M50-vermittelte Abbau der IRE1-Proteinmenge proteasomal verläuft.

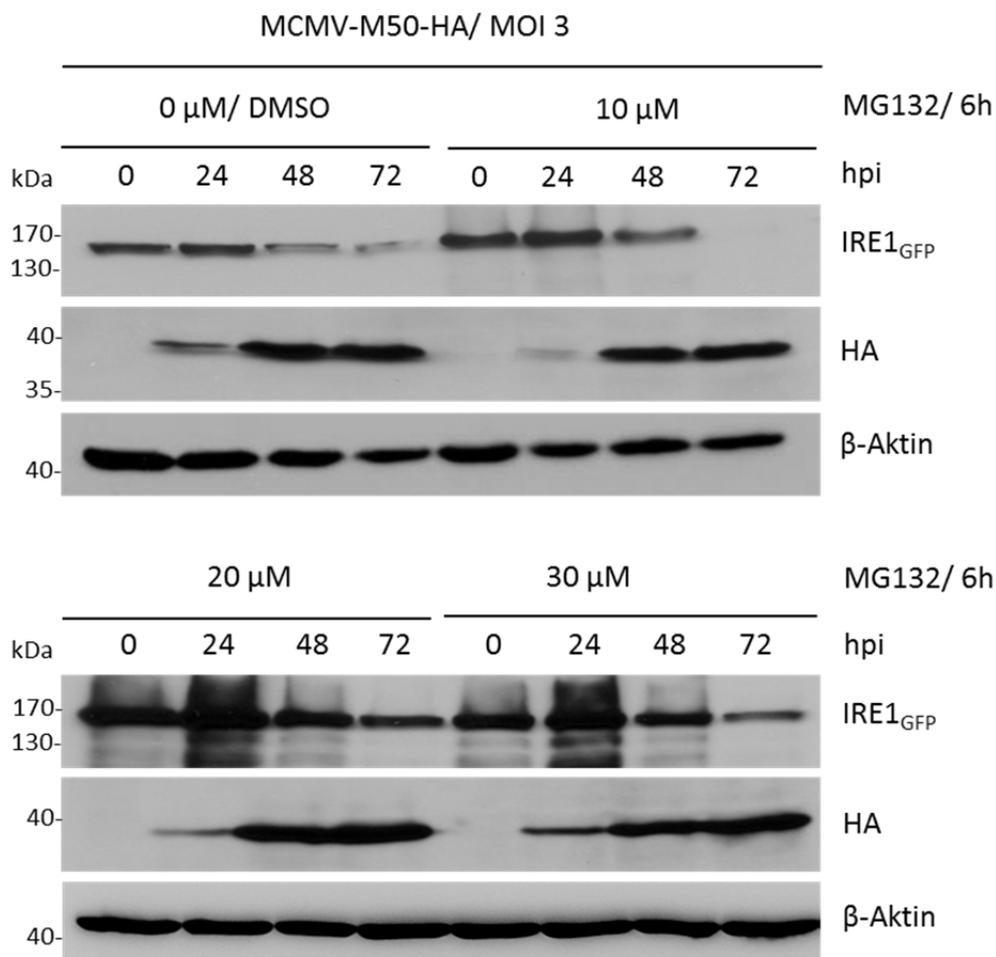


Abbildung 31: IRE1-Degradierung während der Cytomegalovirusinfektion nach Zugabe des Proteaseinhibitors MG132. IRE1-GFP-induzierbare-Zellen wurden mit MCMC-M50-HA-M53-Flag und einer MOI von 4 TCID₅₀/ ml infiziert. Die Expression des IRE1-GFP wurde mit 0.1 nM Doxycyclin induziert. Nach 24, 48 und 72 h wurden die Zellen mit ansteigenden Konzentrationen an MG132 für weitere 6 h inkubiert. Lysate wurden mittels RIPA-Puffer hergestellt und die Proteine mit HA- oder IRE1-spezifischen Antikörper nachgewiesen. Als Kontrolle dienten DMSO-behandelte -infizierte Zellen. β -Aktin diente als Ladekontrolle. kDa: Kilodalton, hpi: Stunden nach Infektion, μM : Mikromol, MOI: *Multiplicity of Infection*

Die vorangegangenen Experimente haben gezeigt, dass das IRE1 durch das M50 proteasomal degradiert wird. Ein Abbau von Zielproteinen über den proteasomalen Signalweg kann

entweder Ubiquitin-abhängig oder -unabhängig ablaufen. Es konnte bereits von mehreren Gruppen gezeigt werden, dass das IRE1 durch verschiedene E3-Ubiquitinligasen ubiquitiniert werden kann (Gao et al., 2008; Zhu et al., 2014). Somit liegt die Vermutung nahe, dass die M50-vermittelte IRE1-Degradierung ebenfalls Ubiquitin-abhängig ist. Das 8,5kDa-Ubiquitin besitzt mehrere Lysine, darunter die am besten charakterisierten Lysin-48 (K48) und Lysin-63 (K63), welche mit den Zielproteinen eine kovalente Bindung eingehen und die Polyubiquitinketten verknüpfen. Eine Modifizierung von Zielproteinen durch das K48 führt zu einer Degradierung des Substrates über das Proteasom. Im Gegensatz dazu koordiniert eine K63-Ubiquitinierung Prozesse, wie die Signaltransduktion, DNA Reparaturmechanismen oder intrazellulären Transport (Hicke, 2001; Miranda et al., 2007). Um zu überprüfen, ob eine IRE1-Ubiquitinierung vorliegt wurden Co-IP Experimente in HEK-293A-Zellen durchgeführt. Transfiziert wurden Myc-markiertes IRE1, Flag-markiertes M50 bzw. M50-Alaninsubstitutionsmutanten und HA-markiertes Ubiquitin-K48-only. In dem K48-Expressionsplasmid wurden alle relevanten Lysine bis auf das Lysin-48 zu Alanin mutiert. Nach 48 h wurden die transfizierten Proben mittels eines publizierten Lyse-Protokolls lysiert (Choo, 2009) und das IRE1-Myc mit einem Myc-spezifischen Antikörpers präzipitiert. Eine Ubiquitinierung eines Proteins kann im SDS-Polyacrylamidgel durch mehr als eine diskrete Bande oder als „Schmier“ durch die Vergrößerung des Molekulargewichts des Proteins durch das Anhängen des Ubiquitins nachgewiesen werden. Abbildung 32 zeigt die Auswertung des Assays. Die beschriebene IRE1-M50-Interaktion wird unter Anwendung des Protokolls nicht nachgewiesen. Die Lysebedingungen weisen ausschließlich kovalente Proteinbindungen und Ubiquitinierungen nach. Die Ergebnisse zeigen, dass die Co-Transfektion mit dem Leervektor zu keiner IRE1-Ubiquitinierung führte. Im Gegensatz dazu zeigte die Co-Transfektion mit dem Vollängen-M50 mehrere zusätzliche Banden oberhalb der 130 kDa Bande von IRE1. Diese Detektion spricht für eine IRE1-Polyubiquitinierung. Eine deutlich stärkere Polyubiquitinierung („Schmier“) konnte durch die Co-Transfektion mit den M50-Alaninsubstitutionsmutanten erreicht werden. Es wurde festgestellt, dass die M50-Mutanten, welche IRE1 nicht mehr degradieren können (siehe Abbildung 25) auch eine deutlich stärkere IRE1-Polyubiquitinierung induzieren (Abbildung 32). Diese Ergebnisse bestätigen, dass der Prozess des M50-vermittelten IRE1-Abbaus durch mehrere Schritte (Interaktion, Ubiquitinierung, proteasomaler Abbau) vermittelt wird.

Ergebnisse

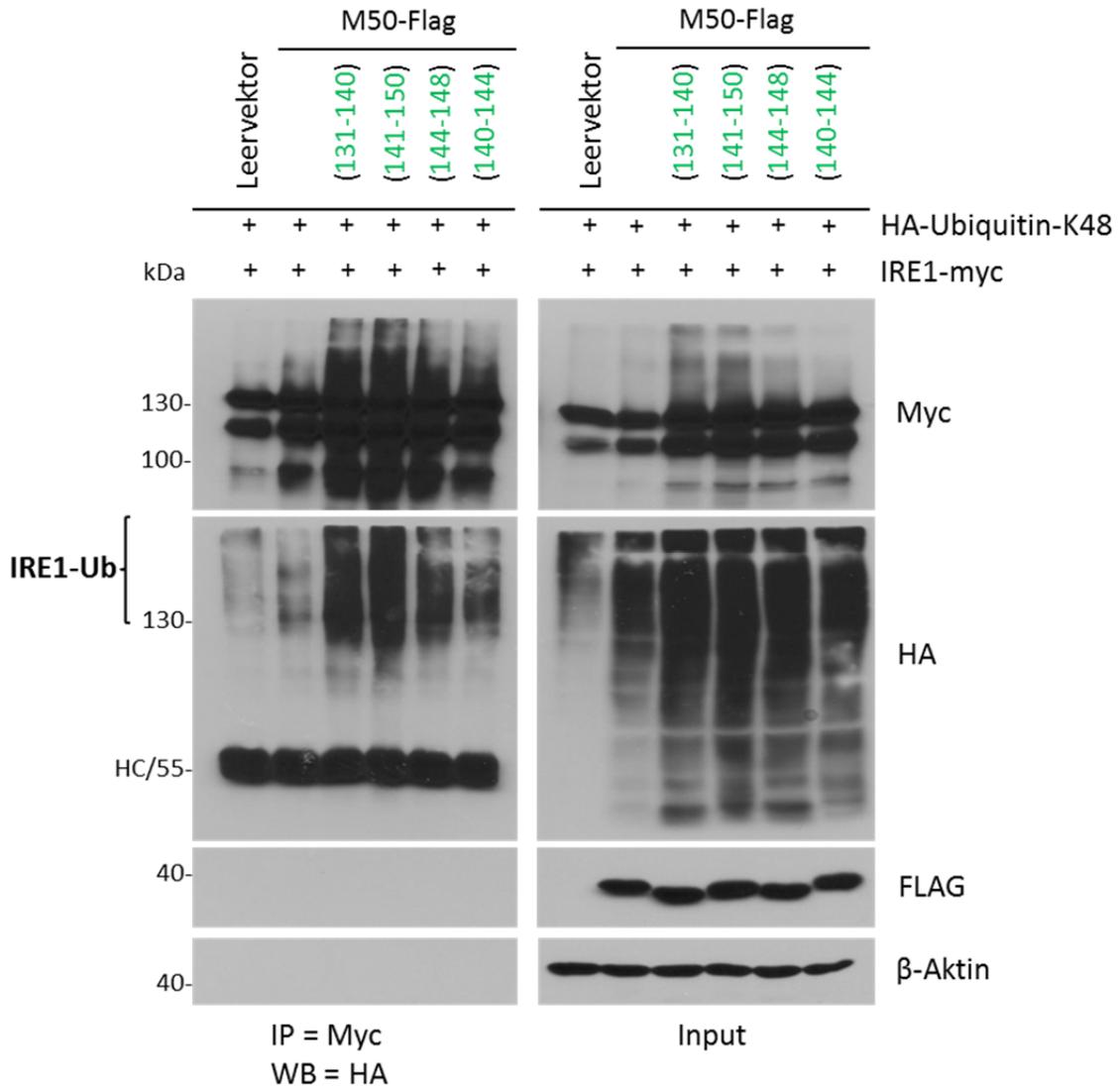


Abbildung 32: IRE1-Ubiquitinierung nach Expression des M50- oder M50-Mutant-Proteins. Das M50-Wildtyp/M50-Mutanten, das HA-markierte Ubiquitin (K48-only) und Myc-markiertes IRE1 wurden in HEK-293A-Zellen co-transfiziert. Nach 48 h wurden Lysate mittels eines speziellen Lyseprotokolls hergestellt und das IRE1-Myc durch den anti-Myc-Antikörper präzipitiert. Co-präzipitierte Proteine wurden mit Hilfe des HA-spezifischen Antikörpers nach Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgel nachgewiesen. Der Leervektor diente als Negativkontrolle. kDa: Kilodalton, IRE1-Ub: Ubiquitinierung des IRE1, K48: Nur das Lysin-48 im Ubiquitin-Protein ist noch funktionell, Grün: Alanin-substituierter Bereich im M50

4 Diskussion

Eine Vielzahl von Viren, darunter das murine Cytomegalovirus, induzieren während eines Replikationszyklus eine Stress Reaktion im Endoplasmatischen Retikulum und die daraus resultierende Aktivierung der sogenannten *Unfolded Protein Response* (UPR). Ausgelöst wird dies durch variable Faktoren, wie die Virusinfektion selbst oder die enorme Menge an ungefalteten viralen Proteinen, welche im ER gefaltet und post-translational modifiziert werden müssen. Hierbei spielen die drei Rezeptorproteine der UPR, PERK, ATF6 und IRE1, eine große Rolle. Die Aktivierung kann für die Virusreplikation entweder von Vorteil sein oder immens negativ ausfallen. Aus diesem Grund haben Cytomegaloviren im Laufe der Evolution wirksame Mechanismen entwickelt, welche die Folgen einer UPR Aktivierung auf verschiedenste Weise regulieren können. Bereits publizierte Daten aus unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass der konservierte UPR-Sensor IRE1 zu späten Zeitpunkten einer murinen Cytomegalovirusinfektion degradiert wird. Das virale Protein M50 konnte als IRE1-Interaktionspartner identifiziert werden. Ferner resultierte die beschriebene Interaktion in einer Reduzierung der IRE1-Proteinmenge. Weitere Untersuchungen zeigten, dass der konservierte N-terminale Teil bzw. die Aminosäuren 101 – 170 des M50-Proteins, als Bereich identifiziert wurden, der für die IRE1-Degradierung und Interaktion verantwortlich ist (Stahl et al., 2013).

4.1 Identifizierung der M50-Domäne für die IRE1-Degradation

Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurden weitere M50-Verkürzungsmutanten kloniert, um den identifizierten M50-Bereich (Aminosäure 101-170) weiter zu minimieren. Hierdurch sollte eine M50-Mutante generiert werden, die noch zur Bildung des Kernausschleusungskomplexes (NEC) mit M53 fähig ist, deren Wirksamkeit, die IRE1-Proteinmenge zu degradieren, blockiert ist. Die M50-M53-Interaktion ist eine essentielle Voraussetzung in einer produktiven MCMV-Replikation, wodurch es zu einer Stabilisierung des M50 in der Kernmembran und folglich zur Ausbildung des NEC kommt (Muranyi et al., 2002). Der deletierte M50-Bereich, welcher in Abbildung 21 grafisch dargestellt ist, wurde gewählt, um die Interaktion zwischen M50 und M53 nicht zu beeinflussen. Die Gruppe von Rupp und Kollegen konnte durch Linker-Insertionsmutagenese des M50-Proteins potentielle Bereiche identifizieren, welche die Interaktion zwischen M50 und M53 massiv einschränkten und eine Virusrekonstitution unmöglich machten (Rupp et al., 2007). Das Ergebnis, dargestellt in

Abbildung 22, mit den klonierten M50-Verkürzungsmutanten konnte die publizierten Daten unserer Arbeitsgruppe bestätigen (Stahl et al., 2013). Interessanterweise wurde durch eine Verkleinerung der verwendeten Deletionen im M50-Protein auch eine stufenartige abfallende Degradierung des IRE1-Proteinlevels erreicht (Abbildung 22). Die internen Deletionen zwischen Aminosäure 130-170 und 140-170 zeigten, in Bezug auf den IRE1-Abbau, einen vergleichbaren Phänotyp mit der publizierten M50-Verkürzungsmutante 141-317 (Stahl et al., 2013). Die Fähigkeit der M50-Mutanten die IRE1-Proteinmenge zu reduzieren war nur teilweise blockiert. Eine zusätzliche N-terminale Verkürzung des M50-Proteins zeigte keine zusätzliche Erkenntnis (Daten ohne Abbildung). Die gewonnenen Daten haben den M50-Bereich, der für die IRE1-Degradierung verantwortlich ist, auf die Aminosäuren 120-140 eingegrenzt. Außerdem zeigten die Ergebnisse, dass die ersten 68 Aminosäuren im M50 keinen Einfluss auf den IRE1-Abbau haben. Des Weiteren hat der identifizierte Bereich, Aminosäure 120-140, keine Auswirkungen auf die IRE1-M50-Interaktion (Abbildung 23). Dementsprechend liegt die Vermutung nahe, dass die IRE1-M50-Interaktion von mehreren Stellen im M50 vermittelt wird. Eine Publikation unserer Arbeitsgruppe hat gezeigt, dass eine Deletion der ersten 141 Aminosäuren im M50 die IRE1-M50-Interaktion stark attenuiert. Zum anderen resultierte eine Deletion der ersten 171 Aminosäuren im M50 in einem kompletter Verlust dieser Interaktion (Stahl et al., 2013). Das bedeutet, dass der M50-Bereich zwischen den Aminosäuren 141-171 für die IRE1-Interaktion essentiell ist. Warum jedoch eine interne Deletion im M50-Protein, Aminosäure 141-171 aus Abbildung 23, eine starke Interaktion zu IRE1 zeigt konnte bis zum Abschluss der Arbeit nicht geklärt werden. Eine Möglichkeit ist, dass die Arbeit mit internen Deletionen, anstatt großer N-terminaler Verkürzungen, einen stabilisierenden Effekt auf die IRE1-M50-Interaktion ausübt. Dies könnte eine Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse erklären. Um dies abschließend zu belegen, sollten weitere M50-Mutanten konstruiert und Interaktionsstudien durchgeführt werden.

Der identifizierte M50-Bereich sollte im nächsten Schritt anhand von Alaninsubstitutionen im Bereich der Aminosäuren 131-148 weiter minimiert werden, um die Gefahr einer Blockierung der essentiellen M50-M53-Interaktion zu verkleinern ((Rupp et al., 2007), Abbildung 24). Auf diese Weise konnte ich den Bereich um die Aminosäuren 134-138 im M50 identifizieren, der für die IRE1-Reduktion verantwortlich ist (Abbildung 25). Bestätigend zu den Co-IP-Daten in Abbildung 23 wurde eine IRE1-Interaktion mit allen M50-

Substitutionsmutanten festgestellt (Abbildung 26). Die Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass für die M50-IRE1-Interaktion mehrere Bindestellen verantwortlich sind. Interessanterweise zeigten einzig die M50-Mutanten eine extrem schwache Interaktion zu M53, bei denen auch ein Funktionsverlust der IRE1-Degradierung nachgewiesen wurde (Abbildung 27; Abbildung 25). Zusammenfassend liegt die Vermutung nahe, dass die zwei Funktionen des M50, M53-Interaktion und IRE1-Degradierung, von ähnlichen Sequenzbereichen im M50 vermittelt und daher nicht getrennt werden können. Zusätzliche Experimente müssten durchgeführt werden, um die Hypothese zu bestätigen. Beispielsweise durch die Konstruktion von M50-Mutanten mit nur einer Aminosäuremutation könnte eine fehlerhafte M53-Interaktion möglicherweise verhindert werden.

