

**Inhibition des programmierten Zelltodes und
proinflammatorischer Signale durch das
Cytomegalovirus-Protein M45**

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Claudia Mack, geborene Gehrke
aus Bremerhaven

Würzburg 2008

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Martin Müller

Gutachter : Prof. Dr. Drs. h.c. Jörg Hacker

Gutachter: PD Dr. Wolfram Brune

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

*Meiner Familie
und Ralf*

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
Zusammenfassung.....	4
Summary.....	5
1 Einleitung.....	7
1.1 Cytomegaloviren.....	7
1.1.1 Epidemiologie, Pathogenese und Klinik.....	8
1.1.2 Aufbau und Replikation.....	9
1.2 Die Detektion und Abwehr einer Cytomegalovirusinfektion durch die angeborene antivirale Immunität.....	11
1.2.1 Detektion von Krankheitserregern.....	13
1.2.1.1 Toll-like Rezeptoren.....	14
1.2.1.2 Zytoplasmatische Sensoren.....	17
1.2.2 Zelluläre Immunität.....	18
1.2.3 Zytokin-vermittelte Effektorfunktionen der angeborenen Immunität.....	19
1.2.3.1 Das Interferonsystem.....	19
1.2.3.2 Das proinflammatorische Zytokin TNF- α	20
1.2.3.2.1 Aktivierung von NF- κ B.....	22
1.2.3.2.2 Apoptoseinduktion.....	24
1.2.3.2.3 Caspase-unabhängiger Zelltod.....	24
1.2.3.2.4 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen.....	24
1.2.4 Zellintrinsische Funktionen der angeborenen Immunität.....	25
1.2.4.1 Direkte antivirale Funktionen.....	25
1.2.4.2 Zelltod als Effektormechanismus mit indirekter antiviraler Wirkung.....	25
1.2.4.2.1 Apoptose.....	26
1.2.4.2.2 Caspase-unabhängiger Zelltod oder programmierte Nekrose.....	30
1.2.4.2.3 Autophagie.....	31
1.2.5 Die Funktionen von RIP1 als Adapterprotein.....	32
1.3 Virale Evasion der angeborenen antiviralen Immunantwort.....	33
1.3.1 Mechanismen viraler Evasion.....	33
1.3.2 Virale Evasion bei Cytomegaloviren.....	35
1.4 Das murine Cytomegalovirus-Ribonukleotidreduktase-Homolog M45 und seine Funktion in infizierten Zellen.....	38
1.4.1 Zielsetzung.....	40
2 Material und Methoden.....	42
2.1 Materialien.....	42
2.1.1 Bakterien.....	42
2.1.2 Zellen.....	42
2.1.2.1 Murine Zelllinien.....	42
2.1.2.2 Humane Zelllinien.....	43
2.1.3 Plasmide.....	44
2.1.4 DNA-Primer und Oligos.....	46
2.1.5 Viren.....	48
2.1.6 Enzyme.....	48
2.1.7 Antikörper.....	48
2.1.8 Reagenzien.....	49
2.1.9 Kits.....	51
2.1.10 Geräte.....	51
2.1.11 Puffer und Lösungen.....	52
2.2 Methoden.....	55
2.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	55
2.2.1.1 DNA-Präparation aus Bakterien.....	55
2.2.1.2 Herstellung elektrokompeter Bakterien.....	56
2.2.1.3 Transformation von Bakterien durch Elektroporation.....	57
2.2.1.4 Polymerase Chain Reaktion (PCR).....	57

2.2.1.5	DNA-Gelelektrophorese.....	58
2.2.1.6	Präparative DNA-Gelelektrophorese.....	59
2.2.1.7	Gelelution von DNA-Fragmenten.....	59
2.2.1.8	Molekulare Klonierung.....	59
2.2.1.9	Überprüfung klonierter Konstrukte durch Restriktionsanalyse der Plasmid-DNA verschiedener Bakterienklone	60
2.2.1.10	Klonierung rekombinanter Viren	60
2.2.2	Zellbiologische Methoden.....	62
2.2.2.1	Zellkultur.....	62
2.2.2.2	Herstellung von Virus-Stocks.....	62
2.2.2.2.1	MCMV	62
2.2.2.2.2	Partielle Aufreinigung und Aufkonzentrierung durch Pelletierung des Virusüberstands.....	62
2.2.2.2.3	HCMV.....	63
2.2.2.3	Bestimmung des Titers von Viruspräparationen	63
2.2.2.4	Transfektion von Zellen mit Expressionsplasmiden	63
2.2.2.4.1	Transfektion von 293 und Phoenix Zellen mittels Kalzium-Phosphat- Präzipitation.....	63
2.2.2.4.2	Liposomale Transfektion mit „Polyfect“	63
2.2.2.5	Retrovirale Transduktion eukaryotischer Zellen.....	64
2.2.2.5.1	Herstellung von Retrovirus-Überständen	64
2.2.2.5.2	Herstellung stabiler Zelllinien	64
2.2.2.5.3	Hochtitrige Transduktion mit pRetroEBNA-Konstrukten	64
2.2.2.6	Infektion von Zellen	64
2.2.2.6.1	Infektion von Zellen mit „Centrifugal Enhancement“.....	65
2.2.2.7	Rekonstitution von rekombinanten Viren durch Transfektion von Zellen	65
2.2.2.8	Fixierung von Zellen auf Objektträgern.....	65
2.2.2.9	Herstellung von Protein-Zelllysaten	65
2.2.2.10	Auftrennung von Proteinen aus Zelllysaten mittels	66
2.2.2.10.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	66
2.2.2.10.2	Anfärbung von Proteinen im Polyacrylamidgel mittels Silberfärbung.....	66
2.2.2.10.2	Detektion von Proteinen mittels Western Blot	67
2.2.2.11	Koimmunpräzipitation zur Untersuchung der Interaktion von Proteinen	69
2.2.2.12	Aufreinigung von M45-TEV-HA aus Zelllysaten mittels	70
2.2.2.12.1	Anti-HA-Affinitätsäulen.....	70
2.2.2.12.1	Proteinfällung durch Chloroform-Methanol-Präzipitation	71
2.2.2.13	MTT-Test zur Bestimmung der Zellvitalität.....	71
2.2.2.14	Luciferase-Assay zur Untersuchung der NF- κ B-Aktivierung	71
3	Ergebnisse	73
3.1	Die Rolle von M45 bei der Vermehrung des murinen Cytomegalovirus auf Endothelzellen	73
3.1.1	Herstellung und Überprüfung einer M45-Revertante und verschiedener Substitutions-Mutanten.....	73
3.1.2	Analyse der Vermehrung der Virusmutanten auf Endothelzellen.....	76
3.2	Ursachen für den Wachstumsdefekt der Δ M45-Mutante auf Endothelzellen	77
3.2.1	Analyse der Funktion von M45 beim viralen Eintritt mit Hilfe der	79
3.2.1	M32-GFP-Mutanten.....	79
3.2.2	Fehlende Inhibition des programmierten Zelltodes als Grund für den Replikationsdefekt der Δ M45-Deletionsmutante	82
3.3	Inhibition des TNF- α -induzierten Zelltodes durch M45	83
3.4	RIP1 als Interaktionspartner von M45	87
3.4.1	Identifikation von Interaktionspartnern von M45 mittels Affinitätsaufreinigung.....	87
3.4.2	Analyse der M45-RIP1-Interaktion mittels Koimmunpräzipitationen.....	90
3.5	Die Funktion der M45-RIP1-Interaktion für die MCMV-Infektion	93
3.5.1	M45 inhibiert die TNF- α -vermittelte NF- κ B-Aktivierung	94

3.5.2	M45 inhibiert den TNF- α -induzierten Caspase-unabhängigen Zelltod	96
3.5.3	M45 inhibiert die Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinase p38	98
3.5.4	M45 inhibiert die TLR3-vermittelte Aktivierung von NF- κ B.....	99
3.6	Der C-terminale Teil von M45 ist essentiell für die Funktion.....	100
3.7	Die viralen Ribonukleotidreduktase-Homologe UL45 und ICP10 teilen nicht die Funktion des M45	102
3.8	Die molekulare Grundlage der RIP1-Inhibition durch M45.....	103
3.8.1	Verlagerung von RIP1 in die unlösliche Fraktion	103
3.8.2	M45 verdrängt RIP1 nicht aus der Bindung mit dem Chaperon-Protein HSP90.....	105
3.8.3	M45 inhibiert die Ubiquitinierung von RIP1	107
4	Diskussion	110
4.1	Evolution der Cytomegaloviren	110
4.1.1	Anpassung eines Virus an zelluläre Bedingungen.....	110
4.1.2	Evolutionäre Mechanismen	111
4.1.3	Das murine Cytomegalovirus-Gen M45 als Beispiel für Koevolution.....	112
4.2	Evasion immunologischer Abwehrmechanismen bei Cytomegaloviren	113
4.2.1	Immunevasion bei der Detektion	114
4.2.1.1	Induktion der antiviralen Immunantwort durch dsRNA	115
4.2.1.2	Induktion der antiviralen Immunantwort durch dsDNA	116
4.2.1.3	Induktion der antiviralen Immunantwort durch Partikeleintritt.....	116
4.2.2	Inhibition des Interferonsystems.....	117
4.2.3	Inhibition der Wirkung des proinflammatorischen Zytokins TNF- α	118
4.2.3.1	Inhibition der NF- κ B-Aktivierung.....	118
4.2.3.2	Weitere antivirale Funktionen des TNF- α	121
4.2.3.3	Inhibition der p38-MAPK-Aktivierung	122
4.2.4	Virale Evasion des programmierten Zelltodes	122
4.2.4.1	Inhibition des TNF- α -induzierten programmierten Zelltodes	123
4.2.4.2	Inhibition des virusinduzierten Zelltodes	123
4.2.4.2.1	Auslösung des programmierten Zelltodes durch intrinsische Signale.....	124
4.2.4.3	Unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber Caspase-unabhängigem Zelltod	126
4.2.4.4	Abhängigkeit des Δ M45-induzierten Zelltodes von RIP1.....	128
4.2.4.5	Bedeutung der Inhibition des Caspase-unabhängigen Zelltodes für die MCMV-Infektion.....	128
4.3	Evasion immunologischer Abwehrmechanismen durch andere Viren	129
4.4	Weitere RIP1-interagierende Proteine.....	131
4.5	Ribonukleotidreduktase-R1-Homologe anderer Viren	133
	Literaturverzeichnis	136
	Abkürzungsverzeichnis.....	150
	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	154
	Danksagung	155
	Erklärung.....	156
	Lebenslauf.....	157

Zusammenfassung

Die angeborene Immunität ist entstanden als Schutz gegenüber einer Vielzahl schädigender Einflüsse, denen ein Organismus ausgesetzt ist, und dient im Besonderen der sofortigen Abwehr von Krankheitserregern. Sie basiert auf der Funktion verschiedener keimbahnkodierter Rezeptoren und Sensoren, wie etwa den Toll-like Rezeptoren, die bestimmte fremdartige Strukturen der Krankheitserreger erkennen und daraufhin diverse Immunabwehrmechanismen auslösen. Hierbei kann die Detektion der Fremdstrukturen zum einen über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, wie AP-1, NF- κ B und IRFs, die Produktion antiviraler und proinflammatorischer Zytokine verursachen, welche daraufhin auf andere Zellen einwirken. Zum anderen kann die Detektion der Fremdstrukturen auch direkte immunologische Effektorfunktionen in der betroffenen Zelle auslösen. Die diversen Signale der Zytokin- und Detektionsrezeptoren münden in gemeinsamen Signalwegen, die daraufhin zur Induktion der verschiedenen Immuneffektorfunktionen führen. Häufig kommt es zunächst zu einer Aktivierung von NF- κ B, was der antiviralen Abwehr, der Beseitigung anderer Störungen und dem Überleben der Zelle unter Stress dient. Wenn der schädigende Einfluss zu lange anhält, kann es stattdessen zur Initiation des programmierten Zelltodes kommen. Der programmierte Zelltod wird als sehr effektive Abwehrstrategie vielzelliger Organismen betrachtet, welcher die Ausbreitung intrazellulärer Erreger im Körper verhindert. Dies beruht darauf, dass die betroffene Zelle abstirbt, bevor der Erreger in der Lage ist, sich zu vervielfältigen und auf benachbarte Zellen zu übertragen.

Da Viren als intrazelluläre Parasiten jedoch auf den Metabolismus ihrer Wirtszellen angewiesen sind, mussten sie im Laufe ihrer Evolution vielseitige Immunevasionsfunktionen etablieren, um sich trotz der effektiven antiviralen Wirksamkeit der angeborenen Immunität in den Wirtszellen vermehren zu können.

In dieser Arbeit konnte ein vielseitiger Immunevasionsmechanismus des murinen Cytomegalovirus aufgedeckt werden.

Am Anfang der Arbeit stand die Beobachtung, dass rekombinante murine Cytomegaloviren, die kein funktionsfähiges M45-Protein exprimieren, nicht mehr in der Lage waren, sich in Endothelzellkulturen auszubreiten, was auf die vorzeitige Induktion des programmierten Zelltodes zurückgeführt wurde. Der Mechanismus, wie das murine Cytomegalovirus-Protein M45 die Einleitung des programmierten Zelltodes verhindert, sollte in dieser Arbeit aufgeklärt werden. In ersten Untersuchungen konnte bestätigt werden, dass M45 tatsächlich in der Lage ist, infizierte Zellen vor Todesrezeptor-vermitteltem Zelltod zu schützen. Über die Analyse von M45-Interaktionspartnern wurde daraufhin aufgedeckt, dass M45 das zentrale zelluläre Adapterprotein RIP1 angreift, welches an einem Schnittpunkt verschiedener immunologischer Detektionssysteme und Zytokinsignalwege steht. Durch die Bindung an

RIP1 kann M45 die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B nach Stimulation des TLR3 unterbinden, was wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Detektion einer CMV-Infektion spielt. Des Weiteren inhibiert M45 die Aktivierung von NF- κ B und der p38 MAP-Kinase nach TNF- α -Stimulation. Die vermutlich wichtigste Funktion hingegen, die M45 durch die Inhibition von RIP1 ausübt, ist die Verhinderung des Caspase-unabhängigen programmierten Zelltodes infizierter Zellen nach Einwirkung von TNF- α . Diese Funktion erklärt den ursprünglich beobachteten Phänotyp der M45-Deletionsmutante.

Es konnte gezeigt werden, dass M45 diese wichtigen Immunevasionsfunktionen allein ohne weitere virale Proteine erfüllen kann. Sowohl für die Bindung an RIP1 als auch für die Inhibition der TNF- α -induzierten NF- κ B-Aktivierung scheint nur der C-terminale Teil des M45 benötigt zu werden. Als molekulare Grundlage konnte nachgewiesen werden, dass M45 die Ubiquitinierung von RIP1 verhindert, welche als Stimulus-abhängige Aktivierung dieses Adapterproteins betrachtet wird. Auf diese Weise werden die verschiedenen RIP1-abhängigen Signalwege von M45 blockiert. Diese Inhibition RIP1-abhängiger Signalwege durch das MCMV-Protein M45 stellt einen neuen viralen Evasionsmechanismus dar, mit dem gleichzeitig mehrere antivirale und proinflammatorische Signalwege inhibiert werden können und der vermutlich entscheidend zur erfolgreichen Vermehrung und Pathogenese des murinen Cytomegalovirus beiträgt.

Summary

Innate immunity has evolved as protection against the multitude of harmful influences which an organism encounters and serves in particular the immediate defence against pathogens. It is based on different germ line-encoded receptors and sensors, as for example Toll-like receptors, which detect specific foreign structures on pathogens and activate diverse immune defence mechanisms. On the one hand the detection of foreign structures can lead via activation of transcription factors such as NF- κ B, AP-1 and IRFs to the production of proinflammatory and antiviral cytokines, which in turn act on neighbouring cells. On the other hand the detection of foreign structures can cause direct immunological effector functions in the primary cell. The various signals of detection and cytokine receptors combine in common signalling pathways which induce different immune effector functions. This usually results in initial activation of NF- κ B, which serves the antiviral defence, the elimination of other disturbances and the survival of the cell under stress. When the harmful impact lasts too long, it can result instead in the initiation of programmed cell death. Programmed cell death is regarded as very effective defence strategy of multicellular organisms which anticipates the spread of intracellular pathogens in the body. This is based on the fact that the infected cell dies before the pathogen is able to proliferate and spread to neighbouring cells.

Since viruses as intracellular pathogens rely on the host cell's metabolism, they had to establish miscellaneous immune evasion mechanisms during their evolution, to be able to replicate in host cells regardless of the effective antiviral potency of innate immunity.

This study revealed an impressively versatile immune evasion mechanism of murine cytomegalovirus.

The project is based on the initial observation that recombinant murine cytomegaloviruses which lack a functional M45 protein were not anymore able to replicate in endothelial cell cultures, which was attributed to premature initiation of programmed cell death.

The aim of this study was to reveal the mechanism how the murine cytomegalovirus protein M45 prevents the induction of programmed cell death.

First experiments confirmed that M45 was able to protect infected cells from death receptor induced programmed cell death. Through the analysis of M45 interaction partners it was discovered that M45 impedes the cellular adapter protein RIP1, which stands at the intersection of different immunological detection systems and cytokine signalling pathways. Through binding to RIP1 M45 is able to prevent the activation of NF- κ B after stimulation of TLR3, which probably plays an important role for the detection of cytomegalovirus infections. Furthermore M45 inhibits the activation of NF- κ B and the p38 MAP kinase after stimulation with TNF- α . However the presumably most important function which M45 fulfils by interacting with RIP1 is the inhibition of TNF- α induced caspase-independent programmed cell death of infected cells. This function accounts for the originally observed phenotype of the M45 deletion mutant.

It has been shown that M45 is able to fulfil this function on its own without other viral proteins. For the binding to RIP1 as well as for the inhibition of TNF- α -induced NF- κ B activation just the C-terminal part of M45 seems to be necessary. As molecular basis it was found that M45 inhibits the ubiquitination of RIP1 which is considered as stimulus-dependent activation of this adapter protein. In this way the different RIP1-dependent signalling cascades are blocked. This inhibition of RIP1-dependent signalling pathways by the MCMV protein M45 presents a new viral immune evasion mechanism, which inhibits several antiviral and proinflammatory signalling cascades at once and which probably contributes decisively to successful propagation and pathogenesis of murine Cytomegalovirus.

1 Einleitung

1.1 Cytomegaloviren

Die Cytomegaloviren sind große umhüllte Viren mit einem ikosaedrischen Kapsid und einem doppelsträngigen DNA-Genom von ungefähr 235 kbp Größe. Aufgrund ihrer Morphologie und ihrer Fähigkeit, latente Infektionen zu verursachen, werden sie zu den Herpesviren gezählt. Herpesviren sind evolutionär sehr alte Viren. Sie weisen eine ungefähr 200 Millionen Jahre lange Koevolution mit ihren Wirten auf (59). Daher sind die Herpesviren im Tierreich sehr weit verbreitet; man findet sie bei vielen verschiedenen Vertebraten, z.B. Säugetieren, Vögeln, Amphibien, Reptilien und Fischen; ein Herpesvirus wurde sogar bei Invertebraten (Herpesvirus der pazifischen Auster) beschrieben (60, 176). Cytomegaloviren weisen eine weite Verbreitung bei den Säugetieren auf, darunter bei vielen Affenarten und Nagetieren. Aufgrund der langen Koevolution mit ihrem jeweiligen Wirt haben sich die Cytomegaloviren so optimal an den Wirt angepasst, dass eine sehr strikte Speziespezifität entstanden ist (97, 124). Diese zeichnet sich unter anderem durch ein fein abgestimmtes, empfindliches Gleichgewicht zwischen den immunologischen Abwehrmechanismen des Wirtes und den viralen Evasionsfunktionen aus (97, 124, 164, 187). Diese optimale Anpassung ermöglicht es den Cytomegaloviren, nach der Primärinfektion latent im Körper des Wirtes zu persistieren. Aus dieser Latenz heraus kann es immer wieder zu Reaktivierungen und damit zu Phasen der Virusausscheidung kommen (144, 245). Die Ausbildung einer persistierenden Infektion mit wiederkehrenden Phasen der Virusausscheidung ist eine effektive virale Strategie, sich in einer Population festzusetzen. In Kombination mit einer effektiven Übertragung durch verschiedene Körpersekrete wie Speichel, Urin, Muttermilch oder Genitalsekrete und der Möglichkeit einer vertikalen Übertragung von der Mutter auf das ungeborene Kind, hat dies das Cytomegalovirus zu einem ubiquitär verbreiteten, opportunistischen Krankheitserreger mit Infektionsraten zwischen 60 und 95% gemacht (144, 188).

Im Unterschied zu anderen Herpesviren weisen Cytomegaloviren eine sehr strikte Speziespezifität auf und ihr Replikationszyklus ist ausgesprochen lang. Eine Vermehrung dauert bei dem humanen Cytomegalovirus (HCMV) ungefähr 48-72 Stunden, bei dem murinen Cytomegalovirus (MCMV) ca. 24 Stunden. Aufgrund der oben genannten Merkmale werden die Cytomegaloviren in die Unterfamilie der β -Herpesviren eingeordnet, dessen Prototyp das humane Cytomegalovirus (HCMV) ist, welches auch als humanes Herpes-Virus 5 (HHV 5) bezeichnet wird (Tabelle 1) (188).

Tabelle 1: Unterfamilien der Herpesviren und ihre Einteilungsmerkmale (189)

Unterfamilie	Virus	Erkrankung	Eigenschaften
α-Herpesviren	Herpes-simplex-Virus 1 (HSV 1) (HHV 1)	Herpes labialis	breites Wirtsspektrum, kurzer Replikationszyklus, schnelles Wachstum in Zellkultur, Zerstörung der infizierten Zellen, Latenz vorwiegend in sensorischen Ganglien
	Herpes-simplex-Virus 2 (HSV 2) (HHV 2)	Herpes genitalis	
	Varizella-zoster-Virus (VZV) (HHV 3)	Windpocken, Gürtelrose	
β-Herpesviren	Humanes Cytomegalovirus (HCMV) (HHV 5)	CMV-Mononukleose, unterschiedliche Symptomatik bei Immunsuppression und bei kongenitaler Übertragung	strikt Spezies-spezifisch, langer Replikationszyklus, langsames Wachstum in Zellkultur, Virus bleibt Zell-assoziiert, infizierte Zellen häufig vergrößert (Cytomegalie), Latenz in Speicheldrüsen, lymphatischen Organen, Niere u.a.
	HHV 6 A und B	Drei-Tage-Fieber (Roseola infantum) bei Kleinkindern	
	HHV 7	Drei-Tage-Fieber (Roseola infantum) bei Kleinkindern	
γ-Herpesviren	Epstein-Barr-Virus (EBV) (HHV 4)	EBV-Mononukleose, Nasopharynxkarzinom, Lymphome	eingeschränktes Wirtsspektrum, variabler Replikationszyklus, Latenz in B- oder T-Lymphozyten
	Kaposi-Sarkom-assoziiertes-Herpes-Virus (KSHV) (HHV 8)	Kaposi Sarkom, Morbus Castleman, Lymphome	

1.1.1 Epidemiologie, Pathogenese und Klinik

Die Cytomegaloviren sind typische opportunistische Krankheitserreger. Bei immunologisch kompetenten Personen verläuft die Infektion inapparent, da das Immunsystem eine starke Ausbreitung des Virus und damit eine Schädigung von Organen verhindern kann. Zur Etablierung einer Erkrankung kommt es nur dann, wenn eine zellvermittelte Immunantwort fehlt oder sehr stark eingeschränkt ist (144). Dies ist der Fall bei kongenitaler Infektion, da das ungeborene Kind immunologisch noch nicht ausgereift ist; bei AIDS-Patienten, bei denen die T-Zell-vermittelte Immunantwort durch das HI-Virus stark abgeschwächt ist; sowie bei Empfängern von Organ- oder Knochenmark-Transplantaten, bei denen die T-Zell-vermittelte Immunantwort medikamentös unterdrückt wird, um die Abstoßung des fremden Gewebes zu verhindern (144). Die primäre CMV-Infektion verläuft in 90% der Fälle asymptomatisch. Es kann jedoch zu einer CMV-assoziierten Mononukleose kommen (79). Bei der kongenitalen Infektion hingegen kann es im ungeborenen Kind zu einer generalisierten Infektion kommen, welche auf Grund von Schädigungen des zentralen Nervensystems schwerwiegende Symptome mit sich bringen kann (144, 171). Die mentalen

Störungen können in ihrer Ausprägung variieren, von häufig auftretendem Hörverlust bis hin zu starker Retardierung (IQ <70) (92). In bis zu 10% der Fälle kann eine symptomatische CMV-Infektion bei Neugeborenen tödlich verlaufen (79, 144). Bei Organtransplantationen kann es durch die immunsuppressive Therapie vor allem dann zu schwerwiegenden Komplikationen kommen, wenn ein CMV-negativer Empfänger ein CMV-positives Organ erhält (144). Die Erkrankung kann sich in verschiedenen Organsystemen manifestieren, wie z. B. Lunge, Verdauungstrakt oder Leber (144). In der allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation konnte nur durch präventive antivirale Therapie die hohe Inzidenz (um 25%) und damit assoziierte Mortalität (30 bis 52% der Erkrankten) von CMV-Erkrankungen nach Stammzelltransplantationen deutlich vermindert werden (253).

1.1.2 Aufbau und Replikation

Cytomegaloviren sind die größten Herpesviren, die umhüllten Virionen haben einen Durchmesser von 200-300 nm. Auch das doppelsträngige DNA-Genom ist mit ca. 235 kbp sehr groß. Es kodiert für über 166 Proteine und besteht aus einer Unique-long-Region (U_L) und einer Unique-short-Region (U_S), die flankiert werden von terminalen und internen Repeats (TR, IR). Diese Repeat- und Unique-Regionen weisen den in Abbildung 1 dargestellten Aufbau auf (188).

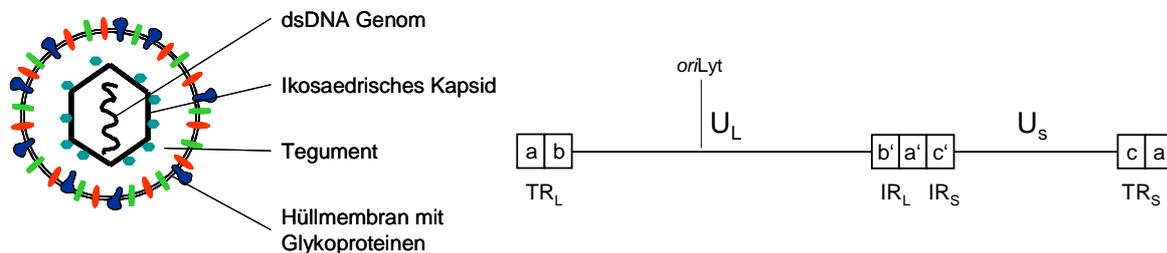


Abbildung 1: Genomaufbau und schematische Darstellung der Virionen

Die Abbildung zeigt den schematischen Aufbau der Virionen sowie die Abfolge der Unique- und Repeat-Regionen des humanen Cytomegalovirus. Die terminalen Repeats weisen cis-agierende Sequenzen auf, hingegen finden sich die meisten Protein-kodierenden Bereiche auf den Unique-Regionen. Der virale Replikationsursprung (ori_{Lyt} , origin of lytic replication) befindet sich in der Mitte der U_L -Region (189).

Das Genom wird umgeben von dem viralen Kapsid, welches 130 nm im Durchmesser ist und eine ikosaedrische T16 Symmetrie aufweist. Es besteht aus 162 Kapsomeren, die aus fünf viralen Proteinen aufgebaut sind.

Das Nukleokapsid wird wiederum umgeben von einer relativ unstrukturierten Proteinmatrix, dem Tegument. Dieses bildet ungefähr 40 % der Virionmasse und besteht aus mindestens 27 verschiedenen viralen Proteinen und einer Ansammlung viraler und zellulärer RNAs.

Das Tegument wird von der viralen Hüllmembran umschlossen, welche sich von dem Endoplasmatischen-Retikulum-Golgi-Intermediärem-Kompartiment (ERGIC) ableitet. In diese

Membran sind über 20 virale Glykoproteine eingelagert. Die wichtigsten viralen Glykoproteine sind das gB und die beiden Komplexe gH:gL, sowie gM:gN (188).

Die Replikation der Cytomegaloviren beginnt mit der Adsorption des Virus an die Zelle, welche einen biphasischen Verlauf nimmt. Zunächst erfolgt eine reine lose Anheftung des Virus über gB an Heparansulfat-Proteoglykan. Im Anschluss erfolgt eine feste Bindung, die schließlich die Aufnahme der Virionen ermöglicht, wobei die beteiligten Rezeptoren noch nicht identifiziert sind. Der Glykoproteinkomplex gH:gL ist schließlich für die Membranfusion verantwortlich (52). Diese findet bei Fibroblasten an der Zelloberfläche statt, wo Virushüllmembran und Zytoplasmamembran miteinander verschmelzen. In Endothelzellen, Epithelzellen und dendritischen Zellen erfolgt die Aufnahme der Viruspartikel hingegen über Endozytose (3, 220). Nach der Freisetzung der Kapside ins Zytoplasma erfolgt der Transport zum Zellkern vermutlich über Mikrotubuli (196). Die virale DNA wird durch die Kernporen in den Zellkern eingeschleust. Die Transkription der viralen Gene erfolgt im Kern und findet in einer strikt regulierten Kaskaden-artigen Weise statt (188). Die viralen Gene werden aufgrund ihres Expressionszeitpunkts und der Abhängigkeit von früheren Genprodukten oder der viralen DNA-Replikation in drei kinetische Klassen eingruppiert, die immediate-early (IE) Gene (α), die delayed-early (E) Gene (β) und die late (L) Gene (γ) (77). Die strikte Regulierung der viralen Genexpression erfüllt einen biologischen Sinn. Die Genprodukte werden nur zu den Zeiten gebildet, zu denen sie auch benötigt werden. Die immediate-early-Gene sind entschieden an der Vorbereitung der Zelle auf die erfolgreiche Virusproduktion beteiligt. Unter anderem steuern sie als Transaktivatoren die virale und zelluläre Genexpression, regulieren den Zellzyklus und unterbinden verschiedene zelluläre Abwehrmechanismen, wie Apoptose oder Interferon-Antwort. Delayed-early-Genprodukte sind unter anderem für die virale DNA-Synthese zuständig. Des Weiteren finden sich Genprodukte, die an der Kapsidreifung beteiligt sind oder zelluläre und immunologische Abwehrmechanismen inhibieren. Virale late-Genprodukte sind hauptsächlich Strukturproteine und damit am Aufbau der Virionen und deren Ausschleusen aus der Zelle beteiligt (144).

Die virale DNA-Synthese erfolgt im Zellkern, wo sich Replikationskompartimente bilden, welche als nukleäre Einschlüsse HCMV-infizierter Zellen lichtmikroskopisch sichtbar sind. Die Replikation der viralen DNA erfolgt nach dem Rolling-Circle-Mechanismus (6).

Als erster Schritt beim Kapsid-Assembly lagern sich die fünf Kapsidkomponenten zu einer Prokapsidhülle zusammen, welche durch die Enkapsidierung der DNA zum Nukleokapsid reift (285). Nach der Reifung erfolgt der Egress der Nukleokapside vermutlich durch einen zweistufigen Prozess. Durch Knospung an der inneren Kernmembran und Deenvelopment an der äußeren Kernmembran werden die Nukleokapside in das Zytoplasma ausgeschleust. Anschließend werden sie durch Mikrotubuli-vermittelten Transport durch das Zytoplasma

befördert, wobei die Assoziation der meisten Tegumentproteine mit dem Nukleokapsid erfolgt (226). Die eigentliche Hüllmembran erhalten die Virionen dann durch Budding an ERGIC-Membranen, welche die viralen Glykoproteine enthalten (236). Die umhüllten Virionen werden vermutlich durch Exozytose aus der Zelle ausgeschleust.

1.2 Die Detektion und Abwehr einer Cytomegalovirusinfektion durch die angeborene antivirale Immunität

Die Replikation von Viren in einem Organismus erfolgt nicht unbemerkt. Eine Vielzahl verschiedener Detektionsmechanismen stellt sicher, dass Viren sofort nach dem Eindringen in den Organismus identifiziert und durch diverse Immuneffektormechanismen abgewehrt werden. Die Immunabwehr kann unterteilt werden in die angeborene und die erworbene Immunität. Die angeborene Immunität stellt die erste, unspezifische Abwehr gegenüber Krankheitserregern dar und kann sofort auf eindringende Erreger reagieren. Im Unterschied zur erworbenen Immunität aber, bietet sie keinen lang anhaltenden Schutz gegenüber erneuter Infektion.

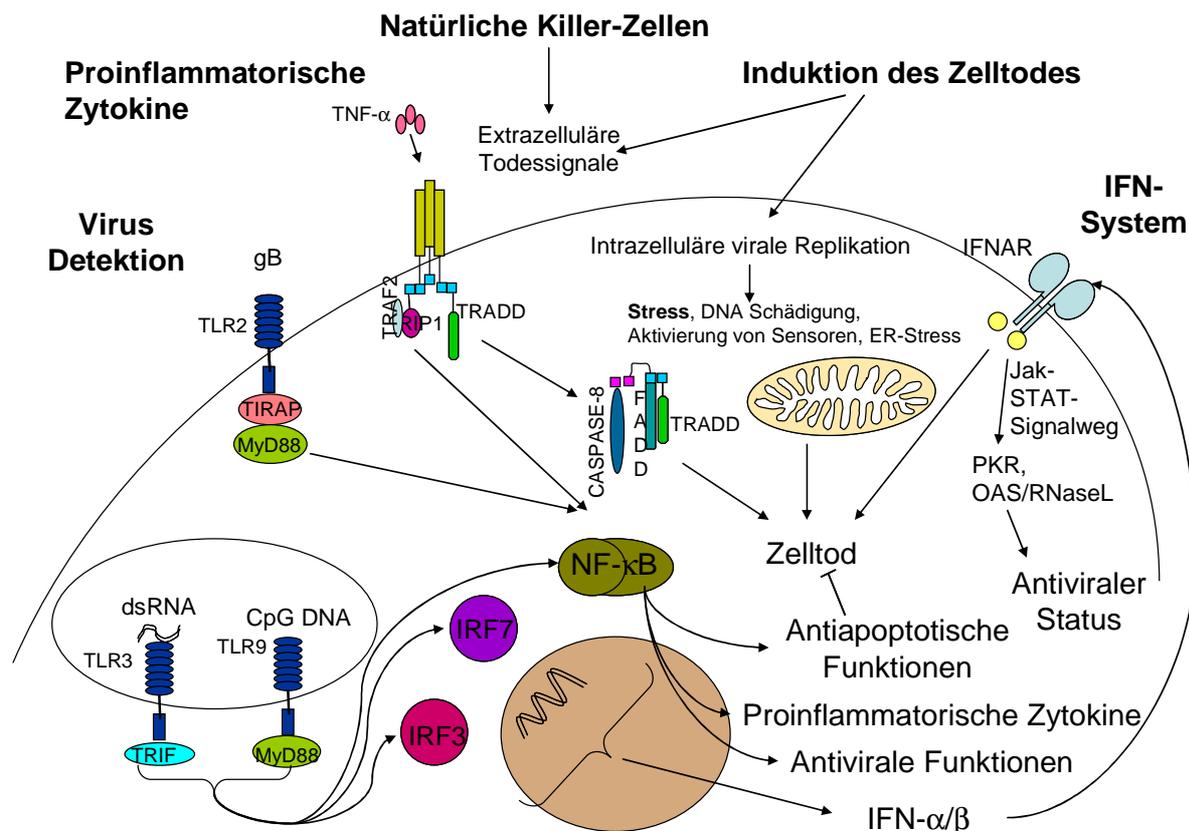


Abbildung 2: Abwehr einer CMV-Infektion durch die angeborene Immunität

Die Abbildung zeigt verschiedene Aspekte der angeborenen Immunität, die bei der Abwehr von Cytomegalovirusinfektionen beteiligt sind.

Grundsätzlich basiert die angeborene Immunität auf der Erkennung von Krankheitserregern durch verschiedene konstitutiv exprimierte Zelloberflächenrezeptoren und intrazelluläre Rezeptoren, wie den Toll-like Rezeptoren und den intrazellulären RNA-Helikasen, welche in der Lage sind, zwischen fremdartigen Strukturen und Eigenstrukturen zu unterscheiden (129). Nach dieser Erkennung kommt es durch verschiedene Signalkaskaden zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und direkt oder indirekt zur Initiierung von Effektormechanismen, die für die Abwehr des eingedrungenen Erregers zuständig sind. Die indirekte Auslösung von Effektorfunktionen erfolgt über die Ausschüttung von Zytokinen, die ihre Effekte daraufhin in anderen Zellen ausüben. Es gibt hingegen auch Effektorfunktionen, die bei der Erkennung eines Krankheitserregers direkt in der betroffenen Zelle ausgelöst werden.

Die angeborene Immunität beinhaltet verschiedene immunologische Aspekte. Ein wichtiger Aspekt der angeborenen Immunität ist die zelluläre Immunität, welche unter anderem auf der Funktion von Makrophagen, dendritischen Zellen und natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen) beruht. Die Hauptaufgabe von Makrophagen und dendritischen Zellen ist die Aufnahme, Detektion und Präsentation von Fremdanitigenen und der darauf folgenden Produktion von Zytokinen. Natürliche Killer-Zellen hingegen sind in der Lage, virusinfizierte Zellen zu erkennen und direkt abzutöten. Die durch natürliche Killer-Zellen vermittelte zelluläre Immunität ist von herausragender Bedeutung bei der Kontrolle einer CMV-Infektion. So konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von natürlichen Killer-Zellen bei Mäusen zu tödlichen Verlaufsformen der MCMV-Infektion führt, sowie zu wesentlich schwereren Verläufen und häufigen Reaktivierungen der HCMV-Infektion beim Menschen (20) (242).

Ein weiterer Aspekt der angeborenen Immunität sind die von Immunzellen, aber auch von somatischen Zellen produzierten Zytokine und Chemokine, welche zur Regulation der Immunantwort sowie der Induktion und Koordination von Immuneffektorfunktionen beitragen. Die Produktion von Zytokinen wird ausgelöst durch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die wiederum durch die Detektion von Krankheitserregern verursacht wird. Im Zuge der angeborenen antiviralen Immunabwehr kommt es durch die Detektion viraler Komponenten hauptsächlich zur Aktivierung der vier Transkriptionsfaktoren NF- κ B, AP-1, IRF3 und IRF7 (237) (131) (129) (130).

Die Aktivierung von NF- κ B und AP-1 führt durch Transkription proinflammatorischer Zytokine, wie TNF- α , IL-6, IL-1 β und IL-12, und Chemokine, wie IL-8, zur Auslösung einer Entzündungsantwort (131, 198, 217).

Bei der Kontrolle der CMV-Infektion ist das proinflammatorische Zytokin TNF- α besonders wichtig, welches über die Rekrutierung weiterer Immunzellen zur Regulation der Immunantwort beiträgt, aber auch direkte antivirale Funktionen ausübt.

Zusammen mit NF- κ B und AP-1 sind die Transkriptionsfaktoren IRF3 und IRF7 an der transkriptionellen Regulation der Typ-1-Interferongene beteiligt. Eine Aktivierung von NF- κ B,

AP-1 und IRF3 wird für die Bildung von IFN- β benötigt, IRF7 ist für die Bildung von IFN- α wichtig (131) (129). Die Interferon-Antwort ist maßgeblich an der Kontrolle der CMV-Infektion beteiligt, indem sie zur Etablierung eines antiviralen Status in uninfizierten Zellen führt, welcher die Replikation des Virus in der Zelle erschwert (223) (197).

Der dritte Aspekt der angeborenen Immunität ist die Vielzahl zellintrinsicischer Funktionen, die der Erkennung und Abwehr von Erregern dienen. Manche dieser zellintrinsicischen Mechanismen sind konstitutiv vorhanden, andere, wie zum Beispiel die Komponenten des Interferon-vermittelten antiviralen Status, müssen zunächst durch Zytokinwirkung induziert oder hochreguliert werden. Zu den zellintrinsicischen Funktionen zählen solche mit direkter antiviraler Wirkung, die bestimmte Schritte im viralen Replikationszyklus blockieren, wie die Mx Proteine (s. u.), und solche mit indirekter antiviraler Wirkung, wie die Induktion des programmierten Zelltodes. Der programmierte Zelltod infizierter Zellen ist ein Effektor-mechanismus, der maßgeblich zur antiviralen Abwehr der Cytomegalovirusinfektion beiträgt (43, 83, 187). Er kann entweder direkt durch die Erkennung viraler Fremdstrukturen in der infizierten Zelle ausgelöst werden oder indirekt durch zytotoxische T-Zellen oder NK-Zellen vermittelt sein. Durch den Tod der infizierten Zelle wird verhindert, dass sich das Virus in der Zelle vermehren und damit auf Nachbarzellen ausbreiten kann.

Allgemein herrscht eine rege Interaktion zwischen den verschiedenen Komponenten des angeborenen Immunsystems, aber auch mit Teilen der erworbenen Immunität.

Im folgenden Abschnitt soll auf die verschiedenen Aspekte der angeborenen Immunität näher eingegangen werden, die bei der Abwehr viraler Infektionen, wie der Cytomegalovirusinfektion, von besonderer Bedeutung sind.

1.2.1 Detektion von Krankheitserregern

Die Detektion fremder Strukturen auf Krankheitserregern erfolgt durch spezialisierte Rezeptoren, den sogenannten „Pattern-Recognition-Rezeptoren“ (PRRs), die in der Lage sind, fremdartige Strukturen wie „Pathogen-Associated Patterns“ (PAMPs) oder „Damage-Associated Patterns“ (DAMPs) zu erkennen und zu binden (4, 166). Diese Strukturen finden sich unter normalen Umständen nicht im Organismus oder sie sind örtlich von den entsprechenden Rezeptoren getrennt, so dass keine Aktivierung durch eigene ungefährliche Strukturen erfolgt. Die Bindung der Fremdstruktur an den entsprechenden Rezeptor führt zur Initiierung von Signalkaskaden, die in der Aktivierung verschiedener Effektorsysteme der angeborenen Immunität münden. Verschiedene PRRs sind von besonderer Bedeutung bei der antiviralen Immunantwort (206). Diese PRRs unterteilen sich in membrangebundene Rezeptoren und zytoplasmatische Rezeptoren. Zu den membrangebundenen Rezeptoren gehören die sogenannten Toll-like Rezeptoren (TLRs), welche sich entweder an der Zelloberfläche in der Zytoplasmamembran oder in endosomalen Membranen befinden (131) (129) (237). Sie sind zuständig für die Erkennung extrazellulärer oder endozytotisch

aufgenommener Fremdstrukturen. Im Zytoplasma befinden sich weitere PRRs, wie die sogenannten RNA-Helikasen, die für die Detektion aktiv replizierender Viren im Zytoplasma verantwortlich sind (293). Des Weiteren sind verschiedene Komponenten des Interferon-vermittelten antiviralen Status als Sensoren an der Detektion viraler Infektionen beteiligt, da sie virale Strukturen binden und hierdurch aktiviert werden. Durch das Vorhandensein der verschiedenen Rezeptoren wird die Detektion von fremdartigen Strukturen in verschiedenen zellulären Kompartimenten ermöglicht (150).

1.2.1.1 Toll-like Rezeptoren

Toll-like Rezeptoren sind eine Familie evolutionär konservierter PRRs, die von entscheidender Bedeutung für die angeborene Immunantwort sind. Ihr Name leitet sich von dem ersten Gen dieser Klasse ab, welches in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* entdeckt und als Toll-Gen bezeichnet wurde. In Säugetieren wurden bisher 13 verschiedene TLRs beschrieben, die unterschiedliche molekulare Strukturen erkennen (Abbildung 3). Allen gemein ist der Aufbau aus einer extrazellulären Domäne, die aus Leucin-reichen Wiederholungsregionen besteht, sowie einem Transmembranteil und einer intrazellulären Domäne, welche aufgrund ihrer Homologie zu der intrazellulären Domäne des Interleukin-1-Rezeptors als Toll/IL-1-Rezeptor-(TIR)-Domäne bezeichnet wird (131).

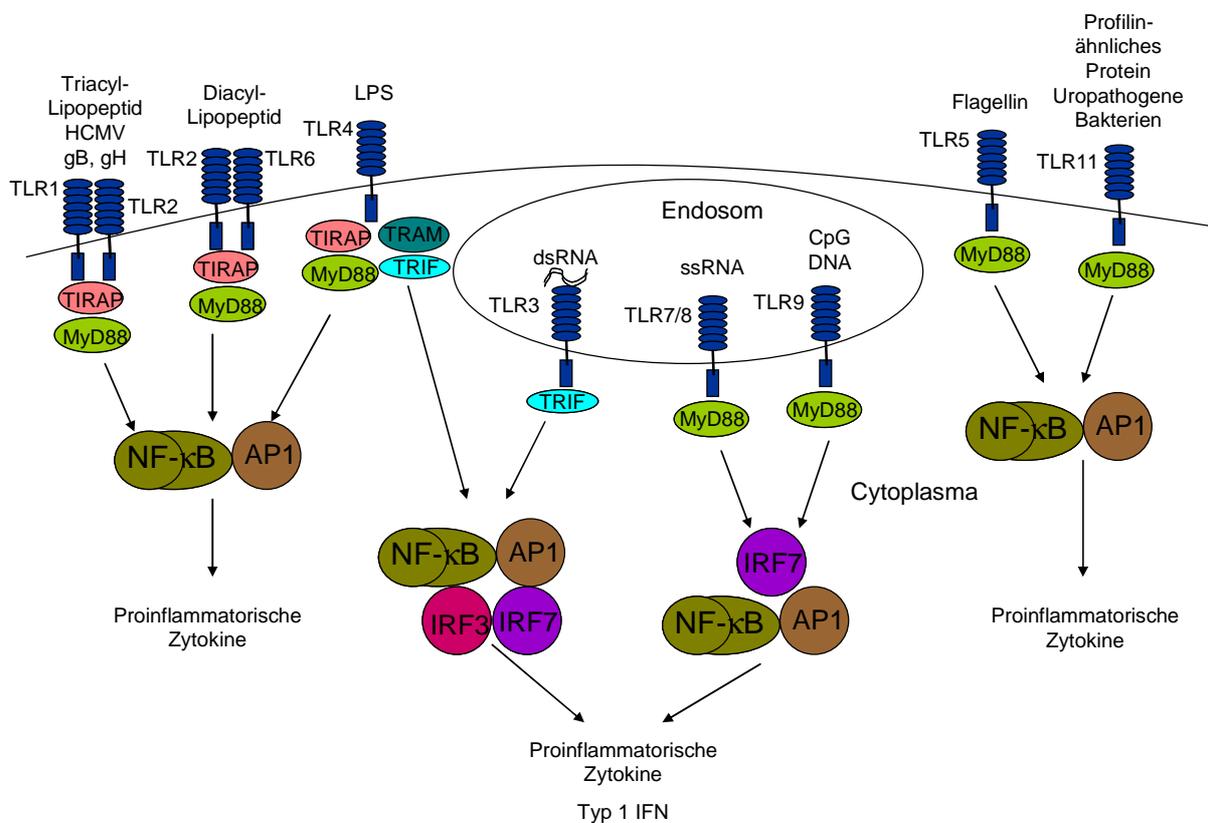


Abbildung 3: Toll-like Rezeptoren in der angeborenen Immunität

Die Abbildung zeigt die verschiedenen Toll-like Rezeptoren, ihre Liganden, Adapterproteine und die eingeleitete Immunantwort. Adaptiert nach „Kawai, T. and S. Akira. TLR signaling“ (131). Die Funktion und Liganden für TLR10, TLR12 und TLR13 sind noch unbekannt.

Die extrazelluläre Domäne ist für die Ligandenbindung verantwortlich, wohingegen die intrazelluläre Domäne für die Rekrutierung von Adaptermolekülen zuständig ist. Trotz der Bindung verschiedener Liganden, aktivieren die verschiedenen TLRs teilweise gleiche oder ähnliche Signalkaskaden. Nach Ligandenbindung rekrutieren die TLRs verschiedene Adaptermoleküle, was zur Initiation der einzelnen Signalkaskaden führt. Hierbei kommt es abhängig vom TLR zur Aktivierung von mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) und der Transkriptionsfaktoren AP-1 (über MAPK), NF- κ B, IRF3 und IRF7. Die aktivierten Transkriptionsfaktoren bewirken die Bildung verschiedener proinflammatorischer Zytokine (NF- κ B, AP-1) und Interferone (NF- κ B, AP-1, IRF3 und IRF7) (131). Zudem kann es durch weitere Signalkaskaden abhängig vom Status der Zelle zur Induktion des programmierten Zelltodes kommen (224). Die Bindung zwischen Rezeptor und Adapter findet über homologe Interaktion von TIR-Domänen im Rezeptor sowie dem Adapter statt. Die verschiedenen zytoplasmatischen TIR-Domänen-enthaltenden Adaptermoleküle sind das „myeloid differentiation primary response protein 88“ (MyD88), „TIR domain-containing adapter inducing IFN β “ (TRIF, TICAM1), „TRIF-related adapter molecule“ (TRAM, TICAM2), sowie „TIR domain-containing adapter protein“ (TIRAP) (131). Alle bisher bekannten TLRs außer TLR3 sind in der Lage über MyD88 zu einer Aktivierung von proinflammatorischen Zytokinen zu führen. Das Adapterprotein TIRAP ist zusammen mit MyD88 an der Aktivierung proinflammatorischer Zytokine bei TLR2 und TLR4 Stimulation beteiligt. TLR3 und TLR4 rekrutieren zudem das Adapterprotein TRIF (im Falle von TLR4 erfolgt dies zusätzlich zur Rekrutierung von MyD88/ TIRAP, bei TLR3 ist dies der einzige rekrutierte Adapter) (131, 291). Die Bindung von TRIF erfolgt bei TLR3 direkt, bei TLR4 wird ein weiteres Adaptermolekül, TRAM benötigt, welches TLR4 und TRIF verbindet (131) (Abbildung 3).

Die für die Abwehr viraler Infektionen besonders wichtigen TLRs sind TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9. Sie sind alle in Endosomen lokalisiert und detektieren verschiedene Nukleinsäuren. Nach Ligandenbindung sind sie in der Lage, neben der Aktivierung von proinflammatorischen Zytokinen auch zu einer Induktion von Typ-1-Interferonen zu führen, was unter anderem zur Einleitung des antiviralen Status beiträgt und daher zur Abwehr viraler Infektionen von Bedeutung ist (129). TLR7/8 binden ssRNA und TLR9 bindet unmethylierte CpG-DNA, was wie schon besprochen über einen MyD88-abhängigen Weg zu einer Aktivierung von NF- κ B und AP-1 führt. Alle drei werden vorwiegend in plasmazytoiden dendritischen Zellen exprimiert, die auch natürliche Interferon-produzierende Zellen genannt werden, wo sie ebenfalls über MyD88 eine Aktivierung von IRF7 bewirken (131, 237).

TLR3 detektiert doppelsträngige RNA (dsRNA), welche als Genombestandteil oder Replikationsintermediat bei vielen Viren vorkommt (280). Zudem wird TLR3 durch poly(I:C), ein künstliches dsRNA-Analog, stimuliert. Die Lokalisation von TLR3 ist abhängig vom Zelltyp: In Fibroblasten wird TLR3 auf der Zelloberfläche exprimiert, in konventionellen

dendritischen Zellen hingegen in Endosomen (173). Nach Bindung von dsRNA oder poly(I:C) an TLR3 erfolgt die Rekrutierung des einzigen Adapters TRIF. Dieser wird sowohl für die Aktivierung von NF- κ B und AP-1 sowie für die Aktivierung von IRF3 benötigt (119). Für die Aktivierung von NF- κ B interagiert TRIF über das C-terminale „RIP-homotypic interaction motif“ (RHIM) mit RIP1, einem Adapterprotein, welches in Absatz 1.2.5 noch genauer besprochen wird. Diese Interaktion führt über die Aktivierung des IKK-Kinase-Komplexes zur Aktivierung von NF- κ B (55, 182). Des Weiteren interagiert TRIF über die N-terminale Domäne mit TRAF6, welches vermutlich über die Ubiquitin-abhängige Aktivierung von TAK1 den IKK-Kinase-Komplex aktiviert und damit zur vollen NF- κ B-Aktivierung beiträgt (119, 120, 228). Zudem wird über die Aktivierung von TAK1 auch die Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen und damit des Transkriptionsfaktors AP-1 bewirkt (120, 276). Ob TAK1 auch für die RIP1-abhängige NF- κ B-Aktivierung benötigt wird, ist unklar.

Die Aktivierung von IRF3 und IRF7 nach Stimulation des TLR3 erfolgt über die beiden Kinasen TBK1 und IKK ϵ . Diese werden durch TRIF aktiviert und phosphorylieren daraufhin direkt IRF3 und IRF7 (131).

Die Detektion von Krankheitserregern über TLRs erfolgt hauptsächlich in dendritischen Zellen. Diese finden sich vor allem in den Geweben, die in Kontakt mit der Außenwelt stehen. Sie suchen nach Fremddantigenen, erkennen diese durch TLRs und werden durch deren Stimulation aktiviert und zur Zytokinproduktion und Antigenpräsentation angeregt (282). Es gibt zwei Typen von dendritischen Zellen. Konventionelle dendritische Zellen erkennen Fremdstrukturen vorrangig über TLR2, TLR3, TLR4 und TLR8. Sie produzieren daraufhin hauptsächlich IL-12, was NK-Zellen und T-Zellen zur Produktion von IFN- γ und TNF- α anregt und die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen stimuliert (101, 142). Die andere Form von dendritischen Zellen sind die plasmazytoiden dendritischen Zellen. Diese erkennen vorwiegend virale Pathogene durch Expression von TLR7 und TLR9. Nach Stimulation produzieren diese Zellen große Mengen an IFN- α und auch INF- β (131). Sie sind damit maßgeblich an der Etablierung des antiviralen Status in anderen Zellen beteiligt, was im Abschnitt über das Interferonsystem noch genauer besprochen wird. Beide Arten von dendritischen Zellen spielen aufgrund ihrer prominenten Rolle bei der Induktion der Interferonproduktion und der Aktivierung von NK- und T-Zellen eine wichtige Rolle bei der Abwehr einer CMV-Infektion (142). Die Detektion von CMV erfolgt hierbei hauptsächlich über Bindung von unmethylierten CpG-DNA-Motiven an TLR9 (62, 142) und vermutlich von doppelsträngiger RNA an TLR3 (256). Zudem erfolgt schon beim Eintritt von HCMV eine Erkennung der Glykoproteine gB und gH über TLR2 (22, 23, 53, 255). Die über TLR2 ausgelöste proinflammatorische Immunantwort ist auch in vivo relevant und an der Abwehr einer MCMV-Infektion über eine verstärkte Aktivierung von NK-Zellen beteiligt (255).

1.2.1.2 Zytoplasmatische Sensoren

Die Detektion von aktiv replizierenden Viren im Zytoplasma erfolgt unter anderem durch die RNA-Helikasen RIG-I (Retinoic acid inducible gene-I) und Mda5 (Melanoma differentiation-associated gene 5), die dsRNA binden (293). Beide haben einen ähnlichen Aufbau, sie haben in ihrem N-terminalen Teil zwei Caspase-Rekrutierungsdomänen (CARD) und im C-terminalen Teil eine ATP-abhängige DExD/H-Box-RNA-Helikase-Domäne. Über die RNA-Helikase-Domänen erfolgt die Bindung von dsRNA. Die Aktivierung erfolgt in beiden Fällen vermutlich durch die Ligandenbindungs-abhängige Freisetzung der CARD-Domänen (129). Über diese CARD-Domäne interagieren RIG-I und Mda5 mit IPS-1 (interferon- β promotor stimulator 1) (auch Cardif, MAVS oder VISA genannt), einem Adapterprotein, welches in der äußeren Mitochondrienmembran gebunden ist und ebenfalls über eine CARD-Domäne verfügt (132, 183, 238, 289). IPS-1 wiederum rekrutiert weitere Signalmoleküle, die zur Aktivierung von NF- κ B und IRF3/IRF7 führen. Die Aktivierung von NF- κ B erfolgt vermutlich über die Assoziation von IPS-1 mit RIP1 und FADD (Fas-associated death domain protein) über eine C-terminale Effektor-domäne (15, 132). Diese Bindung führt über die Aktivierung des IKK-Kinase-Komplexes zur NF- κ B-Aktivierung (132). Allerdings ist die Beteiligung von RIP1 in der IPS-1-vermittelten NF- κ B-Aktivierung umstritten, es gibt auch Hinweise, dass diese Aktivierung abhängig von TRAF6 ist, welches ebenfalls an IPS-1 bindet (289). Für die Aktivierung von IRF3 und IRF7 interagiert IPS-1 mit TRAF3, welches daraufhin die IRF3/7-Kinasen TBK1 und IKK ϵ rekrutiert und aktiviert (222).

Die einzelnen Signalwege der zytoplasmatischen und membrangebundenen Sensoren unterscheiden sich unter anderem in der Nutzung verschiedener Adapterproteine, aber die bisher bekannten Signalwege vereinigen sich alle in der Aktivierung des IKK-Kinase-Komplexes, welcher zur Aktivierung von NF- κ B führt, sowie den Kinasen IKK ϵ und TBK1, welche die Aktivierung von IRF3 und IRF7 bewirken.

Neben der Anwesenheit fremder dsRNA kann auch die Anwesenheit fremder DNA im Zytoplasma einer Zelle detektiert werden und zur Aktivierung einer antiviralen angeborenen Immunreaktion führen (113). Der hierfür zuständige Sensor ist das Protein DAI (DNA-dependent activator of IRFs), welches durch dsDNA von Viren, Bakterien und Säugetieren aktiviert wird und über einen unbekanntem Adapter eine Interferon-Antwort einleitet (259). Diese antivirale Antwort spielt offenbar bei der Abwehr von DNA-Viren eine Rolle, da es an der Interferoninduktion während einer HSV-Infektion beteiligt ist und HSV in seiner Anwesenheit schlechter repliziert (259). Ob dieser Sensor auch bei der CMV-Infektion aktiviert wird, ist noch unbekannt.

Zudem gibt es weitere zytoplasmatische Sensoren, die die Anwesenheit von Viren detektieren. Zu nennen sind hier vor allem die verschiedenen Komponenten des Interferon-induzierten antiviralen Status. Diese detektieren hauptsächlich dsRNA. Durch die Bindung

der dsRNA werden sie aktiviert, wodurch der antivirale Status ausgelöst wird (s. u.). Darüber hinaus werden die verschiedenen dsRNA-bindenden Komponenten des Interferonsystems als Sensoren bei der virusinduzierten Auslösung des programmierten Zelltodes diskutiert.

1.2.2 Zelluläre Immunität

Die zelluläre Immunität ist ein wichtiger Aspekt der angeborenen Immunabwehr und basiert auf der Funktion verschiedener Zelltypen. Die dendritischen Zellen wurden hinsichtlich ihrer Rolle bei der Detektion von Fremdstrukturen schon besprochen. Sie sind durch Zytokinsekretion und Expression kostimulatorischer Rezeptoren auch an der Aktivierung anderer Immunzellen beteiligt. So tragen beispielsweise das von dendritischen Zellen produzierte IL-12 und Interferon zur vollen Aktivierung von natürlichen Killer-Zellen bei.

Die natürlichen Killer-Zellen wiederum spielen eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunität aufgrund ihrer Fähigkeit, virusinfizierte Zellen oder Tumorzellen abzutöten. Die Erkennung dieser Zellen erfolgt hierbei über das sogenannte „Missing Self“, das heißt eine besonders niedrige Expression des Oberflächenmarkers MHC I, welcher normalerweise der Antigenpräsentation gegenüber CD8⁺-T-Zellen dient, bei NK-Zellen aber als inhibitorischer Rezeptor fungiert. In Tumorzellen oder virusinfizierten Zellen ist MHC I oftmals herunterreguliert, was als ein Schutz gegenüber der Lyse durch CD8⁺-T-Zellen angesehen wird. Als evolutionäre Adaptation hierauf sind die NK-Zellen entstanden, welche alle Zellen mit besonders wenig MHC I als verdächtig erkennen und abtöten können (250). An der Aktivierung der NK-Zellen ist zudem die spezifische Stimulation von aktivierenden Rezeptoren beteiligt. Ein wichtiger aktivierender Rezeptor ist z. B. Ly49H, welcher durch Bindung an das MCMV-Protein m157 auf infizierten Zellen aktiviert wird (7). Des Weiteren sind verschiedene Zytokine für die Aktivierung und die Verstärkung der zytotoxischen Wirkung der NK-Zellen verantwortlich, wie Interferone und IL-12 (142). Die Abtötung infizierter Zellen durch NK-Zellen erfolgt durch Ausschüttung von Perforin und Granzym A und B aus Granuloen, aber auch die Sezernierung von TNF- α und FasL sind an der Abtötung beteiligt (165, 250). Die Funktion der natürlichen Killer-Zellen ist, wie schon beschrieben, zentral für die Kontrolle einer CMV-Infektion. Hierfür spielen sowohl die Abtötung infizierter Zellen als auch die Produktion des antiviralen Zytokins IFN- γ eine Rolle (165).

Auch Makrophagen sind an der angeborenen Immunantwort beteiligt. Sie werden durch das von NK-Zellen produzierte IFN- γ aktiviert (209). Ihre Aufgabe ist unter anderem die phagozytische Beseitigung von Zelltrümmern und Antigen-Antikörper-Komplexen. Zudem sind Makrophagen die Hauptproduzenten von TNF- α , welches, wie in Abschnitt 1.2.3.2 besprochen, eine zentrale Rolle bei der Abwehr einer CMV-Infektion spielt.

1.2.3 Zytokin-vermittelte Effektorfunktionen der angeborenen Immunität

Ein weiterer wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunität sind lösliche Botenstoffe, wie die Zytokine und Chemokine, die von bestimmten Zellen des Immunsystems, meist abhängig von deren Aktivierung, produziert werden und dann auf andere Zellen einwirken. Die Chemokine tragen zur Virusbeseitigung bei, indem sie andere Zellen, unter anderem Makrophagen, NK-Zellen und T-Zellen, zum Ort der Infektion locken und diese aktivieren. Zusätzlich steigern sie die zytotoxische Aktivität der NK- und T-Zellen (271). Die Zytokine wiederum dienen der Kommunikation unter Immunzellen sowie zwischen Immunzellen und somatischen Zellen. Zytokine führen durch ihre regulatorische Funktion zu einer effektiven Immunantwort, indem sie ein koordiniertes Zusammenspiel der verschiedenen Komponenten des Immunsystems ermöglichen. Es sollen hier nur beispielhaft einige Zytokine erwähnt werden, die eine besondere Rolle während einer CMV-Infektion spielen.

1.2.3.1 Das Interferonsystem

Die Induktion, Produktion sowie die antiviralen Effektorfunktionen der Typ-1-Interferone, IFN- α und IFN- β , stellen die hauptsächlichen Komponenten des Interferonsystems dar. Das Interferonsystem ist der zentrale antivirale Abwehrmechanismus der angeborenen Immunität. Aufgrund seiner effektiven Wirksamkeit gegenüber vielen Virustypen haben nahezu alle Viren Strategien entwickelt, dieses Abwehrsystem auf verschiedenen Ebenen zu inhibieren. Auch bei der Kontrolle einer CMV-Infektion ist das Interferonsystem neben der zellulären Immunantwort von essentieller Bedeutung (187).

Die Induktion der Typ-1-Interferone, IFN- α und IFN- β , erfolgt durch Erkennung von Virusbestandteilen oder viraler Replikation über TLRs und zytoplasmatische Sensoren wie den RNA-Helikasen (s. o.). In somatischen Zellen und konventionellen dendritischen Zellen führt die Erkennung über RNA-Helikasen und TLR3 zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1, NF- κ B und IRF-3 und somit zur Synthese von IFN- β . In der Amplifikationsphase der Interferonantwort führt die IFN- β Einwirkung zur Hochregulation der Expression des Transkriptionsfaktors IRF-7, dem Hauptregulator der Interferonproduktion, welcher in diesen Zellen normalerweise nicht exprimiert wird (106). Dies führt zur Verstärkung der Interferon- β Produktion und zusätzlich zur Synthese von IFN- α , dessen Expression erst durch eine Kombination der Transkriptionsfaktoren IRF-3 und IRF-7 ermöglicht wird. Die plasmazytoiden dendritischen Zellen exprimieren konstitutiv IRF-7 und sind daher nach Induktion direkt in der Lage, große Mengen an IFN- α und IFN- β zu sezernieren und werden daher auch als natürliche Interferon-produzierende Zellen bezeichnet (131). Sie detektieren Viren vorwiegend mit den endosomal lokalisierten TLRs TLR7, TLR8 und TLR9. Nach der Bildung und Sezernierung von IFN- α und IFN- β kann dies sowohl autokrine als auch parakrine Effekte ausüben.

Über die Bindung von IFN- α und IFN- β an den Typ-1-Interferon-Rezeptor (IFNAR) kommt es durch den sogenannten JAK-STAT-Signalweg zur Aktivierung der latenten zytosolischen Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT2 (137). Dies erfolgt durch Phosphorylierung von STAT1 und STAT2 durch die Januskinasen JAK-1 und Tyk2. Aktiviertes STAT1 und STAT2 bilden zusammen mit IRF9 einen Komplex, welcher im Zellkern an die sogenannten ISRE-Elemente (interferon stimulated response element) im Promotorbereich der Interferon-stimulierten Gene (ISGs) bindet und so deren Transkription ermöglicht (213). Die mehreren Hundert ISGs unterteilen sich in Gene mit direkter antiviraler Wirkung und andere Gene, die wie zum Beispiel der Transkriptionsfaktor IRF7 und die Sensoren für Virusinfektion (TLRs und RNA-Helikasen) zur Verstärkung der Interferonantwort beitragen. Unter den Genen mit direkter antiviraler Wirkung sind vor allem drei funktionell gut charakterisiert: Die dsRNA-regulierte Proteinkinase oder Proteinkinase R (PKR), das OAS/RNaseL-System und die Mx Proteine. Die Mx Proteine haben eine sehr potente Wirkung gegen Orthomyxoviren und Bunyaviren. Sie gehören zur Klasse der Dynamin-artigen großen GTPasen und inhibieren einen frühen Schritt im viralen Replikationszyklus, indem sie nukleokapsidartige Strukturen erkennen und mit deren intrazellulärem Transport interferieren, so dass diese nicht zur Generation neuer Viruspartikel zur Verfügung stehen (205).

Die Proteinkinase R und die Oligoadenylatsynthetase liegen zunächst als inaktive Enzyme im Zytoplasma vor. Ihre Aktivierung erfolgt erst, wenn die durch Interferon-Wirkung vorgewarnte Zelle von einem Virus infiziert wird und es daraufhin zum Auftreten von dsRNA im Zytoplasma kommt. Die dsRNA tritt bei fast allen RNA- und DNA-Viren als Genombestandteil, Replikationsintermediat oder durch die Transkription gegenläufig kodierter, überlappender Gene auf (280). Die Bindung der dsRNA an PKR und OAS bewirkt deren Aktivierung. Die PKR ist eine Serin-Threonin-Proteinkinase, welche die virale Proteinsynthese durch die Phosphorylierung der eIF2 α -Untereinheit des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktors inhibiert. Die Bildung von Oligoadenylaten durch die Oligoadenylatsynthetase führt zur Aktivierung der RNaseL, welche daraufhin den selektiven Abbau einzelsträngiger RNAs bewirkt und so zur Inhibition der Proteinsynthese beiträgt (213).

1.2.3.2 Das proinflammatorische Zytokin TNF- α

TNF- α ist ein pleiotropes Zytokin. Es ist in der Lage, verschiedene biologische Effekte auszulösen, die sich je nach zellulärem Kontext unterscheiden.

So können durch TNF- α verschiedene Signalwege initiiert werden (NF- κ B-Aktivierung, Aktivierung von MAPK, Apoptoseinduktion oder Caspase-unabhängiger Zelltod), die sehr unterschiedliche Auswirkungen auf die Zelle haben, wie Zelltod, Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Ausschüttung anderer Zytokine und Aktivierung antiviraler Funktionen

(18). Dass die betroffenen Zellen immer angemessen auf die TNF- α -Stimulation reagieren, wird unter anderem durch die Expression inhibitorischer Proteine für den einen oder den anderen Signalweg, die Blockierung bestimmter Komponenten eines Signalweges, durch die Menge an vorhandenen reaktiven Sauerstoffintermediaten und anderen zum Teil noch unbekanntem Faktoren reguliert (127, 159, 169, 234, 267).

Die vorwiegende Reaktion von Zellen auf TNF- α ist die Aktivierung von NF- κ B. Zudem werden parallel hierzu verschiedene Mitogen-aktivierte Proteinkinasen vorübergehend aktiviert. Daraus resultiert dann auch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1.

Der Auslösung der Apoptose wird unter physiologischen Bedingungen in der Regel durch die vorherige Aktivierung von NF- κ B und der damit verbundenen transkriptionellen Aktivierung zahlreicher antiapoptotischer Proteine vorgebeugt (244, 266). Wenn die Zellen hingegen mit einem Virus infiziert oder auf andere Art gestresst sind, kann die Einwirkung von TNF- α auch durch verschiedene Signalwege zum Tod der betroffenen Zelle führen, was eine prominente antivirale Funktion des TNF- α darstellt. Zudem hat die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B weitere direkte antivirale Funktionen und trägt zur transkriptionellen Aktivierung des IFN- β Promotors bei (Abschnitt 1.2.3.2.1-1.2.3.2.4).

