



**Einfluss von Interferon auf das Infektionsverhalten von Herpes simplex  
Virus 1 und seiner DUB - Mutante C65A in der Zellkultur**

**The influence of interferon on infection of Herpes simplex Virus 1 and its  
DUB – mutant C65A in cell culture**

Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades

der Graduate School of Life Sciences,

Julius-Maximilians-Universität Würzburg,

Sektion Infektion und Immunität

Vorgelegt von

**Irmgard Katharina Stark**

aus

**Hutthurm**

Würzburg, 2022

**Eingereicht am:** .....

Bürostempel

**Mitglieder des Promotionskomitees:**

**Vorsitzende/r:** .....

**1. Betreuer:** .....

**2. Betreuer:** .....

**3. Betreuer:** .....

**4. Betreuer:** .....

**Tag des Promotionskolloquiums:** .....

**Doktorurkunden ausgehändigt am:** .....

Meinen Freunden und meiner Familie gewidmet.

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	3
1. Einleitung.....	5
1.1. Einführung .....	5
1.2. Geschichtlicher Hintergrund des Herpes Simplex Virus type 1 (HSV-1) und Taxonomie des Herpes Virus.....	7
1.3. Aufbau des Herpesvirus und Ablauf einer Herpesinfektion auf Zellebene .....	10
1.4. Durch HSV-1 und HSV-2 verursachte Erkrankungen.....	15
1.5. Beschreibung des Tegumentproteins pUL36 .....	17
1.6. Wirkungsweise und Funktionen von Protein-Ubiquitinierung .....	20
1.7. Die Rolle der HSV-1 DUB auf pUL36 in der Infektion .....	22
1.8. Einfluss von HSV-1 auf die Zelle, Zellabwehrmechanismen und Interferon als antiviral wirksame Substanz.....	23
1.9. Bereits vorliegende Daten und Ziel der Arbeit.....	29
2. Material und Methoden .....	32
2.1. Verwendete Zelllinien und Materialien zur Zellkultivierung .....	32
2.2. Auftauen von Zellen .....	34
2.3. Aufteilen von Zellen auf neue Zellkulturflaschen.....	34
2.4. Beschichten der Platten mit Kollagen .....	34
2.5. Aussähen der Zellen auf Platten.....	35
2.6. Behandlung der Zellen mit Interferon.....	35
2.7. Verwendete Materialien für die Infektion.....	35
2.9. Experimente zur Darstellung des Phänotyps der DUB-Mutante C65A .....	40
2.9.1. Plaque-Assays zur Darstellung des Phänotyps der DUB- Mutante.....	40
2.9.2. Entwicklung eines 96-well Assay zur Darstellung des Phänotyps von der DUB Mutante C65A nach Interferonabnahme .....	45
2.10 Statistische Auswertung .....	48
3. Ergebnisse .....	49
3.1. Interferons $\alpha$ 2a Wirkung bei Abnahme direkt nach Infektion .....	49
3.2 Interferon $\alpha$ 2a Wirkung bei Abnahme 3 Tage nach Infektion.....	52
3.3. Ergebnis bei Vorbehandlung der Zellen mit Interferon ohne erneute Zugabe während oder nach der Infektion.....	59
3.4. Ergebnisse bei Einsatz eines anderen Virenstammes .....	60
3.5. Entwicklung eines Reaktivierungs-Test-Systems .....	61

3.6. Ergebnisse des Plaque-Assays mit Vorbehandlung mit Interferon vor Infektion bei Verwendung von U-2 OS Zellen statt Verozellen.....	64
4. Diskussion.....	66
4.1. Diskussion der eingesetzten Methoden.....	66
4.2. Diskussion der erzielten Ergebnisse.....	68
5. Zusammenfassung.....	77
6. Literaturverzeichnis.....	80
Appendix.....	92
I Abbildungsverzeichnis.....	92
II Tabellenverzeichnis.....	96
III Softwareverzeichnis.....	97
IV Danksagung.....	3
V Lebenslauf.....	3

# 1. Einleitung

## 1.1. Einführung

Befragt man medizinische Laien was sie mit dem Stichwort „Virus“ assoziieren, bekommt man meist das negative Gesicht dieser komplexen biologischen Strukturen, die nicht eindeutig den Lebewesen noch der reinen Materie zugeordnet werden können (Condit, 2013), geschildert: Computerviren, Zombieviren aus Horrorfilmen oder AIDS, Herpesbläschen, Grippe, Pandemien, Krankheitserreger.