4.2 Virusrekonstitution der M50-Mutanten

Eine weitere Bestätigung der schwachen M50-M53-Interaktion der M50-Substitutionsmutanten, lieferte die durchgeführte BAC-Mutagenese (Abbildung 24). Einzig das Wildtyp-Virus (MCMV-M50-HA-M53-Flag) konnte nach BAC-Transfektion in 3T3-Fibroblasten rekonstituiert werden (ohne Abbildung). Überraschenderweise war es nicht möglich, die Virusmutante mit dem substituierten Aminosäurebereich 140-144A, welche in Abbildung 27 eine M53-Interaktion zeigte, zu rekonstituieren. Eine Möglichkeit ist, dass der mutierte Bereich Auswirkungen auf die Sekundärstruktur des M50-Proteins hat. Dies führte dann zu einer ineffizienten M53-Interaktion und Ausbildung des Kernausschleusungskomplexes. Leigh et al. und Walzer et al. konnten die Kristallstrukturen des M50-Proteins bzw. des HCMV Homolog-Komplexes UL50/ UL53 anfertigen. Hierdurch liegt die Vermutung nahe, dass essentielle M53-Interaktionsstellen im M50-Protein durch die veränderte Sekundärstruktur der M50-Mutanten nicht mehr bestehen (Leigh et al., 2015; Walzer et al., 2015). Die Alaninsubstitutionen könnten die vorhergesagten β -Faltblätter im M50, zwischen Aminosäure 129-156, beeinflussen und somit die Bindung zum M53-Protein erheblich stören. Eine weitere Möglichkeit ist, dass Interaktionen mit anderen zellulären und viralen Proteinen, welche im NEC eine wichtige Rolle spielen, beeinträchtigt sind und somit mehrere Schritte im Kapsidexport behindert sind. Tatsache ist, dass nicht nur M50 und M53, sondern eine ganze Reihe an zellulären, beispielsweise Endophilin-A2 oder Sorting nexin 9, und virale Proteine, beispielsweise M36 oder m139, mit M50 und M53 im NEC interagieren. Das wäre eine mögliche Ursache für die fehlerhafte Rekonstitution der MCMV-M50-Mutanten

(Lemnitzer et al., 2013). Ob beschriebene Interaktionen mit den M50-Mutanten nicht mehr bestehen könnte durch einfache Co-IP Experimente bestätigt werden.

4.3 M50-vermittelter IRE1-Abbaumechanismus

Um die Frage zu klären, wie die M50-vermittelte Degradierung des IRE1-Proteins abläuft, wurden zwei Möglichkeiten in Betracht gezogen: der lysosomale oder proteasomale Abbau. Aus den Ergebnissen von Stahl et al. war die Möglichkeit eines lysosomalen Abbaus bereits ausgeschlossen worden. Diese Annahme konnte an Hand eigener Experimente bestätigt werden (ohne Abbildung). Aus diesem Grund wurde der Fokus auf einen Proteasomal-vermittelten IRE1-Abbau gelegt. Mehrere Studien konnten demonstrieren, dass das IRE1-Protein über das Proteasom degradiert werden kann und dass IRE1 andere zelluläre Proteine dem Proteasom zuführt (Chiang et al., 2012; Gao et al., 2008; Lin et al., 2007). Publierte Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe konnten keinen Hinweis auf einen M50-vermittelten proteasomalen IRE1-Abbau erbringen. Es ist bekannt dass viele der kommerziell verfügbaren Proteasominhibitoren, beispielsweise Lactacystin oder MG132, sensitiv in Bezug auf Inkubationszeit und Dosis sind (Gastaldello et al., 2008; Han et al., 2009a). Dementsprechend wurden verschiedene Parameter der genannten Proteasominhibitoren variiert und die Inhibierung des M50-vermittelten IRE1-Abbaus analysiert. Sowohl Lactacystin (10-40 μM) als auch MG132 (25 μM) konnten den IRE1-Abbau mit ca. 6 Stunden Inkubationszeit inhibieren. Eine lange Inkubationszeit (ca. 24 Stunden) mit steigenden Lactacystin-Konzentrationen (10-40 μM) hatten einen negativen Effekt auf die Proteintranslation (Abbildung 30A). Möglicherweise ist das ein Grund warum das Ergebnis von Stahl et al. keine Blockierung des IRE1-Abbaus nach Behandlung mit 10 μM Lactacystin für 24 Stunden zeigte (Stahl et al., 2013). Die Wirksamkeit des MG132 wurde auch in Infektionsexperimenten bestätigt (Abbildung 31). Die Blockierung des IRE1-Abbaus war Konzentrations-abhängig. Erst mit 20 μM MG132, appliziert für ~6 Stunden, konnte eine effiziente Inhibierung des IRE1-Abbaus erreicht werden. Das wäre wiederum eine mögliche Erklärung, warum wir keinen Erfolg nach Applikation mit 10 μM MG132 in Co-Transfektionsexperimenten hatten. Interessant wäre es, die Ergebnisse auf den UL50-vermittelten Abbau des humanen IRE1 zu übertragen, welchen ich während meiner Masterarbeit herausgefunden hatte (Stahl et al., 2013). Hierfür müssten weitere Experimente durchgeführt werden, um die Annahme zu bestätigen. Co-Transfektions- und Infektionsexperimente mit MG132 oder Lactacystin wären hier möglich. Dies könnte eine Beteiligung des proteasomalen Abbauweges bestätigen.

Im proteasomalen Abbau von Proteinen spielt die Ubiquitinmarkierung von Substraten eine entscheidende Rolle. Es wäre daher durchaus denkbar, dass auch das IRE1 ubiquitiniert werden kann. Gao et al. konnten zeigen, dass das IRE1 mit der E3-Ubiquitinligase Synoviolin/Hrd-1 interagiert und so die Ubiquitinierung und den Abbau des IRE1-Proteins über das Proteasom vermittelt (Gao et al., 2008). In der Tat konnte eine schwache K48-modifizierte Ubiquitinierung des IRE1-Proteins in Co-IP Experimenten mit dem Volllängen-M50-Protein gezeigt werden (Abbildung 32). Die kurze Halbwertszeit von IRE1, ausgelöst durch die M50-vermittelte IRE1-Degradierung (~1 Stunde), könnte die schwache IRE1-Ubiquitinierung erklären (Stahl et al., 2013). Wang et al hatten gezeigt, dass eine verwandte Modifizierung, die Sumoylierung, von *specificity protein 1* (SP1) mit Sumo-1 eine erhebliche Reduktion der Halbwertszeit des Proteins nach sich zieht. Begründet wurde dies durch eine Stabilisierung der Interaktion zwischen SP1 und der Proteasom-Untereinheit rpt6, wodurch eine effektivere Ubiquitinierung und anschließende Degradierung erreicht wurde (Wang et al., 2008). Vielleicht kann auch M50 zu einer Sumoylierung von IRE1 mit nachfolgender Ubiquitinierung und Degradierung beitragen. Ob die Sumoylierung von IRE1 eine Rolle spielt müssten nachfolgende Versuche bestätigen. Im Gegensatz dazu konnte eine starke IRE1-Ubiquitinierung nach Co-Transfektion der M50-Alaninsubstitutionsmutanten detektiert werden (Abbildung 32). Möglicherweise führt die IRE1-M50-(Mutanten)-Interaktion zu einer Stabilisierung des Komplexes und deswegen zu einer erhöhten IRE1-Ubiquitinierung. Indirekt konnte die Theorie durch den Nachweis einer fehlenden IRE1-Ubiquitinierung nach Co-Transfektion mit der M50-Verkürzungsmutante 170-317 bestätigt werden (Abbildung 32). Diese M50-Mutante kann weder mit IRE1 interagieren noch IRE1 degradieren. Interessant wäre es zu überprüfen, ob das M50 ebenfalls durch die Interaktion zu IRE1 ubiquitiniert werden kann.

Des Weiteren konnte nach Überexpression der E3-Ubiquitinligase Synoviolin/Hrd-1 eine erhöhte Ubiquitinierung des IRE1-Proteins nach Co-Transfektion mit M50 festgestellt werden (präliminiere Daten, ohne Abbildung). Somit wäre eine Beteiligung des Synoviolin an der IRE1-Degradierung möglich. Sun et al. konnten in der Hinsicht zeigen, dass der Sel1L/Hrd-1-ERAD Komplex für einen IRE1-Abbau verantwortlich ist. IRE1 aktiviert ERAD über das Spleißen der *Xbp1*-mRNA. Somit wäre eine Beteiligung des ERAD-Signalweges durchaus möglich (Su et al., 2014). Außerdem konnten Claessen et al. zeigen, dass misgefaltete Proteine durch das ERAD-Protein p97/VCP (*-Valosin-containing protein*) aus der ER-

Membran extrahiert und proteasomal degradiert werden können (Claessen et al., 2012). Zusammenfassend erhärten die Ergebnisse den Verdacht, dass der ERAD-Signalweg im M50-vermittelten IRE1-Abbau beteiligt ist. Um die Beteiligung von Synoviolin und möglicherweise auch p97 im Abbaumechanismus zu belegen müssen weitere Experimente durchgeführt werden. Ein Ansatz wäre die Herstellung von Synoviolin- und p97-Knockout Zelllinien. Dies könnte eine mögliche Beteiligung des ERAD-Signalweges im IRE1-Degradierungsprozess nach co-Transfektion mit M50 oder Infektion mit MCMV bestätigen.

4.4 Einfluss des IRE1-Signalweges auf die MCMV Replikation

Publizierte Daten unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass der IRE1-XBP1-Signalweg kurz nach Infektion mit MCMV aktiviert wird (Stahl et al., 2013). Aus diesem Grund hat sich ein Teil meiner Arbeit mit den Fragen auseinandergesetzt warum MCMV den IRE1-Signalweg initial aktiviert und warum das möglicherweise die Virusreplikation begünstigt. Es konnte gezeigt werden, dass eine effiziente MCMV-Replikation in Mausfibroblasten stark von der IRE1-Expression abhängig ist. Es konnte unter Verwendung der CRISPR/Cas9-Methode nachgewiesen werden, dass eine genetische Entfernung von IRE1, jedoch nicht von XBP1 oder TRAF2, das Viruswachstum stark supprimiert. Die Verminderung im Viruswachstum konnte außerdem durch eine reduzierte Expression von viralen Proteinen in infizierten IRE1 ko-Zellen bestätigt werden. Anhand von XBP1- und IRE1-Komplementationen der Knockout-Zellen konnte das ungespleißte Protein des XBP1 (XBP1u) als inhibitorischer Faktor der MCMV-Replikation identifiziert werden. Das Spleißen der *Xbp1*-mRNA und die resultierende Expression des XBP1s stellen womöglich essentielle Schritte in der MCMV-Replikation dar, um den inhibierenden Effekt des XBP1u zu blockieren und eine effiziente produktive Cytomegalovirusinfektion in permissiven Zelllinien zu gewährleisten. Die Aktivierung der IRE1-Signalkaskade zu frühen Zeitpunkten der Infektion zeigt eine weitere virale Strategie des Virus die UPR zu seinen Gunsten zu modulieren, welche in dieser Arbeit erstmals beschrieben wurde.

4.4.1 Dosis-abhängige Expression des IRE1

Das Typ-I-Transmembranprotein IRE1 dimerisiert beim Auftreten einer ER-Stressreaktion durch Akkumulation von ungefalteten Proteinen, wodurch dessen Endoribonuklease-Domäne aktiviert wird. Die Aktivierung führt zu einem unkonventionellen Spleißen der

zytoplasmatischen *Xbp1*-mRNA. Dadurch entsteht der Transkriptionsfaktor XBP1s, der die Transkription von Genen der ER-assoziierte Degradierung (ERAD) reguliert (Chakrabarti et al., 2011). Mein ehemaliger Kollege Dr. Sebastian Stahl konnte nachweisen, dass zu späten Phasen einer MCMV-Infektion das IRE1-Protein durch das virale Protein M50 degradiert und das Spleißen der *Xbp1*-mRNA inhibiert wird (Stahl et al., 2013). Abbildung 9 zeigt, dass die Replikationseffizienz von MCMV sehr stark von der Expressionsmenge des IRE1-Proteins abhängig war. In diesem Zusammenhang zeigte eine erhöhte IRE1-Expression auch ein erhöhtes *Xbp1*-mRNA Spleißen in Mock-infizierten Zellen (Abbildung 8B). Eine völlige Abwesenheit der IRE1-Expression und das nicht mehr vorhandene Spleißen der *Xbp1*-mRNA resultierte in einer stark verminderten Virusreplikation (Abbildung 8B/Abbildung 9). Zusammenfassend deuten die Ergebnisse daraufhin, dass eine gewisse IRE1-Expression und das korrespondierende *Xbp1*-mRNA Spleißen zu frühen Zeitpunkten einer MCMV-Infektion wichtig sind. In späten Replikationsphasen wird das IRE1-Protein jedoch durch das M50 abgebaut (Stahl et al., 2013). Hinweise für eine mögliche Bedeutung des *Xbp1*-mRNA Spleißens lieferten bereits publizierte Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe, welche eine kurzzeitige Aktivierung des IRE1-Signalweges und des *Xbp1*-mRNA Spleißens in frühen Infektionsphasen beschrieben (Stahl et al., 2013). Eine Reduktion der MCMV-Replikation konnte ebenfalls durch eine starke Überexpression des IRE1-Proteins erreicht werden (Abbildung 9). Dieses Ergebnis ist möglicherweise auf eine kontinuierliche Aktivierung des IRE1-Signalweges und die daraus resultierende Expressionsteigerung von proapoptotischen Proteinen, wie beispielsweise CHOP, Bcl2 oder die Aktivierung des ASK1-JNK-Signalweges zurück zu führen (Tabas and Ron, 2011). Die Inhibition im MCMV-Wachstum könnte dann auf eine erhöhte Apoptose zurückführen. Experimentell wurde dies in der vorliegenden Arbeit nicht näher untersucht. Tabas und Ron konnten diesbezüglich durch Überexpression des IRE1-Proteins eine Erhöhung der erwähnten Proteine und die Aktivierung der Apoptose nachweisen. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass sehr hohe Konzentrationen an Doxycyclin bereits vor der Infektion zytotoxisch auf die Zellen wirken. Dementsprechend werden weniger Zellen infiziert und ein geringerer Virustiter wird berechnet. Die Durchführung eines MTS-Assays und die Überprüfung die Zellviabilität vor und nach Infektion könnte diese Möglichkeit klären. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass eine gewisse IRE1-Expression für eine effiziente MCMV-Replikation enorm wichtig ist.

4.4.2 Einfluss der einzelnen Komponenten des IRE1-Signalweges

Um den genauen Hintergrund der beobachteten Reduktion im MCMV-Wachstum im Detail zu analysieren, wurden unterschiedliche Knockout-Zellen des IRE1-Signalweges mittels der CRISPR/Cas9-Methode in embryonalen Mausfibroblasten generiert (Abbildung 10A/B). Abbildung 11 zeigte, dass ausschließlich die Abwesenheit von IRE1, und nicht die von XBP1 oder TRAF2, die virale Replikation deutlich reduziert und IRE1 ein essentieller Faktor in frühen Infektionsphasen darstellt. Die Detektion einer verminderten viralen Proteinexpression in IRE1 ko-Zellen lieferte ein weiteres Indiz für die Wichtigkeit einer IRE1-Expression für eine effiziente MCMV-Replikation (Abbildung 12). Dass ein Gen-Knockout von XBP1 zu einer vergleichbaren MCMV-Replikation und viralen Genexpression im Vergleich mit infizierten MEF_{wt}-Zellen führt deckt sich nicht mit den Daten von Drori et al. Die Gruppe konnte zeigen, dass die Abwesenheit von XBP1 in Mausfibroblasten zu einer geringfügig verzögerten MCMV-Replikation und leicht reduzierten Genexpression führt (Drori et al., 2014). Diese geringfügigen Effekte konnte ich in meinen Experimenten nicht beobachten, allerdings waren die maximalen MCMV-Titer in XBP1 Knockout-MEFs etwas niedriger als in den parental MEFs (Abbildung 12). Dass der IRE1-Signalwege für viele Viren relevant ist, konnte bereits durch mehrere Studien von RNA-Viren bewiesen werden. Hassan et al konnten eine Verminderung in der Influenza A-Virusreplikation beobachten, wenn eine Inhibierung des IRE1-Signalweges vorlag (Hassan et al., 2012). Außerdem konnte die Gruppe demonstrieren, dass eine RSV (= Respiratory Syncytial Virus)-Infektion durch eine IRE1-Blockierung inhibiert wird. In diesem Zusammenhang konnte festgestellt werden, dass die RSV-Replikation XBP1-unabhängig, jedoch TRAF2 abhängig, war. Experimentell wurde dies in der Studie an Hand einer Inhibierung der Endoribonuklease-Domäne des IRE1 realisiert, welche das RSV-Wachstum positiv beeinflusst hat (Hassan et al., 2014a; Hassan et al., 2014b). Genau das Gegenteil konnte ich in meiner Arbeit feststellen. Nach MCMV-Infektion der IRE1 ko-Zellen, komplementiert mit einer IRE1-*RNase-dead* Mutante, (Abbildung 13, Abbildung 14) konnte ein ähnliches reduziertes MCMV-Wachstum wie in IRE1 ko-Zellen gezeigt werden. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass nicht nur die IRE1-Expression sondern auch die IRE1-RNase-Domäne für eine effiziente MCMV-Replikation enorm wichtig ist. Somit ist der IRE1-XBP1 und nicht der IRE1-TRAF2-Signalweg von Bedeutung für das Virus.