Das proinflammatorische Zytokin TNF- α ist maßgeblich an Entzündungsreaktionen beteiligt. TNF- α wird hauptsächlich von Makrophagen gebildet, seine Sezernierung erfolgt nach Stimulation z.B. durch LPS und IL-1. Aber auch Lymphozyten und Endothelzellen können TNF- α sezernieren (274). TNF- α rekrutiert andere Immunzellen und aktiviert die Phagozytose von Makrophagen (208). Wenn es auf Endothelzellen einwirkt, führt es zur Hochregulation von Adhäsionsmolekülen, so dass es Immunzellen aus dem Blut erleichtert wird, an die Endothelzellen der Gefäßwand anzuheften und in das umliegende Gewebe einzuwandern.

TNF- α ist ein wichtiges Zytokin bei der Abwehr einer Cytomegalovirusinfektion (202). Als Schlüssel-Zytokin bei der lokalen inflammatorischen Immunantwort spielt es eine zentrale Rolle bei der Rekrutierung von NK-Zellen, sowie anderen Immunzellen, die zur Abwehr viraler Infektionen benötigt werden. Zusammen mit IFN- γ hat TNF- α eine starke antivirale Wirkung (286), vor allem auch gegenüber Cytomegaloviren (167, 202).

TNF- α kann seine Wirkung auf Zielzellen durch Bindung an zwei verschiedene Rezeptoren ausüben. Dies sind der TNF-Rezeptor 1 (TNFR1) oder auch p55 TNF-Rezeptor und der TNF-Rezeptor 2 (TNFR2) oder auch p75 TNF-Rezeptor. Für die meisten biologischen Effekte ist der TNFR1 verantwortlich, dessen Signalwege auch am besten untersucht sind (274). Die beiden Rezeptoren unterscheiden sich darin, dass TNFR1 eine intrazelluläre Todesdomäne aufweist und damit zu den Todesrezeptoren zählt, wohingegen TNFR2 diese Domäne nicht hat und daher vermutlich auch nicht direkt zur Initiation von Apoptose in der Lage ist. TNFR2 besitzt hingegen ein intrazelluläres TRAF-Bindungsmotiv, über das unter

anderem verschiedene TRAFs (TNF Receptor Associated Factors), wie TRAF2 gebunden werden, welche für die Signaltransduktion von TNFR2 essentiell sind (87).

Die initialen Schritte der Rezeptorbindung und Rekrutierung von Adapterproteinen sind bei allen von dem TNFR1 ausgelösten biologischen Prozessen ähnlich.

Der TNFR1 liegt in der Membran als Trimer vor. Dies ist auf die Funktion der PLAD (preligand assembly domain) zurückzuführen, welche zur Selbstassoziation von TNFR1 Homotrimeren führt, was Voraussetzung für die Bindung eines Liganden ist (39). Die Bindung von TNF- α bewirkt dann vermutlich durch eine Konformationsänderung das Zusammenrücken der drei intrazellulären Todesdomänen, woraufhin verschiedene Adapterproteine rekrutiert werden (45, 274). TRADD (TNF receptor associated death domain protein) und RIP1 werden über die Wechselwirkung zwischen Todesdomänen rekrutiert (107). Hierbei konkurrieren TRADD und RIP1 offensichtlich um die Bindung an den TNFR1 (296). RIP1 kann durch eine eigene Todesdomäne sowohl direkt an TNFR1 binden, aber es wird vermutet, dass die Bindung über die Todesdomäne von TRADD abläuft (107). RIP1 kann auch indirekt über TRAF2 an den TNFR2 binden (235). TRAF2 wird über TRADD zum TNFR1 rekrutiert, die Bindung erfolgt über die C-terminale TRAF-Domäne an die N-terminale Todesdomäne von TRADD (274). Zudem ist TRADD essentiell für die Bindung von FADD (94) (siehe Abschnitt 1.2.3.2.2 „Apoptoseinduktion“) (257).

Es zeigte sich, dass TRADD und RIP1 sowie TRAF2 für die Aktivierung von NF- κ B benötigt werden (108). TRADD ist wiederum zusammen mit FADD und Caspase-8 für die Initiation der Apoptose zuständig (94, 108), wohingegen allein RIP1 für die Einleitung des Caspase-unabhängigen Zelltodes verantwortlich ist (160).

1.2.3.2.1 Aktivierung von NF- κ B

Für die Aktivierung von NF- κ B werden die Adapterproteine RIP1 und TRAF2 benötigt (133, 257). Nach Rezeptorstimulation wird RIP1 vermutlich durch die E3-Ubiquitin-Ligase Funktion von TRAF2 ubiquitiniert (283). Die Ubiquitinmoleküle sind hierbei durch das Lysin 63 (K63) miteinander verknüpft. Diese Form der Ubiquitinierung führt nicht wie die Lysin-48-Ubiquitinierung zur proteasomalen Degradierung von Proteinen, sondern ist wichtig für die Regulation von Signalwegen in der Zelle (140). Die K63-Ubiquitinierung von RIP1 ist essentiell für die NF- κ B-Aktivierung durch TNF- α (157) und kann in diesem Fall als Liganden-induzierte Aktivierung betrachtet werden. Vermutlich ermöglicht diese Form der Ubiquitinierung die Bildung eines Signalkomplexes, der letztendlich zur Aktivierung von NF- κ B führt (140, 211). Hierfür wird zunächst die Kinase TAK1 (TGF-beta activated kinase 1) aktiviert, welche anschließend die Kinase IKK β phosphoryliert (66). Diese liegt in einem Komplex mit IKK α und IKK γ (NEMO) vor. Durch die Phosphorylierung wird dieser Kinase-Komplex aktiviert und phosphoryliert anschließend I κ B, den Inhibitor von NF- κ B. Dieser

Inhibitor, der NF- κ B normalerweise inaktiv im Zytoplasma sequestriert, wird daraufhin ubiquitiniert und degradiert, wodurch NF- κ B freigesetzt wird und in den Zellkern gelangen kann. Es wurde gezeigt, dass sowohl NEMO, die regulatorische Untereinheit des Kinase-Komplexes, als auch TAB2 und TAB3, zwei an TAK1 gebundene Antennenproteine, in der Lage sind, an K63-ubiquitiniertes RIP1 zu binden (66). Hierdurch kommt es nach derzeitigem Kenntnisstand zur Ausbildung des Signalkomplexes, so dass die einzelnen Proteine miteinander kooperieren können (44, 66).

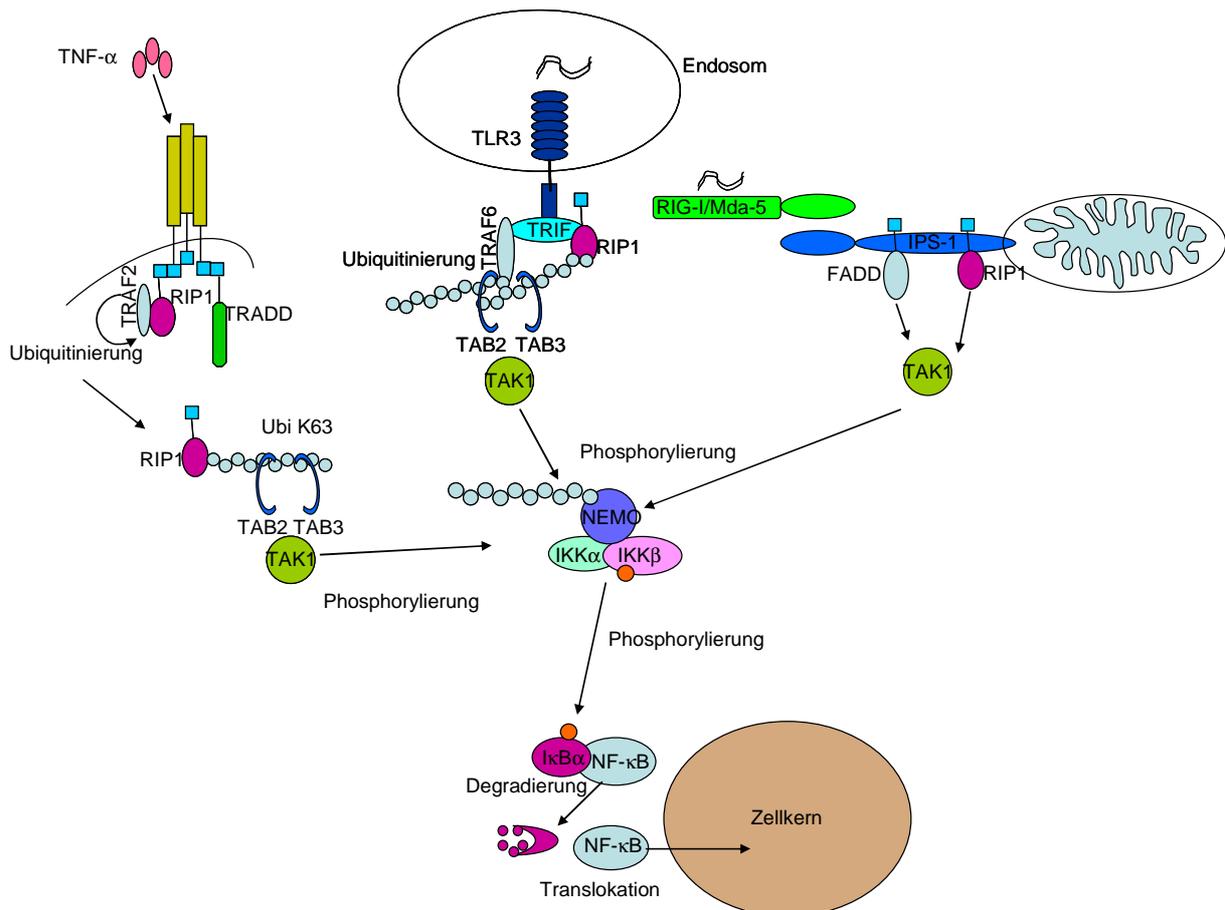


Abbildung 4: NF- κ B-Aktivierung durch verschiedene Stimuli

Die Abbildung zeigt die Signalwege des TNFR1, des TLR3 und der RNA-Helikasen RIG-I und Mda5, die zur Aktivierung von NF- κ B führen. (120, 182)

Die NF- κ B-Aktivierung durch TNF- α -Wirkung weist Parallelen auf zur TLR3- und RIG-I/Mda5-induzierten NF- κ B-Aktivierung. In allen drei Signalwegen ist RIP1 als Adapterprotein beteiligt (182), bei TNF- α - und TLR3-Stimulation erfolgt eine TRAF-abhängige K63-Ubiquitinierung von RIP1, welche der Ausbildung des Signalkomplexes dient, und die Aktivierung der Kinase TAK1 führt zur Phosphorylierung des IKK-Kinase-Komplexes (276). In dieser TAK1-vermittelten Aktivierung des IKK-Kinase-Komplexes durch Phosphorylierung vereinigen sich die drei Signalwege.

1.2.3.2.2 Apoptoseinduktion

Bei dem TNFR1 wird die Signalübertragung des selbstassoziierten Rezeptors durch das Protein SODD (Silencer of Death Domain) verhindert (118). Nach der Bindung von TNF- α an den Rezeptor dissoziiert dieses Protein von der Todesdomäne, so wird eine Rekrutierung von TRADD ermöglicht, welches über homotypische Interaktion der Todesdomänen an den intrazellulären Teil des TNFR1 bindet. Bei der TNF- α -vermittelten Apoptoseinitiation kommt es nacheinander zu der Bildung von zwei verschiedenen Signalkomplexen (185, 241). Der Komplex 1, bestehend aus TNFR1, TRADD, RIP1 und TRAF2, bildet sich an der Zytoplasmamembran (233). Anschließend lösen sich TRADD und RIP1 aus diesem Komplex und bilden zusammen mit FADD und Procaspase-8 im Zytoplasma den Komplex 2. Die Interaktion zwischen TRADD und FADD erfolgt wiederum über homotypische Interaktionen der Todesdomänen, wohingegen FADD und Procaspase-8 über die Todeseffektordomänen interagieren (177). In diesem Komplex kommt es zur autokatalytischen Aktivierung von Caspase-8 durch Abspaltung der Prodomäne (177). Nach der Aktivierung von Caspase-8 kann diese Caspase-3 aktivieren und damit zur Effektorphase der Apoptose führen (s. u.).

Die Apoptoseauslösung durch TNF- α unterliegt einer besonders starken Kontrolle durch die antiapoptotische Wirkung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (266). Durch den Komplex 1, bestehend aus TRADD, TRAF2 und RIP1, kommt es zu einer sehr starken Aktivierung von NF- κ B, was unter anderem durch die Bildung des zellulären Caspase-8 Inhibitors cFLIP (cellular FLICE (=Caspase-8) inhibitory protein) und anderen antiapoptotischen Proteinen der Einleitung der Apoptose entgegenwirkt. Wenn ausreichende Mengen cFLIP an FADD im Komplex 2 gebunden sind, so wirkt dies einer Rekrutierung und Aktivierung von Caspase-8 entgegen, so dass die Initiation der Apoptose verhindert wird (266).

1.2.3.2.3 Caspase-unabhängiger Zelltod

Abhängig vom Status der Zelle kann die Stimulation von Todesrezeptoren wie dem TNFR1 auf mindestens zwei Wegen zur Induktion von Zelltod führen, nämlich durch die oben beschriebene Induktion der Apoptose sowie dem Caspase-unabhängigen Zelltod. Die Einleitung des Caspase-unabhängigen Zelltodes erfolgt bei Inhibition der Caspase-8-Aktivierung und für die Induktion ist das Adaptermolekül RIP1 essentiell (Abschnitt 1.2.4.2.2).

1.2.3.2.4 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen

Die Aktivierung von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen, p38, JNK (c-Jun N-terminale Kinase) (274) und ERK (extracellular signal regulated kinase) bei Stimulation des TNFR1 erfolgt über TRAF2 und RIP1 (63, 105, 219). TRAF2 ist in der Lage, verschiedene MAP3K zu rekrutieren, wie die ASK1 (apoptosis signal regulating kinase), GCK (germinal center kinase), MEKK1 (mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1) und TAK1. Für die JNK-

Aktivierung interagiert TRAF2 vermutlich mit ASK1 (195). Es ist auch möglich, dass die Aktivierung über GCK oder MEKK1 erfolgt (38). Die Aktivierung von p38 basiert vermutlich auf einer RIP1-abhängigen Rekrutierung von MEKK3 (151). Wie es durch TNF- α -Stimulation zu einer Aktivierung von ERK1 und ERK2 kommt, ist nicht endgültig geklärt.

1.2.4 Zellintrinsische Funktionen der angeborenen Immunität

1.2.4.1 Direkte antivirale Funktionen

Zu den zellintrinsischen antiviralen Abwehrmechanismen gehören zum einen Proteine, die spezielle Schritte im viralen Replikationszyklus direkt inhibieren, so dass eine Produktion von Nachkommenviren nicht erfolgen kann. Da diese Mechanismen aufgrund unvollständiger Spezifität auch schädliche Auswirkungen auf zelluläre Funktionen haben können, ist die Expression dieser Proteine häufig strikt reguliert, sie müssen zum Beispiel erst durch Interferon-Wirkung induziert werden. Zum anderen kommt es erst zu einer Aktivierung dieser Enzyme, wenn tatsächlich eine virale Infektion vorliegt, was durch die Erkennung von dsRNA oder anderen viralen Komponenten bewerkstelligt wird. Zu dieser Art von Abwehrmechanismen gehören die oben besprochenen Komponenten des Interferonsystems. Ein weiterer intrinsischer Abwehrmechanismus blockiert die Replikation von HCMV. Das zelluläre Protein Daxx, welches in ND10-Domänen, den Orten viraler Replikation, vorliegt, unterdrückt die Transkription des HCMV Major-Immediate-Early-Promotors durch Rekrutierung von Histon-Deacetylasen. Dies würde zur Inhibition der viralen Replikation führen, wenn nicht das virale Protein pp71 dieser Blockierung durch spezifische proteasomale Degradierung von Daxx entgegenwirken würde (221).

1.2.4.2 Zelltod als Effektormechanismus mit indirekter antiviraler Wirkung

Eine weitere Komponente der intrinsischen Abwehr beeinflusst nicht direkt die virale Replikation, sondern verhindert die Virusvermehrung indirekt durch die Auslösung des programmierten Zelltodes in infizierten Zellen.

Der programmierte Zelltod ist eine wichtige Abwehrstrategie vielzelliger Organismen, um sich unerwünschter Zellen zu entledigen. Dies können zum einen beschädigte Zellen sein, die potentiell zu Krebszellen entarten könnten, auf der anderen Seite kann es sich dabei auch um infizierte Zellen handeln. Durch unterschiedliche Mechanismen ist es möglich, eine Schädigung oder eine Infektion zu erkennen und die betroffene Zelle zu eliminieren, bevor größerer Schaden am Gesamtorganismus entstehen könnte. Die geschädigte Zelle wird hierdurch daran gehindert, zu einer Krebszelle zu entarten. Die infizierte Zelle wird daran gehindert, Nachkommenviren zu produzieren, so dass sich die Infektion nicht auf andere Zellen ausbreiten kann.

Die Auslösung des Zelltodes kann entweder durch die Wirkung von zytotoxischen T-Zellen oder NK-Zellen von außen induziert sein (z. B. TNF- α und FasL) (siehe Abschnitt 1.2.2 „Zelluläre Immunität“ und 1.2.3.2 „Das proinflammatorische Zytokin TNF- α “), oder sie kann durch verschiedene intrinsische Signale ausgelöst werden.

Die Auslösung des Zelltodes über intrinsische Signale erfolgt beispielsweise durch die Erkennung einer Virusinfektion. Dies resultiert entweder direkt aus der Detektion viraler Komponenten, wie z. B. dsRNA (127). Als Detektionssystem fungieren hier die oben schon genannten antiviralen Komponenten des Interferonsystems, wie PKR oder RNaseL, die bei zu starker oder zu langer Aktivierung zur Auslösung des programmierten Zelltodes führen können (13, 14, 36, 81, 82). Zum anderen kann unter bestimmten Umständen (wie Interferonwirkung) die Stimulation von Toll-like Rezeptoren auch zur Induktion des Zelltodes führen (74, 224).

Andererseits kann die virale Infektion einer Zelle auch dadurch erkannt werden, dass die Virusreplikation zu massiven Störungen in zellulären Abläufen führt. Hierzu gehört z. B. die Induktion des Zelltodes durch ER-Stress (287, 288), da Virusvermehrung oft zu einer starken Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen im ER führt. Des Weiteren kann die Replikation von DNA-Viren im Zellkern in der Aktivierung des „DNA-damage-response“ resultieren, da die freien Enden der viralen Genome als dsDNA-Brüche erkannt werden (80, 168). Auch die Aktivierung des „DNA-damage-response“ kann dann zur Auslösung des Zelltodes führen.

Es gibt verschiedene Formen von programmiertem Zelltod; die Apoptose, den Caspase-unabhängigen programmierten Zelltod, sowie eine Sonderform der Autophagie (68, 76, 121, 134). Die drei Arten von Zelltod sollen in den nächsten Absätzen genauer besprochen werden.

1.2.4.2.1 Apoptose

Die Apoptose ist die bekannteste Form des programmierten Zelltodes. Sie wurde früher unterschieden von Nekrose, welche eher als unbeabsichtigter Zelltod in Folge plötzlicher irreparabler Schädigung der Zelle auftritt und daher als von außen ausgelöst angesehen wurde. Die Apoptose hingegen wird als energieabhängiger Prozess, welcher auf regulierten, genetisch festgelegten Signalprozessen beruht, als geordnete Form des Zelltods beschrieben. Der apoptotische Zelltod spielt eine wichtige Rolle für den Organismus. So ist er essentiell für die Beseitigung überschüssiger Zellen während der embryonalen Entwicklung, für die Aufrechterhaltung der Gewebehomöostase, sowie der Beseitigung von infizierten oder geschädigten Zellen. Die Induktion der Apoptose ist durch zahlreiche Kontrollmechanismen strikt reguliert, da eine fehlerhafte Einleitung des programmierten Zelltodes, d. h. eine unangemessene oder fehlende Auslösung der Apoptose, schwerwiegende Folgen für den Organismus haben kann, wie Entwicklungsstörungen,

Autoimmun-Erkrankungen, Neurodegeneration und Krebsentstehung. Die Apoptose kann durch bestimmte morphologische Charakteristika von anderen Arten des Zelltodes abgegrenzt werden, nämlich durch die Abschnürung kleinster Membranvesikel von der Zytoplasmamembran (Apoptose-Körperchen), Schrumpfen der Zelle, Kondensierung des Chromatins und schließlich durch die Fragmentierung der DNA (121). Die Initiation der Apoptose kann in zwei wesentliche Signalwege unterteilt werden, den extrinsischen Weg oder auch Todesrezeptor-vermittelten Weg und den intrinsischen oder auch mitochondrialen Weg (121, 134).

Der extrinsische Weg wird von außen ausgelöst, zum Beispiel durch die Wirkung von Immunzellen. Hierbei erfolgt die Initiation der Apoptose durch die Bindung bestimmter Liganden, die zur Familie der TNF-Liganden gehören, an Rezeptoren auf der Zelloberfläche, die als Todesrezeptoren bezeichnet werden und zur Familie der TNF-Rezeptoren gehören. Zur Gruppe der Todesrezeptoren gehören der TNF-Rezeptor 1, die TRAIL-Rezeptoren (TNF-related apoptosis inducing ligand) DR4 und DR5 (auch Apo2-Rezeptoren) sowie Fas (Apo1-Rezeptor, CD95) (121). Todesrezeptoren sind Typ-1-Transmembranrezeptoren und zeichnen sich durch eine Cystein-reiche extrazelluläre Domäne, die die Ligandenbindung vermittelt, sowie eine intrazelluläre Todesdomäne, über die Signalmoleküle rekrutiert werden, aus. Die Bindung der jeweiligen Liganden, TNF- α , TRAIL (Apo2L) und FasL (Apo1L) induziert die Bildung eines Multiproteinkomplexes durch Rekrutierung verschiedener Adaptermoleküle. Dieser Komplex wird als DISC (death inducing signalling complex) bezeichnet (121). Beim TNF- α -vermittelten Signalweg kommt es über das Adapterprotein TRADD indirekt, bei den anderen Todesrezeptoren direkt zur Rekrutierung des Adapterproteins FADD (94). Die Rekrutierung erfolgt über homotypische Interaktionen der Todesdomänen der beteiligten Proteine. Anschließend kommt es durch Interaktion der Todeseffektordomänen (Death effector domain, DED) von FADD und Caspase-8 zur Rekrutierung von Caspase-8, welche in diesem Komplex autokatalytisch aktiviert wird (177). Nach der Aktivierung von Caspase-8 kann diese Caspase-3 aktivieren und damit zur Effektorphase der Apoptose überleiten (71). Diese direkte Aktivierung der Effektorcaspase Caspase-3 erfolgt nur in sogenannten Typ-1-Zellen, welche meist Lymphozyten sind, so effektiv, dass dies zur Einleitung der Apoptose führt. In allen anderen Zellen (Typ-2-Zellen) bedarf es einer Verstärkung des ursprünglichen Signals der aktivierten Caspase-8 über die Spaltung des proapoptotischen BH3-only Proteins Bid in seine verkürzte Form tBid, welches daraufhin über den intrinsischen Weg zur Auslösung der Apoptose führt (134, 229, 230).

Der intrinsische Apoptoseweg wird durch intrazelluläre Signale ausgelöst, wie zum Beispiel starke Schädigung der DNA, die Detektion von Virusreplikation oder ER-Stress. Eine zentrale Rolle bei dem intrinsischen Weg spielen die Mitochondrien sowie die pro- und antiapoptotischen Mitglieder der Bcl2-Proteinfamilie. Prinzipiell kann gesagt werden, dass die

Regulation des intrinsischen Weges auf dem Gleichgewicht zwischen pro- und anti-apoptotischen Mitgliedern der Bcl2-Familie beruht (121). Die bekanntesten Mitglieder dieser Familie mit antiapoptotischer Funktion sind die zellulären Proteine Bcl2 und BclXL, welche sich durch das Vorhandensein aller vier Bcl2-Homologie-Domänen (BH1 bis BH4) auszeichnen. Diese üben ihre antiapoptotische Funktion durch Interaktion mit den proapoptotischen Mitgliedern der Bcl2-Familie aus. Zu den proapoptotischen Mitgliedern gehören vor allem die Proteine Bax und Bak, welche die drei BH-Domänen 1-3 aufweisen und die Proteine der BH3-only-Subfamilie, zu der unter anderem Bid, PUMA und NOXA gehören. Die proapoptotischen Mitglieder der BH3-only-Subfamilie können durch verschiedene apoptotische Stimuli transkriptionell hochreguliert werden. Sie dienen als zytoplasmatische Sensoren von zellulärem Stress oder Beschädigung und sind in der Lage, Bax und Bak zu aktivieren (121). Das zytoplasmatische Protein Bax wird nach Aktivierung in die äußere Mitochondrienmembran eingelagert, wo es mit Bak assoziiert, was zur Permeabilisierung dieser Membran führt. Dabei werden Cytochrom C und andere proapoptotische Faktoren aus dem Intermembran-Raum in das Zytoplasma entlassen. Das ausgeschüttete Cytochrom C bildet mit den zytoplasmatischen Proteinen Apaf-1 (Apoptotic Protease activating factor 1) und Caspase-9 in Abhängigkeit von Energie einen Multiproteinkomplex, das Apoptosom. In diesem Komplex kommt es durch Dimerisierung zu einer Aktivierung von Caspase-9, welche daraufhin durch Spaltung der Effektorcaspase Caspase-3 die Effektorphase der Apoptose einleitet (71).

Die Effektorphase der Apoptose beginnt mit der Aktivierung der Effektorcaspasen Caspase-3, -6 und -7. Sie sind hauptsächlich für die Spaltung zellulärer Substrate zuständig, was letztendlich zu den morphologischen Veränderungen führt, die mit dem apoptotischen Zelltod einhergehen (71). Die zellulären Substrate der Effektorcaspasen sind sehr vielfältig und können in verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Zu den strukturellen Proteinen gehören u.a. Fodrin und Gelsolin, deren Spaltung zur Zerstörung des Aktin-Zytoskeletts beitragen, was Veränderung der Zellform und Ablösung vom Substrat zur Folge hat. Zudem werden nukleäre Lamine gespalten, was zur Schrumpfung und Auflösung des Zellkerns führt (121).

Es werden ebenfalls verschiedene Proteine der zellulären DNA-Reparatur gespalten, wie zum Beispiel die poly(ADP-ribose)-Polymerase (PARP). Auch verschiedene antiapoptotische Proteine werden im Verlauf der Apoptoseexekution gespalten, u.a. Bcl2, BclXL, IAPs und FLIP_L. Außerdem werden verschiedene Proteinkinasen gespalten u.a. RIP1, dessen Spaltung zur selektiven Unterdrückung des Caspase-unabhängigen Zelltodes und der Autophagie beiträgt, da deren Induktion von RIP1 abhängig ist (Abschnitt 1.2.4.2.2 „Caspase-unabhängiger Zelltod oder programmierte Nekrose“ und Abschnitt 1.2.4.2.3 „Autophagie“) (121). Dies führt dazu, dass die Apoptose in den meisten Zellen der vorwiegende Zelltodmechanismus ist (162).

Letztendlich wird die betroffene Zelle sowie ihre DNA in ihre Einzelteile zerlegt. Die Abbauprodukte werden in Membran-umhüllten Vesikeln von der Zelle abgeschnürt, den sogenannten Apoptose-Körperchen. Die apoptotischen Zellen werden von Makrophagen phagozytotisch beseitigt, ohne dass es zur Einleitung einer Entzündungsreaktion kommt, so dass Schaden an benachbartem Gewebe vermieden wird (76).

Die Einleitung wie auch die Ausübung der Apoptose beruhen auf der Funktion spezieller Proteasen, der Caspasen. Der Begriff Caspase leitet sich von „cysteiny-l-aspartate **s**pecific prote**a**se“ ab und beschreibt deren Funktion als Cysteinproteasen, welche das Substrat nach einem Aspartatrest spalten. Die Caspasen können in zwei Gruppen eingeteilt werden, die Initiatorcaspasen, die an der Einleitung des programmierten Zelltodes beteiligt sind und die Effektorcaspasen, welche für die Ausführung der Apoptose zuständig sind.

Tabelle 2: Effektor- und Initiatorcaspasen und ihre Funktionen
(71, 243)

Einteilung	Caspase	Funktion
Initiator-Caspasen	Caspase-8	enthält 2 DED, aktiviert durch Todesrezeptoren (DISC), spaltet Caspase-3 und Bid
	Caspase-10	enthält 2 DED, aktiviert durch Todesrezeptoren (DISC), spaltet Caspase-3 und Bid (186, 277)
	Caspase-2	enthält CARD, aktiviert durch DNA-Schädigung oder Todesrezeptoren, spaltet Bid, wirkt direkt auf Mitochondrien, so dass Cytochrom C und andere proapoptotische Faktoren entlassen werden (90, 218, 272, 297)
	Caspase-9	enthält CARD, aktiviert durch Apoptosom-Bildung, spaltet Caspase-3 und -7
Effektor-Caspasen	Caspase-3	wichtigste Effektorcaspase, wird aktiviert durch Caspase-8/9/10 und aktiviert wiederum Caspase-3/6/9, spaltet zelluläre Substrate
	Caspase-6	aktiviert durch Caspase-3, spaltet zelluläre Substrate
	Caspase-7	aktiviert durch Caspase-3, spaltet zelluläre Substrate

Die Aktivierung der Effektorcaspasen erfolgt durch die Abspaltung einer Prodomäne durch eine Initiatorcaspase und damit verbundener Freisetzung des katalytisch aktiven Enzyms. Die Initiatorcaspasen hingegen werden entweder durch autokatalytische Spaltung oder durch eine Konformationsänderung aktiviert. Beides beruht auf der Bildung eines Multiprotein-Komplexes, in dem mehrere Moleküle der Initiatorcaspasen in räumliche Nähe gebracht werden, was Voraussetzung für ihre Aktivierung ist (71).

Wie schon erwähnt, ist es wichtig, dass ein Prozess mit so weit reichenden Auswirkungen wie die Apoptose strikt reguliert wird, damit es nicht versehentlich unter physiologischen Bedingungen zur Auslösung des apoptotischen Zelltodes kommen kann. Die Regulation findet auf verschiedenen Ebenen statt. Die hauptsächliche Wirkung kommt hierbei wohl dem Transkriptionsfaktor NF- κ B zu (244, 266). Dieser kann durch verschiedene Faktoren aktiviert werden und führt dann zur Transkription einer Reihe verschiedener antiapoptotischer Proteine. Die meisten antiapoptotischen Proteine sind kurzlebige Proteine, die ständig von der Zelle aktiv produziert werden müssen, um die Zelle vor inadäquater Apoptoseauslösung zu schützen. So erklärt sich, wie die Zelle unter dem Einfluss von Stress, z.B. einer Virusinfektion, anfälliger für die Induktion der Apoptose wird.

1.2.4.2.2 Caspase-unabhängiger Zelltod oder programmierte Nekrose

Caspase-unabhängiger Zelltod wird aufgrund der vorliegenden Zellmorphologie auch als programmierte Nekrose bezeichnet. Im Unterschied zur Apoptose kommt es hierbei meist zum Anschwellen von Organellen, vor allem den Mitochondrien, sowie einer schnellen und irreversiblen Zerstörung der Zytoplasmamembran. Es findet hingegen keine Chromatinkondensation statt. Im Unterschied zur Apoptose wird bei dem Caspase-unabhängigen Zelltod der Inhalt der Zelle an die Umgebung abgegeben, was starke Entzündungsreaktionen hervorruft (75).

Die Eingliederung des Zelltodes in die drei verschiedenen Unterformen aufgrund der Zellmorphologie ist nicht immer zweifelsfrei möglich. Der apoptotische Zelltod weist beispielsweise oft sekundär Zeichen der Nekrose auf, zudem ist es möglich, dass in einer Zelle parallel verschiedene Zelltodprogramme ablaufen, so dass verschiedene morphologische Merkmale auftreten (32, 76).

Die Signalwege, die zur Einleitung des Caspase-unabhängigen Zelltodes führen, sind noch wenig untersucht (85). Es ist lediglich klar, dass die Serin-Threonin-Kinase RIP1 eine zentrale Rolle bei der Initiation spielt. Die Induktion des Caspase-unabhängigen Zelltodes ist sehr stark abhängig vom zellulären Kontext. Sowohl die Stimulation von Todesrezeptoren (103, 159, 261) als auch eine Stimulation von TLR3 und TLR4 (169) kann zur Auslösung des Caspase-unabhängigen Zelltodes führen, wenn die Initiation oder Ausführung von Apoptose blockiert ist, z.B. durch virale oder synthetische Caspase-Inhibitoren oder das Fehlen von FADD oder Caspase-8 (268, 270). Daher wurde Caspase-unabhängiger Zelltod auch als „Backup“-Zelltodweg beschrieben, welcher den Tod der Zelle sicherstellt, wenn die Ausführung der Apoptose verhindert wird.

Da RIP1 für die Initiation des Caspase-unabhängigen Zelltodes essentiell ist, kommt auch dem Chaperon-Protein HSP90 eine große Rolle zu. Dieses bindet an RIP1 und andere Kinasen, hält sie in der funktionellen Konformation und schützt sie vor proteasomalem Abbau

(78, 155). Bei Inhibition von HSP90 kommt es zu einer Degradation von RIP1 und damit zur Hemmung des Caspase-unabhängigen Zelltodes (267). Einige Zellen sind natürlicherweise besonders sensitiv gegenüber Caspase-unabhängigem Zelltod, wie z.B. L929 oder Jurkat-Zellen, welche auf TNF- α -Stimulation mit Caspase-unabhängigem Zelltod reagieren.

Für die Exekution des Caspase-unabhängigen Zelltodes sind verschiedene Mediatoren beschrieben worden (74). Häufig scheint die Ausübung von JNK-Aktivierung und/oder reaktiven Sauerstoffintermediaten (ROS) abhängig zu sein (46, 75, 160, 234, 290). Zudem wurden die Proteasen Calpain (46) und Cathepsin B (85) sowie der Second Messenger Ceramid in Zusammenhang mit der Exekution des Caspase-unabhängigen Zelltodes gebracht (261, 262).

Der Caspase-unabhängige Zelltod wird offenbar im Unterschied zur Apoptose weniger stark durch die Aktivierung von NF- κ B reguliert (163).

1.2.4.2.3 Autophagie

Autophagie ist eigentlich eine Überlebensstrategie von Zellen bei Nährstoffmangel oder eine Strategie zur Beseitigung von beschädigten Zellbestandteilen. Hierbei werden Zellorganellen und andere Zellbestandteile von Vesikeln umschlossen, die aus zwei oder mehr Membranen bestehen. Durch Fusion mit Lysosomen werden die Bestandteile abgebaut, um die Bausteine wieder bereitzustellen. Die Multimembranvesikel, die als Autophagosomen bezeichnet werden, sind wichtigstes morphologisches Merkmal der Autophagie (32). Die Ausübung der Autophagie basiert auf einer Reihe konservierter Gene, den Atg-Genen, wie zum Beispiel Atg7 und Beclin-1. Unter bestimmten Umständen kann dieses Überlebensprogramm jedoch auch zum Zelltod führen (295). Wie bestimmt wird, wann die Auslösung des Autophagie-Programms zum Überleben oder zum Tod der Zelle führt, ist noch ungeklärt. Es wird vermutet, dass der Autophagie-Zelltod eintritt, wenn das Autophagie-Programm zu lange anhält oder außer Kontrolle gerät. Wie auch beim Caspase-unabhängigen Zelltod ist RIP1 ein zentraler Initiator der Autophagie. Normalerweise wird diese Form des Zelltodes durch Apoptose unterdrückt und kann durch gezielte Caspase-Inhibition ausgelöst werden (294).

1.2.5 Die Funktionen von RIP1 als Adapterprotein

Verschiedene Rezeptoren der angeborenen Immunität, wie die der TNF-Rezeptor-Familie und die Toll-like Rezeptoren, besitzen keine eigene Kinase-Aktivität und müssen sich daher bei der Signalübertragung auf intrazelluläre Adaptermoleküle verlassen. Adaptermoleküle sind in vielen Signaltransduktionswegen von zentraler Bedeutung. Sie integrieren verschiedene extrazelluläre und intrazelluläre Stimuli und leiten sie zu den entsprechenden Effektorfunktionen über. Ein Adaptermolekül, welches sowohl in TNF-Rezeptor-, Toll-like-Rezeptor- als auch in intrazellulären Rezeptor-vermittelten Signalwegen agiert, ist die Serin-Threonin-Kinase RIP1 (74, 184). Das Protein RIP1, welches zunächst als RIP bezeichnet wurde und erst bei der späteren Entdeckung verwandter Proteine in RIP1 umbenannt wurde, ist ursprünglich in einem Yeast-Two-Hybrid-Screen als Interaktionspartner des Todesrezeptors Fas entdeckt worden (252). Daher wurde das Protein als RIP für „receptor-interacting protein“ bezeichnet. RIP1 hat verschiedene Domänen, mit denen es mit einer Vielzahl anderer Signaltransduktionsproteine und Rezeptoren interagieren kann (184). Im N-Terminus befindet sich die Serin-Threonin-Kinase-Domäne, über deren Funktion noch wenig bekannt ist. In der intermediären Domäne befindet sich unter anderem die RHIM-Domäne (RIP homotypic interaction motif), über die die Interaktion mit TRIF und RIP3 erfolgt (182). Zudem findet die Interaktion mit NEMO (bei K63-Ubiquitinierung) (44, 66, 211), TRAF1, TRAF2 und TRAF3 (107), sowie mit den Kinasen MEKK1 und MEKK3 über die intermediäre Domäne statt (135, 292). Im C-Terminus befindet sich die Todesdomäne, über die RIP1 mit den Todesrezeptoren und anderen Todesdomänen-enhaltenden Adapterproteinen interagieren kann (107, 252). Durch diese Vielzahl von möglichen Interaktionen erfüllt RIP1 verschiedene Funktionen in vielen Signalwegen. Eine zentrale Funktion hat RIP1 für die NF- κ B-Aktivierung aufgrund verschiedener Stimuli, nämlich der Stimulation von Todesrezeptoren, TNFR1, Fas und TRAIL DR4 und DR5 (103, 133, 141, 161), sowie der Stimulation der Toll-like Rezeptoren, TLR3 und TLR4 (182). Des Weiteren ist RIP1 vermutlich zusammen mit FADD an der IPS-1-vermittelten NF- κ B-Aktivierung durch RNA-Helikasen (RIG-I/Mda5) beteiligt (15, 132). Zudem ist RIP1 in einem Komplex mit PIDD (p53 inducible death domain containing protein) und NEMO verantwortlich für die NF- κ B-Aktivierung nach DNA-Schädigung (111). Am besten untersucht ist die Funktion von RIP1 in der TNF- α -induzierten NF- κ B-Aktivierung. Hier kommt es vermutlich durch TRAF2 zu einer K63-Ubiquitinierung von RIP1 (an Lys377 im humanen bzw. Lys376 im murinen RIP1) (74), welche essentiell ist für die Rekrutierung weiterer Signalmoleküle wie TAK1 und NEMO und für die darauf folgende NF- κ B-Aktivierung (44, 66). Im Zusammenhang mit der Ubiquitinierung von RIP1 wurde auch die Funktion des Proteins A20 entdeckt. Dieses zelluläre, durch TNF- α induzierbare Protein ist an der Termination der NF- κ B-Aktivierung maßgeblich beteiligt, indem es die K63-Ubiquitinierung von RIP1 entfernt und durch seine

Ubiquitin-Ligase Funktion anschließend K48-verknüpfte Ubiquitinreste anheftet. Hierdurch kommt es zum proteasomalen Abbau von RIP1 und zur Beendigung der NF- κ B-Aktivierung (99, 100, 149, 283).

Eine weitere zentrale Funktion von RIP1 ist die Initiation des Caspase-unabhängigen Zelltodes durch verschiedene Auslöser, wie der Stimulation von Todesrezeptoren (TNFR1, Fas und TRAIL DR4 und DR5) (103, 160) und Toll-like Rezeptoren, TLR3 und TLR4 (127, 169). Auch durch DNA-Schädigung kann RIP1-abhängig ein Zelltod ausgelöst werden (110). Des Weiteren übernimmt RIP1 Funktionen in der Aktivierung von MAP-Kinasen (63). So ist RIP1 beispielsweise essentiell für die TNF- α -induzierte Aktivierung von p38 (151) und ERK (63) oder auch für die durch TRAIL-Stimulation oder DNA-Schädigung induzierte Aktivierung von JNK (161, 290).

Die Kinase-Aktivität der Proteinkinase-Domäne wird für die Einleitung des Caspase-unabhängigen Zelltodes und für die Aktivierung von ERK benötigt (63), hingegen ist sie unbedeutend für die Aktivierung der p38 MAPK und NF- κ B (152, 184).

1.3 Virale Evasion der angeborenen antiviralen Immunantwort

1.3.1 Mechanismen viraler Evasion

Angesichts der vielen wirkungsvollen antiviralen Mechanismen der angeborenen Immunität mussten Viren im Laufe ihrer Evolution ebenfalls verschiedene Strategien entwickeln, der antiviralen Immunantwort des Wirtes zu begegnen. Für komplexe, langsam replizierende Viren, die eine persistierende Infektion verursachen, ist der evolutionäre Druck besonders groß, sich aktiv der Immunabwehr zu entziehen. Sie sind einer permanenten Auseinandersetzung mit dem Immunsystem ihres Wirtes unterworfen. Die lange Koevolution von Cytomegaloviren mit ihrem jeweiligen Wirt hat es dem Virus ermöglicht, diverse Evasionsmechanismen zu etablieren. Die Funktionen der angeborenen und erworbenen Immunität können zwar dazu beitragen, dass eine Cytomegalovirusinfektion unter ständiger Immunkontrolle inapparent verläuft, aber es ist dem Wirt nicht möglich, das Virus komplett zu eliminieren. Letztlich führt das komplexe Zusammenspiel zwischen der Immunantwort des Wirtes und den viralen Evasionsmechanismen zu einer Koexistenz von Virus und Wirt. Es kommt zur Ausbildung eines Gleichgewichts, bei der das Virus sich aktiv replizieren und auf andere Wirte ausbreiten kann, die Schädigung des Organismus aber weitgehend vermieden wird (144).

Es gibt verschiedene Möglichkeiten viraler Evasion der angeborenen Immunität (Abbildung 5). Eine Möglichkeit besteht darin, der Detektion durch die zellulären Sensoren der angeborenen Immunität mit Hilfe verschiedener Maßnahmen zu entgehen. So können die viralen Fremdstrukturen maskiert oder sequestriert werden. Ein Beispiel hierfür ist die

Komplexierung von Nukleinsäuren mit viralen Proteinen, so liegen z.B. die meisten viralen Genome innerhalb von Nukleokapsiden oder direkt komplexiert mit viralen Proteinen als Nukleoproteinkomplexe vor. Die als Replikationsintermediat auftretende dsRNA wird häufig von viralen Proteinen maskiert, dies ist z.B. die Funktion des Ebola-Virus-Proteins VP35 (35). Des Weiteren kann direkt die Funktion der PR-Rezeptoren blockiert werden, wie bei der Inhibition von RIG-I durch das Influenzavirus NS1-Protein (91).

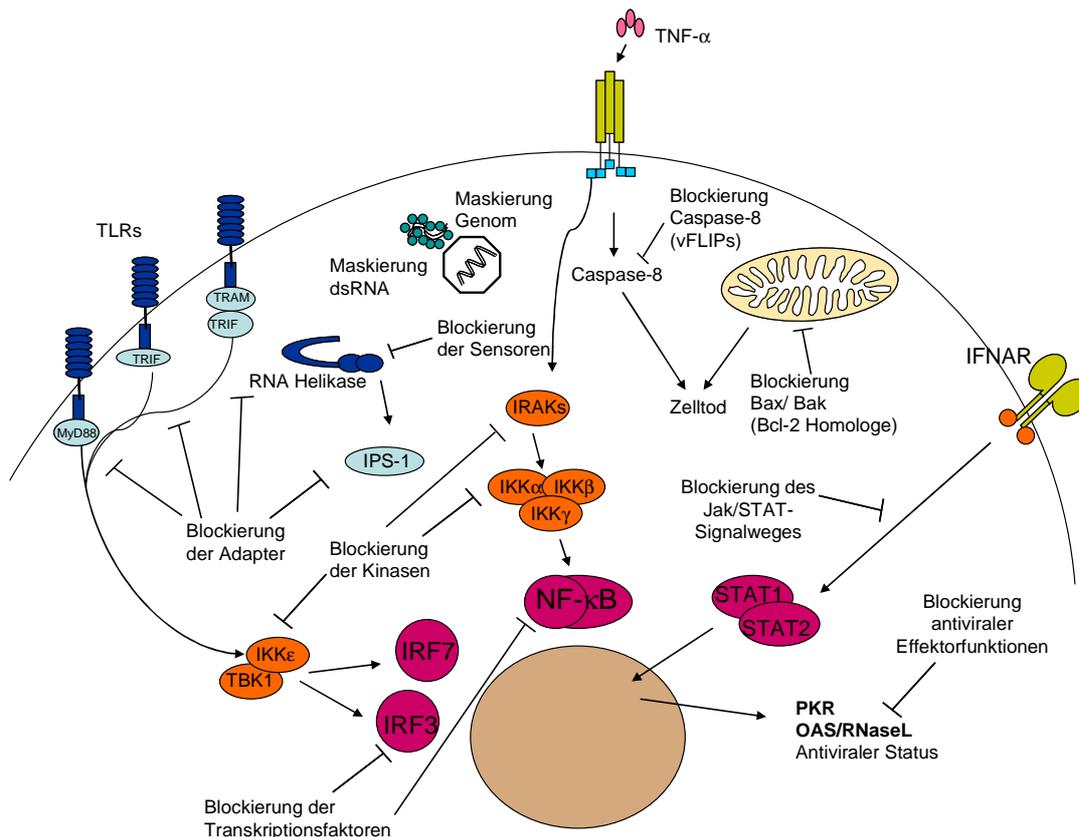


Abbildung 5: Virale Evasion der angeborenen Immunität

Die Abbildung zeigt exemplarisch die verschiedenen Strategien, wie Viren der angeborenen Immunität entgegenwirken. Die Elemente der Abbildung sind farbig unterschieden: Detektoren und -sensoren sind blau, Zytokinrezeptoren sind grün, Kinasen sind orange und Transkriptionsfaktoren sind rot dargestellt. Zugunsten besserer Übersichtlichkeit sind Teile vereinfacht dargestellt.

Alternativ können Viren mit den nachgeschalteten Signalwegen interferieren, indem sie beispielsweise die Adapterproteine blockieren, wie z. B. das Hepatitis-C-Virus, welches mit dem NS3/4A-Protein gleichzeitig TRIF- und IPS-1-vermittelte IRF-3-Aktivierung hemmt (158). Zudem besteht die Möglichkeit, direkt die Aktivierung der an der antiviralen Immunität beteiligten Transkriptionsfaktoren oder die an der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren beteiligten Kinasen zu inhibieren. Das A238L-Protein des Afrikanischen Schweinepest-Virus etwa weist große Homologie zu dem zellulären Inhibitor IκB auf und kann dadurch die NF-κB-Aktivierung verhindern (210). Auch die einzelnen Effektormechanismen der angeborenen Immunität können blockiert werden. Es ist beispielsweise bekannt, dass eine Vielzahl von Viren wie Herpesviren und Poxviren mit diversen Genprodukten die Initiation

des programmierten Zelltodes blockieren, als Beispiel sind hier die vFLIPs (viralen FLICE (Caspase-8) inhibitory proteins) zu nennen, die die Aktivierung von Caspase-8 verhindern, sowie verschiedene virale Bcl-2-Homologe, welche durch Inhibition von Bax und/oder Bak der Auslösung des intrinsischen Apoptoseweges vorbeugen (19, 207). Als weiterer wichtiger antiviraler Effektormechanismus wird das Interferonsystem von vielen verschiedenen Viren inhibiert. So besteht neben der Inhibition der Interferonproduktion auch die Möglichkeit, die Wirkung der Interferone zu inhibieren, indem entweder die Interferonsignaltransduktion (JAK-STAT-Signalweg) oder die antiviralen Effektormechanismen wie die PKR oder das OAS/RNaseL-System blockiert werden. Poxviren etwa inhibieren die Interferonsignaltransduktion durch Expression löslicher Interferonrezeptoren, welche produziertes Interferon binden und inaktivieren (213). Die V-Proteine verschiedener Paramyxoviren inhibieren die Interferonsignaltransduktion, indem sie verschiedene STAT-Proteine durch unterschiedliche Mechanismen wie Degradierung und Sequestrierung angreifen (213). Viele virale Proteine binden direkt an die Proteinkinase R und inhibieren deren Funktion, wie das multifunktionelle Influenzavirus-Protein NS1 (213).

Verschiedene Viren interferieren auch mit der Produktion von Zytokinen und der Aktivierung und Funktion verschiedener Immunzellen, wobei die zugrunde liegenden Mechanismen sehr unterschiedlich und komplex sind und daher nicht näher aufgeführt werden sollen.

1.3.2 Virale Evasion bei Cytomegaloviren

Auch Cytomegaloviren können der Immunantwort des Wirtes auf verschiedenen Ebenen entgegenwirken. In diesem Abschnitt sollen nur einige Beispiele dazu aufgeführt werden.

Es wurde gezeigt, dass HCMV die durch Eintritt der Viruspartikel ausgelöste Interferonantwort durch das Tegumentprotein pp65 blockieren kann, wobei der zugrunde liegende Mechanismus der Inhibition umstritten ist. Entweder führt pp65 zu einer Blockierung der IRF3-Aktivierung (1) oder der Aktivierung von NF- κ B und IRF1 (28) (Abbildung 6). Andere Mechanismen, wie CMV mit den TLR-Signalwegen oder den Signalwegen der RNA-Helikasen interferiert, sind nicht bekannt.

Cytomegaloviren haben außerdem diverse Strategien, um der Immunabwehr durch NK-Zellen zu entgehen. Dies erfolgt durch verschiedene Genprodukte, welche entweder zelluläre Liganden für aktivierende NK-Zellrezeptoren herunterregulieren oder inhibitorische NK-Liganden hochregulieren. Zusätzlich exprimieren sowohl HCMV als auch MCMV MHC-I-Homologe (gpUL18, UL142 und m144, m157), welche an inhibitorische NK-Rezeptoren binden und so die Erkennung infizierter Zellen durch NK-Zellen verhindern und der Lyse durch NK-Zellen entgegenwirken (7, 72, 284).

Durch die Expression von Zytokin- und Chemokinhomologen können Viren das Zusammenspiel der verschiedenen Komponenten des Immunsystems stören. Ein gut

untersuchtes Zytokinhomolog ist das virale IL-10. Dieses antiinflammatorische Zytokin blockiert selektiv bestimmte Teile der zellulären Immunantwort und inhibiert die Expression verschiedener Zytokine, wie IFN- γ und TNF- α , sowie kostimulatorischer Moleküle auf Makrophagen. Die Modulation seiner Expression oder die direkte Expression eines viralen Homologs sind essentiell für die Persistenz von Herpesviren. Daher exprimiert HCMV ein virales IL-10-Homolog (cmvIL-10) (117, 139). MCMV hingegen induziert die Produktion von zellulärem IL-10 (215).

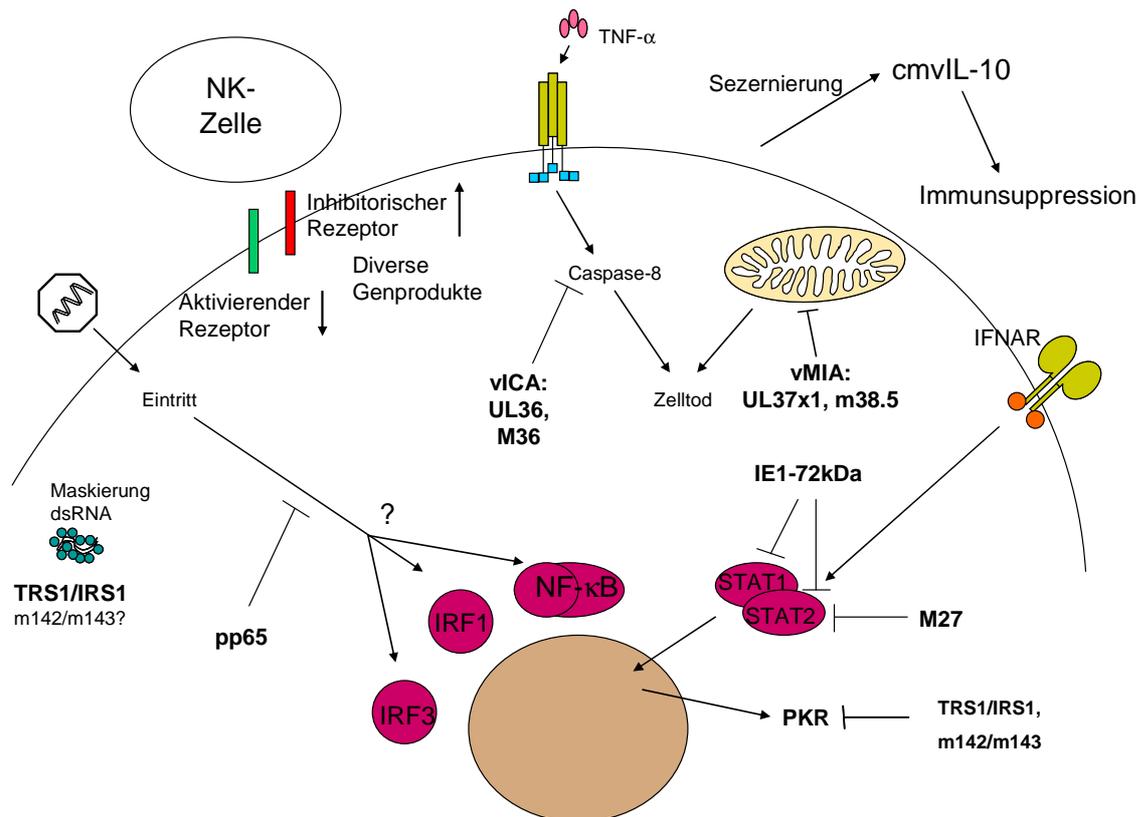


Abbildung 6: Immunevasion bei Cytomegaloviren

Die Abbildung zeigt verschiedene Immunevasionsmechanismen von HCMV und MCMV. Dargestellt sind diejenigen Mechanismen, bei denen das verantwortliche virale Genprodukt bekannt ist und die bereits gut charakterisiert sind. Das Hauptaugenmerk liegt hierbei auf zellintrinsic Mechanismen. Erläuterungen finden sich im Text.

Um den antiviralen Wirkungen des TNF- α zu entgehen, kommt es nach einer HCMV Infektion zur Herunterregulation des TNFR1 (12, 190). Die MCMV-Infektion von Makrophagen führt zur Herunterregulation von TNFR1 und TNFR2. Welche viralen Proteine diese Funktionen ausüben, bleibt unklar (208).

CMV interferiert zudem vielschichtig mit dem Interferonsystem. Typ-1- und Typ-2-Interferon-Signalwege können durch das murine Cytomegalovirus-Protein M27 blockiert werden, welches zu einem Abbau von STAT2 führt (298). Das humane Cytomegalovirus-Protein IE1-72kDa blockiert den JAK-STAT-Signalweg, indem es STAT1 und STAT2 angreift und die

Komplexbildung mit IRF9 verhindert (201). Es wurde nicht untersucht, ob sich diese Blockade auch auf die IFN- γ -induzierten Signalwege auswirkt.

Neben der Inhibition der IFN-Signalwege wird der für den antiviralen Status vermutlich wichtigste Faktor, die Proteinkinase R auch direkt von CMV blockiert. Die Proteine m142 und m143 von MCMV, sowie die Proteine IRS1 und TRS1 von HCMV verhindern die Aktivierung der PKR und ermöglichen so die Aufrechterhaltung der Proteinsynthese in infizierten Zellen (48, 265).

Auch die Inhibition von vorzeitigem Zelltod in infizierten Zellen ist von essentieller Bedeutung für eine effiziente CMV-Replikation. Bei HCMV und MCMV sind bisher acht Genprodukte bekannt, die der Inhibition des Zelltodes gewidmet sind. Todesrezeptor-vermittelte Apoptose wird durch den viralen Inhibitor der Caspase-8-Aktivierung (vICA) blockiert, der von den Genen M36 und UL36 kodiert wird (51, 179, 246). Ein weiteres HCMV-Protein, UL38, ist an der Inhibition des intrinsischen Apoptoseweges beteiligt und schützt vor ER-Stress-induzierter Apoptose (260). Kürzlich wurde bei HCMV eine nicht kodierende RNA, das β 2.7-Transkript, beschrieben, welche den durch oxidativen Stress bedingten Zelltod inhibiert, indem sie mit einem Bestandteil des Komplex I in Mitochondrien interagiert und so die ATP-Produktion in den Mitochondrien aufrechterhält (216). Des Weiteren wird der intrinsische Apoptoseweg durch das HCMV-Protein UL37x1 (vMIA) blockiert (84), welches an Bax bindet (9), sowie durch seinen Gegenpart in MCMV, dem Protein m38.5 (125). Bei dem murinen Cytomegalovirus wurden noch zwei weitere Genprodukte in Zusammenhang mit der Inhibition des vorzeitigen Zelltodes gebracht; das Genprodukt des m41-Genlokus, dessen molekularer Wirkmechanismus noch nicht aufgeklärt ist (30), und das Protein M45 (29), dessen Funktion in dieser Arbeit untersucht wurde.

Vermutlich werden in weiteren Untersuchungen noch zusätzliche virale Proteine gefunden werden, die das breite Spektrum der Immunevasionsfunktionen bei Cytomegaloviren ergänzen.

1.4 Das murine Cytomegalovirus-Ribonukleotidreduktase-Homolog M45 und seine Funktion in infizierten Zellen

Das MCMV-Protein M45 ist ein zytoplasmatisches Protein von 1174 Aminosäuren (AS), welches zu frühen Zeitpunkten während des viralen Replikationszyklus gebildet wird und zu späteren Zeitpunkten in die neu gebildeten Viruspartikel integriert wird (128, 154). Als Bestandteil des Teguments gelangt es daher direkt in das Zytoplasma neu infizierter Zellen. M45 besitzt in seinem C-Terminus eine Sequenzhomologie zur großen Untereinheit (R1) zellulärer Ribonukleotidreduktasen (RNR). Zusätzlich zu der C-terminalen Ribonukleotidreduktase-Domäne besitzt M45 eine N-terminale Domäne von ungefähr 674 AS mit unbekannter Funktion (200, 214).

Ribonukleotidreduktasen sind zelluläre Enzyme, deren funktionelle Form aus einer großen katalytischen Untereinheit (R1) und einer kleinen regulatorischen Untereinheit (R2) zusammengesetzt ist. Sie katalysieren die Reduktion von Ribonukleotiden zu den entsprechenden Desoxyribonukleotiden und werden für die de novo Synthese der DNA-Bausteine benötigt (154). Damit ist das Enzym essentiell für die Zellproliferation sowie die Replikation von DNA-Viren (200). Alpha- und Gamma-Herpesviren kodieren sowohl für die R1- als auch für eine R2-Untereinheit und bilden damit ein funktionelles Enzym. Sie sind daher in der Lage, unabhängig von dem zellulären Enzym, dessen Expression an den Zellzyklus gebunden ist, die Synthese der DNA-Bausteine sicherzustellen (154). Beta-Herpesviren hingegen haben eine andere Strategie entwickelt, um ausreichende Mengen an Desoxyribonukleotiden bereitzustellen. Es wurde gezeigt, dass HCMV und MCMV gezielt die Expression der zellulären Ribonukleotidreduktase induzieren, so dass die eigene Ribonukleotidreduktase nicht mehr benötigt wird (154, 200). Daher kodieren Cytomegaloviren nicht für eine R2-Untereinheit und die ursprünglich in dem UL45- bzw. M45-ORF kodierten RNR R1-Untereinheiten des HCMV und MCMV zeigen keine RNR-Aktivität (154, 200). Die MCMV R1-Untereinheit M45 weist Mutationen in verschiedenen katalytisch essentiellen AS auf. In einer Untersuchung konnte gezeigt werden, dass M45 auch in Kombination mit der zellulären R2-Untereinheit nicht die Funktion einer Ribonukleotidreduktase übernimmt (154). Die ursprüngliche R1 RNR-Funktion von M45 ist also aufgrund des fehlenden Selektionsdrucks durch Mutationen verloren gegangen. Da der M45-ORF aber trotz der Entbehrlichkeit der Ribonukleotidreduktase-Funktion erhalten geblieben ist und das Protein sogar in die Viruspartikel integriert wird, konnte vermutet werden, dass M45 eine andere Funktion übernommen hat oder eine zusätzliche Funktion konserviert hat. Erste Hinweise auf diese neue Funktion ergaben sich in einer Untersuchung zu Transposon-Insertionsmutanten, die die Fähigkeit verloren hatten, sich auf Endothelzellen zu vermehren. In dieser Untersuchung zeigte sich, dass bei allen Transposoninsertionen der

M45-ORF betroffen war und dass dieses Gen offenbar essentiell ist für die Vermehrung auf Endothelzellen und Makrophagen. Dies wurde auf die Unfähigkeit der Transposonmutanten zurückgeführt, den vorzeitigen Zelltod infizierter Endothelzellen zu inhibieren, da Zellkulturen, die mit diesen Viren infiziert wurden, einen deutlich höheren Anteil apoptotischer Zellen aufwiesen (29). In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass diese Funktion offensichtlich auch essentiell ist für die Pathogenese *in vivo*. Bei der Infektion von SCID-Mäusen, die sehr empfänglich für eine MCMV-Infektion sind und normalerweise an der Infektion versterben, zeigte sich, dass Virusmutanten ohne funktionelles M45 komplett apathogen sind (154).

Domänenorganisation der viralen Ribonukleotidreduktase R1 Homologe

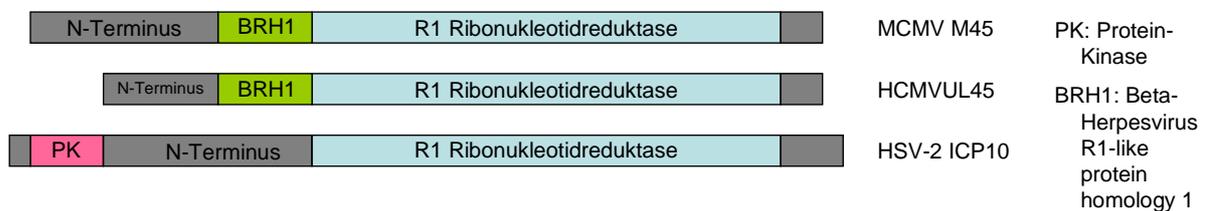


Abbildung 7: Aufbau der viralen Ribonukleotidreduktase R1-Homologe

Dargestellt ist die Domänenorganisation der R1-Homologe, des MCMV-Proteins M45, des HCMV-Proteins UL45 und des HSV-2-Proteins ICP10. In Anlehnung an Patrone et al (200).

Aufgrund seiner Ribonukleotidreduktase-Domäne weist M45 Sequenzhomologie zu anderen herpesviralen R1-Ribonukleotidreduktase-Homologen auf. Die Domänen-Organisation von M45 zeigt besonders große Ähnlichkeit zu den RNR-R1-Homologen von HCMV (UL45) und Herpes-simplex-Virus Typ 2 (HSV 2) (ICP10). Diese drei Proteine besitzen alle neben ihrer R1-Ribonukleotidreduktase-Domäne eine spezielle N-terminale Domäne unbekannter Funktion, die keine Homologie zu anderen funktionell charakterisierten Proteinen hat. Die N-terminale Domäne von M45 weist lediglich in einem Bereich eine Sequenz-Homologie zu den N-terminalen Domänen anderer β -herpesviraler Ribonukleotidreduktasen auf, nämlich denjenigen von HCMV und HHV 7. Dieser Bereich wird als „ β -Herpesvirus R1-like protein homology 1“ (BRH1) bezeichnet (200). Dem R1-Homolog von HHV 7 fehlt hingegen der einzigartige N-terminale Bereich, welcher sich in den R1-Homologen von MCMV, HCMV und ICP10 der BRH1-Domäne bzw. direkt der Ribonukleotidreduktase-Domäne N-terminal anschließt. Das ICP10-Protein weist zusätzlich in seinem speziellen N-terminalen Bereich eine Proteinkinase-Domäne auf, welche in den N-terminalen Domänen von M45 und UL45 fehlt (200). Des Weiteren ist das R1-Homolog ICP10 das einzige der drei R1-Homologe, welches wirklich die Funktion einer Ribonukleotidreduktase übernimmt (37). Neben dem Vorhandensein der speziellen N-terminalen Domäne haben die drei R1-Homologe weitere Gemeinsamkeiten. Alle drei Proteine sind Bestandteil des Teguments (128, 154, 200, 247)

und ihre Funktionen scheinen von Bedeutung zu sein für die virale Replikation, da Knockoutviren des gesamten Gens bzw. der N-terminalen Domäne ein verringertes Wachstum in Zellkultur aufweisen (29, 200, 248, 249). ICP10 und UL45 wurde ebenfalls eine neue Funktion bei der Inhibition des programmierten Zelltodes zugesprochen. Für UL45 konnte gezeigt werden, dass es infizierte Zellen vor FasL-induziertem Zelltod schützt, wobei dieser Effekt nur sehr schwach ausgeprägt war (200). Für ICP10 wurden verschiedene Mechanismen der Zelltod inhibition postuliert. Zum einen wurde gezeigt, dass es Todesrezeptor-vermittelten Zelltod oberhalb der Aktivierung von Caspase-8 blockiert mittels direkter oder indirekter Interaktion mit Caspase-8 (145). Eine andere Arbeitsgruppe führt die antiapoptotische Funktion von ICP10 auf die Proteinkinaseaktivität zurück, die ICP10 in seinem N-Terminus besitzt. Diese Proteinkinase soll MEK/ERK- und PI3-K/Akt-Überlebenssignalwege aktivieren, was zur Überlagerung des proapoptotischen Signals führt, so dass die Aktivierung von Caspase-3 verhindert wird (203, 204, 275). Es ist jedoch umstritten, ob ICP10 überhaupt über eine eigene Proteinkinase-Aktivität verfügt (54, 146).

1.4.1 Zielsetzung

Wie schon in den vorangegangenen Absätzen besprochen, ist die Auslösung des programmierten Zelltodes in infizierten Zellen ein wirkungsvoller Mechanismus, um der Ausbreitung von Viren in einem Organismus entgegenzuwirken. Demzufolge brauchen Viren für eine erfolgreiche Vermehrung Strategien, um dieser Funktion der angeborenen Immunität zu entgehen. Eine Möglichkeit besteht darin, dass der Replikationszyklus so schnell verläuft, dass die Produktion von Nachkommenviren abgeschlossen ist, bevor die infizierte Zelle an programmiertem Zelltod stirbt. Große komplexe DNA-Viren hingegen haben in der Regel einen relativ langen Reproduktionszyklus. Daher besteht bei diesen Viren die Notwendigkeit, die Auslösung des programmierten Zelltodes aktiv zu verhindern.

Dieser Arbeit lag die Fragestellung zugrunde, wie das murine Cytomegalovirus-Protein M45 den vorzeitigen Zelltod infizierter Zellen verhindert. Im Rahmen der Untersuchungen sollte herausgefunden werden, in welchen Zelltod-Signalweg M45 eingreift und ob es diese Funktion allein erfüllt oder ob andere virale Proteine daran beteiligt sind. Da die Vermutung bestand, dass M45 potentiell mehr als eine Funktion besitzen könnte, wurde auch der Fragestellung nachgegangen, ob M45 neben der Inhibition des vorzeitigen Zelltodes eine zusätzliche Funktion bei der viralen Replikation übernimmt, zum Beispiel beim Eintritt oder der Ausschleusung der Viruspartikel. Des Weiteren sollte der genaue molekulare Mechanismus aufgeklärt werden, wie M45 mit einem Zelltod-Signalweg interferiert. Darüber hinaus war es von Interesse zu untersuchen, ob Ribonukleotidreduktase-Homologe anderer, verwandter Viren in der Lage sind, die Funktion von M45 zu substituieren oder ob deren postulierte antiapoptotische Funktion sich von der Funktion von M45 unterscheidet.

Angesichts der gravierenden Bedeutung des programmierten Zelltodes für die angeborene Immunität gegenüber viralen Infektionen, aber auch gegenüber entarteten Zellen, dienen die gewonnenen Erkenntnisse über die molekulare Grundlage der Zelltod inhibition durch M45 einem besseren Verständnis der viralen Pathogenese, aber auch dem generellen Verständnis über Angriffspunkte für antivirale und Anti-Tumor-Therapien.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Neben den hier im Detail aufgeführten Materialien und Geräten wurden zusätzlich diverse Standard-Chemikalien und eine übliche Laborausstattung zur Durchführung der Arbeit genutzt.