Tatsächlich sind Viren Krankheitserreger; so sterben beispielsweise jährlich 770 000 Menschen an einer Infektion durch das humane Immundefizienz Virus (HIV) beziehungsweise der damit einhergehenden Folgeerkrankungen (UNAIDS, 2018).

Die Infektionsabläufe verschiedener Viruserkrankungen sind unterschiedlich. Nachdem das Virus als obligat intrazellulärer Parasit die Zelle infiziert hat, unterscheidet man lytische und latente Infektionen. Bei lytischen Infektionen kommt es durch das Freisetzen der Viren zur Lyse der Zelle. Bei latenten Infektionen wird die virale DNA erhalten und bildet nach Stimulation durch bestimmte Faktoren Viren. Sie geht damit in den lytischen Infektionsablauf über. Dies wird als „Reaktivierung“ bezeichnet. Ein Mischbild aus lytischer und latenter Infektion, bei der das Virus zwischen beiden Phasen hin und her wechselt, ohne größeren Schaden an der Zelle anzurichten, wird als „persistierend“ bezeichnet (Traylen et al., 2011).

Adaptationsmechanismen haben dazu geführt, dass Viren von den Bedingungen, die der Lebensraum „Mensch“ ihnen bietet, profitieren, ohne den Wirt dabei zu töten. Ein Beispiel hierfür bilden Herpesviren (Flint, 2004). Klinisch lässt sich die gute Anpassung an den Wirt beobachten, indem es erst bei Immundefizienz des Wirtes und der damit abfallenden Kontrolle über die Infektion zu einem symptomatischen Krankheitsbild kommt, also zum Wechsel zwischen latenter und lytischer Infektion. Ein Beispiel hierfür ist die CMV Enterokolitis, die beispielsweise bei onkologischen Patienten, welche eine chemotherapeutische Behandlung und damit eine Immunsuppression erfahren, beobachtet werden kann (Kaufman et al., 1999). Auch stellt HSV-2 bei einer Infektion mit

humanem Papillomavirus ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Cervixkarzinoms dar (Smith et al., 2002) und kann somit ein Cofaktor in der Entwicklung von Karzinomen sein.

Herpesviren sind jedoch nicht nur als Krankheitserreger für die Forschung interessant, sondern erfüllen in der Wissenschaft vielfältige Funktionen: Sie werden unter anderem gentechnisch verändert gegen Krebs eingesetzt (Roizman, 2013), wie beispielsweise als „*Talimogen laherparepvec*“ gegen das maligne Melanom (Harrington et al., 2015). Obwohl sie zu den Viren gehören, die am besten von der modernen Forschung verstanden werden, bleibt die Funktion vieler viraler Proteine unbekannt (Roizman, 2013). Eines davon, dessen Funktion im infektiologischen Kontext nicht vollständig verstanden ist, ist die Deubiquitinasefunktion auf dem Proteinabschnitt des viralen Proteins 1-2 (pUL36) (McNabb et Courtney, 1992) von der diese Arbeit handelt.

## 1.2. Geschichtlicher Hintergrund des Herpes Simplex Virus type 1 (HSV-1) und Taxonomie des Herpes Virus

Durch Herpes Simplex Virus (HSV) verursachte Erkrankungen sind wahrscheinlich schon seit der Antike bekannt. Hippokrates bezeichnete mit dem Begriff „Herpes“ Läsionen, die scheinbar über die Haut kriechen. Der Begriff leitet sich ab aus dem griechischen ἕρπειν *herpein* „kriechen“. Bereits in sumerischen Schriftwerken aus dem 3. Jahrtausend v.Chr. und im Ebers Papyrus (1500 v.Chr.) tauchen genitale Verletzungen auf, die möglicherweise von Herpes verursacht wurden (Roizman B., 2013).

Durch die Jahrhunderte erfolgten weitere Beschreibungen von herpes-assoziierten Erkrankungen. Ein bezeichnendes Charakteristikum von Herpes-erkrankungen, die Fähigkeit zur Latenz, zur nicht sichtbaren Infektion der Zellen ohne Produktion von Viren und Reaktivierung, wurde jedoch erst 1939 von Burnett und Williams erkannt. Diese Fähigkeit zur Latenz und Reaktivierung erklärt, warum antivirale Antikörper im humanen Serum bei gleichzeitig bestehender klinischer Manifestation in der menschlichen Population vorhanden sind. Erst unter physischen Stressoren wird die Infektion durch Reaktivierung sichtbar (Burnett et Williams , 1939).