4.4.3 XBP1u inhibiert die MCMV-Replikation

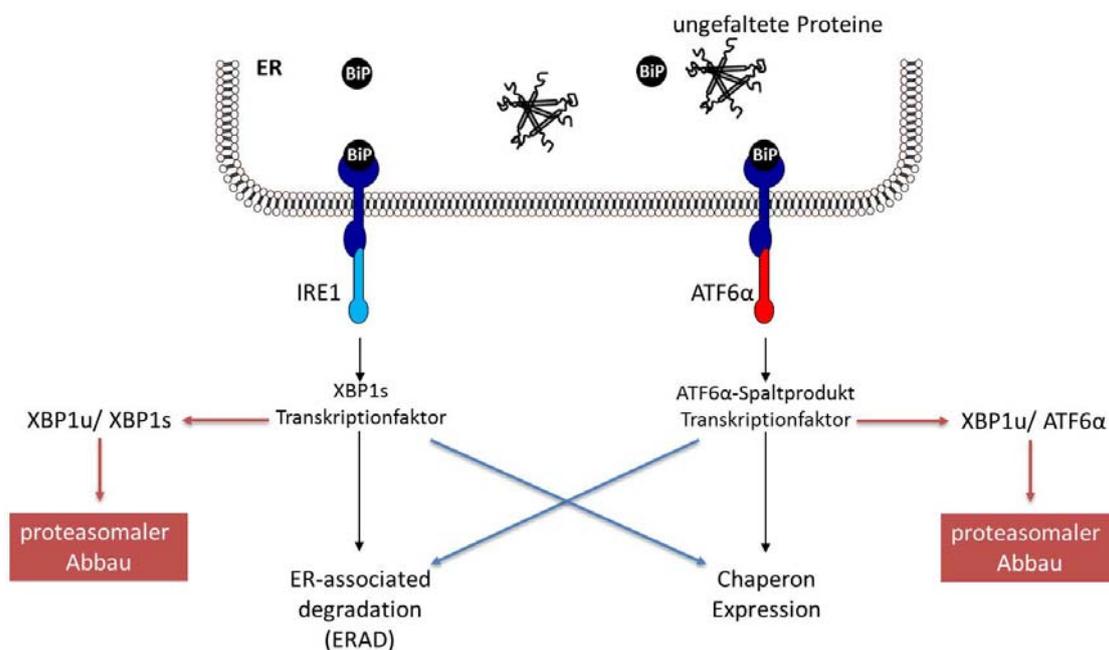
Es stellt sich die Frage, welcher Faktor oder welche Faktoren für die Verminderung der MCMV-Replikation in IRE1 ko-Zellen verantwortlich sind. Interessanterweise konnte eine Anreicherung des ungespleißten XBP1-Produktes, XBP1u, in ER-Stress-induzierten IRE1 ko- und in IRE1-RNase-defizienten-Zellen detektiert werden (Abbildung 10B, Abbildung 14A). Der Nachweis ist deshalb bemerkenswert, da bereits von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben worden ist, dass das XBP1u eine relativ kurze Halbwertszeit von ca. 11 min besitzt und während einer akuten ER-Stressphase proteasomal degradiert wird. Im Gegensatz dazu hat das XBP1s-Protein eine längere Halbwertszeit von ca. 22 min, wodurch eine Kerntranslokation und die Aktivierung von UPR-Zielgenen stattfindet (He et al., 2010). Einzig in chronischen Stressphasen ist das XBP1u für die proteasomale Degradierung von XBP1s wichtig (Calfon et al., 2002; Yoshida et al., 2001). In der generierten IRE1 ko-Zelllinie scheint das XBP1u stabil vorzuliegen. Denkbar wäre, dass eine Akkumulation des XBP1u-Proteins durch die Anreicherung vorliegt und durch einen bisher nicht identifizierten Mechanismus einen negativen Einfluss auf die virale Replikation ausübt. Unter Verwendung der XBP1 ko-Zellen und Komplementationen mit verschiedenen XBP1-Varianten, zeigte einzig die Insertion von XBP1u und eine Verkürzungsmutante, XBP1_{stop}, eine reduzierende Wirkung auf die MCMV-Replikation (Abbildung 16, Abbildung 17A/B). Die Ergebnisse identifizieren das XBP1u-Protein als reduzierenden Faktor des Viruswachstums in IRE1 ko-Zellen. Yoshida et al. konnte bereits zeigen, dass das XBP1u und eine XBP1-Verkürzungsmutante in den Kern translozieren können (Yoshida et al., 2006). Die N-terminale DNA-Bindedomäne ist in den beiden Proteinen, XBP1u und XBP1_{stop}, noch vorhanden. Somit ist es naheliegend, dass die Proteine eine Blockierung von zellulärer oder viraler Transkription verursachen. Das könnte eine mögliche Ursache einer ineffizienten viralen Replikation sein und würde auch die schwächere virale Genexpression in IRE1 ko-Zellen erklären. Um diese Theorie zu bestätigen könnte die Aktivität zellulärer oder viraler Promotoren, beispielsweise der *Major Immediate-Early Promotor* (-MIEP), in den verschiedenen Knockout-Zelllinien mittels eines Luziferase-basierten Experiments überprüft werden. Der MIEP ist einer der ersten Promotoren, der zu Beginn einer CMV Infektion aktiviert wird. Der Promotor besteht aus mehreren Domänen, wie ein basaler Promotor mit einer kanonischen TATA Box und einigen *Enhancer* Regionen (Baskar et al., 1996). Mit den Ergebnissen könnten Rückschlüsse gezogen werden, warum die MCMV-Replikation in IRE1 ko-Zellen stark reduziert vorliegt.

Ein gleichzeitiger Knockout von XBP1 und IRE1 konnte den reduzierenden Effekt des XBP1u-Proteins auf die MCMV-Replikation aufheben (Abbildung 15A/ B). Die Anreicherung des XBP1u-Proteins in den IRE1 ko-Zellen konnte anhand des XBP1-Knockouts nicht mehr auftreten. Dies stützt die Theorie, dass das XBP1u durch einen noch unbekanntem Mechanismus einen negativen Einfluss auf die MCMV Replikation ausübt. Außerdem zeigen die Ergebnisse, dass das *Xbp1*-mRNA-Spleißen in frühen Phasen der Virusinfektion essentiell ist aber nur wenn eine IRE1-Expression vorliegt. Es würde die Anreicherung des XBP1u unterdrücken. Tatsächlich konnten in mehreren Studien demonstriert werden, dass das XBP1s in HCMV oder SARS-Coronavirus Infektionen erhöht ist, jedoch ohne die Transkription von UPR-Zielgenen zu aktivieren (Bechill et al., 2008; Isler et al., 2005). Weiter zeigte die Gruppe um Wilson und Kollegen, dass eine erhöhte Expression von XBP1s bei der Reaktivierung von KSHV in PEL (*-Primary effusion lymphoma*) Zellen eine Rolle spielt (Wilson et al., 2007). Zwar wurde in diesen Studien kein Fokus auf das XBP1u gelegt, sie beweisen jedoch, dass das XBP1s für viele Virusfamilien eine bedeutende Rolle einnimmt. Interessant wäre zu überprüfen, wie eine Überexpression des XBP1u-Proteins die Replikationen oder auch Reaktivierung von verschiedenen Viren beeinflussen könnte. Ein experimenteller Nachweis zur Erhöhung der XBP1s Proteinexpression oder die resultierende Transkription von UPR-induzierten Zielgenen während einer MCMV-Infektion wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Allerdings konnten Marcinowski und Kollegen mittels eines Transkriptionsprofilings während einer lytischen MCMV Infektion zeigen, dass verschiedene Gene, die auf ungefaltete Proteine und ER Stress reagieren, hochreguliert werden (Marcinowski et al., 2012). Ob die korrespondierenden Proteine einen direkten Einfluss auf die MCMV Replikation besitzen, müsste durch nachfolgende Experimente näher untersucht werden.

4.5 Einfluss des ATF6-Signalweges auf die MCMV-Replikation

Eine Erhöhung der Chaperonexpression stellt einen wichtigen Schritt in der Virusreplikation dar, um die Masse an ungefalteten viralen Proteinen zu prozessieren. Überwiegend wird dies durch den ATF6 α -Signalweg reguliert. Es konnte bereits nachweisen werden, dass Chaperone und die ATF6 α -vermittelte Genexpression während einer HCMV-Replikation induziert wird (Buchkovich et al., 2008; Buchkovich et al., 2010). Außerdem konnte Qian und Kollegen zeigen, dass die BiP-Expression im Laufe einer MCMV-Replikation ansteigt (Qian et al., 2012). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der ATF6 α - und IRE1-XBP1-Signalweg

miteinander durch die Bindung der Transkriptionsfaktoren an ähnliche Sequenzmotive in Promotoren verknüpft sind (Lee et al., 2002; Yoshida et al., 2001). Unter diesen Aspekten war die Möglichkeit, dass die Chaperonexpression bzw. der ATF6 α -Signalweg selbst durch eine XBP1u Anreicherung blockiert ist, was potentiell zu einer Verminderung im Viruswachstum führen könnte. Der Nachweis des Volllängen-ATF6 α -Proteins und der prozessierten Form des ATF6 α konnte in dieser Studie nicht durchgeführt werden, weil kein funktionierender Antikörper erhältlich war. Somit war es nicht möglich eine potentielle Inhibition der ATF6 α -Aktivierung in IRE1 ko-Zellen zu überprüfen. Deswegen wurde die MCMV-Replikation in ATF6 α -Knockout MEF-Zellen analysiert. Überraschenderweise wurde kein Unterschied in der Replikation des murinen Cytomegalovirus und der viralen Genexpression, im Vergleich zu Kontrollzellen, festgestellt (Abbildung 19A, B). Wie bereits oben erwähnt, führt ein XBP1 Knockout zu keiner Beeinträchtigung der MCMV-Vermehrung. Der Unterschied zwischen ATF6 α -/- und IRE1 ko-Zellen ist die normale Funktion des IRE1-Signalweges in ATF6 α -/- Zellen und die Überexpression von XBP1u in IRE1 ko-Zellen. Eine mögliche Erklärung für die Ergebnisse wäre, dass das vorhandene XBP1s-Protein in ATF6 α -/- Zellen für das fehlende ATF6 α -Protein kompensieren kann. In XBP1 ko-Zellen würde dies dementsprechend vice versa verlaufen. Beispielsweise ist aus einer Studie bekannt, dass das XBP1s-Protein und die aktive Form des ATF6 α synergistisch innerhalb bestimmter Promotoren wirken können. Diese Synergie, welche in Abbildung 33 schematisch dargestellt ist, verstärkt die Transkription von verschiedenen ER-Stress-induzierten Genen, wie beispielsweise BiP und XBP1 (Abbildung 33, (Inagi et al., 2014)).



Diskussion

Abbildung 33: Schematische Darstellung des IRE1-XBP1- und ATF6 α -Signalweges und deren Synergien. Beide Signalwege werden während einer akuten ER-Stressreaktion aktiviert. Die Aktivierung resultiert in der Translation von zwei Transkriptionsfaktoren, XBP1s und ATF6 α (Spaltprodukt). Beide Proteine gewisse Synergie zueinander (dargestellt durch blaue Pfeile) und können an ähnliche Promotorelemente binden. Außerdem können beide Proteine durch das XBP1u-Protein proteasomal degradiert werden (dargestellt durch rote Pfeile). (Lee et al., 2002; Yoshida et al., 2009) ER: Endoplasmatisches Retikulum

Die Synergie der beiden Signalwege könnte die ähnlich-effiziente MCMV-Replikation in den Zelllinien hervorrufen. Die reprimierende Wirkung des XBP1u-Proteins auf die MCMV-Replikation in IRE1 ko-Zellen könnte dementsprechend daher herrühren, dass das XBP1s abwesend ist und gleichzeitig das ATF6 α , entweder der Signalweg im Ganzen oder die Promotorbindung der prozessierten ATF6 α -Form, von XBP1u blockiert ist. Hierzu konnte bereits Yoshida et al. in Transfektionsexperimenten zeigen, dass das ATF6 α durch das XBP1u proteasomal degradiert werden kann (Yoshida et al., 2009). Basierend auf diesen Annahmen wurde eine Doppelknockout Zelllinie aus ATF6 $^{-/-}$ und XBP1 ko generiert. Es konnte in Abbildung 20B eine eingeschränkte Virusvermehrung in dieser Zelllinie bestätigt werden mit Titern ähnlich der Infektion in IRE1 ko-Zellen. Ob die Replikationsineffizienz in den ATF6 $^{-/-}$ /XBP1 ko-Zellen jedoch von der Tatsache abhängt, dass zwei der drei UPR-Signalwege fehlen und ER-Stress nur noch extrem eingeschränkt durch den PERK-Signalweg behoben werden kann, müssten weitere Experimente zeigen. Es ist möglich, dass wesentlich schneller Apoptose in den Doppelknockout-Zellen durch zusätzlichen ER-Stress, beispielsweise einer Virusinfektion, induziert wird. Dadurch könnte ein geringerer Virustiter gemessen werden. Die Durchführung eines MTS-Assays mit Überprüfung der Zellviabilität könnte die Annahme belegen. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass entweder das ATF6 α - oder das XBP1s-Protein zusammen mit dem IRE1-Protein in den Zellen vorhanden sein muss, um eine produktive MCMV-Replikation zu gewährleisten. Die Frage warum das MCMV in den ATF6 $^{-/-}$ /XBP1 ko-Zellen und in IRE1 ko-Zellen schlechter repliziert konnte jedoch durch die Ergebnisse nicht beantwortet werden. Aufbauend auf der weiter oben beschriebenen Hypothese wäre es möglich, dass das ATF6 α und XBP1s durch Bindung an virale Promotoren, wie den *Major Immediate Early Promotor* (-MIEP) von MCMV die Transkription von viralen Genen beschleunigen und somit die Replikation begünstigen. Tatsächlich wurden mittels *in silico* Analyse mehrere potentielle XBP1s- und ATF6 α -Bindestellen auf dem MIEP identifiziert (prälimäre Daten, ohne Abbildung). Die Hypothese müsste durch nachfolgende Experimente näher untersucht werden.

4.6 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion des murinen Cytomegalovirus mit dem IRE1-abhängigen ER-Stress-Signalweg zu frühen und zu späten Zeitpunkten einer Infektion untersucht. Es wurde erstmals beschrieben, dass die Aktivierung des IRE1-Signalweges und das resultierende *Xbp1*-mRNA-Spleißen eine essentielle Bedeutung für die effiziente-produktive Replikation von MCMV zu frühen Zeitpunkten darstellt. Eine Aktivierung des IRE1-TRAF2-ASK1-JNK-Signalweges konnte anhand der ermittelten Daten ausgeschlossen werden. Des Weiteren konnte eine inhibitorische Funktion der ungespleißten Form des XBP1-Proteins (XBP1u) auf die MCMV-Replikation nachgewiesen werden. Die hier gewonnenen Erkenntnisse beschreiben erstmals eine neuartige Strategie, mit dem MCMV negative Einflüsse der UPR durch eine kurzzeitige Aktivierung des IRE1-XBP1-Signalwegs unterdrückt. Diese Aktivierung Inhibiert die Translation des XBP1u-Proteins, welches einen negativen Effekt auf die MCMV-Replikation und virale Genexpression hätte. Diese Ergebnisse könnten möglicherweise dabei helfen einen neuen Angriffspunkt antiviraler Substanzen zu identifizieren, um die Replikation des Virus bereits zu frühen Phasen zu blockieren.

Des Weiteren wurde die M50-vermittelte IRE1-Degradierung zu späten Zeitpunkten einer murinen Cytomegalovirusinfektion im Detail analysiert. Die M50-Domäne, die für die IRE1-Reduktion verantwortlich ist, konnte auf 5 Aminosäuren eingeschränkt werden. Jedoch konnte anhand dieser Erkenntnis bisher keine MCMV-M50-Mutante generiert werden, die das IRE1-Protein nicht mehr abbaut. Der Grund hierfür war die fehlerhafte Interaktion der M50-Mutante zu M53. Diese Interaktion stellt einen essentiellen Schritt in der MCMV-Replikation dar. Somit war es nicht möglich den Einfluss eines funktionellen IRE1-XBP1-Signalwegs in späten Phasen einer Cytomegalovirusinfektion zu untersuchen. Es war jedoch erstmals möglich, den verantwortlichen Abbaumechanismus als proteasomal zu identifizieren, wodurch das IRE1 durch das M50 degradiert wird. Außerdem zeigen die Daten dieser Arbeit, dass die IRE1-M50-Interaktion zu einer Ubiquitinierung des IRE1 führt und möglicherweise die Beteiligung der E3-Ubiquitinligase Synoviolin und des ERAD-Signalwegs essentielle Schritte im IRE1-Abbaumechanismus darstellen.

5 Materialien

5.1 Zelllinien

Tabelle 1: Zelllinien

Bezeichnung	Erläuterung	Quelle/ Referenz
HEK 293A	Adenovirus transformierte human embryonale Nierenzellen; exprimieren Adenovirus E1 Proteine; selektioniert auf flache Morphologie	Invitrogen, Karlsruhe R705-07
HEK 293T	Basierend auf HEK 293 Zelllinie, welche das großes T-Antigen von SV40 exprimieren	ATCC: CL-11268
MEF_{wt}	SV40 immortalisierte embryonale Mausfibroblasten	A. Villunger, Med. Uni. Innsbruck
10.1	spontan immortalisierte primäre BALB/c murine embryonale Fibroblasten, p53 negativ	(Harvey and Levine, 1991)
NIH3T3	murine embryonale Fibroblasten aus NIH Swiss Mouse, spontan immortalisiert	ATCC: CRL-1658
NIH3T3-M50-komplementierend	G418 resistent (2mg/ ml)	(Mohr et al., 2012)
mIRE1_{GFP} MEF	IRE1-ko basiert auf MEF _{wt} -Zellen; transduziert mit Lentiviren zur Etablierung eines Tet-ON und IRE1 _{GFP} induzierbaren Systems (Doxycyclin induzierbar)	Eelco van Anken/ Universität Mailand
XBP1-ko MEF	<i>XBP1</i> Gen wurde durch Insertion des Neomycin Resistenzgens zwischen Exons 1 und 2, sowohl das Intron, unterbrochen, führt zu einer Verschiebung im Sequenzleseraster	(Reimold et al., 2000)
Phoenix¹⁾	Amphotrophe Verpackungszelllinie zur Herstellung von Retroviren basierend auf 293T-Zellen, stabile Expression der <i>gag/pol/env</i> Gene des Moloney-Maus-Leukämie-Virus	Nolan Lab.; Stanford

1) regelmäßig selektionieren mit 200 µg/ ml Hygromycin B und 2 µg/ ml Diphtheriatoxin

5.2 Modifizierte Zelllinien

Tabelle 2: Modifizierte Zelllinien

Bezeichnung	Erläuterung	Quelle/ Referenz
MEF_{wt} SV40imm. mIRE1-ko MEF_{wt} SV40imm. XBP1-ko MEF_{wt} SV40imm. TRAF2-ko	MEF _{wt} Zellen, die über das CRISPR/Cas9 modifiziert wurden, um IRE1-, XBP1- und TRAF2-ko Zellen zu etablieren (selektioniert mit 1,5 µg/ml Puromycin)	Florian Hinte
10.1-mIRE1-3xMyc	Stabil transduzierte 10.1 Fibroblasten mit mIRE1-3xMyc (200 µg/ml Hygromycin B)	Sebastian Stahl
MEF_{wt} SV40imm. mIRE1-/- _mIRE1-wt MEF_{wt} SV40imm. mIRE1-/- _mIRE1-RNase dead	CRISPR/Cas9 Zellen, die entweder mit dem wt oder RNase-dead mIRE1 durch retrovirale Transduktion komplementiert wurden (50 µg/ml Hygromycin B)	Florian Hinte
XBP1-ko + HA-XBP1_{wt} XBP1-ko + HA-XBP1_{Stop} XBP1-ko + HA-XBP1_{unsplicable}	Stabil transduzierte XBP1-ko MEF Zellen, komplementiert mit XBP1 _{wt} , XBP1 _{unsplicable} oder XBP1 _{Stop} (1,25 µg/ml Puromycin), exprimieren ein N-terminalen HA-Tag	Florian Hinte
XBP1-ko_mIRE1-ko	Knockout von mIRE1 mittels CRISPR/Cas9 basierend auf XBP1-ko MEF Zellen	Florian Hinte
ATF6^{+/+} (LT) und ATF6^{-/-} (LT)	mittels pBabe-LTcDNA-zeocin Lentiviral-transduzierte primäre ATF6 ^{+/+} und ATF6 ^{-/-} MEF Zellen zur Immortalisierung	Florian Hinte/ (Wu et al., 2007)/ T. Rutkowski
ATF6^{-/-} (LT)_XBP1-ko	Immortalisierte ATF6 ^{-/-} Zellen, in denen durch CRISPR/Cas9 das <i>Xbp1</i> -Gen ausgeknockt wurde	Florian Hinte