2.1.1 Bakterien

Bakterienstamm	Eigenschaften	Quelle / Referenz
<i>Escherichia coli</i> Stamm K-12 Unterstamm DH10B	Genotyp: F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 endA1 ara</i> Δ139 Δ(<i>ara, leu</i>)7697 <i>galU galK</i> λ- <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>nupG</i> (NCBI-Nummer: NC_010473)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
<i>Escherichia coli</i> Stamm K-12 Unterstamm DY380	Abgeleitet von DH10B, haben den defekten Prophagen λ stabil im Genom integriert und exprimieren die Rekombinationsproteine <i>exo</i> , <i>bet</i> und <i>gam</i> unter Kontrolle des Temperatur-sensitiven Repressors <i>cl857</i> . Tetracyclin-Resistenz (12.5 µg/ml). Genotyp: DH10B [<i>cl857 (cro-bioA)</i> <> <i>tet</i>]	(148)
<i>Escherichia coli</i> Stamm K-12 Unterstamm EL250	Abgeleitet von DY380. Enthalten zusätzlich zu den Rekombinationsgenen ein Arabinose-induzierbares <i>flpe</i> Gen für FLP-Rekombination. Keine Tetrazyklin-Resistenz. Genotyp: DH10B [λ <i>cl857(cro-bioA)</i> <> <i>araC-P_{BAD}flpe</i>]	(148)

2.1.2 Zellen

2.1.2.1 Murine Zelllinien

Zellart	Beschreibung	Medium	Umsetz-Verhältnis	Quelle
10.1	Spontan immortalisierte primäre BALB/c murine embryonale Fibroblasten, p53 negativ	DMEM 10% FCS P/S	1:10	(96)
NIH/3T3	Spontan immortalisierte primäre NIH swiss mouse embryonale fibroblasten	DMEM 5% NCS P/S	1:5	ATCC: CRL-1658
SVEC4-10	SV40 (Stamm 4A) transformierte murine Endothelzellen	DMEM 10% FCS P/S	1:10	ATCC: CRL-2181

Material und Methoden

Zellart	Beschreibung	Medium	Umsetz-Verhältnis	Quelle
RIP +/+	Spontan immortalisierte murine embryonale Fibroblasten von WT Mäusen	DMEM 10% FCS P/S	1:5	(133)
RIP -/-	Spontan immortalisierte murine embryonale Fibroblasten von RIP1-Knockout Mäusen	DMEM 10% FCS P/S	1:5	(133)
TNFR1 -/-	Spontan immortalisierte murine embryonale Fibroblasten von TNFR1-Knockout Mäusen	DMEM 10% FCS P/S	1:5	(56)
TRAF2/5 DKO	Spontan immortalisierte murine embryonale Fibroblasten von TRAF2/TRAF5 Doppelknockout Mäusen	DMEM 10% FCS P/S	1:5	(152)
L-929	Murine Fibrosarkomzellen	RPMI 10% FCS P/S	1:6	ATCC: CCL-1

2.1.2.2 Humane Zelllinien

Zellart	Beschreibung	Medium	Umsetz-Verhältnis	Quelle
MRC-5	Humane Lungenfibroblasten	DMEM 10% FCS P/S	1:3	ATCC: CCL-171
HFFtel	Humane Vorhautfibroblasten Telomerase-immortalisiert	DMEM 10% FCS P/S	1:3	(27)
293A	Humane embryonale Nierenzellen (HEK293), selektioniert auf flache Morphologie	DMEM 10% FCS P/S	1:10	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Phoenix	Verpackungszelllinie zur Produktion von Retrovirusvektoren, basiert auf einem amphotropen Moloney Murine Leukemia Virus (MMLV); diese Phoenixzellen basieren auf 293T Zellen und exprimieren stabil die Gene gag, pol und env des amphotropen MMLV	DMEM 10% FCS P/S	1:10	(136)

2.1.3 Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Quelle
pcDNA3	Eukaryotischer Expressionsvektor, CMV-Promoter, Neomycin Resistenz (eukaryotisch), Ampicillin Resistenz (prokaryotisch)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
pReplacer	Basierend auf pBluescriptII KS ⁺ , Plasmid für homologe Rekombination zur Insertion von Genen in die m02-m06-Region von MCMV, Ampicillin und Kanamycin-Resistenz, Phosphoglycerat-Kinase-Promoter	(124)
pcDNA3-m143-HA	Eukaryotischer Expressionsvektor für das MCMV-Gen m143 mit HA-Tag (Kontrolle)	(265)
pCAGGS-FlagA20	Eukaryotischer Expressionsvektor für murines Zinkfingerprotein A20 mit Flag-Tag (N-terminal)	Universität Gent Plasmid collection (LMBP)
pEF6-E-mTRAF2	Eukaryotischer Expressionsvektor für murines TRAF2	Universität Gent Plasmid collection (LMBP)
pRK5-MycRIP	Eukaryotischer Expressionsvektor für humanes RIP1 mit Myc-Tag (N-terminal)	Zheng-gang Liu, National Institute of Health, Bethesda, USA
pTranslucent NF- κ B(2) reporter vector	Reporter-Vektor für NF- κ B-abhängige firefly Luciferase-Expression mit NF- κ B-Konsensus-Bindungsstelle	Panomics
pRSV- β Gal	Eukaryotischer Expressionsvektor für konstitutive Expression von β -Galaktosidase	Annette Mankertz, Robert Koch-Institut, Berlin
pZEO4	Plasmid mit Zeocin-Resistenzgen zur Klonierung von rekombinanten Viren mit Gendelektion	W. Bresnahan
pKD46	Prokaryotischer Expressionsvektor für Rekombinationsproteine Gam, Bet, und Exo des λ Phagen Red (Arabinose-induzierbar), für homologe Rekombination (NCBI-Nummer: AY048746)	(57)
pcDNA-HAm41	Eukaryotischer Expressionsvektor für das MCMV-Gen m41 (Kontrolle)	(30)
pSL-FRTKn	Plasmid mit FRT-flankierter Kanamycinresistenz-Kassette	M. Wagner, (10)

Material und Methoden

Plasmid	Beschreibung	Quelle
pLXRN	Retroviraler Vektor, Herstellung von Retrovirus zur stabilen Expression in eukaryotischen Zellen, retrovirales Verpackungssignal, 3' und 5' LTR inkl. Promotor), Neomycin Resistenz (eukaryotisch), Ampicillin Resistenz (prokaryotisch)	Takara Bio Europe/Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
pRetroEBNA	Retroviraler Vektor, Herstellung von Retrovirus zur stabilen Expression in eukaryotischen Zellen, nicht selektionierbar	T. Shenk, Princeton University, USA
pRetroGFP	Retroviraler Vektor, Herstellung von Retrovirus zur stabilen Expression von GFP in eukaryotischen Zellen, nicht selektionierbar,	T. Shenk, Princeton University, USA
pHA-Ubq	Eukaryotischer Expressionsvektor für HA-getaggttes Ubiquitin	Michael Nevels, Universität Regensburg
pAdCMV5-R1	Adenoviraler Vektor mit HSV 2 R1-Gen (ICP10)	(145)
pSL301	Plasmid zur Umklonierung, Superlinker, Ampicillin Resistenz (prokaryotisch)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
pEGFP-N1/ N2/ N3 pEGFP-C1/ C2/ C3	Plasmide zum Anfügen von N- und C-terminalen GFP-Tags (drei verschiedene Leserahmen), Kanamycin-Resistenz (prokaryotisch)	Takara Bio Europe/Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
pCR3-HA-M36	Eukaryotischer Expressionsvektor für MCMV-Gen M36 (N-terminaler HA-Tag)	(179)
pMSCVpuro	Retroviraler Vektor, Herstellung von Retrovirus zur stabilen Expression in eukaryotischen Zellen, retrovirales Verpackungssignal, 3' und 5' LTR (inkl. Promotor), Puromycin Resistenz (eukaryotisch), Ampicillin Resistenz (prokaryotisch)	Takara Bio Europe/Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
pYX-Asc-RIP ORF	Vollständiger cDNA Klon des murinen RIP1 Gens (IMAGE ID 5721177)	RZPD (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung), Berlin
pcDNA-UL45 TB40E	Eukaryotischer Expressionsvektor für HCMV TB40E Gen UL45 (C-terminaler HA-Tag)	Wolfram Brune
pcDNA-M45	Eukaryotischer Expressionsvektor für MCMV Gen M45 (C-terminaler HA-Tag)	Wolfram Brune
pcDNA-UL45	Eukaryotischer Expressionsvektor für HCMV AD169 Gen UL45 (C-terminaler HA-Tag)	Wolfram Brune

Material und Methoden

Plasmid	Beschreibung	Quelle
pRetro-M45	Retroviraler Vektor (basierend auf pRetroEBNA) mit MCMV Gen M45 (C-terminaler HA-Tag)	Wolfram Brune
pRetro-UL45	Retroviraler Vektor (basierend auf pRetroEBNA) mit HCMV AD169 Gen UL45 (C-terminaler HA-Tag)	Wolfram Brune
pFlagCMV1-huTLR3	Eukaryotischer Expressionsvektor für humanen TLR3 (N-terminaler Flag-Tag)	Addgene Inc., Cambridge, MA, USA
pcDNA-CrmA	Eukaryotischer Expressionsvektor für Kuhpockenvirus CrmA Gen	Wolfram Brune
pcDNA-m41HA-FRTKan	Plasmid zur PCR-Amplifikation des HA-Tags und der FRT-flankierten Kanamycinresistenz-Kassette	Wolfram Brune
pcDNA-M45 ohne HA	Eukaryotischer Expressionsvektor für MCMV Gen M45 ohne HA-Tag	(154)
pReplacer-UL37	Plasmid zur Insertion von HA-getagtem UL37x1 in m02-m06-Region von MCMV durch Homologe Rekombination	Wolfram Brune
pReplacer-mRFP	Plasmid zur Insertion von mRFP in m02-m06-Region von MCMV durch homologe Rekombination	(124)

2.1.4 DNA-Primer und Oligos

Primer	Sequenz	Funktion
M36-Zeofwd	5'-TTTCTCCCCTCACCTCTCCGTCC CTTTCTTATCCGTTTTCCCTCTATCG tggtgacaattaatcatcgcat-3'	Klonierung der M36-Deletionsmutante
M36-Zeorev	5'-GCTCATTCTTTTCGGGAAAGGGGTGGA GGAGGGTCGTTTGACAGTGAAAGGA gaattcagtcctgctcctcgcca-3'	Klonierung der M36-Deletionsmutante
TEV-HA-Oligo1	5'-ggccgcggtggtgagaacctctactccaaggtggt ggttaccatacagcgtcccagactacgcttgag-3'	Klonierung von pSL-FRTKn-TEV-HA (zur Klonierung des M45-TEV-HA-Virus)
TEV-HA-Oligo2	5'-GATCCTCAAGCGTAGTCTGGGACGT CGTATGGGTAACCACCACCTTGGAAAGT AGAGGTTCTCACCACCGC-3'	Klonierung von pSL-FRTKn-TEV-HA (zur Klonierung des M45-TEV-HA-Virus)
M45-TEV-HAfwd	5'-tgtccgtcggagtataaatgtagtatgccccctt ccgtgaattatcgc ggtggtgagaacctctactcca-3'	PCR Amplifikation des TEV-HA-Tags und FRT-Kan-Kassette (zur Klonierung des M45-TEV-HA-Virus)

Material und Methoden

Primer	Sequenz	Funktion
M45-TEV-HArev	5'- tcgagcgcagagcaatagaactcgtttttggcgacgagtt cgccgtcaGTGGAATGCCTTCGAATTCGAAG TT-3'	PCR Amplifikation des TEV- HA-Tags und FRT-Kan- Kassette (zur Klonierung des M45-TEV-HA-Virus)
M45truncN1 fwd	5'-Aaaggtaccgatatccacc ATGAATGGAGTCTCTGGAATACAGATC-3'	Primer für N-terminal verkürztes M45 Nterm1 (Start bp 162)
M45truncN1 rev	5'-gGTGGCGGCCGCGGATC-3'	Primer für N-terminal verkürztes M45 Nterm1 (Start bp 162)
Oligo M45truncC1.1	5'TCGAGTACCCATACGACGTCC CAGACTACGCTTAGT3'	Oligolinker für C-terminal verkürztes M45
Oligo M45truncC1.2	5'CTAGACTAAGCGTAGTCTGGGA CGTCGTATGGGTAC3'	Oligolinker für C-terminal verkürztes M45
pMSCVpuroRev2	CTAGTGGGCAAACGGGGTTTG	Sequenzierprimer für pMSCVpuro-RIP ORF
RIP ORF int1	GTACAGCTTTGGCATTGTCCTTG	Sequenzierprimer für pMSCVpuro-RIP ORF
pMSCVpuroFwd	CATCCGCCCCGTCTCTC	Sequenzierprimer für pMSCVpuro
pMSCVpuroRev	GAGGCCAGAGGCCACTTG	Sequenzierprimer für pMSCVpuro
pReplacer fwd	CGCACGCTTCAAAGCGCAC	Sequenzierprimer für pReplacer
pReplacer rev	CTAAAGGGAACAAAAGCTGGGTAC	Sequenzierprimer für pReplacer
pcDNA-Fwd	CGTGTACGGTGGGAGGTC	Sequenzierprimer für pcDNA
pcDNA-Rev	CAGGGTCAAGGAAGGCACG	Sequenzierprimer für pcDNA
pLXRN fwd	CGT CTG AAT TTT TGC TTT CGG	Sequenzierprimer für pLXRN
pLXRN rev	gcaagactacaagagtattgc	Sequenzierprimer für pLXRN
M32-GFP1	5'-gttctgatgggacggtggcggcctggtaaaaaa tcgtcgtcgtctcac GCCACCATGGTGAGCAAG-3'	Primer zur Klonierung des M32-GFP-Virus
M32-GFP2	5'-aataaaaaataataaaaaccaacc aggagcgcgatcatcgtctgt-3' 5'-gtaccgtcgtcgcagaattc-3'	Primer zur Klonierung des M32-GFP-Virus

2.1.5 Viren

Virus	Eigenschaften	Quelle
MCMV-GFP	rekombinantes MCMV, kloniert als BAC, exprimiert GFP, basierend auf Smith Stamm, im Text als MCMVwt bezeichnet	(29)
MCMV Δ M45	rekombinantes MCMV, basiert auf MCMV-GFP, Deletion des M45-Gens durch Insertion von Zeocin	(30)
MCMV WT	rekombinantes MCMV, kloniert als BAC, basierend auf Smith Stamm, als MCMV WT bezeichnet	(180, 273)
MCMV M45-HA	rekombinantes MCMV, basiert auf MCMV WT, in situ HA-getaggttes M45 (C-terminal)	Wolfram Brune
HCMV AD169	rekombinantes HCMV (ATCC: VR-538), Stamm AD-169	(25)
HCMV Δ UL45	rekombinantes HCMV, basierend auf HCMV AD169, Deletion des UL45-Gens	Wolfram Brune

2.1.6 Enzyme

Enzym	Hersteller
Restriktionsenzyme, PCR-Enzyme und dNTPs, DNA-modifizierende Enzyme und DNA-Ligasen	Fermentas, St. Leon-Rot, und New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
AcTEV-Protease	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Hot-Star-Taq	Qiagen GmbH, Hilden
RNase A	Carl Roth, Karlsruhe

2.1.7 Antikörper

Primäre Antikörper	Antigen	Quelle	Anwendung	Hersteller
Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (3D7)	Phospho-p38 MAPK	Kaninchen	WB	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA
RIP (H-207)	RIP1	Kaninchen	IP	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA
I κ B- α (C-21)	I κ B α	Kaninchen	WB	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA
Anti-HA (polyklonal)	HA-Tag	Kaninchen	WB, IP	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Anti-HA 16B12	HA-Tag	Maus	WB, IP	Covance Research Products, Berkeley, USA
Anti-M45 crude serum	M45	Kaninchen	WB, IP	David Lembo (154)
Ub (P4D1)	Ubiquitin	Maus	WB	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA

Material und Methoden

Primäre Antikörper	Antigen	Quelle	Anwendung	Hersteller
Anti-RIP (mouse)	RIP1	Maus	WB	BD Transduction Laboratories
Anti-p38 (C-20)	p38 MAPK	Kaninchen	WB	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA
Anti-β actin (AC-74)	Aktin	Maus	WB	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Anti-Flag (M2)	Flag-Tag	Maus	WB	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Anti-HA 3F10 Affinitätsmatrix (Agarose beads) (11815016001)	HA-Tag	Ratte	Affinitätsaufreinigung	Roche Applied Science, Mannheim
Anti-Myc Tag (4A6)	Myc-Tag	Maus	IP	Upstate (Millipore)
Anti-mouse TNF-R1 (55R-170)	TNFR1	Armenischer Hamster	FACS	R&D Systems, Minneapolis, USA

Sekundäre Antikörper	Quelle	Anwendung	Hersteller
Anti-Armenian Hamster IgG Cy5-konjugiert (127-175-099)	Ziege	FACS	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., UK
Anti-rabbit IgG HRP-gekoppelt (P0399)	Schwein	WB	DakoCytomation, Glostrup; Denmark
Anti-mouse IgG HRP-gekoppelt (P0447)	Ziege	WB	DakoCytomation, Glostrup; Denmark
Anti-rabbit IgG, HRP-gekoppelt (#7074)	Ziege	WB	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA

2.1.8 Reagenzien

Reagenz	Anwendung	Hersteller
Rekombinantes murines TNF-α (aus <i>E. coli</i>) (D-63720)	Zelltod, NF-κB-Aktivierung	Promokine, PromoCell GmbH, Heidelberg
Rekombinantes humanes TNF-α (aus <i>E. coli</i>) (C-63722)	Zelltod, NF-κB-Aktivierung	Promokine, PromoCell GmbH, Heidelberg
Hamster Anti-Mouse FAS purified (NA/LE) (554254)	Zelltod	BD Biosciences (Pharmingen™), Heidelberg
Phosphonoacetic acid (PAA)	Inhibition der MCMV-Replikation	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

Material und Methoden

Reagenz	Anwendung	Hersteller
Staurosporin	Apoptoseinduktion	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Z-VADfmk	Pan-Caspase-Inhibitor	MBL International, Woburn, MA, USA
Z-IETDfmk	Caspase-8-Inhibitor	MBL International, Woburn, MA, USA
Zeocin	Prokaryotische Selektion	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Ampicillin	Prokaryotische Selektion	Carl Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Prokaryotische Selektion	Carl Roth, Karlsruhe
Puromycin	Eukaryotische Selektion	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Cycloheximid	Translationsinhibition, Zelltod (zusammen mit TNF- α)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Actinomycin D	Transkriptioninhibition	Carl Roth, Karlsruhe
GeneRuler™ 1kb DNA Ladder Fragments 0.25-10 kb	DNA-Größenstandard	Fermentas, St. Leon-Rot
Kaleidoscope Prestained Standards, broad range	Protein Größenstandard, farbig,	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Precision Plus Protein unstained	Protein Größenstandard, unmarkiert	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Full-Range Rainbow™ Protein Molecular Weight Markers 10-250 kDa	Protein Größenstandard, farbig,	GE Healthcare, München
MTT (3-(4,5-Dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid)	MTT-Test	Carl Roth, Karlsruhe
nProtein A Sepharose™ Fast Flow	Immunpräzipitation	GE Healthcare, München
Protein G Sepharose 4 Fast Flow	Immunpräzipitation	GE Healthcare, München
Silbernitrat	Proteinfärbung	Carl Roth, Karlsruhe
Sequa-brene™ (Hexadimethrinbromid)	Steigerung der Infektiosität von Retrovirusüberständen	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Aqua-Poly/Mount	Mountingmedium	Polysciences Europe GmbH, Eppelheim
Gelred	Anfärbung der DNA	MoBiTec, Göttingen

2.1.9 Kits

Kit und Zubehör	Anwendung	Hersteller
BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Sequenzierung	GE Healthcare, München
NucleoBond®PC500	DNA-Präparation (Plasmide)	Macherey-Nagel, Düren
NucleoBond®PC100	DNA-Präparation (BACs)	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin®Extract	DNA-Gelelution	Macherey-Nagel, Düren
ECL Western Blotting Detection Reagents	Detektion von HRP-gekoppelten Antikörpern (Western Blot)	GE Healthcare, München
Advanced ECL	Detektion von HRP-gekoppelten Antikörpern (Western Blot)	GE Healthcare, München
Dual light luciferase and β -galactosidase assay kit	Luciferase-Assay	Applied Biosystems, Applera Deutschland GmbH, Darmstadt
Luciferase Reporter Assay Kit (K801-200-BV)	Luciferase-Assay	Biocat, Heidelberg
Röntgen Filme	Western Blot	X-Ray Retina, Berlin
Polyfect	Transfektionsreagenz	Qiagen GmbH, Hilden
Hybond ECL Nitrocellulosemembran	Western Blot	GE Healthcare, München
Neubauer improved	Zählkammer	Carl Roth, Karlsruhe
Genepulser cuvette, 0,2 cm Elektrodenabstand	Elektroporation	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

2.1.10 Geräte

Gerät	Anwendung	Hersteller
GeneAmp® PCR System 9600	PCR	Applied Biosystems, Applera Deutschland GmbH, Darmstadt
Inverted Microscope Axiovert 200M	Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
Fastblot B34	Semi dry Blot Apparatur	Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen
Hofer cooled tank blotter TE 62	Tank Blot	Hofer, Inc., San Francisco, USA

Material und Methoden

Mini-PROTEAN 3 Cell	Proteingelsystem	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
SE 600 Ruby™, 18 x 24 cm	Proteingelsystem	GE Healthcare, München
SE 410 Sturdier Vertical Electrophoresis Unit, 18 x 24 cm	Proteingelsystem	GE Healthcare, München
HE 99X Max submarine unit	DNA-Gelelektrophorese	GE Healthcare, München
PerfectBlue Gelsystem Mini S (gel size 7 x 8 cm)	DNA-Gelelektrophorese	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Electrophoresis Power Supply EPS 301	Netzanschlussgerät (Regulierung von Spannung und Stromstärke)	GE Healthcare, München
CoolSnap CCD Camera / MetaVue Software	Geldokumentationssystem	Visitron Systems, Puchheim
Gel Documentation Sytem E.A.S.Y Win32	Geldokumentationssystem	Herolab, Wiesloch
Mikrotiterplatten Luminometer MicroLumatPlus LB96V	Luciferase-Assay	EG&G Berthold, Bundoora, Australien
Multiplate Absorbance Reader Spectrafluor Plus	MTT-Test	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Nanodrop	DNA-Konzentrationsbestimmung	Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, MA, USA
Stratalinker Model 2400	UV-Inaktivierung	Stratagene Europe, Amsterdam
Gene Pulser XCell	Elektroporation	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

2.1.11 Puffer und Lösungen

DNA-Präparation

Lösung S1	25 mM Tris-HCl (pH 8,0); 50 mM Glucose; 10 mM EDTA (pH 8,0)
Lösung S2	0,2 N NaOH; 1% SDS
Lösung S3	3 M KAc (pH 4,8)
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 7,8), 1 mM EDTA (pH 8,0), pH 7,8

DNA-Gelelektrophorese

50 x TAE	2 M Tris-HCl, 5,7% Essigsäure, 50 mM EDTA (pH 8,0)
5 x TBE	445 mM Tris, 445 mM boric acid, 20 mM EDTA (pH 8,0)
6 x DNA-Ladepuffer (Orange dye)	0,2 % Orange G; 60 mM EDTA pH 8; 60% Glycerin

Kalzium-Phosphat-Präzipitation

2 x HBS	50 mM Hepes pH 7,05; 10 mM KCl; 12 mM Dextrose (D+ Glukose); 280 mM NaCl; 150 mM Na ₂ HPO ₄ ; pH mit NaOH auf 7,0 / 7,05 / 7,1 einstellen und alle drei auf Transfektionseffizienz austesten
Kalziumchlorid	2 M CaCl ₂ , sterilfiltriert

Zellfixierung

Fixierung	3 % Paraformaldehyd in PBS
Ammoniumchlorid	50 mM NH ₄ Cl in PBS

Lysis-Puffer

Triton-Puffer	10 mM Tris-HCl pH 8,0; 140 mM NaCl; 0,025% NaN ₃ ; 1% Triton X-100; Protease Inhibitor Cocktail (Roche)
RIPA-Puffer	20 mM Tris-HCl pH 7,5; 300 mM NaCl; 1% Na-Deoxycholat; 1% Triton X-100; 0,1% SDS; Protease Inhibitor Cocktail (Roche)
Lysis Säule 1% NP40	50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 1% Nonidet P40; Protease Inhibitor Cocktail (Roche)

SDS-PAGE

Tricine-Gel-Puffer	3 M Tris-HCl pH 8,5; 0,3% SDS
5 x Kathodenpuffer	0,5 M Tris; 0,5 M Tricine; 0,5% SDS
10 x Anodenpuffer	2 M Tris-HCl pH 8,9
2 x PPP	125 mM Tris-HCl pH 6,8; 4% SDS; 20% Glycerin; 10% 2-Mercaptoethanol; 0,05% BPB

Material und Methoden

Silbergel	
Fixierung	30% Ethanol; 10% Essigsäure
Vernetzung	0,5% Glutaraldehyd, 0,1% Natriumthiosulfat in 30% Ethanol/ 70% 0,4 M Natriumacetatpuffer pH 6,0
Färbung	0,1% AgNO ₃ ; 0,009% Formaldehyd
Entwicklung	2,5% Na ₂ CO ₃ ; 0,015% Formaldehyd
Stopp-Lösung	5% Essigsäure
Western Blot	
Transfer-Puffer	50 mM Tris; 40 mM Glycin; 0,04% SDS; 20% Methanol
Towbin's Transfer Puffer	25 mM Tris; 192 mM Glycin; 20% Methanol
PBS	137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ ; 2 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7.2
TBS	10 mM Tris-HCl pH 7.4; 150 mM NaCl
Stripping-Puffer	62,5 mM Tris-HCl pH 7,5; 2% SDS; 100 mM 2- Mercaptoethanol
Ponceau S-Lösung	0,1% Ponceau S; 5% Essigsäure
FACS	
FACS-PBS	0,1% BSA; 0,05% NaN ₃ in PBS
Ko-IP	
Waschpuffer B	1mM Tris pH 7,6; 150mM NaCl; 2mM EDTA
Waschpuffer C	1mM Tris pH 7,6; 500mM NaCl; 2mM EDTA
Waschpuffer D	10mM Tris pH 7,6
Affinitätssäulenaufreinigung	
Lysis Säule 2,5% NP40	50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 2,5 % Nonidet P40; Protease Inhibitor Cocktail (Roche)
Equilibrierungspuffer	20 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,1 M NaCl; 0,1 M EDTA
Waschpuffer	20 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,1 M NaCl; 0,1 M EDTA; 0,05% Tween-20
Säulen-Lager-Puffer	20 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,1 M NaCl; 0,1 M EDTA; 0,09% NaN ₃
Säulen-Regenerations-Puffer	0,1 M Glycin pH 2,0
TEV-Protease-Puffer	50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,5 mM EDTA; 1 mM DTT
MTT	
MTT-Lösung	5 mg/ml MTT in PBS
Solubilisierungslösung	Ethanol/ DMSO 1:1

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 DNA-Präparation aus Bakterien

Plasmid- und BAC-DNA wurde in Bakterien (*Escherichia coli*, K12 Unterstamm DH10 oder DY380) vermehrt und anschließend mittels alkalischer Lyse aus den Bakterien präpariert. Zur Herstellung größerer Mengen Affinitätssäulen aufgereinigter DNA wurden kommerziell erhältliche Kits von MACHEREY-NAGEL nach den Angaben des Herstellers verwendet.

Für die DNA-Präparation von high-copy Plasmiden wurden hierfür 100 ml einer dicht gewachsenen Bakterienkultur eingesetzt. Die Bakterien wurden bei 5000 g für 15 min abzentrifugiert und anschließend nach Angaben des Herstellers lysiert. Das weiße Präzipitat (restliche Zellbestandteile) wurde durch Filtration von dem Plasmid-DNA-haltigen Lysat getrennt. Die NucleoBond-Säulen (NucleoBond AX Silicium-Granulat) der Größe AX 500 wurden equilibriert und anschließend mit dem Lysat beladen. Nachdem das Lysat durch die Säule gelaufen war, wurde diese gewaschen. Die an die Säulenmatrix gebundene DNA wurde mit 15 ml Elutionspuffer eluiert. Zu dem Eluat wurden 200 µl 3M NaAc pH 5,2 und 12 ml Isopropanol gegeben, vermischt und für 45 min bei 3500 g und 4°C im Ausschwingrotor zentrifugiert um die DNA zu präzipitieren. Das Pellet wurde anschließend einmal mit 5 ml reinem 70%igem Ethanol gewaschen und noch einmal für 15 min bei gleicher Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Ethanol wurde durch Absaugen komplett entfernt und die Pellets für ca. 15 min bei RT getrocknet bis sie durchsichtig waren. Anschließend wurde die DNA in 500 µl TE-Puffer gelöst.

Für die Präparation von BAC-DNA wurde das Protokoll für Low-Copy-Plasmide verwendet, was andere Mengenverhältnisse aufweist. Für eine BAC-Midi-Präparation wurden 150 ml dicht gewachsene Bakterienkultur eingesetzt. Von den Puffern S1-3 wurden jeweils 8 ml verwendet. Das gefilterte Lysat wurde auf eine equilibrierte Säule der Größe AX 100 geladen und gewaschen. Die Elution erfolgte mit 5 ml Elutionspuffer. Die BAC-DNA wurde durch Zugabe von 3,8 ml Isopropanol und Zentrifugation bei 15500g für 30 min bei 4°C präzipitiert und anschließend sehr vorsichtig mit 2 ml 70%igem reinem Ethanol gewaschen. Das getrocknete Pellet wurde in 150 µl TE aufgenommen.

Anschließend wurde die Konzentration und Reinheit der DNA mit einem Nanodrop-Messgerät bestimmt.

Die Präparation kleiner Mengen an ungereinigter DNA zur Analyse der Plasmid- /BAC-Konstrukte verschiedener Bakterienklone (nach Klonierung von Plasmiden oder rekombinanten BACs) erfolgte ebenfalls nach dem Prinzip der alkalischen Lyse jedoch mit selbst angesetzten Puffern.

Hierfür wurden für die Isolierung von Plasmid-DNA Kulturen von je 2ml angeimpft. 1,5 ml der dicht gewachsenen Kulturen wurden bei 16000 g für 30 sec in Eppendorfcups abzentrifugiert und anschließend in je 100 µl kalter Lösung S1 resuspendiert, 3 µl RNase A (10mg/ml) zugegeben und für 5-10 min auf Eis inkubiert. Dann wurden je 100 µl Lösung S2 zugegeben, durch vorsichtiges Invertieren gemischt und 2-5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden je 200 µl kalte Lösung S3 zugegeben und erneut vorsichtig invertiert. Um das Präzipitat zu entfernen, wurden die Cups für 10-15 min bei 16000g und 4°C zentrifugiert. Der DNA-haltige Überstand wurde in neuen Cups mit 0,6 Volumenteilen (220µl) Isopropanol gut gemischt und für 10-20 min bei 16000g und 4°C zentrifugiert um die DNA zu präzipitieren. Der Überstand wurde abgossen und die Pellets jeweils mit 500 µl 70% igem reinen Ethanol gewaschen, der Ethanol wurde zugeben und erneut für 5 min zentrifugiert. Reste von Ethanol wurden vollständig abgesaugt, die Pellets für 5-10 min bei 37°C getrocknet bis sie durchsichtig waren und in je 50 µl TE-Puffer gelöst.

Für die Isolierung kleiner Mengen ungereinigter BAC-DNA wurden jeweils 5-ml-Kulturen angeimpft. Je 2 x 2 ml der dicht gewachsenen Bakterienkulturen wurden bei 16000g für 30 sec abzentrifugiert und beide Pellets zusammen in 200 µl kaltem Puffer S1 resuspendiert. Dann wurden je 250 µl Lösung S2 zugegeben und die Cups vorsichtig mehrfach invertiert und 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 300µl kalter Lösung S3 wurde erneut vorsichtig mehrfach invertiert und 5-10 min auf Eis inkubiert. Das Präzipitat wurde für 20 min bei 16000 g und 4°C abzentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und in ein neues 1,5 ml Eppendorfcup gegeben. Der DNA-haltige Überstand wird mit einem Volumenteil (ca. 700-800 µl) Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol versetzt (unter dem Chemikaleinabzug) und für 15-30 min überkopf geschüttelt. Um die wässrige von der organischen Phase zu trennen, wurden die Cups für 1 min bei 16000 g und 4°C zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und zu 0,8 Volumenteilen (640 µl) Isopropanol in neue Cups gegeben und vorsichtig durch Invertieren vermischt. Die DNA wurde durch 20-30-minütige Zentrifugation bei 4°C und 16000 g präzipitiert. Die Pellets wurden mit 500 µl 70%igem reinem Ethanol gewaschen und erneut 5 min zentrifugiert. Der Ethanol wurde vollständig entfernt und die Pellets getrocknet, bis sie durchsichtig waren. Dann wurden die Pellets in je 50 µl TE-Puffer mit RNase (0,1 mg/ml) aufgenommen und für 30 min bei 37°C geschüttelt.

2.2.1.2 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Für die Herstellung elektrokompetenter Bakterien wurde eine 5ml-Vorkultur angeimpft und mit dieser Vorkultur wurde am nächsten Morgen eine größere Kultur ungefähr im Verhältnis 1:100 angeimpft. Die Kultur wurde bei 37°C wachsen gelassen, bis eine OD_{600} von $\leq 0,6$ erreicht war. Anschließend wurden die Kolben für 30 min auf Eis abgekühlt. Es ist wichtig die Bakterien permanent bei 4°C zu halten. Die abgekühlten Bakterien wurden dann 10 min bei 5000 g und 4°C abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 50 ml kaltem

deionisiertem Wasser gewaschen. Anschließend wurde 15 min bei 5000g zentrifugiert und wieder mit 50 ml kaltem Milliporewasser gewaschen. Die Bakterien wurden erneut 15 min zentrifugiert und mit 50 ml kaltem 10 % Glycerin gewaschen. Nach einer erneuten 10 min Zentrifugation wurde das Pellet je nach Größe in ca. 2 ml kaltem 10 % Glycerin aufgenommen (das Glycerinvolumen sollte ungefähr dem Volumen des Pellets entsprechen). Diese Bakterien wurden in kleine Portionen aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die fertigen Aliquots wurden bei -80°C gelagert.

2.2.1.3 Transformation von Bakterien durch Elektroporation

Zur Elektroporation von Bakterien wurde ein Aliquot elektrokompetenter Bakterien auf Eis aufgetaut. Für jede Transformation wurden 40 µl der Bakterien mit ca. 1 ng Plasmid-DNA oder 1-2 µl eines Ligationsansatzes vermischt, in eine gekühlte Elektroporationsküvette (Genepulser cuvette, 0,2 cm Elektrodenabstand von Biorad) gefüllt und mit Hilfe eines Gene Pulser XCell von Biorad elektroporiert. Die hierfür eingestellten Werte betragen:

Spannung: 2500 V (Volt)

Kapazität: 25 µF (Mikrofarad)

Widerstand: 200 Ω (Ohm)

Nach dem Strompuls wurden die transformierten Bakterien sofort in 600 µl LB-Medium aufgenommen und für eine halbe Stunde bei 37°C geschüttelt. Anschließend konnten die Bakterien auf Agarplatten ausplattiert werden.

2.2.1.4 Polymerase Chain Reaktion (PCR)

Für einige Klonierungen wurden bestimmte DNA-Fragmente mittels PCR amplifiziert. Hierdurch können durch das Design der PCR-Primer Tags oder Restriktionsschnittstellen oder homologe Sequenzen für eine spätere Rekombination an die zu vermehrende DNA-Sequenz angefügt werden.

Die PCR wurde nach Standardprotokollen durchgeführt. Die PCR Reaktion wurde wie folgt angesetzt:

1x Taq-Puffer

0.2 mM dNTP Mix

0.1-1 µM Primer 1 und 2

1.25 u Taq DNA Polymerase

1-4 mM MgCl₂

10pg-1 µg Template DNA

Deionisiertes H₂O auf 50 µl

Die Ansätze wurden in speziellen PCR-Reaktionsgefäßen auf Eis gemischt und in einen vorgeheizten Thermocycler gegeben. Das PCR-Programm wurde vorher wie folgt eingestellt:

Reaktionsschritt	Zeit	Temperatur	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	95°C	1-3 min	1x
Denaturierung	94-95°C	0.5-2 min	25-40x
Primer-Annealing	5°C niedriger als Schmelztemperatur der Primer	0.5-2 min	
Extension	70-75°C	1 min für Produkte bis 2 kb	
Finale Extension	72°C	10 min	1x
Kühlung	4°C	unendlich	1x

Die Schmelztemperatur der Primer wurde mit einem Internet-Programm bestimmt (<http://www.promega.com/biomath/calc11.htm>).

Für einige Klonierungs-PCRs wurde die Hot-Start-Taq-DNA-Polymerase von Fermentas verwendet. Hierbei ist die Polymerase aufgrund einer chemischen Modifizierung bei RT inaktiv, was die Spezifität der Reaktion erhöhen soll. Die PCR wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Bedingungen waren vergleichbar mit den oben genannten, nur dass der initiale Denaturierungsschritt auf 4 min ausgedehnt wurde, da die modifizierte Polymerase zunächst aktiviert werden musste.

2.2.1.5 DNA-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden Agarosegele verwendet. Je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente wurde eine Agarosekonzentration von 0,6 (Fragmente über 6 kbp) bis 1% in Laufpuffer angesetzt. Für Gele, die kurz liefen, wurde als Laufpuffer 1xTAE verwendet. Bei Gelen, die über Nacht liefen, wurde 0,5x TBE als Puffersystem verwendet. Die Agarose wurde durch Aufkochen in der Mikrowelle in dem Puffer gelöst. Um die DNA im Gel sichtbar zu machen, wurde den Gelen Ethidiumbromid zugesetzt, welches anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht wurde. Die flüssige Agarose wurde in eine Gießvorrichtung gegossen und ein Kamm mit benötigter Taschengröße und Anzahl eingehängt. Das auspolymerisierte Gel wurde in eine mit Laufpuffer gefüllte Gelkammer gegeben. Die DNA-Proben wurden mit Gelladepuffer versetzt (1:6) und in die Taschen des Agarosegels geladen. Zusätzlich wurde ein DNA-Größen-Standard aufgetragen, um die Größe der erhaltenen Fragmente einschätzen zu können. Dann wurde die DNA mit ca. 90-120 Volt (über Tag) oder 50 Volt (über Nacht) zur Kathode hin aufgetrennt. Anschließend wurden die DNA-Fragmente durch kurzwelliges UV-Licht (254 nm) auf einem Transilluminator sichtbar gemacht und fotografiert.

2.2.1.6 Präparative DNA-Gelelektrophorese

Für ein präparatives DNA-Gel wurde die DNA anstelle von Ethidiumbromid mit dem Farbstoff Gelred angefärbt, zudem wurden längere Gele verwendet, um die DNA-Fragmente zuverlässiger voneinander zu trennen.

2.2.1.7 Gelelution von DNA-Fragmenten

Die Gelelution von DNA-Fragmenten wurde mit Hilfe des Nucleospin Extract II Kits von Macherey-Nagel durchgeführt. Die in einem präparativen DNA-Gel aufgetrennten DNA-Fragmente wurden mit Hilfe eines Transilluminators aus dem Gel ausgeschnitten. Die Gelstücke wurden in Puffer NT bei 50°C aufgelöst. Anschließend wurde die Lösung auf Nucleospin Extract Säulen geladen und 1 min bei 11000 g zentrifugiert. Die an die Silicamatrix gebundene DNA wurde einmal mit 600 µl Puffer NT3 gewaschen. Der Waschpuffer wurde durch zweimaliges Zentrifugieren bei 11000 g vollständig entfernt. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 15-50 µl Elutionspuffer NE, 1 min Inkubation bei RT und Zentrifugation bei 11000 g eluiert. Die eluierten DNA-Fragmente wurden dann für molekulare Klonierungen oder Herstellung rekombinanter Viren verwendet.

2.2.1.8 Molekulare Klonierung

Für die molekulare Klonierung von Genen in Expressions- oder Replikationsvektoren wurden die entsprechenden Gene und Vektoren mit Restriktionsenzymen geschnitten. Für einen solchen Restriktionsansatz wurden in der Regel fünf µg DNA sowie ca.15 Units des benötigten Enzyms in 20-50 µl des entsprechenden optimalen Puffers für das verwendete Enzym eingesetzt. Die Restriktionsansätze wurden für 2 h bei der für das Enzym benötigten Temperatur inkubiert. Bei dem Verdau des Vektors (das DNA-Fragment mit dem bakteriellen Replikationsursprung) wurde in der letzten halben Stunde des Verdaus noch Shrimp Alkaline Phosphatase zugegeben, um die Phosphatreste zu entfernen. So wurde eine anschließende Selbstligation des Vektors verhindert, da eine Ligation nur möglich ist, wenn die Insert-DNA (das DNA-Fragment mit dem ausgeschnittenen Gen) zugegeben wird. Anschließend wurde die verdaute DNA auf ein präparatives Agarosegel aufgetragen (s. o.). Die eluierten DNA Fragmente wurden durch Ligation wieder zu vollständigen Vektoren zusammengefügt. Hierfür wurde in einem Ligationsansatz ein Vektorfragment mit einem Insertfragment zusammengegeben, die kompatible Enden aufwiesen, und durch Zugabe der T4-DNA-Ligase und einem ATP-haltigen Puffer wurden die Fragmente 2 h bei RT oder über Nacht bei 16°C miteinander ligiert.

2.2.1.9 Überprüfung klonierter Konstrukte durch Restriktionsanalyse der Plasmid-DNA verschiedener Bakterienklone

Die verschiedenen bei einer Ligation entstandenen Plasmidmoleküle mussten auf ihre Richtigkeit überprüft werden. Hierfür wurde die DNA des Ligationsansatzes in *E. coli* K12 Unterstamm DH10 transformiert und anschließend auf Agarplatten mit einem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. So erhaltene Einzelklone wurden gepickt und 2-ml-Kulturen angeimpft. Diese wurden über Nacht angezüchtet. Aus der dichten Bakterienkultur wurde am nächsten Tag die Plasmid-DNA isoliert, wie unter Absatz 2.2.1.1 „DNA-Präparation aus Bakterien“ beschrieben. Anschließend wurde durch Restriktionsanalyse mit einem geeigneten Enzym untersucht, welcher der Bakterienklone das richtige DNA-Molekül enthielt. Bei Klonierungen, wo eine eindeutige Überprüfung der erhaltenen Konstrukte durch eine Restriktionsanalyse nicht möglich war, wurden einige Klone durch Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft. Die Sequenzierungen wurden von dem Sequenzierlabor im Robert Koch-Institut durchgeführt.

Von einem richtigen Klon wurde eine große Kultur angeimpft und eine größere Menge aufgereinigter DNA hergestellt wie unter Absatz 2.2.1.1 beschrieben.

2.2.1.10 Klonierung rekombinanter Viren

Die rekombinanten Viren wurden mittels homologer Rekombination von linearen DNA-Fragmenten mit dem als BAC (bacterial artificial chromosome) klonierten parentalen MCMV-Genom in rekombinationskompetenten Bakterien hergestellt. Hierfür wurden entweder *E. coli* des Unterstamms DY380 verwendet, die den defekten Prophagen λ stabil im Genom integriert haben und die Rekombinationsproteine *exo*, *bet* und *gam* unter Kontrolle eines Temperatur-sensitiven Repressors exprimieren. Für eine Rekombination wurden auch *E. coli* des Unterstamms EL250 verwendet. Diese sind Abkömmlinge des Stamms DY380, die zusätzlich ein Arabinose-induzierbares *flpe*-Gen enthalten, mit Hilfe dessen eine FLP-Rekombination zwischen zwei FRT-Stellen durchgeführt werden konnte. Bei anderen Rekombinationen wurden *E. coli* des Unterstamms DH10B verwendet, die zusätzlich zu dem als BAC klonierten Virusgenom das Plasmid pKD46 enthielten, welches die Gene *exo*, *bet* und *gam* des Lambda-Phagen Arabinose-induzierbar exprimiert. Die für die Rekombination benötigten Bakterien wurden bis zu einer OD unter 0,4 angezüchtet, DY380 und EL250 bei 30°C und DH10B mit pKD46 bei 37°C. Anschließend wurden die Rekombinationsgene entweder durch Hitzeinduktion bei DY380 und EL250 (10 min bei 42°C) oder durch Zugabe von 1 mM Arabinose zu der Bakterienkultur ca. 30 min vor Erreichen der finalen OD (bei Verwendung von pKD46) induziert. Anschließend wurden die Bakterienkulturen abgekühlt und wie unter Absatz 2.2.1.2 „Herstellung elektrokompetenter Bakterien“ beschrieben elektrokompetent gemacht.

Die für die homologe Rekombination benötigten linearen DNA-Fragmente müssen die zu inserierende Sequenz sowie ein Resistenzgen enthalten, flankiert von zwei 50bp-Regionen, welche eine Homologie zu der Zielsequenz in dem MCMV-Genom aufweisen. Diese DNA-Fragmente wurden durch PCR mittels spezieller Primer, die die homologen Sequenzen als Extensionen aufweisen, hergestellt. Nach der PCR wurde entweder ein DpnI-Verdau angeschlossen oder das gesamte PCR-Produkt in einem Agarosegel aufgereinigt, um das als Template verwendete Plasmid zu entfernen. Für andere Rekombinationen wurde das zu inserierende Gen in den Vektor pReplacer (124) kloniert, welcher schon die entsprechenden homologen Bereiche zum MCMV-Genom enthält, um das Gen in die m02-m06-Genregion einzufügen. Der bei der Rekombination entstehende Verlust dieser Genregion hat keine Auswirkungen auf das Wachstum der rekombinanten Viren in Zellkultur, weil die hier kodierten Gene nur für Immunevasion in Mäusen benötigt werden. Aus dem pReplacer-Plasmid mit dem entsprechenden Gen wurde mit bestimmten Enzymen ein lineares DNA-Fragment ausgeschnitten, welches dann über ein Agarosegel aufgereinigt werden musste, um das ungeschnittene Plasmid zu entfernen. Die erhaltenen Fragmente wurden mit einem Gelelutionskit wie in Absatz 2.2.1.7 beschrieben aufgereinigt und anschließend ca. 5 µl in die entsprechenden rekombinationskompetenten Bakterien elektroporiert und dann für 2 h bei 30°C (DY380 und EL250) oder bei 37°C (DH10B) geschüttelt. Anschließend wurden die Bakterien vorsichtig abpelletiert und auf Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika (Chloramphenicol zur Selektion des BAC und ein Antibiotikum zur Selektion der Rekombinanten, meist Kanamycin oder Zeocin) ausplattiert und wiederum bei der oben genannten Temperatur inkubiert. Bei den Rekombinationen mit DH10B und pKD46 wurde zusätzlich eine Stunde bei 43°C inkubiert, um das Temperatur-sensitive pKD46 wieder zu entfernen. Die nach dem Ausplattieren erhaltenen Einzelklone konnten noch auf weitere Agarplatten umgepickt werden, um rekombinierte Klone von denjenigen Klonen zu unterscheiden; die lediglich das ursprüngliche Template-Plasmid oder ungeschnittenes pReplacer-Plasmid enthalten. Diese Klone hatten zusätzlich zu der gewünschten Resistenz (Chloramphenicol und meist Kanamycin) meist auch eine Ampicillinresistenz. Zusätzlich konnte so auf den Verlust des pKD46 getestet werden (Selektion gegen Ampicillin).

Anschließend wurden positive Klone gepickt und durch BAC-Mini-Präparation und Restriktionsanalyse mit geeigneten Restriktionsenzymen die erfolgreiche Rekombination überprüft. Dafür wurden 1,5-2 µg DNA eingesetzt. Die verdauten BAC-DNA wurde auf ein großes Agarosegel geladen und über Nacht bei 45-60 Volt in TBE-Puffer aufgetrennt. Hierfür wurde nicht nur dem Agarosegel sondern auch dem Laufpuffer Ethidiumbromid zugesetzt (5µl auf 1300ml), damit auch kleine Banden nicht wieder entfärbt wurden. Als Vergleich wurde immer auch eine Präparation des parentalen BACs mit verdaut, um die entstandenen Veränderungen im Bandenmuster erkennen zu können.

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Zellkultur

Die verschiedenen Zelllinien wurden mit dem angegebenen Medium (Absatz 2.1.2) gehalten. Das Fötale Kälberserum (FCS) wurde vor der Verwendung für 30 min bei 56°C hitzeinaktiviert, um das Komplementsystem zu inaktivieren. Das Neugeborenen-Kälberserum (NCS) wurde nicht hitzeinaktiviert. Für die Passagierung der Zellen wurden diese mit PBS gespült und mit Trypsin bei 37°C inkubiert, bis die Zellen sich ablösen und vereinzeln ließen. Dann wurde jede Ziellinie maximal in dem angegebenen Verhältnis umgesetzt.

Zur Kryokonservierung der Zellen wurden subkonfluente Zellen mit Trypsin abgelöst und bei 1000 rpm (188 g) abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10% DMSO in FCS aufgenommen und in Kryoröhrchen zunächst bei -80°C (max. 3 Tage) eingefroren und dann in den flüssigen Stickstoff überführt.

Zellen, die für Versuche umgesetzt wurden, wurden in der Regel in einer Neubauer-improved-Zählkammer gezählt und dann in einer definierten Zelldichte ausgesät.

2.2.2.2 Herstellung von Virus-Stocks

2.2.2.2.1 MCMV

MCMV wurde auf 10.1 oder auf NIH3T3 Zellen angezüchtet. Hierfür wurden 6×10^6 Zellen pro 15-cm-Schale ausgesät und gleichzeitig mit einer MOI von 0,05 TCID₅₀ infiziert. Es hat sich herausgestellt, dass Viren, die auf dem Δ M45-Virus basieren, besser auf NIH3T3-Zellen angezüchtet werden konnten, da diese Zellen weniger sensitiv gegenüber dem Δ M45-induzierten Zelltod sind. Ungefähr 5 bis 7 Tage später waren die so infizierten Zellkulturen durchinfiziert. Das Virus wurde 24 h nach vollständigem CPE geerntet. Hierfür wurde der Überstand abgenommen und Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 2000 rpm (755 g) abpelletiert. Der so erhaltene Virusüberstand konnte entweder so bei -80°C in Aliquots (1 ml) eingefroren werden oder zur weiteren Aufreinigung verwendet werden, wie unten beschrieben.

2.2.2.2.2 Partielle Aufreinigung und Aufkonzentrierung durch Pelletierung des Virusüberstands

Der aus Zellkultur erhaltene Überstand wurde (im Falle von MCMV) meist durch Abpelletieren der Viruspartikel grob von anderen aus den Zellen freigesetzten Stoffen gereinigt. Hierfür wurde der Überstand für 4 h bei 25000 g und 4°C zentrifugiert. Das entstehende Pellet wurde mit neuem Medium bedeckt und über Nacht bei 4°C quellen gelassen, bevor es am nächsten Tag durch hoch- und herunterpipettieren gelöst wurde. Das so aufbereitete Virus wurde in kleinen Aliquots (200, 500 µl) bei -80°C eingefroren.

2.2.2.2.3 HCMV

HCMV wurde auf MRC-5 Zellen angezüchtet. Hierfür wurden die Zellen aus einer konfluenten 15-cm-Schale 1:4 in 4 neue 15-cm-Schalen gesplittet und diese Zellen mit einer TCID₅₀ von 1×10^5 infiziert. Nach ungefähr 8-12 Tagen waren die so infizierten Zellkulturen durchinfiziert. 24 h nach vollständigem CPE wurde der Überstand abgenommen und Zelltrümmer bei 2000 rpm (755 g) abzentrifugiert. Meist wurden Stocks von HCMV nicht weiter aufgereinigt, da hierbei keine Erhöhung des Virustiters erzielt werden konnte.

2.2.2.3 Bestimmung des Titers von Viruspräparationen

Um den Titer (Maß für die Menge infektiöser Viruspartikel) einer Viruspräparation zu bestimmen, wurde mittels Endpunktverdünnungsmethode die mittlere „Tissue culture infectious dose“ (TCID₅₀) ermittelt. Die Berechnung der TCID₅₀ erfolgte nach Spearman-Kärber. Die Titrationsen wurden für MCMV auf 10.1 Zellen durchgeführt und nach 7 Tagen abgelesen, für HCMV erfolgten die Titrationsen auf MRC-5 Zellen und die Auswertung erfolgte nach 14 Tagen.

2.2.2.4 Transfektion von Zellen mit Expressionsplasmiden

2.2.2.4.1 Transfektion von 293 und Phoenix Zellen mittels Kalzium-Phosphat-Präzipitation

293 und Phoenix Zellen können durch Kalzium-Phosphat-Präzipitation transfiziert werden. Die Zellen nehmen die an Kalzium-Phosphat-Präzipitate gebundene DNA mittels Endozytose auf.

Hierfür wurden 5-10 µg DNA und 61 µl 2M CaCl₂-Lösung in einem Volumen von 500 µl gemischt. Anschließend wurden 500 µl 2xHBS-Lösung zugegeben und so vermischt, dass Blasen entstanden. Die Mischung wurde vorsichtig auf die 70-80% konfluenten Zellen einer 6-cm-Schale gegeben. Nach ca. 8-12 h musste das Medium mit den Kalziumphosphat-Kristallen durch frisches ausgetauscht werden. In 293 und Phoenix Zellen kann auf diese Weise eine Transfektionseffizienz von deutlich über 50% erreicht werden.

2.2.2.4.2 Liposomale Transfektion mit „Polyfect“

Zur Transfektion von 10.1 und NIH3T3 Zellen wurde das Polyfect Transfektionsreagenz von Qiagen verwendet. Hierfür wurden die Zellen so ausgesät, dass sie für die Transfektion 40-80% konfluent waren. Zur Transfektion einer 6-cm-Schale wurden 2,5 µg DNA in 150 µl DMEM ohne Zusätze aufgenommen und dann mit 15 µl Polyfect Reagenz vermischt und für 5-10 min bei RT inkubiert. Das Medium auf den Zellen wurde gewechselt und durch 3ml frisches ersetzt. Die nach der Inkubation entstehenden DNA-Komplexe wurden in 1 ml Medium aufgenommen und auf die Zellen gegeben.

2.2.2.5 Retrovirale Transduktion eukaryotischer Zellen

2.2.2.5.1 Herstellung von Retrovirus-Überständen

Zur Herstellung von Retrovirus-Überständen wurden Phoenix-Zellen als Verpackungszelllinie benutzt. Diese Verpackungszelllinie basiert auf 293-T Zellen und exprimiert stabil die Gene gag, pol und env des amphotropen Moloney-murine-leukemia-Virus. Durch Transfektion dieser Zellen mit speziellen Plasmiden können Retrovirus-Überstände gewonnen werden, die dann zur Transduktion und damit zur stabilen Integration und Expression eines Fremdgens in Zielzellen genutzt werden. Die in die Phoenixzellen transfizierten Plasmide exprimierten ein Transkript, welches ein retrovirales Verpackungssignal, eine 5' und 3'LTR (zur stabilen Integration in die Zielzellen) und ein kloniertes Fremdgen, welches von dem 5'LTR-Promotor exprimiert wurde, enthielten. Selektionierbare Retrovirusvektoren enthielten zusätzlich einen Selektionsmarker, welcher durch einen unabhängigen Promotor exprimiert wurde.

Die Phoenixzellen wurden mit Hilfe der Kalzium-Phosphat-Transfektion transfiziert und 48 h später wurde der Überstand abgenommen, durch 45-µm-Filter filtriert und entweder sofort zur Transduktion der Zielzellen eingesetzt oder bei -80°C eingefroren.

2.2.2.5.2 Herstellung stabiler Zelllinien

Für die stabile Expression von Fremdgenen wurden Retroviren auf Basis des retroviralen Vektors pMSCVpuro benutzt. Der erhaltene Retrovirusüberstand wurde mit 5 µg/ml Sequabrene versetzt und auf die Zielzellen gegeben. 12-24 h später wurde das Medium gewechselt. Die transduzierten Zielzellen (RIP -/-) wurden zwei Tage nach der Transduktion mit 4 µg/ml Puromycin selektioniert.

2.2.2.5.3 Hochtitrige Transduktion mit pRetroEBNA-Konstrukten

Für Gene, die nicht stabil exprimiert werden konnten, wurden Zellen mit besonders hochtitrigen Retrovirusüberständen transduziert. Anschließend wurde keine Selektion durchgeführt. Hierfür wurden Retrovirusüberstände auf Basis des pRetroEBNA benutzt. Dies ist ein nicht selektionierbarer Retrovirusvektor, der besonders hohe Retrovirustiter erzielt, da sich das Plasmid in den Phoenixzellen episomal amplifiziert. Zur Herstellung der Überstände wurde genauso verfahren, wie bei den selektionierbaren Vektoren.

Die Effizienz der Transduktion wurde immer mittels Immunfluoreszenz überprüft. Meist wurde das Fremdgen in über 95% der Zielzellen exprimiert.

2.2.2.6 Infektion von Zellen

Zur Infektion der Zellen mit MCMV mussten diese subkonfluent sein. Für die meisten Experimente wurde eine definierte Zahl an Zellen ausgesät, um diese anschließend mit einer

definierten Menge Virus infizieren zu können, damit die MOI bei verschiedenen Viren und Versuchen konstant gehalten werden konnte. Eine Infektion mit MOI 3 TCID₅₀ stellte sicher, dass alle Zellen infiziert wurden, die Infektion mit niedrigeren MOIs wurde gewählt, um die Ausbreitung eines Virus in Zellkultur zu analysieren. Zur Infektion wurde das Virus auf die Zellen gegeben und mindestens 4 h gewartet, damit das Virus adhären konnte. Dann konnte ein Mediumwechsel erfolgen. Bei Viren, die auf dem MCMV-GFP-BAC basieren, konnte die Infektionseffizienz direkt (je nach MOI 3-12 h nach der Infektion) durch Analyse der GFP-Expression mittels Fluoreszenzmikroskop überprüft werden. Bei anderen rekombinanten Viren wurde die Infektion an Hand des CPEs überprüft.

2.2.2.6.1 Infektion von Zellen mit „Centrifugal Enhancement“

Die Infektiosität von MCMV kann durch Zentrifugation um 1 bis 1,5 log-Stufen erhöht werden. Dies wurde bei einigen Versuchen mit hoher MOI ausgenutzt. Hierfür wurde das Virus auf die Zellen gegeben und anschließend 30 min bei 37°C mit 1000g zentrifugiert. Da die Effizienz des „Centrifugal Enhancement“ zwischen unterschiedlichen Viruspräparationen schwankt, wurde für diese Versuche der Titer der Virusstocks auch mittels „Centrifugal Enhancement“ bestimmt.

2.2.2.7 Rekonstitution von rekombinanten Viren durch Transfektion von Zellen mit BAC-Konstrukten

Um rekombinante MCMV-BACs zu rekonstituieren, wurde die BAC-DNA mittels Polyfect in NIH3T3 Zellen transfiziert. Bei MCMV ist die BAC-DNA ausreichend, um eine Virusreplikation zu erzielen. Damit die Zellen nicht zu dicht wurden, mussten sie einige Male gesplittet werden, bis das Virus sich ausreichend ausgebreitet hatte.

2.2.2.8 Fixierung von Zellen auf Objektträgern

Hierfür wurden die Zellen subkonfluent auf sterilen Deckgläschen in 12-Well-Platten ausgesät. Nach einmaligem Waschen der Zellen mit PBS wurden sie mit 3%iger Paraformaldehydlösung für 20 min bei RT fixiert. Anschließend wurden die Zellen wiederum 2 mal mit PBS gewaschen und dann mit 50 mM NH₄Cl in PBS für 10 min bei RT inkubiert, um Autofluoreszenz zu dämpfen, die durch verbleibende Aldehydgruppen verursacht werden könnte. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Deckgläschen zum Schluss umgedreht und mit den Zellen nach unten in einen Tropfen Mountingmedium auf Objektträger gelegt. Nach dem Aushärten wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

2.2.2.9 Herstellung von Protein-Zelllysaten

Zur Herstellung von Zelllysaten wurden die Zellen einmal mit kaltem PBS gewaschen und dann ca. 350 µl pro 6-cm-Schale Tritonpuffer oder Säulen-Lysispuffer mit 1%NP40

zugegeben und die Zellen für 30 min auf Eis lysiert. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen vom Well gelöst und dann mit dem Lysispuffer in ein Eppendorfcup überführt. Durch Zentrifugation für 10 min bei 16100 g (4°C) wurden die Zellkerne und unlösliche Bestandteile abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit dem gleichen Volumen 2xPPP versehen und entweder direkt durch SDS-PAGE aufgetrennt oder für spätere Verwendung bei -20°C eingefroren.

Um sämtliche Zellbestandteile inklusive des Kerns zu lysieren, wurden die Zellen mit RIPA-Puffer ebenfalls für 30 min auf Eis lysiert. Anschließend wurden die Lysate auf Qias shredder geladen und ein bis zweimal für 2 min bei 16100 g zentrifugiert, um die hochmolekulare DNA zu zerkleinern. Anschließend wurde das Lysat wiederum mit dem gleichen Volumen 2xPPP versetzt.

Um Zellen nach der Einwirkung bestimmter Substanzen zeitgenau zu lysieren, wurde das Medium entfernt und die Zellen mit kochendem 2xPPP Probenpuffer (150 µl pro Well) geerntet. Anschließend wurden die Proben mit Ultraschall behandelt, um die hochmolekulare DNA zu zerkleinern.

2.2.2.10 Auftrennung von Proteinen aus Zelllysaten mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um Proteine aus Zelllysaten ihrer Größe nach aufzutrennen, wurden sie mittels SDS-PAGE separiert. Die Gelsysteme gibt es in unterschiedlichen Größen. Für Gele von einer Größe von 5 x 8,5 cm wurde das Biorad Mini Protean 3 Cell-System benutzt. Für 11 x 14 cm Gele wurde das SE 600 Ruby oder SE 410 System (GE Healthcare) benutzt. Für die SDS-PAGE-Gele wurde das Tris-Tricine-Puffersystem verwendet. Zum Herstellen des Trenn- (7,5 bis 10%) und Sammelgels (4%) wurden Rotiphoresegel 30, Tricinegelpuffer (1:3), Glycerin (10%) und Wasser so vermischt, dass ein Gel der gewünschten Prozentigkeit entsteht. Zum polymerisieren wurde dem Gel 0,1% Ammoniumpersulfat und 0,1% TEMED zugesetzt.

Die polymerisierten Gele wurden in das Gelsystem eingespannt und in Anoden- und Kathodenpuffer getaucht. Die Proben wurden zusammen mit einem Größenstandard auf das Polyacrylamidgel geladen und durch Anlegen eines Stroms zur Anode hin aufgetrennt. Bei Verwendung von kleinen Gelen wurde eine Spannung von 100 Volt angelegt. Bei Verwendung von großen Gelen wurde die Gelelektrophorese bei ca. 15-25 mA über Nacht durchgeführt. Das Rubysystem konnte verwendet werden, um Proben in großen Gelen schneller aufzutrennen. Hierfür wurden zwei Gele bei 200-300 mA bei 4°C laufen gelassen.

2.2.2.10.1 Anfärbung von Proteinen im Polyacrylamidgel mittels Silberfärbung

Für die Silberfärbung durften die Gele nicht dicker sein als 1 mm. Das Gel wurde 2 mal 4 min in 30% Ethanol/ 10% Essigsäure fixiert. Anschließend wurde es zur Quervernetzung der Proteine für 8 min in 0,5% Glutaraldehyd, 0,1% Natriumthiosulfat in 30% Ethanol und 70%

0,4 M Natriumacetatpuffer pH 6,0 inkubiert. Danach wurde das Gel 3 mal 3min und 2 mal 4 min mit Miliporewasser gewaschen. Anschließend wurde das Gel in 0,1%iger Silbernitratlösung mit 0,009% Formaldehyd für 10 min angefärbt. Die Entwicklung erfolgte durch ein- bis dreimalige kurze (20 sec) Inkubation und dann nach Sicht bis zu 10-minütiger Inkubation mit 2,5% Natriumcarbonat und 0,015% Formaldehyd. Sobald die Banden sichtbar waren, wurde die Entwicklung gestoppt durch 2 min Inkubation in 5% Essigsäure, 3 min Miliporewasser und 3 min 20 % Glycerol. Anschließend wurde das Gel kurz mit Miliporewasser abgespült und in Folie verpackt eingescannt.

2.2.2.10.2 Detektion von Proteinen mittels Western Blot

Die im Proteingel aufgetrennten Proteine wurden zunächst auf Nitrocellulosemembranen übertragen. Dies konnte entweder durch die Semi-dry-Blot-Methode oder durch die Tank-Blot-Methode erfolgen.

Für den Semi-dry-Blot wurden 10 Lagen Whatmanpapier und eine Nitrocellulosemembran in Gelgröße in Transferpuffer vorinkubiert. Das Blotsandwich, bestehend aus 5 Lagen Whatmanpapier, Nitrocellulosemembran, Gel und 5 Lagen Whatmanpapier, wurde zwischen die Elektroden der Semi-dry-Blotapparatur gelegt. Die Proteine wurden bei 1 mA pro cm² Membran für 1,5 bis 2,25h auf die Membran übertragen.

Für den Tankblot wurden vier Lagen Whatmanpapier in Towbin-Puffer und eine Nitrocellulosemembran in Gelgröße zunächst in Miliporewasser und dann in Towbin-Puffer vorinkubiert. Anschließend wurde das Blotsandwich folgendermaßen zusammen gebaut: Ein 3mm Schwamm, eine Lage Whatmanpapier, die Nitrocellulosemembran, das Gel, 3 Lagen Whatmanpapier und ein 3mm Schwamm wurden in die Halterung der Tankblot-Apparatur eingeklemmt. Das Blotsandwich wurde so in den Tankblot gehängt, dass die Nitrocellulosemembran zur Anode zeigte. Durch Anlegen des Stroms wurden alle Proteine, die bei dem pH-Wert des Towbinpuffers negativ geladen waren auf die Membran übertragen. Der Transfer erfolgte für 12 h bei 100 mA und 4°C.

Die Effizienz des Blotvorgangs konnte durch eine Ponceau-Färbung der Membran überprüft werden. Hierfür wurde die Membran kurz in Ponceau-S-Lösung gefärbt und anschließend mit Miliporewasser wieder entfärbt, um die gefärbten Proteinbanden sichtbar zu machen.

Für eine Anfärbung spezifischer auf die Membran geblotteter Proteine mit Antikörpern mussten unspezifische Bindungsstellen auf der Membran zunächst durch Blockierung mit proteinhaltigen Lösungen (BSA oder Magermilchpulver) abgesättigt werden. Die Wahl der Blockierungslösung erfolgte je nach Antikörper (siehe Tabelle). Die Blockierung erfolgte entweder für 1h bei RT oder über Nacht bei 4°C.

Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper für 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C. Die Verdünnung des Antikörpers und die Verdünnungslösung waren wiederum abhängig von der Wahl des Antikörpers (Tabelle). Nach der Inkubation wurde die

Material und Methoden

Membran dreimal kurz und dreimal 5 min mit Waschlösung (abhängig von der Wahl des primären Antikörpers, siehe Tabelle) gewaschen. Dann erfolgte die Inkubation mit dem sekundären HRP-gekoppelten Antikörper für 1 h bei RT und wiederum Waschschrte (dreimal kurz und 4 mal 10 min) mit der angegebenen Waschlösung. Die Detektion des an den sekundären Antikörper gekoppelten HRP erfolgte durch Zugabe von ECL-Detektionsreagenz. Hierfür wurden die beiden Komponenten vermischt und auf die Membran gegeben. Mit dem entstehenden Lichtsignal wurde ein Röntgenfilm belichtet. Die Entwicklung des Films erfolgte in einer Entwicklermaschine.

Wenn durch eine lange Belichtung mit ECL kein Signal auf der Membran detektiert werden konnte, wurde die Membran mit Advanced ECL oder einer Mischung aus normalem ECL und Advanced ECL behandelt und erneut das Lichtsignal mit einem Röntgenfilm detektiert.

Wenn ein Western Blot für eine weitere Anfärbung mit einem anderen Antikörper weiter verwendet werden sollte, so wurden zunächst die gebundenen Antikörper von der Membran durch „Strippen“ entfernt. Dies erfolgte durch eine 30 min Inkubation in Strippingpuffer bei 55°C und anschließendes Waschen mit PBS 0,5% Tween (3 mal kurz und 3 mal 15 min).

Antikörper	Verdünnung	Verdünnt in	Blockierung	Waschpuffer	Sekund. AK	Bemerkungen
Phospho-p38 MAPK	1:1000	1x TBS 0,1% Tween-20, 5% BSA	1x TBS 0,1% Tween-20, 5% BSA	1x TBS 0,1% Tween-20	Anti-rabbit HRP (Cell signaling) 1:3000	Proben müssen frisch sein, nicht einfrieren
I κ B- α (C-21)	1:2000	1x TBS 2% NFDM	1x TBS 2% NFDM	1x TBS 0,1% Tween-20	Anti-rabbit HRP (Cell signaling) 1:3000	TBS frisch angesetzt, Advanced ECL/ ECL 1:5 30 min Exposition
Rabbit anti-HA	1:1000	PBS 0,05% Tween-20	PBS 0,05% Tween-20, 5% NFDM	PBS 0,05% Tween-20	Anti-rabbit HRP (Cell signaling) 1:3000	
Anti-HA 16B12	1:1000	PBS 5% NFDM	PBS 5% NFDM	PBS 0,5% Tween-20	Anti-mouse HRP 1:1000	

Material und Methoden

Antikörper	Verdünnung	Verdünnt in	Blockierung	Waschpuffer	Sekund. AK	Bemerkungen
Anti-M45 crude serum	1:1000	PBS 5% NFDM	PBS 5% NFDM	PBS 0,5% Tween-20	Anti-rabbit HRP (Cell signaling) 1:3000	
Ub (P4D1)	1:500	1xTBS, 0,05% Tween-20, 2% NFDM	1xTBS, 0,05% Tween-20, 2% NFDM	1xTBS, 0,05% Tween-20	Anti-mouse HRP 1:1000	Blot vor der Blockierung in Millipore-Wasser autoklavieren
Anti-RIP (mouse)	1:2000	PBS	PBS 5% NFDM	PBS 0,1% Tween-20	Anti-mouse HRP 1:1000	
Anti-p38 (C-20)	1:1000	PBS 5% NFDM	PBS 5% NFDM	PBS 0,1% Tween-20	Anti-rabbit HRP (Dako) 1:1000	
Anti-β actin (AC-74)	1:10000	PBS 5% NFDM	PBS 5% NFDM	PBS 0,1% Tween-20	Anti-mouse HRP 1:1000	
Anti-Flag	1:2000	PBS 5% NFDM	PBS 5% NFDM	PBS 0,1% Tween-20	Anti-mouse HRP 1:1000	

2.2.2.11 Koimmunpräzipitation zur Untersuchung der Interaktion von Proteinen

Für die Koimmunpräzipitation wurden Zelllysate hergestellt, ähnlich der Lysate für Western Blot. Die Anzahl der Zellen für eine Probe und die Wahl des Lysispuffers unterschieden sich je nach kopräzipitiertem Protein (Tabelle). Abhängig von der Ko-IP erfolgt ein „Preclearing“-Schritt, wobei das Lysat (1 ml) mit 40 µl Protein-A- oder G-Sepharose für 0,5-1 h bei 4°C im Überkopf-Rotationsmischer rotiert wurde (Tabelle). Anschließend wurde die Sepharose verworfen und das gereinigte Lysat für die Ko-IP verwendet. Dafür wurde das Lysat mit ca. 2 µg des Antikörpers versetzt (Tabelle), gegen das Protein, welches präzipitiert werden sollte. Danach erfolgte wieder eine Inkubation bei 4°C im Überkopf-Rotationsmischer für 4-12h. Anschließend wurden 80 µl Protein-A- oder G-Sepharose pro Probe zugegeben und erneut für 2-4h bei 4°C überkopfgeschüttelt.