Herpesviren bilden dabei eine eigenständige Ordnung, die *Herpesvirales*. Diese werden je nach Wirt unterteilt in drei verschiedene Familien: die *Herpesviridae* befallen Säugetiere, Vögel und Reptilien, die *Alloherpesviridae* Fische und Amphibien und die *Malacoherpesviridae* Muscheln (ICTV Report 2019).

Bisher sind neun menschenpathogene Viren bekannt, ein weiteres kann, obwohl es natürlicherweise Makaken infiziert, Enzephalitiden beim Menschen auslösen (Cohen, 2010; ICTV Report 2019). bietet eine Übersicht über die Einteilung der humanem Herpesviren.

Die Herpesviridae kann man in  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ - Herpesviren unterteilen. Diese Unterteilung orientiert sich an den biologischen Eigenschaften der Viren (Pellet, 2013):

**$\alpha$ -Herpesviren** weisen eine unspezifische Wirtswahl und eine relativ schnelle Vermehrung auf. Sie sind zytolytisch und können in sensorischen Ganglien persistieren. Für die Gruppe der  $\alpha$ -Herpesviridae ist Herpes-Simplex-Virus Typ 1, HSV-1 archetypisch (Roizman, 2013). Weitere Vertreter dieser Gruppe sind Herpes-simplex Virus Typ 2 (HSV-2) sowie das Varizella Zoster Virus (VZV) (Pellet, 2013).

Im Gegensatz zu den  $\alpha$ -Herpesviren sind  **$\beta$ -Herpesviren** in ihrer Wirtswahl begrenzt und weisen eine langsame Vermehrung auf. Infizierte Zellen können sich vergrößern, (Pellet, 2013) und weisen bei Cytomegalievirus-Infektion (CMV) die typische Form der sog. „Eulenaugenzellen“ auf (Sodeik, 2016). Neben anderen Geweben können Herpesviren dieser Subfamilie in Drüsen- oder Nierenzellen latent werden. Neben CMV gehört das Humane Herpesvirus 6 A, 6 B sowie 7 (HHV-6A, HHV-6B, HHV7) in diese Gruppe (Pellet, 2013).

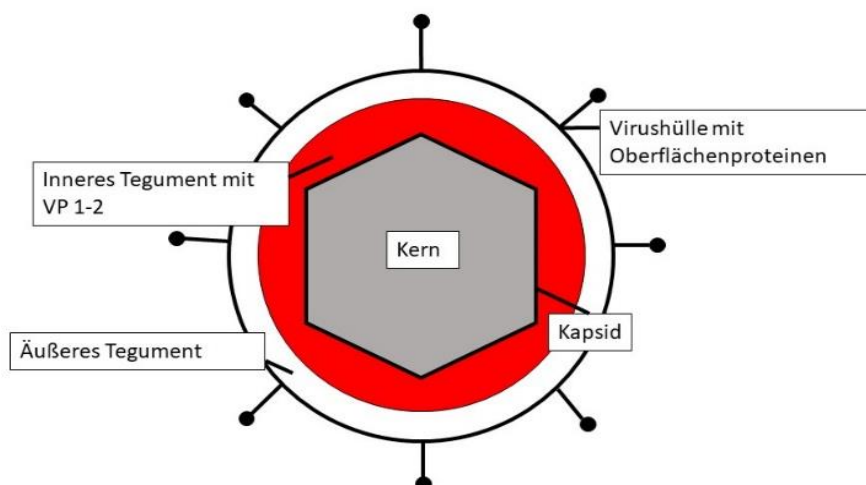
Die Wirtswahl der  **$\gamma$ -Herpesviren** ist begrenzt. In der Zellkultur können sich alle Viren dieser Subfamilie in lymphoblastoiden Zellen vermehren, wobei hierbei auch eine latente Infektion möglich ist. Bei einem Vertreter dieser Gruppe, Kaposi-Sarkom-assoziiertem Herpesvirus, KSHV geht lytische Infektion mit der Differenzierung des Epithels im Mund einher (Johnson et al., 2005). Das Epstein-Barr-Virus, Auslöser des „Pfeifferschen Drüsenkrankheit“ bzw. der „kissing disease“ gehört ebenfalls zu dieser Gruppe (Pellet, 2013).