5.3 Zellkulturmedien

Dulbeccos Modified Eagles Medium (DMEM) mit Glucose	(PAA)
Dulbeccos PBS (D-PBS) ohne Calcium und Magnesium	(PAA)
Trypsin/ EDTA (0,05 ‰/ 0,02 ‰) in PBS	(PAA)
Fetales Kälber Serum (FCS)	(PAN)
Fetales Kälber Serum – Tetracycline frei (FCS _{TETfree})	(PAN)
Neugeborenes Kälber Serum (NCS)	(PAN)

5.4 Viren

Tabelle 3: Viren

Bezeichnung	Erläuterung	Quelle/ Referenz
Murines Cytomegalovirus, Stamm Smith (MCMV_{GFP})	Rekombinantes murines CMV kloniert als BAC Konstrukt mit Expression des grün fluoresz. Proteins (GFP), Selektion in Bakterien über Chloramphenicol-Res.	(Brune et al., 2001)
Murines Cytomegalovirus, Stamm Smith (MCMV_{-M50-HA-M53-Flag})	Rekombinantes murines CMV kloniert als BAC Konstrukt, in dem M50 und M53 als HA- bzw. Flag-markierte Form vorliegt, Selektion in Bakterien über Chloramphenicol-Res.	Zsolt Ruzsics/ Universitätsklinikum Freiburg

5.5 Bakterien und Bakterienkulturmedium

Tabelle 4: Bakterien

Bezeichnung	Erläuterung	Quelle/ Referenz
<i>E.coli</i> DH10B	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 endA1 recA1 deoR Δ(ara,leu) 7697 araD139 galU galK nupG rpsL λ-	Life Technologies
<i>E.coli</i> GS1783	DH10B cl857 Δ(<i>cro-bioA</i>)<> <i>araC</i> PBADl- <i>scel</i> ;	(Tischer et al., 2010)

Luria-Bertani Flüssigmedium (LB):

- 1 % Bactotrypton (Roth)
- 0,5 % Hefeextrakt (Roth)
- 0,5 % NaCl
- evtl. Zugabe eines Antibiotika

Luria-Bertani-Agarplatten:

- 1 % Bactotrypton (Roth)
- 0,5 % Hefeextrakt (Roth)
- 0,5 % NaCl
- 15 g/ L Agar-Agar
- evtl. Zugabe eines Antibiotika

5.6 Antibiotika

Tabelle 5: Antibiotika

Bezeichnung	Konzentration	Quelle/ Referenz
Ampicillin	100 µg/ ml	Roth
Penicillin	100 U/ ml	PAA
Streptomycin	100 U/ ml	PAA
G418	2 mg/ ml	Life Technologies
Hygromycin B	50/ 200 µg/ ml	Roth
Puromycin	1,0 – 1,5 µg/ ml	Sigma-Aldrich
Kanamycin	50 µg/ ml	Roth
Chloramphenicol	15 µg/ ml	Roth

5.7 Plasmide

Tabelle 6: Plasmide

Bezeichnung	Beschreibung	Quelle/ Referenz
pcDNA3	5,4 kb, high-copy, eukaryotischer Expressionsvektor, CMV-Promotor, Neomycin und Ampicillin-Resistenzgen	Invitrogen
pcDNA3-M50-170-317-FLAG	5,8 kb, high-copy, basierend auf pcDNA3, eukaryotischer Expressionsvektor für Aminosäuren 170-317 des MCMV Gens M50 mit C-Terminalem FLAG-Tag (Kontrolle)	Sebastian Stahl
pcDNA3-M50-FLAG	6,3 kb, high-copy, basierend auf pcDNA3, eukaryotischer Expressionsvektor für das MCMV Gens M50 mit C-Terminalem FLAG-Tag	Sebastian Stahl

pcDNA3-M50-1-276-FLAG	6,3 kb, high-copy, basierend auf pcDNA3, eukaryotischer Expressionsvektor für Aminosäuren 1-276 des MCMV Gens M50 mit C-Terminalem FLAG-Tag (Kontrolle)	Sebastian Stahl
pMSCV-Hyg	6,9 kb, low copy, retroviraler Vektor, LTR Promotor, Hygromycin Resistenz	Clontech Laboratories
pMSCV-Puro	6,2 kb, low copy, retroviraler Vektor, LTR Promotor, Puromycin Resistenz	Clontech Laboratories
pcDNA-3xFlag-ATF6	7,4 kb, high copy, basierend auf pcDNA3, eukaryotischer Expressionsvektor für murines ATF6 mit N-Terminalem 3xFlag-Tag	Sebastian Stahl
Plasmide, die während der vorliegenden Arbeit konstruiert wurden		
pMSCV-Hyg-mIRE1_{wt}	9,9 kb, low copy, retroviraler Vektor, LTR Promotor, Hygromycin Resistenz, exprimiert IRE1 mit modifizierter Sequenz am N-Terminus	Florian Hinte
pMSCV-Hyg-mIRE1-RNase-Dead	9,9 kb, low copy, retroviraler Vektor, LTR Promotor, Hygromycin Resistenz, exprimiert IRE1 mit modifizierter Sequenz am N-Terminus und Mutation in der RNase-Domäne	Florian Hinte
pMSCV-Puro-HA-XBP1_{wt}	7,4 kb, low copy, LTR Promotor, Puromycin Resistenz, exprimiert XBP1 wt Sequenz mit einem N-terminalen HA-tag	Florian Hinte
pMSCV-Puro-HA-XBP1_{unsplicable}	7,4 kb, low copy, LTR Promotor, Puromycin Resistenz, exprimiert mutiertes XBP1 in der Spleißregion mit einem N-terminalen HA-Tag	Florian Hinte
pMSCV-Puro-HA-XBP1_{stop}	7,4 kb, low copy, LTR Promotor, Puromycin Resistenz, exprimiert mutiertes XBP1 mit Punktmutation vor Intron, wodurch ein Translationsstop entsteht, mit einem N-terminalen HA-Tag	Florian Hinte

pcDNA3-HA-XBP1_{wt}	6,6 kb, high-copy, basierend auf pcDNA3, eukaryotischer Expressionsvektor für das XBP1 _{wt} mit N-terminalen HA-Tag	Florian Hinte
pcDNA3-HA-XBP1_{unsplicable}	6,6 kb, high-copy, basierend auf pcDNA3, eukaryotischer Expressionsvektor, für das in der Spleißregion mutierte XBP1 mit N-terminalen HA-Tag	Florian Hinte
pcDNA3-HA-XBP1_{Stop}	6,6 kb, high-copy, basierend auf pcDNA3, eukaryotischer Expressionsvektor für eine ausschließlich den N-terminalen Teil exprimierende XBP1 Mutante mit N-terminalen HA-Tag	Florian Hinte
pcDNA3-HA-XBP1_{Spliced}	6,6 kb, high-copy, basierend auf pcDNA3, eukaryotischer Expressionsvektor, für das gespleißte XBP1 mit N-terminalen HA-Tag	Florian Hinte
pcDNA3-M50-FLAG (Deletions- und Alaninsubstitutionsmutanten)	6,3 kb, high-copy, basierend auf pcDNA3, eukaryotischer Expressionsvektor für das MCMV Gen M50 mit C-Terminalem FLAG-Tag, mit verschiedenen Deletionen oder Alaninsubstitutionen	Florian Hinte

5.8 Oligonukleotide *

Tabelle 7: Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz	Funktion
IRE1-gRNA 1	fwd: 5'- ACCGCTTGCATGCTGTTAGCAAG -3' rev: 5'- AAACCTTGCTAACAGCATGCAAG -3'	CRISPR/ Cas9
IRE1-gRNA 2	fwd: 5'- ACCGCATGCTGTTAGCAAGAGGA -3' rev: 5'- AAACCTCCTTGCTAACAGCATG -3'	CRISPR/ Cas9
IRE1-gRNA 3	fwd: 5'- ACCGATGGCAGTCTGTACACACT -3' rev: 5'- AAACAGTGTGTACAGACTGCCAT -3'	CRISPR/ Cas9

XBP1-gRNA 1	fwd: 5' - ACCGGCTATGGTGGTGGTGGCAG -3' rev: 5' - AAACCTGCCACCACCACCATAGC -3'	CRISPR/ Cas9
XBP1-gRNA 2	fwd: 5' - ACCGGTGGCAGCGGCGCCGAGCG -3' rev: 5' - AAACCGCTCGGCGCCGCTGCCAC -3'	CRISPR/ Cas9
XBP1-gRNA 3	fwd: 5' - ACCGCCAGCCCCGCTCCGGCGGC -3' rev: 5' - AAACGCCGCCGAGGGCGGGCTGG -3'	CRISPR/ Cas9
TRAF2-gRNA 1	fwd: 5' - ACCGTGTGACTTCCCCTGGCTCC -3' rev: 5' - AAACGGAGCCAGGGGAAGTCACA -3'	CRISPR/ Cas9
TRAF2-gRNA 2	fwd: 5' - ACCGGTTAGAAGCCAAGTACCTC -3' rev: 5' - AAACGAGTACTTGGCTTCTAAC -3'	CRISPR/ Cas9
TRAF2-gRNA 3	fwd: 5' - ACCGCGGAGGCCTTCCAGGCC -3' rev: 5' - AAACGGGCCTGGAAAGGCCTCCG -3'	CRISPR/ Cas9
mIRE1 w/o	fwd: 5' - ATTAGATCTCCACCATGCCGGCCCGGTGGCTGTTG -3' rev: 5' - AACCTCGAGTCAGAGGGCATATGGAATCACTGG -3'	Klonierung
HA-XBP1_{wt}	fwd: 5' - GGAATTAGATCTCCATGTACCCATACGACGTCCCAGACTACGCT GTGGTGGTGGCAGCG -3' rev: 5' - GAATTCGTAACTTAGACACTAATCAGCTGGGGGAAAAGTTCAT TGGCAAAAGTAT -3'	Klonierung
HA-XBP1_{stop}	fwd: 5' - GTGGCCGGGTGAGCTGAGTCC -3' rev: 5' - GGAATCAGCTCACCCGGCCAC -3'	Klonierung/ QuikChange
HA-XBP1_{Unspliced}	fwd: 5' - GAGAGTGCAGCACTCAGACTATGTGCACCTTTACAACAG -3' rev: 5' - CTGTTGTAAGGTGCACATAGTCTGAGTGCTGCACTCTC -3'	Klonierung/ Intron- Modifikation auf XBP1 _{wt} basierend
Sequenzierung M50	fwd: 5' - AGCAGCTGGAGGTGATACTTG - 3' rev: 5' - ATGAAGCTCTTTACGGCCGTG - 3'	BAC- Sequenzierung
IRE1_{wt}	fwd: 5' - CTCGAGGTTAACATGCCGGCCCGGTGGCTGTTG - 3' rev: 5' - AGAATTCGTAACTCAGAGGGCATATGGAATCACTGGAGG - 3'	Klonierung
IRE1-RNase- dead	fwd: 5' - AGAGCTGTGGTCAAGATGGAC - 3' rev: 5' - GTCCATCTTGACCACAGCTCT - 3'	Klonierung/ QuikChange auf IRE1 _{wt} basierend

* Alle Oligonukleotide wurden von Life Technologies bezogen

Bezeichnung	Sequenz	Erläuterung/Quelle
IRE1modifiziert 1-531 bp	atgccggcccgggtggctgttctcctgctggcgctgctgctaccg ccgcccggcccTggTagttttggaagaaccagcacagttacac tgcctgagacctgttgtttgtctcgaccctggatgga TCTCTA caCgcAgtATCAaaACGCacTggctccatcaagtggacttt aaaagaagatccagtcctgcaggtccaacacacgtggaagag ccggctttcctcccagatcccaatga CggATCCTtAtaTacC TTA ggaggcaagaacaacgaaggcctgacgaaacttcccttt accatcccagaattggttcaggcctccccatgccgaagttcaga tggaatcctctacatgggtaaaagcaagatatttggatgttat cgacctctgactggcgagaagcagcagactttgtcatcggcct ttgctgatagtctctgcccatcaacttcccttctatatcttggacg gacagaatacaccatcaccatgtatgacaccaagacccggggag ctccgctgg	Sequenz wurde von der Firma Integrated DNA Technologies (IDT) synthetisiert In Großbuchstaben sind die Basen in der Sequenz markiert, die verändert wurden gegenüber der Wildtyp Sequenz Die Veränderung führt zu einer fehlerhaften Erkennung von Cas9

5.9 Größenstandards

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

5.10 Enzyme

Fast Digest-Restriktionsenzyme (10 U/μl)	(Thermo Fisher Scientific)
T4 DNA Ligase (5 U/μl) und Puffer	(Thermo Fisher Scientific)
PRECISOR High-Fidelity DNA Polymerase (2u/μl) und Puffer	(BioCat)
Dream Taq™ Green DNA Polymerase (5u/μl) und Puffer	(Thermo Fisher Scientific)
RNase A (10 mg/ml)	(Roth)
TURBO DNA-free™ Kit	(Ambion)
RevertAid H Minus Reverse Transcriptase und Puffer	(Thermo Fisher Scientific)

5.11 Kit-Systeme

NucleoBond® Xtra Midi	(Macherey-Nagel)
NucleoBond Gel and PCR Clean-up	(Macherey-Nagel)
BCA Protein Assay Kit	(Perbio)
innuPREP DNA mini Kit	(Analytik Jena)
innuPREP RNA mini Kit	(Analytik Jena)

5.12 Antikörper

Tabelle 8: Primäre Antikörper

Bezeichnung	Herkunft	Antigen	Anwendung	Quelle/ Referenz
α-HA (16B12)	Maus	HA	WB 1:1000 IP 1:300	BioLegend
α-Flag (M2)	Maus	Flag	WB 1:1000 IP 1:300	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
α-Myc (4A6)	Maus	Myc	WB 1:1000 IP 1:300	Millipore (Upstate)
α-IRE1 (14C10)	Kaninchen	IRE1 α	WB 1:1000	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA
α-XBP1	Kaninchen	XBP1	WB 1:500	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA
α-TRAF2	Kaninchen	TRAF2	WB 1:1000	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA
α-IE1 (Chroma101)	Maus	IE1	WB 1:1000	Stipan Jonjic (Univ.of Rijeka)
α-M57	Maus	M57	WB 1:1000	Stipan Jonjic (Univ.of Rijeka)
α-gB (M55.01)	Maus	gB	WB 1:1000	Capri (Stipan Jonjic)
α-GFP	Maus	GFP	WB 1:1000	Roche
α-β-Aktin (AC-74)	Maus	β-Aktin	WB 1:1000	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

Tabelle 9: Sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Herkunft	Antigen	Anwendung	Quelle/ Referenz
α-Kaninchen Ig	Ziege	IgG aus Kaninchen	WB 1:5000	Jackson ImmunoResearch
α-Maus Ig	Ziege	IgG aus Maus	WB 1:5000	Jackson ImmunoResearch

5.13 Verbrauchsmaterialien

0,45 µm Filteraufsätze Minisart®	(Sartorius)
Kryoröhrchen 2 ml (steril)	(Roth)
Deoxyribonukleotidemix mit je 10mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP	(Thermo Fisher Scientific)
ECL Detection Reagents	(Pierce)
Elektroporationsküvetten	(Eurogentec)
Hybond ECL/ Nitrocellulose	(GE Healthcare)
Pipettenspitzen	(VWR, Neolab)
Reaktionsgefäße	(Eppendorf)
Protein A/ G Agarose	(Roche)
Whatman Papier 3mm	(Roth)
Zellkulturschaber	(TPP)
Zellkulturgefäße	(Greiner, TPP, Sarstedt)
Protease Inhibitor Cocktail „Complete Mini“	(Roche)

5.14 Chemikalien

Standardchemikalien wurden von Carl Roth oder Sigma Aldrich bezogen. Gesondert aufgelistete Substanzen/Chemikalien jeweils vom angegebenen Hersteller.