Anschließend wurden die Proben dreimal mit Waschpuffer B, zweimal mit Waschpuffer C und einmal mit Waschpuffer D gewaschen, indem die Sepharose jeweils 1 sec bei 13000 rpm abzentrifugiert wurde, der Überstand verworfen und die Sepharose im Waschpuffer aufgenommen wurde. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Puffer vollständig entfernt

und die Sepharose in 120 µl 2 x PPP aufgenommen und dann für 10 min bei 100°C aufgeköcht.

Die so von der Sepharose gelösten Proteine wurden zusammen mit normalen Westernblotproben der verwendeten Zelllysate auf ein großes SDS-Polyacrylamidgel geladen und aufgetrennt. Anschließend erfolgte ein Western Blot gegen das kopräzipitierte Protein.

Ko-IP	Zellzahl	Lysis-puffer	Pre-clearing	IP-Antikörper	WB-Antikörper	Sepharose	Waschen
HA→RIP	6-7 x10 ⁶	Lysis Säule 1% NP40	nein	Rabbit anti-HA 2,5 µg	Anti-RIP (mouse)	PAS	Wie beschrieben mit 0,2 % NP40
RIP→HA	6-7 x10 ⁶	Lysis Säule 1% NP40	ja	Rabbit anti-RIP 2 µg	Rabbit anti-HA	PAS	Wie beschrieben mit 0,2 % NP40
MycRIP →HA/ Ubiquitin	3,5 x10 ⁶	RIPA-Puffer und Qia-shredder	ja	Anti-Myc (4A6) 5µg	Rabbit anti-HA/ anti-Ub (P4D1)	PGS	2 x Wasch B 3 x Wasch C 1 x Wasch D mit 0,5% NP40

2.2.2.12 Aufreinigung von M45-TEV-HA aus Zelllysaten mittels Anti-HA-Affinitätssäulen

Für die Affinitätsaufreinigung des M45 Proteins und seiner Interaktionspartner wurden ca. 8×10^7 10.1 Zellen jeweils mit einer MOI von 1 TCID₅₀ mit MCMV-M45-TEV-HA oder MCMV-GFP infiziert. 48 h später wurden die Zellen mit Lysis-Puffer (50 mM Tris, pH 7,5; 150 mM NaCl; 2,5 % Nonidet P40, complete protease inhibitor cocktail) für 30 min auf Eis lysiert, abgeschabt und für 1 h bei 20 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde auf equilibrierte α-HA-3F10-Affinitätssäulen (Roche) (je 1ml abgesetzte Matrix mit 3,5 mg Antikörper) geladen. Die Säulen wurden mit 20 ml Waschpuffer (20 mM Tris, pH 7,5; 0,1 M NaCl; 0,1 M EDTA; 0,05% Tween-20) gewaschen. Anschließend wurden das M45-TEV-HA und assoziierte Proteine durch Verdau mit AcTEV-Protease (Invitrogen) spezifisch aus der Säule eluiert. 100 U der Protease wurden in 2,5 ml Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,5 mM EDTA; 1 mM DTT) zu der Säulenmatrix gegeben. Die Proben wurden für 1 h bei RT verdaut. Die eluierten Proben wurden mittels Chloroform-Methanol-Präzipitation gefällt und anschließend im Proteingel separiert. Das Gel wurde silbergefärbt und Banden, die spezifisch für die M45-

TEV-HA Probe waren, die nicht in der Kontrollprobe auftauchten, wurden ausgeschnitten und mittels Massenspektrometrie analysiert. Die massenspektrometrische Analyse (inklusive Probenaufreinigung, Silberfärbung und Ausschneiden der Banden) wurde im Labor von Albert Sickmann (Rudolf-Virchow-Zentrum, Würzburg) durchgeführt.

2.2.2.12.1 Proteinfällung durch Chloroform-Methanol-Präzipitation

Zu der proteinhaltigen Probe wurden 4 VT Methanol zugegeben und gevortext. Anschließend wurde 1 VT Chloroform zugegeben, wieder durch vortexen gemischt, 3 VT Miliporewasser zugegeben und erneut gemischt. Dann wurden die Proben für 1 min bei 14000 g zentrifugiert und die obere wässrige Phase wurde angenommen. Dann wurden 4 VT Methanol zugegeben, gevortext und für 2 min bei 14000 g zentrifugiert. Der Methanol wurde entfernt und die Pellets in der Speed-Vac getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in 2xPPP gelöst.

2.2.2.13 MTT-Test zur Bestimmung der Zellvitalität

Zur Analyse der Zellvitalität wurde ein MTT-Test durchgeführt. Dieser basiert auf einem Farbumschlag, der mittels Absorbanz gemessen wird. In vitalen Zellen wird der gelbe Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) durch zelluläre Reduktionsäquivalente NADH und NADPH zu Formazan reduziert. Der entstehende unlösliche blau-violette Farbstoff dient als Maß für die Zellvitalität. Der Test detektiert lediglich späte Phasen des Zelltods.

Für den MTT-Test wurden Zellen in 96-Well-Platten ausgesät, ggf. infiziert und mit unterschiedlichen Chemikalien behandelt. Die Messung der Zellvitalität erfolgte durch Inkubation der Zellen mit 0.5 mg/ml MTT in DMEM ohne Serum oder Antibiotika für 4 h. Anschließend wurde das MTT entfernt und die Zellen wurden durch Zugabe von 100 µl Ethanol/ DMSO (1:1) pro Well lysiert. Die Absorbanz wurde bei einer Wellenlänge von 570 nm mit einer Referenzwellenlänge von 670nm (bzw. mit einem vorherigen Filtersatz bei 560 und 650nm als Referenz) in einem Multiwellplatten-Absorbanz-Lesegerät (Spectrafluor Plus, Tecan, Schweiz) gemessen. Die Ergebnisse wurden entweder als absolute Absorbanzwerte (Absorbanz als Maß für die Vitalität) dargestellt oder als Prozent Vitalität im Vergleich zu Zellen mit Kontrollbehandlung und stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen von 4 bis 8 Parallelproben dar.

2.2.2.14 Luciferase-Assay zur Untersuchung der NF-κB-Aktivierung

Um die NF-κB-Aktivierung mit einem Reporter-Gen-Assay zu untersuchen, wurden 293 Zellen in 12-Well-Platten mit pTranslucent-NF-κB(2)-Reporter-Vector, pRSV-βGal, pFlagCMV1-huTLR3 (nur für die Analyse des TLR3-Signaling), pRK5-MycRIP und pcDNA-CrmA (nur für die Analyse der RIP1-Überexpression) sowie Expressionsvektoren für die zu

analysierenden Gene mittels Kalzium-Phosphat-Präzipitation transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen wie angegeben mit TNF- α oder poly(I:C) stimuliert oder unbehandelt gelassen. Anschließend wurden die Proben geerntet und mit dem Dual light luciferase and β -galactosidase assay kit (Applied Biosystems) nach den Angaben des Herstellers auf Luciferase- und β -Galactosidase-Expression untersucht. Hierfür wurden die Zellen eines Wells in 100 μ l Lysispuffer aufgenommen, die Zelltrümmer bei für 2 min bei 13000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde bei -80°C eingefroren. Für die Messung bei Raumtemperatur wurden 10 μ l jeder Probe in 96-Well-Lumineszenz-Platten überführt, anschließend wurden je 25 μ l Puffer A zugegeben. Die anschließende Zugabe von 100 μ l Puffer B mit Galacton-Plus Substrat (1:100) erfolgte durch den Injektor des Messgeräts (Mikrotiterplatten Luminometer MicroLumatPlus LB96V von EG&G Berthold, Australien). Die Messung der Lichtemission erfolgte direkt nach der Zugabe des Substrats bei einer Wellenlänge von 562 nm. Nach einer Inkubation von 45 min wurden je 100 μ l des Accelerator-II zugegeben und die Lichtemission der β -Galactosidase-Reaktion ebenfalls bei 562 nm gemessen. Alle Proben (induziert und uninduziert) wurden als Dreifachbestimmung gemessen und die Ergebnisse wurden als x-fache Erhöhung der Luciferase-Aktivität in induzierten Proben im Vergleich zu uninduzierten Proben mit der Standardabweichung als Fehlerindikator angegeben. Zum Ausgleich unterschiedlicher Transfektionseffizienzen wurden die Proben anhand der β -Galaktosidase-Aktivität normalisiert.

3 Ergebnisse

3.1 Die Rolle von M45 bei der Vermehrung des murinen Cytomegalovirus auf Endothelzellen

In vorherigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass verschiedene rekombinante murine Cytomegaloviren, denen ein vollständiges M45-Gen fehlte, nicht in der Lage waren, sich auf Endothelzellen oder Makrophagen auszubreiten. Dies wurde auf die vorzeitige Induktion des programmierten Zelltodes zurückgeführt, da Zellen, die mit den rekombinanten Viren infiziert waren, einen wesentlich höheren Anteil an apoptotischen Zellen aufwiesen als MCMVwt-infizierte Zellen (29). Mit den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen sollte der molekulare Mechanismus der Zelltod inhibition von M45 aufgeklärt werden.

3.1.1 Herstellung und Überprüfung einer M45-Revertante und verschiedener Substitutions-Mutanten

Für die Untersuchungen wurden zunächst verschiedene rekombinante Viren auf Basis der Δ M45-Deletionsmutante hergestellt. Zur Herstellung einer Revertante wurde das M45-Gen an ektope Position wieder in das Genom der Δ M45-Deletionsmutante eingefügt. Hierfür wurde das Gen unter Kontrolle eines konstitutiv-exprimierenden Phosphoglyceratkinase-Promotors (PGKp) durch homologe Rekombination in die m02-m06-Region des MCMV Δ M45-Genoms inseriert.

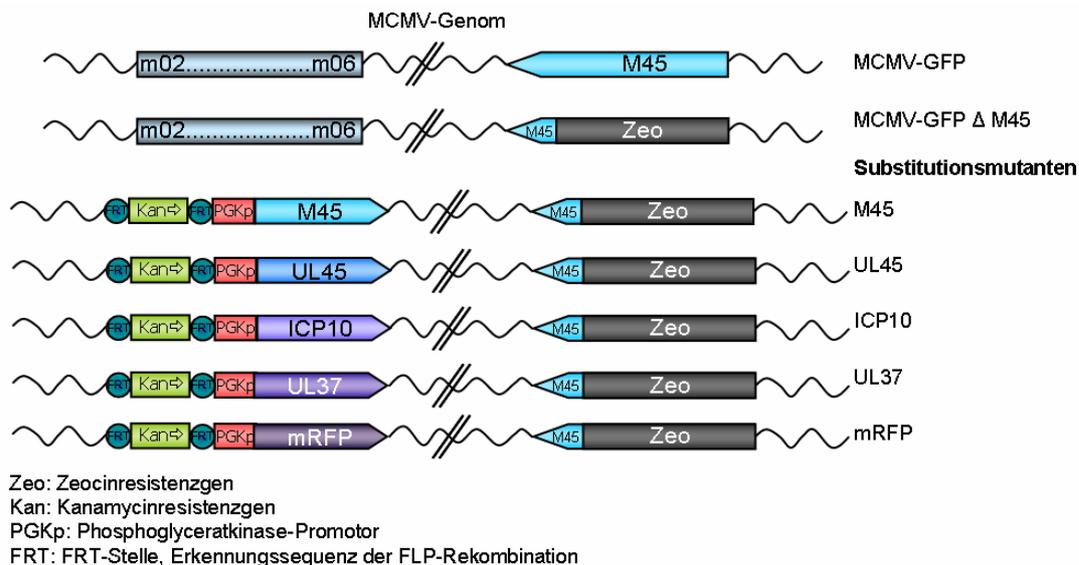
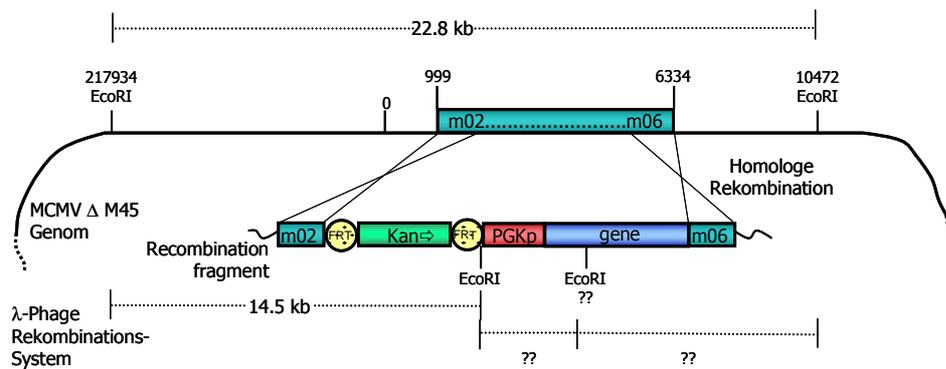


Abbildung 8: Schematische Darstellung der hergestellten rekombinanten MCMVs

Auf Grundlage der Δ M45-Deletionsmutante, welche an Stelle eines Großteils des M45-Gens ein Zeocinresistenzgen (Zeo) aufweist, wurden die M45-Revertante und die Substitutionsmutanten hergestellt. Hierfür wurden die neuen Gene mitsamt einem HA-Tag unter Kontrolle eines konstitutiv exprimierenden Phosphoglyceratkinase-Promotors (PGKp) zusammen mit einem Kanamycinresistenzgen (Kan) durch homologe Rekombination in die m02-m06-Genregion des Δ M45-Genoms eingefügt.

Ergebnisse

Des Weiteren war von Interesse, ob zwei virale Sequenzhomologe des M45, nämlich das UL45-Gen von HCMV und das ICP10-Gen von HSV 2, denen, wie in der Einleitung besprochen, ebenfalls eine antiapoptotische Funktion zugesprochen wurde, die Funktion von M45 ersetzen können. Daher wurden noch weitere Substitutionsmutanten hergestellt, bei denen das HCMV UL45 und das HSV 2 ICP10 ebenfalls in die m02-m06-Genregion der Δ M45-Deletionsmutante eingefügt wurden. Als Kontrollen wurden noch ein anderes antiapoptotisches Gen, das UL37x1 des HCMV, welches ein gut charakterisierter viraler mitochondrialer Apoptoseinhibitor (vMIA) ist, sowie ein weiteres irrelevantes Protein (mRFP) in das Genom inseriert.



Veränderungen im EcoRI Restriktionsmuster bei den Rekombinanten

Alle Rekombinanten	Inseriertes Gen	Genspezifische Änderung
- 22.8 kb	+ 14.5 kb	M45 + 6.8 kb + 1.5 kb
		UL45 + 7.5 kb
		ICP10 + 8.2 kb
		UL37 + 5.2 kb

Abbildung 9: Schematische Darstellung der Konstruktion der Substitutionsmutanten

Die Revertante und die Substitutionsmutanten wurden mittels homologer Rekombination zwischen einem linearen DNA-Fragment und dem Genom der Δ M45-Deletionsmutante, welches als BAC (bacterial artificial chromosome) kloniert in *E. coli* DH10B vorlag, hergestellt. Das zu inserierende DNA-Fragment wurde flankiert von zwei 50-bp-langen Homologieregionen zur m02-m06-Genregion des MCMV-Genoms. Die berechneten Änderungen, die sich durch die Rekombination im EcoRI-Verdau ergaben, sind unten in der Abbildung angegeben.

Durch die homologe Rekombination ergaben sich in den rekombinanten BACs im Vergleich zu dem parentalen BAC bestimmte Änderungen im Restriktionsmuster, welche sich bei Kenntnis der genauen Sequenzen berechnen lassen (Abbildung 9).

Die neu hergestellten rekombinanten BAC-Genome wurden mittels EcoRI-Restriktionsanalyse überprüft. Die erwarteten Änderungen des Bandenmusters sind in dem DNA-Agarose-Gel in Abbildung 10 zu erkennen, was darauf hindeutet, dass eine erfolgreiche Rekombination stattgefunden hat.

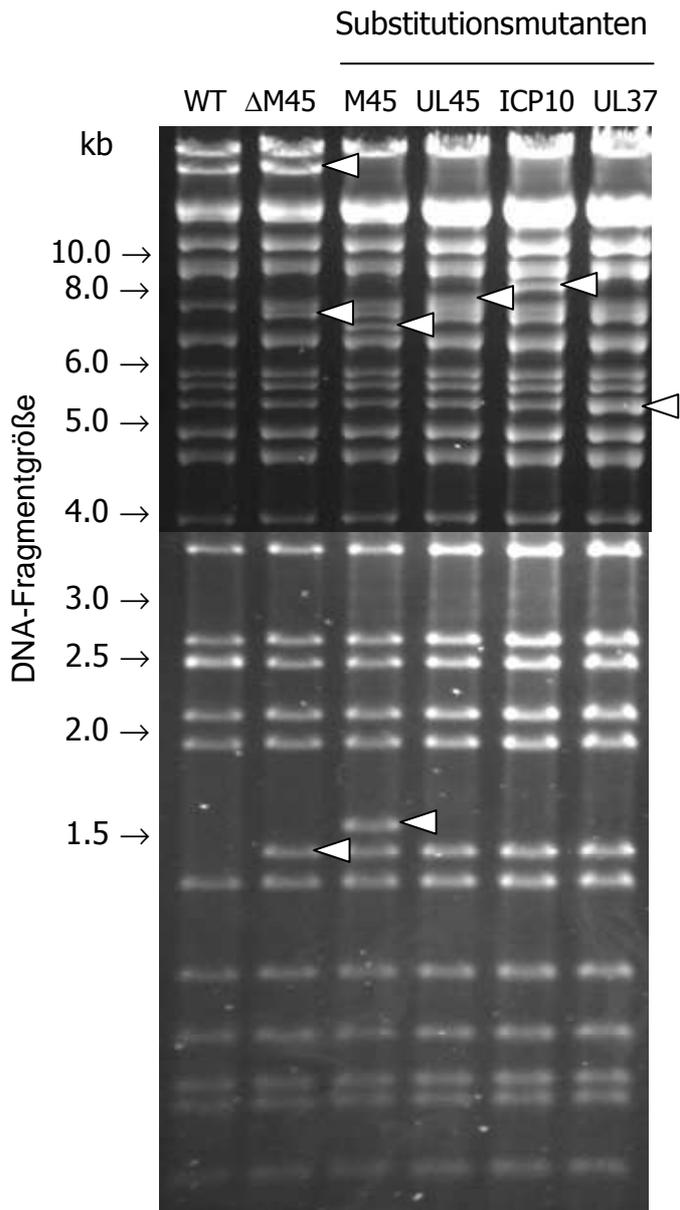


Abbildung 10: EcoRI-Restriktionsanalyse der BAC-Genome der M45-Revertante sowie der Substitutionsmutanten im Vergleich zu Δ M45 und dem MCMVwt

Die durch homologe Rekombination gewonnenen rekombinanten Virusgenome (kloniert als BAC) wurden durch EcoRI-Restriktionsanalyse der BAC-DNA untersucht. Das DNA-Agarosegel zeigt die erwarteten Änderungen im Bandenmuster (Pfeile) der M45-Revertante und der verschiedenen Substitutionsmutanten im Vergleich zum MCMVwt und der Δ M45-Deletionsmutante.

Um zu überprüfen, ob bei den rekombinanten MCMVs die neu inserierten HA-getaggten Gene exprimiert werden, wurde ein Western Blot mit Zelllysaten aus infizierten 10.1 Zellen durchgeführt. Die Anfärbung mit einem α -HA-Antikörper zeigte bei allen Virusmutanten Banden, die, aufgrund ihrer Höhe, der erwarteten Größe des exprimierten Proteins entsprachen (Abbildung 11).

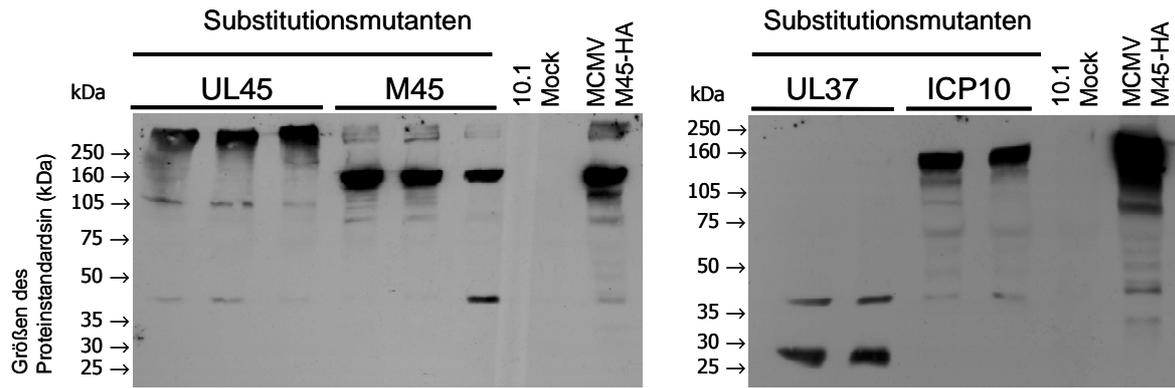


Abbildung 11: Expression der HA-getaggtten Proteine der rekombinanten MCMVs in infizierten 10.1 Zellen

Die 10.1 Zellen wurden mit einer MOI von 1 TCID₅₀ infiziert und nach 24h mit Triton-Puffer geerntet. Als Kontrolle wurden Zelllysate von Zellen, die mit einer *in situ* getaggtten M45-HA-Virusmutante infiziert waren, sowie von Mock-infizierten Zellen aufgetragen. Von den rekombinanten Viren wurden jeweils zwei oder drei Klone verwendet. Der Western Blot wurde mit einem α -HA-Antikörper (16B12) angefärbt. Die verschiedenen HA-getaggtten Proteine zeigten im Western Blot Banden, die der erwarteten Größe des exprimierten Proteins entsprachen. Bei der Expression von UL45-HA ist zu beachten, dass ein Großteil des Proteins vermutlich aufgrund der Aggregation mit anderen Proteinen nicht richtig in das Gel gelaufen war, und daher ein starkes Signal am oberen Rand des Gels ergab. Die korrekte Bande zeigte sich bei 105 kDa.

3.1.2 Analyse der Vermehrung der Virusmutanten auf Endothelzellen

Die M45-Revertante sowie die verschiedenen Substitutionsmutanten wurden hinsichtlich ihrer Replikationseigenschaften im Vergleich zu dem MCMVwt-Virus und der Δ M45-Deletionsmutante untersucht.

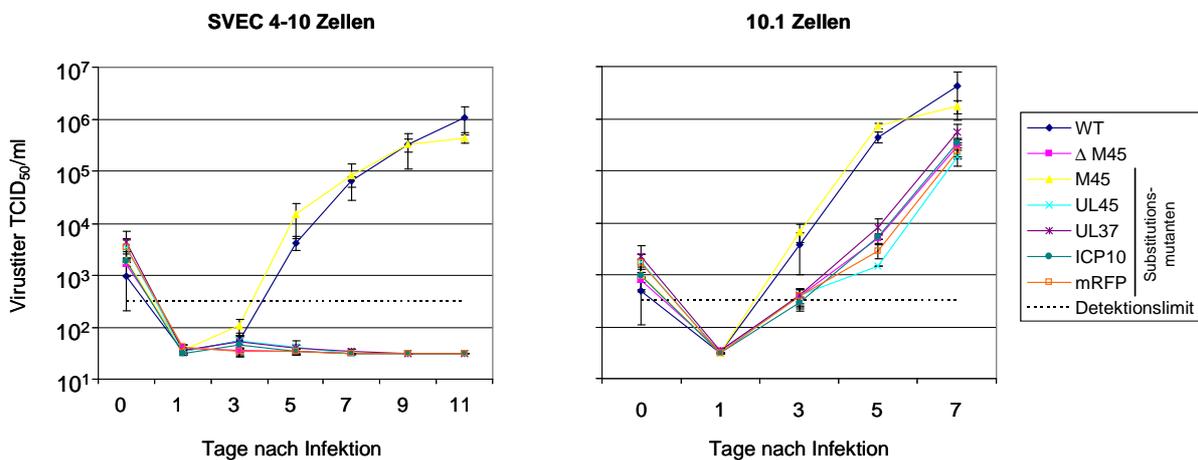


Abbildung 12: Wachstumsanalyse der M45-Revertante und der Substitutionsmutanten im Vergleich zu MCMVwt und Δ M45-Deletionsmutante auf 10.1 Fibroblasten und SVEC4-10 Endothelzellen

Für die Wachstumsanalyse wurden 1×10^5 10.1 bzw. SVEC4-10 Zellen/Well einer 6-Well-Platte ausgesät und gleichzeitig mit einer MOI von 0,05 TCID₅₀ für 10.1 Zellen bzw. 0,1 TCID₅₀ für SVEC4-10 Zellen infiziert. Nach 1, 3, 5, 7, 9 und 11 Tagen wurden Proben des Überstandes entnommen und mittels Endpunktverdünnungsmethode die mittlere „Zellkultur infektiöse Dosis“ (TCID₅₀) ermittelt. Die angegebenen Virustiter sind ein Maß für die Menge an neu gebildeten infektiösen Viruspartikeln. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte und Standardabweichung von drei parallelen Proben. Die M45-Revertante weist vergleichbare Wachstumseigenschaften zum MCMVwt auf, wohingegen die Substitutionsmutanten ein Wachstum aufweisen, das der Δ M45-Mutante entspricht.

Die Wachstumsanalyse wurde zum einen auf SVEC4-10 Endothelzellen durchgeführt, die die Ausbreitung der Δ M45-Deletionsmutante nicht unterstützen (29). Zum anderen wurde eine Wachstumsanalyse auf 10.1 Fibroblasten gemacht, auf denen der Wachstumsdefekt der Δ M45-Deletionsmutante voraussichtlich weniger stark ausgeprägt sein sollte.

Die Wachstumskurven zeigten deutlich, dass der in SVEC4-10 Zellen stark ausgeprägte und in 10.1 Fibroblasten weniger stark ausgeprägte Wachstumsdefekt der Δ M45-Deletionsmutante nur durch die Reinsertion des M45-Gens wieder ausgeglichen werden konnte, da nur die M45-Revertante in beiden Zelltypen die gleiche Vermehrungsfähigkeit wie MCMVwt aufwies. Alle anderen Substitutionsmutanten wiesen in beiden Wachstumskurven ein Wachstum auf, welches dem der Deletionsmutante entsprach (Abbildung 12). Die Insertion der M45-Sequenz-Homologe von HCMV (UL45) und HSV 2 (ICP10), sowie des antiapoptotischen Gens UL37 x 1 von HCMV war nicht in der Lage, den Wachstumsdefekt der Deletionsmutante zu kompensieren. Dies zeigt, dass trotz großer Sequenzhomologie eine entscheidende Eigenschaft des M45-Gens, die für das Wachstum auf Endothelzellen essentiell ist, nicht von den beiden Sequenzhomologen geteilt wird.

3.2 Ursachen für den Wachstumsdefekt der Δ M45-Mutante auf Endothelzellen

Auch die Abbildung 13 zeigt, dass nur Viren, die funktionsfähiges M45 exprimierten, in der Lage waren, sich von ursprünglich infizierten SVEC4-10 Zellen auf benachbarte Zellen auszubreiten. Bei den anderen Virusmutanten schienen die infizierten Zellen abzusterben und es erfolgte keine Ausbreitung des Virus in der Zellkultur.

Ausbreitung der Substitutionsmutanten auf SVEC4-10 Endothelzellen

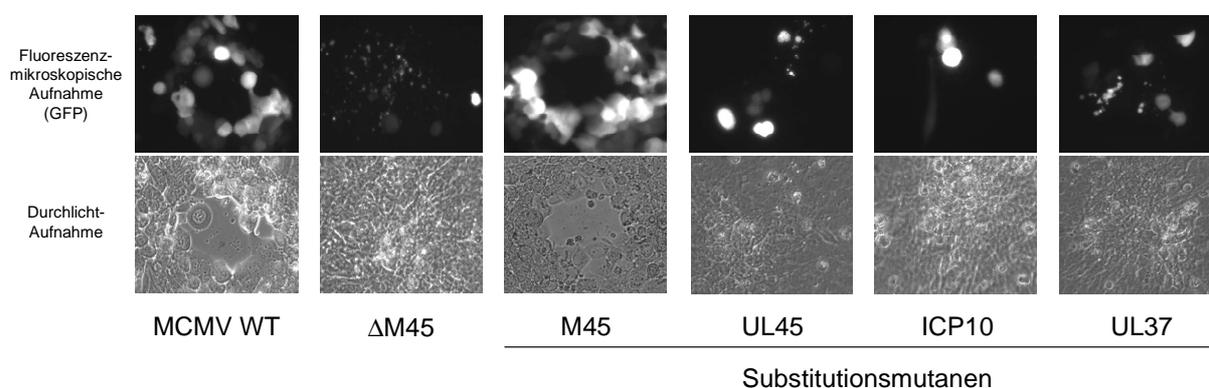


Abbildung 13: Ausbreitung der rekombinanten Viren in SVEC4-10 Endothelzellen

Die Abbildung zeigt Fluoreszenz- und Durchlicht-Aufnahmen der Ausbreitung der GFP-exprimierenden Viren 5 Tage nach Infektion mit MOI 0,1 TCID₅₀.

Wenn man Δ M45-infizierte SVEC4-10 Endothelzellen im Vergleich zu MCMVwt-infizierten Zellen unter dem Mikroskop betrachtet, so wird deutlich, dass ein Großteil der Δ M45-infizierten Endothelzellen kurze Zeit nach der Infektion massivem Zelltod unterliegt.

Der verstärkt auftretende Zelltod könnte die Ursache für den Wachstumsdefekt der Δ M45-Deletionsmutante auf Endothelzellen sein. Wenn die anfänglich infizierte Zelle abstirbt, bevor der virale Replikationszyklus abgeschlossen ist, kann sich das Virus nicht auf benachbarte Zellen ausbreiten.

Es gibt jedoch eine weitere Möglichkeit, wie es zur Auslösung des Zelltodes und zur beeinträchtigten Vermehrung der Δ M45-Deletionsmutante auf den Endothelzellen kommen kann. Diese basiert darauf, dass M45 zusätzlich oder ausschließlich eine direkte Funktion im viralen Reproduktionszyklus hat, wie zum Beispiel beim Eintritt und intrazellulären Transport der Viruspartikel oder bei der Ausschleusung neu gebildeter Viren. Die folglich beeinträchtigte Produktion von Nachkommenviren könnte die Ursache für die beeinträchtigte Ausbreitung in Endothelzellkulturen sowie für die Auslösung des Zelltodes sein. Der verstärkte Zelltod würde hierbei nur als Konsequenz der beeinträchtigten Replikation entstehen. So wäre es denkbar, dass eine starke Akkumulation von neu gebildeten Viruspartikeln, denen es nicht möglich ist, aus der Zelle zu gelangen, den Zelltod auslöst.

Um näher einzugrenzen, wodurch der beobachtete Zelltod ausgelöst wurde, sind Zellvitalitätstests durchgeführt worden. Hierfür wurden verschiedene Schritte im viralen Replikationszyklus blockiert, und anschließend wurde untersucht, ob die Infektion der Zellen mit der Δ M45-Deletionsmutante unter diesen Bedingungen immer noch Zelltod auslöste.

Bei der Inhibition der viralen Transkription durch UV-Inaktivierung des Virus und bei der Inhibition viraler und zellulärer Transkription durch Vorbehandlung der infizierten Zellen mit Actinomycin D konnte der virusinduzierte Zelltod der Δ M45-Deletionsmutante verhindert werden. Wenn allerdings nur die virale und zelluläre Translation durch Behandlung der Zellen mit Cycloheximid verhindert wurde, ließ sich der Δ M45-induzierte Zelltod kaum inhibieren (Abbildung 14). Dies lässt vermuten, dass die durch virale Transkription gebildete dsRNA der vorwiegende Auslöser für den Zelltod in Δ M45-infizierten Zellen ist. Es kann über eine geringfügige Beteiligung des durch Translation viraler Proteine verursachten ER-Stresses an dem Δ M45-induzierten Zelltod spekuliert werden, da bei MCMVwt- und Mock-infizierten Zellen die Zellvitalität bei Behandlung mit Cycloheximid deutlich abnahm, aber bei der Vitalität der Δ M45-infizierten Zellen eine geringfügige Steigerung zu beobachten war (Abbildung 14). Vielleicht haben sich hier eine Beeinträchtigung der generellen Zellvitalität durch Behandlung mit Cycloheximid und eine geringfügige Verhinderung des durch Δ M45 induzierten Zelltodes durch die Cycloheximid-Behandlung kompensiert.

Ergebnisse

Die virale Replikation hingegen ist keine Voraussetzung für die Induktion des Zelltodes durch die Δ M45-Deletionsmutante. Dies zeigte sich daran, dass der Δ M45-induzierte Zelltod nicht durch die Vorbehandlung der Zellen mit PAA, welches die MCMV-Replikation unterbindet, verhindert werden konnte (Abbildung 14).

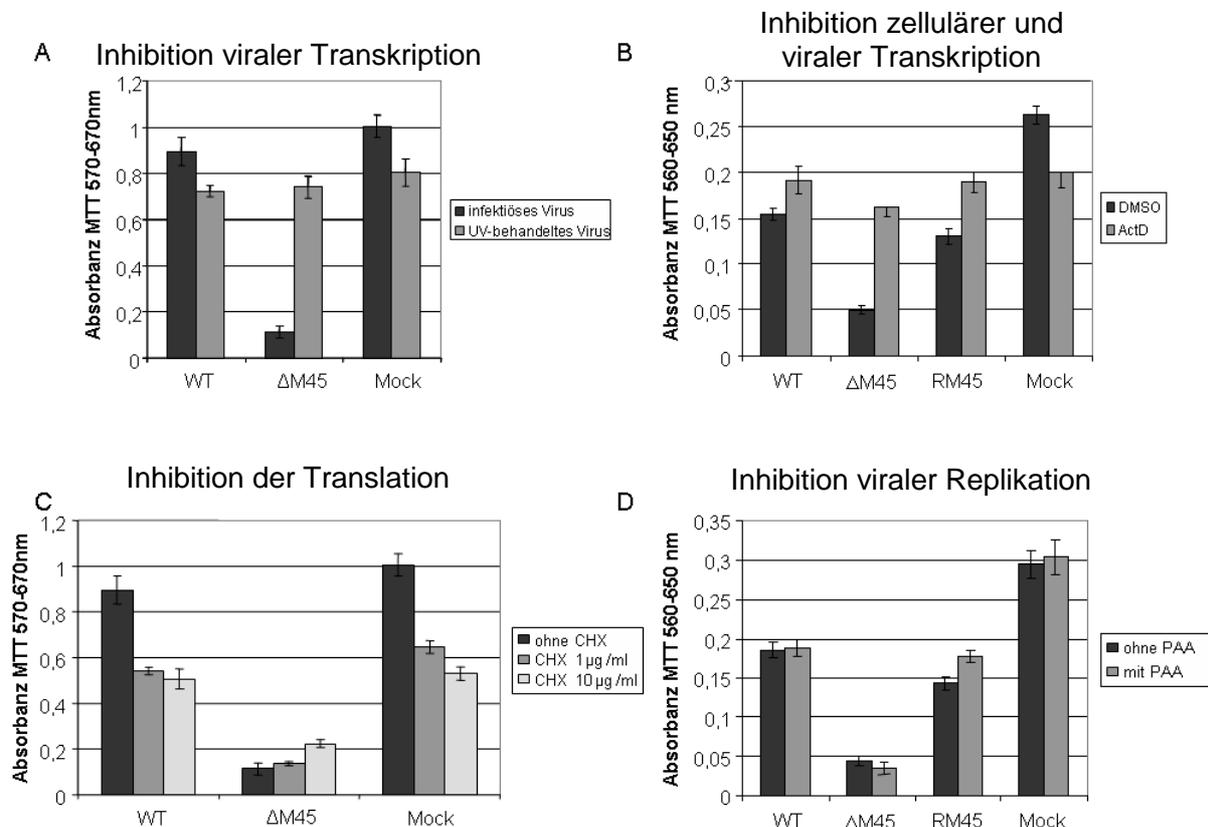


Abbildung 14: Abhängigkeit des Δ M45-induzierten Zelltodes von viraler oder zellulärer Transkription, Translation und viraler Replikation

Die Abbildungen zeigen die Vitalität von SVEC4-10 Zellen (A und C) und 10.1 Zellen (B und D), die mittels „Centrifugal Enhancement“ mit einer MOI von 3 TCID₅₀ mit MCMVwt, Δ M45, der M45-Revertante (RM45) oder Mock infiziert wurden. 30 min vor der Infektion sowie während der Infektion wurden die Zellen mit einem Inhibitor der Transkription (Actinomycin D [ActD], 1 μ g/ml), einem Inhibitor der Translation (Cycloheximid [CHX], 1 bzw. 10 μ g/ml) und einem Inhibitor viraler Replikation (phosphono acetic acid [PAA], 400 μ g/ml) behandelt. Zur Inhibition viraler Transkription wurde das Virus mit UV-Bestrahlung inaktiviert. Die Analyse der Zellvitalität erfolgte 20 Stunden nach Infektion mittels MTT-Test. Die Abbildungen zeigen die absoluten Absorbanzwerte als Maß für die Zellvitalität. Es ist zu erkennen, dass der durch Δ M45 induzierte Zelltod durch UV-Inaktivierung des Virus, ActD-Behandlung, nicht aber durch PAA- oder CHX-Vorbehandlung verhindert werden konnte.

Dieses Ergebnis zeigt auch, dass eine Akkumulation von neu synthetisierten Viruspartikeln als Grund für den Δ M45-induzierten Zelltod ausgeschlossen werden kann, da dieser Zelltod durch eine Behandlung mit PAA inhibiert werden würde.

3.2.1 Analyse der Funktion von M45 beim viralen Eintritt mit Hilfe der M32-GFP-Mutanten

Da vermutet wurde, dass M45 eventuell eine zusätzliche Funktion beim viralen Eintritt oder der Ausschleusung neu gebildeter Viruspartikel hat, wurden zur Analyse einer solchen

Funktion Virusmutanten hergestellt, in denen das virale Gen M32 mit GFP fusioniert ist. Das M32-Genprodukt, ist ein Tegumentprotein, welches sehr dicht mit dem Kapsid assoziiert ist und welches auch während des Eintritts- und Ausschleusungsprozesses mit dem Kapsid assoziiert bleibt. Die Fusion dieses Gens mit GFP ist eine Möglichkeit, Virusmutanten mit fluoreszierend markierten Kapsiden herzustellen, was bei HCMV (UL32) schon erfolgreich durchgeführt wurde (225). Um die Rolle von M45 beim viralen Eintritt zu untersuchen, wurde eine M32-GFP-Mutante sowohl mit als auch ohne funktionelles M45-Gen hergestellt. Auf diese Weise sollte das Eintrittsverhalten der beiden Mutanten verglichen werden. Die Herstellung der rekombinanten Viren erfolgte mittels homologer Rekombination eines linearen DNA-Fragments, welches neben den 50-bp-Homologieregionen einen GFP-Tag und eine Kanamycin-Resistenz-Kassette aufwies, mit dem MCMV-BAC. Das lineare Fragment wurde durch PCR-Amplifikation hergestellt. Auf Basis des MCMV M32-GFP Virus wurde die Deletion des M45-Gens durch Insertion einer Zeocinresistenz wie beschrieben durchgeführt (30).

Die hergestellten Virusmutanten wurden ebenfalls durch EcoRI-Restriktionsanalyse untersucht, um festzustellen, ob die durchgeführten Rekombinationen erfolgreich waren (Abbildung 15).

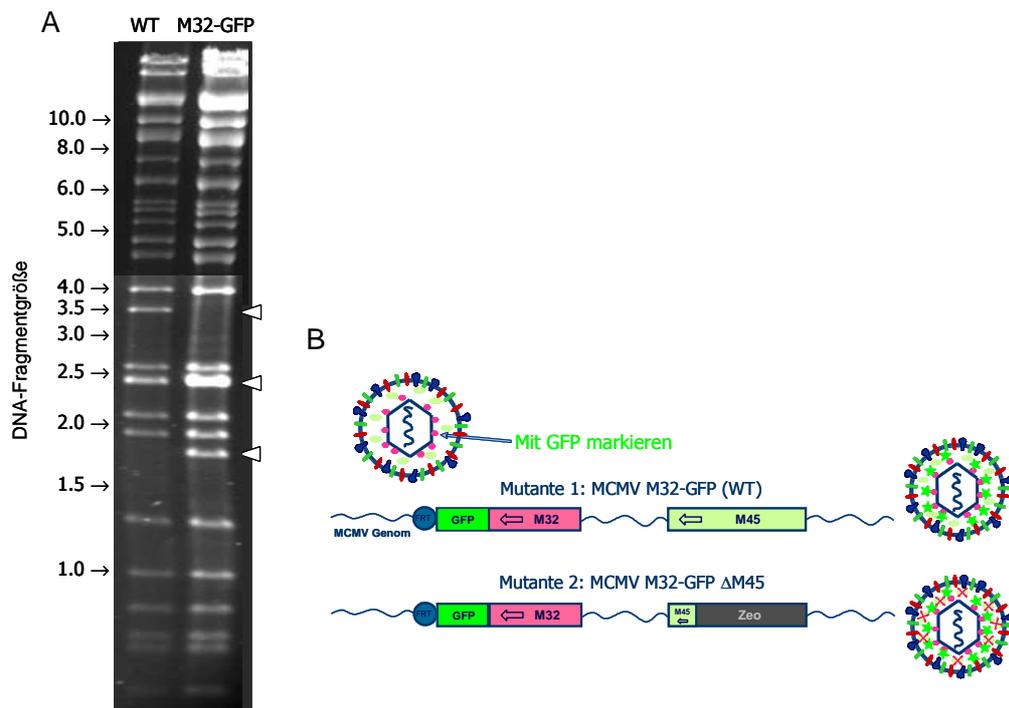


Abbildung 15: Herstellung der MCMV M32-GFP-Mutanten mit und ohne funktionelles M45

(A) Die durch homologe Rekombination gewonnenen rekombinanten Virusgenome (kloniert als BAC) wurden durch EcoRI-Restriktionsanalyse der BAC-DNA untersucht. Das DNA-Agarosegel zeigt die erwarteten Änderungen im Bandenmuster (Pfeile) der MCMV M32-GFP-WT Mutante im Vergleich zum MCMV WT. Abbildungsteil B zeigt die schematische Darstellung der M32-GFP-Mutanten mit und ohne funktionelles M45. Die Fusionierung von GFP an das M32-Gen im viralen Genom bewirkt, dass die gebildeten Viruspartikel fluoreszierend markierte Kapside aufweisen. Dies ermöglicht den Vergleich der beiden Virusmutanten mit und ohne M45-Gen hinsichtlich ihres Eintritts- und Austrittsverhaltens in infizierten Zellen.

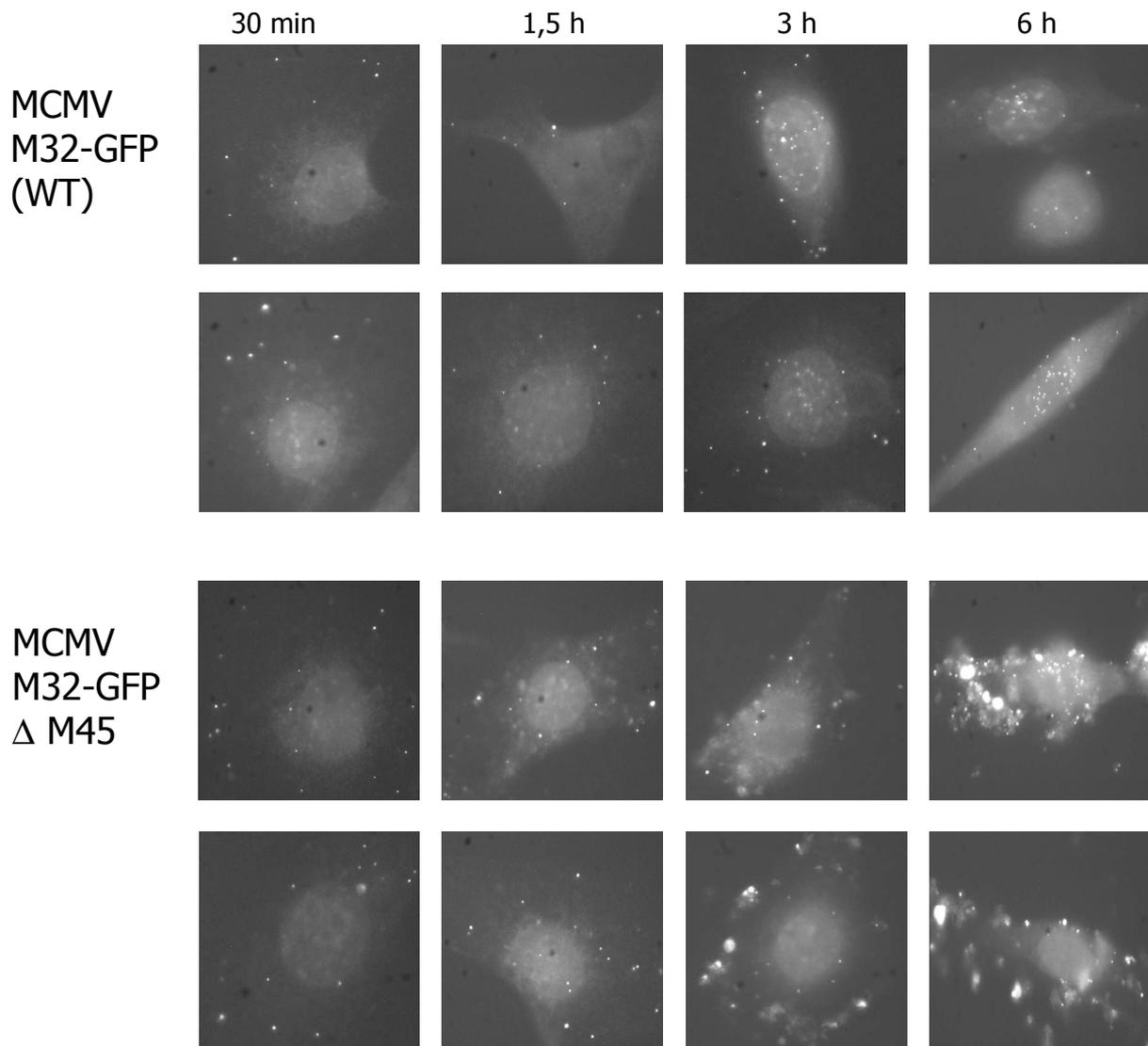


Abbildung 16: Mikroskopische Analyse des Eintrittsverhaltens der M32-GFP-Mutanten mit und ohne M45

Die Bilder zeigen je zwei repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von fixierten Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Infektion mit MOI 1 TCID₅₀ mit beiden Virusmutanten. Die Zellen sind durch ihre Autofluoreszenz zu erkennen, die stark fluoreszierenden Punkte stellen Viruspartikel dar.

Die beiden fluoreszierend markierten Virusmutanten wurden benutzt, um SVEC4-10 Endothelzellen zu infizieren. Anschließend wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion die Zellen fixiert und die fluoreszierenden Viruspartikel unter dem Mikroskop analysiert. Hierbei konnte kein nennenswerter Unterschied zwischen den beiden Virusmutanten hinsichtlich ihres Eintrittsverhaltens beobachtet werden (Abbildung 16). Daher wurde es als unwahrscheinlich erachtet, dass eine Beeinträchtigung des Kapsidtransports für die massive Zelltod-Induktion verantwortlich ist. Aus diesem Grund konzentrierten sich die weiteren Untersuchungen auf die Funktion von M45 bei der Inhibition des programmierten Zelltodes.

3.2.2 Fehlende Inhibition des programmierten Zelltodes als Grund für den Replikationsdefekt der Δ M45-Deletionsmutante

Wie in den vorangegangenen Absätzen beschrieben kann auch eine fehlende Zelltod-Inhibition ein möglicher Grund für die beeinträchtigte Vermehrung einer Virusmutante sein. Langsam replizierende Viren, wie die Cytomegaloviren, müssen die Induktion des programmierten Zelltodes als natürlichen Abwehrmechanismus der Zellen unterbinden, um eine erfolgreiche Replikation und Ausbreitung des Virus zu gewährleisten. Tritt der Tod der infizierten Zelle ein, bevor der Replikationszyklus des Virus abgeschlossen ist, so können keine fertigen Nachkommenviren freigesetzt werden und die Ausbreitung auf Nachbarzellen ist unterbunden.

Um festzustellen, ob bei der Δ M45-Deletionsmutante der Zelltod vor Abschluss des Replikationszyklus eintritt, wurde der Zeitpunkt der Zelltod-Auslösung der verschiedenen Virusmutanten in 10.1 Fibroblasten und SVEC4-10 Endothelzellen untersucht.

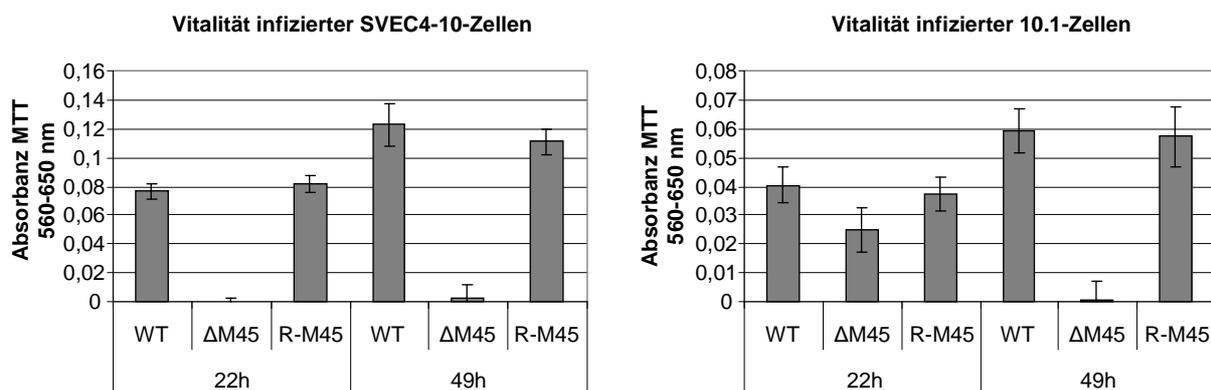


Abbildung 17: Zeitpunkt der Zelltodinduktion bei verschiedenen M45-Mutanten in SVEC4-10 und 10.1 Zellen

Die Abbildungen zeigen die Vitalität infizierter SVEC4-10 und 10.1 Zellen 22 und 49 Stunden nach Infektion. Die Zellen wurden mittels „Centrifugal Enhancement“ mit einer MOI von 3 TCID₅₀ mit MCMVwt, M45-Revertante (R-M45) und Δ M45 infiziert und die Vitalität zu den angegebenen Zeitpunkten mittels MTT-Test analysiert. Dargestellt sind die absoluten Absorbanzwerte als Maß für die Zellvitalität.

Diese Untersuchung zeigte, dass in SVEC4-10 Zellen schon 22 Stunden nach der Infektion mit Δ M45 alle Zellen abgestorben waren. Im Unterschied hierzu waren zu diesem Zeitpunkt noch alle infizierten 10.1 Zellen vital (Abbildung 17). Dies deutete darauf hin, dass die schnellere Induktion des Zelltodes in SVEC4-10 Zellen tatsächlich die Ursache für die verhinderte Ausbreitung sein könnte, da der Zelltod schon vor Abschluss des Replikationszyklus (ca. 24h) eintrat. In 10.1 Zellen war ein deutlicher Zelltod der Δ M45-infizierten Zellen erst nach einer Infektionsdauer von 49 Stunden zu erkennen. Da auch zu diesen späteren Zeitpunkten noch Nachkommenviren produziert werden, steht dies in Übereinstimmung mit der leichten Wachstumsbeeinträchtigung dieser Virusmutante in 10.1 Zellen.

3.3 Inhibition des TNF- α -induzierten Zelltodes durch M45

Um die mögliche Funktion von M45 in der Zelltod-Inhibition näher zu untersuchen, wurden infizierte Zellen mit verschiedenen Zelltod-induzierenden Chemikalien behandelt. Hierbei wurden Chemikalien ausgewählt, die bekanntermaßen über den intrinsischen Weg Zelltod auslösen (STS und ActD) oder solche, die Todesrezeptor-vermittelten Zelltod verursachen (TNF- α und FasL), um näher eingrenzen zu können, in welchen Signalweg M45 möglicherweise eingreift.

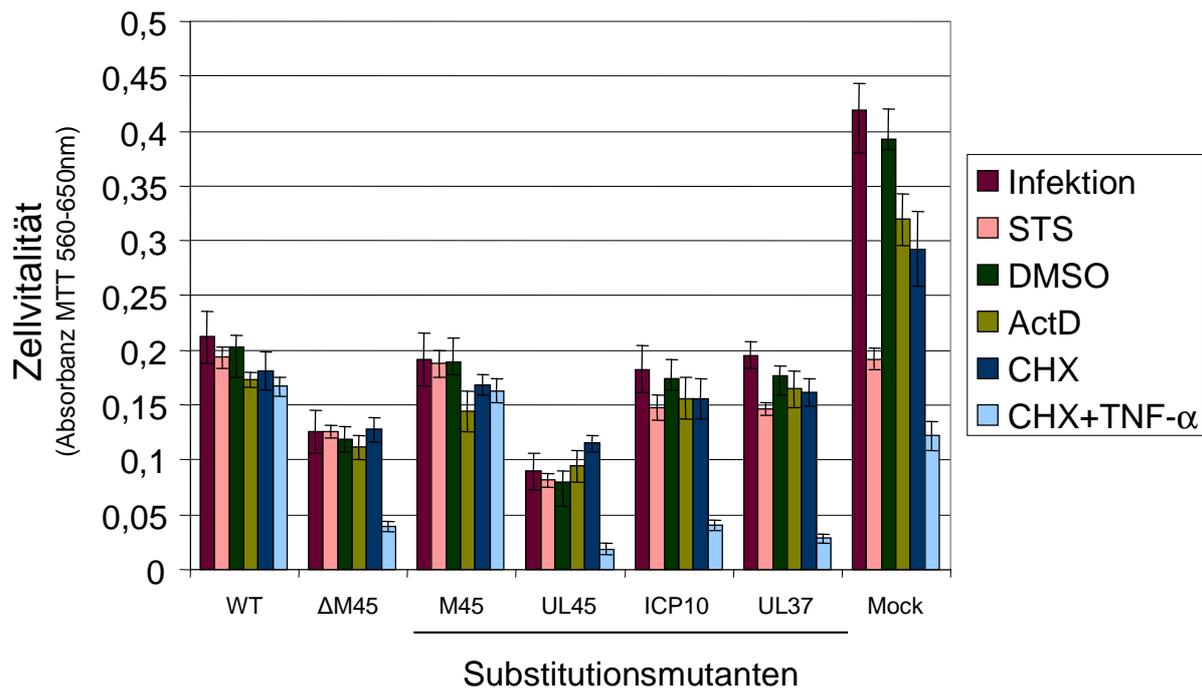


Abbildung 18: M45 schützt vor TNF- α -induziertem Zelltod

Die Abbildung zeigt die Vitalität infizierter 10.1 Zellen, die mit verschiedenen Zelltod-induzierenden Chemikalien behandelt wurden. 10.1 Zellen wurden mit einer MOI von 3 TCID₅₀ mittels „Centrifugal Enhancement“ infiziert. Nach sechs Stunden wurden die Virusüberstände abgenommen und die Chemikalien (150 nM STS, 0,2 μ g/ml ActD, 250 ng/ml CHX, 20ng/ml murines TNF- α) in angegebener Konzentration verdünnt in Zellkulturmedium auf die Zellen gegeben. Als Kontrolle für das ActD wurde eine entsprechende Verdünnung von DMSO angesetzt, die Kontrolle für TNF- α mit CHX sind Zellen, die nur mit CHX behandelt wurden. 21 Stunden später wurde die Vitalität mittels MTT-Test bestimmt. Bei allen Virusmutanten lag ein Schutz gegenüber Chemikalien vor, die über den intrinsischen Weg Apoptose auslösen (STS und ActD). Hingegen vermittelten nur die Virusmutanten mit funktionsfähigem M45 einen Schutz gegenüber TNF- α -induziertem Zelltod.

Bei diesen Versuchen wurde deutlich, dass M45 offenbar keine Rolle spielt bei der Blockierung des intrinsischen (mitochondrialen) Apoptoseweges, da alle Virusmutanten einheitlich gegenüber Staurosporin und Actinomycin D geschützt waren. Hingegen wiesen alle rekombinanten Viren, denen M45 fehlte, eine starke Sensitivität gegenüber TNF- α auf (Abbildung 18). Dies deutet darauf hin, dass M45 im viralen Kontext benötigt wird, um TNF- α -induzierten Zelltod zu blockieren.

Ergebnisse

Um zu überprüfen, ob M45 generell eine Rolle im Todesrezeptor-vermittelten Zelltod spielt, wurden infizierte Zellen auch mit einem α -Fas-Antikörper behandelt, welcher über die Stimulation des Fas-Rezeptors Zelltod auslöst.

Die Untersuchungen ergaben, dass die Δ M45-infizierten Zellen ebenfalls eine erhöhte Sensitivität gegenüber Fas-Rezeptor-vermitteltem Zelltod aufwiesen (Abbildung 19). Der Effekt war hierbei weniger stark ausgeprägt, als bei TNF- α -Behandlung. Ein möglicher Grund hierfür ist, dass die Stimulation der Fas-Rezeptoren offenbar langsamer Zelltod auslöst. In dieser Zeit war die Vitalität der Δ M45-infizierten 10.1 Zellen schon stark durch den virusinduzierten Zelltod vermindert, so dass der Effekt der Fas-Rezeptor-Stimulation nicht deutlich hervortrat.

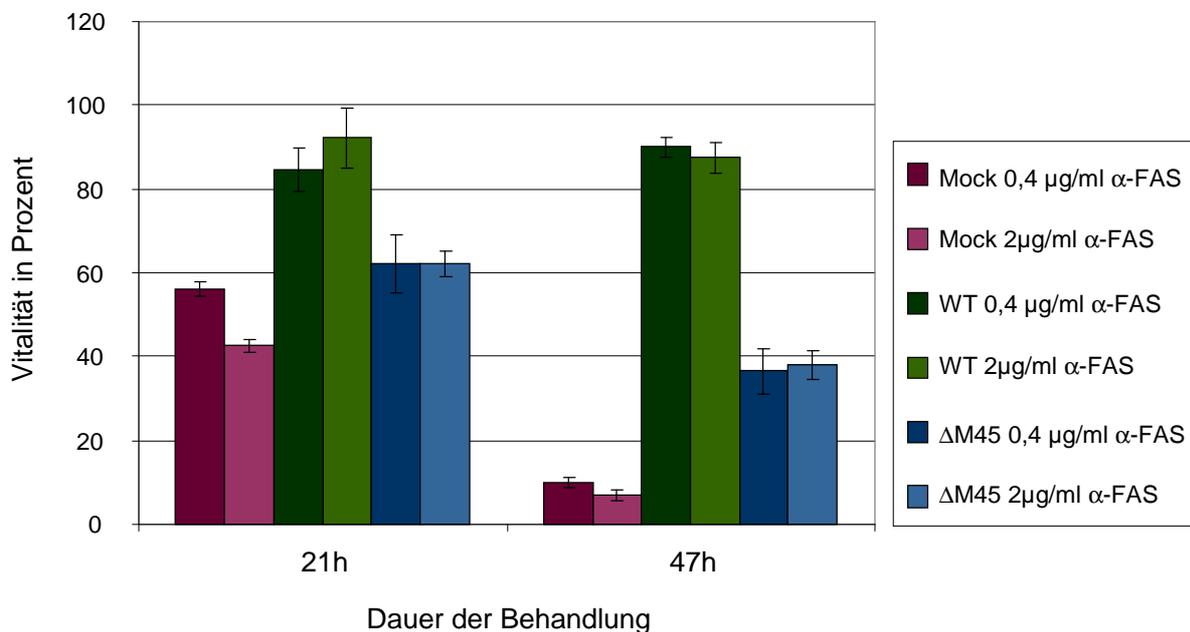


Abbildung 19: Inhibition des Fas-Rezeptor-induzierten Zelltodes durch M45

10.1 Zellen wurden mit einer MOI von 3 TCID₅₀ mittels „Centrifugal Enhancement“ mit MCMVwt und Δ M45 infiziert. Vier Stunden nach der Infektion wurde der Virusüberstand entfernt und die Zellen mit einem α -Fas-Antikörper (0,4 bzw. 2 µg/ml) und Cycloheximid (500 ng/ml) behandelt. 21 bzw. 47 Stunden nach der Behandlung wurde die Zellvitalität mittels MTT-Test bestimmt. Dargestellt ist die Vitalität (%) im Verhältnis zu unbehandelten Kontrollzellen. Hierbei zeigte sich eine leicht erhöhte Sensitivität der Δ M45-infizierten Zellen gegenüber Fas-Rezeptor-vermitteltem Zelltod.

Das Ergebnis, dass M45 im viralen Kontext benötigt wird, um vor Todesrezeptor-vermitteltem Zelltod zu schützen, ist überraschend, weil MCMV mit dem M36-Gen bereits einen viralen Caspase-8-Inhibitor (vICA, viral Inhibitor of Caspase activation) exprimiert, welcher infizierte Zellen vor Rezeptor-vermittelter Apoptose schützen sollte (51, 179). Um zu überprüfen, ob tatsächlich beide Proteine, M45 und M36, eine Rolle bei der Inhibition des Todesrezeptor-vermittelten Zelltodes spielen, wurde als Kontrolle eine weitere Virusmutante hergestellt, der das M36-Gen fehlt (170). Diese wurde zusammen mit der Δ M45-Mutante und MCMVwt in weiteren Zelltod-Assays untersucht.

Ergebnisse

In diesen Versuchen zeigte sich, dass offenbar beide Gene, sowohl M45 als auch M36, während der Virusinfektion benötigt werden, um die Zellen vor TNF- α -vermitteltem Zelltod zu schützen, da beide Deletionsmutanten (Δ M45 und Δ M36) eine starke Sensitivität gegenüber TNF- α -induziertem Zelltod aufwiesen (Abbildung 20). Zudem konnte beobachtet werden, dass im Rahmen der Virusinfektion offensichtlich im Unterschied zu uninfizierten Zellen keine zusätzliche Translationsinhibition durch Cycloheximid (CHX) benötigt wird, damit die Zellen an TNF- α -induziertem Zelltod sterben. Daher wurde in diesem Versuch bei den infizierten Zellen auf Zugabe von CHX verzichtet, da dies eher den natürlichen Bedingungen während einer Infektion entspricht. Um die Funktionalität des TNF- α in den uninfizierten Zellen zu überprüfen, wurde bei diesen CHX zugegeben, da sie sonst nicht sterben würden.

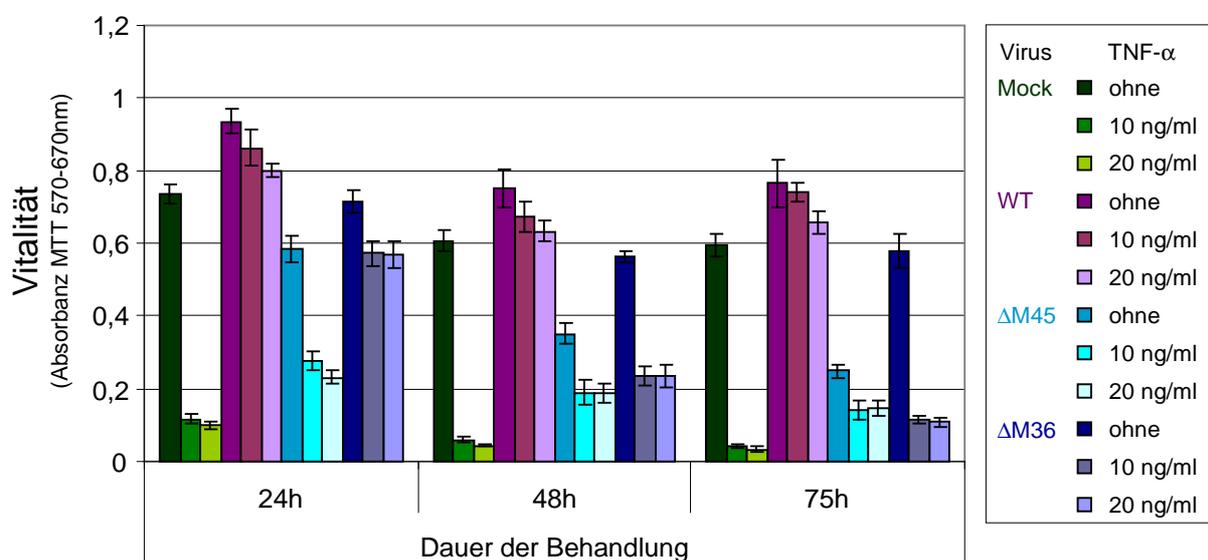


Abbildung 20: Protektion vor TNF- α -induziertem Zelltod durch M45 und M36

Die Abbildung zeigt die Vitalität infizierter Zellen nach TNF- α -Behandlung. Die 10.1 Zellen wurden mit einer MOI von 3 TCID₅₀ mittels „Centrifugal Enhancement“ mit MCMVwt, Δ M45 und Δ M36 infiziert und gleichzeitig wurden die Zellen mit den angegebenen Konzentrationen von TNF- α behandelt. Nach 24, 48 und 75 Stunden wurde die Zellvitalität mittels MTT-Test bestimmt. Dargestellt sind die absoluten Absorbanzwerte als Maß für die Zellvitalität. Die uninfizierten Kontrollzellen wurden zusätzlich mit CHX (500 ng/ml) behandelt, da diese sonst im Unterschied zu infizierten Zellen nicht an TNF- α -Stimulation sterben.

Ein weiterer auffälliger Unterschied zwischen den beiden Virusmutanten konnte in diesem Versuch beobachtet werden. Die Δ M45-Deletionsmutante verursachte nach 48-stündiger Infektion einen deutlichen virusinduzierten Zelltod, wohingegen die Δ M36-Deletionsmutante in den infizierten Zellen auch nach 75 Stunden Infektion keinen erhöhten Zelltod auslöste (Abbildung 20). Dies lässt den TNF- α -induzierten Zelltod in den Δ M36-infizierten Zellen fälschlicherweise stärker erscheinen als in den Δ M45-infizierten Zellen. Zudem wird deutlich, dass der TNF- α -induzierte Zelltod im Falle der Δ M45-Deletionsmutante wesentlich schneller

eintrat. Nach 24 Stunden wiesen die Zellen eine deutlich reduzierte Vitalität auf, wohingegen der TNF- α -induzierte Zelltod bei der Δ M36-Deletionsmutante erst nach 48 Stunden eintrat.

Angesichts dieser Unterschiede ist es denkbar, dass es sich bei den beiden Virusmutanten um zwei unterschiedliche Arten von TNF- α -induziertem Zelltod handelt.

Daher sollte untersucht werden, ob der Zelltod in beiden Fällen Caspase-abhängig ist. Hierfür wurden infizierte Zellen zusätzlich zu TNF- α mit dem synthetischen Pan-Caspase-Inhibitor Z-VADfmk behandelt.