<b>Gruppe</b>	<b>Vertreter</b>	<b>Systematische Nomenklatur</b>
<b>α Herpesviren</b>	Herpes-simplex-Virus Typ 1 (HSV-1)	HHV-1
	Herpes-simplex-Virus Typ 2 (HSV-2)	HHV-2
	Varizella-Zoster-Virus (VZV)	HHV-3
<b>β Herpesviren</b>	Zytomegalievirus (CMV)	HHV-5
	Humanes Herpesvirus 6 A und B	HHV-6 A und B
	Humanes Herpesvirus 7	HHV-7
<b>γ Herpesviren</b>	Epstein-Barr-Virus (EBV)	HHV-4
	Kaposi-Sarkom-Herpesvirus (KSHV)	HHV-8

***Tabelle 1: Übersicht über die Taxonomie der humanen Herpesviren (Sodeik, 2016)***

### 1.3. Aufbau des Herpesvirus und Ablauf einer Herpesinfektion auf Zellebene

Ein Herpesvirus ist aus unterschiedlichen Bestandteilen aufgebaut: Einem Kapsid mit ikosaedrischer Struktur das die virale DNA umhüllt und so einen Kern bildet, dem Tegument, einem proteinreichen Raum zwischen Kapsid und Hülle, und der Hülle (Roizman, 2013). Der Durchmesser eines Herpespartikels variiert dabei zwischen 155 und 240 nm (Laine et al., 2015). **Error! Reference source not found.** Abbildung 1 zeigt eine schematisch vereinfachte Darstellung (modifiziert nach Laine et al., 2015 und Roizman, 2013)



**Abbildung 1: Schematisch vereinfachte Darstellung eines Herpesviruspartikels.** Die Hülle besteht aus einer Doppelmembran mit Oberflächenproteinen, welche bei der Infektion einer Zelle mit der Zellmembran interagieren. Der Raum zwischen Kern und Hülle ist mit Proteinen angefüllt und wird als „Tegument“ bezeichnet. Im Gegensatz zu dieser vereinfachten Darstellung ist er asymmetrisch. Er kann in inneres und äußeres Tegument unterteilt werden, wobei sich diese Unterteilung daran orientiert, ob die entsprechenden Proteine mit dem Kapsid assoziiert sind oder nicht. Anschließend schließt sich das Kapsid an, welches mit viraler DNA befüllt ist. Abbildung erzeugt mit Powerpoint.

Die Hülle besteht aus einer zweischichtigen Lipidhülle, die Glykoproteine enthält. (Roizman, 2013). Das ikosaedrische Kapsid hat einen Durchmesser von 125nm (Laine et

al. , 2015) und ist aufgebaut aus 162 Kapsomeren, einschließlich 150 Hexonen, 11 Pentonen und einem Portal (Heming et al., 2011).

Im Kern befinden sich die doppelsträngige, lineare DNA sowie Polyamine (Roizman, 2013). Herpesviren weisen ein sog. „Tegument“ (aus dem lateinischen „tegumentum“, „Hülle“) auf. Damit wird der Raum zwischen Hülle und Kapsid beschrieben, welcher mit Proteinen angefüllt ist (Guo et al., 2010). Das Tegument enthält über 25 verschiedene Proteine, die unterschiedliche Funktionen während der Infektion erfüllen (Funk et al., 2019). Die Größe des Teguments liegt zwischen 15nm und 50nm, wobei beachtet werden muss, dass das Tegument das Kapsid nicht zirkulär symmetrisch umschließt. Auch die enthaltenen Proteine sind zum großen Teil nicht symmetrisch angeordnet, bis auf wenige Proteine, die mit dem Kapsid assoziiert sind (Zhou et al., 1999). Das Tegument kann unterteilt werden in inneres und äußeres Tegument. Die Proteine des inneren Teguments sind mit dem Kapsid assoziiert und werden nach Eintritt in die Zelle nicht abgeworfen, im Gegensatz zu den Proteinen des äußeren Teguments (Newcomb et Brown , 2010). Die doppelsträngige DNA ist aufgebaut aus zwei Abschnitten, einem langen Abschnitt (unique long, UL) und einem kurzen Abschnitt (unique short, US). Proteine, deren Gensequenz bspw. auf dem langen Abschnitt liegt, werden mit UL und einer Zahl abgekürzt (Szpara et al., 2014).