5.15 Zusammensetzung SDS-PAGE Gele

Tabelle 10: Zusammensetzung der SDS-PAGE Gele

Bezeichnung	Konzentration	Komponente	Volumen (für 1 Gel)
Sammelgel	4 %	H ₂ O	6,1 ml
		Acrylamid/ Bis	1,3 ml
		Gelpuffer	2,5 ml
		SDS (20 %)	50 µl
		APS	40 µl
		TEMED	20 µl
Trenngel	8 %	H ₂ O	4,7 ml
		Acrylamid/ Bis	3,3 ml
		Gelpuffer	2,5 ml
		SDS (20 %)	50 µl
		APS	80 µl
		TEMED	40 µl

Materialien

	10 %	H ₂ O Acrylamid/ Bis Gelpuffer SDS (20 %) APS TEMED	4,1 ml 3,3 ml 2,5 ml 50 µl 80 µl 40 µl
	12 %	H ₂ O Acrylamid/ Bis Gelpuffer SDS (20 %) APS TEMED	3,4 ml 4,0 ml 2,5 ml 50 µl 80 µl 40 µl

5.16 Puffer und Lösungen

Tabelle 11: Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Volumen (aufgefüllt mit ddH ₂ O)	Masse	Besonderheiten
RIPA-Lysepuffer	für 200 ml:	50 mM Tris 150 mM NaCl 1 % TritonX100 0,1 % SDS 1 % Deoxycholat	pH 7,2 einstellen; Zugabe eines Proteaseinhibitors (Complete Mini, Roche) 1 Tablette/10 ml Puffer
Transferpuffer	für 2 L:	50 mM Tris 40 mM Glycin 0,04 % SDS 20 % Methanol	
Waschpuffer 1 (IP)	für 500 ml:	150 mM NaCl 1 mM Tris pH 7,6 2 mM EDTA 0,2 % NP40	
Waschpuffer 2 (IP)	für 500 ml:	500 mM NaCl 1 mM Tris pH 7,6 2 mM EDTA 0,2 % NP40	
Waschpuffer 3 (IP)	für 500 ml:	100 mM Tris	auf pH 8,0 einstellen
TE-Puffer	für 500 ml:	10 mM Tris 1 mM EDTA	auf pH 8,0 einstellen; zum Lösen von Plasmid- /BAC-DNA

TBST (10x)	für 5 L:	100 mM Tris 1,5 mM NaCl 1 % Tween20	auf pH 7,5 einstellen, zum Waschen von Membranen und ansetzen von Antikörper Verdünnungen
TAE (50x)	für 1 L:	2 M Tris 5,7 % AcOH 50 mM EDTA	für Agarose-/und BAC- Gele
S1 – Resuspendierung	für 250 ml:	50 mM Tris pH 8 10 mM EDTA RNaseA 100 µg/ml	Puffe zur Isolierung der Plasmid-/BAC-DNA (Minipräpation)
S2 – Lyse	für 250 ml:	200 mM NaOH 1 % SDS	
S3 – Neutralisation	für 250 ml:	2,8 M KAc pH 5,1 mit AcOH	
Gelpuffer für Sammelgel	für 500 ml:	0,5 M Tris	pH 6,8 einstellen
Gelpuffer für Trenngel	für 500 ml:	1,5 M Tris	pH 8,8 einstellen
Laemmli – Laufpuffer für SDS-PAGE (10x)	für 5 L:	250 mM Tris 1,92 M Glycin 1 % SDS	
Proteinprobenpuffer (4x PPP)	für 50 ml	0,3 M Tris 12 % SDS 40 % Glycerin 200 mM DTT	pH 6,8 einstellen, Zugabe von Bromphenolblau
Kern Extrakt: Harvest Buffer	für 100 ml		
Kern Extrakt: Waschpuffer			

5.17 Geräte

Tabelle 12: Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Agagel Midi-Wide/ Maxi	Biometra
Axiovert 25 Mikroskop	Zeiss
Bakterienbrutschrank	Memmert
Bakterienschüttelinkubator GFL3033	Hilab
Bakterienschüttler Certomat® R	B. Braun Biotech International
Finnpipette® Multistepper	ThermoFisher

Materialien

Geldokumentation GelDoc XR	Bio-Rad
Gene Pulser XCell	Bio-Rad
Glaspipetten (5 ml, 10 ml, 20 ml)	Brandt
Heraeus Multifuge 1S-R	ThermoFisher
Inverted Microscope Axiovert 200M	Zeiss
Kühltischzentrifuge Hereus Fresco 21	ThermoFisher
Kühlzentrifuge Sorvall® RC 5C Plus	ThermoFisher
Magnetrührer MR2002	Heidolph
Mini-Protean 3 Cell	Bio-Rad
Multiplate Absorbance Reader Spectrafluor Plus	Tecan
Nanodrop	Peqlab
PefectBlue Gelsystem Mini S/ Maxi S	Peqlab
ph-Meter inoLab pH720	WTW
Photometer Ultrospec 10	GE Healthcare
Pipettboy acu	IBS
Pipetten 0,2 – 1000 µl	Gilson
Schüttler für Blots Wt-17	Biometra
Spannungsgenerator Power-PacTM Universal	Bio-Rad
TC10™ Automated Cell Counter	Bio-Rad
Thermomixer 5496	Eppendorf
Tischzentrifuge Centrifuge 5415D	Eppendorf
Transblot® SD Semi-dry Transfer Cell	Bio-Rad
Überkopfschüttler Rotator SB2	Stuart
Vortex Mixer 7-2020	Neolab
Zellkultur Inkubator HeraCell 150	ThermoFisher
Zellkulturwerkbank Clean Air DLF/Rec 4 KL 2A	ThermoFisher

6 Methoden

6.1 Molekularbiologische Methoden

6.1.1 RNA-Isolierung aus Zellen

Die RNA-Isolierung erfolgte mit Hilfe des *RNeasy® Mini Kit* von *Analytic Jena* nach Herstellerangaben. Nachdem die RNA in 44 µl ddH₂O von der Säule eluiert wurde erfolgte eine DNase-Behandlung, um mögliche DNA Kontaminationen zu entfernen. Hierfür wurde die RNA mit 5 µl 10x-DNase-Puffer und 1 µl DNase vermischt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Für die Inaktivierung der DNase wurden 5 µl Inaktivierungsbeads zum Ansatz hinzu gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Die Beads wurden durch anschließende Zentrifugation bei 11000 x g für 5 min pelletiert und der RNA-enthaltende Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die RNA-Konzentration kann, wenn nötig, photometrisch bestimmt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode der RNA-Isolierung angewendet, um aus Tunicamycin-behandelten MEF_{wt} Zellen, die gespleißte Form von XBP1 zu extrahieren und mittels PCR zu amplifizieren.

6.1.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Um die Konzentration von Nukleinsäuren zu bestimmen, wird die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Bei dieser Wellenlänge weisen die aromatischen Basen der Nukleinsäuren ein Absorptionsmaximum auf. Proteine hingegen besitzen ein Absorptionsmaximum bei 280 nm. Durch Messung beider Werte und anschließender Bildung des Quotienten lässt sich neben der Konzentration auch eine Aussage über den Reinheitsgrad der Nukleinsäure treffen. So liegt der Quotient OD₂₆₀/ OD₂₈₀ einer reinen DNA-Präparation zwischen 1,8 und 2 und die optische Dichte von 1 entspricht einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml. Eine solche Messung wurde mit Hilfe eines NanoDrop-Instruments (ND-1000 Spectrophotometer) der Firma *Peqlab* durchgeführt.

6.1.3 cDNA-Synthese

Für eine cDNA-Synthese wurden 1 µg RNA eingesetzt. Die isolierte RNA, beschrieben unter 6.1.1, wurde mit ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 11 µl verdünnt. Hinzu kamen 1 µl (100 pmol) Oligo(dT)₁₈, 2 µl dNTP's (20 mM), 0,5 µl (20 U) RNase-Inhibitor, 5 µl MMLV-RT-Puffer (10x) sowie 1 µl (200 U) MMLV-Reverse Transkriptase. Die Synthese wurde für 1 h bei 42 °C

im Thermoblock der Firma *Eppendorf* durchgeführt. Zur Inaktivierung der Reverse Transkriptase wurde der Ansatz bei 70 °C für 10 min erhitzt.

6.1.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Zur Amplifizierung einer spezifischen DNA Sequenz, für die Klonierung eines zellulären oder viralen Gens, wurde eine PCR durchgeführt. Die Reaktion lässt sich in drei Schritten unterteilen: Denaturierung, Annealing, Extension. Die Denaturierung und die Extension sind feste Größen in der Reaktion. Die Annealingtemperatur (T_m), also die Temperatur, bei dem die Primer komplementär an die einzelsträngige DNA-Zielsequenz binden, ist hingegen spezifisch. In der vorliegenden Arbeit wurden für die durchgeführten PCR Reaktionen 2 unterschiedliche Polymerase verwendet, die unter 5.10 vermerkt sind. Der Ansatz für eine PCR wurde nach Herstellerangaben der eingesetzten Polymerase pipettiert. Nachfolgend ist ein Beispiel eines PCR-Programms aufgelistet:

1. 98 °C, 5 min
2. 98 °C, 30 s
3. Annealing-Temperatur ($T_m - 5$ °C), 30 s
4. 72 °C, 30 sec/ kbp
5. 72 °C, 10 min
6. 4 °C, ∞

Die Schritte 2 bis 5 wurden üblicherweise 35 x wiederholt.

6.1.5 Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel

Um DNA-Fragmente verschiedener Größe voneinander zu trennen und zu identifizieren wurde die Agarosegel-Elektrophorese verwendet. Die DNA-Fragmente wurden in 1 %igen Agarosegelen in 1x TAE-Laufpuffer getrennt. Bei Bedarf wurden die Proben mit 6x Ladepuffer versetzt. Die Auftrennung erfolgte bei 120 V für ca. 1 h. Durch die Zugabe von Ethidiumbromid in das Agarosegel konnten die PCR-Fragmente unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

6.1.6 Extraktion von DNA-Fragmenten

Unter UV-Licht wurden DNA-Banden von Interesse mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Wichtig war zu beachten, dass das Agarosegel nur kurze Zeit dem UV-Licht ausgesetzt wurde, um eventuelle Thymindimere der DNA und so Mutationen im

amplifizierten Produkt zu vermeiden. Unter Verwendung des *QIAquick Gel Extraction Kit* der Firma *Qiagen*, wurde die DNA entsprechend des Herstellerprotokolls extrahiert. Nach Aufreinigung, wurden die PCR-Produkte für eine Ligation mit dem Zielvektor oder für eine weitere Amplifikation verwendet.

6.1.7 Restriktionsverdau und Ligation

Für die Plasmid- oder BAC-Kontrolle, sowie für den Verdau von amplifizierten PCR-Produkten, wurde ein Restriktionsverdau mit entsprechenden *FastDigest* Enzymen von *LifeTechnologies* durchgeführt. Hierfür wurden in der Regel 0,5-1,0 µg DNA mit einem oder mehreren Enzymen und Restriktionspuffer gemischt und bei optimaler Temperatur für 10-30 min inkubiert. Bei Bedarf wurden die Reaktionen, wie unter 6.1.5 beschrieben, elektrophoretisch getrennt, aus dem Agarosegel ausgeschnitten und nach Aufreinigung über passende Schnittstellen in einen Zielvektor ligiert. Dazu wurden Vektor und Amplifikat im molaren Verhältnis von 1:5 mit 1 µl (5 U) T4-DNA-Ligase und der entsprechenden Menge T4-DNA-Puffer versetzt. Die Ligation erfolgte üblicherweise bei 16 °C über Nacht im Thermoblock der Firma *Eppendorf*.

6.1.8 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Zur Elektroporation von Plasmiden bzw. Ligationsansätzen wurden Bakterien vom Stamm DH10B verwendet, die elektrokompetent gemacht wurden. Hierzu wurde eine Übernachtskultur (3 ml LB-Medium ohne Antibiotikum) aus einem Glycerolstock angeimpft und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurden 200 ml LB-Medium mit einer 1:100 Verdünnung der Übernachtskultur vermischt und für ca. 3 h bei 37 °C kultiviert. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5-0,6, wurde die Bakteriensuspension sofort auf Eis heruntergekühlt und bei 6000 x g und 4 °C für 10 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet 2x in 200 ml eiskaltem ddH₂O resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 6000 x g und 4 °C für 10 min wurde das Pellet in 10 % Glycerin gewaschen. Zum Schluss wurden die Bakterien in 2 ml 10 % Glycerin aufgenommen und in 100 µl Aliquots bei -80 °C schockgefrostet.

6.1.9 Transformation

Die Transformation ist ein Verfahren, welches ein DNA-Transfer in kompetente Bakterien erlaubt. Hierfür wurden 3-5 µl des jeweiligen Ligationsansatzes mit 50 µl einer

elektrokompetenten Bakteriensuspension vermischt und in eine 2,5 mm Elektroporationskuvette überführt. Durch das Anlegen einer Spannung von 2500 V werden die Zellwände der Bakterien permeabel und die DNA kann eindringen. Die Suspension wurde in 400 µl LB-Medium aufgenommen und bei 37 °C für 30-45 min geschüttelt. Die jeweiligen Ansätze wurden auf LB-Platten, mit einem oder mehreren Antibiotika, ausplattiert und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Am Folgetag wurden die Platten ausgelesen und Kulturen für eine Minipräparation angesetzt.

6.1.10 Extraktion von Plasmid-/BAC-DNA („Mini“ bzw. Midi“)

Die Extraktion von Plasmid-/BAC-DNA in geringen Mengen (Minipräparation; 3-5 ml LB-Medium + Antibiotika) erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse. Die Kultivierung der transformierten Bakterien erfolgte in Übernacht-Kulturen bei 37 °C im Brutschüttler. Am Folgetag wurden 2-4 ml der Bakteriensuspension bei 6000 g für 5 min pelletiert. Zur Resuspendierung der Pellets wurden 300 µl S1-Puffer eingesetzt. Anschließend wurde mit 300 µl S2-Puffer für 5 min bei RT lysiert. Zur Neutralisierung des Lysepuffers wurde 300 µl S3-Puffer zugegeben und bei 16200 x g für 10 min zentrifugiert. Die Bezeichnung der Puffer wurde von unserer Arbeitsgruppe gewählt und die Zusammensetzung ist unter 5.16 nachzulesen. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die Plasmid-/BAC-DNA mit 600 µl 2-Propanol bei 16200 x g für 30 min gefällt. Das Pellet wurde anschließend in 500 µl Ethanol gewaschen. Die DNA wurde bei 37 °C für 5-30 min getrocknet und in TE-Puffer (pH 8.0) gelöst. Der Puffer besitzt eine stabilisierende Wirkung auf die DNA. Zur Kontrolle wurden vorzugsweise ein Restriktionverdau und eine Sequenzierung des klonierten Plasmids/BAC durchgeführt.

Für die Gewinnung größerer Mengen an Plasmid-/BAC-DNA (Midipräparation; 200 ml LB-Medium + Antibiotika) wurde das *NucleoBond® Xtra Midi Kit* der Firma *Macherey-Nagel* verwendet. Üblicherweise wurden Übernacht-Kulturen aus 200 µl der Minipräparation in 200 ml LB-Medium mit Antibiotikum angesetzt und bei 37 °C im Brutschüttler über Nacht inkubiert. Eine Isolierung der DNA erfolgte laut Herstellerprotokoll für Low-Copy-Plasmide (BAC-DNA) oder High-Copy-Plasmide (Plasmid-DNA). Ein wichtiger Schritt bei der Aufreinigung von BAC-DNA war, dass diese nur kurz den Trocknungsprozess unterlaufen musste. Dies gewährleistete eine höhere Transfektionseffizienz. In Abhängigkeit von der Größe des DNA-Pellet wurden 100-300 µl TE-Puffer zum Lösen der Plasmid- oder BAC-DNA

Methoden

eingesetzt. Die Konzentration wurde mit dem NanoDrop-Spectrophotometer bestimmt und, wenn nötig, auf eine entsprechende Konzentration mit TE-Puffer eingestellt. (Alle genannten Puffer sind unter 0 aufgelistet.)

6.1.11 Anlegen eines Glycerolstocks

Zum Anlegen eines Glycerolstocks wurden 700 µl einer Midipräparation mit 300 µl Glycerol (86 %) vermischt, kurz gevortext und bei -80 °C gelagert. Bei Bedarf kann jederzeit aus dem Glycerolstock eine Midipräparation angeimpft werden.

6.2 Zellbiologische Methoden

6.2.1 Passagieren von Zellen

Sämtliche Zelllinien wurden in Ø 15 cm-Kulturschalen gehalten. Nach Erreichen einer ca. 90-95 %igen Konfluenz, wurde das Zellkulturmedium entfernt und 1x mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 3 ml Trypsin/EDTA von der Kulturschale gelöst und die Reaktion mit 7 ml Zellkulturmedium abgestoppt. Gesplittet wurde alle 3-4 Tage. Zu Beginn eines Experiments wurden 10 µl der jeweiligen Zellsuspension in einem automatischen Zellzähler ausgezählt und entsprechend der benötigten Zellzahl ausgesät. Schwer abzulösende Zellen, wurden vor dem Trypsinierungsschritt, 1x mit 1,5 ml Trypsin/EDTA gewaschen.

6.2.2 Einfrieren

Zum Einfrieren, wurden die Zellen bis zu einer 90-95 %igen Konfluenz kultiviert und wie vorher beschrieben von der Kulturschale gelöst. Die Suspension wurde in einem 15 ml Falcon überführt und bei 600 x g für 3 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde im Anschluss 1x in PBS resuspendiert und abermals zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in einem entsprechenden Volumen aus 10 % DMSO in FCS aufgenommen. Eine Ø 15 cm-Kulturschale wurde auf 4x 2,0 ml Kryoröhrchen aufgeteilt, bei -80 °C über Nacht und am Folgetag im flüssigen Stickstoff gelagert.

6.2.3 Auftauen

Aliquots der jeweiligen Zelllinie wurde aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und im 37 °C warmen Wasserbad durch leichtes schwenken aufgetaut. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein 15 ml Falconröhrchen mit Serum-haltigem Medium überführt und bei 600 x g für 3 min abzentrifugiert, um das DMSO zu entfernen. Das Zellpellet wurde in Serum-

haltigem Medium resuspendiert und mit 20 ml Medium auf eine \varnothing 15 cm-Kulturschale gegeben. Am Folgetag wurde das Medium gewechselt, um eventuell nicht angewachsene Zellen zu entfernen.

6.2.4 *In vitro* Transfektion

Für die transiente Transfektion von Expressionsplasmiden wurde am Tag -1 die benötigten Zellen von der Kulturschale trypsinisiert, die Zellzahl bestimmt und, in Abhängigkeit vom durchgeführten Experiment, Zellzahlen von $1,5 \cdot 10^5$ bis $3 \cdot 10^6$ in eine 6-Loch-Platte oder \varnothing 10 cm Kulturschale ausgesät.

Für die Transfektion von HEK 293A-Zellen wurden 6-8 μ g Plasmid-DNA zusammen mit 500 μ l *MoA*-Medium (Antibiotika- und Serum-freies Medium) vorgelegt, das Transfektionsreagenz PEI im Verhältnis von 1:4 (Plasmid-DNA: PEI) hinzu gemischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Transfektionsansatz gleichmäßig auf die Zellen getropft. 6-7 h später wurde das Medium entfernt, durch frisches ersetzt und im Brutschrank bei 37 °C für 24-48 h weiter kultiviert (siehe 6.3.1).

NIH3T3-Zellen wurden entsprechend der Experimente ausgesät und nach adhären transfiziert. In einem Reaktionsgefäß wurden 3-6 μ g Plasmid-DNA in 150 μ l *MoA*-Medium (Antibiotika- und Serum-freies Medium) aufgenommen und mit 10-15 μ l Polyfect versetzt. Der Reaktionsansatz wurde kurz vermischt, 20 min bei RT inkubiert und anschließend gleichmäßig auf die Zellen getropft. 6-7 h später wurde das Medium entfernt, durch frisches ersetzt und weitere 24-48 h im Brutschrank bei 37 °C kultiviert (siehe 6.3.1).

6.2.5 *In vitro* Infektion

Für Infektionsexperimente *in vitro* wurden verschiedene Zelllinien, abhängig vom durchzuführenden Experiment, verwendet. Hierfür wurde an Tag -1 $3,0 - 4,0 \times 10^5$ Zellen pro Kavität in einer 6-Loch-Platte ausgesät. Am Folgetag (-Tag 0) wurde mit einer MOI von 3-4 TCID₅₀/Zelle infiziert, welches vorher anhand des Virustiters berechnet wurde. Die Virussuspension wurde im Serum-haltigem Medium verdünnt und 3 ml auf die Zellen pipettiert. Anschließend wurden die Platten entweder einen Zentrifugationsschritt bei 1065 x g, 37 °C für 30 min unterzogen oder sofort im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Je nach Experiment wurde an verschiedenen Zeitpunkten Proben für spezifische Analysen genommen.