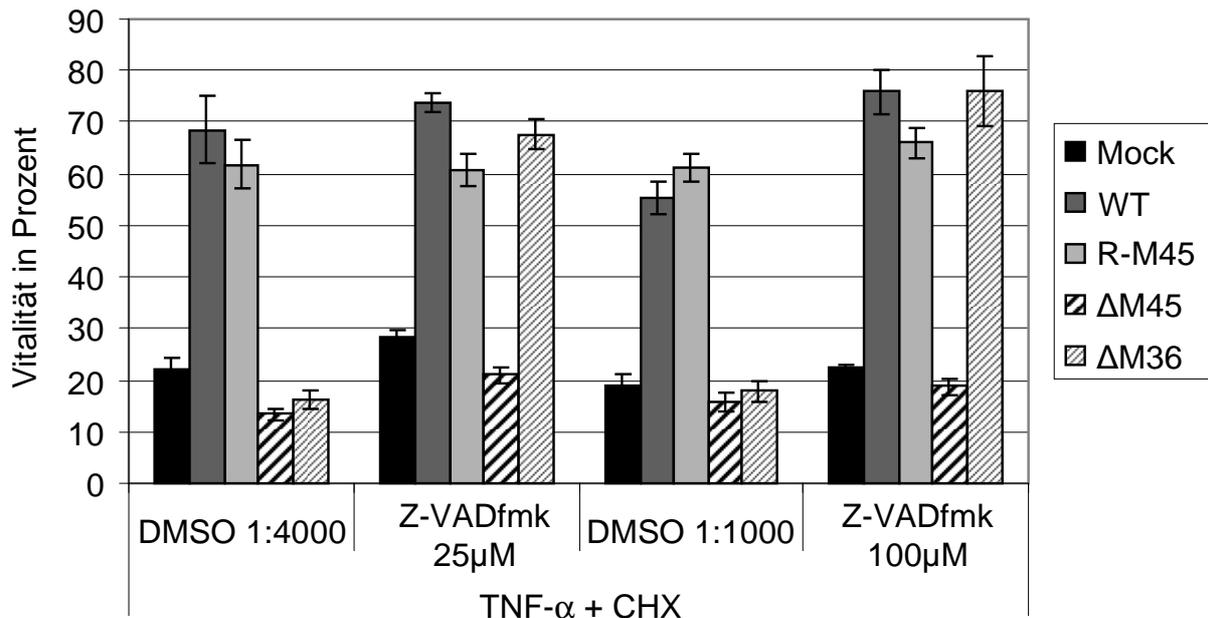


Abbildung 21: Caspase-Abhängigkeit des TNF- α -induzierten Zelltodes bei Δ M45- und Δ M36-infizierten Zellen

Die 10.1 Zellen wurden mit einer MOI von 3 TCID₅₀ mittels „Centrifugal Enhancement“ infiziert und nach vier Stunden wurde der Virusüberstand wieder entfernt. Die Zellen wurden dann mit TNF- α (20ng/ml), CHX (500ng/ml) und Z-VADfmk (25 bzw. 100 μ M) behandelt. Als Kontrolle für das in DMSO gelöste Z-VADfmk wurden Zellen mit TNF- α , CHX und DMSO behandelt. Nach 20 Stunden wurde die Vitalität mittels MTT-Test bestimmt. Angegeben ist die relative Vitalität (%) bezogen auf unbehandelte Kontrollzellen. (R-M45= M45-Revertante)

Die Untersuchung zeigte wie erwartet, dass der TNF- α -induzierte Zelltod im Falle der Δ M36-Mutante Caspase-abhängig war, da er durch den Pan-Caspase-Inhibitor Z-VADfmk blockiert werden konnte. Im Gegensatz dazu erfolgte der TNF- α -induzierte Zelltod im Falle der Δ M45-Mutante Caspase-unabhängig, er war nicht durch Verwendung des synthetischen Caspase-Inhibitors (bis zu der maximal einsetzbaren Konzentration von 100 μ M) zu blockieren (Abbildung 21). In anderen Untersuchungen zeigte sich sogar, dass Δ M45-infizierte und mit TNF- α behandelte Zellen in Gegenwart von Z-VADfmk einen verstärkten Zelltod im Vergleich zu der Kontrolle mit TNF- α und DMSO aufwiesen. Dies zeigt, dass tatsächlich beide Proteine, M36 und M45, während der Virusinfektion zum Schutz vor TNF- α -vermitteltem Zelltod benötigt werden. Offenbar blockieren sie zwei unterschiedliche, parallel existierende Wege, die Caspase-abhängige Apoptose und einen Caspase-unabhängigen Zelltod.

3.4 RIP1 als Interaktionspartner von M45

3.4.1 Identifikation von Interaktionspartnern von M45 mittels Affinitätsaufreinigung

Um näheren Aufschluss darüber zu bekommen, wie M45 in den TNF- α -induzierten Caspase-unabhängigen Zelltod eingreift, wurde M45 aus infizierten Zellen aufgereinigt, um mögliche virale oder zelluläre Interaktionspartner zu identifizieren. Hierfür wurde ein rekombinantes Virus hergestellt, bei dem die Sequenz einer TEV-(tobacco etch virus)-Protease-Schnittstelle sowie eine HA-Tag-Sequenz an das 3'-Ende des M45-Gens angefügt wurden. Mit diesem Virus konnte M45 in großem Maßstab aus infizierten Zellen über α -HA-Affinitätssäulen aufgereinigt werden. Hierbei bindet M45 mit dem HA-Tag an die Säule, anschließend können das gebundene M45 sowie dessen Interaktionspartner spezifisch aus der Säule eluiert werden, indem M45 durch Verdau mit einer TEV-Protease von seinem HA-Tag abgetrennt wird (Abbildung 22).

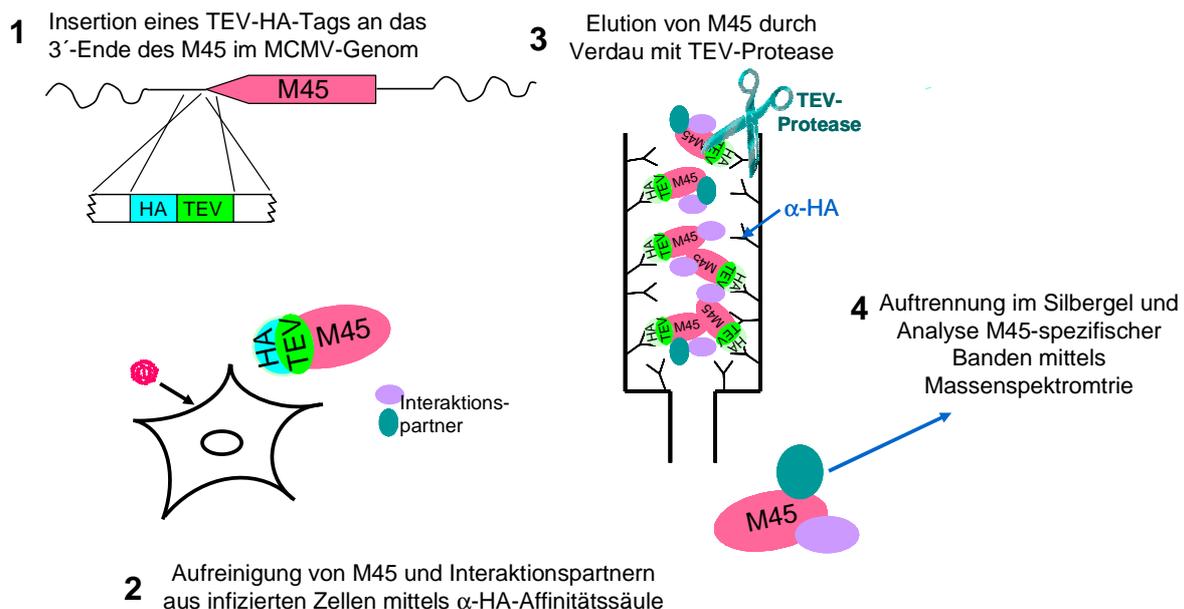


Abbildung 22: Prinzip der Affinitätsaufreinigung von M45 zur Identifikation von Interaktionspartnern

Für die Affinitätsaufreinigung wurde ein rekombinantes Virus hergestellt, in dessen Genom dem 3'-Ende des M45-Gens ein, durch eine TEV-Schnittstelle abtrennbarer, HA-Tag angefügt wurde. Somit konnte M45-TEV-HA aus infizierten Zellen über eine α -HA-Affinitätssäule aufgereinigt werden. Die spezifische Elution von M45 und Interaktionspartnern erfolgte durch Verdau mit rekombinanter TEV-Protease. Die eluierten Proben (M45-TEV-HA und Kontrollvirus ohne Tag) wurden im Proteingel aufgetrennt, mittels Silberfärbung angefärbt und Banden, die spezifisch für die M45-TEV-HA-Probe waren, ausgeschnitten und durch Massenspektrometrie analysiert.

Das rekombinante Virus wurde hinsichtlich seiner Funktionalität getestet. Um sicher zu stellen, dass das Anfügen eines 20-Aminosäuren-langen TEV-HA-Tags an den C-Terminus des 1174-Aminosäuren-langen M45 nicht dessen Funktion inhibiert, wurde das Wachstum

Ergebnisse

des rekombinanten Virus auf SVEC4-10 Endothelzellen untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Funktion von M45 nicht durch den Tag beeinträchtigt wurde, da das Wachstum dem des MCMV/wt entsprach.

Des Weiteren musste überprüft werden, ob der HA-Tag tatsächlich durch Zugabe der TEV-Protease von M45 entfernt werden konnte. Hierfür wurde M45 mit dem TEV-HA-Tag (sowie zum Vergleich mit normalem HA-Tag ohne TEV-Schnittstelle) aus infizierten Zellen mittels Immunpräzipitation aufkonzentriert und anschließend durch Zugabe der TEV-Protease und Verdau bei unterschiedlichen Temperaturen von seinem HA-Tag getrennt.

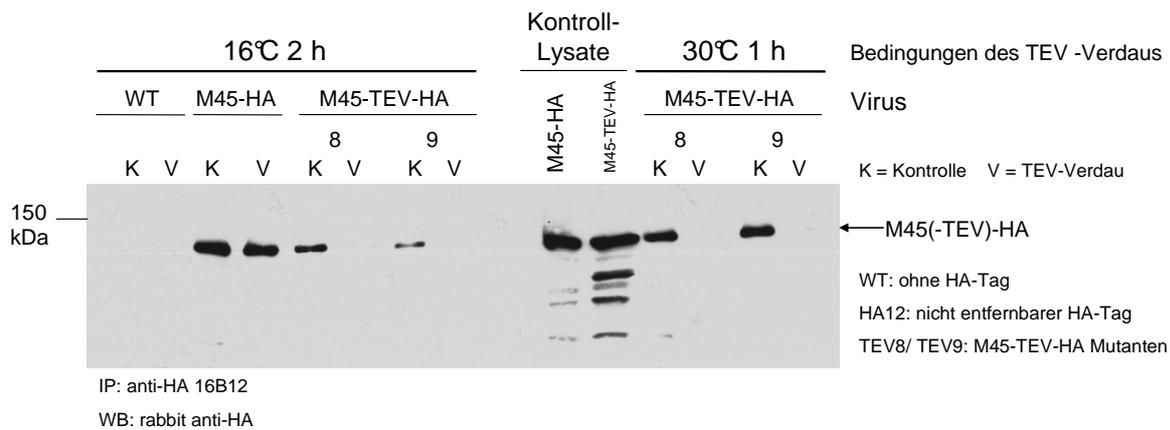


Abbildung 23: Überprüfung der Abtrennbarkeit des TEV-HA-Tags von zwei rekombinanten Viren

Der Western Blot zeigt die unverdauten (K) und die bei verschiedenen Bedingungen mit TEV-Protease verdauten (V) Proben aus Immunpräzipitationen infizierter Zellen. Hierbei wurden Zelllysate verwendet von Zellen, die mit den rekombinanten Viren infiziert waren (M45-TEV-HA 8 und 9 [zwei Klone]) oder mit Kontrollviren, die einen nicht verdaubaren HA-Tag (M45-HA) oder gar keinen Tag aufwiesen. Hierfür wurden je 1 6-Well-Platte 10.1 Zellen mit einer MOI von 3 TCID₅₀ mittels „Centrifugal Enhancement“ infiziert, nach 24 Stunden mit Lysispuffer mit 1% NP40 geerntet und mit 10 µg/ml α-HA 16B12 und Protein-G-Sepharose eine IP durchgeführt. Die vier Proben wurden dann mit den IP-Waschpuffern mit 0,2 % NP40 gewaschen und die Pellets anschließend je in 300 µl TEV-Puffer mit DTT aufgenommen, in vier Portionen aufgeteilt und zu der einen Hälfte der Proben wurden dann je 20 Units TEV-Protease zugegeben. Der Verdau erfolgte entweder bei 16°C für 2 h oder bei 30°C für 1 h. Die unverdauten Proben wurden entsprechend behandelt. Anschließend wurden die Proteine durch Aufkochen mit SDS-Probenpuffer von der Sepharose gelöst. Die Anfärbung des Western Blots erfolgte mit polyklonalem α-HA-Antikörper (Kaninchen).

Bei Analyse dieser Proben in einem α-HA Western Blot zeigte sich, dass bei den TEV-verdauten Proben (V) im Unterschied zu den unverdauten Kontrollproben (K) das Signal des M45-TEV-HA verschwindet, da der Tag entfernt worden ist. Im Unterschied hierzu erfolgte bei den M45-HA-Proben keine Entfernung des HA-Tags durch Verdau mit der TEV-Protease, da diese keine TEV-Schnittstelle aufweisen (Abbildung 23).

An den Ergebnissen kann man erkennen, dass beide Klone des rekombinanten MCMV M45-TEV-HA (8 und 9) sowohl bei einstündigem Verdau bei 30°C als auch bei zweistündigem Verdau bei 16°C effektiv von dem HA-Tag getrennt werden konnten. Daher konnte davon ausgegangen werden, dass die Aminosäuresequenz der Schnittstelle für die TEV-Protease

Ergebnisse

zugänglich war und dass die rekombinanten Viren daher für eine Affinitätsaufreinigung geeignet waren.

Für die Affinitätsaufreinigung von M45-TEV-HA wurden 8×10^7 10.1 Zellen mit einer MOI von 1 TCID₅₀ mit MCMV M45-TEV-HA oder MCMV-GFP als Kontrolle infiziert. 48 h später wurden die Zelllysate über α -HA-Affinitätssäulen aufgereinigt und durch Verdau mit der TEV-Protease eluiert. Die Eluate wurden auf einem Proteingel aufgetrennt und die Proteine durch Silberfärbung sichtbar gemacht.

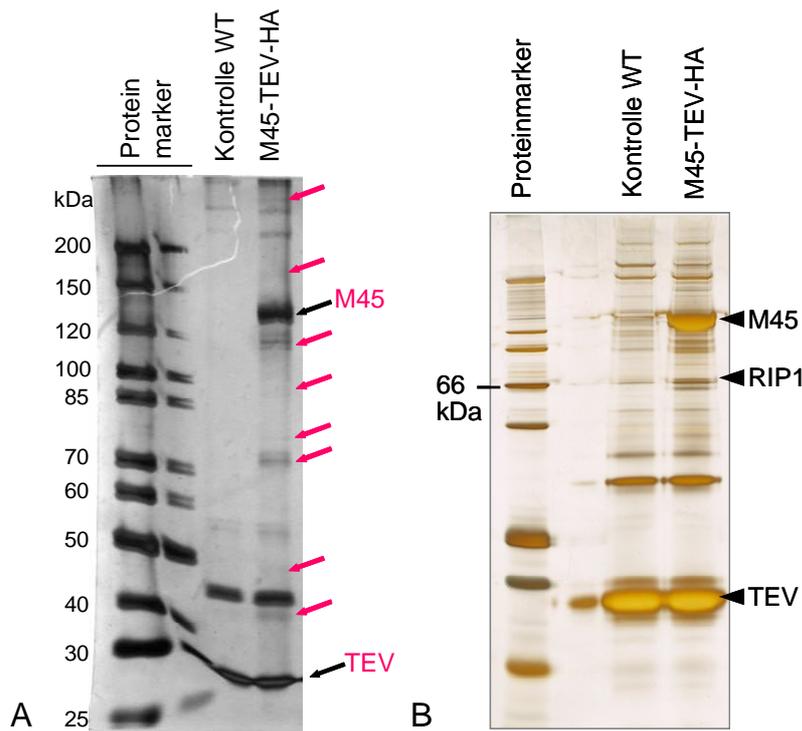


Abbildung 24: Silbergele der α -HA-affinitätsaufgereinigten Proben

Die Abbildung zeigt die Silberfärbungen der im Proteingel aufgetrennten Proben der α -HA-Affinitätsaufreinigung, normales Proteingel (A) und Gradientengel (A. Sickmann, C. Winkler, Würzburg) (B). Hierfür wurden 8×10^7 10.1 Zellen mit einer MOI von 1 TCID₅₀ mit MCMV M45-TEV-HA oder MCMVwt infiziert. Nach 48 h wurden die Zellen mit Lysis-Puffer (50 mM Tris, pH 7,5; 150 mM NaCl; 2,5 % Nonidet P40, complete protease inhibitor cocktail) für 30 min auf Eis lysiert und für 1h bei 20.000 g zentrifugiert. Nach dem Beladen der Säulen (1ml Matrix mit 3,5 mg Antikörper α -HA 3F10 [Roche]) wurden sie mit 20 ml Waschpuffer (20 mM Tris, pH 7,5; 0,1 M NaCl; 0,1 M EDTA; 0,05% Tween-20) gewaschen. Die Elution erfolgte durch Verdau mit AcTEV-Protease (Invitrogen) (100 U in 2,5 ml Puffer [50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,5 mM EDTA; 1 mM DTT], 1h, RT). Die Proben wurden mit Chloroform-Methanol-Präzipitation gefällt, auf ein Proteingel aufgetragen und mit Silber gefärbt. Die Banden, die nur in der M45-Probe, nicht aber in der Kontrollprobe auftreten (rote Pfeile), sind potentielle Interaktionspartner von M45.

Es war zu erkennen, dass die M45-spezifische Probe im Vergleich zu der Kontrollprobe viele zusätzliche Banden neben der Bande von M45 und der TEV-Protease aufwies (Abbildung 24). Diese stellen potentielle Interaktionspartner von M45 dar, welche zusammen mit M45 an die α -HA-Affinitätssäulen gebunden haben. Daher wurde ein Teil der aufgereinigten Probe von unseren Kooperationspartnern Albert Sickmann und Christiane Winkler in Würzburg

massenspektrometrisch analysiert. Hierfür wurden die Proben in einem Gradientengel aufgetrennt, silbergefärbt und die für die M45-Probe spezifischen Banden ausgeschnitten und deren Proteinzusammensetzung massenspektrometrisch untersucht. Diese Analyse erbrachte eine Vielzahl von Proteinen, die in den ausgeschnittenen Banden gefunden wurden. Ein Großteil dieser Proteine waren vermutlich Kontaminationen, die häufig bei massenspektrometrischen Analysen auftreten. In einer Bande von ungefähr 70 kDa hingegen wurde ein interessanter potentieller Interaktionspartner gefunden, nämlich das zelluläre Protein RIP1. Die Serin-Threonin-Kinase RIP1 ist ein Protein, welches in TNF-Rezeptor-vermittelten Signalwegen eine entscheidende Rolle spielt (74, 184). Daher sollte RIP1 als Interaktionspartner von M45 näher untersucht werden.

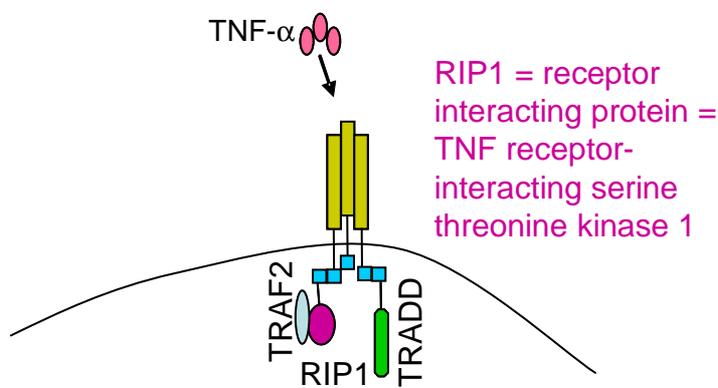


Abbildung 25: RIP1 als Teil des TNF-Rezeptor 1 Signalkomplexes

Schematische Darstellung des TNFR1-Signalkomplexes, der sich nach TNF- α -Stimulation durch Rekrutierung verschiedener Proteine bildet (107). Ein für viele TNF- α -induzierte Signalwege essentielles Protein ist die Serin-Threonin-Kinase RIP1. Dieses Protein wurde in der massenspektrometrischen Analyse in einer ca. 70 kDa Bande als potentieller Interaktionspartner von M45 identifiziert.

3.4.2 Analyse der M45-RIP1-Interaktion mittels Koimmunpräzitationen

Die potentielle Interaktion von M45 mit RIP1 sollte in unabhängigen Untersuchungen bestätigt werden. Hierfür wurde eine Koimmunpräzitation (Ko-IP) von RIP1 mit M45 in infizierten Zellen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden Zellen mit MCMV WT oder einem rekombinanten MCMV mit einem *in situ* HA-getaggten M45 infiziert und die Lysate dieser Zellen einer Immunpräzitation mit einem α -HA Antikörper, einem spezifischen M45-Antikörper oder einem Kontroll-Antikörper unterzogen. Die immunpräzitierten Proben wurden im Western Blot mit einem α -RIP1-Antikörper angefärbt, um eine Kopräzitation von RIP1 nachzuweisen. Diese Untersuchung zeigte, dass RIP1 in infizierten Zellen spezifisch mit M45 kopräzitiert wurde, sowohl mittels eines α -HA-Antiköpers als auch bei Verwendung des spezifischen M45-Antiköpers (Abbildung 26 A).

Zudem wurde eine Koimmunpräzipitation von M45-HA durch RIP1 in infizierten Zellen durchgeführt. Diese bestätigte, dass M45-HA in infizierten Zellen spezifisch mit einem α -RIP1-Antikörper, aber nicht mit Kontrollantikörpern, kopräzipitiert werden konnte (Abbildung 26 B). Beide Versuche deuten darauf hin, dass M45 in infizierten Zellen tatsächlich mit RIP1 interagiert.

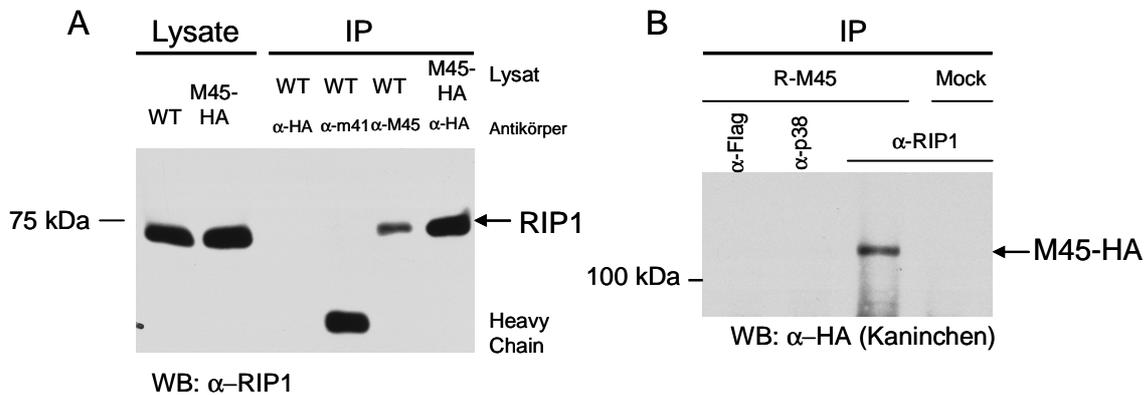


Abbildung 26: Koimmunpräzipitation von RIP1 und M45 aus infizierten Zellen

(A) Je 6×10^6 10.1-Zellen pro Probe wurden mit einer MOI von 1 TCID₅₀ mittels „Centrifugal Enhancement“ mit MCMV WT und MCMV M45-HA infiziert. 36h nach Infektion wurden die Zellen mit Lysispuffer (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 1% Nonidet P40; Protease Inhibitor Cocktail (Roche)) lysiert, Zelltrümmer abzentrifugiert und ein Teil der Lysate über Nacht einer Immunpräzipitation mit den angegebenen Antikörpern (2 μ g polyklonaler α -HA [Kaninchen], 4 μ l α -M45 [ungereinigtes Serum] bzw. 6 μ g α -m41) und Protein-G-Sepharose unterzogen. Die Sepharose wurde sechsmal mit IP-Puffern B, C und D (siehe Methoden) gewaschen, die Proteine mit kochendem Probenpuffer abgelöst und zusammen mit unbehandelten Lysaten auf ein Proteingel aufgetragen. Der Western Blot wurde mit α -RIP1-Antikörper angefärbt. (B) Je 3×10^6 RIP1 +/+ Zellen pro Probe wurden mit einer MOI von 3 TCID₅₀ mittels „Centrifugal Enhancement“ mit der M45-Revertante infiziert. 36h nach Infektion wurden die Zellen wie in Abbildungsteil A lysiert, ein „Preclearing“ mit Protein-A-Sepharose durchgeführt und mit je 2 μ g der angegebenen Antikörper pro Probe (α -RIP1 [Kaninchen], α -p38 [Kaninchen], α -HA [Kaninchen]) und PAS eine IP mit den oben genannten Bedingungen durchgeführt. Der Western Blot wurde mit einem polyklonalen α -HA-Antikörper (Kaninchen) angefärbt.

Um zu überprüfen, ob diese Interaktion von anderen viralen Proteinen anhängig ist oder ob M45 auch ohne den viralen Kontext mit RIP1 interagiert, wurden M45-HA oder ein weiteres HA-getaggtetes virales Kontrollprotein (m143-HA) isoliert exprimiert. Hierfür wurden Zellen mit Expressionsplasmiden für M45-HA und m143-HA transfiziert. In den gewonnenen Zelllysaten wurde wiederum mit einem α -HA-Antikörper eine Koimmunpräzipitation von RIP1 durchgeführt.

Diese Untersuchung zeigte eine spezifische Kopräzipitation von RIP1 mit M45-HA aber nicht mit dem Kontrollprotein m143-HA aus transfizierten Zellen (Abbildung 27). Auf Grund dieser Resultate kann davon ausgegangen werden, dass für die Interaktion von RIP1 mit M45 keine weiteren viralen Proteine benötigt werden.

Ergebnisse

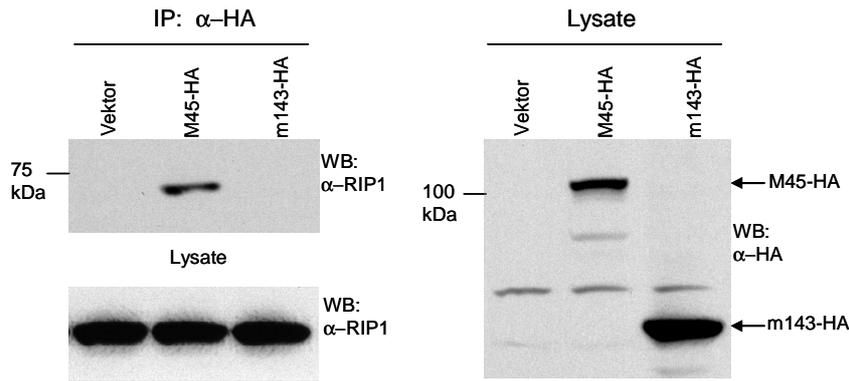


Abbildung 27: Koimmunpräzipitation von RIP1 mit M45 aus transfizierten Zellen

Die Abbildung zeigt die Ko-IP von RIP1 aus M45-HA exprimierenden, aber nicht aus Kontrollzellen. Als Kontrolle wurde die Expression von RIP1 und den beiden HA-getaggten Proteinen in den für die Ko-IP verwendeten Zelllysaten gezeigt. Pro Probe wurden 6×10^6 NIH3T3 Zellen mit Expressionsvektoren für M45-HA und m143-HA bzw. einem leeren Vektor mit Polyfect-Transfektionsreagenz transfiziert. 36h nach Transfektion wurden die Zelllysate geerntet. Die Ko-IP erfolgte identisch wie in Abbildung 26 A beschrieben unter Verwendung des polyklonalen α -HA-Antikörpers (Kaninchen). Zusätzlich wurde in den Lysaten noch die Expression der HA-getaggten Proteine nachgewiesen (α -HA 16B12).

Nach der Stimulation von Zellen mit TNF- α bildet sich ein TNFR1-Signalkomplex (Abbildung 25) durch Rekrutierung der Proteine RIP1, TRAF2 und TRADD sowie vermutlich weiterer Proteine zum TNFR1. Um auszuschließen, dass die Interaktion von M45 und RIP1 indirekt über ein weiteres Protein dieses Signalkomplexes erfolgt, wurden verschiedene Knockout-Zellen für eine Ko-IP verwendet (56, 133, 152). Nur eine Interaktion von M45 und RIP1 über TRADD konnte auf diese Weise nicht ausgeschlossen werden, da TRADD-Knockout-Zellen auf Grund der Letalität dieses Gendefekts nicht verfügbar sind.

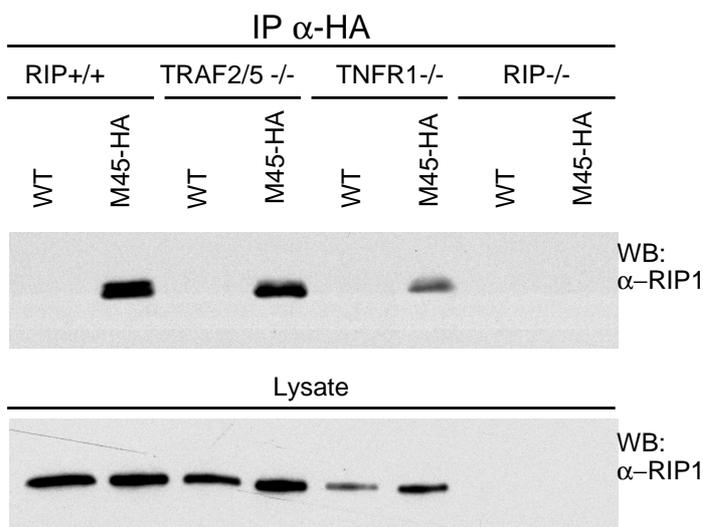


Abbildung 28: Koimmunpräzipitation von RIP1 mit M45-HA aus infizierten Knockout-Zellen

Die Abbildung zeigt die Koimmunpräzipitation von RIP1 mit M45-HA aus MCMV-M45-HA-infizierten Knockout-Zellen mittels eines polyklonalen α -HA-Antikörpers. Die Spezifität wurde gezeigt durch eine gleichartige Ko-IP aus MCMV-WT-infizierten Zellen, bei denen der HA-Tag am M45 fehlt. Es wurden TNFR1-negative, TRAF2/5-negative und RIP1-negative Zellen sowie RIP1-positive Kontrollzellen für die Ko-IP verwendet. Die Bedingungen der Infektion sowie der Koimmunpräzipitation waren identisch zu den Versuchsbedingungen in Abbildung 26A.

Dieser Versuch zeigte, dass die Interaktion von M45 mit RIP1 unabhängig von TRAF2 und TRAF5 sowie von dem TNFR1 ist, weil RIP1 in allen Zellen bis auf den RIP1-negativen Zellen zusammen mit M45-HA kopräzipitiert werden konnte (Abbildung 28).

3.5 Die Funktion der M45-RIP1-Interaktion für die MCMV-Infektion

Nachdem die Interaktion von M45 mit RIP1 nachgewiesen wurde, stellte sich die Frage, welche Funktion diese Interaktion in der MCMV-Infektion ausübt.

RIP1 ist als Adaptermolekül von zentraler Bedeutung für verschiedene Signalwege. Es integriert verschiedene extrazelluläre und intrazelluläre Stimuli und leitet sie zu verschiedenen Effektorfunktionen über (Abbildung 29) (74).

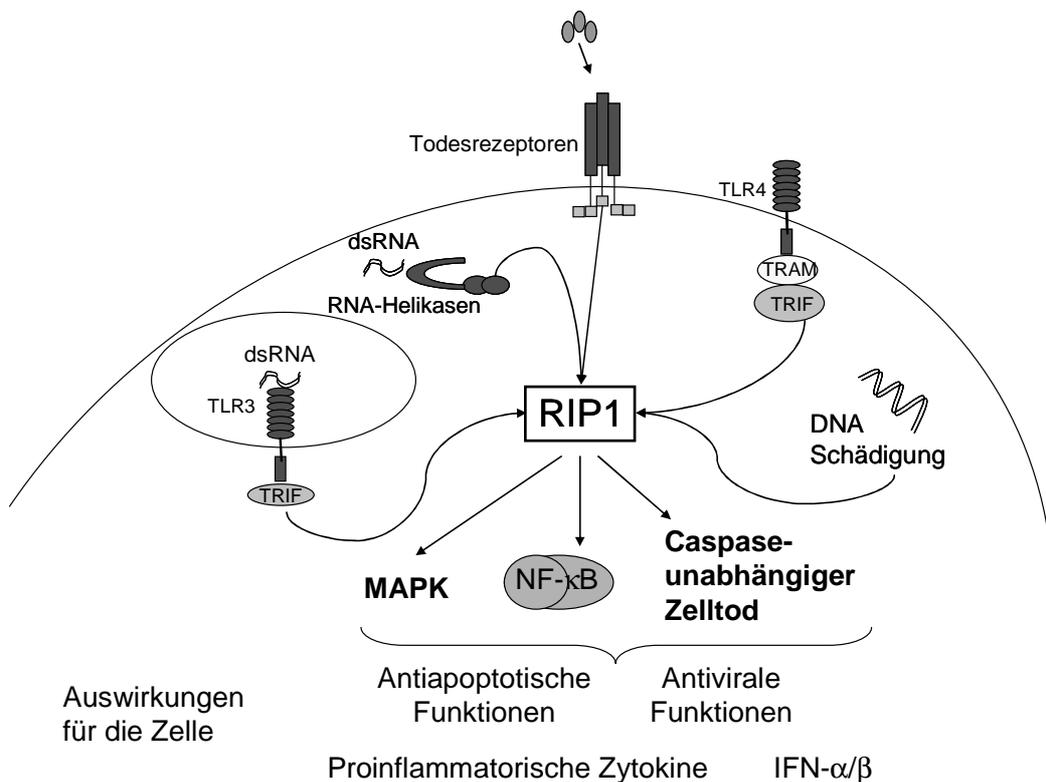


Abbildung 29: Die zentrale Rolle von RIP1 in verschiedenen Signalwegen

Schematische Darstellung der RIP1-abhängigen Signalwege und möglicher zellulärer Auswirkungen. RIP1 ist essentiell für die TNF- α -induzierte Aktivierung von NF- κ B und der MAP-Kinasen, sowie der Induktion des Caspase-unabhängigen Zelltodes. Neben den Todesrezeptoren können RIP1-vermittelte Signalwege auch aktiviert werden durch TLR3 und TLR4 und durch intrazellulären Stress, wie DNA-Schädigung und zytoplasmatische dsRNA-Sensoren (74).

Eine der wichtigsten Funktionen von RIP1 ist die Signalübermittlung vom TNFR1 zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (133). Dieser Signalweg ist aufgrund seiner bedeutenden Stellung in Entzündungsvorgängen besonders gut untersucht. Nach der

Stimulation des TNFR1 wird RIP1 durch die E3-Ubiquitinligase-Aktivität von TRAF2 ubiquitiniert. Diese Ubiquitinierung ist essentiell für die NF- κ B-Aktivierung (157). Die angefügten Ubiquitinmoleküle sind hierbei mit dem Lysinrest 63 (K63) miteinander verknüpft, was im Unterschied zu einer K48-Ubiquitinierung nicht den proteasomalen Abbau des so markierten Proteins bewirkt, sondern wichtig ist für die Regulation von Signalwegen durch Komplexbildung zwischen verschiedenen Signalproteinen. In diesem Fall bewirkt es die Komplexbildung zwischen NEMO/IKK γ (der regulatorischen Untereinheit des IKK-Kinasekomplexes), sowie des Komplexes TAB2/3/TAK1 und RIP1 (44, 66, 140, 211). Daraufhin erfolgt durch Phosphorylierung von IKK β durch TAK1 die Aktivierung des IKK-Kinasekomplexes, welcher anschließend I κ B, den Inhibitor von NF- κ B, phosphoryliert. Diese Phosphorylierung führt wiederum zur Degradierung von I κ B, so dass NF- κ B freigesetzt wird. NF- κ B kann daraufhin in den Zellkern gelangen und dort seine transkriptionelle Aktivität ausüben (Abbildung 4) (66).

3.5.1 M45 inhibiert die TNF- α -vermittelte NF- κ B-Aktivierung

Da die NF- κ B-Aktivierung nach TNF- α -Stimulation eine der Hauptaufgaben von RIP1 ist, sollte untersucht werden, ob M45 mit diesem Signalweg interferiert. Die Degradierung des I κ B α (ein I κ B-Subtyp) dient als ein möglicher Nachweis für eine NF- κ B-Aktivierung.

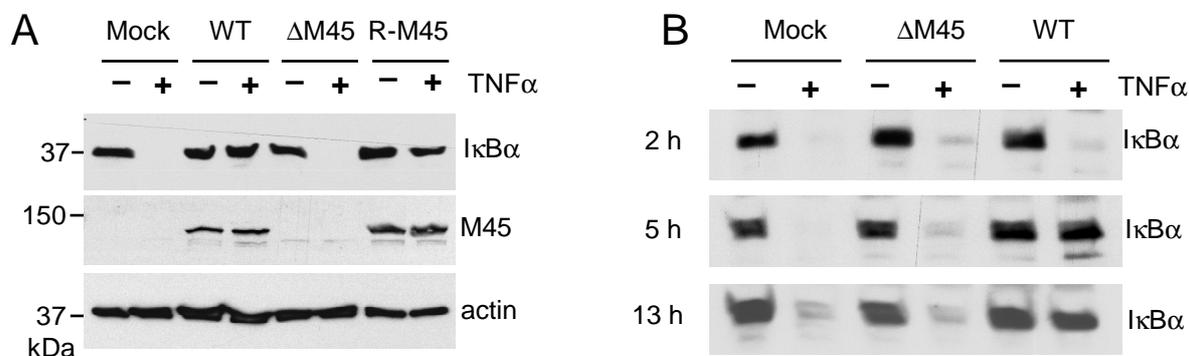


Abbildung 30: Inhibition der I κ B α -Degradierung durch M45 in infizierten Zellen

Der Abbildungsteil A zeigt die TNF- α -vermittelte I κ B α -Degradierung in NIH3T3 Zellen. Die Zellen wurden mit einer MOI von 3 TCID₅₀ mit MCMVwt, Δ M45, M45-Revertante oder Mock-infiziert, 24h nach Infektion für 15 min mit 20 ng/ml murinem TNF- α stimuliert und durch Zugabe von kochendem SDS-Probenpuffer geerntet. Der Western Blot zeigt das Vorhandensein des Inhibitors von NF- κ B, I κ B α , welcher normalerweise 15 min nach TNF- α -Stimulation vollständig degradiert ist. Wenn der Inhibitor auch bei TNF- α -stimulierten Zellen nachgewiesen wird, zeigt dies die Blockierung der TNF- α -vermittelten NF- κ B-Aktivierung an. Als Kontrolle wurde in den Zelllysaten die Expression von β -Aktin und M45 nachgewiesen. Abbildungsteil B zeigt die Inhibition der I κ B α -Degradierung durch M45 zu verschiedenen Zeitpunkten (2, 5 und 13h) nach Infektion. Hierfür wurden die Zellen identisch wie in Abbildungsteil A behandelt, aber schon nach 2, 5 bzw. 13 Stunden Infektion mit TNF- α behandelt und geerntet. Es ist zu erkennen, dass Viren, die M45 exprimieren, ab 5h nach Infektion einen Schutz vor TNF- α -vermittelter I κ B α -Degradierung bewirken.

Hierfür wurden NIH3T3 Zellen infiziert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Infektion für 15 min mit TNF- α behandelt. Nach 15-minütiger TNF- α -Stimulation liegt normalerweise eine vollständige Degradierung von I κ B α in den Zellen vor. Bei der Untersuchung der I κ B α -Degradierung in infizierten Zellen zeigte sich, dass in MCMVwt- sowie M45-Revertante-(R-M45)-infizierten Zellen die I κ B α -Degradierung blockiert war, jedoch nicht in Mock-infizierten oder Δ M45-infizierten Zellen. Die Protektion vor TNF- α -vermittelter I κ B α -Degradierung war ab ca. 5 Stunden nach Infektion nachweisbar (Abbildung 30), was ungefähr dem Zeitpunkt entspricht, zu dem M45 im Western Blot detektiert werden kann.

Um festzustellen, ob auch M45 allein in der Lage ist, die TNF- α -vermittelte I κ B α -Degradierung zu blockieren, wurden Zellen mit M45-HA- oder GFP-exprimierenden Retroviren transduziert. Diese Retroviren basieren auf dem Retrovirusvektor pRetroEBNA, welcher durch besonders hohe Retrovirustiter die Transgenexpression in über 90% der transduzierten Zellen ermöglicht. Um die RIP1-Abhängigkeit des Prozesses zu zeigen, wurden hierfür zum einen RIP1-negative Zellen verwendet, in die durch Transduktion das RIP1-Gen wieder stabil integriert wurde. In den RIP1-negativen Zellen, ist die I κ B α -Degradierung nach TNF- α -Stimulation nicht möglich. In den RIP1-positiven Zellen hingegen wurde die I κ B α -Degradierung nur durch die Expression von M45 blockiert, in den Kontrollzellen erfolgte sie wie erwartet (Abbildung 31). Dieses Ergebnis zeigt, dass M45 allein, ohne andere virale Proteine, in der Lage ist, vor TNF- α -vermittelter I κ B α -Degradierung zu schützen.

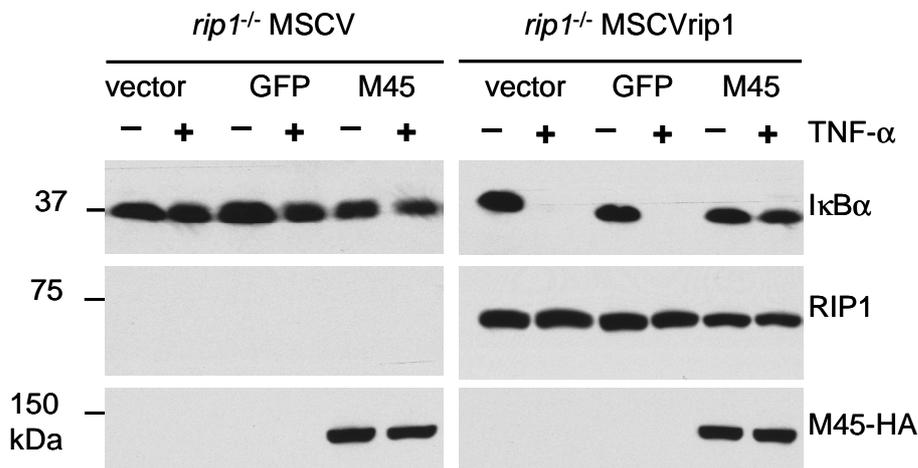


Abbildung 31: M45 inhibiert die TNF- α -induzierte I κ B α -Degradierung in transduzierten Zellen

Die Abbildung zeigt die Untersuchung der TNF- α -induzierten I κ B α -Degradierung in RIP1-negativen Zellen und Zellen, in die das RIP1-Gen wieder stabil integriert wurde. Hierfür wurden RIP1-negative Zellen mit pMSCVpuro-basierten Retroviren (pMSCVpuro ohne Insert und mit der cDNA von *rip1*) transduziert. Die Selektion der stabil transduzierten Zellen erfolgte mit 4 μ g/ml Puromycin für 7 Tage. Die so gewonnenen RIP1-positiven und -negativen Zellen wurden jeweils mit hochtitrigen Retroviren transduziert, um eine effiziente Transgenexpression von M45 oder GFP als Kontrolle zu ermöglichen. Die transduzierten RIP1-negativen und RIP1-positiven Zellen wurden für 15 min mit 20 ng/ml murinem TNF- α stimuliert oder unbehandelt gelassen. Die Proben wurden mit kochendem Probenpuffer geerntet und im Western Blot die I κ B α -Degradierung untersucht. Zur Kontrolle wurde zusätzlich die Expression von RIP1 und M45-HA mittels Western Blot nachgewiesen.

Um die Rolle von M45 bei der Inhibition der NF- κ B-Aktivierung mit einem unabhängigen Experiment zu bestätigen, wurde als nächstes ein Reporterassay zur Analyse der NF- κ B-Aktivierung durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden 293 Zellen mit einem NF- κ B-abhängigen Luciferase-Reportervektor, einem konstitutiv exprimierenden β -Galaktosidase-Expressionsplasmid zur Kontrolle der Transfektionseffizienz, sowie verschiedenen Expressionsplasmiden für die Expression der zu untersuchenden Proteine transfiziert. 24 Stunden später wurden die Zellen durch Behandlung mit humanem TNF- α induziert oder uninduziert gelassen. Die Abbildung 32 zeigt die Induktion der Luciferase-Aktivität in TNF- α -stimulierten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Zur Kontrolle wurde noch A20, ein zellulärer Inhibitor der NF- κ B-Aktivierung (283), untersucht. Wie in Abbildung 32 zu sehen ist, inhibierten sowohl A20 als auch M45 die Induktion der Luciferase-Aktivität durch TNF- α -Stimulation, somit konnten die Ergebnisse des Luciferase-Reporter-Assays die Inhibition der TNF- α -vermittelten NF- κ B-Aktivierung durch M45 bestätigen.

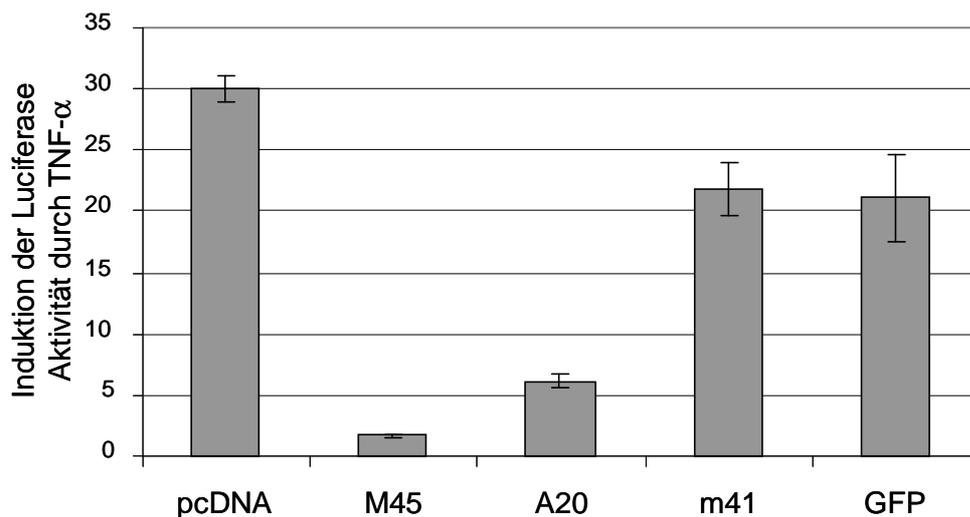


Abbildung 32: Inhibition der TNF- α -induzierten NF- κ B-Aktivierung durch M45

Die Abbildung zeigt die TNF- α -vermittelte Aktivierung eines NF- κ B-abhängigen Luciferase-Reporter-Vektors. Dieser wurde zusammen mit Expressionsplasmiden für die zu analysierenden Gene in 293 Zellen transfiziert, nach 24h wurden die Zellen für 12h mit humanem TNF- α behandelt oder unbehandelt gelassen. Zur Normalisierung von Schwankungen in der Transfektionseffizienz wurde ein β -Galaktosidase-Expressionsplasmid verwendet. Dargestellt ist die Erhöhung der Luciferase-Aktivität in TNF- α -stimulierten im Vergleich zu uninduzierten Proben. Durch die Koexpression von M45 und A20 wird die TNF- α -induzierte Aktivierung des Konsensus-NF- κ B-Promotors verhindert.

3.5.2 M45 inhibiert den TNF- α -induzierten Caspase-unabhängigen Zelltod

Eine weitere zentrale Funktion von RIP1 neben seiner Rolle in der NF- κ B-Aktivierung ist die Induktion des Caspase-unabhängigen Zelltodes (74). Diese Form des programmierten Zelltodes ist ein parallel existierender Signalweg, welcher vorwiegend dann aktiviert wird, wenn die Induktion von Caspase-abhängiger Apoptose zum Beispiel durch Caspase-Inhibitoren blockiert ist, und wird daher auch als Backup-Signalweg zum Zelltod beschrieben

Ergebnisse

(268). Diese weitere Funktion von RIP1 ist in Anbetracht der ursprünglichen Ergebnisse zur Inhibition eines TNF- α -induzierten Caspase-unabhängigen Zelltodes durch M45 sehr interessant. Während der MCMV-Infektion ist die Aktivierung der Caspase-8 durch M36 blockiert, so dass infizierte Zellen nach TNF- α -Stimulation durch Caspase-unabhängigen Zelltod sterben würden. Daher ist es denkbar, dass das Virus die Funktion von M45 braucht, um diesen alternativen Zelltod-Signalweg ebenfalls zu blockieren.

Der Caspase-unabhängige Zelltod kann künstlich ausgelöst werden durch gleichzeitige Behandlung von Zellen mit TNF- α und Caspase-Inhibitoren wie Z-VADfmk (Pan-Caspase-Inhibitor) oder Z-IETDfmk (Caspase-8-Inhibitor) (74, 270). Allerdings unterscheiden sich Zellen hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber dieser Form des Zelltodes.

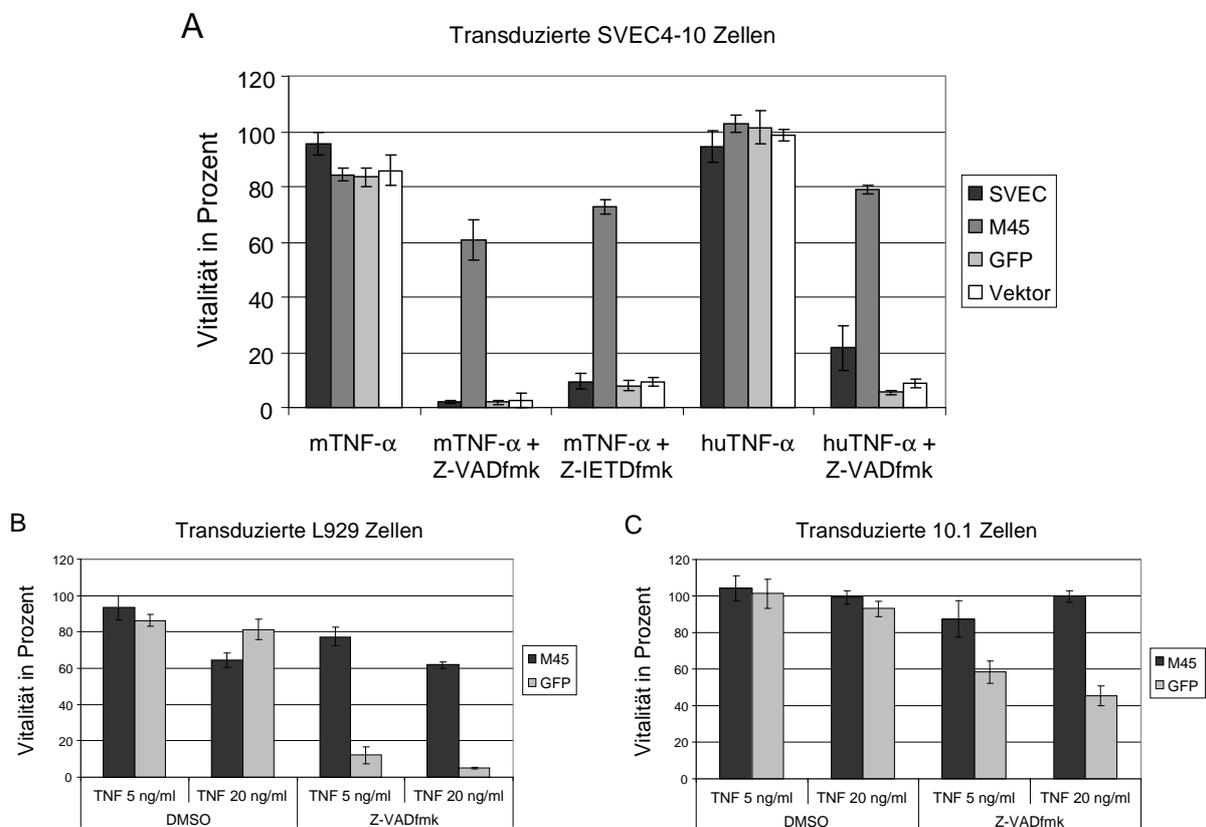


Abbildung 33: M45 inhibiert TNF- α -induzierten Caspase-unabhängigen Zelltod

Die Abbildungen zeigen die Vitalität von transduzierten Zellen, die mit TNF- α und Caspase-Inhibitoren behandelt wurden. (A) Untransduzierte, Leervektor-transduzierte oder M45-HA- oder GFP-exprimierende SVEC4-10 wurden mit murinem oder humanem TNF- α (20 ng/ml) sowie dem Pan-Caspase-Inhibitor Z-VADfmk (100 μ M) behandelt, bzw. mit murinem TNF- α (20 ng/ml) in Kombination mit dem Caspase-8 spezifischen Inhibitor Z-IETDfmk (50 μ M). Als Kontrolle wurden die Proben mit TNF- α zusätzlich mit DMSO behandelt (Lösungsmittel für die Caspase-Inhibitoren). Die Behandlung erfolgte für 24h Stunden. Die Vitalität wurde mittels MTT-Test bestimmt und ist in Prozent relativ zu unbehandelten Kontrollzellen angegeben. Die beiden unteren Abbildungen zeigen die 27-stündige Behandlung von L929 Fibrosarkomzellen (B) und 10.1 Fibroblasten (C), die mit M45 oder GFP-exprimierenden Retrovirusvektoren transduziert wurden, mit murinem TNF- α (20 bzw. 5 ng/ml) und Z-VADfmk (50 μ M), bzw. murinem TNF- α mit DMSO als Kontrolle.

Um zu untersuchen, ob M45 allein den Caspase-unabhängigen Zelltod blockieren kann, wurden verschiedene Zelltypen mit M45-exprimierenden oder Kontroll-Retrovirusvektoren transduziert und anschließend durch die oben genannte Behandlung Caspase-unabhängiger Zelltod induziert. Zusätzlich wurde in einem Experiment eine Behandlung mit humanem TNF- α durchgeführt, welches in murinen Zellen ausschließlich den TNFR1 stimuliert (156), um zu untersuchen, ob TNFR2 bei dem untersuchten Zelltod eine Rolle spielt.

Die Untersuchungen zeigten, dass M45 sehr effektiv den Caspase-unabhängigen Zelltod blockieren kann. Die untersuchten Zellen unterschieden sich hinsichtlich ihrer Sensitivität, hierbei waren SVEC4-10 Endothelzellen sehr empfindlich gegenüber dieser Form des Zelltodes, gefolgt von der murinen Fibrosarkomzelllinie L929, welche auch von anderen Arbeitsgruppen zur Untersuchung des Caspase-unabhängigen Zelltodes verwendet wird (234, 270). Auch 10.1 Fibroblasten zeigen diese Form des Zelltodes, wenn auch weniger stark ausgeprägt. NIH3T3 Zellen hingegen weisen überhaupt keine Empfindlichkeit gegenüber dieser Form des Zelltodes auf. Sie wurden in einem gleichartigen Experiment untersucht, sind aber durch die Behandlung nicht gestorben. SVEC4-10 Endothelzellen zeigten schon wenige Stunden nach der Behandlung mit TNF- α und Caspase-Inhibitoren erste Anzeichen von beginnendem Zelltod. Nach 24-stündiger Behandlung wiesen die Kontrollzellen nur noch eine Vitalität von unter 10% im Vergleich zu unbehandelten Zellen auf. Die Zellen konnten durch die Expression von M45 nahezu vollständig geschützt werden, die Zellvitalität lag bei 60-80% (Abbildung 33). Des Weiteren wird deutlich, dass die Zellen durch alleinige Behandlung mit TNF- α nicht sterben, sondern dass es hierzu der gleichzeitigen Behandlung mit Caspase-Inhibitoren bedarf. Der TNFR2 scheint keine bedeutende Funktion bei der Induktion des Caspase-unabhängigen Zelltodes in SVEC4-10 Zellen zu haben, da die mit humanem TNF- α behandelten Zellen ähnliche Ergebnisse zeigten.

3.5.3 M45 inhibiert die Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinase p38

Weiterhin ist RIP1 wesentlich an der Aktivierung der p38 Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) nach Stimulation mit TNF- α beteiligt (151). Um herauszufinden, ob sich die Inhibition RIP1-abhängiger Signalwege durch M45 auch auf diese Funktion von RIP1 erstreckt, wurden infizierte Zellen für unterschiedliche Zeiten mit TNF- α behandelt und anschließend die Aktivierung der p38 MAPK mittels Western Blot mit einem phosphospezifischen p38-Antikörper untersucht, welcher nur die aktivierte Form der p38 MAPK erkennt.

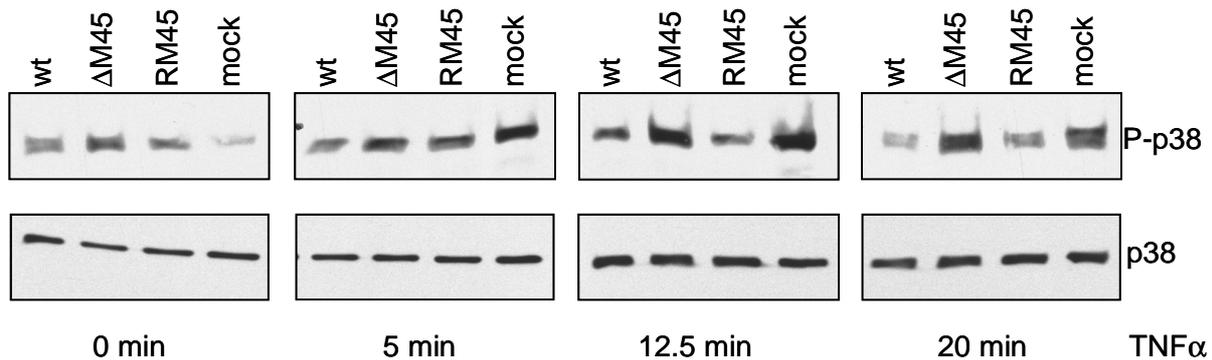


Abbildung 34: M45 verhindert die Aktivierung der p38 MAP-Kinase

Die Abbildung zeigt einen Western Blot von Proben aus infizierten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach TNF- α -Stimulation. 8×10^5 10.1 Zellen pro Probe wurden mittels „Centrifugal Enhancement“ mit MOI 6 TCID₅₀ infiziert. 24h nach Infektion wurden die Zellen für die angegebene Dauer mit 7,5 ng/ml murinem TNF- α behandelt und direkt danach mit kochendem SDS-Probenpuffer geerntet. Untersucht wurde die phosphorylierte (aktivierte) Form der p38 MAPK und als Kontrolle das gesamte p38. Es ist zu beachten, dass durch die MCMV-Infektion der basale Level der aktivierten p38 MAPK im Vergleich zu Mock-Zellen erhöht ist.

Die Untersuchung zeigte, dass in MCMVwt- oder M45-Revertante-infizierten Zellen die Aktivierung der p38 MAPK abgeschwächt war. In uninfizierten Zellen oder Zellen, die mit Δ M45 infiziert waren, erfolgte hingegen eine starke Aktivierung der p38 MAPK nach Stimulation mit TNF- α . Dies zeigt, dass M45 auch in der Lage ist, die TNF- α -vermittelte Aktivierung der p38 MAPK in infizierten Zellen zu blockieren.

3.5.4 M45 inhibiert die TLR3-vermittelte Aktivierung von NF- κ B

RIP1 übermittelt die Signale verschiedener Rezeptoren und Sensoren. So vermittelt es nicht nur die TNF- α -induzierte NF- κ B-Aktivierung, sondern wurde auch in Zusammenhang gebracht mit der NF- κ B-Aktivierung nach Stimulation von TLR3 und TLR4 (55, 182). Diese beiden Toll-like Rezeptoren rekrutieren für die Signalübertragung den Adapter TRIF, welcher wiederum mit RIP1 interagiert. Die Stimulation des TLR3 kann nur über TRIF und RIP1 zu einer NF- κ B-Aktivierung führen, und daher ist RIP1 für die durch dsRNA induzierte NF- κ B-Aktivierung über TLR3 essentiell. Da die Stimulation des TLR3 durch dsRNA sehr wichtig ist bei der Erkennung viraler Infektionen und auch bei der MCMV-Infektion eine Rolle zu spielen scheint, sollte die Involvierung von M45 in diesem Signalweg untersucht werden.

Hierfür wurde die Funktion verschiedener Gene in dem NF- κ B-abhängigen Luciferase-Reportergen-Assay in 293 Zellen untersucht. Zur Stimulation des TLR3 wurden die 293 Zellen für sechs Stunden mit poly(I:C) behandelt. Diese Behandlung durch externe Zugabe von poly(I:C) stimuliert in 293 Zellen ausschließlich TLR3 und nicht intrazelluläre dsRNA-Sensoren, da das poly(I:C) offensichtlich nur in die Endosomen gelangt und nicht in das Zytoplasma (5).

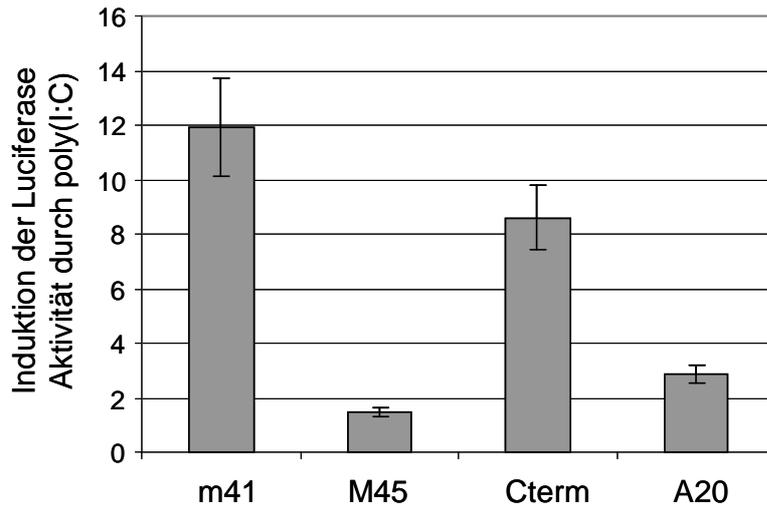


Abbildung 35: M45 blockiert die TLR3-induzierte Aktivierung von NF- κ B

293 Zellen wurden mittels Kalziumphosphat-Präzipitation mit Expressionsplasmiden für die viralen Gene M45 und m41, für eine inaktive verkürzte Form des M45 (Cterm) und für den zellulären RIP1-Inhibitor A20 transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen für 6h mit 100 μ g/ml poly(I:C) behandelt oder unbehandelt gelassen, und die Analyse der NF- κ B-Aktivierung erfolgte mittels Luciferase-Reporter-Assay wie in Abbildung 32 beschrieben. Die Abbildung zeigt die NF- κ B-abhängige Induktion des Luciferase-Reporter-Gens in poly(I:C)-stimulierten 293 Zellen.

Die Untersuchung zeigte, dass sowohl M45 als auch der zelluläre RIP1-Inhibitor A20, nicht aber eine inaktive C-terminale Verkürzung des M45 (die im folgenden Kapitel näher beschrieben wird) oder ein virales Kontrollprotein (m41), die poly(I:C)-induzierte NF- κ B-Aktivierung in 293 Zellen blockieren (Abbildung 35).

3.6 Der C-terminale Teil von M45 ist essentiell für die Funktion

M45 ist mit 1174 Aminosäuren ein sehr großes Protein, welches zudem aus zwei verschiedenen Domänen besteht. Im C-Terminus besitzt M45 eine große Sequenz-Homologie zur großen Untereinheit zellulärer Ribonukleotidreduktasen, welche jedoch auf Grund von Mutationen in essentiellen Aminosäuren nicht funktionell ist (154). Da MCMV die Expression der zellulären Ribonukleotidreduktase induziert, wird die virale Ribonukleotidreduktase R1-Untereinheit nicht mehr als solche benötigt. Daher könnte die Ribonukleotidreduktase-Homologie-Domäne von M45 aufgrund des Verlustes ihrer ursprünglichen Funktion durch Mutationen eine komplett neue Funktion angenommen haben. Zudem besitzt M45 eine N-terminale Domäne unbekannter Funktion (200). Diese Domäne könnte ebenfalls die RIP1-inhibierende Funktion des M45 beinhalten.

Daher war es interessant herauszufinden, welcher Teil des M45 für die Funktion verantwortlich ist. Zu diesem Zweck wurden verschiedene N- und C-terminale Verkürzungsmutanten von M45 hergestellt. Diese wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit, RIP1 zu binden und eine TNF- α -induzierte NF- κ B-Aktivierung zu inhibieren, untersucht.

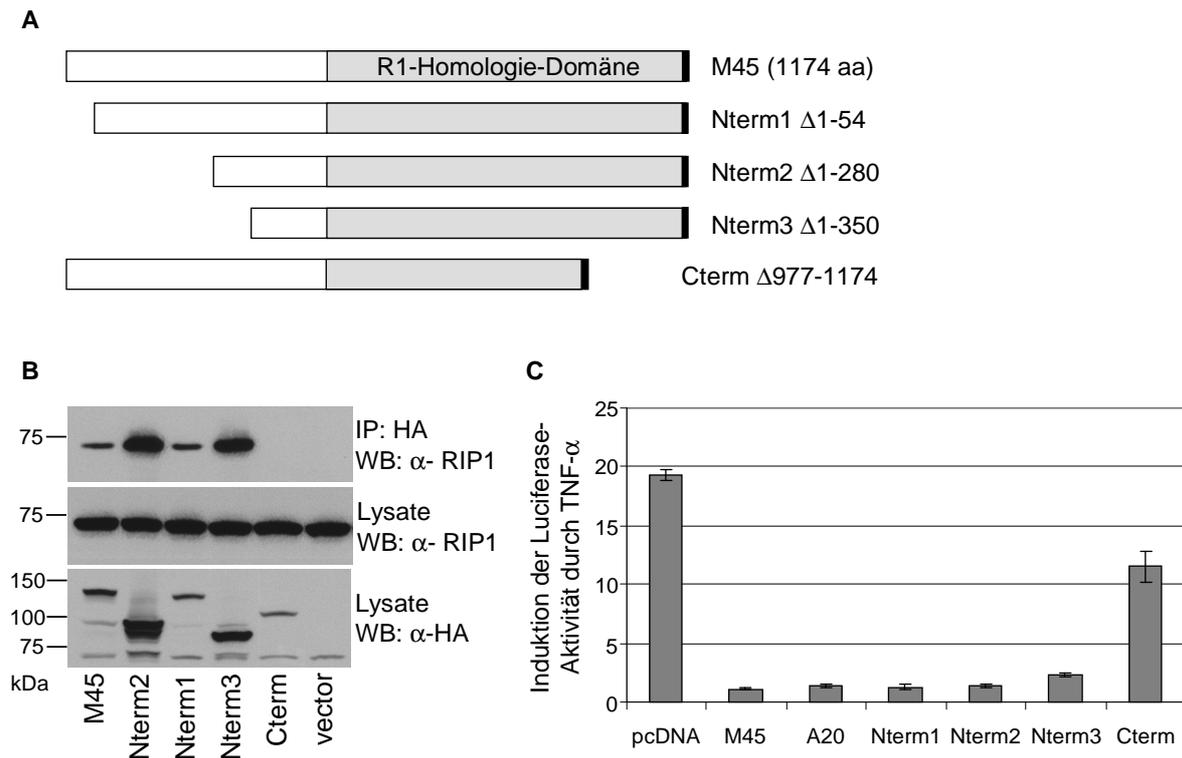


Abbildung 36: Der C-terminale Teil des M45 ist essentiell für die Bindung an RIP1 und für die Inhibition der NF- κ B-Aktivierung

(A) Schematische Darstellung der M45-Verkürzungsmutanten. Der weiße Balken stellt die N-terminale Domäne dar, von der drei unterschiedlich lange Verkürzungen hergestellt wurden (Nterm1-3). Der graue Balken ist die Ribonukleotidreduktase-Homologie-Domäne, von der eine Verkürzung hergestellt wurde (Cterm). Der schwarze Balken symbolisiert den HA-Tag. (B) M45 und die verschiedenen Verkürzungsmutanten wurden in NIH3T3 Zellen exprimiert. 24h nach der Transfektion mit Polyfect wurde eine Ko-IP wie in Abbildung 26 A durchgeführt, um zu überprüfen, welche der verkürzten Formen von M45 noch an RIP1 binden. Der obere Western Blot zeigt das kopräzipitierte RIP1 und der untere Western Blot zeigt die Expression der HA-getaggten Proteine in den Lysaten, die für die Ko-IP verwendet wurden. (C) Expressionsvektoren des M45 und der verkürzten Konstrukte sowie des A20 als Kontrolle wurden mittels Kalziumphosphat-Präzipitation in 293 Zellen transfiziert. 24h nach Transfektion wurden die Zellen 12h mit 20 ng/ml humanem TNF- α behandelt oder unbehandelt gelassen, und die Analyse der NF- κ B-Aktivierung erfolgte mittels Luciferase-Reporter-Assay wie in Abbildung 32 beschrieben. Die Abbildung zeigt die Stärke der Aktivierung des NF- κ B-abhängigen Promotors.

Die Ergebnisse in Abbildung 36 zeigen, dass nahezu der gesamte N-terminale Teil von M45 entbehrlich ist für die Bindung an RIP1 und die Inhibition der TNF- α -vermittelten NF- κ B-Aktivierung. Die Entfernung von 197 Aminosäuren vom C-Terminus hingegen unterbindet die Interaktion mit RIP1 sowie die Fähigkeit zur Inhibition der NF- κ B-Aktivierung. Diese bei den Verkürzungsmutanten beobachtete Korrelation hinsichtlich ihrer Bindung an RIP1 und ihrer Fähigkeit, die TNF- α -induzierte NF- κ B-Aktivierung zu blockieren, ist auch ein starker Hinweis darauf, dass die Bindung an RIP1 wirklich ursächlich an der Funktion von M45 beteiligt ist.