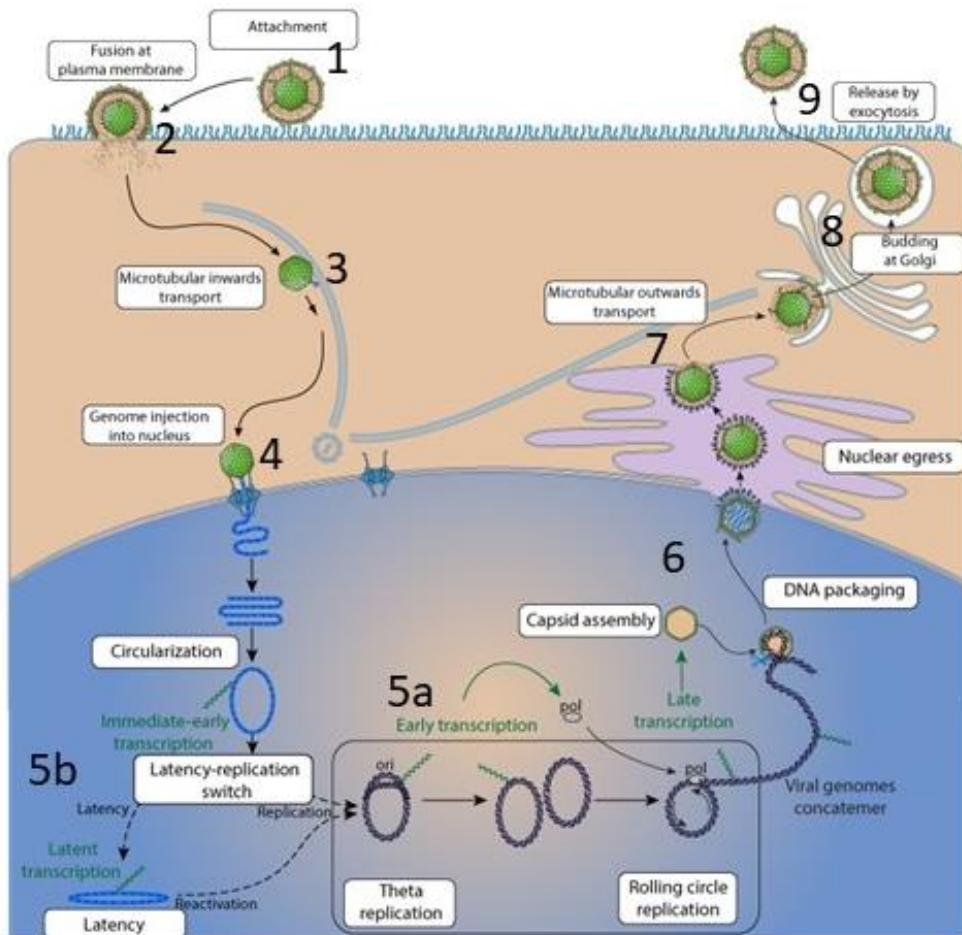
Eine Herpesinfektion beginnt auf Zellebene damit, dass das Virus zunächst an die Zellmembran bindet (siehe Abbildung 2, Punkt 1) und anschließend je nach vorliegendem Zelltyp über Endozytose oder über die Fusion mit der Plasmamembran in die Zelle eindringt (siehe Abbildung 2 Punkt 2). Wichtig ist hier in beiden Fällen die Interaktion des viralen Glykoprotein D mit dem entsprechenden Rezeptor auf der Zellmembran. Es handelt es sich hierbei um Nektine, sowie einen Proteinkomplex der als Herpesvirus Eintrittsmediator HVEM, beschrieben wurde und Heparansulfat. Nachdem diese Proteine auf vielen Zelloberflächen exprimiert werden, kann HSV viele unterschiedliche Zellen infizieren (Roizman, 2013). Im Zytoplasma gelangen die Kapside über die Proteine des inneren Teguments, welche die Fortbewegung entlang des mikrotubulären Apparates durch das Motorprotein Dynein ermöglichen, zum Kern