6.2.6 Herstellung eines Virusstocks

Für die Herstellung eines Virusstocks (MCMV_{GFP} oder MCMV-M50-HA-M53-FLAG) wurden 10x Ø-15 cm Kulturschalen mit je $1,0 \times 10^6$ 10.1 oder 3T3 Zellen ausgesät und mit einer TCID₅₀/Zelle von 0,02 infiziert. Am Folgetag wurde das Medium gewechselt. Die Kulturschalen wurden im Brutschrank bei 37 °C bis zur vollständigen Infektion (6-7 Tage) inkubiert. Anschließend wurde das Kulturmedium in 250 ml Zentrifugenbecher überführt und bei 6000 g, 4 °C für 10 min zentrifugiert, um abgelöste Zellbestandteile zu pelletieren. Der Überstand wurde in neue Zentrifugenbecher überführt und bei 25000 x g, 4 °C für 4 h zentrifugiert. Durch diesen Vorgang wird das Virus pelletiert. Das Pellet wurde in 0,5-1,0 ml Kulturmedium aufgenommen, über Nacht bei 4 °C auf Eis gequellt, am Folgetag aliquotiert (à 100 µl) und anschließend bei -80 °C gelagert.

6.2.7 Titration zur Bestimmung des Virustiters

Für die Titration des jeweiligen Virus wurden 4x 96er-Loch-Platten mit $1,5 \times 10^3$ 10.1 Zellen/Kavität ausgesät. Hierfür wurden $7,5 \times 10^5$ Zellen in 50 ml Kulturmedium aufgenommen und 100 µl der Zellsuspension mit einer Multikanalpipette in jede Kavität gegeben. Am Folgetag wurde zwei Verdünnungsreihen des jeweiligen Virus von 10^{-3} bis 10^{-10} angesetzt. Jede Virusverdünnung konnte 24 Kavitäten von 2 96er-Loch-Platten infizieren. Zwei der 96er-Loch-Platten wurden bei 1065 x g, bei 37 °C für 30 min zentrifugiert (*centrifugal enhancement*). Die anderen zwei Platten dienten zur Bestimmung des Virustiters mit keinem *centrifugal enhancement*, was ungefähr einem Titer von einer Logstufe weniger, im Vergleich zum *centrifugal enhancement*, entspricht. Bei 37 °C für 7-8 Tage, wurden die Platten kultiviert.

Zum Auslesen wurde jede der 96er-Loch-Platten unter einen Lichtmikroskop (mit oder ohne Fluoreszenz) analysiert. Dabei wurde die höchste Verdünnungsstufe bei der die Zellen noch vollständig (12 Kavitäten) infiziert waren, notiert. Für die nachfolgenden Verdünnungsreihen wurden die infizierten Kavitäten festgehalten und nach der Formel von Spearman-Kärber die TCID₅₀/ml des Virus berechnet.

6.2.8 Durchführung einer Viruswachstumskurve

Das Prinzip einer Viruswachstumskurve beruht auf die Analyse der Virusverbreitung in eukaryotischen Zellen über einen definierten Zeitraum. Unterschieden werden zwischen einer *Multistep*- und *Singlestep*-Wachstumskurve, welche mit einer niedrigen (0,1) bzw. einer hoher (3) TCID₅₀/Zelle infiziert werden. Hierfür wurde am Tag -1 5×10^4 bzw. 3×10^5 Zellen pro Kavität in einer 6-Loch-Platte ausgesät. Am Tag 0 wurde mit der entsprechenden Virusmenge infiziert, wobei kein Zentrifugationsschritt durchgeführt wurde. Proben für die Berechnung der applizierten Virusmenge (Input/Tag 0) wurde in Triplikaten genommen und bis auf weiteres bei -80 °C eingefroren. Nach ca. 6 – 7 h wurde das Medium ausgewechselt und weiter im Brutschrank bei 37 °C kultiviert. Üblicherweise wurden 1 ml Virusüberstand in Triplikaten an Tag 1, 3, 5, 7 und 9 in 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert und bei -80 °C eingefroren. Das übrige Medium wurde entfernt und mit 3 ml frischem Kulturmedium ersetzt. Das Ansetzen der Verdünnungsreihen jeder Probe erfolgte in 96er-*Deep-Well*-Platten der Firma *Eppendorf*. 1,8 ml Kulturmedium wurde in den einzelnen Kavitäten vorgelegt und 200 µl des Virusüberstandes hinzugegeben. Das Erstellen der Virusverdünnungen (10^{-1} bis 10^{-8}) erfolgte mittels einer Multikanalpipette, wobei die Proben gemischt und 200 µl der Virussuspension in die nächste Verdünnung überführt wurden. Die fertigen Verdünnungsreihen wurden mit Hilfe einer Multikanal-/ Multistep pipette auf die am Vortag ausgesäten 10.1-Fibroblasten pipettiert. Die Auswertung der infizierten Kavitäten erfolgte wie unter Punkt 6.2.7 beschrieben.

6.2.9 *En Passant* BAC-Mutagenese

Die *En Passant* BAC-Mutagenese wurde nach dem Protokoll von Tischer und Kollegen durchgeführt (Tischer et al., 2010). Die einzelnen Schritte sind wie folgt: Zuerst wurde ein lineares DNA Fragment mittels PCR hergestellt. Dieses Fragment (- ca. 1 kb) enthält ein Kanamycinresistenzgen und Duplikate des zu mutierenden Genbereichs. Das pEP-KAN-S Plasmid fungierte in der PCR als Ausgangsvektor. 100 und 200 ng des aufgereinigten PCR Produktes wurden in GS1783-elektrokompetente Bakterien, welche den MCMV-M50-HA Smith BAC tragen, transformiert. Die transformierten Bakterien wurden 1 ½ h in einem Thermoschüttler bei 30 °C leicht geschüttelt. Der Schritt diente für die erste Teilungsphase der transformierten Bakterien und zum Transkriptionsstart des Resistenzgens. Anschließend wurden die Bakterien auf LB-Agarplatten mit Chloramphenicol und Kanamycin ausplattiert und 36 h bei 30 °C im Brutschrank inkubiert. Die resultierenden Klone wurden durch

Übernackkultur angezogen und nach Extraktion der BAC-DNA „Mini“ mittels HindIII Verdau im Agarosegel überprüft. Die Insertion des linearen DNA-Fragment und der Kanamycin-Kassette führt zu einer Verschiebung im Restriktionsmuster des transformierten BACs. Somit können positive Klone identifiziert werden. Jeweils zwei positive Klone wurden dem zweiten Rekombinationsschritt unterzogen. Dieser Schritt erfordert die Expression der I-SceI Rekombinase, welche durch Hitze Induktion bei 42 °C und Zugabe von 2 % (w/v) L-Arabinose aktiviert wird. Die Bakterien wurden anschließend auf LB-Agarplatten mit 10 % L-Arabinose und Chloramphenicol ausplattiert. Die resultierenden Klone wurden mittels Übernackkultur angezogen und nach Extraktion der BAC-DNA „Mini“ mittels HindIII Verdau im Agarosegel auf den Verlust der Kanamycin-Kassette analysiert. Durch die Aktivität der I-SceI Rekombinase wird die Kanamycin-Kassette entfernt. Das mutierte Gen im BAC wurde durch Sequenzierung abschließend überprüft. Von zwei positiven Klonen wurde je eine Übernackkultur im großen Maßstab „Midi“ angesetzt.

6.2.10 Herstellung von Retroviren und Transduktion

Für die Übertragung von bestimmten Genen in eukaryotischen Zellen wurde das Prinzip der retroviralen Transduktion genutzt. Dabei wurden Phoenix Zellen mit einem retroviralen Vektor, der das entsprechende Gen besitzt, transfiziert. Die Transfektion erfolgt mittels PEI. Hierzu wurden 3×10^6 Zellen pro 10 cm Schale ausgesät. Am Folgetag wurden 8 µg Plasmid-DNA mit 500 µl Antibiotika-freies Medium und 32 µl PEI vermischt, 20 min bei RT inkubiert und anschließend auf die Zellen getropft. Nach ungefähr 24 h wurde das Kulturmedium gewechselt und die entsprechenden Zielzellen mit $5 - 7,5 \times 10^4$ Zellen pro Kavität in einer 6-Loch-Platte ausgesät. Die Ernte des Retrovirus erfolgte 48 h und 72 h nach Transfektion. Die retroviralen Überstände werden zunächst durch einen Filter mit einer Porengröße von 0,45 µm filtriert. Hierdurch werden virusproduzierende Zellen und Zellreste entfernt. Das Filtrat wird mit Polybrene (Verhältnis 1:1100) versetzt, 3 ml zu den Zellen gegeben und bei $1065 \times g$, 37 °C für 30 min zentrifugiert. Eine zweite Transduktion erfolgt nach demselben Prinzip
24 h später.

6.2.11 Bestimmung der Antibiotikakonzentration mittels eines *KillCurve Assays*

Zur Bestimmung der Antibiotikakonzentration (Hygromycin B und Puromycin) für die Selektion von retro- oder lentiviralen transduzierten Zelllinien, wurde das Protokoll von GOLDBIO.com angewendet. Die einzelnen Schritte lauten wie folgt:

1. Adhärente Zellen werden trypsiniert und eine 10 ml Zellsuspension im Verhältnis von 1:5 hergestellt
2. 0,5 ml der Zellsuspension wird mit 0,5 ml Medium + Antibiotika zusammen in eine Kavität einer 24-Loch-Platte pipettiert. Die Konzentration für Hygromycin B wurde zwischen 0 – 1000 µg/ ml und für Puromycin zwischen 0 – 7,5 µg/ ml gewählt
3. Die Viabilität der Zellen wurde alle 2 Tage unter einem Mikroskop festgestellt und alle 3 Tage das Medium + Antibiotika ausgetauscht
4. Nach ca. 7 – 9 Tagen wird die finale Konzentration festgelegt

6.2.12 Herstellung von Knockout-Zellen mittels der CRISPR/Cas9 Methode

Das CRISPR/Cas-System (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated*) ist eine Methode, um DNA an einer vorher definierten Sequenz in Zielzellen gezielt zu schneiden und zu verändern. Mit diesem System können sowohl Gene integriert, als auch komplett entfernt oder auch nur ausgeschaltet werden, sodass kein funktionelles Protein mehr exprimiert werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode auf das murine IRE1-, das Xbp1- und das TRAF2-Gen angewendet, um das besagte Gen auszuschalten. Unser Kooperationspartner (Robert Jan Lebbink PhD., UMC Utrecht) hat uns die nötigen Plasmide und Protokolle für die Durchführung der CRISPR/Cas9-Methode zur Verfügung gestellt (van de Weijer et al 2014; van Diemen et al., 2016). Die wichtigsten Punkte des Protokolls von CRISPR/Cas9 sind: 3 guideRNAs (gRNA) wurden für jedes Gen unter zu Hilfenahme von <http://www.e-crisp.org/E-CRISP/designcrispr.html> konstruiert. Der Grund für die Auswahl von 3 gRNAs für jedes Gen war, um sogenannte Off-Target-Hits (-ein zufälliges Schneiden des Cas9-Proteins an einer ungewollten Position im Genom) zu vermeiden und mögliche Fehlinterpretationen der gewonnenen Ergebnisse zu minimieren. Essentielle Komponenten der gRNAs sind die Länge von 20 Nukleotiden, wobei das erste Nukleotid ein Guanin (G) laut Protokoll sein musste, und eine spezifische Sequenz am 3'-Ende. Diese wird als PAM-Sequenz (*Protospacer adjacent motif*) bezeichnet. Kurz = G-(N)₁₉-NGG. Hinzu wird eine Schnittstelle integriert, die es erlaubt die gRNA in den vorher

verdauten Zielvektor zu ligieren. Die *forward* und *reverse* gRNA wurden zuerst miteinander bei 95 °C für 10 min komplementiert. Im Anschluss wird eine spezifische Menge der komplementierten gRNA in den geschnittenen pSicoR-CRISPR-Cas9-Vektor ligiert. Die Ligation wurde bei 16 °C über Nacht im *Thermoshaker* der Firma *Eppendorf* durchgeführt. Transformation in elektrokompente DH10B-Bakterien und Ausplattieren auf Ampicillin-haltige LB-Agarplatten war der abschließende Schritt. Die resultierenden Klone wurden über eine Sequenzierung analysiert. Zwei positive Klone wurden ausgewählt und eine Plasmid-Midi Präparation durchgeführt.

Zum Herstellen einer Knockout-Zelllinie wurde das Prinzip der Lentiviralen Transduktion angewendet. HEK 293T-Zellen wurden mit dem klonierten CRISPR-Cas9-Vektor und den viralen Verpackungsvektoren (pMDG und pCMV8.91) mittels PEI transfiziert. Das Plasmid-Verhältnis war 4:1:3 µg. Die Transduktion der Zielzellen erfolgte nach 48 h (siehe 6.2.10). Für 5 Tage wurden die transduzierten Zellen mit Puromycin selektiert und mittels Western Blot auf Expression der jeweiligen Proteine überprüft. Anschließend wurde eine Einzelzell-Klonierung in einer 96-Loch-Platten durchgeführt. Nach ca. 2 Wochen wurden für jede gRNA 6 Klone ausgewählt, in denen die Abwesenheit der Expression des Zielproteins im Western Blot überprüft wurde.

6.2.13 Herstellung einer stabil-exprimierenden Zelllinie

CRISPR/Cas9-IRE1 ko- bzw. XBP1 ko-MEF-Zellen wurden wie in 6.2.10 beschrieben mit einem retroviralen Vektor, der entweder IRE1-wt/ -RNase-dead bzw. XBP1-wt/ -unsplicable/ -Stop kodiert, transduziert und mit entsprechendem Antibiotikum über eine Woche selektioniert. Anschließend wurden die Expressionen der Proteine mittels Western Blot überprüft.

6.2.14 Immortalisierung von primären MEF Zellen

Die Immortalisierung von primären embryonalen ATF6 α ^{+/+} bzw. ATF6 α ^{-/-} Maus-embryonale Fibroblasten Zellen (MEF) erfolgte durch Transduktion der primären Zellen mit einem SV40-Large-T-Antigen exprimierenden Retrovirus. Die Immortalisierung mittels retroviraler Transduktion wurde in ähnlicher Weise durchgeführt wie in Punkt 6.2.10 beschrieben. Als retroviraler Vektor wurde der pBabe-LTcDNA-zeocin verwendet. Selektioniert wurden die Zellen nach Transduktion nicht, da nicht-transduzierte Zellen nach mehreren Passagen in Seneszenz gehen und sich dadurch auf natürliche Weise rausselektieren. Nach etwa 2-3 Wochen wurde der Vorgang als erfolgreich bezeichnet.

6.3 Proteinbiochemische Methoden

6.3.1 Probennahme

Nach einer definierten Zeit, abhängig vom durchgeführten Experiment, wurde das Medium von der Kulturschale abgesaugt und 1x mit kaltem PBS gewaschen. Zur Lyse der Zellen wurde RIPA-Puffer mit Proteaseinhibitor (PI) verwendet und 150 µl Puffer pro Probe zugegeben. Die Probennahme und die anschließende Inkubationszeit von ca. 20-30 min erfolgten auf Eis. Die unlöslichen Zellbestandteile wurden bei 16200 x g, 4 °C für 10 min pelletiert und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -20 °C eingefroren.

6.3.2 BCA-Assay

Der BCA-Assay dient zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration in den zu analysierenden Proben. Als Standardreihe wurden 10 µl einer BSA-Lösung in absteigenden Konzentrationen (1 – 0,03 µg) in eine 96er-Loch-Platte pipettiert. 5 µl der Lysate wurden 1:1 mit PBS verdünnt und ebenfalls in die 96er-Loch-Platte pipettiert. Die Bestimmung erfolgte üblicherweise in Duplikaten. Anschließend wurden zwei Reagenzien der Firma *PIERCE* laut Herstellerangaben 1:50 gemixt und 100 µl mit einer Multikanalpipette in die Kavitäten gegeben. Die 96er-Loch Platte wurde für 20 min bei 37 °C inkubiert und am ELISA-Reader ausgelesen. Für eine Analyse im Western Blot wurden 20 – 50 µg Gesamtprotein eingesetzt und mit 4xProteinprobenpuffer (PPP) versetzt. Abschließend wurden die Proben bei 96 °C für 6 min denaturiert.

6.3.3 Co-Immunopräzipitation (IP)

Die Proben für eine Co-Immunopräzipitation wurden üblicherweise in 1,2 ml RIPA-Buffer lysiert und wie unter Punkt 6.3.1 & 6.3.2 weiter verfahren. 150 µl der jeweiligen Proben wurden für die Expressionskontrolle (-Input) in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C eingefroren. Der Rest wurde mit 10 µl Protein-G-Agarose Beeds (PGA) der Firma *Roche* versetzt und ein sogenanntes *Preclearing* für 1 h bei 4 °C durchgeführt. Diese Methode soll die Proteinmenge reduzieren, die unspezifisch an die Beeds binden und ein Falsch-positives Signal im Western Blot verursachen. Die Beeds wurden pelletiert und der Überstand mit entsprechendem primärem Antikörper (Verdünnung: 1:300/ 1:500) versetzt. Die Bindung an den Antikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C. Am Folgetag wurde die

Suspension mit 30 μ l PGA-Beeds versetzt und weitere 3 h bei 4 °C inkubiert, um die Antikörper-gekoppelten Proteine zu präzipitieren. Es erfolgten mehrere Waschschrte und im Anschluss die vollständige Entfernung der flüssigen Phase. Die Beeds wurden mit 100 μ l 2xPPP versetzt und bei 96 °C für 6 min aufgekocht. Dies diente dazu, um die Proteine von den Beeds zu lösen und zu denaturieren.

6.3.4 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

In der SDS-PAGE werden die Proteine nach Denaturierung und Ladungsausgleich durch das SDS, ihrer Molmasse nach voneinander getrennt. Für das Auftragen der Proben wurde ein Polyacrylamidgel (4 %iges Sammel- und 8, 10 oder 12 %iges Trenngel) hergestellt (siehe 5.15). Das Sammelgel dient der Konzentrierung der Proben und führt zur Ausbildung kompakterer Banden. Das Beladen der Probenaschen erfolgte mit gleichen Volumina und Gesamtproteinkonzentrationen. Zur Identifikation der Proteingrößen diente der *Precision Plus Protein Standards*-Marker der Firma *BIO-RAD*. Die Elektrophorese erfolgte konstant bei 90 V für ca. 2 h.