3.7 Die viralen Ribonukleotidreduktase-Homologe UL45 und ICP10 teilen nicht die Funktion des M45

Obwohl die Insertion der beiden anderen viralen Ribonukleotidreduktase-Homologe (UL45 und ICP10) in das Δ M45-Virusgenom nicht die Funktion von M45 substituieren konnten (Abschnitt 3.1.2), sollten die Gene in weiteren Assays auf ihre Funktionalität hin überprüft werden. Es wäre denkbar, dass die funktionelle Substitution im viralen Kontext nicht erfolgreich war, weil die homologen Gene nur eine Teilfunktion nicht erfüllen. Eventuell werden UL45 und ICP10 aufgrund einer fehlenden Interaktion mit einem anderen viralen Protein nicht in die Viruspartikel des murinen Cytomegalovirus mit eingebaut. Wenn aber das im Viruspartikel verpackte M45 wichtig für die ausgeübte Funktion wäre, hätte dies zur Folge, dass die Substitution nicht erfolgreich wäre, selbst wenn die Gene eventuell die gleiche Funktion hätten. Zudem wäre es möglich, dass ICP10 und UL45 als Gene humaner Viren nur in humanen Zellen funktionell sind, weil sie beispielsweise nur mit humanem RIP1 interagieren können. Daher wurden weitere Versuche durchgeführt mit isoliert exprimiertem ICP10 und UL45.

Obwohl das ICP10-Protein in Ko-Immünpräzipitationen eine leichte Interaktion mit RIP1 aufzuweisen schien (Ergebnisse nicht abgebildet), hat es offensichtlich nicht die gleiche Funktion wie M45 hinsichtlich einer Inhibition der NF- κ B-Aktivierung. In NF- κ B-abhängigen Luciferase-Reporterassays in 293 Zellen weisen sowohl ICP10 als auch UL45 keine Inhibition der TNF- α -induzierten NF- κ B-Aktivierung auf (Abbildung 37).

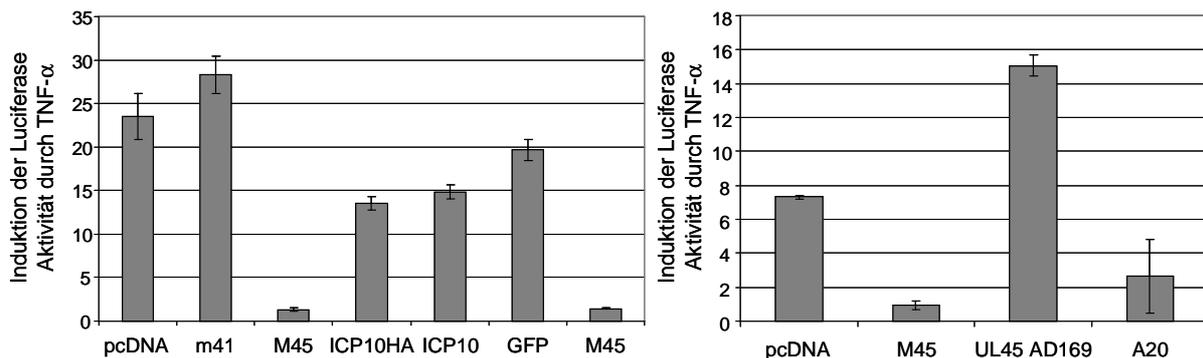


Abbildung 37: Die beiden Sequenzhomologe des M45 zeigen nicht die gleiche Funktion

Die Abbildung zeigt die TNF- α -vermittelte Aktivierung eines NF- κ B-abhängigen Luciferase-Reporter-Vektors. Dieser wurde mittels Kalzium-Phosphatpräzipitation zusammen mit Expressionsplasmiden für die zu analysierenden Gene in 293 Zellen transfiziert, nach 24h wurden die Zellen für 6 bzw. 12h mit humanem TNF- α behandelt oder unbehandelt gelassen. Dargestellt ist die Erhöhung der Luciferase-Aktivität in TNF- α -stimulierten im Vergleich zu uninduzierten Proben. Nur durch die Koexpression von M45 und A20 wird die TNF- α -induzierte Aktivierung des Konsensus-NF- κ B-Promotors verhindert.

Die Funktion des UL45 wurde zudem anhand eines HCMV-Deletionsvirus noch einmal in seinem eigenen viralen Kontext untersucht. Hierfür wurden MRC-5 Zellen mit HCMV AD169

oder einer UL45-Deletionsmutante infiziert. Beide Viren bewirkten einen Schutz vor TNF- α -vermittelter I κ B α -Degradierung, was folglich auf eine andere virale Funktion zurückgeführt werden muss (Abbildung 38). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass UL45 und ICP10 trotz großer Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz offenbar nicht die gleiche Funktion in der viralen Infektion übernehmen wie M45.

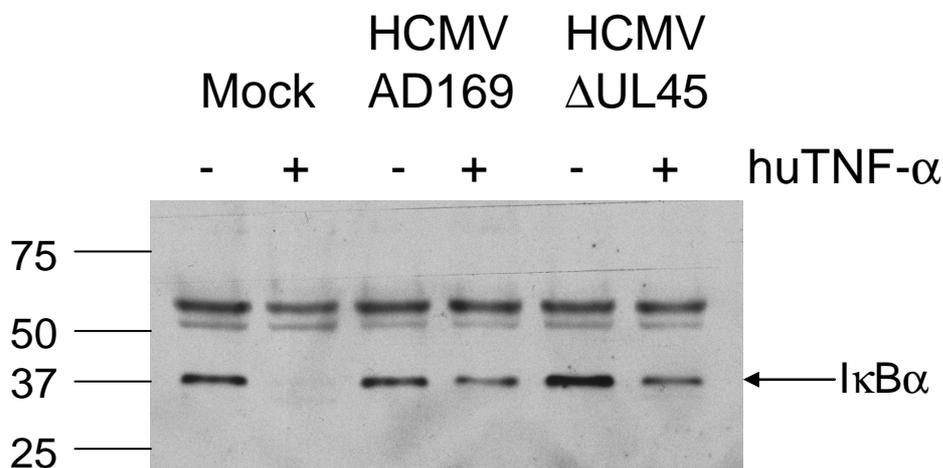


Abbildung 38: HCMV AD169 und die UL45-Deletionsmutante inhibieren die TNF- α -vermittelte I κ B α -Degradierung

MRC-5 Zellen wurden mit einer MOI von 3 TCID₅₀ mit HCMV AD169 und der UL45-Deletionsmutante infiziert. 48h nach der Infektion wurden die Zellen für 15 min mit 20 ng/ml humanem TNF- α behandelt und anschließend wie in Abbildung 30 A geerntet und mittels Western Blot die I κ B α -Degradierung untersucht.

3.8 Die molekulare Grundlage der RIP1-Inhibition durch M45

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, wie ein Protein die Funktion eines anderen Proteins inhibieren kann. Zum einen könnte ein proteasomaler Abbau des Proteins verursacht werden, das Protein könnte in ein anderes zelluläres Kompartiment sequestriert werden, wo die Funktion nicht mehr erfüllt werden kann, oder eine für die Aktivierung des Proteins notwendige posttranslationale Modifikation könnte verhindert werden. Des Weiteren ist es möglich, dass durch die Bindung an das Protein Domänen, welche für die Funktion essentiell sind, sterisch blockiert werden. In verschiedenen Untersuchungen sollte analysiert werden, auf welche Weise M45 die Funktion von RIP1 inhibiert.

3.8.1 Verlagerung von RIP1 in die unlösliche Fraktion

Um die molekulare Grundlage der RIP1-Inhibition durch M45 aufzuklären, wurde zunächst die Expression von RIP1 in MCMVwt- und Δ M45-infizierten Zellen mittels Western Blot untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Stärke der Expression von RIP1 in verschiedenen MCMVwt-infizierten Zellen deutlich schwächer war als in uninfizierten oder Δ M45-infizierten Zellen (Abbildung 39). Dies könnte als ein Hinweis auf einen proteasomalen Abbau von RIP1

gedeutet werden. Die reduzierte RIP1-Expression ließ sich allerdings nicht mit einem Proteasomen-Inhibitor blockieren (Ergebnisse nicht abgebildet).

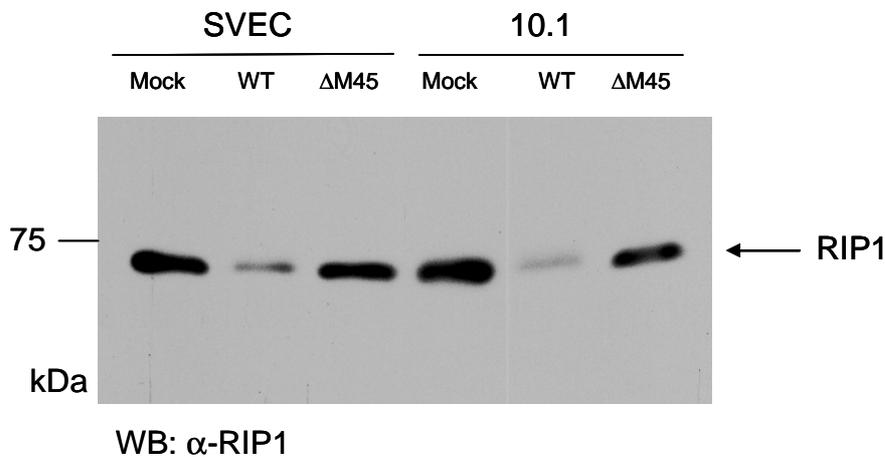


Abbildung 39: Reduzierte RIP1-Expression in MCMVwt-infizierten Zellen

SVEC4-10 und 10.1 Zellen wurden mit einer MOI von 3 TCID₅₀ mittels „Centrifugal Enhancement“ mit MCMVwt oder ΔM45 infiziert. 24h nach Infektion wurden die Zellen mit Lysispuffer (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 1% Nonidet P40; Protease Inhibitor Cocktail (Roche)) lysiert, Zelltrümmer abzentrifugiert und die so gewonnenen Proteinextrakte mit SDS-Probenpuffer versetzt und im Proteingel aufgetrennt und der Western Blot mit einem monoklonalen Antikörper gegen RIP1 angefärbt. Die Abbildung zeigt die Expressionsstärke von RIP1 in infizierten Zellen.

In weiteren Untersuchungen wurde daraufhin der unlösliche Anteil der Zelllysate, der vorher bei der Herstellung der Western Blot Proben verworfen wurde, näher untersucht. Hierbei stellte sich heraus, dass ab einem Zeitpunkt von ca. 5h nach der Infektion mit der M45-Revertante eine Verlagerung von RIP1 in die unlösliche Fraktion erfolgte. Diese Verlagerung konnte in ΔM45-infizierten Zellen oder in M45-Revertante-infizierten Zellen vor Einsetzen der M45-Expression nicht beobachtet werden (Abbildung 40). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass M45 RIP1 in ein zelluläres Kompartiment sequestriert, wo es seine normale Funktion nicht mehr ausüben kann. Es war jedoch trotz verschiedener Versuche mittels Immunfluoreszenz oder Zellfraktionierung nicht möglich, herauszufinden, in welches zelluläre Kompartiment RIP1 möglicherweise verlagert wird.

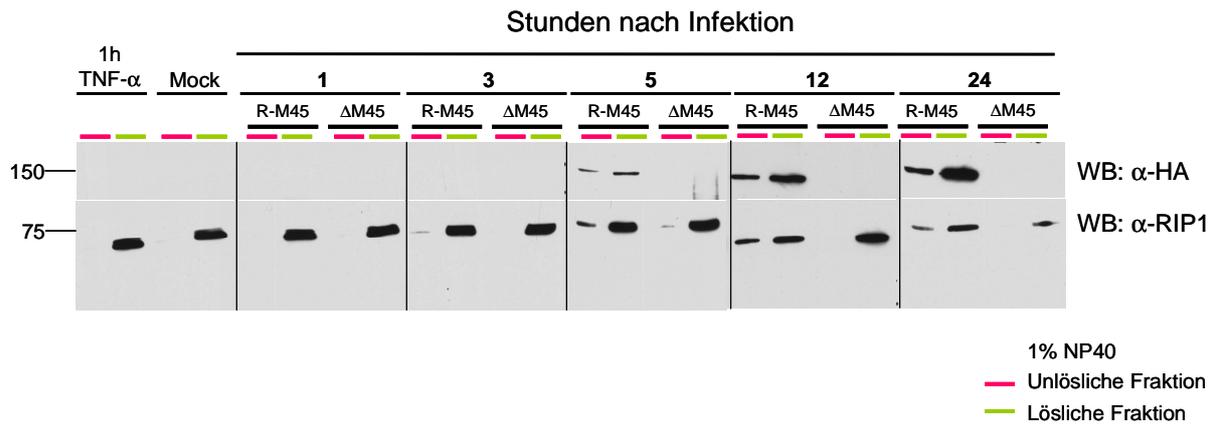


Abbildung 40: RIP1 wird durch M45 in die unlösliche Fraktion verlagert

Die Abbildung zeigt RIP1 in der 1%-NP40-löslichen und -unlöslichen Fraktion der Zelllysate von M45-Revertante- und Δ M45-infizierten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten (1 bis 24 h) nach der Infektion mit MOI 3 TCID₅₀. Die Herstellung der Proteinlysate (lösliche Fraktion) erfolgte durch 30-minütige Lyse der Zellen auf Eis mit Lysispuffer (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 1% Nonidet P40; Protease Inhibitor Cocktail (Roche)), Abzentrifugation der Zelltrümmer und Versetzen und Aufkochen mit SDS-Probenpuffer. Die unlösliche Fraktion (Zelltrümmer) wurde mit einer entsprechenden Menge SDS-Probenpuffer versetzt, gemischt und für 10 min aufgeköcht. Als Kontrolle wurden beide Fraktionen von Mock-Zellen und TNF- α -behandelten Zellen aufgetragen. Der Western Blot wurde mit einem monoklonalen α -RIP1-Antikörper angefärbt. Zusätzlich wurde die Expression von M45 mit einem α -HA-Antikörper (16B12) in den Zelllysaten nachgewiesen.

3.8.2 M45 verdrängt RIP1 nicht aus der Bindung mit dem Chaperon-Protein HSP90

Viele Proteine benötigen für ihre Stabilität und die Aufrechterhaltung ihrer nativen Konformation die Interaktion mit Chaperon-Proteinen, wie den Heat-Shock-Proteinen (HSPs) (78). Auch RIP1 interagiert mit dem Chaperon HSP90 und diese Interaktion ist essentiell für die Stabilität von RIP1 sowie für die Aufrechterhaltung seiner Funktion in der NF- κ B-Aktivierung. Die Behandlung von Zellen mit dem HSP90-Inhibitor Geldanamycin (GA) führt zur Degradierung des RIP1 und zur Inhibition der NF- κ B-Aktivierung. Gleichzeitige Proteasomen-Inhibition verhindert den Abbau des RIP1, welches daraufhin in einer unlöslichen Fraktion akkumuliert, was aber nicht zur Wiederherstellung seiner Funktion in der NF- κ B-Aktivierung führt (155). Aufgrund dieser Erkenntnisse erscheint es möglich, dass M45 RIP1 aus der Bindung mit dem Chaperon-Protein HSP90 verdrängt, gleichzeitig aber durch die Bindung an RIP1 dessen proteasomalen Abbau verhindert. RIP1 würde dann eventuell aufgrund des Verlustes seiner nativen Faltung in die unlösliche Fraktion übergehen und seine Funktion wäre damit inhibiert. Zudem wurde das Hitzeschockprotein HSC70, welches eine Rolle bei der Inaktivierung des HSP90 durch GA spielt (155, 231), als möglicher M45-Interaktionspartner in der Affinitätsaufreinigung gefunden. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob M45 RIP1 aus der Bindung mit HSP90 verdrängt. Als Kontrolle wurden Zellen mit dem HSP90-Inhibitor Geldanamycin behandelt. Anschließend wurde eine

Ergebnisse

Immunpräzipitation mit einem monoklonalen α -RIP1-Antikörper durchgeführt und das an RIP1 gebundene HSP90 nachgewiesen.

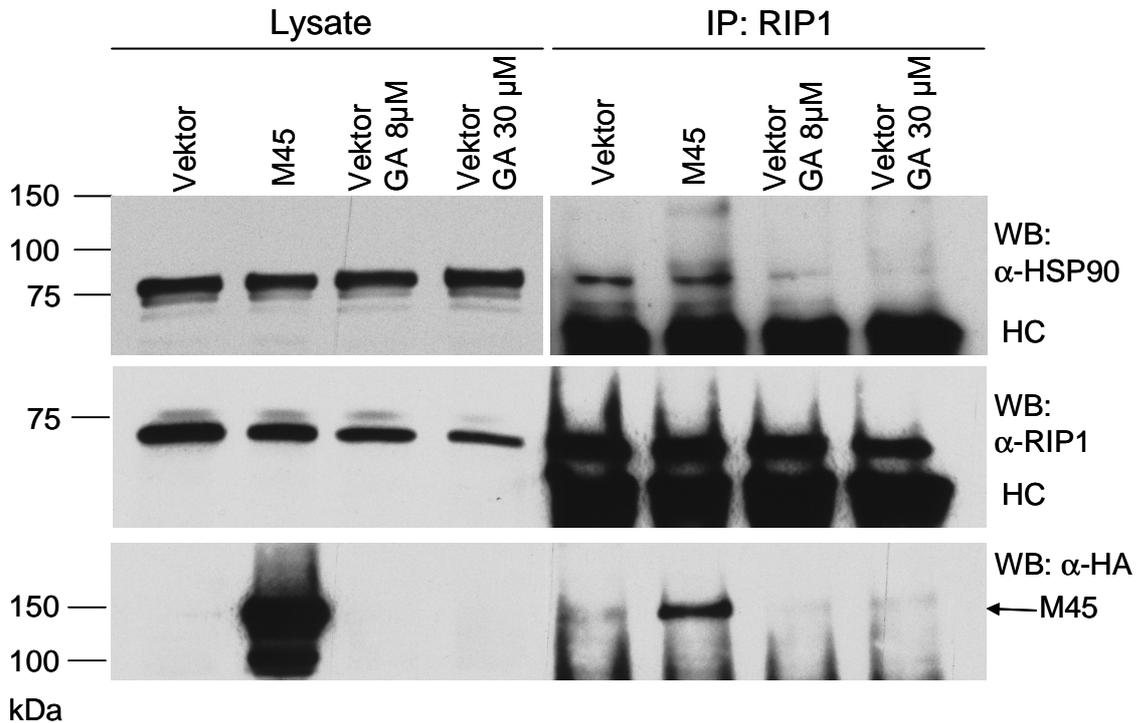


Abbildung 41: Die Interaktion von RIP1 mit HSP90 wird nicht durch M45 verhindert

Pro Probe wurde eine 10-cm-Schale Leervektor- oder M45-transduzierte 10.1 Zellen unbehandelt gelassen oder für 6h mit 8 oder 30 μ M Geldanamycin (GA) behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit Lysispuffer lysiert und eine Immunpräzipitation mit einem α -RIP1-Antikörper (2 μ g/ Probe) und Protein-A-Sepharose durchgeführt. Die Bedingungen der Ko-IP entsprachen den in Abbildung 26 A beschriebenen. Der anschließende Western Blot wurde mit einem polyklonalen α -HSP90-Antikörper angefärbt. Hinterher wurde der selbe Western Blot zur Kontrolle der IP mit dem α -RIP1-Antikörper angefärbt und die Expression von M45 mit einem α -HA-Antikörper (16B12) untersucht. (HC= heavy chain)

Die in dem Versuch verwendeten transduzierten Zellen wurden gleichzeitig für die Analyse der Inhibition des Caspase-unabhängigen Zelltodes verwendet, daher konnte eine Funktionalität des exprimierten M45 sichergestellt werden. Trotz vorhandener Funktionalität bewirkte das exprimierte M45 hingegen keine Verdrängung von RIP1 aus der Interaktion mit HSP90, wie in Abbildung 41 zu sehen ist. Die zur Kontrolle der Versuchsbedingungen durchgeführte Behandlung der Zellen mit Geldanamycin führte dabei aber zu einer deutlichen Verminderung der Bindung von RIP1 an HSP90. Durch diese Ergebnisse kann eine Verdrängung vom RIP1 aus der Interaktion mit seinem Chaperon HSP90 als molekulare Grundlage der M45-Funktion ausgeschlossen werden.

3.8.3 M45 inhibiert die Ubiquitinierung von RIP1

Da M45 nur eine teilweise Verlagerung von RIP1 in die unlösliche Fraktion bewirkt, erscheint es nicht überzeugend, dass dieses Phänomen für die komplette Inhibition der RIP1-Funktion verantwortlich ist. Daher wurde versucht, zwischen aktiviertem und nicht aktiviertem RIP1 zu unterscheiden, da eventuell nur ein Teil des zellulären RIP1 während der Signalübertragung aktiviert wird.

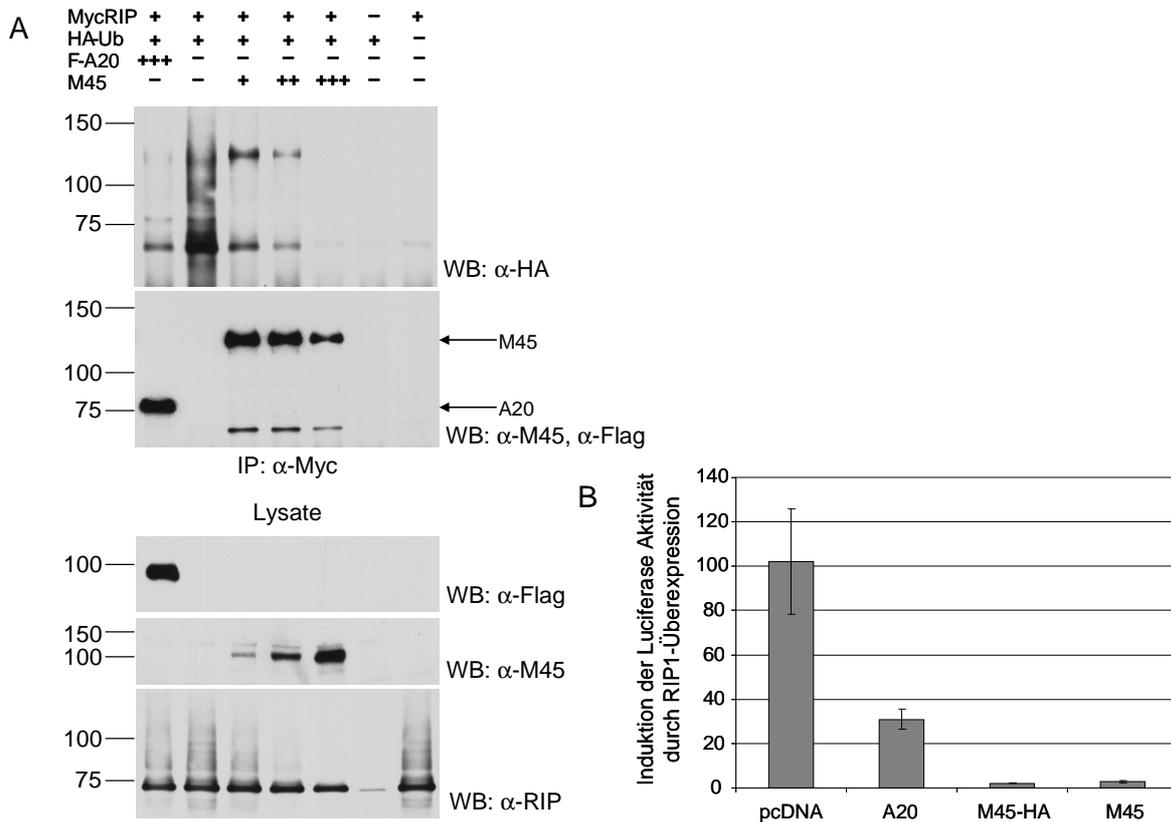


Abbildung 42: M45 inhibiert die Ubiquitinierung von RIP1 und blockiert damit die NF- κ B-Aktivierung durch RIP1-Überexpression

Der Abbildungsteil A zeigt die Immunpräzipitation von überexprimiertem MycRIP mittels eines α -Myc-Antikörpers. Die Ubiquitinierung von MycRIP wurde durch die Expression eines HA-getaggtgen Ubiquitins (HA-Ub) in dem anschließenden α -HA Western Blot als Leiter hochmolekularer RIP1-Spezies sichtbar gemacht (Spur 2). Die Ubiquitinierung wurde durch die Expression von M45 und A20 unterdrückt. Zur Inhibition des durch RIP1-Überexpression ausgelösten apoptotischen Zelltodes wurde bei allen Proben auch noch ein CrmA-Expressionsplasmid (viraler Caspase-Inhibitor) kotransfiziert. Der zweite Bildteil zeigt die Anfärbung des gestripten Blots mit einem spezifischen α -M45-Antikörper und einem α -Flag-Antikörper, die zeigte, dass die im oberen Blot detektierten Extrabanden (Spur 1, 3 und 4) auf die Kopräzipitation von ebenfalls ubiquitiniertem Flag-A20 (Spur 1) und M45 (Spur 3-5) zurückzuführen waren. Die unteren drei Western Blots zeigen die Expression von RIP1, detektiert mit einem spezifischen α -RIP1-Antikörper, sowie die Expression von Flag-A20 und M45 in den Lysaten, die für die Ko-IP benutzt wurden. Abbildungsteil B zeigt in einem NF- κ B-abhängigen Luciferase-Reporter-Gen-Assay, dass die Überexpression von MycRIP zur Aktivierung von NF- κ B führte, welche durch die gleichzeitige Expression von M45 und A20 inhibiert wurde. Die Durchführung des NF- κ B-abhängigen Luciferase-Reporter-Gen-Assay erfolgte wie in Abbildung 32 beschrieben, nur dass die Induktion der Luciferase-Expression nicht durch TNF- α -Behandlung bewirkt wurde, sondern durch die Überexpression von MycRIP. Als uninduzierte Kontrollen wurden für jede Probe Zellen mit der gleichen Menge und Zusammensetzung an Plasmiden transfiziert, aber anstelle des Expressionsplasmids für MycRIP wurde leeres pcDNA3 kotransfiziert. Die Abbildung zeigt die Induktion des NF- κ B-abhängigen Promotors durch MycRIP-Überexpression im Vergleich zu Zellen ohne MycRIP-Überexpression.

Bei der TNF- α -induzierten NF- κ B-Aktivierung erfolgt die Stimulus-abhängige Aktivierung von RIP1 durch eine Lysin-63-(K63)-verknüpfte Ubiquitinierung durch TRAF2. Diese Ubiquitinierung führt zur Rekrutierung von NEMO (IKK γ) und Aktivierung des IKK-Kinase-Komplexes und ist essentiell für die NF- κ B-Aktivierung (66). Der zelluläre RIP1-Inhibitor A20 entfernt die K63-verknüpfte Ubiquitinierung von RIP1 und bewirkt stattdessen eine Lysin-48-(K48)-Ubiquitinierung des RIP1, welche durch den proteasomalen Abbau von RIP1 zur Beendigung der NF- κ B-Aktivierung führt (283). Da auch eine Überexpression von RIP1 dessen K63-Ubiquitinierung und die Aktivierung von NF- κ B verursacht (283), sollte dies genutzt werden, um zu überprüfen, ob M45 die Ubiquitinierung von RIP1 verhindert. Hierfür wurde Myc-getaggtetes RIP1 (MycRIP) in 293 Zellen überexprimiert, zusammen mit Expressionsplasmiden für M45 und Flag-getaggttem A20 (Flag-A20) sowie HA-getaggttem Ubiquitin (HA-Ub). In der Immunpräzipitation von MycRIP mit einem α -Myc-Antikörper kann die Ubiquitinierung im anschließenden α -HA Western Blot als hochmolekulare Leiter sichtbar gemacht werden. Abbildung 42 A zeigt, dass die durch MycRIP-Überexpression ausgelöste Ubiquitinierung von RIP1 sowohl durch A20 als auch durch M45 verhindert werden kann. Um dieses Ergebnis mit einem anderen Antikörper zu bestätigen, wurde ein Teil der selben IP-Proben in einem anderen Western Blot mit einem spezifischen α -Ubiquitin-Antikörper (Ub (P4D1)) angefärbt. Auch hierbei zeigte sich, dass M45 die Ubiquitinierung des MycRIP verhindert (Ergebnisse nicht dargestellt). Die Inhibition der RIP1-Ubiquitinierung durch M45 wurde hierdurch zusätzlich mit einem anderen Antikörper bestätigt.

Des Weiteren zeigt Abbildung 42 A, dass M45 und A20 mit MycRIP kopräzipitieren, da die im oberen Western Blot zu erkennenden Extrabanden (Spuren 1, 3 und 4) durch die erneute Anfärbung des gestrippten Blots mit spezifischen α -M45- und α -Flag-Antikörpern als M45 und Flag-A20 identifiziert wurden. Offenbar werden also auch M45 und A20 ubiquitiniert, da sie in dem α -HA Western Blot mit angefärbt worden waren.

Die durch RIP1-Überexpression verursachte NF- κ B-Aktivierung wurde gleichzeitig in einem NF- κ B-abhängigen Luciferase-Reporter-Gen-Assay untersucht. Hierfür wurden 293 Zellen mit den gleichen Plasmidverhältnissen wie in der Immunpräzipitation von MycRIP transfiziert, aber anstelle des HA-Ubiquitin-Expressionsplasmids wurden das Luciferase-Reporter-Plasmid und das β -Galaktosidase-Kontrollplasmid kotransfiziert.

Der Luciferase-Reporter-Gen-Assay zeigte, dass die Blockierung der RIP1-Ubiquitinierung durch M45 und A20 mit einer Inhibition der durch RIP1-Überexpression verursachten NF- κ B-Aktivierung einhergeht. Der inhibierende Effekt von M45 ist hierbei noch wesentlich stärker ausgeprägt als der schon in vorangegangenen Arbeiten gezeigte Effekt von A20 auf die durch RIP1-Überexpression induzierte NF- κ B-Aktivierung (Abbildung 42 B).

Ergebnisse

Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die molekulare Grundlage der Funktion von M45 die Inhibition der Stimulus-induzierten RIP1-Ubiquitinierung ist. Auf diese Weise kann RIP1 nicht mehr aktiviert werden und daher sind RIP1-abhängige Prozesse blockiert.

4 Diskussion

4.1 Evolution der Cytomegaloviren

4.1.1 Anpassung eines Virus an zelluläre Bedingungen

Viren sind obligat intrazelluläre Parasiten und als solche sind sie für ihre Vermehrung auf spezifische zelluläre Funktionen angewiesen. Außerhalb ihrer Wirtszellen sind Viren nicht lebensfähig, da sie nicht über einen eigenen Metabolismus verfügen und daher ohne die Wirtszelle weder zur Energieproduktion noch zur Proteinsynthese oder zur Synthese makromolekularer Bausteine in der Lage sind. Einen wichtigen Bestandteil im Lebenszyklus von Viren stellt daher die Übertragung von einem Wirt auf den anderen dar. Diese ermöglicht es ihnen, neue Wirtszellen zu finden, deren Stoffwechsel sie für ihre eigene Reproduktion ausnutzen können.

Es gibt für Viren verschiedene Strategien, um sich in einer Wirtspopulation zu erhalten und immer wieder neue Zellen für ihre Vermehrung zu finden. Zum einen besteht die Möglichkeit, dass sie eine sehr effiziente Übertragung von Wirt zu Wirt aufweisen. Hierfür sollte ein Virus sehr infektiös sein, in großer Zahl produziert werden und effektiv, optimalerweise aerogen, übertragen werden oder eine hohe Umweltstabilität aufweisen, so dass auch eine Übertragung über kontaminierte Gegenstände möglich ist. Beispiele hierfür sind das Influenzavirus, der Erreger der Maul-und-Klauenseuche oder das Norovirus. Eine andere Möglichkeit ist die Etablierung von lebenslangen latenten oder persistenten Infektionen. Hierdurch wird in dem latent infizierten Wirt ein Virusreservoir etabliert, von dem aus das Virus bei Reaktivierung immer wieder auf neue Wirte übertragen werden kann. Hierfür bedarf es eines sehr hohen Grades der Anpassung an den Wirt, da das Virus in der Lage sein muss, den verschiedenen hoch effektiven Abwehrmechanismen des Immunsystems zu entkommen und zudem eine möglichst geringe Schädigung des Wirtes zu verursachen. Dies kann in der Regel nur durch eine sehr lange Koevolution des Erregers mit dem Wirt gewährleistet werden (42). Ein Beispiel hierfür sind die Herpesviren, die eine ungefähr 200 Millionen Jahre lange Koevolution mit ihren Wirten durchgemacht haben. Es wird vermutet, dass alle Herpesviren auf einen einzigen Vorläufer zurückzuführen sind. Die Herpesviren der einzelnen Spezies haben daraufhin eine Kospeziation mit ihren jeweiligen Wirtsspezies durchgemacht. Dadurch haben sich die Viren parallel mit ihrem Wirt, seinen zellulären Bedingungen und seinen Abwehrsystemen entwickelt, so dass nach und nach eine optimale Anpassung erfolgen konnte (58, 175, 281).

Für diese optimale Anpassung eines Erregers müssen verschiedene Anforderungen erfüllt werden. Zum einen müssen in der infizierten Zelle Bedingungen geschaffen werden, die eine

optimale Replikation des Virus ermöglichen, und die virale Replikation sollte mit größtmöglicher Unabhängigkeit von den zellulären Syntheseprozessen erfolgen können. Hierfür muss sichergestellt werden, dass die notwendigen makromolekularen Bausteine für den Aufbau der Viruspartikel sowie die notwendige Energie für deren Zusammenbau zur Verfügung stehen. Zudem müssen zelluläre Hindernisse überwunden werden, die es dem Virus erschweren oder unmöglich machen würden, seine Gene zu exprimieren oder seine DNA zu vervielfältigen. Ein Beispiel hierfür ist die durch das HCMV Protein pp71 induzierte Degradierung des zellulären Proteins Daxx, welches ansonsten durch Deacetylierung des Major-immediate-early-Promotors die Transkription der viralen IE-Gene verhindern würde (221). Zum anderen muss sowohl auf zellulärer Ebene als auch auf Ebene des Gesamtorganismus gewährleistet sein, dass die virale Replikation nicht durch die wirtseigenen Immunabwehrmechanismen gestört wird. Hierfür müssen sowohl zellintrinsic Abwehrmechanismen, wie die Auslösung des programmierten Zelltodes in infizierten Zellen, blockiert werden, als auch zellübergreifende immunologische Abwehrstrategien außer Kraft gesetzt werden. Letzteres lässt sich für das Virus ungleich schwerer verwirklichen, da das Virus meist nur direkten Einfluss auf die infizierten Zellen haben kann und somit nicht alle Zellen des Abwehrsystems kontrollieren kann. Daher lässt es sich zum Teil nicht vermeiden, dass nur die Auswirkung der immunologischen Abwehrreaktionen auf die infizierte Zelle unterbunden und nicht die Immunreaktion an sich beeinflusst werden kann. Als letzte Anforderung sollte noch gewährleistet werden, dass die effiziente Vermehrung des Virus möglichst ohne zu große Schädigung des Wirtes erfolgen kann, da für die Etablierung einer lebenslangen persistenten Infektion eine Koexistenz zwischen Virus und Wirt erzielt werden sollte.

4.1.2 Evolutionäre Mechanismen

Die Anpassung der Cytomegaloviren an ihre Wirte ist auf drei verschiedene evolutionäre Mechanismen zurückzuführen. Zum einen erfolgte während der Entstehung der Herpesvirusarten eine Akquisition fremder DNA-Sequenzen des Wirtes oder anderer Viren (278). Zum anderen kam es durch homologe Rekombination innerhalb des Genoms zu invertierten oder Tandem-Wiederholungssequenzen, so dass Gene verdoppelt wurden und andere Gene aufgrund der limitierenden Größe des Genoms verloren gegangen sind (239). Des Weiteren kommt es trotz hoher Genauigkeit der Herpesvirus DNA-Polymerase zu Punktmutationen, die mit einer geschätzten Häufigkeit von 1×10^{-7} bzw. $2,7 \times 10^{-9}$ Substitutionen pro Nukleotid pro Jahr für synonyme und nicht synonyme Austausche auftreten (264). Durch die Aneignung von Wirts-DNA-Sequenzen können diverse Funktionen des zellulären Metabolismus, der DNA-Synthese und der Immunabwehr des Wirtes kopiert werden und durch Rekombination und Nukleotidaustausche können diese Funktionen so

manipuliert, optimiert und zum Vorteil des Virus ausgenutzt werden, dass eine Koexistenz zwischen Virus und Wirt ermöglicht wird.

Tatsächlich finden sich im Genom des humanen und murinen Cytomegalovirus verschiedene Gene mit Homologie zu zellulären Genen mit Funktionen im Metabolismus und in der DNA-Synthese (DNA-Helikase, DNA-Polymerase, Deoxyuridin-Triphosphatase, Proteinkinase und Uracil-DNA-Glykosylase) sowie Gene mit immunologischen Funktionen (IL-10, MHCI) (139, 214).

Im Unterschied zu anderen Herpesviren kodieren Cytomegaloviren aber nicht für Enzyme für die Biosynthese von Nukleotiden wie Thymidin-Kinase, Dihydrofolat-Reduktase und Thymidylat-Synthase (89). Sie besitzen zwar ein Homolog der großen Untereinheit (R1) der Ribonukleotidreduktase, kodiert von M45 und UL45, aber keines der kleinen Untereinheit (R2). Zudem wurde gezeigt, dass die R1-Untereinheit des murinen Cytomegalovirus aufgrund von Mutationen in essentiellen Aminosäuren nicht funktionell ist (154). Cytomegaloviren haben eine andere Strategie entwickelt, um optimale Bedingungen für ihre DNA-Synthese zu schaffen, indem sie gezielt die Produktion verschiedener zellulärer Enzyme hochregulieren, die bei der Nukleotid-Biosynthese benötigt werden (89, 154, 192, 200). Ein Beispiel hierfür ist die zelluläre Ribonukleotidreduktase.

4.1.3 Das murine Cytomegalovirus-Gen M45 als Beispiel für Koevolution

Das murine Cytomegalovirus-Gen M45 ist ein sehr gutes Beispiel für die Genakquisition und Genadaptation während der Koevolution der Herpesviren mit ihren Wirtsspezies. Es kann vermutet werden, dass das RNR R1-Homolog zu frühen Zeiten der herpesviralen Evolution vom Wirtsgenom akquiriert wurde, da alle Herpesviren dieses Gen aufweisen. Das Homolog für die R2-Untereinheit, welches bei α - und γ -Herpesviren zu finden ist, nicht aber bei β -Herpesviren wie den Cytomegaloviren, ist entweder irgendwann in der Evolutionslinie der β -Herpesviren verloren gegangen oder es wurde bei den anderen Herpesviren später akquiriert, nachdem die Trennung von den β -Herpesviren erfolgt war. Da die Cytomegaloviren wie erwähnt eine andere Strategie entwickelt haben, um eine ausreichende Versorgung mit DNA-Bausteinen sicherzustellen, ist die Funktion der Cytomegalovirus-RNR R1-Untereinheit überflüssig geworden. Der fehlende Selektionsdruck ermöglichte es, dass dieses Gen vermutlich durch verschiedene Mutationen eine andere Funktion annehmen konnte (29, 154). Die Analyse der neu erworbenen Funktion des murinen Cytomegalovirus-Proteins M45 war Gegenstand der Untersuchungen der vorliegenden Dissertation.

4.2 Evasion immunologischer Abwehrmechanismen bei Cytomegaloviren

Die immunologischen Abwehrmechanismen des Wirtes beruhen, wie in der Einleitung beschrieben, auf einer Vielzahl verschiedener Detektionssysteme, die entweder innerhalb oder außerhalb einer Zelle die Anwesenheit eines Virus oder einer Störung registrieren. Zudem kommt es durch die Erkennung eines Krankheitserregers zur Sezernierung von Zytokinen, die an Rezeptoren auf der Zelloberfläche binden und Signalkaskaden in den Zellen auslösen, so dass uninfizierte Zellen auf eine mögliche Infektion vorbereitet werden. Diese diversen äußeren und inneren Signale führen zur Aktivierung einer begrenzten Zahl von Transkriptionsfaktoren und Effektormechanismen, so dass auf die Vielzahl verschiedener schädigender Signale mit einer limitierten Anzahl von Effektorfunktionen reagiert werden kann. Häufig kommt es zunächst zu einer Aktivierung von NF- κ B, wodurch in der Zelle verschiedene Mechanismen aktiviert werden, die zur antiviralen Abwehr, zur Beseitigung anderer Störungen und zum Überleben der Zelle unter Stress benötigt werden. Wenn der schädigende Einfluss zu lange anhält, kommt es durch die gleichen Signale stattdessen zur Initiation des programmierten Zelltodes.

Das Adapterprotein RIP1 steht an einem Schnittpunkt verschiedener immunologischer Detektionssysteme und Zytokinsignaltransduktionswege und ist verantwortlich für die Aktivierung von NF- κ B sowie für die Auslösung des Caspase-unabhängigen Zelltodes (74). Diese zentrale Stellung in Detektions- und Abwehrsystemen macht RIP1 zu einem idealen Angriffspunkt für ein Virus, um gleich mehrere zelluläre Abwehrmechanismen außer Kraft zu setzen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das murine Cytomegalovirus-Protein M45 das zentrale Signalmolekül RIP1 angreift, seine Aktivierung durch Ubiquitinierung verhindert und so gleichzeitig verschiedene proinflammatorische und antivirale Signalwege blockiert. Da sowohl die Auslösung einer antiviralen proinflammatorischen Immunantwort über NF- κ B als auch die Initiation des programmierten Zelltodes sehr nachteilig für die erfolgreiche Replikation eines Virus sind, ist die Funktion von M45 offensichtlich sehr wertvoll für das murine Cytomegalovirus. Mit der Blockierung der proinflammatorischen und antiviralen Signalwege ergänzt M45 die anderen schon bekannten Immunevasionsmechanismen des murinen Cytomegalovirus.

Die verschiedenen Abwehrmechanismen der angeborenen Immunität, die Cytomegaloviren aufgrund ihrer besonders starken antiviralen Wirksamkeit blockieren müssen, lassen sich in vier Bereiche einteilen (Abbildung 43). Zunächst erfolgt die Erkennung der Virusinfektion. Daraufhin kommt es zur Produktion proinflammatorischer Zytokine und Interferone, wobei die

proinflammatorischen Zytokine und das Interferonsystem daraufhin separate antivirale Wirkungen aufweisen. Der vierte Bereich der antiviralen Abwehr, der sich als sehr wirkungsvoll gegenüber Cytomegaloviren erweist, ist die Induktion des programmierten Zelltodes.

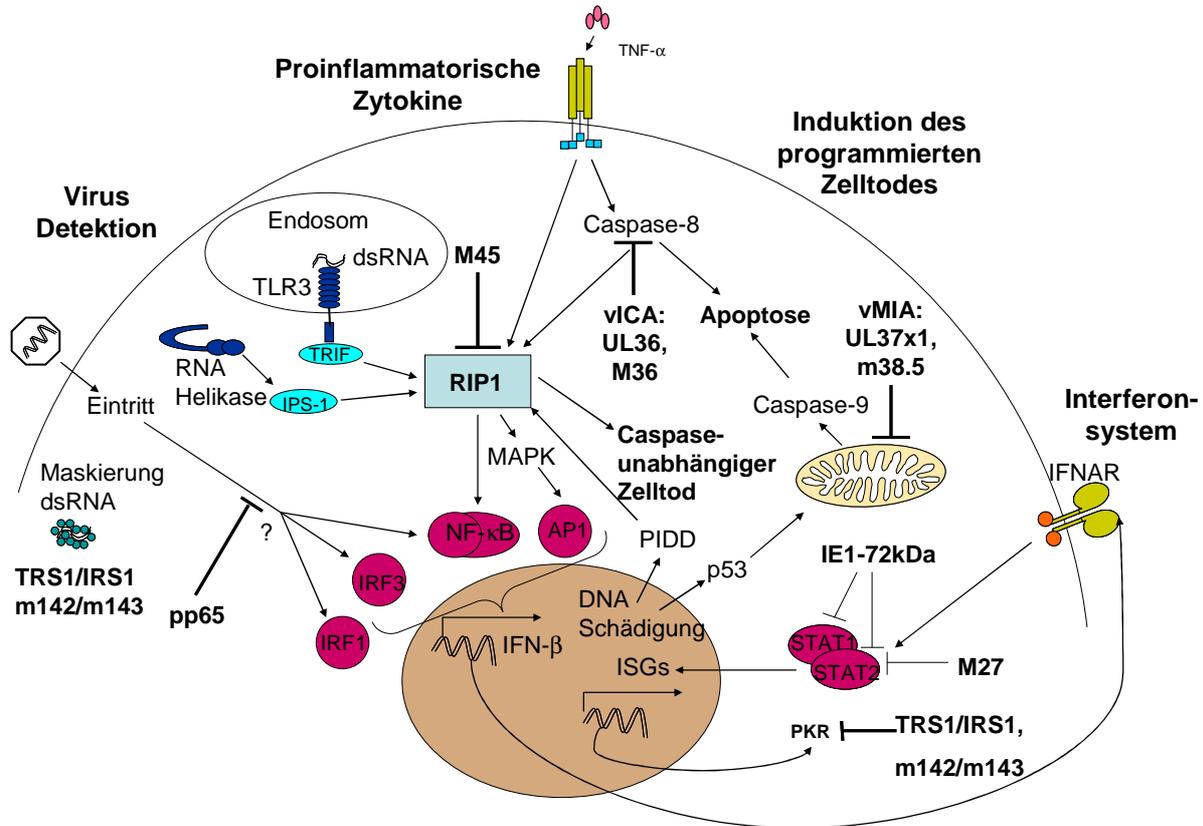


Abbildung 43: Immunevasion bei Cytomegaloviren

Die Abbildung zeigt die bei Cytomegaloviren bekannten Immunevasionsfunktionen und wie diese durch die Inhibition RIP1-abhängiger Signalwege durch M45 ergänzt werden bzw. werden könnten.

Wie die Cytomegaloviren den Immunabwehrmechanismen dieser vier Teilbereiche entgegenwirken, wie M45 die Immunevasion in diesen Bereichen ergänzt, und wie mögliche weitere Funktionen von M45, die über die Blockierung RIP1-abhängiger Signalwege verlaufen, die Immunevasion zusätzlich ergänzen könnten, soll in den folgenden Absätzen besprochen werden.

4.2.1 Immunevasion bei der Detektion

Es ist bekannt, dass eine Infektion mit Cytomegaloviren durch verschiedene Rezeptoren und Sensoren von der betroffenen Zelle detektiert wird. Die verschiedenen Detektionssysteme führen letztlich zur Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren wie NF-κB, AP-1 und den IRFs, welche die Immunreaktion der Zelle durch die Transkription verschiedener antiviraler und immunologisch wirksamer Gene vermitteln. Die IRFs sind von großer Bedeutung, da sie zur Transkription der Interferongene sowie verschiedener Interferon-stimulierter Gene führen.

Im Verlauf einer Cytomegalovirusinfektion kommt es vermutlich zur Stimulation des TLR3 durch dsRNA als auch des TLR9 durch virale CpG-DNA (62, 102, 142, 256). Direkt bei der Adsorption der Viruspartikel an die Zelle erfolgt eine Stimulation des TLR2 durch die viralen Glykoproteine gB und gH (22, 23, 53). Des Weiteren findet bei der Penetration der Viruspartikel von HCMV eine Aktivierung Interferon-stimulierter Gene statt, die entweder über IRF3 (1) oder über NF- κ B und IRF1 (28) erfolgt. Der Sensor für diese Aktivierung ist derzeit unbekannt.

4.2.1.1 Induktion der antiviralen Immunantwort durch dsRNA

Doppelsträngige RNA ist ein sehr wichtiges virales PAMP und daher von zentraler Bedeutung für die virusinduzierte Aktivierung der angeborenen antiviralen Immunantwort.

DsRNA wird vor allem in Endosomen aber auch außerhalb der Zelle durch TLR3 detektiert (5, 173). Dessen Stimulation führt über Rekrutierung des Adapters TRIF zur Aktivierung von IRF3/7 und NF- κ B (119, 182). Auch die beiden RNA-Helikasen RIG-I und Mda5 sind an der Detektion der dsRNA während der Virusinfektion beteiligt (293). Sie detektieren dsRNA im Zytoplasma und führen daraufhin über den Adapter IPS-1 (132) zur Aktivierung von NF- κ B und IRF3/7. In beiden Fällen verläuft die Aktivierung von NF- κ B vermutlich über RIP1, wohingegen die Aktivierung von IRF3 und IRF7 über die Kinasen TBK1 und IKK ϵ vermittelt wird.

Zudem tragen auch die Komponenten des Interferonsystems PKR und OAS zur Detektion der dsRNA bei (213).

Die Erkenntnis, dass M45 in der Lage ist, TLR3-vermittelte Signalwege zu inhibieren, erweitert seine Bedeutung für die MCMV-Infektion, da auf diese Weise ein früher Virusdetektionsmechanismus blockiert wird.

Wie wichtig TLR3 für die Aktivierung einer antiviralen Immunantwort während der MCMV-Infektion ist, ist umstritten. Eine Untersuchung hat gezeigt, dass TLR3 keinen Einfluss hat auf die adaptive T-Zell-Antwort bei einer MCMV-Infektion (67). Eine andere Untersuchung hingegen hat demonstriert, dass während einer MCMV-Infektion TLR3 und TLR9 aktiviert werden und dass beide Rezeptoren notwendig sind, um eine effektive angeborene Immunantwort gegenüber MCMV zu vermitteln (256). Zudem zeigte eine weitere Untersuchung, dass Mäuse mit einem Defekt im TLR3- und TLR4-Signaladapter TRIF eine stark erhöhte Sensitivität gegenüber MCMV-Infektionen aufweisen, da sie in Reaktion auf die Infektion kein Typ-1-Interferon produzieren (102). Dies legt nahe, dass vermutlich TLR3 oder ein anderer Rezeptor, der TRIF als Adapter benutzt, von entscheidender Bedeutung für die Bekämpfung der MCMV-Infektion ist. Im Unterschied zu anderen Toll-like Rezeptoren wird TLR3 in vielen Zelltypen exprimiert, einschließlich Epithelzellen, Fibroblasten, sowie Endothelzellen (123, 263). Bei HCMV wurde für Endothelzellen ein spezieller Entry-Weg

über Endosomen beschrieben (220). Bei einem solchen Viruseintritt könnte TLR3 eventuell sogar direkt durch die im Tegument mitgebrachten RNAs aktiviert werden.

Ob RIG-I oder Mda5 während der Cytomegalovirusinfektion stimuliert werden, ist bisher nicht untersucht worden. Es ist aber durchaus möglich, dass diese zytoplasmatischen dsRNA-Sensoren bei der Infektion mit CMV aktiviert werden, da, wie in der Einleitung beschrieben, durch die Transkription gegenläufig kodierter überlappender Gene während der Infektion vermutlich Transkripte entstehen, die zum Auftreten von dsRNA-Molekülen im Zytoplasma führen. Zudem zeigt die Aktivierung der Proteinkinase R in Abwesenheit der viralen Proteine m142 oder m143 (265), dass dsRNA während einer MCMV-Infektion im Zytoplasma vorhanden ist.

Die Bindung dsRNA durch die MCMV-Proteine m142 und m143 (47, 49) sowie die HCMV-Proteine TRS1 und IRS1 (48) kann ebenfalls als ein Schutz vor der Aktivierung einer antiviralen Immunantwort gesehen werden. Ob die Bindung der dsRNA durch diese Proteine allerdings ausreichend ist, um die dsRNA zu maskieren und damit alle durch dsRNA aktivierten Immunreaktionen zu blockieren oder ob diese Proteine ausschließlich die Aktivierung der PKR verhindern, bleibt unklar.

Da RIP1 vermutlich auch an der Aktivierung von NF- κ B nach Stimulation der RNA-Helikasen RIG-I und Mda5 beteiligt ist, könnte M45 potentiell auch diese Detektionssysteme inhibieren.

4.2.1.2 Induktion der antiviralen Immunantwort durch dsDNA

Kürzlich wurde gezeigt, dass es neben TLR9 auch ein zytoplasmatisches Detektionssystem für dsDNA gibt. Es wurde dargestellt, dass zytoplasmatische dsDNA (unter anderem von HCMV) ebenfalls zu einer Typ-1-Interferonantwort führen kann, welche unabhängig von TLRs und RIG-I ist (113). Der Sensor, welcher hierbei IRF-3 und NF- κ B aktiviert, ist das Protein DAI (DNA-dependent activator of IRFs) (259). Die Bedeutung für die CMV-Infektion ist jedoch noch nicht geklärt. Eventuell tritt während der Infektion gar keine „nackte“ virale DNA im Zytoplasma auf, da sie mit dem Kapsid direkt zum Zellkern transportiert wird und dort durch die Kernporen in den Zellkern entlassen wird. In diesem Fall könnten auch die Komponenten des viralen Nukleokapsids und der Eintrittsmechanismus als Immunevasionsstrategie betrachtet werden.

4.2.1.3 Induktion der antiviralen Immunantwort durch Partikeleintritt

Direkt beim Eintritt des humanen Cytomegalovirus in die Zelle wurden zwei weitere Möglichkeiten beschrieben, wie es zur Induktion einer antiviralen Immunantwort kommt. Zum einen führt die Erkennung der Glykoproteine gB und gH durch TLR2 bei der Bindung des Virus an die Zelloberfläche zur Aktivierung von NF- κ B und AP-1 (22, 23, 53). TLR2 wird

jedoch nicht auf allen Zelltypen exprimiert. Beim murinen Cytomegalovirus ist es zudem umstritten, ob TLR2 an der Erkennung von MCMV in vivo beteiligt ist (62, 255).

Bei HCMV wurde gezeigt, dass es bei der Aufnahme des Virus in die Zelle über Membranfusion durch ein unbekanntes Signal zur Induktion einer antiviralen Immunantwort und zur Expression von Interferon-stimulierten Genen kommt (1, 28). Ob diese frühe Induktion der antiviralen Immunantwort über eine Aktivierung von IRF3 (1) oder IRF1 und NF- κ B erfolgt (28), wird kontrovers diskutiert. Die Autoren zeigten jedoch, dass diese frühe Immunantwort bei HCMV offenbar von dem viralen Protein pp65, dem Hauptbestandteil des Teguments, sofort nach Eintritt in die Zelle blockiert wird. Damit ist pp65 bisher das einzige Cytomegalovirus-Gen, von dem gezeigt wurde, dass es direkt die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren der antiviralen Immunität verhindert. Ein ähnliches Phänomen wird beim Rhesus-CMV beobachtet, wobei das Virionprotein, welches die frühe Aktivierung von IRF3 in diesem Fall verhindert, nicht näher spezifiziert wurde (61).

4.2.2 Inhibition des Interferonsystems

Die an der angeborenen Immunität beteiligten Transkriptionsfaktoren steuern die Expression einer Vielzahl von Genen. Ihre wahrscheinlich wichtigste antivirale Funktion ist die transkriptionelle Aktivierung der Interferongene. Interferone sind, wie in der Einleitung besprochen, sehr potente antivirale Zytokine. Das Interferonsystem ist neben der zellulären Immunität, vermittelt durch NK- und T-Zellen, maßgeblich an der Kontrolle der Cytomegalovirusinfektion beteiligt (187). Die Transkription von IFN- β wird gemeinsam durch die Transkriptionsfaktoren NF- κ B, AP-1 und IRF-3 reguliert. Nach derzeitigem Kenntnisstand ist die einzige Rolle, die M45 potentiell im Interferonsystem spielt, die mögliche Beeinträchtigung der IFN- β -Produktion durch die Inhibition der NF- κ B-Aktivierung nach Stimulation von Zellen mit TNF- α oder dsRNA.

Sollte auch das MCMV-Homolog von pp65 tatsächlich die Aktivierung von IRF3 blockieren, so spielt die Inhibition von NF- κ B durch M45 für die Hemmung der Interferonantwort vermutlich nur eine untergeordnete Rolle, da IRF3 als der entscheidende Transkriptionsfaktor für die Produktion von Interferon und die Aktivierung der Interferon-stimulierten Gene (ISGs) angesehen wird (213). Da aber weder eindeutig geklärt ist, ob HCMV pp65 die IRF3-Aktivierung verhindert, noch ob dies bei MCMV auf gleiche Weise erfolgt, kann über die Bedeutung von M45 für die Aktivierung der Interferonantwort nur schwer spekuliert werden. Es wäre in diesem Zusammenhang sicherlich interessant, die Mengen an synthetisiertem IFN- β nach Infektion von Interferon-produzierenden Zellen mit MCMVwt und Δ M45 zu bestimmen; nur so kann der Einfluss der Blockierung einer NF- κ B-Aktivierung durch M45 auf die Interferonproduktion abschließend geklärt werden.

Potentiell wäre M45 ähnlich wie HCMV pp65 in der Lage, eine antivirale Immunantwort direkt beim Eintritt der Viruspartikel in die Zelle zu blockieren, da auch M45 Teil des viralen Teguments ist (128, 154) und so direkt beim Viruseintritt mit in die Zelle gelangt. Die mitgebrachten Mengen von M45 könnten ausreichend sein, um eine direkte Blockierung von NF- κ B zu ermöglichen. Zumindest das HCMV-Homolog UL45 macht einen relativen Anteil von knapp 5% am Tegument aus (269). Die Analyse des Zeitverlaufs der Inhibition der TNF- α -vermittelten I κ B α -Degradierung zeigte zwar eine Inhibition bei 5h, nicht aber bei 2h nach Infektion. Es ist aber möglich, dass nach 2h das mitgebrachte M45 schon nicht mehr funktionell ist, aber zu noch früheren Zeitpunkten eine Inhibition durch mitgebrachtes M45 erfolgen könnte. Das durch TNF- α induzierte Signal könnte auch zu stark sein, um in ausreichender Weise durch mitgebrachtes M45 blockiert werden zu können. Dies könnte aber bei den durch Partikel-Eintritt ausgelösten Signalen anders sein.

Da sowohl HCMV als auch MCMV, wie in der Einleitung beschrieben, weitere Teile des Interferonsystems blockieren können, ist die Inhibition der IFN- β -Produktion eventuell von untergeordneter Bedeutung.

4.2.3 Inhibition der Wirkung des proinflammatorischen Zytokins TNF- α

Proinflammatorische Zytokine sind wichtige Mediatoren in der angeborenen Immunität. Besonders das proinflammatorische Zytokin TNF- α weist potente Wirksamkeit gegenüber diversen Krankheitserregern auf. TNF- α kann in betroffenen Zellen verschiedene Signalwege auslösen. Die potente antivirale Wirksamkeit des TNF- α basiert neben der Induktion des programmierten Zelltodes, welcher in Abschnitt 4.2.4.1 diskutiert wird, hauptsächlich auf der Aktivierung von NF- κ B, aber auch die Aktivierung von MAPK kann antivirale Effekte ausüben. Zudem vermittelt TNF- α antivirale Effekte, bei denen die zellulären Signalwege noch nicht bekannt sind.

4.2.3.1 Inhibition der NF- κ B-Aktivierung

Schon in früheren Arbeiten wurde beobachtet, dass MCMV die TNF- α -induzierte Aktivierung von NF- κ B in infizierten Makrophagen verhindert. Dieser Effekt wurde auf die Herunterregulation des TNFR1 und TNFR2 zurückgeführt, das hierfür zuständige Genprodukt wurde aber nicht beschrieben (208). In unseren Untersuchungen konnten wir in verschiedenen infizierten Fibroblasten und Endothelzellen keine Herunterregulation des TNFR1 beobachten (Ergebnisse nicht abgebildet). Zudem zeigt die Sensitivität der Δ M45- und Δ M36-infizierten Zellen gegenüber TNF- α -induziertem Zelltod, dass die vermutete Herunterregulation des TNFR1 offenbar nicht so stark ist, dass die Zellen nicht auf die TNF- α -Behandlung reagieren würden. Eventuell ist der Effekt der TNFR1-Herunterregulation

spezifisch für Makrophagen. Es ist zu vermuten, dass die beschriebene Inhibition der TNF- α -induzierten NF- κ B-Aktivierung in Makrophagen auf die in dieser Arbeit beschriebene Funktion von M45 zurückzuführen ist. Die Autoren dieser Arbeit konnten zeigen, dass der inhibitorische Effekt abhängig von replikationsfähigem Virus war, sich aber als unabhängig von viraler DNA-Synthese und Late-Genexpression erwies, was mit unseren Ergebnissen zur Inhibierbarkeit des Δ M45-induzierten Zelltodes übereinstimmt (Abschnitt 3.2). Die in der Arbeit von Popkin et al. beobachtete Herunterregulation des TNFR1 ist möglicherweise ein Nebeneffekt, der zumindest in Fibroblasten und Endothelzellen nicht für die Inhibition der TNF- α -vermittelten NF- κ B-Aktivierung verantwortlich ist. Auch bei HCMV wurde eine virusvermittelte Inhibition der TNF- α - und IL-1 β -induzierten NF- κ B-Aktivierung beschrieben, welche auf zwei unterschiedlichen Mechanismen beruht (116). Die Inhibition der TNF- α -vermittelten NF- κ B-Aktivierung wurde bei HCMV ebenfalls auf die Herunterregulation des TNFR1 zurückgeführt, das hierfür verantwortliche Genprodukt ist ebenfalls noch nicht bekannt (190). Ebenso hat eine weitere Arbeitsgruppe gezeigt, dass HCMV den TNFR1 herunterreguliert, um die TNF- α -Signaltransduktion zu blockieren (12).

Die Aktivierung von NF- κ B scheint für die Cytomegalovirusinfektion eine ambivalente Wirkung zu haben. Dies ist verständlich, da NF- κ B ein sehr starker Transkriptionsfaktor ist, der an der transkriptionellen Aktivierung von über 150 verschiedenen zellulären Genen beteiligt ist (227). Diese Gene haben sehr divergente Funktionen. Einige sind an der Immunantwort und an Entzündungsreaktion beteiligt, wie verschiedene Zytokine, Chemokine, Adhäsionsmoleküle und Rezeptoren für Immunerkennung und Antigenpräsentation. Andere sind wichtig für die Zellproliferation, wie Cyclin D1 und c-myc. Wieder andere NF- κ B-regulierte Gene haben antiapoptotische Wirkung, wie die verschiedenen Proteine der Bcl2-Familie, zelluläre Apoptoseinhibitoren, wie c-IAP1, c-IAP2, XIAP und cFLIP, sowie Adapterproteine wie TRAF1 und TRAF2.

Des Weiteren nutzen viele Viren, wie auch die Cytomegaloviren, den starken Transkriptionsfaktor NF- κ B als Transaktivator für ihre eigenen Gene (227).

Aufgrund dieser diversen Funktionen NF- κ B-kontrollierter Gene ist die Aktivierung von NF- κ B bei vielen Viren vielschichtig reguliert, wie auch bei den Cytomegaloviren. Bei HCMV kommt es zu einer frühen Aktivierung von NF- κ B durch die Detektion viraler Komponenten über die Sensoren der angeborenen Immunität. Diese frühe Aktivierung von NF- κ B ist offensichtlich bei wachstumsarretierten Zellen essentiell für die Initiation der viralen Replikation (33). Dies ist darauf zurückzuführen, dass der Major-Immediate-Early-Promotor von HCMV und MCMV multiple Bindungsstellen für NF- κ B aufweist und NF- κ B so als Transaktivator für die viralen IE-Gene wirkt. Wenn Zellen sich hingegen aktiv teilen, ist die transkriptionelle Aktivierung der

IE-Gene und damit die Initiation der viralen Replikation nicht von NF- κ B abhängig, vermutlich weil hier ausreichend andere Transkriptionsfaktoren aktiv sind, die die fehlende Aktivität von NF- κ B ausgleichen können. Da HCMV aber bei seiner Pathogenese in vivo auf die Infektion wachstumsarretierter Zellen angewiesen ist, scheint die frühe Aktivierung von NF- κ B förderlich für die HCMV-Infektion zu sein.

Zu späteren Zeitpunkten im Replikationszyklus wird die Aktivierung von NF- κ B durch verschiedene Stimuli dann stark unterdrückt und man kann annehmen, dass dies aufgrund der Blockierung von proinflammatorischen Immunreaktionen von Vorteil für das Virus ist (34, 69, 116, 190).

Andere Viren profitieren in anderer Hinsicht von einer anhaltenden Aktivierung von NF- κ B. Die hierbei exprimierten zellulären antiapoptotischen Gene verhindern den vorzeitigen Zelltod infizierter Zellen. Dies wurde zum Beispiel für das Hepatitis-C-Virus (258) und das Herpes-simplex-Virus beschrieben (86). Bei HCMV und MCMV wird die Aktivierung von NF- κ B zur Unterdrückung des vorzeitigen Zelltodes zu späteren Zeitpunkten des Infektionszyklus offenbar nicht mehr benötigt, da sie den programmierten Zelltod selbstständig mit diversen Genfunktionen blockieren können.

Daher ist auch die Rolle von M45 nicht als ambivalent zu betrachten, was man zunächst vielleicht vermuten könnte bei einem Protein, welches den Caspase-unabhängigen Zelltod inhibiert, gleichzeitig aber mit der Inhibition von NF- κ B sozusagen die zelleigene Zelltodinhibition blockiert und damit wiederum den Zelltod fördert. Da sich die Aktivierung von NF- κ B aber nicht so stark gegen den Caspase-unabhängigen Zelltod richtet (163), würde die alleinige Aktivierung von NF- κ B eine MCMV-infizierte Zelle nicht ausreichend vor programmiertem Zelltod schützen. Daher verfolgt MCMV die Strategie, den Caspase-unabhängigen Zelltod durch M45 zu blockieren, die Apoptose ebenfalls selbstständig durch verschiedene virale Genprodukte zu blockieren und zu späteren Zeitpunkten darüber hinaus die NF- κ B-Aktivierung zu inhibieren, um gleichzeitig die durch NF- κ B verursachte antivirale und proinflammatorische Immunreaktion zu unterdrücken.

Eine der wichtigsten antiviralen Funktionen der NF- κ B-Aktivierung ist, wie oben besprochen, vermutlich die Beteiligung an der transkriptionellen Aktivierung von IFN- β . In verschiedenen Virusinfektionen scheint die Aktivierung von NF- κ B hingegen auch direkt, d.h. nicht über die Produktion von antiviralen Zytokinen, einen antiviralen Effekt auf die Virusreplikation auszuüben, wobei die zugrunde liegenden Mechanismen in den meisten Fällen nicht aufgeklärt sind.

Zum Beispiel hat eine frühe Aktivierung von NF- κ B bei dem humanen Parainfluenzavirus Typ 3, dem Respiratory-Syncytial-Virus und dem Vesicular-Stomatitis-Virus eine antivirale Wirkung, die nicht über Interferon oder andere lösliche Faktoren

vermittelt wird (26). Das humane Parainfluenzavirus ist ein wenig pathogenes Virus und aktiviert NF- κ B natürlicherweise früh während des viralen Replikationszyklus. Durch Inhibition dieser frühen NF- κ B-Aktivierung wird dieses Virus wesentlich virulenter und vermehrt sich effektiver in Zellkultur. Das Respiratory-Syncytial-Virus und das Vesicular-Stomatitis-Virus hingegen sind hochpathogene Erreger und aktivieren NF- κ B erst sehr spät in ihrem Replikationszyklus. Wenn durch TNF- α oder IL-1 β eine frühe Aktivierung von NF- κ B herbeigeführt wird, so wird die Virulenz dieser beiden Erreger deutlich reduziert und sie replizieren zu geringeren Titern in Zellkultur (26). Wie besprochen verhält es sich bei dem Cytomegalovirus anders. Hier ist die frühe Aktivierung von NF- κ B vorteilig oder sogar essentiell für die Virusreplikation (33, 34), nur die späte Aktivierung von NF- κ B muss offenbar von CMV direkt unterdrückt werden (69). Ein Faktor der hierbei die antivirale Wirksamkeit der NF- κ B-Aktivität vermittelt, ist die Induktion des antiviralen Zytokins IFN- β (69). Ob NF- κ B hierbei noch weitere direkte antivirale Funktion ausübt, ist nicht bekannt.

4.2.3.2 Weitere antivirale Funktionen des TNF- α

TNF- α wurde zudem bei verschiedenen Virusinfektionen eine sehr potente antivirale Wirkung zugesprochen, deren zelluläre Wirkmechanismen aber noch nicht vollständig aufgeklärt sind (286). Die antivirale Wirkung erfolgt häufig in Kombination mit IFN- γ oder auch mit IFN- β . Die starke antivirale Wirksamkeit der Kombination der beiden Zytokine TNF- α und IFN- γ ist beispielsweise an der Abwehr verschiedener Infektionen wie Ectromelia-Virus (Mauspockenvirus) (11), Influenza-A-Virus (143), Adenovirus 2 (174) und HSV 1 (73) beteiligt. Auch auf die MCMV-Infektion scheint die Kombination von TNF- α und IFN- γ eine direkte antivirale Wirkung auszuüben (167). Diese führt zu einem antiviralen Status in uninfizierten Zellen, welcher die Replikation stark verlangsamt und die Produktion infektiöser Partikel um 3 Zehnerpotenzen reduzieren kann (167). Ob dieser Effekt auf die Aktivierung von NF- κ B zurückzuführen ist, wurde nicht untersucht.