(siehe Abbildung 2 Punkt 3 (Sodeik, 1997)) oder es werden zelluläre Strukturen wie Aktinfilamente genutzt (Roberts et Baines, 2011). Dieser Transport über zelluläre Strukturen ist wichtig für das Virus, um effektiv zum Zellkern zu gelangen. Mittels Transport über zelleigene Strukturen kommen die ersten Kapside schon in weniger als einer Stunde am Zellkern an (Sodeik, 1997). pUL36 ist am Transport entlang des Axons und damit an der Neuroinvasion beteiligt (Dai et Zhou, 2018). Anschließend wird die virale DNA in den Kern eingeschleust und das leere Kapsid bleibt vor der nukleären Membran zurück (siehe Abbildung 2 Punkt 4). Das Virus nutzt den zelleigenen Apparat zur Produktion viraler mRNA (siehe Abbildung 2 Punkt 5a), welche im Zytoplasma zu viralen Proteinen translatiert wird. Hierbei unterteilt man die Gene je nach Zeitpunkt der Transkription in  $\alpha$ ,  $\beta$ 1 und 2 und  $\gamma$ 1 und 2 Abschnitte.  $\alpha$ -Genabschnitte werden auch als mittlere bis frühe Gene („*immediate-early*“) bezeichnet, das bedeutet, sie werden früh und ohne vorherige Proteinsynthese von viralen Proteinen abgelesen. Die  $\beta$ -Gene werden unterteilt in  $\beta$ 1 („*early-early*“) bzw.  $\beta$ 2 („*late-early*“) Abschnitte. Sie werden also nach den  $\alpha$  Genen transkribiert. Am Ende folgen die  $\gamma$ -Gene als „*late gens*“. Hierbei kann man unterscheiden in  $\gamma$ 1 („*leaky-late*“) bzw.  $\gamma$ 2 („*true-late*“) Gene. Die Produkte dieser Genabschnitte erfüllen unterschiedliche Funktionen: So aktivieren die Aminosäuresequenzen aus den  $\alpha$ -Genen die Expression der  $\beta$ -Gene, die Produkte der  $\beta$  - Gene wiederum führen die virale Replikation durch und die Produkte der  $\gamma$ -Genesequenzen den Zusammenbau der Viren. Zur Bildung von Kapsiden wird die mRNA der  $\gamma$ -Gene im Zytoplasma abgelesen. Die entsprechenden Proteine reichern sich anschließend im Nukleus als Kapside an (siehe Abbildung 2 Punkt 6). Im Nukleus wird die virale DNA eingefügt und das Kapsid damit befüllt. Die DNA-haltigen Kapside bezeichnet man als C-Kapside. B-Kapside sind Vorläufer der C-Kapside und enthalten Strukturproteine, welche sie beim Einbau der viralen DNA verlieren, sowie eine virale Protease. A-Kapside sind leere Hüllen und präsentieren vermutlich das Ende eines geschädigten Ablaufprozesses. Dieser Zusammenbau der Virionen wird als „*assembly*“ bezeichnet (Roizman, 2013). Betrachtet man die Abläufe der Umhüllung des Kapsids mit Tegumentproteinen, muss zunächst der sog. CVSC-Komplex (CVSC für Kapsid vertex-spezifische Komponente), ein Komplex aus UL17-UL25, an die Triplexe (Fan et al., 2015),

welche sich an den Pentonen/Hexonen des Virus befinden, an das Kapsid binden, damit pUL36 an den Komplex binden kann. Der CVSC-Komplex interagiert erst während der Umhüllung der DNA mit dem Kapsid, nicht vorher. Dies erklärt, warum pUL36 erst nach der Umhüllung der DNA an das Kapsid bindet. (Trus et al., 2009) pUL36 dient wiederum als Bindungspartner von pUL37 (Cardone et al., 2012). Nachdem die Zelllyse nicht sofort eintritt, müssen die Kapside durch einen bestimmten Mechanismus ihren Weg erst durch die Kernmembran, dann durch das Zytoplasma, zur Zellmembran finden. An erster Stelle steht hierbei das Verlassen des Kerns (siehe Abbildung 2 Punkt 7). Kapsid wird hierbei zuerst an der inneren Kernmembran eingehüllt, und verliert danach durch Fusion mit der Membran des endoplasmatischen Retikulums diese erste Membran. Im Zytoplasma wird das Virus neu eingehüllt („*dual envelopment pathway*“). Präziser dargestellt, besagt er, dass bei der Aussprossung („*budding*“) der reifen Nukleokapside an das Kapsid die inneren Tegumentproteine, also auch pUL36, gebunden werden (Roizman, 2013). Diese Partikel werden umhüllt und gelangen zur äußeren Nukleuswand, wo sie die erste Hülle verlieren (Nagel et al., 2008). Unter Beteiligung des Golgi-Apparates und Endosomen werden zum zweiten Mal Hüllen gebildet. Die Virenpartikel werden in einem Vesikel ausgeschleust und gelangen nach Fusion mit der Plasmamembran in den Extrazellulärraum. Der vom Virus gewählte Weg wird auch vom Zeitpunkt der Infektion bestimmt, so beschreibt Campadelli-Fiume und Roizmann, dass früh in der Infektion ein Vesikeltransport zur Zellmembran stattfindet (Campadelli-Fiume et Roizmann, 2006). Herpesviren können sich jedoch auch von Zelle zu Zelle verbreiten, was die Grundbedingung für die Durchführung von Plaque-Assays bildet bzw. *in vivo* die Verbreitung der Infektion unter Epithelzellen trotz neutralisierender Antikörper im Serum (Roizman, 2013).