6.3.5 Western Blot

Mit dem anschließenden Western Blot lassen sich Proteine nach Größenauftrennung mittels spezifischen Antikörpern (siehe 5.12) nachweisen. Hierfür wurde der Ansatz nach Abbildung 34 zusammengesetzt und in eine *FastBlot* Kammer der Firma *BIO-RAD* eingelegt. Bei einem konstanten Stromfluss von 2 mA/cm², wurden die Negativ-geladenen Proteine durch das elektrische Feld aus der Gelmatrix auf eine Nitrocellulosemembran für 60 min transferiert.

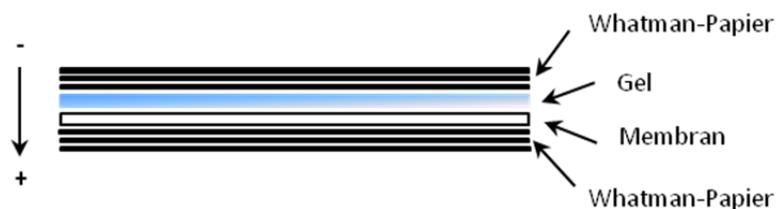


Abbildung 34: Schematischer Aufbau eines semi-dry Western Blots. Alle Komponenten des Western Blot „Sandwiches“ werden im Transferpuffer befeuchtet und wie dargestellt übereinander gelegt. Durch das Anlegen eines konstanten Stromflusses, werden die Negativ-geladenen Proteine zum Pluspol auf die Membran transferiert. In der Nitrocellulosemembran werden die Proteine festgehalten.

6.3.6 Immunnachweis

Im Anschluss an den Transfer, wird die Membran 1 h in einer 5 %igen Milchsuspension in TBST bei RT inkubiert, um unspezifische Bindungen der Antikörper an die Membran zu

Methoden

verhindern. Die Bindung des primären Antikörpers, gelöst in 5 % Milch in TBST oder 5 % BSA in TBST, an das Protein erfolgte über Nacht bei 4 °C. Am Folgetag wurde 3 x mit TBST gewaschen und mit einem sekundären Antikörper (1:5000) für 1 h bei RT inkubiert. Das *Horse Relish Peroxidase* (HRP), das an die sekundären Antikörper gekoppelt ist kann durch Zugabe einer Lösung eine Chemilumineszenzreaktion auslösen und den Nachweis der Proteine erleichtern. Dafür wurde die Membran mit einer Mischung aus zwei Detergenzien der Firma *PIERCE* benetzt und für 5 min inkubiert. Die Detektion der Proteinbanden erfolgt mittels eines Filmentwicklers.

7 Literaturverzeichnis

- Adland, E., Klenerman, P., Goulder, P., and Matthews, P.C. (2015). Ongoing burden of disease and mortality from HIV/CMV coinfection in Africa in the antiretroviral therapy era. *Front Microbiol* **6**.
- Adler, S.P., Finney, J.W., and Manganello, A.M. (1995). Prevention of Child-to-Mother Transmission of Cytomegalovirus (Cmv) by Changing Behaviors - a Randomized Controlled Trial. *Pediatr Res* **37**, A168-A168.
- Alwine, J.C. (2012). The human cytomegalovirus assembly compartment: a masterpiece of viral manipulation of cellular processes that facilitates assembly and egress. *PLoS pathogens* **8**, e1002878.
- Ambrose, R.L., and Mackenzie, J.M. (2011). West Nile Virus Differentially Modulates the Unfolded Protein Response To Facilitate Replication and Immune Evasion. *Journal of Virology* **85**, 2723-2732.
- Ambrose, R.L., and Mackenzie, J.M. (2013). ATF6 Signaling Is Required for Efficient West Nile Virus Replication by Promoting Cell Survival and Inhibition of Innate Immune Responses. *Journal of Virology* **87**, 2206-2214.
- Aragon, T., van Anken, E., Pincus, D., Serafimova, I.M., Korennykh, A.V., Rubio, C.A., and Walter, P. (2009). Messenger RNA targeting to endoplasmic reticulum stress signalling sites. *Nature* **457**, 736-U739.
- Baltzis, D., Qu, L.K., Papadopoulou, S., Blais, J.D., Bell, J.C., Sonenberg, N., and Koromilas, A.E. (2004). Resistance to vesicular stomatitis virus infection requires a functional cross talk between the eukaryotic translation initiation factor 2alpha kinases PERK and PKR. *J Virol* **78**, 12747-12761.
- Baskar, J.F., Smith, P.P., Nilaver, G., Jupp, R.A., Hoffmann, S., Peffer, N.J., Tenney, D.J., ColbergPoley, A.M., Ghazal, P., and Nelson, J.A. (1996). The enhancer domain of the human cytomegalovirus major immediate-early promoter determines cell type-specific expression in transgenic mice. *Journal of Virology* **70**, 3207-3214.
- Bechill, J., Chen, Z.B., Brewer, J.W., and Baker, S.C. (2008). Coronavirus infection modulates the unfolded protein response and mediates sustained translational repression. *Journal of Virology* **82**, 4492-4501.
- Britt, W. (2007). *CMV maturation and egress* (Cambridge Press).
- Brune, W., Menard, C., Heesemann, J., and Koszinowski, U.H. (2001). A ribonucleotide reductase homolog of cytomegalovirus and endothelial cell tropism. *Science* **291**, 303-305.
- Bubeck, A., Wagner, M., Ruzsics, Z., Lotzerich, M., Iglesias, M., Singh, I.R., and Koszinowski, U.H. (2004). Comprehensive mutational analysis of a herpesvirus gene in the viral genome context reveals a region essential for virus replication. *Journal of Virology* **78**, 8026-8035.
- Buchkovich, N.J., Maguire, T.G., Yu, Y., Paton, A.W., Paton, J.C., and Alwine, J.C. (2008). Human cytomegalovirus specifically controls the levels of the endoplasmic reticulum chaperone BiP/GRP78, which is required for virion assembly. *J Virol* **82**, 31-39.
- Buchkovich, N.J., Yu, Y.J., Pierciey, F.J., and Alwine, J.C. (2010). Human Cytomegalovirus Induces the Endoplasmic Reticulum Chaperone BiP through Increased Transcription and Activation of Translation by Using the BiP Internal Ribosome Entry Site. *Journal of Virology* **84**, 11479-11486.
- Calfon, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J.H., Hubbard, S.R., Harding, H.P., Clark, S.G., and Ron, D. (2002). IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* **415**, 92-96.
- Chakrabarti, A., Chen, A.W., and Varner, J.D. (2011). A review of the mammalian unfolded protein response. *Biotechnology and bioengineering* **108**, 2777-2793.
- Chiang, W.C., Messah, C., and Lin, J.H. (2012). IRE1 directs proteasomal and lysosomal degradation of misfolded rhodopsin. *Molecular biology of the cell* **23**, 758-770.
- Choo, Y.S., & Zhang, Z. (2009). Detection of Protein Ubiquitination. *Journal of Visualized Experiments* : JoVE **30**.

- Chrip, P., and Clissold, S.P. (1991). Foscarnet. A review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use in immunocompromised patients with cytomegalovirus retinitis. *Drugs* 41, 104-129.
- Claessen, J.H.L., Kundrat, L., and Ploegh, H.L. (2012). Protein quality control in the ER: balancing the ubiquitin checkbook. *Trends in Cell Biology* 22, 22-32.
- Cox, J.S., Shamu, C.E., and Walter, P. (1993). Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase. *Cell* 73, 1197-1206.
- Cox, J.S., Walter, P. (1996). A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response. *Cell*.
- Crough, T., and Khanna, R. (2009). Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clinical microbiology reviews* 22, 76-98, Table of Contents.
- Das, S., and Pellett, P.E. (2011). Spatial relationships between markers for secretory and endosomal machinery in human cytomegalovirus-infected cells versus those in uninfected cells. *J Virol* 85, 5864-5879.
- Drori, A., Messlerle, M., Brune, W., and Tirosh, B. (2014). Lack of XBP-1 Impedes Murine Cytomegalovirus Gene Expression. *Plos One* 9.
- Fenteany, G., Standaert, R.F., Lane, W.S., Choi, S., Corey, E.J., and Schreiber, S.L. (1995). Inhibition of Proteasome Activities and Subunit-Specific Amino-Terminal Threonine Modification by Lactacystin. *Science* 268, 726-731.
- Fields, B.N., Knipe, D.M., and Howley, P.M. (2007). *Fields virology* (Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins).
- Flint, S.J., Enquist, L. W., Racaniello, V. R., Shalka, A. M. (2009). *Principles of Virology*, Vol 1, 3rd edn.
- Fowler, K.B., Stagno, S., Pass, R.F., Britt, W.J., Boll, T.J., and Alford, C.A. (1992). The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status. *The New England journal of medicine* 326, 663-667.
- Gao, B.X., Lee, S.M., Chen, A., Zhang, J.P., Zhang, D.D., Kannan, K., Ortmann, R.A., and Fang, D.Y. (2008). Synoviolin promotes IRE1 ubiquitination and degradation in synovial fibroblasts from mice with collagen-induced arthritis. *Embo Rep* 9, 480-485.
- Gastaldello, S., D'Angelo, S., Franzoso, S., Fanin, M., Angelini, C., Betto, R., and Sandona, D. (2008). Inhibition of proteasome activity promotes the correct localization of disease-causing alpha-sarcoglycan mutants in HEK-293 cells constitutively expressing beta-, gamma-, and delta-sarcoglycan. *Am J Pathol* 173, 170-181.
- Gething, M.J., and Sambrook, J. (1992). Protein folding in the cell. *Nature* 355, 33-45.
- Griffiths, P.D. (2011). A Randomized Placebo Controlled Trial of a CMV Vaccine. *Am J Transplant* 11, 78-78.
- Gülow, K., Bienert, D., Haas, I.G. (2002). BiP is feed-back regulated by control of protein translation efficiency *Journal of Cell Science* 115, 2443-2452.
- Hai, T.W., Liu, F., Coukos, W.J., and Green, M.R. (1989). Transcription Factor Atf Cdna Clones - an Extensive Family of Leucine Zipper Proteins Able to Selectively Form DNA-Binding Heterodimers. *Gene Dev* 3, 2083-2090.
- Han, D., Lerner, A.G., Vande Walle, L., Upton, J.P., Xu, W.H., Hagen, A., Backes, B.J., Oakes, S.A., and Papa, F.R. (2009a). IRE1 alpha Kinase Activation Modes Control Alternate Endoribonuclease Outputs to Determine Divergent Cell Fates. *Cell* 138, 562-575.
- Han, Y.H., Moon, H.J., You, B.R., and Park, W.H. (2009b). The effect of MG132, a proteasome inhibitor on HeLa cells in relation to cell growth, reactive oxygen species and GSH. *Oncol Rep* 22, 215-221.
- Harvey, D.M., and Levine, A.J. (1991). P53 Alteration Is a Common Event in the Spontaneous Immortalization of Primary Balb/C Murine Embryo Fibroblasts. *Gene Dev* 5, 2375-2385.
- Hassan, I., Gaines, K.S., Hottel, W.J., Wishy, R.M., Miller, S.E., Powers, L.S., Rutkowski, D.T., and Monick, M.M. (2014a). Inositol-requiring Enzyme 1 Inhibits Respiratory Syncytial Virus Replication. *J Biol Chem* 289, 7537-7546.

- Hassan, I., Hottel, W.J., Powers, L., and Monick, M.M. (2014b). Blocking Respiratory Syncytial Virus Replication, A Novel Role Of The INOSitol Requiring Enzyme 1. *Am J Resp Crit Care* **189**.
- Hassan, I.H., Zhang, M.S., Powers, L.S., Shao, J.Q., Baltrusaitis, J., Rutkowski, D.T., Legge, K., and Monick, M.M. (2012). Influenza A Viral Replication Is Blocked by Inhibition of the Inositol-requiring Enzyme 1 (IRE1) Stress Pathway. *J Biol Chem* **287**, 4679-4689.
- Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T., and Mori, K. (1999). Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Molecular biology of the cell* **10**, 3787-3799.
- He, B. (2006). Viruses, endoplasmic reticulum stress, and interferon responses. *Cell death and differentiation* **13**, 393-403.
- He, Y., Sun, S.Y., Sha, H.B., Lu, Z.Y., Yang, L., Xue, Z., Chen, H., and Qi, L. (2010). Emerging Roles for XBP1, a sUPeR Transcription Factor. *Gene Expression* **15**, 13-25.
- Hetz, C. (2012). The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Bio* **13**, 89-102.
- Hetz, C., Martinon, F., Rodriguez, D., and Glimcher, L.H. (2011). The Unfolded Protein Response: Integrating Stress Signals through the Stress Sensor Ire1 Alpha. *Physiol Rev* **91**, 1219-1243.
- Hicke, L. (2001). A new ticket for entry into budding vesicles - Ubiquitin. *Cell* **106**, 527-530.
- Homman-Loudiyi, M., Hultenby, K., Britt, W., and Soderberg-Naucler, C. (2003). Envelopment of human cytomegalovirus occurs by budding into golgi-derived vacuole compartments positive for gB, rab 3, trans-golgi network 46, and mannosidase II (vol 77, pg 3191, 2003). *Journal of Virology* **77**, 8179-8179.
- Inagi, R., Ishimoto, Y., and Nangaku, M. (2014). Proteostasis in endoplasmic reticulum-new mechanisms in kidney disease. *Nat Rev Nephrol* **10**, 369-378.
- Isler, J.A., Skalet, A.H., and Alwine, J.C. (2005). Human cytomegalovirus infection activates and regulates the unfolded protein response. *J Virol* **79**, 6890-6899.
- Kaufman, R.J., Scheuner, D., Schroder, M., Shen, X., Lee, K., Liu, C.Y., and Arnold, S.M. (2002). The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation. *Nature reviews Molecular cell biology* **3**, 411-421.
- Kimata, Y., Ishiwata-Kimata, Y., Ito, T., Hirata, A., Suzuki, T., Oikawa, D., Takeuchi, M., and Kohno, K. (2007). Two regulatory steps of ER-stress sensor Ire1 involving its cluster formation and interaction with unfolded proteins. *The Journal of cell biology* **179**, 75-86.
- Kinney, J.S., Kumar, M.L. (1988). Should we expand the TORCH complex? A description of clinical and diagnostic aspects of selected old and new agents. *Clin Perinatol*, 727-744.
- Krech, U. (1973). Complement-fixing antibodies against cytomegalovirus in different parts of the world. *Bulletin of the World Health Organization* **49**, 103-106.
- Lee, K., Tirasophon, W., Shen, X.H., Michalak, M., Prywes, R., Okada, T., Yoshida, H., Mori, K., and Kaufman, R.J. (2002). IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response. *Gene Dev* **16**, 452-466.
- Leigh, K.E., Sharma, M., Mansueto, M.S., Boeszoermyeni, A., Filman, D.J., Hogle, J.M., Wagner, G., Coen, D.M., and Arthanari, H. (2015). Structure of a herpesvirus nuclear egress complex subunit reveals an interaction groove that is essential for viral replication. *P Natl Acad Sci USA* **112**, 9010-9015.
- Lemnitzer, F., Raschbichler, V., Kolodziejczak, D., Israel, L., Imhof, A., Bailer, S.M., Koszinowski, U., and Ruzsics, Z. (2013). Mouse cytomegalovirus egress protein pM50 interacts with cellular endophilin-A2. *Cell Microbiol* **15**, 335-351.
- Li, H., Korennykh, A.V., Behrman, S.L., and Walter, P. (2010). Mammalian endoplasmic reticulum stress sensor IRE1 signals by dynamic clustering. *P Natl Acad Sci USA* **107**, 16113-16118.
- Lin, J.H., Li, H., Yasumura, D., Cohen, H.R., Zhang, C., Panning, B., Shokat, K.M., LaVail, M.M., and Walter, P. (2007). IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response. *Science* **318**, 944-949.
- Lodish, H.e.a. (2007). *Molecular Cell Biology*, 6th edn.

- Ma, Y., and Hendershot, L.M. (2001). The unfolding tale of the unfolded protein response. *Cell* *107*, 827-830.
- Marcinowski, L., Lidschreiber, M., Windhager, L., Rieder, M., Bosse, J.B., Radle, B., Bonfert, T., Gyory, I., de Graaf, M., da Costa, O.P., *et al.* (2012). Real-time Transcriptional Profiling of Cellular and Viral Gene Expression during Lytic Cytomegalovirus Infection. *PLoS pathogens* *8*.
- McGeoch, D.J., Rixon, F.J., and Davison, A.J. (2006). Topics in herpesvirus genomics and evolution. *Virus Res* *117*, 90-104.
- Milbradt, J., Auerochs, S., and Marschall, M. (2007). Cytomegaloviral proteins pUL50 and pUL53 are associated with the nuclear lamina and interact with cellular protein kinase C. *J Gen Virol* *88*, 2642-2650.
- Miranda, M., Dionne, K.R., Sorkina, T., and Sorkin, A. (2007). Three ubiquitin conjugation sites in the amino terminus of the dopamine transporter mediate protein kinase C-dependent endocytosis of the transporter. *Molecular biology of the cell* *18*, 313-323.
- Mocarski, E.S. (1996). Cytomegalovirus and their replication. *Virology*, 2447-2449.
- Mocarski, E.S., Shenk, T., and Pass, R.F. (2007). Cytomegaloviruses. In *Fields virology*, D.M. Knipe, and P.M. Howley, eds. (Philadelphia, PA: Wilkins).
- Mohr, H., Mohr, C.A., Schneider, M.R., Scrivano, L., Adler, B., Kraner-Schreiber, S., Schnieke, A., Dahlhoff, M., Wolf, E., Koszinowski, U.H., *et al.* (2012). Cytomegalovirus Replicon-Based Regulation of Gene Expression In Vitro and In Vivo. *PLoS pathogens* *8*.
- Mori, K. (2009). Signalling Pathways in the Unfolded Protein Response: Development from Yeast to Mammals. *J Biochem* *146*, 743-750.
- Movassagh, M., Gozlan, J., Senechal, B., Baillou, C., Petit, J.C., and Lemoine, F.M. (1996). Direct infection of CD34+ progenitor cells by human cytomegalovirus: evidence for inhibition of hematopoiesis and viral replication. *Blood* *88*, 1277-1283.
- Muranyi, W., Haas, J., Wagner, M., Krohne, G., and Koszinowski, U.H. (2002). Cytomegalovirus recruitment of cellular kinases to dissolve the nuclear lamina. *Science* *297*, 854-857.
- Naidoo, N. (2009). ER and aging-Protein folding and the ER stress response. *Ageing research reviews* *8*, 150-159.
- Ogawa-Goto, K., Tanaka, K., Gibson, W., Moriishi, E., Miura, Y., Kurata, T., Irie, S., and Sata, T. (2003). Microtubule network facilitates nuclear targeting of human cytomegalovirus capsid. *J Virol* *77*, 8541-8547.
- Papa, F.R., Zhang, C., Shokat, K., and Walter, P. (2003). Bypassing a kinase activity with an ATP-competitive drug. *Science* *302*, 1533-1537.
- Pass, R.F. (2009). Development and evidence for efficacy of CMV glycoprotein B vaccine with MF59 adjuvant. *Journal of Clinical Virology* *46*, S73-S76.
- Proud, C.G. (1995). PKR: A new name and new roles. Elsevier Science Ltd.
- Qian, Z., Xuan, B., Gualberto, N., and Yu, D. (2011). The human cytomegalovirus protein pUL38 suppresses endoplasmic reticulum stress-mediated cell death independently of its ability to induce mTORC1 activation. *J Virol* *85*, 9103-9113.
- Qian, Z.K., Xuan, B.Q., Chapa, T.J., Gualberto, N., and Yu, D. (2012). Murine Cytomegalovirus Targets Transcription Factor ATF4 To Exploit the Unfolded-Protein Response. *Journal of Virology* *86*, 6712-6723.
- Rao, R.V., Ellerby, H.M., and Bredesen, D.E. (2004). Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell death and differentiation* *11*, 372-380.
- Rapoport, T.A. (1992). Transport of proteins across the endoplasmic reticulum membrane. *Science* *258*, 931-936.
- Reimold, A.M., Etkin, A., Clauss, I., Perkins, A., Friend, D.S., Zhang, J., Horton, H.F., Scott, A., Orkin, S.H., Byrne, M.C., *et al.* (2000). An essential role in liver development for transcription factor XBP-1. *Gene Dev* *14*, 152-157.
- Ron, D. (2002). Translational control in the endoplasmic reticulum stress response. *The Journal of clinical investigation* *110*, 1383-1388.
- Ron, D.a.H., Stevan R. (2008). How IRE1 Reacts to ER Stress. *Cell*