Eine mögliche durch TNF- α und IFN- γ ausgelöste antivirale Funktion wurde in der Induktion der Indolamin-2,3-deoxygenase gesehen, welche die Degradierung der essentiellen Aminosäure L-Tryptophan bewirkt (2). Diese Funktion wurde auch für die Inhibition der HCMV- (21), HSV-1- und HSV-2-Replikation (2) verantwortlich gemacht.

Ein weiteres Beispiel für die antivirale Wirkung von TNF- α ist das Hepatitis-B-Virus. Es wurde beschrieben, dass TNF- α einen direkten antiviralen Effekt auf das Hepatitis-B-Virus ausübt, welcher die zytoplasmatischen Nukleokapside destabilisiert und die Akkumulation viraler DNA im Kern reduziert (212). Diese Effekte ähneln denen, die in MCMV-infizierten Zellen bei Behandlung mit IFN- γ und TNF- α beobachtet wurden. Hier führen die Zytokine

ebenfalls zu einer Verminderung der viralen DNA-Replikation sowie zur Veränderung der Nukleokapsid-Bildung bei der Morphogenese (167).

4.2.3.3 Inhibition der p38-MAPK-Aktivierung

Durch verschiedene Stimuli wie Virusinfektionen oder Zytokine, wie z.B. TNF- α , kommt es zur Aktivierung der Stress-induzierten MAP-Kinasen p38 und JNK. Die verschiedenen Stress-induzierten MAP-Kinasen regulieren die Reaktion einer Zelle auf diese Stress-Faktoren (105, 219). Die Aktivierung kann sowohl negative als auch positive Auswirkungen auf Virusinfektionen haben. Die p38 MAPK scheint essentiell zu sein für eine normale Immunantwort und Entzündungsreaktion (219). Zudem ist eine Aktivierung von p38 essentiell für die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α und IL-1 β nach Virusinfektion (147, 153, 181). Zusätzlich führt die Aktivierung der MAP-Kinasen zu einer Aktivierung der AP-1 Transkriptionsfaktoren und ist damit ebenfalls an der Aktivierung des IFN- β -Promotors beteiligt. Es erscheint in Hinsicht auf die oben besprochenen antiviralen Wirkungen des TNF- α und des IFN- β für das Cytomegalovirus sinnvoll zu sein, die Aktivierung von p38 zu blockieren.

Andere Untersuchungen hingegen zeigen, dass die Aktivierung von p38 durch HCMV wichtig ist für die virale DNA Replikation (122). Ähnliche positive Effekte einer p38-Aktivierung auf die virale Replikation werden auch für andere Viren beschrieben (41, 104). Auch in unserer Untersuchung konnte eine direkte Aktivierung von p38 durch die MCMV-Infektion beobachtet werden, deren Rolle in der DNA-Replikation wurde allerdings nicht untersucht. Der positive Effekt der virusinduzierten p38-Aktivierung steht im Gegensatz zu den oben beschriebenen antiviralen Auswirkungen der p38-Aktivierung. Es ist denkbar, dass hinsichtlich der p38-Aktivierung eine ähnliche Ambivalenz besteht wie bei der Aktivierung von NF- κ B, wobei eine frühe Aktivierung von Vorteil für die virale Replikation ist und zu späteren Zeitpunkten die Aktivierung durch externe Signale wie Zytokine gezielt blockiert werden muss, um den negativen Auswirkungen der Aktivierung von Immun- und Entzündungsreaktionen zu entgehen.

4.2.4 Virale Evasion des programmierten Zelltodes

Die Induktion des programmierten Zelltodes infizierter Zellen ist neben der Wirkung proinflammatorischer Zytokine und dem Interferonsystem einer der wichtigsten Immunabwehrmechanismen gegenüber Infektionen mit Cytomegaloviren. Dies wird auch dadurch deutlich, dass bei HCMV und MCMV zusammen acht Genprodukte beschrieben wurden, die der Inhibition des programmierten Zelltodes gewidmet sind. Der Zelltod kann in infizierten Zellen entweder durch verschiedene intrinsische Signale der Virusreplikation verursacht werden, oder er kann von extrinsischen Signalen ausgelöst werden, wie der

Stimulation von Todesrezeptoren durch Liganden, die unter anderem von natürlichen Killer-Zellen sezerniert werden. Die unterschiedlichen Zelltodsignalwege werden separat durch verschiedene Genprodukte der Cytomegaloviren blockiert.

4.2.4.1 Inhibition des TNF- α -induzierten programmierten Zelltodes

Eine der wichtigsten antiviralen Funktionen des Zytokins TNF- α ist die Initiation des programmierten Zelltodes. Die Bindung von TNF- α an den TNFR1 führt zur Bildung eines Multiproteinkomplexes, in dem es zur autokatalytischen Aktivierung von Caspase-8 und damit zur Auslösung der Apoptose kommt. In MCMV-infizierten Zellen wird der Auslösung dieses extrinsischen Apoptoseweges durch das Protein M36 entgegengewirkt, welches an Procaspase-8 bindet und dessen autokatalytische Aktivierung verhindert (51, 179). Die gleiche Funktion übernimmt in HCMV-infizierten Zellen das Protein UL36 (vICA) (246). Wenn aber die Aktivierung von Caspase-8 wie bei einer Cytomegalovirusinfektion blockiert wird, reagieren bestimmte Zelltypen auf verschiedene extrinsische und intrinsische Stimuli stattdessen mit der Induktion des Caspase-unabhängigen Zelltodes, welcher, wie in der Einleitung beschrieben, eine alternative Form des programmierten Zelltodes darstellt. Daher müsste auch dieser Signalweg zumindest bei der Infektion bestimmter empfindlicher Zelltypen von Cytomegaloviren blockiert werden. Das murine Cytomegalovirus exprimiert aus diesem Grund zusätzlich das Protein M45, welches die Aufgabe übernimmt, diesen „Backup“-Signalweg zum Zelltod zu inhibieren. Da sehr viele Viren, wie Herpesviren und Poxviren ebenfalls Caspase-8-Inhibitoren exprimieren, ist es wahrscheinlich, dass auch diese Viren zusätzlich den Caspase-unabhängigen Zelltod blockieren müssen.

Ob das M45-Sequenzhomolog von HCMV, UL45, eine ähnliche Aufgabe übernimmt, ist bisher nicht abschließend geklärt. Vielleicht beschränkt sich das humane Cytomegalovirus im Unterschied zum murinen Cytomegalovirus bei seiner Pathogenese auf Zelltypen, die keine Empfindlichkeit gegenüber Caspase-unabhängigem Zelltod aufweisen, so dass eine solche Funktion von HCMV nicht benötigt wird.

4.2.4.2 Inhibition des virusinduzierten Zelltodes

Auch die zellintrinsische Induktion des programmierten Zelltodes wird von Cytomegaloviren kontrolliert. Eine wichtige Rolle hierbei spielt der virale mitochondriale Inhibitor der Apoptose (vMIA) (HCMV UL37x1 und MCMV m38.5), der Bax blockiert und so die Ausschüttung von Cytochrom C verhindert (9, 84, 125). Je nach zellulärem Kontext können verschiedene intrinsische Stimuli aber auch Caspase-unabhängigen Zelltod auslösen, der bei einer MCMV-Infektion durch M45 blockiert werden sollte. Des Weiteren unterbinden Cytomegaloviren spezifisch verschiedene intrinsische Signale, die zur Auslösung des programmierten Zelltodes führen könnten. Beispiele hierfür sind die Blockierung des „DNA-

damage-response“ durch HCMV (80, 168), die Inhibition von ER-Stress durch HCMV (114) oder das in der Einleitung erwähnte β 2.7-Transkript, welches oxidativem Stress vorbeugt und auf diese Weise den hierdurch bedingten Zelltod inhibiert (216).

4.2.4.2.1 Auslösung des programmierten Zelltodes durch intrinsische Signale

Da die Infektion mit der Δ M45-Mutante im Unterschied zu der Δ M36-Mutante in unseren Untersuchungen an 10.1 Zellen auch ohne externe Zugabe von TNF- α zum Tod der infizierten Zellen führte, ist es von Interesse, wodurch dieser virusinduzierte Zelltod ausgelöst wird. Bei der Replikation eines Virus in einer Zelle kann es, wie in der Einleitung beschrieben, durch verschiedene intrinsische Signale zur Auslösung des Zelltodes kommen. Hierfür muss die Zelle die Infektion mit einem Virus erkennen, damit die Zelltodsignalwege ausgelöst werden können. Die Erkennung kann direkt durch die Detektion viraler Komponenten, wie z. B. dsRNA, über Sensoren erfolgen. Andererseits kann die virale Infektion einer Zelle auch dadurch detektiert werden, dass die Virusreplikation zu massiven Störungen in zellulären Abläufen führt. Hierzu gehört z. B. die Induktion des Zelltodes durch ER-Stress (287, 288) oder durch die unkontrollierte Auslösung des DNA-damage-response (80, 168, 232).

Ein wichtiger Erkennungsmechanismus, ist die Detektion von dsRNA. DsRNA wird durch die Viruspartikel in die infizierte Zelle mitgebracht und/oder dort während der Replikation generiert (280). Sie wird zum einen von TLR3 erkannt. Eine Stimulation von TLR3 kann über die Rekrutierung von TRIF, RIP1 und FADD letztlich Caspase-8 und -10 aktivieren und so zur Auslösung von Apoptose führen (93, 126). Möglicherweise ist M45 über die Verhinderung der RIP1-medierte Rekrutierung von FADD und Caspase-8 an der Inhibition dieses apoptotischen Zelltodes beteiligt. Dies würde erklären, warum in den ursprünglichen Untersuchungen zu dem Δ M45-induzierten Zelltod Marker der Apoptose (Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche, DNA-Fragmentierung) gefunden wurden (29). Es ist denkbar, dass die Δ M45-infizierten Zellen an einer Kombination der beiden Zelltodarten sterben.

DsRNA kann zudem über Mda5 und RIG-I detektiert werden, aber es ist nicht bekannt, dass diese Sensoren zur Einleitung des Zelltodes führen.

Des Weiteren ist die Proteinkinase R in die Induktion der Apoptose durch dsRNA involviert. Diese erfolgt über die FADD-vermittelte Rekrutierung von Caspase-8 (13, 14, 81, 82). Auch die RNaseL wird durch Auftreten von dsRNA aktiviert und wird bei verschiedenen Virusinfektionen in Zusammenhang gebracht mit virusinduziertem Zelltod (36). An RNaseL-induziertem Zelltod sind die Caspasen 2, 8 und 9 beteiligt (65). Ob RIP1 in RNaseL- oder PKR-induziertem Zelltod eine Rolle spielt, ist nicht bekannt, daher bleibt unklar, ob M45 bei der Inhibition dieser Formen des Zelltodes involviert sein könnte.

Allgemein kann aber die Behandlung von Zellen mit Interferonen und dsRNA je nach Status der Zelle zur Induktion der Apoptose (16) oder des Caspase-unabhängigen Zelltodes führen (127), wobei die Induktion des Caspase-unabhängigen Zelltodes abhängig ist von RIP1 und besonders dann auftritt, wenn die Aktivierung der Caspase-8 blockiert ist (127). Dies zeigt, dass M45 potentiell benötigt wird, um infizierte Zellen vor RIP1-abhängigem Caspase-unabhängigem Zelltod zu schützen, der durch dsRNA ausgelöst wird.

Bei einer HCMV-Infektion wurde gezeigt, dass es durch die Vermehrung der viralen DNA im Zellkern zur Aktivierung des „DNA-damage-response“ kommen kann, da die freiliegenden Enden der viralen Genome als Doppelstrangbrüche erkannt werden (80, 168). Dies kann zum einen p53-abhängig Apoptose induzieren (232), welche dann vermutlich durch m38.5 inhibiert wird. Zudem kann es unabhängig von p53 (in Abwesenheit von p53) über PIDD (p53-inducible death-domain-containing protein) zur Induktion des Caspase-unabhängigen Zelltodes kommen, was wiederum durch RIP1 vermittelt wird (110). Potentiell könnte also M45 benötigt werden, um die Auslösung dieses Zelltodes durch „DNA-damage-response“ entgegenzuwirken.

Eine weitere Möglichkeit der Zelltod-Induktion in infizierten Zellen ist die Auslösung von ER-Stress. Durch die massive Translation viraler Proteine kommt es zur Akkumulation von ungefalteten oder missgefalteten Proteinen im ER, wodurch die „unfolded-protein-response“ ausgelöst wird. Dies kann ebenfalls zur Induktion des Zelltodes führen (287, 288). Eine direkte Beteiligung von RIP1 an ER-Stress-induziertem Zelltod ist nicht bekannt. Es wurde aber beschrieben, dass autokrine TNF- α -Produktion bedeutend zum ER-Stress-induzierten Zelltod beiträgt (109). Dies könnte in infizierten Zellen wiederum zur Auslösung von Caspase-unabhängigem Zelltod führen, so dass M45 nötig wäre, um diesen Zelltod zu inhibieren.

In den Untersuchungen zur Inhibition des Δ M45-induzierten Zelltodes konnte gezeigt werden, dass der Zelltod vermutlich durch Entstehung dsRNA bei der Transkription viraler Gene ausgelöst wird, da er sowohl durch die Inhibition der Transkription durch Actinomycin D als auch durch die Inhibition viraler Transkription durch UV-Behandlung des Virus verhindert werden konnte.

Es ist unwahrscheinlich, dass der Δ M45-induzierte Zelltod durch die DNA-Replikations-abhängige Aktivierung des „DNA-damage-response“ ausgelöst wird, da dies durch die Inhibition der DNA-Replikation verhindert werden sollte. In unseren Untersuchungen wurde aber gezeigt, dass eine Inhibition der DNA-Replikation in Δ M45-infizierten Zellen mit PAA nicht in der Lage war, den Zelltod zu verhindern. Zudem wurde bei HCMV gezeigt, dass die

Induktion des „DNA-damage-response“ gezielt durch das Virus blockiert wird (80, 168), so dass es vermutlich nicht mehr zur Auslösung von Zelltod kommt. Dies könnte bei MCMV ähnlich sein.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Inhibition des Δ M45-induzierten Zelltodes lassen die Vermutung zu, dass eine geringfügige Beteiligung des durch Translation viraler Proteine ausgelösten ER-Stresses an dem Δ M45-induzierten Zelltod vorliegt. Zwar spielt RIP1 vermutlich in ER-Stress-induziertem Zelltod keine direkte Rolle. Nur wenn tatsächlich eine Beteiligung von autokriner TNF- α -Produktion an ER-Stress-induziertem Zelltod vorliegt (109), wäre eine Beteiligung von M45 bei der Inhibition des hierbei verursachten Caspase-unabhängigen Zelltodes denkbar. Es ist jedoch auch bekannt, dass zumindest bei HCMV die Auslösung von ER-Stress teilweise inhibiert wird (114) und des Weiteren konnte bei HCMV gezeigt werden, dass das Gen UL38 in der Lage ist, ER-Stress-induzierten Zelltod zu verhindern (260).

4.2.4.3 Unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber Caspase-unabhängigem Zelltod

Warum verschiedene Zellarten eine stark unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber Caspase-unabhängigem Zelltod aufweisen, ist nicht endgültig geklärt. Eine Untersuchung bringt die Empfindlichkeit gegenüber Caspase-unabhängigem Zelltod in Zusammenhang mit dem Expressionslevel von RIP1, welcher in verschiedenen Makrophagen-Zelllinien besonders hoch sein soll (172). Diese Untersuchung würde sich mit unseren Beobachtungen decken, dass Makrophagen besonders empfindlich gegenüber Δ M45-vermitteltem Zelltod sind (29).

Ein weiterer möglicher Grund für die unterschiedliche Empfindlichkeit verschiedener Zelllinien gegenüber Caspase-unabhängigem Zelltod ist die Expression von TNFR2. In einer Untersuchung wurde gezeigt, dass TNFR2 eine verstärkende Wirkung auf TNF- α -vermittelten Caspase-unabhängigen Zelltod hat (40). Die Autoren zeigen, dass die Vorstimulation von TNFR2 eine verstärkte Rekrutierung von RIP1 zum TNFR1 bedingt und vermuten, dass dies auf eine TNFR2-induzierte Degradierung von TRAF2 zurückzuführen ist, welches sonst mit RIP1 um die Bindung an TNFR1 konkurrieren würde. Letztlich bewirkt dies also eine Verstärkung des RIP1-Signals. Eine Verstärkung des TNF- α -vermittelten Caspase-unabhängigen Zelltodes durch TNFR2 würde sich mit der Beobachtung decken, dass Endothelzellen und Zellen der myeloiden Linie, welche besonders empfindlich gegenüber Δ M45-induziertem Zelltod sind, auch eine höhere Expression von TNFR2 aufweisen (98). In unseren Untersuchungen an SVEC4-10 Endothelzellen konnten wir hingegen keinen nennenswerten verstärkenden Effekt der TNFR2-Stimulation auf den Caspase-unabhängigen Zelltod beobachten. Wenn SVEC4-10 Zellen mit murinem TNF- α

und Z-VADfmk behandelt wurden, so war der Zelltod nicht deutlich verstärkt gegenüber einer Behandlung mit Z-VADfmk und humanem TNF- α , welches in murinen Zellen nur TNFR1 stimulieren soll (156). Entweder kann diese Diskrepanz auf Zelllinien-spezifische Unterschiede zurückzuführen sein, z. B. dass SVEC4-10 Zellen keinen TNFR2 exprimieren und dieser somit keinen verstärkenden Effekt ausüben kann. Oder es ist eventuell von verschiedenen Varianten des rekombinanten humanen TNF- α abhängig (z.B. Glykosilierungsstatus etc.), ob beide Rezeptoren stimuliert werden oder nicht. Es ist also nicht klar zu beurteilen, ob die Stimulation des TNFR2 auch in unseren Untersuchungen einen verstärkenden Effekt auf den Caspase-unabhängigen Zelltod ausüben könnte.

Der dritte mögliche Grund für die unterschiedliche Sensitivität verschiedener Zelllinien gegenüber Caspase-unabhängigem Zelltod könnte eine autokrine TNF- α -Produktion sein. Viele Zellen, die unseren Beobachtungen zufolge besonders empfindlich gegenüber Δ M45-induziertem Zelltod sind, oder sich den Ergebnissen anderer Arbeiten nach als sehr empfindlich gegenüber Caspase-unabhängigem Zelltod erweisen, wie Endothelzellen, Makrophagen und Jurkatzellen (74), sind Zellen, die auch für eine Produktion von TNF- α bekannt sind (274). So könnte der Grund für den verstärkten Zelltod bei Infektion mit der Δ M45-Mutante in SVEC4-10 Zellen und Makrophagen in Zellkultur eventuell auf eine eigene Produktion von TNF- α zurückzuführen sein. Dies würde übereinstimmen mit der Beobachtung dass 10.1 Zellen, die normalerweise die Vermehrung der Δ M45-Mutante im Gegensatz zu SVEC4-10 Zellen unterstützen, bei externer Zugabe von TNF- α dem Phänotyp der SVEC4-10 Zellen entsprechen, also die Ausbreitung der Δ M45-Mutante nicht mehr unterstützen (Ergebnisse nicht dargestellt). Hingegen gibt es auch Zellen wie NIH3T3 Zellen, die auch bei zusätzlicher Zugabe von TNF- α nicht die Vermehrung der Δ M45-Mutante blockieren, die also offensichtlich nicht aufgrund der fehlenden autokrinen TNF- α -Produktion resistent gegenüber dem Δ M45-induzierten Zelltod sind. Was gegen diese Annahme spricht, ist, dass SVEC4-10 Zellen bei Infektion mit der Δ M36-Mutante nicht an autokriner TNF- α -Produktion sterben, obwohl dabei der apoptotische Zelltodweg ausgelöst werden sollte. Eventuell ist aber in den Δ M36-infizierten Zellen die autokrine TNF- α -Produktion deutlich abgeschwächt, da M45 die TNF- α - und TLR3-induzierte NF- κ B-Aktivierung sowie die TNF- α -induzierte p38-Aktivierung unterdrückt, welche wiederum wie besprochen essentiell für die Synthese von TNF- α sind. Gegen eine autokrine TNF- α -Produktion als Grund für die erhöhte Empfindlichkeit bestimmter Zelllinien gegenüber Δ M45-induziertem Zelltod spricht, dass es nicht möglich war, diesen Zelltod in SVEC4-10 Zellen durch Zugabe eines inhibitorischen TNFR1-Antikörpers zu blockieren (Ergebnisse nicht abgebildet).

Ein weiterer möglicher Grund für die erhöhte Empfindlichkeit von Makrophagen und Endothelzellen gegenüber Δ M45-induziertem Zelltod ist, dass diese Zellen potentiell TLR3 oder andere dsRNA-Sensoren exprimieren. Da der durch Infektion mit dem Δ M45-Virus induzierte Zelltod möglicherweise durch dsRNA ausgelöst wird (s. o.), ist es denkbar, dass Zellen, die eine besonders hohe Expression von dsRNA-Sensoren aufweisen, eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber diesem Zelltod zeigen.

4.2.4.4 Abhängigkeit des Δ M45-induzierten Zelltodes von RIP1

Es wäre sehr interessant zu wissen, ob der durch Infektion mit der Δ M45-Mutante in SVEC4-10 Zellen und Makrophagen ausgelöste Zelltod wirklich von RIP1 abhängig ist. Die Bedeutung der RIP1-Inhibition durch M45 könnte bestärkt werden, wenn die Abwesenheit von RIP1 zur Revertierung des Phänotyps der Δ M45-Mutante führen würde. Leider kann eine Beteiligung von RIP1 in dem durch Δ M45-Infektion ausgelösten Zelltod nicht gezeigt werden, da die in unseren Untersuchungen verwendeten RIP^{-/-} und RIP^{+/+} Zellen (spontan immortalisierte murine embryonale Fibroblasten) ähnlich wie NIH3T3 Zellen eine so geringe Empfindlichkeit gegenüber Caspase-unabhängigem Zelltod aufweisen, dass auch die entsprechenden RIP^{+/+} Kontrollzellen nicht an der Infektion mit Δ M45 sterben. Eine Möglichkeit, eine Beteiligung von RIP1 an dem Δ M45-induzierten Zelltod nachzuweisen, wäre die Blockierung der RIP1-Expression mittels siRNA in Zellen, die empfindlich gegenüber Δ M45-induziertem Zelltod sind, und anschließende Infektion dieser Zellen mit Δ M45.

4.2.4.5 Bedeutung der Inhibition des Caspase-unabhängigen Zelltodes für die MCMV-Infektion

Die Inhibition des Caspase-unabhängigen Zelltodes durch M45 hat für die MCMV-Infektion in vivo vermutlich die größte Bedeutung. Diese Funktion macht M45 wahrscheinlich essentiell für das Virus. Zwar zählt das M45-Gen nicht im engeren Sinne zu den essentiellen Genen, deren Funktion unbedingt notwendig ist für die Replikation in einer Zelle, da die Funktion von M45 nur in bestimmten Zelltypen absolut erforderlich ist und die Replikationsfähigkeit des Deletionsvirus daher von der jeweiligen Zellart abhängig ist. So ist eine relativ normale Vermehrungsfähigkeit in verschiedenen Fibroblastenzellen gegeben. Aber für die Replikation des Virus in Endothelzellen und Makrophagen ist die Funktion von M45 essentiell. Dies könnte M45 zu einem essentiellen Gen für die Vermehrung und Pathogenese des MCMV in seinem natürlichen Wirt machen. In einer Arbeit konnte genau das gezeigt werden; verschiedene MCMV-Mutanten, denen ein funktionelles M45 fehlte, waren nicht in der Lage, sich in immundefizienten SCID-Mäusen auszubreiten, die sehr empfänglich für die MCMV-Infektion sind und normalerweise an der Infektion versterben. Das Virus konnte nach 24

Tagen weder in Niere, Lunge, Leber, Milz oder Speicheldrüsen gefunden werden und die Infektion verlief im Unterschied zum WT-Virus komplett inapparent (154). Dies ist vermutlich auf das Unvermögen der Virusmutanten zurückzuführen, sich in Makrophagen und Endothelzellen zu replizieren, da diese Zellarten als essentiell angesehen werden für die Dissemination und Pathogenese des Virus in vivo sowie für den Aufbau einer latenten oder persistenten Infektion (138, 254). Diese Ergebnisse zeigen, dass aufgrund der Bedeutung der M45-Funktion für spezielle Zelltypen, die Funktion von M45 essentiell ist für die Ausbreitung und Pathogenese in vivo.

Die Funktion von M45 als RIP1-Inhibitor und die Bedeutung der RIP1-Inhibition für die MCMV-Infektion ließen sich ebenfalls mit der Revertierung des apathogenen Phänotyps der Δ M45-Mutante in vivo durch Fehlen von RIP1 bestärken. Diese Untersuchungen sind aber nicht möglich, da RIP1-Knockout-Mäuse innerhalb von ein bis drei Tagen nach der Geburt sterben (133).

Wie bedeutsam die Blockierung des vorzeitigen Zelltodes für die MCMV-Infektion in seinem natürlichen Wirt ist, wurde auch anhand des M36-Gens demonstriert. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass so viele verschiedene proapoptotische Stimuli auf die infizierten Zellen einwirken, dass der Verlust des M36-Gens nicht einfach durch die Blockierung eines einzigen Todesrezeptor-Apoptoseweges ausgeglichen werden kann, sondern dass gleichzeitig alle Todesrezeptor-vermittelten Signalwege über dominant-negatives FADD (welches dazu führt, dass die Signale von Todesrezeptoren nicht mehr zur Aktivierung von Caspasen führen) blockiert werden müssen, um den Phänotyp der Δ M36-Mutante zu revertieren (51).

4.3 Evasion immunologischer Abwehrmechanismen durch andere Viren

Angesichts der vielen wirkungsvollen antiviralen Mechanismen der angeborenen Immunität mussten auch andere Viren im Laufe ihrer Evolution verschiedene Strategien entwickeln, mit denen sie der antiviralen Immunantwort des Wirtes entgehen, um sich erfolgreich vermehren zu können. Hier sollen einige Beispiele aufgeführt werden, wie verschiedene Viren mit der TNFR1- und TLR3-Signaltransduktion interferieren und so die Aktivierung von NF- κ B und IRF3 verhindern. Wie man in der Abbildung 44 erkennen kann, haben Viren verschiedenste Möglichkeiten hierzu entwickelt. Häufig blockiert ein virales Protein mehr als einen Signalweg, indem es zum Beispiel mit Adapterproteinen oder Kinasen interagiert, welche in mehreren Signalwegen eine Rolle spielen.

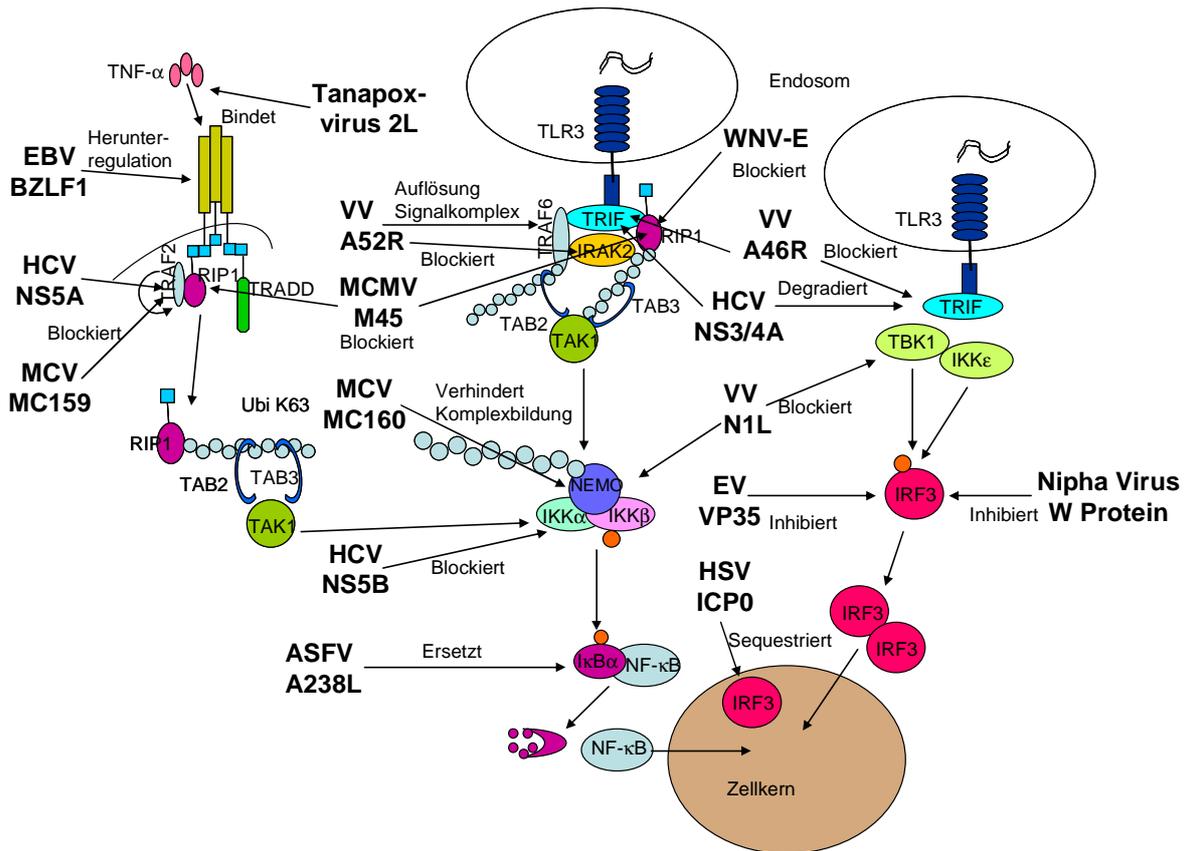


Abbildung 44: Inhibition der TNFR1- und TLR3-Signaltransduktionswege durch virale Proteine
 Dargestellt sind die Signalwege des TNFR1 und TLR3, die zur Aktivierung von NF- κ B und IRF3 führen. Beispiele verschiedener viraler Proteine, die in diese Signalwege eingreifen, sind eingezeichnet. (EBV = Epstein-Barr-Virus, HCV = Hepatitis-C-Virus, MCV = Molluscum-Contagiosum-Virus, VV = Vaccinia-Virus, ASFV = Afrikanisches Schweinepest-Virus, WNV = West-Nil-Virus, EV = Ebola-Virus, HSV = Herpes-simplex-Virus)

Verschiedene virale Proteine inhibieren die TLR3-Signaltransduktion, indem sie die Adapterproteine angreifen, die den Rezeptor mit der Signalkaskade verbinden. So blockiert das Vaccinia-Virus-Protein A46R über seine TIR-Domäne die TIR-Domänen enthaltenden Adapterproteine Mal, TRAM, TRIF und MyD88 und verhindert so TLR2-, TLR3- und TLR4-vermittelte NF- κ B-, IRF3- und MAPK-Aktivierung (251). Auch die Hepatitis-C-Virus NS3/4A-Protease blockiert die TLR3-Signalkaskade durch Spaltung des Adapters TRIF und inhibiert damit gleichzeitig IRF3- und NF- κ B-Aktivierung (158). Eine sehr neue Untersuchung zeigt, dass auch das West-Nil-Virus E-Protein ähnlich wie M45 die durch dsRNA verursachte NF- κ B-Aktivierung blockiert, indem es die Ubiquitinierung von RIP1 verhindert (8). Des Weiteren kann die Funktion der Kinasen blockiert werden, die letztlich zu einer Phosphorylierung von I κ B oder IRF3 und IRF7 führen. Das Vaccinia-Virus-Protein A52R blockiert sowohl eine Kinase als auch ein Adapterprotein, um die TLR3-Signalkaskade zu blockieren. Es assoziiert mit der Kinase IRAK2 und dem Adapterprotein TRAF6 und führt zur Auflösung von Signalkomplexen, die diese Proteine enthalten (95). Auch das Vaccinia-Virus-N1L-Protein blockiert TLR-Signalkaskaden auf dem Level der Kinasen IKKs und TBK1 (64). Die an der antiviralen Immunität beteiligten Transkriptionsfaktoren können auch direkt

angegriffen werden, so besitzt das Ebola-Virus-Protein VP35 neben seiner Fähigkeit, dsRNA zu binden (35), die Eigenschaft, die Phosphorylierung, Dimerisierung und Aktivierung von IRF-3 vermutlich direkt zu inhibieren (17). Auch das Nipah-Virus-W-Protein inhibiert die Phosphorylierung des IRF3 nach TLR3-Stimulation über einen unbekanntem Mechanismus (240). Ebenso inhibiert das ICP0-Protein des HSV 1 die IRF3-Aktivierung, indem es aktiviertes IRF3 im Kern sequestriert (178). Das A238L-Protein des Afrikanischen Schweinepest-Virus weist große Homologie zu zellulärem I κ B auf und kann dadurch die NF- κ B-Aktivierung durch verschiedene Stimuli verhindern (210).

Des Weiteren gibt es verschiedene virale Proteine, die mit der TNFR1-Signalkaskade interferieren. Das 2L-Genprodukt des Tanapoxvirus ist ein sezerniertes Protein, welches TNF- α sequestriert und dessen Bindung an den TNFR1 und TNFR2 verhindert (31). Auf der Ebene des Rezeptors wirkt hingegen das BZLF1-Protein des Epstein-Barr-Virus, welches den TNFR1 herunterreguliert (191). Auf der Ebene der Adapterproteine greifen das MC159-Protein des Molluscum-Contagiosum-Virus und das Hepatitis-C-Virus-Protein NS5A ein. MC159 inhibiert die späte Phase der NF- κ B-Aktivierung, indem es an TRAF2 bindet und dieses blockiert (193). Auch NS5A blockiert TRAF2 (199). Ein weiteres HCV-Protein wirkt auf der Ebene der Kinasen, NS5B bindet an die Kinase IKK α und inhibiert dessen Aktivierung (50). Das Molluscum-Contagiosum-Virus MC160-Protein verhindert ebenfalls teilweise die Aktivierung von NF- κ B, indem es die Bildung des IKK-Kinase-Komplexes blockiert (194).

4.4 Weitere RIP1-interagierende Proteine

Da RIP1 ein zentrales Adapterprotein ist, welches in verschiedenen Signalwegen eine Rolle spielt, gibt es weitere Proteine, die an RIP1 binden und seine Funktion blockieren oder verändern, um die verschiedenen Signalwege zu beeinflussen. Das zelluläre Zinkfingerprotein A20 ist ein TNF- α -induzierbares Protein und für die Termination der NF- κ B-Aktivierung nach TNF- α -Stimulation zuständig (99). Es wurde gezeigt, dass dieses Protein selektiv K63-Ubiquitinierung von RIP1 entfernt und durch die Übertragung von K48-Ubiquitin mittels der E3-Ubiquitinligase-Domäne zu dessen proteasomalen Abbau führt (283). Die Involvierung von A20 in Ubiquitinierung basiert unter anderem auf seinen Zinkfingerdomänen. Obwohl M45 keinerlei Sequenzhomologie zu A20 aufweist, besteht die Vermutung, dass es eine ähnliche Funktion erfüllen könnte. Tatsächlich konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass M45 ebenso wie das als Kontrolle verwendete A20 die Ubiquitinierung von RIP1 nach RIP1-Überexpression verhindert und so auch die durch RIP1-Überexpression verursachte NF- κ B-Aktivierung blockiert. Da M45 weder offensichtliche Homologie zu Zinkfingerdomänen oder E3-Ubiquitinligasedomänen aufweist, unterscheidet

sich der Wirkmechanismus sicherlich von dem des A20. Eventuell erfolgt die Bindung von M45 an RIP1 genau an der Stelle, an der die Ubiquitinierung erfolgen würde (K377 im humanen bzw. K376 im murinen RIP1) (66, 157) und die Bindung ist so stark, dass sie die zuständige Ubiquitinligase sterisch inhibiert. A20 bewirkt nicht nur die Termination der NF- κ B-Aktivierung nach TNF- α -Stimulation sondern auch nach Stimulation verschiedener TLRs (24, 279). Die inhibitorische Aktivität auf TLR4-Signalkaskaden wurde allerdings in der Untersuchung auf die Deubiquitinierung von TRAF6 zurückgeführt (24), worauf M45 vermutlich keinen Einfluss hat.

Auch das EBV-Onkoprotein LMP1 hat die Fähigkeit an RIP1 zu binden. Der Effekt, den diese Interaktion mit RIP1 ausübt, ist hingegen ein komplett anderer als bei der Interaktion von M45 mit RIP1. LMP1 ist ein Membranprotein, welches die Funktion eines konstitutiv aktiven TNF-Rezeptors übernimmt und damit zur dauerhaften Aktivierung von NF- κ B führt. Zudem wird RIP1 hierfür nicht benötigt (115). Eine weitere Untersuchung hat gezeigt, dass die Interaktion von LMP1 mit RIP1 eine andere Funktion übernimmt, nämlich die der Aktivierung von IRF7. Hierfür interagiert RIP1 direkt mit IRF7 und mediiert dessen K63-Ubiquitinierung vermutlich durch TRAF6 (112). Die Funktion von RIP1 als Signalkaskadenadapter ist hierfür essentiell. Da auch diese Funktion offenbar zumindest zum Teil von einer K63-Ubiquitinierung von RIP1 abhängt, wäre es interessant zu wissen, ob M45 auch die Aktivierung von IRF7 blockieren kann. Dies wäre sicher von großer Bedeutung für die MCMV-Infektion, da IRF7 der zentrale Transkriptionsfaktor für die Produktion großer Mengen Typ-1-Interferons ist. Die Funktion des LMP1 unterscheidet sich noch in weiterer Hinsicht von der Funktion des M45, so wurde in einer anderen Untersuchung gezeigt, dass LMP1 auch zu einer gezielten Aktivierung von p38 führt (70) und diese nicht wie M45 verhindert. Vermutlich trägt die Aktivierung der verschiedenen Signalwege durch LMP1 zur onkogenen Transformation bei.

In einer neuen Untersuchung wurde gezeigt, dass das West-Nil-Virus Hüllprotein (WNV-E) die dsRNA-induzierte Zytokinproduktion in Makrophagen inhibiert, indem es die Ubiquitinierung von RIP1 verhindert (8). Auch wenn in diesen Untersuchungen keine direkte Interaktion zwischen WNV-E und RIP1 gezeigt werden konnte, demonstrieren die Ergebnisse, dass auch andere Viren die Produktion von proinflammatorischen und antiviralen Zytokinen inhibieren, indem sie die Stimulus-induzierte Aktivierung des Adapterproteins RIP1 verhindern. Anhand dieser Untersuchung kann auch abgelesen werden, dass die vermutlich alleinige Inhibition der NF- κ B-Aktivierung über RIP1 zu einer deutlichen Reduktion nicht nur der TNF- α -Produktion führt, dessen Synthese ausschließlich von NF- κ B abhängig ist, sondern auch einen deutlichen Einfluss auf die Produktion von IFN- β hat, dessen Transkription von NF- κ B, IRF-3 und AP-1 abhängig ist. Damit klärt diese Untersuchung die Frage, die ich in meiner Arbeit nicht analysieren konnte, inwieweit sich die

Inhibition von NF- κ B über RIP1 auf die Produktion des antiviralen Zytokins IFN- β auswirkt, unter der Voraussetzung, dass sich die Funktion von WNV-E nicht zusätzlich auf einen weiteren Transkriptionsfaktor erstreckt.

4.5 Ribonukleotidreduktase-R1-Homologe anderer Viren

Wie beschrieben haben die Herpesviren einen großen Teil ihrer Evolution gemeinsam durchgemacht. Das RNR R1-Homolog wurde von einem frühen Vorläufer der Herpesviren aus dem Wirtsgenom übernommen und hat dann aufgrund von Mutationen bei der Evolution des murinen Cytomegalovirus eine neue Funktion angenommen. Diese Funktion ist entscheidend für die Pathogenese von MCMV (154). Aufgrund vergleichbarer Lebenszyklen haben HCMV und HSV 2 vermutlich ähnliche Anforderungen an die zellulären und immunologischen Bedingungen. Ihre R1-Homologe sind M45 sehr ähnlich. Die Identität zu M45 auf Proteinebene liegt bei 27% für UL45 und 22% für ICP10. Vor allem HCMV und MCMV sind sehr eng miteinander verwandt. Da man vermuten sollte, dass eine so essentielle Funktion wie die von M45 entweder konserviert wurde, falls sie vor der Separierung von HCMV und MCMV entstanden ist, oder sich anderenfalls in beiden Viren parallel entwickelt haben sollte, ist es überraschend, dass wir in unseren Untersuchungen keine gemeinsame Funktion nachweisen konnten.

Es gibt viele Parallelen zwischen den drei R1-Homologen, die für das Vorhandensein einer gemeinsamen Funktion sprechen. Alle drei Proteine haben im Vergleich zu anderen viralen und zellulären Ribonukleotidreduktase R1-Homologen eine einzigartige N-terminale Domäne, in der die neu erworbene Funktion ursprünglich vermutet wurde (200). Knockout-Virusmutanten des gesamten Gens oder der N-terminalen Domäne zeigen ein vermindertes Wachstum, z. T. Zelltyp-spezifisch, was darauf hindeutet, dass die Funktion wichtig ist für die Virusreplikation (29, 200, 248, 249). Alle drei Proteine sind Bestandteil des viralen Teguments (128, 154, 203, 247) und ihnen wurde eine antiapoptotische Funktion zugesprochen. Diese ist bei UL45, wie in der Einleitung beschrieben, nur sehr schwach ausgeprägt, aber es weist einen Schutz vor FasL-induziertem Zelltod in virusinfizierten Zellen auf (200). Bei dem ICP10-Protein des HSV 2 sind die postulierten Mechanismen der antiapoptotischen Funktion etwas widersprüchlich, eventuell vereinigt dieses Protein aber auch mehrerer Funktionen in einem.

Des Weiteren wurde auch bei HCMV-infizierten Zellen eine mit den bei MCMV gezeigten Effekten vergleichbare Inhibition der TNF- α -induzierten NF- κ B-Aktivierung beschrieben, die auf der Funktion von UL45 basieren könnte (116, 190).

Aufgrund der Annahme einer gemeinsamen Funktion wurden die beiden anderen viralen Ribonukleotidreduktase-Homologe in unseren Untersuchungen als Kontrollen verwendet. Es

stellte sich jedoch in unterschiedlichen Analysen heraus, dass die Funktion von M45 vermutlich nicht von ICP10 oder UL45 geteilt wird. Das ICP10-Protein zeigte zumindest teilweise eine ähnliche Aktivität wie M45, die aber längst nicht so stark ausgeprägt war. In Koimmunpräzipitationsexperimenten war beispielsweise eine leichte Interaktion mit RIP1 zu beobachten. Diese Interaktion könnte aber indirekt sein, da vermutet wurde, dass ICP10 an Caspase-8 bindet. In einigen Luciferase-Versuchen zeigte ICP10 ebenfalls eine leichte Inhibition der NF- κ B-Aktivierung, die aber nicht mit der von M45 zu vergleichen war. In anderen Versuchen hingegen war die inhibierende Wirkung des ICP10 nicht von der der Negativkontrollen zu unterscheiden. Vielleicht ist die inhibierende Wirkung abhängig vom Zeitpunkt der Untersuchung oder die Inhibition ist nur ein indirekter Effekt. UL45 zeigte in keinem Versuch eine Auswirkung auf die NF- κ B-Aktivierung. In den Luciferase-Versuchen könnte die fehlende Inhibition von UL45 technisch bedingt sein. Es ist möglich, dass im Unterschied zu M45 der C-terminale HA-Tag bei UL45 eventuell die Funktion stört, da der Bereich im C-Terminus nach der RNR-Domäne bei UL45 kürzer ist als bei M45 und die Funktion offensichtlich in dem C-terminalen Bereich liegt. Auch bei ICP10 wurde gezeigt, dass nur ein sehr kleiner Teil des C-Terminus entfernt werden konnte, ohne die Funktion zu beeinträchtigen (37). In dem Versuch zur I κ B α -Degradierung mit HCMV AD169 und dem zugehörigem UL45-Knockoutvirus zeigte UL45 auch keine Funktionalität; dies könnte eventuell auf Stamm-spezifische Unterschiede zurückzuführen sein. Der Laborstamm AD169 hat aufgrund einer Punktmutation kein funktionelles UL36 (246). Vielleicht hat daraufhin auch das UL45 seine Funktion verloren, da aufgrund des nicht mehr funktionellen UL36 kein Selektionsdruck bestanden hat, auch den Caspase-unabhängigen Zelltodweg zu blockieren. Tatsächlich weist die Sequenz von UL45 aus AD169 einige Aminosäureaustausche im Vergleich zu klinischen Isolaten wie FIX oder dem Endothelzell-tropen Isolat TB40/E auf. Diese Aminosäureaustausche liegen allerdings fast alle in der einzigartigen N-terminalen Region. In den Untersuchungen an M45 hat sich hingegen der N-Terminus als entbehrlich für die Funktion erwiesen, so dass die Mutationen im N-Terminus von UL45 vermutlich unbedeutend sind.

Es ist zudem möglich, dass die in HCMV-infizierten Zellen beschriebene Herunterregulation des TNFR1 (12, 190) für die in unseren Versuchen beobachtete Inhibition der I κ B α -Degradierung verantwortlich war und dass hierdurch ein möglicher zusätzlicher Effekt von UL45 auf die NF- κ B-Aktivierung verdeckt wurde. Anhand der vorliegenden Ergebnisse, ist es also nicht eindeutig zu beurteilen, ob UL45 oder ICP10 eine vergleichbare Funktion wie M45 aufweisen. Es muss aber als eher unwahrscheinlich betrachtet werden, auch wenn dies aus evolutionären Gesichtspunkten erstaunlich erscheinen mag. Da HCMV und HSV 2 beide humane Viren sind, könnte der Unterschied hierauf zurückzuführen sein. Eventuell ist der Caspase-unabhängige Zelltod in humanen Zellen, oder zumindest in denjenigen, die für eine

HCMV- oder HSV-2-Infektion relevant sind, nicht so stark ausgeprägt, so dass nicht so ein starker Selektionsdruck bestanden hat, eine Proteinfunktion zu entwickeln, die sich dagegen richtet. Die NF- κ B-Aktivierung wird bei HCMV eventuell auf andere Weise, z. B. durch die beschriebene Herunterregulation des TNFR1 (12, 190) und durch ein anderes Genprodukt blockiert. Bei HSV scheint eine andauernde NF- κ B-Aktivierung, eventuell aufgrund des kürzeren Replikationszyklus, keine negative Auswirkung für das Virus zu haben (88, 227). Vermutlich ist es daher für das Virus nicht notwendig, eine Funktion zur Inhibition der NF- κ B-Aktivierung zu entwickeln. Aus den genannten Gründen ist es möglich, dass die drei Ribonukleotidreduktase-Homologe aufgrund der verschiedenen zellulären Bedingungen für das Virus einer unterschiedlichen Evolution unterworfen waren, und so die Funktion von M45, die für die MCMV-Infektion so bedeutend ist, bei den beiden anderen R1-Homologen nicht entstanden ist oder nicht konserviert wurde, da keine Notwendigkeit hierfür vorlag. Dies würde wiederum zeigen, wie stark tatsächlich die individuelle Anpassung eines Herpesvirus an seinen spezifischen Wirt ist. Diese individuelle Anpassung wäre, wie auch andere sehr spezifische Anpassungen an zelluläre oder immunologische Bedingungen des jeweiligen Wirtes, ein Grund dafür, warum Herpesviren eine strikte Speziespezifität aufweisen. Die Anpassung erweist sich an verschiedenen Stellen als so individuell, dass es einem artfremden Virus nicht möglich ist, sich in einem anderen als seinem eigenen Wirt zu vermehren, weil dieses Virus nicht mehr in der Lage wäre, die zellulären Bedingungen für die Replikation zu optimieren und die Abwehrmechanismen zu inhibieren (97, 124). Ähnlich wie auch andere virale Gene kann M45 gleichzeitig verschiedene Immunabwehrfunktionen außer Kraft setzen. Dies zeigt die gelungene Adaptation viraler Proteine, die während ihrer Evolution außerordentlich einfallsreiche Strategien entwickelt haben, um aufgrund begrenzter Kodierungskapazität möglichst effizient die Bedingungen für die virale Replikation zu optimieren.

Literaturverzeichnis

1. **Abate, D. A., S. Watanabe, and E. S. Mocarski.** 2004. Major human cytomegalovirus structural protein pp65 (ppUL83) prevents interferon response factor 3 activation in the interferon response. *J Virol* **78**:10995-11006.
2. **Adams, O., K. Besken, C. Oberdorfer, C. R. MacKenzie, O. Takikawa, and W. Daubener.** 2004. Role of indoleamine-2,3-dioxygenase in alpha/beta and gamma interferon-mediated antiviral effects against herpes simplex virus infections. *J Virol* **78**:2632-6.
3. **Adler, B., L. Scrivano, Z. Ruzcics, B. Rupp, C. Sinzger, and U. Koszinowski.** 2006. Role of human cytomegalovirus UL131A in cell type-specific virus entry and release. *J Gen Virol* **87**:2451-60.
4. **Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi.** 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**:783-801.
5. **Alexopoulou, L., A. C. Holt, R. Medzhitov, and R. A. Flavell.** 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**:732-8.
6. **Anders, D. G., M. A. Kacica, G. Pari, and S. M. Punturieri.** 1992. Boundaries and structure of human cytomegalovirus oriLyt, a complex origin for lytic-phase DNA replication. *J Virol* **66**:3373-84.
7. **Arase, H., E. S. Mocarski, A. E. Campbell, A. B. Hill, and L. L. Lanier.** 2002. Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors. *Science* **296**:1323-6.
8. **Arjona, A., M. Ledizet, K. Anthony, N. Bonafe, Y. Modis, T. Town, and E. Fikrig.** 2007. West Nile virus envelope protein inhibits dsRNA-induced innate immune responses. *J Immunol* **179**:8403-9.
9. **Arnoult, D., L. M. Bartle, A. Skaletskaya, D. Poncet, N. Zamzami, P. U. Park, J. Sharpe, R. J. Youle, and V. S. Goldmacher.** 2004. Cytomegalovirus cell death suppressor vMIA blocks Bax- but not Bak-mediated apoptosis by binding and sequestering Bax at mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:7988-93.
10. **Atalay, R., A. Zimmermann, M. Wagner, E. Borst, C. Benz, M. Messerle, and H. Hengel.** 2002. Identification and expression of human cytomegalovirus transcription units coding for two distinct Fcgamma receptor homologs. *J Virol* **76**:8596-608.
11. **Atrasheuskaya, A. V., E. K. Bukin, T. M. Fredeking, and G. M. Ignatyev.** 2004. Protective effect of exogenous recombinant mouse interferon-gamma and tumour necrosis factor-alpha on ectromelia virus infection in susceptible BALB/c mice. *Clin Exp Immunol* **136**:207-14.
12. **Baillie, J., D. A. Sahlender, and J. H. Sinclair.** 2003. Human cytomegalovirus infection inhibits tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) signaling by targeting the 55-kilodalton TNF-alpha receptor. *J Virol* **77**:7007-16.
13. **Balachandran, S., C. N. Kim, W. C. Yeh, T. W. Mak, K. Bhalla, and G. N. Barber.** 1998. Activation of the dsRNA-dependent protein kinase, PKR, induces apoptosis through FADD-mediated death signaling. *EMBO J* **17**:6888-902.
14. **Balachandran, S., P. C. Roberts, T. Kipperman, K. N. Bhalla, R. W. Compans, D. R. Archer, and G. N. Barber.** 2000. Alpha/beta interferons potentiate virus-induced apoptosis through activation of the FADD/Caspase-8 death signaling pathway. *J Virol* **74**:1513-23.
15. **Balachandran, S., E. Thomas, and G. N. Barber.** 2004. A FADD-dependent innate immune mechanism in mammalian cells. *Nature* **432**:401-5.
16. **Barber, G. N.** 2001. Host defense, viruses and apoptosis. *Cell Death Differ* **8**:113-26.
17. **Basler, C. F., A. Mikulasova, L. Martinez-Sobrido, J. Paragas, E. Muhlberger, M. Bray, H. D. Klenk, P. Palese, and A. Garcia-Sastre.** 2003. The Ebola virus VP35 protein inhibits activation of interferon regulatory factor 3. *J Virol* **77**:7945-56.
18. **Baud, V., and M. Karin.** 2001. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol* **11**:372-7.
19. **Benedict, C. A., P. S. Norris, and C. F. Ware.** 2002. To kill or be killed: viral evasion of apoptosis. *Nat Immunol* **3**:1013-1018.
20. **Biron, C. A., K. S. Byron, and J. L. Sullivan.** 1989. Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. *N Engl J Med* **320**:1731-5.
21. **Bodaghi, B., O. Goureau, D. Zipeto, L. Laurent, J. L. Virelizier, and S. Michelson.** 1999. Role of IFN-gamma-induced indoleamine 2,3 dioxygenase and inducible nitric oxide synthase in the replication of human cytomegalovirus in retinal pigment epithelial cells. *J Immunol* **162**:957-64.

22. **Boehme, K. W., M. Guerrero, and T. Compton.** 2006. Human cytomegalovirus envelope glycoproteins B and H are necessary for TLR2 activation in permissive cells. *J Immunol* **177**:7094-102.
23. **Boehme, K. W., J. Singh, S. T. Perry, and T. Compton.** 2004. Human cytomegalovirus elicits a coordinated cellular antiviral response via envelope glycoprotein B. *J Virol* **78**:1202-1211.
24. **Boone, D. L., E. E. Turer, E. G. Lee, R. C. Ahmad, M. T. Wheeler, C. Tsui, P. Hurley, M. Chien, S. Chai, O. Hitotsumatsu, E. McNally, C. Pickart, and A. Ma.** 2004. The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses. *Nat Immunol* **5**:1052-60.
25. **Borst, E. M., G. Hahn, U. H. Koszinowski, and M. Messerle.** 1999. Cloning of the human cytomegalovirus (HCMV) genome as an infectious bacterial artificial chromosome in *Escherichia coli*: a new approach for construction of HCMV mutants. *J Virol* **73**:8320-8329.
26. **Bose, S., N. Kar, R. Maitra, J. A. DiDonato, and A. K. Banerjee.** 2003. Temporal activation of NF-kappaB regulates an interferon-independent innate antiviral response against cytoplasmic RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:10890-5.
27. **Bresnahan, W. A., G. E. Hultman, and T. Shenk.** 2000. Replication of wild-type and mutant human cytomegalovirus in life-extended human diploid fibroblasts. *J Virol* **74**:10816-8.
28. **Browne, E. P., and T. Shenk.** 2003. Human cytomegalovirus UL83-coded pp65 virion protein inhibits antiviral gene expression in infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:11439-11444.
29. **Brune, W., C. Ménard, J. Heesemann, and U. H. Koszinowski.** 2001. A ribonucleotide reductase homolog of cytomegalovirus and endothelial cell tropism. *Science* **291**:303-5.
30. **Brune, W., M. Nevels, and T. Shenk.** 2003. Murine cytomegalovirus m41 open reading frame encodes a Golgi-localized antiapoptotic protein. *J Virol* **77**:11633-11643.
31. **Brunetti, C. R., M. Paulose-Murphy, R. Singh, J. Qin, J. W. Barrett, A. Tardivel, P. Schneider, K. Essani, and G. McFadden.** 2003. A secreted high-affinity inhibitor of human TNF from Tanapox virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:4831-6.
32. **Bursch, W.** 2001. The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death Differ* **8**:569-81.
33. **Caposio, P., A. Luganini, G. Hahn, S. Landolfo, and G. Gribaudo.** 2007. Activation of the virus-induced IKK/NF-kappaB signalling axis is critical for the replication of human cytomegalovirus in quiescent cells. *Cell Microbiol* **9**:2040-54.
34. **Caposio, P., T. Musso, A. Luganini, H. Inoue, M. Gariglio, S. Landolfo, and G. Gribaudo.** 2007. Targeting the NF-kappaB pathway through pharmacological inhibition of IKK2 prevents human cytomegalovirus replication and virus-induced inflammatory response in infected endothelial cells. *Antiviral Res* **73**:175-84.
35. **Cardenas, W. B., Y. M. Loo, M. Gale, Jr., A. L. Hartman, C. R. Kimberlin, L. Martinez-Sobrido, E. O. Saphire, and C. F. Basler.** 2006. Ebola virus VP35 protein binds double-stranded RNA and inhibits alpha/beta interferon production induced by RIG-I signaling. *J Virol* **80**:5168-78.
36. **Castelli, J. C., B. A. Hassel, K. A. Wood, X. L. Li, K. Amemiya, M. C. Dalakas, P. F. Torrence, and R. J. Youle.** 1997. A study of the interferon antiviral mechanism: apoptosis activation by the 2-5A system. *J Exp Med* **186**:967-72.
37. **Chabaud, S., A. M. Sasseville, S. M. Elahi, A. Caron, F. Dufour, B. Massie, and Y. Langelier.** 2007. The ribonucleotide reductase domain of the R1 subunit of herpes simplex virus type 2 ribonucleotide reductase is essential for R1 antiapoptotic function. *J Gen Virol* **88**:384-94.
38. **Chadee, D. N., T. Yuasa, and J. M. Kyriakis.** 2002. Direct activation of mitogen-activated protein kinase kinase kinase MEKK1 by the Ste20p homologue GCK and the adapter protein TRAF2. *Mol Cell Biol* **22**:737-49.
39. **Chan, F. K., H. J. Chun, L. Zheng, R. M. Siegel, K. L. Bui, and M. J. Lenardo.** 2000. A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science* **288**:2351-4.
40. **Chan, F. K., J. Shisler, J. G. Bixby, M. Felices, L. Zheng, M. Appel, J. Orenstein, B. Moss, and M. J. Lenardo.** 2003. A role for tumor necrosis factor receptor-2 and receptor-interacting protein in programmed necrosis and antiviral responses. *J Biol Chem* **278**:51613-21.
41. **Chang, W. W., I. J. Su, M. D. Lai, W. T. Chang, W. Huang, and H. Y. Lei.** 2008. Suppression of p38 mitogen-activated protein kinase inhibits hepatitis B virus replication in human hepatoma cell: the antiviral role of nitric oxide. *J Viral Hepat.*
42. **Chaston, T. B., and B. A. Lidbury.** 2001. Genetic 'budget' of viruses and the cost to the infected host: a theory on the relationship between the genetic capacity of viruses, immune evasion, persistence and disease. *Immunol Cell Biol* **79**:62-6.

43. **Chaudhuri, A. R., S. St Jeor, and J. P. Maciejewski.** 1999. Apoptosis induced by human cytomegalovirus infection can be enhanced by cytokines to limit the spread of virus. *Exp Hematol* **27**:1194-203.
44. **Chen, F., D. Bhatia, Q. Chang, and V. Castranova.** 2006. Finding NEMO by K63-linked polyubiquitin chain. *Cell Death Differ* **13**:1835-8.
45. **Chen, G., and D. V. Goeddel.** 2002. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* **296**:1634-5.
46. **Chen, H. C., C. J. Wang, C. L. Chou, S. M. Lin, C. D. Huang, T. Y. Lin, C. H. Wang, H. C. Lin, C. T. Yu, H. P. Kuo, and C. Y. Liu.** 2006. Tumor necrosis factor-alpha induces caspase-independent cell death in human neutrophils via reactive oxidants and associated with calpain activity. *J Biomed Sci* **13**:261-73.
47. **Child, J. C., L. K. Hanson, C. E. Brown, D. M. Janzen, and A. P. Geballe.** 2006. Double-stranded RNA-binding by the murine cytomegalovirus m142 and m143. submitted.
48. **Child, S. J., M. Hakkı, K. L. De Niro, and A. P. Geballe.** 2004. Evasion of cellular antiviral responses by human cytomegalovirus TRS1 and IRS1. *J Virol* **78**:197-205.
49. **Child, S. J., L. K. Hanson, C. E. Brown, D. M. Janzen, and A. P. Geballe.** 2006. Double-stranded RNA binding by a heterodimeric complex of murine cytomegalovirus m142 and m143 proteins. *J Virol* **80**:10173-80.
50. **Choi, S. H., K. J. Park, B. Y. Ahn, G. Jung, M. M. Lai, and S. B. Hwang.** 2006. Hepatitis C virus nonstructural 5B protein regulates tumor necrosis factor alpha signaling through effects on cellular I κ B kinase. *Mol Cell Biol* **26**:3048-59.
51. **Cicin-Sain, L., Z. Ruzsics, J. Podlech, I. Bubic, C. Menard, S. Jonjic, M. J. Reddehase, and U. H. Koszinowski.** 2008. Dominant-negative FADD rescues the in vivo fitness of a cytomegalovirus lacking an antiapoptotic viral gene. *J Virol* **82**:2056-64.
52. **Compton, T.** 2004. Receptors and immune sensors: the complex entry path of human cytomegalovirus. *Trends Cell Biol* **14**:5-8.
53. **Compton, T., E. A. Kurt-Jones, K. W. Boehme, J. Belko, E. Latz, D. T. Golenbock, and R. W. Finberg.** 2003. Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. *J Virol* **77**:4588-4596.
54. **Conner, J.** 1999. The unique N terminus of herpes simplex virus type 1 ribonucleotide reductase large subunit is phosphorylated by casein kinase 2, which may have a homologue in *Escherichia coli*. *J Gen Virol* **80** (Pt 6):1471-6.
55. **Cusson-Hermance, N., S. Khurana, T. H. Lee, K. A. Fitzgerald, and M. A. Kelliher.** 2005. Rip1 mediates the Trif-dependent toll-like receptor 3- and 4-induced NF- κ B activation but does not contribute to interferon regulatory factor 3 activation. *J Biol Chem* **280**:36560-6.
56. **Cusson, N., S. Oikemus, E. D. Kilpatrick, L. Cunningham, and M. Kelliher.** 2002. The death domain kinase RIP protects thymocytes from tumor necrosis factor receptor type 2-induced cell death. *J Exp Med* **196**:15-26.
57. **Datsenko, K. A., and B. L. Wanner.** 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:6640-6645.
58. **Davison, A. J.** 2002. Evolution of the herpesviruses. *Vet Microbiol* **86**:69-88.
59. **Davison, A. J., D. J. Dargan, and N. D. Stow.** 2002. Fundamental and accessory systems in herpesviruses. *Antiviral Res* **56**:1-11.
60. **Davison, A. J., B. L. Trus, N. Cheng, A. C. Steven, M. S. Watson, C. Cunningham, R. M. Le Deuff, and T. Renault.** 2005. A novel class of herpesvirus with bivalve hosts. *J Gen Virol* **86**:41-53.
61. **DeFilippis, V., and K. Fruh.** 2005. Rhesus cytomegalovirus particles prevent activation of interferon regulatory factor 3. *J Virol* **79**:6419-31.
62. **Delale, T., A. Paquin, C. Asselin-Paturel, M. Dalod, G. Brizard, E. E. Bates, P. Kastner, S. Chan, S. Akira, A. Vicari, C. A. Biron, G. Trinchieri, and F. Briere.** 2005. MyD88-dependent and -independent murine cytomegalovirus sensing for IFN-alpha release and initiation of immune responses in vivo. *J Immunol* **175**:6723-32.
63. **Devin, A., Y. Lin, and Z. G. Liu.** 2003. The role of the death-domain kinase RIP in tumour-necrosis-factor-induced activation of mitogen-activated protein kinases. *EMBO Rep* **4**:623-7.
64. **DiPerna, G., J. Stack, A. G. Bowie, A. Boyd, G. Kotwal, Z. Zhang, S. Arvikar, E. Latz, K. A. Fitzgerald, and W. L. Marshall.** 2004. Poxvirus protein N1L targets the I κ B kinase complex, inhibits signaling to NF- κ B by the tumor necrosis factor superfamily of receptors, and inhibits NF- κ B and IRF3 signaling by toll-like receptors. *J Biol Chem* **279**:36570-8.

65. **Domingo-Gil, E., and M. Esteban.** 2006. Role of mitochondria in apoptosis induced by the 2-5A system and mechanisms involved. *Apoptosis* **11**:725-38.
66. **Ea, C. K., L. Deng, Z. P. Xia, G. Pineda, and Z. J. Chen.** 2006. Activation of IKK by TNF α requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO. *Mol Cell* **22**:245-57.
67. **Edelmann, K. H., S. Richardson-Burns, L. Alexopoulou, K. L. Tyler, R. A. Flavell, and M. B. Oldstone.** 2004. Does Toll-like receptor 3 play a biological role in virus infections? *Virology* **322**:231-8.
68. **Edinger, A. L., and C. B. Thompson.** 2004. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol* **16**:663-9.
69. **Eickhoff, J. E., and M. Cotten.** 2005. NF-kappaB activation can mediate inhibition of human cytomegalovirus replication. *J Gen Virol* **86**:285-95.
70. **Eliopoulos, A. G., N. J. Gallagher, S. M. Blake, C. W. Dawson, and L. S. Young.** 1999. Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 coregulates interleukin-6 and interleukin-8 production. *J Biol Chem* **274**:16085-96.
71. **Fan, T. J., L. H. Han, R. S. Cong, and J. Liang.** 2005. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **37**:719-27.
72. **Farrell, H. E., H. Vally, D. M. Lynch, P. Fleming, G. R. Shellam, A. A. Scalzo, and N. J. Davis-Poynter.** 1997. Inhibition of natural killer cells by a cytomegalovirus MHC class I homologue in vivo. *Nature* **386**:510-4.
73. **Feduchi, E., M. A. Alonso, and L. Carrasco.** 1989. Human gamma interferon and tumor necrosis factor exert a synergistic blockade on the replication of herpes simplex virus. *J Virol* **63**:1354-9.
74. **Festjens, N., T. Vanden Berghe, S. Cornelis, and P. Vandenabeele.** 2007. RIP1, a kinase on the crossroads of a cell's decision to live or die. *Cell Death Differ* **14**:400-10.
75. **Festjens, N., T. Vanden Berghe, and P. Vandenabeele.** 2006. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim Biophys Acta* **1757**:1371-87.
76. **Fink, S. L., and B. T. Cookson.** 2005. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun* **73**:1907-16.
77. **Fortunato, E. A., and D. H. Spector.** 1999. Regulation of human cytomegalovirus gene expression. *Adv Virus Res* **54**:61-128.
78. **Freeman, B. C., and R. I. Morimoto.** 1996. The human cytosolic molecular chaperones hsp90, hsp70 (hsc70) and hdj-1 have distinct roles in recognition of a non-native protein and protein refolding. *EMBO J* **15**:2969-79.
79. **Gandhi, M. K., and R. Khanna.** 2004. Human cytomegalovirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging treatments. *Lancet Infect Dis* **4**:725-38.
80. **Gaspar, M., and T. Shenk.** 2006. Human cytomegalovirus inhibits a DNA damage response by mislocalizing checkpoint proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:2821-6.
81. **Gil, J., and M. Esteban.** 2000. Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase (PKR): mechanism of action. *Apoptosis* **5**:107-14.
82. **Gil, J., and M. Esteban.** 2000. The interferon-induced protein kinase (PKR), triggers apoptosis through FADD-mediated activation of caspase 8 in a manner independent of Fas and TNF-alpha receptors. *Oncogene* **19**:3665-74.
83. **Goldmacher, V. S.** 2005. Cell death suppression by cytomegaloviruses. *Apoptosis* **10**:251-65.
84. **Goldmacher, V. S., L. M. Bartle, A. Skaletskaya, C. A. Dionne, N. L. Kedersha, C. A. Vater, J. Han, R. J. Lutz, S. Watanabe, E. D. McFarland, E. D. Kieff, E. S. Mocarski, and T. Chittenden.** 1999. A cytomegalovirus-encoded mitochondria-localized inhibitor of apoptosis structurally unrelated to Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:12536-12541.
85. **Golstein, P., and G. Kroemer.** 2007. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci* **32**:37-43.
86. **Goodkin, M. L., A. T. Ting, and J. A. Blaho.** 2003. NF-kappaB is required for apoptosis prevention during herpes simplex virus type 1 infection. *J Virol* **77**:7261-80.
87. **Grech, A. P., S. Gardam, T. Chan, R. Quinn, R. Gonzales, A. Basten, and R. Brink.** 2005. Tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2) signaling is negatively regulated by a novel, carboxyl-terminal TNFR-associated factor 2 (TRAF2)-binding site. *J Biol Chem* **280**:31572-81.
88. **Gregory, D., D. Hargett, D. Holmes, E. Money, and S. L. Bachenheimer.** 2004. Efficient replication by herpes simplex virus type 1 involves activation of the IkkappaB kinase-IkkappaB-p65 pathway. *J Virol* **78**:13582-90.