- Rupp, B., Ruzsics, Z., Buser, C., Adler, B., Walther, P., and Koszinowski, U.H. (2007). Random screening for dominant-negative mutants of the cytomegalovirus nuclear egress protein M50. *Journal of Virology* *81*, 5508-5517.
- Ryan, K.J., Ray, C.G., and Sherris, J.C. (2004). *Sherris medical microbiology: an introduction to infectious diseases* (McGraw-Hill).
- Shamu, C.E., and Walter, P. (1996). Oligomerization and phosphorylation of the Ire1p kinase during intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *The EMBO journal* *15*, 3028-3039.
- Shang, J., and Lehrman, M.A. (2004). Discordance of UPR signaling by ATF6 and Ire1p-XBP1 with levels of target transcripts. *Biochem Biophys Res Commun* *317*, 390-396.
- Stahl, S., Burkhart, J.M., Hinte, F., Tirosh, B., Mohr, H., Zahedi, R.P., Sickmann, A., Ruzsics, Z., Budt, M., and Brune, W. (2013). Cytomegalovirus Downregulates IRE1 to Repress the Unfolded Protein Response. *PLoS pathogens* *9*.
- Steininger, C. (2007). Clinical relevance of cytomegalovirus infection in patients with disorders of the immune system. *Clin Microbiol Infect* *13*, 953-963.
- Sullivan, V., Talarico, C.L., Stanat, S.C., Davis, M., Coen, D.M., and Biron, K.K. (1992). A protein kinase homologue controls phosphorylation of ganciclovir in human cytomegalovirus-infected cells. *Nature* *359*, 85.
- Syggelou, A., Iacovidou, N., Kloudas, S., Christoni, Z., and Papaevangelou, V. (2010). Congenital cytomegalovirus infection. *Annals of the New York Academy of Sciences* *1205*, 144-147.
- Tabas, I., and Ron, D. (2011). Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol* *13*, 184-190.
- Tandon, R., and Mocarski, E.S. (2008). Control of cytoplasmic maturation events by cytomegalovirus tegument protein pp150. *J Virol* *82*, 9433-9444.
- Tandon, R., and Mocarski, E.S. (2012). Viral and host control of cytomegalovirus maturation. *Trends in microbiology* *20*, 392-401.
- Tardif, K.D., Mori, K., and Siddiqui, A. (2002). Hepatitis C virus subgenomic replicons induce endoplasmic reticulum stress activating an intracellular signaling pathway. *J Virol* *76*, 7453-7459.
- Tarrant-Elorza, M., Rossetto, C.C., and Pari, G.S. (2014). Maintenance and Replication of the Human Cytomegalovirus Genome during Latency. *Cell Host Microbe* *16*, 43-54.
- Terhune, S., Torigoi, E., Moorman, N., Silva, M., Qian, Z., Shenk, T., and Yu, D. (2007). Human cytomegalovirus UL38 protein blocks apoptosis. *J Virol* *81*, 3109-3123.
- Thuerauf, D.J., Marcinko, M., Belmont, P.J., and Glembotski, C.C. (2007). Effects of the isoform-specific characteristics of ATF6 alpha and ATF6 beta on endoplasmic reticulum stress response gene expression and cell viability. *J Biol Chem* *282*, 22865-22878.
- Tischer, B.K., Smith, G.A., and Osterrieder, N. (2010). En Passant Mutagenesis: A Two Step Marker less Red Recombination System. *Methods Mol Biol* *634*, 421-430.
- Todd, D.J., Lee, A.H., and Glimcher, L.H. (2008). The endoplasmic reticulum stress response in immunity and autoimmunity. *Nature reviews Immunology* *8*, 663-674.
- Tomtishen III, J.P. (2012). Human cytomegalovirus tegument proteins (pp65, pp71, pp150, pp28). *Virology Journal* *9*, 22.
- Tsuru, A., Imai, Y., Saito, M., and Kohno, K. (2016). Novel mechanism of enhancing IRE1 alpha-XBP1 signalling via the PERK-ATF4 pathway. *Sci Rep-Uk* *6*.
- Urano, F., Wang, X.Z., Bertolotti, A., Zhang, Y.H., Chung, P., Harding, H.P., and Ron, D. (2000). Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* *287*, 664-666.
- Walzer, S.A., Egerer-Sieber, C., Sticht, H., Sevvana, M., Hohl, K., Milbradt, J., Muller, Y.A., and Marschall, M. (2015). Crystal Structure of the Human Cytomegalovirus pUL50-pUL53 Core Nuclear Egress Complex Provides Insight into a Unique Assembly Scaffold for Virus-Host Protein Interactions. *J Biol Chem* *290*, 27452-27458.

- Wang, X., D.Y. Huang, et al. (2005). Integrin alphavbeta3 is a coreceptor for human cytomegalovirus. *Nature Medicine*.
- Wang, X., S.M. Huong, et al. (2003). Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus. *Nature*.
- Wang, Y., Shen, J.S., Arenzana, N., Tirasophon, W., Kaufman, R.J., and Prywes, R. (2000). Activation of ATF6 and an ATF6 DNA binding site by the endoplasmic reticulum stress response. *J Biol Chem* 275, 27013-27020.
- Wang, Y.T., Chuang, J.Y., Shen, M.R., Yang, W.B., Chang, W.C., and Hung, J.J. (2008). Sumoylation of specificity protein 1 augments its degradation by changing the localization and increasing the specificity protein 1 proteolytic process. *J Mol Biol* 380, 869-885.
- Wilson, S.J., Tsao, E.H., Webb, B.L.J., Ye, H.T., Dalton-Griffin, L., Tsantoulas, C., Gale, C.V., Du, M.Q., Whitehouse, A., and Kellam, P. (2007). X box binding protein XBP-1s transactivates the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) ORF50 promoter, linking plasma cell differentiation to KSHV reactivation from latency. *Journal of Virology* 81, 13578-13586.
- Wu, J., Rutkowski, D.T., Dubois, M., Swathirajan, J., Saunders, T., Wang, J., Song, B., Yau, G.D.Y., and Kaufman, R.J. (2007). ATF6 alpha optimizes long-term endoplasmic reticulum function to protect cells from chronic stress. *Dev Cell* 13, 351-364.
- Xuan, B., Qian, Z., Torigoi, E., and Yu, D. (2009). Human cytomegalovirus protein pUL38 induces ATF4 expression, inhibits persistent JNK phosphorylation, and suppresses endoplasmic reticulum stress-induced cell death. *J Virol* 83, 3463-3474.
- Yanagitani, K., Imagawa, Y., Iwawaki, T., Hosoda, A., Saito, M., Kimata, Y., and Kohno, K. (2009). Cotranslational Targeting of XBP1 Protein to the Membrane Promotes Cytoplasmic Splicing of Its Own mRNA. *Mol Cell* 34, 191-200.
- Yanagitani, K., Kimata, Y., Kadokura, H., and Kohno, K. (2011). Translational Pausing Ensures Membrane Targeting and Cytoplasmic Splicing of XBP1u mRNA. *Science* 331, 586-589.
- Yoshida, H., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., and Mori, K. (1998). Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins - Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *J Biol Chem* 273, 33741-33749.
- Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., and Mori, K. (2001). XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* 107, 881-891.
- Yoshida, H., Oku, M., Suzuki, M., and Mori, K. (2006). pXBP1(U) encoded in XBP1 pre-mRNA negatively regulates unfolded protein response activator pXBP1(S) in mammalian ER stress response. *Journal of Cell Biology* 172, 565-575.
- Yoshida, H., Uemura, A., and Mori, K. (2009). pXBP1(U), a Negative Regulator of the Unfolded Protein Response Activator pXBP1(S), Targets ATF6 but not ATF4 in Proteasome-mediated Degradation. *Cell Struct Funct* 34, 1-10.
- Zhu, C., Johansen, F.E., and Prywes, R. (1997). Interaction of ATF6 and serum response factor. *Molecular and cellular biology* 17, 4957-4966.
- Zhu, X., Zhang, J., Sun, H.Y., Jiang, C.C., Dong, Y.S., Shan, Q., Su, S.Y., Xie, Y.Y., Xu, N.Z., Lou, X.M., et al. (2014). Ubiquitination of Inositol-requiring Enzyme 1 (IRE1) by the E3 Ligase CHIP Mediates the IRE1/TRAF2/JNK Pathway. *J Biol Chem* 289, 30567-30577.
- Zhuravskaya, T., Maciejewski, J.P., Netski, D.M., Bruening, E., Mackintosh, F.R., and St Jeor, S. (1997). Spread of human cytomegalovirus (HCMV) after infection of human hematopoietic progenitor cells: model of HCMV latency. *Blood* 90, 2482-2491.

8 Anhang

8.1 Gefahrenstoffe

Gefahrenstoff	Gefahrensymbol	H-Sätze	P-Sätze
2-Mercaptoethanol		H301 + H331-H310-H315-H317-H318-H373-H410	P261-P280-P301 + P310 + P330-P302 + P352 + P310-P305 + P351 + P338 + P310-P403 + P233
Acrylamid		H301-H312 + H332-H315-H317-H319-H340-H350-H361f-H372	P201-P280-P301 + P310-P305 + P351 + P338-P308 + P313
Ammoniumpersulfat		H272-H302-H315-H317-H319-H334-H335	P220-P261-P280-P305 + P351 + P338-P342 + P311
Ampicillin		H315-H317-H319-H334-H335	P261-P280-P305 + P351 + P338-P342 + P311
Bisacrylamid		H302 + H332	
Chloramphenicol		H350	P201-P308 + P313
Dithiotheritol		H302-H315-H319-H335	P261-P305 + P351 + P338
Deoxycholat		H302-H335	P301 + P312 + P330
EDTA		H319	P305 + P351 + P338
Essigsäure		H226-H314	P280-P305 + P351 + P338-P310
Ethanol		H225-H319	P210-P280-P305 + P351 + P338-P337 + P313-P403 + P235
Ethidiumbromid		H302-H330-H341	P260-P281-P284-P310
flüssiger Stickstoff		H281	P202-P271 + P403-P282
Hygromycin B		H300 + H310 + H330-H318-H334	P260-P264-P280-P284-P301 + P310-P302 + P350

Isopropanol		H225-H319-H336	P210-P261-P305 + P351 + P338
Kanamycin		H360	P201-P308 + P313
Methanol		H225-H301 + H311 + H331-H370	P210-P260-P280-P301 + P310-P311
Natriumdodecylsulfat		H315-H318-H335	P280-P304 + P340 + P312-P305 + P351 + P338 + P310
Natriumhydroxid		H290-H314	P280-P305 + P351 + P338-P310
Paraformaldehyd		H228-H302 + H332-H315-H317-H318-H335-H350	P201-P210-P280-P302+P352-P305+P351+P338
Penicillin		H317-H334	P261-P280-P342 + P311
Protein A-Agraose		H226	
Protein G-Agarose		H226	
Puromycin		H373	
Salzsäure 37%		H290-H314-H335	P260-P280-P303 + P361 + P353-P304 + P340 + P310-P305 + P351 + P338
Streptomycin		H302-H361	P281
TEMED		H225-H302-H314-H332	P210-P280-P305 + P351 + P338-P310
Triton X-100		H302-H319-H411	P273-P280-P301 + P312 + P330-P337 + P313-P391-P501
Tunicamycin		H300	P264-P301 + P310

8.2 Lebenslauf

Persönliche Daten

Florian Hinte

M. Sc. Molecular Life Science/ Dipl. Ing. Biotechnologie

geboren am 31/05/1984 in Neumünster

Studium

02/2013 – 01/2018	Promotion am Heinrich-Pette-Institut Hamburg; Institut für experimentelle Virologie
05/2012 – 01/2013	Masterarbeit am Heinrich-Pette-Institut Hamburg; Institut für experimentelle Virologie; Abteilung: Virus-Wirt-Interaktion
10/2011 – 01/2013	Masterstudium Molecular Life Sciences an der Universität Hamburg
08/2009	Diplom am Leibniz Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK)
11/2007	Vordiplom
09/2004	Diplomstudium der Biotechnologie an der Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg (HAW Hamburg)

Schulabschluss

09/2001 – 07/2003	Ausbildung zum Chemisch-Technischen Assistenten (CTA) an der Theodor-Litt-Schule in Neumünster Zusätzlicher Abschluss: Fachhochschulreife
-------------------	--

Auslandsaufenthalt

09/2000 – 08/2001	Besuch einer High School in Los Angeles
-------------------	---

Berufliche Erfahrungen – studienbegleitende Praktika

02/2012 – 04/2012	Studienbegleitendes Praktikum am Heinrich-Pette-Institut Hamburg in der Forschungsgruppe von Prof. Dr. Gülsah Gabriel (Virale Zoonosen und Adaption)
-------------------	--

Anhang

04/2008 – 08/2008	Studienbegleitendes Praktikum am Leibniz Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) im Bereich der angewandten Biochemie <u>Tätigkeit:</u> Isolierung und Reinigung eines pflanzlichen Proteins, SDS-Gelelektrophorese, Aufschlussmethoden
09/2007 – 12/2007	Studentische Hilfskraft an der Helmut-Schmidt-Universität/Hamburg <u>Tätigkeiten:</u> Organische Synthesen von β -Cyclodextrinen und Reinigung mittels der DC, HPLC und SDS-Gelelektrophorese
09/2006 – 07/2007	Studienbegleitendes Projekt (HAW Hamburg)
09/2003 – 03/2004	Praktikum bei Dr. Lippelt und Partner (Medizinisches Labor für Mikrobiologie, Drogen-Screening, Serologie) in Lübeck im Anschluss an die CTA Ausbildung

8.3 Vorträge

- 12th Workshop *Cell Biology of Viral Infection* der Gesellschaft für Virologie, Deidesheim, Dezember 2013
- Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Alpbach/Österreich, März 2014
- 39th Annual International Herpesvirus Workshop, Kobe/Japan, August 2014
- 11th Mini-Herpesvirus Workshop, Berlin, September 2016
- Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Marburg, März 2017
- Young Scientists Symposium, Marburg, Juli 2017
- HPI Scientific Retreat 2017

8.4 Poster

- Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Kiel, März 2013
- 39th Annual International Herpesvirus Workshop, Kobe/Japan, August 2014

8.5 Stipendien

- 39th Annual International Herpesvirus Workshop, Kobe/Japan, August 2014
- Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Marburg, März 2017

Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Wolfram Brune bedanken, der mir diese spannende Arbeit ermöglicht hat. Er gab mir die Unabhängigkeit selbständig zu arbeiten und eigene Ideen zu verwirklichen. Trotzdem stand er mir durch regelmäßige Besprechungen und Diskussionen mit hilfreichen Tipps und Anregungen zu den Experimenten zu Seite. All diese Faktoren haben dazu geführt, dass die Arbeit ein Erfolg wurde.

Ebenfalls möchte ich mich bei Dr. Eva Herker bedanken, die die Zweitbetreuung meiner Promotionsarbeit übernahm. Sie unterstützte mich durch Diskussionen und hilfreiche Tipps für eine erfolgreiche Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Adam Grundhoff möchte ich für die Übernahme des Zweitgutachtens der Dissertation danken. Bei Herrn PD Dr. Markus Perbandt und Herrn Prof. Dr. Hartmut Schlüter danke ich für die Begutachtung der Disputation.

Ich möchte mich auch bei meinen Kooperationspartnern Dr. Eelco van Anken, Dr. Zsolt Ruzsics, Dr. Boaz Tirosh und Dr. Thomas Rutkowski bedanken. Sie stellten mir essentielle Zelllinien und Plasmiden bereit, welche enorm wichtig für diese Arbeit waren.

Besonderen Dank geht natürlich auch an Dr. Sebastian Stahl und Dr. Wiebke Hanke. Obwohl Sie nicht in der Materie involviert waren, haben sie mich mit hilfreichen Tipps und Anregungen unterstützt.

Dank gilt auch an alle meine Kollegen und ehemalige der Arbeitsgruppe „Virus-Wirt-Interaktion“ am Heinrich-Pette-Institut für die Unterstützung und guten Ratschläge, im Einzelnen Tim, Eva, Martina, Gabi, Kerstin, Theo, Elena, Jiajia, Renke, Leila, Eleonoré und Antonio. Es hat mir sehr viel Spaß gemacht, meine Dissertation hier durchzuführen.

Ein besonderer Dank gilt meiner Mutter und meiner Schwester, welche mich während meines langen Studiums in vielerlei Hinsicht unterstützt haben. Ohne euch wäre es wahrscheinlich nicht möglich gewesen diese Arbeit erfolgreich abzuschließen.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Freundin Susann danken. Sie hat mich gefühlt täglich gefragt, wann die Arbeit denn endlich mal beendet ist. Genau jetzt! Außerdem möchte ich hier meinen zwei wundervollen Kindern danken. Ihr habt mir täglich ein Lächeln geschenkt und mich auf eine Weise beeinflusst, wie ihr euch es noch nicht vorstellen könnt. Es existieren keine Worte, um auszudrücken wie viel ihr mir bedeutet. Danke Euch!

Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Ich versichere, dass diese Dissertation nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde.

Datum, Unterschrift