89. **Gribaudo, G., L. Riera, D. Lembo, M. De Andrea, M. Gariglio, T. L. Rudge, L. F. Johnson, and S. Landolfo.** 2000. Murine cytomegalovirus stimulates cellular thymidylate synthase gene expression in quiescent cells and requires the enzyme for replication. *J Virol* **74**:4979-87.
90. **Guo, Y., S. M. Srinivasula, A. Druilhe, T. Fernandes-Alnemri, and E. S. Alnemri.** 2002. Caspase-2 induces apoptosis by releasing proapoptotic proteins from mitochondria. *J Biol Chem* **277**:13430-7.
91. **Guo, Z., L. M. Chen, H. Zeng, J. A. Gomez, J. Plowden, T. Fujita, J. M. Katz, R. O. Donis, and S. Sambhara.** 2007. NS1 protein of influenza A virus inhibits the function of intracytoplasmic pathogen sensor, RIG-I. *Am J Respir Cell Mol Biol* **36**:263-9.
92. **Hamprecht, K., and G. Jahn.** 2007. [Human cytomegalovirus and congenital virus infection]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* **50**:1379-92.
93. **Han, K. J., X. Su, L. G. Xu, L. H. Bin, J. Zhang, and H. B. Shu.** 2004. Mechanisms of the TRIF-induced interferon-stimulated response element and NF-kappaB activation and apoptosis pathways. *J Biol Chem* **279**:15652-61.
94. **Harper, N., M. Hughes, M. MacFarlane, and G. M. Cohen.** 2003. Fas-associated death domain protein and caspase-8 are not recruited to the tumor necrosis factor receptor 1 signaling complex during tumor necrosis factor-induced apoptosis. *J Biol Chem* **278**:25534-41.
95. **Harte, M. T., I. R. Haga, G. Maloney, P. Gray, P. C. Reading, N. W. Bartlett, G. L. Smith, A. Bowie, and L. A. O'Neill.** 2003. The poxvirus protein A52R targets Toll-like receptor signaling complexes to suppress host defense. *J Exp Med* **197**:343-51.
96. **Harvey, D. M., and A. J. Levine.** 1991. p53 alteration is a common event in the spontaneous immortalization of primary BALB/c murine embryo fibroblasts. *Genes Dev* **5**:2375-2385.
97. **Hengel, H., W. Brune, and U. H. Koszinowski.** 1998. Immune evasion by cytomegalovirus - survival strategies of a highly adapted opportunist. *Trends Microbiol* **6**:190-7.
98. **Herbein, G., and W. A. O'Brien.** 2000. Tumor necrosis factor (TNF)-alpha and TNF receptors in viral pathogenesis. *Proc Soc Exp Biol Med* **223**:241-57.
99. **Heyninck, K., and R. Beyaert.** 2005. A20 inhibits NF-kappaB activation by dual ubiquitin-editing functions. *Trends Biochem Sci* **30**:1-4.
100. **Heyninck, K., D. De Valck, W. Vanden Berghe, W. Van Crielinge, R. Contreras, W. Fiers, G. Haegeman, and R. Beyaert.** 1999. The zinc finger protein A20 inhibits TNF-induced NF-kappaB-dependent gene expression by interfering with an RIP- or TRAF2-mediated transactivation signal and directly binds to a novel NF-kappaB-inhibiting protein ABIN. *J Cell Biol* **145**:1471-82.
101. **Hochrein, H., K. Shortman, D. Vremec, B. Scott, P. Hertzog, and M. O'Keeffe.** 2001. Differential production of IL-12, IFN-alpha, and IFN-gamma by mouse dendritic cell subsets. *J Immunol* **166**:5448-55.
102. **Hoebe, K., X. Du, P. Georgel, E. Janssen, K. Tabeta, S. O. Kim, J. Goode, P. Lin, N. Mann, S. Mudd, K. Crozat, S. Sovath, J. Han, and B. Beutler.** 2003. Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature* **424**:743-8.
103. **Holler, N., R. Zaru, O. Micheau, M. Thome, A. Attinger, S. Valitutti, J. L. Bodmer, P. Schneider, B. Seed, and J. Tschopp.** 2000. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol* **1**:489-95.
104. **Holloway, G., and B. S. Coulson.** 2006. Rotavirus activates JNK and p38 signaling pathways in intestinal cells, leading to AP-1-driven transcriptional responses and enhanced virus replication. *J Virol* **80**:10624-33.
105. **Hommes, D. W., M. P. Peppelenbosch, and S. J. van Deventer.** 2003. Mitogen activated protein (MAP) kinase signal transduction pathways and novel anti-inflammatory targets. *Gut* **52**:144-51.
106. **Honda, K., H. Yanai, H. Negishi, M. Asagiri, M. Sato, T. Mizutani, N. Shimada, Y. Ohba, A. Takaoka, N. Yoshida, and T. Taniguchi.** 2005. IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* **434**:772-7.
107. **Hsu, H., J. Huang, H. B. Shu, V. Baichwal, and D. V. Goeddel.** 1996. TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity* **4**:387-96.
108. **Hsu, H., J. Xiong, and D. V. Goeddel.** 1995. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* **81**:495-504.
109. **Hu, P., Z. Han, A. D. Couvillon, R. J. Kaufman, and J. H. Exton.** 2006. Autocrine tumor necrosis factor alpha links endoplasmic reticulum stress to the membrane death receptor pathway through IRE1alpha-mediated NF-kappaB activation and down-regulation of TRAF2 expression. *Mol Cell Biol* **26**:3071-84.

110. **Hur, G. M., Y. S. Kim, M. Won, S. Choksi, and Z. G. Liu.** 2006. The death domain kinase RIP has an important role in DNA damage-induced, p53-independent cell death. *J Biol Chem* **281**:25011-7.
111. **Hur, G. M., J. Lewis, Q. Yang, Y. Lin, H. Nakano, S. Nedospasov, and Z. G. Liu.** 2003. The death domain kinase RIP has an essential role in DNA damage-induced NF-kappa B activation. *Genes Dev* **17**:873-882.
112. **Huye, L. E., S. Ning, M. Kelliher, and J. S. Pagano.** 2007. Interferon regulatory factor 7 is activated by a viral oncoprotein through RIP-dependent ubiquitination. *Mol Cell Biol* **27**:2910-8.
113. **Ishii, K. J., C. Coban, H. Kato, K. Takahashi, Y. Torii, F. Takeshita, H. Ludwig, G. Sutter, K. Suzuki, H. Hemmi, S. Sato, M. Yamamoto, S. Uematsu, T. Kawai, O. Takeuchi, and S. Akira.** 2006. A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA. *Nat Immunol* **7**:40-8.
114. **Isler, J. A., A. H. Skalet, and J. C. Alwine.** 2005. Human cytomegalovirus infection activates and regulates the unfolded protein response. *J Virol* **79**:6890-6899.
115. **Izumi, K. M., E. D. Cahir McFarland, A. T. Ting, E. A. Riley, B. Seed, and E. D. Kieff.** 1999. The Epstein-Barr virus oncoprotein latent membrane protein 1 engages the tumor necrosis factor receptor-associated proteins TRADD and receptor-interacting protein (RIP) but does not induce apoptosis or require RIP for NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol* **19**:5759-67.
116. **Jarvis, M. A., J. A. Borton, A. M. Keech, J. Wong, W. J. Britt, B. E. Magun, and J. A. Nelson.** 2006. Human cytomegalovirus attenuates interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha proinflammatory signaling by inhibition of NF-kappaB activation. *J Virol* **80**:5588-98.
117. **Jenkins, C., W. Garcia, M. J. Godwin, J. V. Spencer, J. L. Stern, A. Abendroth, and B. Slobedman.** 2008. Immunomodulatory properties of a viral homolog of human interleukin-10 expressed by human cytomegalovirus during the latent phase of infection. *J Virol* **82**:3736-50.
118. **Jiang, Y., J. D. Woronicz, W. Liu, and D. V. Goeddel.** 1999. Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains. *Science* **283**:543-6.
119. **Jiang, Z., T. W. Mak, G. Sen, and X. Li.** 2004. Toll-like receptor 3-mediated activation of NF-kappaB and IRF3 diverges at Toll-IL-1 receptor domain-containing adapter inducing IFN-beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:3533-8.
120. **Jiang, Z., M. Zamanian-Daryoush, H. Nie, A. M. Silva, B. R. Williams, and X. Li.** 2003. Poly(I-C)-induced Toll-like receptor 3 (TLR3)-mediated activation of NFkappa B and MAP kinase is through an interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK)-independent pathway employing the signaling components TLR3-TRAF6-TAK1-TAB2-PKR. *J Biol Chem* **278**:16713-9.
121. **Jin, Z., and W. S. El-Deiry.** 2005. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther* **4**:139-63.
122. **Johnson, R. A., S. M. Huong, and E. S. Huang.** 2000. Activation of the mitogen-activated protein kinase p38 by human cytomegalovirus infection through two distinct pathways: a novel mechanism for activation of p38. *J Virol* **74**:1158-67.
123. **Jorgenson, R. L., S. L. Young, M. J. Lesmeister, T. D. Lyddon, and M. L. Misfeldt.** 2005. Human endometrial epithelial cells cyclically express Toll-like receptor 3 (TLR3) and exhibit TLR3-dependent responses to dsRNA. *Hum Immunol* **66**:469-82.
124. **Jurak, I., and W. Brune.** 2006. Induction of apoptosis limits cytomegalovirus cross-species infection. *Embo J* **25**:2634-42.
125. **Jurak, I., U. Schumacher, H. Simic, S. Voigt, and W. Brune.** 2008. The murine cytomegalovirus m38.5 protein inhibits Bax-mediated cell death. *J Virol*.
126. **Kaiser, W. J., and M. K. Offermann.** 2005. Apoptosis induced by the toll-like receptor adaptor TRIF is dependent on its receptor interacting protein homotypic interaction motif. *J Immunol* **174**:4942-52.
127. **Kalai, M., G. Van Loo, T. Vanden Berghe, A. Meeus, W. Burm, X. Saelens, and P. Vandenabeele.** 2002. Tipping the balance between necrosis and apoptosis in human and murine cells treated with interferon and dsRNA. *Cell Death Differ* **9**:981-94.
128. **Kattenhorn, L. M., R. Mills, M. Wagner, A. Lomsadze, V. Makeev, M. Borodovsky, H. L. Ploegh, and B. M. Kessler.** 2004. Identification of proteins associated with murine cytomegalovirus virions. *J Virol* **78**:11187-97.
129. **Kawai, T., and S. Akira.** 2007. Antiviral signaling through pattern recognition receptors. *J Biochem* **141**:137-45.
130. **Kawai, T., and S. Akira.** 2006. Innate immune recognition of viral infection. *Nat Immunol* **7**:131-137.
131. **Kawai, T., and S. Akira.** 2006. TLR signaling. *Cell Death Differ* **13**:816-825.

132. **Kawai, T., K. Takahashi, S. Sato, C. Coban, H. Kumar, H. Kato, K. J. Ishii, O. Takeuchi, and S. Akira.** 2005. IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol* **6**:981-8.
133. **Kelliher, M. A., S. Grimm, Y. Ishida, F. Kuo, B. Z. Stanger, and P. Leder.** 1998. The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF-kappaB signal. *Immunity* **8**:297-303.
134. **Khosravi-Far, R., and M. D. Esposti.** 2004. Death receptor signals to mitochondria. *Cancer Biol Ther* **3**:1051-7.
135. **Kim, J. W., C. O. Joe, and E. J. Choi.** 2001. Role of receptor-interacting protein in tumor necrosis factor-alpha -dependent MEKK1 activation. *J Biol Chem* **276**:27064-70.
136. **Kinsella, T. M., and G. P. Nolan.** 1996. Episomal vectors rapidly and stably produce high-titer recombinant retrovirus. *Hum Gene Ther* **7**:1405-13.
137. **Kisseleva, T., S. Bhattacharya, J. Braunstein, and C. W. Schindler.** 2002. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* **285**:1-24.
138. **Koffron, A. J., M. Hummel, B. K. Patterson, S. Yan, D. B. Kaufman, J. P. Fryer, F. P. Stuart, and M. I. Abecassis.** 1998. Cellular localization of latent murine cytomegalovirus. *J Virol* **72**:95-103.
139. **Kotenko, S. V., S. Sacconi, L. S. Izotova, O. V. Mirochnitchenko, and S. Pestka.** 2000. Human cytomegalovirus harbors its own unique IL-10 homolog (cmvIL-10). *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:1695-700.
140. **Krappmann, D., and C. Scheidereit.** 2005. A pervasive role of ubiquitin conjugation in activation and termination of IkappaB kinase pathways. *EMBO Rep* **6**:321-6.
141. **Kreuz, S., D. Siegmund, J. J. Rumpf, D. Samel, M. Leverkus, O. Janssen, G. Hacker, O. Dittrich-Breiholz, M. Kracht, P. Scheurich, and H. Wajant.** 2004. NFkappaB activation by Fas is mediated through FADD, caspase-8, and RIP and is inhibited by FLIP. *J Cell Biol* **166**:369-80.
142. **Krug, A., A. R. French, W. Barchet, J. A. Fischer, A. Dzionek, J. T. Pingel, M. M. Orihuela, S. Akira, W. M. Yokoyama, and M. Colonna.** 2004. TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. *Immunity* **21**:107-119.
143. **Kuwano, K., T. Kawashima, and S. Arai.** 1993. Antiviral effect of TNF-alpha and IFN-gamma secreted from a CD8+ influenza virus-specific CTL clone. *Viral Immunol* **6**:1-11.
144. **Landolfo, S., M. Gariglio, G. Gribaudo, and D. Lembo.** 2003. The human cytomegalovirus. *Pharmacol Ther* **98**:269-97.
145. **Langelier, Y., S. Bergeron, S. Chabaud, J. Lippens, C. Guilbault, A. M. Sasseville, S. Denis, D. D. Mosser, and B. Massie.** 2002. The R1 subunit of herpes simplex virus ribonucleotide reductase protects cells against apoptosis at, or upstream of, caspase-8 activation. *J Gen Virol* **83**:2779-89.
146. **Langelier, Y., L. Champoux, M. Hamel, C. Guilbault, N. Lamarche, P. Gaudreau, and B. Massie.** 1998. The R1 subunit of herpes simplex virus ribonucleotide reductase is a good substrate for host cell protein kinases but is not itself a protein kinase. *J Biol Chem* **273**:1435-43.
147. **Lee, D. C., C. Y. Cheung, A. H. Law, C. K. Mok, M. Peiris, and A. S. Lau.** 2005. p38 mitogen-activated protein kinase-dependent hyperinduction of tumor necrosis factor alpha expression in response to avian influenza virus H5N1. *J Virol* **79**:10147-54.
148. **Lee, E. C., D. Yu, J. Martinez de Velasco, L. Tassarollo, D. A. Swing, D. L. Court, N. A. Jenkins, and N. G. Copeland.** 2001. A highly efficient Escherichia coli-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA. *Genomics* **73**:56-65.
149. **Lee, E. G., D. L. Boone, S. Chai, S. L. Libby, M. Chien, J. P. Lodolce, and A. Ma.** 2000. Failure to regulate TNF-induced NF-kappaB and cell death responses in A20-deficient mice. *Science* **289**:2350-4.
150. **Lee, M. S., and Y. J. Kim.** 2007. Pattern-recognition receptor signaling initiated from extracellular, membrane, and cytoplasmic space. *Mol Cells* **23**:1-10.
151. **Lee, T. H., Q. Huang, S. Oikemus, J. Shank, J. J. Ventura, N. Cusson, R. R. Vaillancourt, B. Su, R. J. Davis, and M. A. Kelliher.** 2003. The death domain kinase RIP1 is essential for tumor necrosis factor alpha signaling to p38 mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Biol* **23**:8377-85.
152. **Lee, T. H., J. Shank, N. Cusson, and M. A. Kelliher.** 2004. The kinase activity of Rip1 is not required for tumor necrosis factor-alpha-induced IkappaB kinase or p38 MAP kinase activation or for the ubiquitination of Rip1 by Traf2. *J Biol Chem* **279**:33185-91.
153. **Lee, Y. B., J. W. Schrader, and S. U. Kim.** 2000. p38 map kinase regulates TNF-alpha production in human astrocytes and microglia by multiple mechanisms. *Cytokine* **12**:874-80.

154. **Lembo, D., M. Donalisio, A. Hofer, M. Cornaglia, W. Brune, U. Koszinowski, L. Thelander, and S. Landolfo.** 2004. The ribonucleotide reductase R1 homolog of murine cytomegalovirus is not a functional enzyme subunit but is required for pathogenesis. *J Virol* **78**:4278-88.
155. **Lewis, J., A. Devin, A. Miller, Y. Lin, Y. Rodriguez, L. Neckers, and Z. G. Liu.** 2000. Disruption of hsp90 function results in degradation of the death domain kinase, receptor-interacting protein (RIP), and blockage of tumor necrosis factor-induced nuclear factor-kappaB activation. *J Biol Chem* **275**:10519-26.
156. **Lewis, M., L. A. Tartaglia, A. Lee, G. L. Bennett, G. C. Rice, G. H. Wong, E. Y. Chen, and D. V. Goeddel.** 1991. Cloning and expression of cDNAs for two distinct murine tumor necrosis factor receptors demonstrate one receptor is species specific. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:2830-4.
157. **Li, H., M. Kobayashi, M. Blonska, Y. You, and X. Lin.** 2006. Ubiquitination of RIP is required for tumor necrosis factor alpha-induced NF-kappaB activation. *J Biol Chem* **281**:13636-43.
158. **Li, K., E. Foy, J. C. Ferreon, M. Nakamura, A. C. Ferreon, M. Ikeda, S. C. Ray, M. Gale, Jr., and S. M. Lemon.** 2005. Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:2992-7.
159. **Li, M., and A. A. Beg.** 2000. Induction of necrotic-like cell death by tumor necrosis factor alpha and caspase inhibitors: novel mechanism for killing virus-infected cells. *J Virol* **74**:7470-7.
160. **Lin, Y., S. Choksi, H. M. Shen, Q. F. Yang, G. M. Hur, Y. S. Kim, J. H. Tran, S. A. Nedospasov, and Z. G. Liu.** 2004. Tumor necrosis factor-induced nonapoptotic cell death requires receptor-interacting protein-mediated cellular reactive oxygen species accumulation. *J Biol Chem* **279**:10822-8.
161. **Lin, Y., A. Devin, A. Cook, M. M. Keane, M. Kelliher, S. Lipkowitz, and Z. G. Liu.** 2000. The death domain kinase RIP is essential for TRAIL (Apo2L)-induced activation of IkappaB kinase and c-Jun N-terminal kinase. *Mol Cell Biol* **20**:6638-45.
162. **Lin, Y., A. Devin, Y. Rodriguez, and Z. G. Liu.** 1999. Cleavage of the death domain kinase RIP by caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis. *Genes Dev* **13**:2514-26.
163. **Liu, C. Y., A. Takemasa, W. C. Liles, R. B. Goodman, M. Jonas, H. Rosen, E. Chi, R. K. Winn, J. M. Harlan, and P. I. Chuang.** 2003. Broad-spectrum caspase inhibition paradoxically augments cell death in TNF-alpha-stimulated neutrophils. *Blood* **101**:295-304.
164. **Loenen, W. A., C. A. Bruggeman, and E. J. Wiertz.** 2001. Immune evasion by human cytomegalovirus: lessons in immunology and cell biology. *Semin Immunol* **13**:41-9.
165. **Loh, J., D. T. Chu, A. K. O'Guin, W. M. Yokoyama, and H. W. t. Virgin.** 2005. Natural killer cells utilize both perforin and gamma interferon to regulate murine cytomegalovirus infection in the spleen and liver. *J Virol* **79**:661-7.
166. **Lotze, M. T., H. J. Zeh, A. Rubartelli, L. J. Sparvero, A. A. Amoscato, N. R. Washburn, M. E. Devera, X. Liang, M. Tor, and T. Billiar.** 2007. The grateful dead: damage-associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity. *Immunol Rev* **220**:60-81.
167. **Lucin, P., S. Jonjic, M. Messerle, B. Polic, H. Hengel, and U. H. Koszinowski.** 1994. Late phase inhibition of murine cytomegalovirus replication by synergistic action of interferon-gamma and tumour necrosis factor. *J Gen Virol* **75 (Pt 1)**:101-10.
168. **Luo, M. H., K. Rosenke, K. Czornak, and E. A. Fortunato.** 2007. Human cytomegalovirus disrupts both ataxia telangiectasia mutated protein (ATM)- and ATM-Rad3-related kinase-mediated DNA damage responses during lytic infection. *J Virol* **81**:1934-50.
169. **Ma, Y., V. Temkin, H. Liu, and R. M. Pope.** 2005. NF-kappaB protects macrophages from lipopolysaccharide-induced cell death: the role of caspase 8 and receptor-interacting protein. *J Biol Chem* **280**:41827-34.
170. **Mack, C., A. Sickmann, D. Lembo, and W. Brune.** 2008. Inhibition of proinflammatory and innate immune signaling pathways by a cytomegalovirus RIP1-interacting protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:3094-9.
171. **Malm, G., and M. L. Engman.** 2007. Congenital cytomegalovirus infections. *Semin Fetal Neonatal Med* **12**:154-9.
172. **Martinet, W., D. M. Schrijvers, A. G. Herman, and G. R. De Meyer.** 2006. z-VAD-fmk-induced non-apoptotic cell death of macrophages: possibilities and limitations for atherosclerotic plaque stabilization. *Autophagy* **2**:312-4.
173. **Matsumoto, M., K. Funami, M. Tanabe, H. Oshiumi, M. Shingai, Y. Seto, A. Yamamoto, and T. Seya.** 2003. Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J Immunol* **171**:3154-62.

174. **Mayer, A., H. Gelderblom, G. Kumel, and C. Jungwirth.** 1992. Interferon-gamma-induced assembly block in the replication cycle of adenovirus 2: augmentation by tumour necrosis factor-alpha. *Virology* **187**:372-6.
175. **McGeoch, D. J., S. Cook, A. Dolan, F. E. Jamieson, and E. A. Telford.** 1995. Molecular phylogeny and evolutionary timescale for the family of mammalian herpesviruses. *J Mol Biol* **247**:443-58.
176. **McGeoch, D. J., and D. Gatherer.** 2005. Integrating reptilian herpesviruses into the family herpesviridae. *J Virol* **79**:725-31.
177. **Medema, J. P., C. Scaffidi, F. C. Kischkel, A. Shevchenko, M. Mann, P. H. Krammer, and M. E. Peter.** 1997. FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J* **16**:2794-804.
178. **Melroe, G. T., L. Silva, P. A. Schaffer, and D. M. Knipe.** 2007. Recruitment of activated IRF-3 and CBP/p300 to herpes simplex virus ICP0 nuclear foci: Potential role in blocking IFN-beta induction. *Virology* **360**:305-21.
179. **Menard, C., M. Wagner, Z. Ruzsics, K. Holak, W. Brune, A. E. Campbell, and U. H. Koszinowski.** 2003. Role of murine cytomegalovirus US22 gene family members in replication in macrophages. *J Virol* **77**:5557-70.
180. **Messerle, M., I. Crnkovic, W. Hammerschmidt, H. Ziegler, and U. H. Koszinowski.** 1997. Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:14759-14763.
181. **Meusel, T. R., and F. Imani.** 2003. Viral induction of inflammatory cytokines in human epithelial cells follows a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent but NF-kappa B-independent pathway. *J Immunol* **171**:3768-74.
182. **Meylan, E., K. Burns, K. Hofmann, V. Blancheteau, F. Martinon, M. Kelliher, and J. Tschopp.** 2004. RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation. *Nat Immunol* **5**:503-7.
183. **Meylan, E., J. Curran, K. Hofmann, D. Moradpour, M. Binder, R. Bartenschlager, and J. Tschopp.** 2005. Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* **437**:1167-72.
184. **Meylan, E., and J. Tschopp.** 2005. The RIP kinases: crucial integrators of cellular stress. *Trends Biochem Sci* **30**:151-9.
185. **Micheau, O., and J. Tschopp.** 2003. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* **114**:181-90.
186. **Milhas, D., O. Cuvillier, N. Therville, P. Clave, M. Thomsen, T. Levade, H. Benoist, and B. Segui.** 2005. Caspase-10 triggers Bid cleavage and caspase cascade activation in FasL-induced apoptosis. *J Biol Chem* **280**:19836-42.
187. **Mocarski, E. S., Jr.** 2002. Immunomodulation by cytomegaloviruses: manipulative strategies beyond evasion. *Trends Microbiol* **10**:332-9.
188. **Mocarski, E. S. J., Shenk, T., Pass, R. F.** 2007. Cytomegaloviruses. *In* B. Fields, Knipe, D. M., Howley, P. M. (ed.), *Fields Virology*, 5th ed. . Lippincott-Williams & Wilkins, Philadelphia.
189. **Modrow, S., Falke, D.** 2002. Molekulare Virologie. Spektrum Akad. Vlg., Hdg., Heidelberg.
190. **Montag, C., J. Wagner, I. Gruska, and C. Hagemeier.** 2006. Human cytomegalovirus blocks tumor necrosis factor alpha- and interleukin-1beta-mediated NF-kappaB signaling. *J Virol* **80**:11686-98.
191. **Morrison, T. E., A. Mauser, A. Klingelutz, and S. C. Kenney.** 2004. Epstein-Barr virus immediate-early protein BZLF1 inhibits tumor necrosis factor alpha-induced signaling and apoptosis by downregulating tumor necrosis factor receptor 1. *J Virol* **78**:544-9.
192. **Munger, J., S. U. Bajad, H. A. Collier, T. Shenk, and J. D. Rabinowitz.** 2006. Dynamics of the cellular metabolome during human cytomegalovirus infection. *PLoS Pathog* **2**:e132.
193. **Murao, L. E., and J. L. Shisler.** 2005. The MCV MC159 protein inhibits late, but not early, events of TNF-alpha-induced NF-kappaB activation. *Virology* **340**:255-64.
194. **Nichols, D. B., and J. L. Shisler.** 2006. The MC160 protein expressed by the dermatotropic poxvirus molluscum contagiosum virus prevents tumor necrosis factor alpha-induced NF-kappaB activation via inhibition of I kappa kinase complex formation. *J Virol* **80**:578-86.
195. **Nishitoh, H., M. Saitoh, Y. Mochida, K. Takeda, H. Nakano, M. Rothe, K. Miyazono, and H. Ichijo.** 1998. ASK1 is essential for JNK/SAPK activation by TRAF2. *Mol Cell* **2**:389-95.
196. **Ogawa-Goto, K., K. Tanaka, W. Gibson, E. Moriishi, Y. Miura, T. Kurata, S. Irie, and T. Sata.** 2003. Microtubule network facilitates nuclear targeting of human cytomegalovirus capsid. *J Virol* **77**:8541-7.

197. **Orange, J. S., and C. A. Biron.** 1996. Characterization of early IL-12, IFN- α , and TNF effects on antiviral state and NK cell responses during murine cytomegalovirus infection. *J Immunol* **156**:4746-56.
198. **Palanki, M. S.** 2002. Inhibitors of AP-1 and NF- κ B mediated transcriptional activation: therapeutic potential in autoimmune diseases and structural diversity. *Curr Med Chem* **9**:219-27.
199. **Park, K. J., S. H. Choi, S. Y. Lee, S. B. Hwang, and M. M. Lai.** 2002. Nonstructural 5A protein of hepatitis C virus modulates tumor necrosis factor α -stimulated nuclear factor κ B activation. *J Biol Chem* **277**:13122-8.
200. **Patrone, M., E. Percivalle, M. Secchi, L. Fiorina, G. Pedrali-Noy, M. Zoppe, F. Baldanti, G. Hahn, U. H. Koszinowski, G. Milanesi, and A. Gallina.** 2003. The human cytomegalovirus UL45 gene product is a late, virion-associated protein and influences virus growth at low multiplicities of infection. *J Gen Virol* **84**:3359-70.
201. **Paulus, C., S. Krauss, and M. Nevels.** 2006. A human cytomegalovirus antagonist of type I IFN-dependent signal transducer and activator of transcription signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:3840-3845.
202. **Pavic, I., B. Polic, I. Crnkovic, P. Lucin, S. Jonjic, and U. H. Koszinowski.** 1993. Participation of endogenous tumour necrosis factor α in host resistance to cytomegalovirus infection. *J Gen Virol* **74** (Pt 10):2215-23.
203. **Perkins, D., E. F. Pereira, and L. Aurelian.** 2003. The herpes simplex virus type 2 R1 protein kinase (ICP10 PK) functions as a dominant regulator of apoptosis in hippocampal neurons involving activation of the ERK survival pathway and upregulation of the antiapoptotic protein Bag-1. *J Virol* **77**:1292-305.
204. **Perkins, D., E. F. Pereira, M. Gober, P. J. Yarowsky, and L. Aurelian.** 2002. The herpes simplex virus type 2 R1 protein kinase (ICP10 PK) blocks apoptosis in hippocampal neurons, involving activation of the MEK/MAPK survival pathway. *J Virol* **76**:1435-49.
205. **Pfeffer, S., A. Sewer, M. Lagos-Quintana, R. Sheridan, C. Sander, F. A. Grasser, L. F. van Dyk, C. K. Ho, S. Shuman, M. Chien, J. J. Russo, J. Ju, G. Randall, B. D. Lindenbach, C. M. Rice, V. Simon, D. D. Ho, M. Zavolan, and T. Tuschl.** 2005. Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nat Methods* **2**:269-276.
206. **Pichlmair, A., and C. Reis e Sousa.** 2007. Innate recognition of viruses. *Immunity* **27**:370-83.
207. **Polster, B. M., J. Pevsner, and J. M. Hardwick.** 2004. Viral Bcl-2 homologs and their role in virus replication and associated diseases. *Biochim Biophys Acta* **1644**:211-27.
208. **Popkin, D. L., and H. W. Virgin.** 2003. Murine cytomegalovirus infection inhibits tumor necrosis factor α responses in primary macrophages. *J Virol* **77**:10125-30.
209. **Popkin, D. L., M. A. Watson, E. Karaskov, G. P. Dunn, R. Bremner, and H. W. t. Virgin.** 2003. Murine cytomegalovirus paralyzes macrophages by blocking IFN γ -induced promoter assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:14309-14.
210. **Powell, P. P., L. K. Dixon, and R. M. Parkhouse.** 1996. An IkappaB homolog encoded by African swine fever virus provides a novel mechanism for downregulation of proinflammatory cytokine responses in host macrophages. *J Virol* **70**:8527-33.
211. **Poyet, J. L., S. M. Srinivasula, J. H. Lin, T. Fernandes-Alnemri, S. Yamaoka, P. N. Tsichlis, and E. S. Alnemri.** 2000. Activation of the Ikappa B kinases by RIP via IKK γ /NEMO-mediated oligomerization. *J Biol Chem* **275**:37966-77.
212. **Puro, R., and R. J. Schneider.** 2007. Tumor necrosis factor activates a conserved innate antiviral response to hepatitis B virus that destabilizes nucleocapsids and reduces nuclear viral DNA. *J Virol* **81**:7351-62.
213. **Randall, R. E., and S. Goodbourn.** 2008. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J Gen Virol* **89**:1-47.
214. **Rawlinson, W. D., H. E. Farrell, and B. G. Barrell.** 1996. Analysis of the complete DNA sequence of murine cytomegalovirus. *J Virol* **70**:8833-8849.
215. **Redpath, S., A. Angulo, N. R. Gascoigne, and P. Ghazal.** 1999. Murine cytomegalovirus infection down-regulates MHC class II expression on macrophages by induction of IL-10. *J Immunol* **162**:6701-7.
216. **Reeves, M. B., A. A. Davies, B. P. McSharry, G. W. Wilkinson, and J. H. Sinclair.** 2007. Complex I binding by a virally encoded RNA regulates mitochondria-induced cell death. *Science* **316**:1345-8.
217. **Rhodus, N. L., B. Cheng, S. Myers, W. Bowles, V. Ho, and F. Ondrey.** 2005. A comparison of the pro-inflammatory, NF- κ B-dependent cytokines: TNF- α , IL-1- α , IL-6, and IL-8 in different oral fluids from oral lichen planus patients. *Clin Immunol* **114**:278-83.

218. **Robertson, J. D., M. Enoksson, M. Suomela, B. Zhivotovsky, and S. Orrenius.** 2002. Caspase-2 acts upstream of mitochondria to promote cytochrome c release during etoposide-induced apoptosis. *J Biol Chem* **277**:29803-9.
219. **Roux, P. P., and J. Blenis.** 2004. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**:320-44.
220. **Ryckman, B. J., M. A. Jarvis, D. D. Drummond, J. A. Nelson, and D. C. Johnson.** 2006. Human cytomegalovirus entry into epithelial and endothelial cells depends on genes UL128 to UL150 and occurs by endocytosis and low-pH fusion. *J Virol* **80**:710-22.
221. **Saffert, R. T., and R. F. Kalejta.** 2006. Inactivating a cellular intrinsic immune defense mediated by Daxx is the mechanism through which the human cytomegalovirus pp71 protein stimulates viral immediate-early gene expression. *J Virol* **80**:3863-71.
222. **Saha, S. K., E. M. Pietras, J. Q. He, J. R. Kang, S. Y. Liu, G. Oganessian, A. Shahangian, B. Zarnegar, T. L. Shiba, Y. Wang, and G. Cheng.** 2006. Regulation of antiviral responses by a direct and specific interaction between TRAF3 and Cardif. *EMBO J* **25**:3257-63.
223. **Sainz, B., Jr., H. L. LaMarca, R. F. Garry, and C. A. Morris.** 2005. Synergistic inhibition of human cytomegalovirus replication by interferon-alpha/beta and interferon-gamma. *Virol J* **2**:14.
224. **Salaun, B., P. Romero, and S. Lebecque.** 2007. Toll-like receptors' two-edged sword: when immunity meets apoptosis. *Eur J Immunol* **37**:3311-8.
225. **Sampaio, K. L., Y. Cavignac, Y. D. Stierhof, and C. Sinzger.** 2005. Human cytomegalovirus labeled with green fluorescent protein for live analysis of intracellular particle movements. *J Virol* **79**:2754-67.
226. **Sanchez, V., K. D. Greis, E. Sztul, and W. J. Britt.** 2000. Accumulation of virion tegument and envelope proteins in a stable cytoplasmic compartment during human cytomegalovirus replication: characterization of a potential site of virus assembly. *J Virol* **74**:975-86.
227. **Santoro, M. G., A. Rossi, and C. Amici.** 2003. NF-kappaB and virus infection: who controls whom. *EMBO J* **22**:2552-60.
228. **Sato, S., M. Sugiyama, M. Yamamoto, Y. Watanabe, T. Kawai, K. Takeda, and S. Akira.** 2003. Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* **171**:4304-10.
229. **Scaffidi, C., S. Fulda, A. Srinivasan, C. Friesen, F. Li, K. J. Tomaselli, K. M. Debatin, P. H. Krammer, and M. E. Peter.** 1998. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* **17**:1675-87.
230. **Scaffidi, C., I. Schmitz, J. Zha, S. J. Korsmeyer, P. H. Krammer, and M. E. Peter.** 1999. Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells. *J Biol Chem* **274**:22532-8.
231. **Scheibel, T., and J. Buchner.** 1998. The Hsp90 complex--a super-chaperone machine as a novel drug target. *Biochem Pharmacol* **56**:675-82.
232. **Schmitt, E., C. Paquet, M. Beauchemin, and R. Bertrand.** 2007. DNA-damage response network at the crossroads of cell-cycle checkpoints, cellular senescence and apoptosis. *J Zhejiang Univ Sci B* **8**:377-97.
233. **Schneider-Brachert, W., V. Tchikov, J. Neumeyer, M. Jakob, S. Winoto-Morbach, J. Held-Feindt, M. Heinrich, O. Merkel, M. Ehrenschwender, D. Adam, R. Mentlein, D. Kabelitz, and S. Schutze.** 2004. Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling: internalized TNF receptors as death signaling vesicles. *Immunity* **21**:415-28.
234. **Schulze-Osthoff, K., P. H. Krammer, and W. Droge.** 1994. Divergent signalling via APO-1/Fas and the TNF receptor, two homologous molecules involved in physiological cell death. *EMBO J* **13**:4587-96.
235. **Screaton, G., and X. N. Xu.** 2000. T cell life and death signalling via TNF-receptor family members. *Curr Opin Immunol* **12**:316-22.
236. **Seo, J. Y., and W. J. Britt.** 2006. Sequence requirements for localization of human cytomegalovirus tegument protein pp28 to the virus assembly compartment and for assembly of infectious virus. *J Virol* **80**:5611-26.
237. **Seth, R. B., L. Sun, and Z. J. Chen.** 2006. Antiviral innate immunity pathways. *Cell Res* **16**:141-7.
238. **Seth, R. B., L. Sun, C. K. Ea, and Z. J. Chen.** 2005. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* **122**:669-82.
239. **Shackelton, L. A., and E. C. Holmes.** 2004. The evolution of large DNA viruses: combining genomic information of viruses and their hosts. *Trends Microbiol* **12**:458-65.

240. **Shaw, M. L., W. B. Cardenas, D. Zamarin, P. Palese, and C. F. Basler.** 2005. Nuclear localization of the Nipah virus W protein allows for inhibition of both virus- and toll-like receptor 3-triggered signaling pathways. *J Virol* **79**:6078-88.
241. **Sheikh, M. S., and Y. Huang.** 2003. Death receptor activation complexes: it takes two to activate TNF receptor 1. *Cell Cycle* **2**:550-2.
242. **Shellam, G. R., J. E. Allan, J. M. Papadimitriou, and G. J. Bancroft.** 1981. Increased susceptibility to cytomegalovirus infection in beige mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**:5104-8.
243. **Shi, Y.** 2002. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* **9**:459-70.
244. **Shishodia, S., and B. B. Aggarwal.** 2002. Nuclear factor-kappaB activation: a question of life or death. *J Biochem Mol Biol* **35**:28-40.
245. **Sinclair, J., and P. Sissons.** 2006. Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *J Gen Virol* **87**:1763-79.
246. **Skaletskaya, A., L. M. Bartle, T. Chittenden, A. L. McCormick, E. S. Mocarski, and V. S. Goldmacher.** 2001. A cytomegalovirus-encoded inhibitor of apoptosis that suppresses caspase-8 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:7829-7834.
247. **Smith, C. C., and L. Aurelian.** 1997. The large subunit of herpes simplex virus type 2 ribonucleotide reductase (ICP10) is associated with the virion tegument and has PK activity. *Virology* **234**:235-42.
248. **Smith, C. C., M. Kulka, J. P. Wymer, T. D. Chung, and L. Aurelian.** 1992. Expression of the large subunit of herpes simplex virus type 2 ribonucleotide reductase (ICP10) is required for virus growth and neoplastic transformation. *J Gen Virol* **73 (Pt 6)**:1417-28.
249. **Smith, C. C., T. Peng, M. Kulka, and L. Aurelian.** 1998. The PK domain of the large subunit of herpes simplex virus type 2 ribonucleotide reductase (ICP10) is required for immediate-early gene expression and virus growth. *J Virol* **72**:9131-41.
250. **Smyth, M. J., E. Cretney, J. M. Kelly, J. A. Westwood, S. E. Street, H. Yagita, K. Takeda, S. L. van Dommelen, M. A. Degli-Esposti, and Y. Hayakawa.** 2005. Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol* **42**:501-10.
251. **Stack, J., I. R. Haga, M. Schroder, N. W. Bartlett, G. Maloney, P. C. Reading, K. A. Fitzgerald, G. L. Smith, and A. G. Bowie.** 2005. Vaccinia virus protein A46R targets multiple Toll-like-interleukin-1 receptor adaptors and contributes to virulence. *J Exp Med* **201**:1007-18.
252. **Stanger, B. Z., P. Leder, T. H. Lee, E. Kim, and B. Seed.** 1995. RIP: a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death. *Cell* **81**:513-23.
253. **Stocchi, R., K. N. Ward, R. Fanin, M. Baccarani, and J. F. Apperley.** 1999. Management of human cytomegalovirus infection and disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Haematologica* **84**:71-9.
254. **Stoddart, C. A., R. D. Cardin, J. M. Boname, W. C. Manning, G. B. Abenes, and E. S. Mocarski.** 1994. Peripheral blood mononuclear phagocytes mediate dissemination of murine cytomegalovirus. *68*:6243-6253.
255. **Szomolanyi-Tsuda, E., X. Liang, R. M. Welsh, E. A. Kurt-Jones, and R. W. Finberg.** 2006. Role for TLR2 in NK cell-mediated control of murine cytomegalovirus in vivo. *J Virol* **80**:4286-91.
256. **Tabeta, K., P. Georgel, E. Janssen, X. Du, K. Hoebe, K. Crozat, S. Mudd, L. Shamel, S. Sovath, J. Goode, L. Alexopoulou, R. A. Flavell, and B. Beutler.** 2004. Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:3516-21.
257. **Tada, K., T. Okazaki, S. Sakon, T. Kobara, K. Kurosawa, S. Yamaoka, H. Hashimoto, T. W. Mak, H. Yagita, K. Okumura, W. C. Yeh, and H. Nakano.** 2001. Critical roles of TRAF2 and TRAF5 in tumor necrosis factor-induced NF-kappa B activation and protection from cell death. *J Biol Chem* **276**:36530-4.
258. **Tai, D. I., S. L. Tsai, Y. M. Chen, Y. L. Chuang, C. Y. Peng, I. S. Sheen, C. T. Yeh, K. S. Chang, S. N. Huang, G. C. Kuo, and Y. F. Liaw.** 2000. Activation of nuclear factor kappaB in hepatitis C virus infection: implications for pathogenesis and hepatocarcinogenesis. *Hepatology* **31**:656-64.
259. **Takaoka, A., Z. Wang, M. K. Choi, H. Yanai, H. Negishi, T. Ban, Y. Lu, M. Miyagishi, T. Kodama, K. Honda, Y. Ohba, and T. Taniguchi.** 2007. DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature* **448**:501-5.
260. **Terhune, S., E. Torigoi, N. Moorman, M. Silva, Z. Qian, T. Shenk, and D. Yu.** 2007. Human cytomegalovirus UL38 protein blocks apoptosis. *J Virol* **81**:3109-23.
261. **Thon, L., S. Mathieu, D. Kabelitz, and D. Adam.** 2006. The murine TRAIL receptor signals caspase-independent cell death through ceramide. *Exp Cell Res* **312**:3808-21.

262. **Thon, L., H. Mohlig, S. Mathieu, A. Lange, E. Bulanova, S. Winoto-Morbach, S. Schutze, S. Bulfone-Paus, and D. Adam.** 2005. Ceramide mediates caspase-independent programmed cell death. *FASEB J* **19**:1945-56.
263. **Tissari, J., J. Siren, S. Meri, I. Julkunen, and S. Matikainen.** 2005. IFN-alpha enhances TLR3-mediated antiviral cytokine expression in human endothelial and epithelial cells by up-regulating TLR3 expression. *J Immunol* **174**:4289-94.
264. **Umene, K., and H. Sakaoka.** 1999. Evolution of herpes simplex virus type 1 under herpesviral evolutionary processes. *Arch Virol* **144**:637-56.
265. **Valchanova, R. S., M. Picard-Maureau, M. Budt, and W. Brune.** 2006. Murine cytomegalovirus m142 and m143 are both required to block protein kinase R-mediated shutdown of protein synthesis. *J Virol* **80**:10181-90.
266. **Van Antwerp, D. J., S. J. Martin, I. M. Verma, and D. R. Green.** 1998. Inhibition of TNF-induced apoptosis by NF-kappa B. *Trends Cell Biol* **8**:107-11.
267. **Vanden Berghe, T., M. Kalai, G. van Loo, W. Declercq, and P. Vandenabeele.** 2003. Disruption of HSP90 function reverts tumor necrosis factor-induced necrosis to apoptosis. *J Biol Chem* **278**:5622-9.
268. **Vandenabeele, P., T. Vanden Berghe, and N. Festjens.** 2006. Caspase inhibitors promote alternative cell death pathways. *Sci STKE* **2006**:pe44.
269. **Varnum, S. M., D. N. Streblov, M. E. Monroe, P. Smith, K. J. Auberry, L. Pasa-Tolic, D. Wang, D. G. Camp, 2nd, K. Rodland, S. Wiley, W. Britt, T. Shenk, R. D. Smith, and J. A. Nelson.** 2004. Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome. *J Virol* **78**:10960-6.
270. **Vercammen, D., R. Beyaert, G. Denecker, V. Goossens, G. Van Loo, W. Declercq, J. Grooten, W. Fiers, and P. Vandenabeele.** 1998. Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor. *J Exp Med* **187**:1477-85.
271. **Vester, B., K. Muller, W. Solbach, and T. Laskay.** 1999. Early gene expression of NK cell-activating chemokines in mice resistant to *Leishmania major*. *Infect Immun* **67**:3155-9.
272. **Wagner, K. W., I. H. Engels, and Q. L. Deveraux.** 2004. Caspase-2 can function upstream of bid cleavage in the TRAIL apoptosis pathway. *J Biol Chem* **279**:35047-52.
273. **Wagner, M., S. Jonjic, U. H. Koszinowski, and M. Messerle.** 1999. Systematic excision of vector sequences from the BAC-cloned herpesvirus genome during virus reconstitution. *J Virol* **73**:7056-7060.
274. **Wajant, H., K. Pfizenmaier, and P. Scheurich.** 2003. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* **10**:45-65.
275. **Wales, S. Q., B. Li, J. M. Laing, and L. Aurelian.** 2007. The herpes simplex virus type 2 gene ICP10PK protects from apoptosis caused by nerve growth factor deprivation through inhibition of caspase-3 activation and XIAP up-regulation. *J Neurochem* **103**:365-79.
276. **Wang, C., L. Deng, M. Hong, G. R. Akkaraju, J. Inoue, and Z. J. Chen.** 2001. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* **412**:346-51.
277. **Wang, J., H. J. Chun, W. Wong, D. M. Spencer, and M. J. Lenardo.** 2001. Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:13884-8.
278. **Wang, N., P. F. Baldi, and B. S. Gaut.** 2007. Phylogenetic analysis, genome evolution and the rate of gene gain in the Herpesviridae. *Mol Phylogenet Evol* **43**:1066-75.
279. **Wang, Y. Y., L. Li, K. J. Han, Z. Zhai, and H. B. Shu.** 2004. A20 is a potent inhibitor of TLR3- and Sendai virus-induced activation of NF-kappaB and ISRE and IFN-beta promoter. *FEBS Lett* **576**:86-90.
280. **Weber, F., V. Wagner, S. B. Rasmussen, R. Hartmann, and S. R. Paludan.** 2006. Double-stranded RNA is produced by positive-strand RNA viruses and DNA viruses but not in detectable amounts by negative-strand RNA viruses. *J Virol* **80**:5059-5064.
281. **Weir, J. P.** 1998. Genomic organization and evolution of the human herpesviruses. *Virus Genes* **16**:85-93.
282. **Werling, D., and T. W. Jungi.** 2003. TOLL-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Vet Immunol Immunopathol* **91**:1-12.
283. **Wertz, I. E., K. M. O'Rourke, H. Zhou, M. Eby, L. Aravind, S. Seshagiri, P. Wu, C. Wiesmann, R. Baker, D. L. Boone, A. Ma, E. V. Koonin, and V. M. Dixit.** 2004. De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. *Nature* **430**:694-9.
284. **Wills, M. R., O. Ashiru, M. B. Reeves, G. Okecha, J. Trowsdale, P. Tomasec, G. W. Wilkinson, J. Sinclair, and J. G. Sissons.** 2005. Human cytomegalovirus encodes an MHC class I-like molecule (UL142) that functions to inhibit NK cell lysis. *J Immunol* **175**:7457-65.

285. **Wolf, D. G., C. T. Courcelle, M. N. Prichard, and E. S. Mocarski.** 2001. Distinct and separate roles for herpesvirus-conserved UL97 kinase in cytomegalovirus DNA synthesis and encapsidation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:1895-900.
286. **Wong, G. H., and D. V. Goeddel.** 1986. Tumour necrosis factors alpha and beta inhibit virus replication and synergize with interferons. *Nature* **323**:819-22.
287. **Wu, J., and R. J. Kaufman.** 2006. From acute ER stress to physiological roles of the Unfolded Protein Response. *Cell Death Differ* **13**:374-84.
288. **Xu, C., B. Bailly-Maitre, and J. C. Reed.** 2005. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest* **115**:2656-64.
289. **Xu, L. G., Y. Y. Wang, K. J. Han, L. Y. Li, Z. Zhai, and H. B. Shu.** 2005. VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Mol Cell* **19**:727-40.
290. **Xu, Y., S. Huang, Z. G. Liu, and J. Han.** 2006. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 signaling to mitochondria in necrotic cell death requires RIP1/TRAF2-mediated JNK1 activation. *J Biol Chem* **281**:8788-95.
291. **Yamamoto, M., S. Sato, K. Mori, K. Hoshino, O. Takeuchi, K. Takeda, and S. Akira.** 2002. Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* **169**:6668-72.
292. **Yang, J., Y. Lin, Z. Guo, J. Cheng, J. Huang, L. Deng, W. Liao, Z. Chen, Z. Liu, and B. Su.** 2001. The essential role of MEKK3 in TNF-induced NF-kappaB activation. *Nat Immunol* **2**:620-4.
293. **Yoneyama, M., and T. Fujita.** 2007. Function of RIG-I-like receptors in antiviral innate immunity. *J Biol Chem* **282**:15315-8.
294. **Yu, L., A. Alva, H. Su, P. Dutt, E. Freundt, S. Welsh, E. H. Baehrecke, and M. J. Lenardo.** 2004. Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science* **304**:1500-2.
295. **Yu, L., F. Wan, S. Dutta, S. Welsh, Z. Liu, E. Freundt, E. H. Baehrecke, and M. Lenardo.** 2006. Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:4952-7.
296. **Zheng, L., N. Bidere, D. Staudt, A. Cubre, J. Orenstein, F. K. Chan, and M. Lenardo.** 2006. Competitive control of independent programs of tumor necrosis factor receptor-induced cell death by TRADD and RIP1. *Mol Cell Biol* **26**:3505-13.
297. **Zhivotovsky, B., and S. Orrenius.** 2005. Caspase-2 function in response to DNA damage. *Biochem Biophys Res Commun* **331**:859-67.
298. **Zimmermann, A., M. Trilling, M. Wagner, M. Wilborn, I. Bubic, S. Jonjic, U. Koszinowski, and H. Hengel.** 2005. A cytomegaloviral protein reveals a dual role for STAT2 in IFN- γ signaling and antiviral responses. *J Exp Med* **201**:1543-1553.

Abkürzungsverzeichnis

α -	Anti	CMV	Cytomegalovirus
Ω	Ohm	cmvIL-10	HCMV IL-10-Homolog
β 2.7	2.7-kb RNA-Transkript (HCMV)	CPE	Cytopathischer Effekt
μ F	Mikrofarad	CpG DNA	deoxycytidylate-phosphate- deoxyguanylate (CpG)-DNA
μ g	Mikrogramm	CrmA	Kuhpocken "cytokine response modifier A"
μ l	Mikroliter	C-terminal	carboxyterminal
2L	Genprodukt des Tanapoxvirus	DAI	DNA-dependent activator of IRFs
3C	Hepatitis-A-Virus-Protease	DAMPs	Danger-Associated Molecular Patterns
A20	TNFAIP3 (tumor necrosis factor alpha-induced protein 3)	Daxx	death-associated protein 6
A238L	Protein des Afrikanischen Schweinepest-Virus	DD	Todesdomäne
A46R	Vaccinia-Virus-Protein	DED	Todeseffektordomänen
A52R	Vaccinia-Virus-Protein	DExD/H Box	RNA-Helikase-Domäne
ActD	Actinomycin D	DISC	death inducing signalling complex
AD169	HCMV Labor-Stamm	DKO	Doppel-Knockout
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome	DMEM	Dulbecco's modified Eagle- Medium
AK	Antikörper	DMSO	Dimethylsulphoxid
Akt	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	DNA	Deoxyribonukleinsäure
AP-1	Activating protein-1	dNTP	Desoxyribonukleosid- triphosphat
Apaf-1	Apoptotic Protease activating factor 1	DR4 und 5	Todesrezeptor 4 und 5 (TRAIL-Rezeptoren)
AS	Aminosäuren	dsDNA	doppelsträngige DNA
ASFV	Afrikanisches Schweinepest- Virus	dsRNA	doppelsträngige RNA
ASK1	apoptosis signal regulating kinase	DTT	Dithiothreitol
Atg7	autophagy-related 7	E	delayed-early Gene (β)
ATP	Adenosintriphosphat	E. coli	Escherichia coli
BAC	bacterial artificial chromosome	E3	Ubiquitinligase
Bak	BCL2-antagonist/killer 1	EBV	Epstein-Barr-Virus
Bax	Bcl2-associated X protein	ECL	Enhanced Chemilumineszenz
Bcl2	B-cell CLL/lymphoma 2	EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
BclXL	=bcl2l1 (BCL2-like 1)	EGFP	„Enhanced green fluorescent protein“
Beclin-1	=BECN1 (beclin 1, autophagy related)	eIF2 α	eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor 2 α
BH1 bis 4	Bcl2-Homologie-Domänen 1 bis 4	ER	Endoplasmatisches Retikulum
Bid, tBid	BH3 interacting domain death agonist, trunkeerte Version	ERGIC	Endoplasmatisches-Retikulum- Golgi-Intermediäres- Kompartiment
bp	Basenpaare	ERK	extracellular signal regulated kinase (ERK1 und ERK2)
BPB	Bromphenolblau	EV	Ebola-Virus
BRH1	β -Herpesvirus R1-like protein homology 1	FACS	„fluorescence activated cell sorter“
BSA	Rinderserum Albumin	FADD	Fas-associated death domain protein
BZLF1	Epstein-Barr-Virus-Protein	Fas	TNF receptor superfamily member 6 (Apo1, CD95)
CARD	Caspase- Rekrutierungsdomäne	FasL	TNF receptor superfamily member 6 Ligand (Apo1L, CD95L)
Caspase	„cysteiny-l-aspartate specific protease“	FCS	Fötale Kälberserum
CD8 ⁺ -T-Zellen	Zytotoxische T-Zellen	FIX	HCMV klinischer Stamm
cDNA	complementary DNA		
cFLIP	cellular FLICE (=Caspase-8) inhibitory protein		
CHX	Cycloheximid		
c-IAP	cellular inhibitor of apoptosis		

Anhang

FLIP _L	FLICE-inhibitory protein lange Form	kbp	Kilobasenpaare
FLP	Rekombinationssystem aus Hefe	kDa	Kilodalton
FRT	Rekombinase Target	Ko-IP	Koimmunpräzipitation
g	Konstante der Schwerebeschleunigung (9,81 m s ⁻²)	KSHV	Kaposi-Sarkoma-assoziiertes-Herpesvirus
GA	Geldanamycin	L	late Gene (γ)
gB	Glykoprotein B	LMP1	EBV Oncoprotein (latent membrane protein 1)
GFP	green fluorescent protein	LPS	Lipopolysaccharid
gH:gL	Glykoproteine H und L	LTR	long terminal repeat
gM:gN	Glykoproteine M und N	Ly49H	aktivierender Rezeptor auf NK-Zellen
gpUL18	Glykoprotein UL18 (MHC I Homolog)	M	Molar
h	Stunde	m	murine
HA	Hämagglutinin	m142	MCMV-Protein
HBS	Hepes buffered saline	m143	MCMV-Protein
HCMV	humanes Cytomegalovirus	m144	MCMV-Protein
HCV	Hepatitis-C-Virus	m157	MCMV-Protein
HHV 1 bis 8	Humanes Herpesvirus 1 bis 8	M27	MCMV-Protein
HI-Virus	Humanes-Immundefizienz-Virus	M32	MCMV-Protein
HRP	Meerrettich-Peroxidase	M36	MCMV-Protein
HSP90	Hitzeschockprotein 90	m38.5	MCMV-Protein
HSPs	Hitze-Schock-Proteine	m41	MCMV-Protein
HSV 1 und 2	Herpes-simplex-Virus 1 und 2	M45	MCMV-Protein
hu	human	MAP3K	MAP-Kinase Kinase Kinasen
IκB	Inhibitor von NF-κB	MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
IκBα	Inhibitor von NF-κB α	MC159	Protein des Molluscum-Contagiosum-Virus
IAPs	Inhibitor of apoptosis proteins	MC160	Protein des Molluscum-Contagiosum-Virus
ICP0	HSV 1-Protein (infected cell protein 0)	MCMV	Murines Cytomegalovirus
ICP10	HSV 2-Protein (infected cell protein 10)	MCMVwt	Murines Cytomegalovirus Wildtyp (mit GFP)
IE	immediate-early Gene (α)	MCMV WT	Murines Cytomegalovirus Wildtyp (ohne GFP)
IE1-72kDa	HCMV immediate-early 1-Protein 72-kDa	MCV	Molluscum-Contagiosum-Virus
IFN-α, -β, -γ	Interferon-α, -β, -γ	Mda5	Melanoma differentiation-associated gene 5
IFNAR	Typ-1-Interferon-Rezeptor	MEK	mitogen-activated protein kinase kinase
IgG	Immunglobulin G	MEKK	mitogen-activated protein kinase kinase kinase
IKKα, β, γ, ε	IκB Kinase (α, β, γ, ε)	MHCI	Haupthistokompatibilitätskomplex I
IL	Interleukin	MKK	=MEK (mitogen-activated protein kinase kinase)
IP	Immunpräzipitation	MLK	mixed lineage protein kinase
IPS-1	interferon-β promotor stimulator 1 (=Cardif, MAVS oder VISA)	mM	millimolar
IR, IR _S , IR _L	Interne Wiederholungssequenz (kurz, lang)	MOI	„multiplicity of infection“
IRAK	IL-1R-associated kinase	mRFP	monomeric red fluorescent protein
IRF	Interferon regulatory factor	mRNA	„messenger RNA“
IRS1	HCMV-Protein (internal repeat short 1)	MSCV	Murine Stem Cell Virus
ISGs	Interferon-stimulierte Gene	MTT	(3-(4,5-Dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid)
ISRE	interferon stimulated response element	Mx	myxovirus (influenza virus) resistance
JAK-1	Janus kinase-1	MyD88	myeloid differentiation primary response protein 88
JNK	c-Jun N-terminale Kinase	N1L	Vaccinia-Virus-Protein
K	Lysin		
kan	Kanamycin		
kb	Kilobasen		

Anhang

ND10	nuclear domain 10	RIP3	RIPK3 (receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 3)
NEMO	NFkappaB essential modulator (=IKK γ)	RIPA	radio immunoprecipitation. buffer
NF- κ B	Nuclear factor κ B	R-M45	M45-Revertante
NFDM	non fat dry milk	RNA	Ribonukleinsäure
NK-Zellen	natürliche Killer-Zellen	RNaseL	ribonuclease L (2',5'-oligoadenylate synthetase-dependent)
nm	Nanometer	RNR	Ribonukleotidreduktase
nM	nanomolar	ROS	reaktiven
NOXA	PMAIP1 (phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1)	rpm	Sauerstoffintermediaten
NP40	Nonidet P40	RPMI	Umdrehungen pro Minute
NS1	Influenzavirus-Protein	RT	Zellkulturmedium
NS3/4A	Hepatitis-C-Virus-Protease	SCID-Mäuse	Raumtemperatur
NS5A	Hepatitis-C-Virus-Protein	SDS	Severe Combined Immunodeficiency Disorder
NS5B	Hepatitis-C-Virus-Protein	siRNA	Natriumlaurylsulfat
N-terminal	Aminoterminal	SODD	small interfering RNA
OAS	Oligoadenylatsynthetase	ssRNA	Silencer of Death domain
OD	optische Dichte	STAT	einzelsträngige RNA
ORF	Offener Leserahmen	T16	Signal Transducers and Activators of Transcription
ori _{Lyt}	Lytischer Replikationsursprung	TAB	16 fache Triangulationszahl (Kapsidsymmetrie)
P/S	Penicillin, Streptomycin	TAE	TAK1-binding protein
p38	mitogen-activated protein kinase 14	TAK1	Tris-Acetat-EDTA Puffer
p53	TP53 (tumor protein p53)	TB40/E	TGF-beta activated kinase 1
PAA	phosphono acetic acid	TBE	HCMV endothelzelltroper Stamm
PAMPs	Pathogen associated molecular pattern	TBK1	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
PARP	poly(ADP-ribose) polymerase	TBS	TANK-binding kinase 1
PAS	Protein-A-Sepharose	TCID ₅₀	Tris-Buffered Saline
PBS	„Phosphate Buffered Saline“	TE	Median tissue culture infective dose
PCR	Polymerasekettenreaktion	TEMED	Tris-EDTA Puffer
PGS	Protein-G-Sepharose	TEV	Tetramethylethylendiamin
PI3-K	Phosphoinositid-3-Kinase	TIR	tobacco etch virus
PIDD	p53 inducible death domain containing protein	TIRAP	Toll/IL-1 Rezeptor Domäne
PK	Proteinkinase	TIRAP	toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein
PKR	dsRNA-regulierte Proteinkinase= ProteinkinaseR	TLR	TIR domain-containing adapter protein
PLAD	preligand assembly domain	T-Lymphozyten	Toll-like receptor
poly(I:C)	poly inosinic polycytidylic acid (künstliches dsRNA-Analog)	TNF- α	Thymus-abhängig Lymphozyten
pp65	Tegumentprotein	TNFR1	Tumornekrosefaktor- α
pp71	HCMV-Protein	TNFR2	TNF-Rezeptor 1
PGKp	Phosphoglyceratkinase-Promotor	TR, TR _S , TR _L	TNF-Rezeptor
PPP	Proteinprobenpuffer	TRADD	Terminale Wiederholungssequenz (kurz, lang)
PRR	Pattern Recognition Receptor	TRAF	TNF receptor associated death domain protein
PUMA	BBC3 (BCL2 binding component 3) (P53 upregulated modulator of apoptosis)	TRAIL	TNF Receptor Associated Factor
R1	Ribonukleotidreduktase große Untereinheit	TRAM	TNF-related apoptosis inducing ligand (Apo2L)
R2	Ribonukleotidreduktase kleine Untereinheit		TRIF-related adapter molecule (=TICAM2)
RHIM	RIP-homotypic interaction motif		
RIG-I	Retinoic acid inducible gene-I		
RIP1	RIPK1 (receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1)		

Anhang

TRIF	TIR domain-containing adapter inducing IFN β (=TICAM1)	vFLIPs	viralen Flice (Caspase-8) inhibitory proteins
Tris	Tris-hydroxymethylaminomethan	vICA	viraler Inhibitor der Caspase Aktivierung
TRS1	HCMV Protein (terminal repeat short 1)	vMIA	viraler mitochondrialer Apoptoseinhibitor
Tyk2	Januskinasen	VP35	Ebola-Virus-Protein
T-Zellen	= T-Lymphozyten	V-Protein	Paramyxovirus
U	Enzymeinheit	VV	Vaccinia-Virus
U _L	Unique-Region, lang	VZV	Varizella-zoster-Virus
UL142	HCMV Protein (MHCII Homolog)	WB	Western Blot
UL32	HCMV Protein	WNV	West-Nil-Virus
UL36	HCMV Protein	WNV-E	West-Nil-Virus Hüllprotein
UL37x1	HCMV Protein	W-Protein	Nipah-Virus-Protein
UL38	HCMV Protein	WT	Wildtyp
UL45	HCMV Protein	XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis
U _S	Unique-Region, kurz	z.B.	zum Beispiel
UV	Ultraviolett	zeo	Zeocin
V	Volt	Z-IETDfmk	Caspase-8-Inhibitor
		Z-VADfmk	PAN-Caspaseinhibitor
		Δ	Delta (Deletion)
		μ	Mikro

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Genomaufbau und schematische Darstellung der Virionen	9
Abbildung 2: Abwehr einer CMV-Infektion durch die angeborene Immunität	11
Abbildung 3: Toll-like Rezeptoren in der angeborenen Immunität	14
Abbildung 4: NF- κ B-Aktivierung durch verschiedene Stimuli	23
Abbildung 5: Virale Evasion der angeborenen Immunität	34
Abbildung 6: Immunevasion bei Cytomegaloviren	36
Abbildung 7: Aufbau der viralen Ribonukleotidreduktase R1 Homologe	39
Abbildung 8: Schematische Darstellung der hergestellten rekombinanten MCMVs	73
Abbildung 9: Schematische Darstellung der Konstruktion der Substitutionsmutanten	74
Abbildung 10: EcoRI-Restriktionsanalyse der BAC-Genome der M45-Revertante sowie der Substitutionsmutanten im Vergleich zu Δ M45 und dem MCMVwt	75
Abbildung 11: Expression der HA-getaggten Proteine der rekombinanten MCMVs in infizierten 10.1 Zellen	76
Abbildung 12: Wachstumsanalyse der M45-Revertante und der Substitutionsmutanten im Vergleich zu MCMVwt und Δ M45-Deletionsmutante auf 10.1 Fibroblasten und SVEC4-10 Endothelzellen	76
Abbildung 13: Ausbreitung der rekombinanten Viren in SVEC4-10 Endothelzellen	77
Abbildung 14: Abhängigkeit des Δ M45-induzierten Zelltodes von viraler oder zellulärer Transkription, Translation und viraler Replikation	79
Abbildung 15: Herstellung der MCMV M32-GFP-Mutanten mit und ohne funktionelles M45	80
Abbildung 16: Mikroskopische Analyse des Eintrittsverhaltens der M32-GFP-Mutanten mit und ohne M45	81
Abbildung 17: Zeitpunkt der Zelltodinduktion bei verschiedenen M45-Mutanten in SVEC4-10 und 10.1 Zellen	82
Abbildung 18: M45 schützt vor TNF- α -induziertem Zelltod	83
Abbildung 19: Inhibition des Fas-Rezeptor-induzierten Zelltodes durch M45	84
Abbildung 20: Protektion vor TNF- α -induziertem Zelltod durch M45 und M36	85
Abbildung 21: Caspase-Abhängigkeit des TNF- α -induzierten Zelltodes bei Δ M45- und Δ M36-infizierten Zellen	86
Abbildung 22: Prinzip der Affinitätsaufreinigung von M45 zur Identifikation von Interaktionspartnern ..	87
Abbildung 23: Überprüfung der Abtrennbarkeit des TEV-HA-Tags von zwei rekombinanten Viren	88
Abbildung 24: Silbergele der α -HA-affinitätsaufgereinigten Proben	89
Abbildung 25: RIP1 als Teil des TNF-Rezeptor 1 Signalkomplexes	90
Abbildung 26: Koimmunpräzipitation von RIP1 und M45 aus infizierten Zellen	91
Abbildung 27: Koimmunpräzipitation von RIP1 mit M45 aus transfizierten Zellen	92
Abbildung 28: Koimmunpräzipitation von RIP1 mit M45-HA aus infizierten Knockout-Zellen	92
Abbildung 29: Die zentrale Rolle von RIP1 in verschiedenen Signalwegen	93
Abbildung 30: Inhibition der I κ B α -Degradierung durch M45 in infizierten Zellen	94
Abbildung 31: M45 inhibiert die TNF- α -induzierte I κ B α -Degradierung in transduzierten Zellen	95
Abbildung 32: Inhibition der TNF- α -induzierten NF- κ B-Aktivierung durch M45	96
Abbildung 33: M45 inhibiert TNF- α -induzierten Caspase-unabhängigen Zelltod	97
Abbildung 34: M45 verhindert die Aktivierung der p38 MAP-Kinase	99
Abbildung 35: M45 blockiert die TLR3-induzierte Aktivierung von NF- κ B	100
Abbildung 36: Der C-terminale Teil des M45 ist essentiell für die Bindung an RIP1 und für die Inhibition der NF- κ B-Aktivierung	101
Abbildung 37: Die beiden Sequenzhomologe des M45 zeigen nicht die gleiche Funktion	102
Abbildung 38: HCMV AD169 und die UL45-Deletionsmutante inhibieren die TNF- α -vermittelte I κ B α -Degradierung	103
Abbildung 39: Reduzierte RIP1-Expression in MCMVwt-infizierten Zellen	104
Abbildung 40: RIP1 wird durch M45 in die unlösliche Fraktion verlagert	105
Abbildung 41: Die Interaktion von RIP1 mit HSP90 wird nicht durch M45 verhindert	106
Abbildung 42: M45 inhibiert die Ubiquitinierung von RIP1 und blockiert damit die NF- κ B-Aktivierung durch RIP1-Überexpression	107
Abbildung 43: Immunevasion bei Cytomegaloviren	114
Abbildung 44: Inhibition der TNFR1- und TLR3-Signaltransduktionswege durch virale Proteine	130
Tabelle 1: Unterfamilien der Herpesviren und ihre Einteilungsmerkmale	8
Tabelle 2: Effektor- und Initiatorcaspasen und ihre Funktionen	29

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater PD Dr. Wolfram Brune für die Möglichkeit bedanken, dieses interessante Projekt zu bearbeiten und dafür dass er mich dabei zu jeder Zeit tatkräftig unterstützt hat. Seine Betreuung, sein Interesse an meinen Ergebnissen und die gemeinsam entwickelten Strategien haben diese Doktorarbeit erst möglich gemacht.

Besonders herzlich danke ich Herrn Prof. Dr. Drs. h.c. Jörg Hacker, dem Vertreter der biologischen Fakultät, für sein Interesse am Fortschritt der Arbeit und seinen Einsatz als Erstgutachter.

Ich möchte mich auch bei Conny Hasselberg-Christoph bedanken, die mir in der stressigen Schlussphase der Arbeit eine sehr große Hilfe im Labor war.

Bei meinen Kollegen möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit, intensive Diskussionen, die Entwicklung neuer Ideen, die Unterstützung bei technischen Problemen und vor allen für ihre Freundschaft bedanken. Besonderer Dank geht hierbei an Maren, die immer besonderes Interesse an meiner Arbeit gezeigt hat und für unglaublich gute Motivation gesorgt hat.

Mein außerordentlicher Dank gilt auch unseren Kooperationspartnern Prof. Dr. Albert Sickmann und Christiane Winkler für die massenspektrometrische Analyse der Interaktionspartner, deren Ergebnisse den entscheidenden Anstoß zur Aufklärung dieses Projekts gegeben haben.

Bei Herrn Prof. David Lembo möchte ich mich herzlich für die Bereitstellung des spezifischen M45-Antikörpers bedanken.

Meiner Familie danke ich sehr für ihre Unterstützung, die sie mir gegeben haben, wenn ich diese brauchte. Meiner Mutter danke ich besonders für die ausdauernde Fehlerkorrektur.

Und natürlich möchte ich Ralf danken, der mir immer mit vollem Einsatz zur Seite gestanden hat und mir oft geholfen hat, Dinge aus einem anderen Blickwinkel zu betrachten.

Erklärung

Erklärung gemäß §4 Abs. 3 der Promotionsordnung:

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Dissertation „Inhibition des programmierten Zelltodes und proinflammatorischer Signale durch das Cytomegalovirus-Protein M45“ selbständig angefertigt und keine anderen als die in der Arbeit aufgeführten Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Zudem erkläre ich, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe vorher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.