Nach Primärinfektion gelangen die Herpesviren über Axone von Neuronen zum Ganglion und können dort latent persistieren. Sie können unter Stimuli reaktivieren und unter Lyse der Zelle replizieren (Pellet, 2013). Während der Latenz wird nur eine Region im Genom transkribiert und bildet das sog. Latenz-assoziierte Transkript, LAT, (Abbildung 2 Punkt 5b). Unter Stressbedingungen kann die Latenz aufgehoben werden und das Virus in einen produktiven Zyklus wechseln. Eine wichtige Rolle in der Regulation ob eine lytische

oder latente Infektion vorliegt, spielt hierbei das virale Protein ICPO („*infected cell polypeptide 0*“) (Smith et al., 2011).



**Abbildung 2: Übersicht über die Abläufe während einer Infektion:** Das Virus bindet an die Zellmembran („attachment“) und fusioniert anschließend mit dieser. Das Kapsid gelangt durch mikrotubuli-vermittelten Transport zum Kern. Dort wird das virale Genom in den Zellkern eingebracht und es erfolgt die im Text beschriebene Transkription zunächst der  $\alpha$ ,  $\beta$  und dann  $\gamma$  Gene, sofern es keine Latenz eingeht. Anschließend erfolgt der Zusammenbau des Viruspartikels und das Ausschleusen aus dem Kern. Abgebildet ist hierbei der von der Fachwelt präferierte „dual envelopment pathway“, mit einer zweizeitigen Umhüllung des Virus. Die erste Hülle des Virus verliert es wieder an der äußeren Nukleuswand. Es wird ein weiteres Mal am Golgi-apparat umhüllt und verlässt anschließend durch Exozytose die Zelle (Roizman,2013). Abbildung modifiziert und übernommen mit freundlicher Genehmigung von SIB Swiss Institute of Bioinformatics, 2018.

#### 1.4. Durch HSV-1 und HSV-2 verursachte Erkrankungen

Bei den durch das Herpes-simplex-virus verursachten Krankheitsbildern muss zwischen einer Primärinfektion und einem Rezidiv unterschieden werden (Sodeik,2016): Ein Rezidiv kann durch Stressfaktoren wie beispielweise Fieber oder Sonneneinstrahlung ausgelöst werden. Eine Primärinfektion an der Mundschleimhaut kann zur *Gingivostomatitis herpetica* führen, womit eine daraufhin folgende Entzündung von Zahnfleisch und Mundschleimhaut beschrieben wird. Bei einem Rezidiv kommt es zum *Herpes labialis*, womit eine Bläschenbildung im Lippenbereich beschrieben wird, woran 15-30% der Bevölkerung leiden. Global betrachtet sind 60-95% aller Menschen infiziert, wobei die Infektionsrate von Alter und dem sozioökonomischen Status abhängig ist (Crimi et al., 2019). Dabei gilt auch zu beachten, dass auch eine asymptomatische, aber dennoch infektiöse Reaktivierung stattfinden kann. Die Übertragung kommt durch den Kontakt mit Körperflüssigkeiten oder durch Verletzungen zustande. Auch bei Symptomlosigkeit ist eine Infektion möglich (Crimi et al., 2019). Neben dem Befall der Mundschleimhaut kann auch die Schleimhaut am Genitale befallen sein (*Herpes genitalis*; dieser Begriff beschreibt sowohl eine Primärinfektion als auch ein Rezidiv, (Sodeik, 2016)). Dies wird häufiger durch HSV-2 verursacht als durch HSV-1, wobei eine Beeinflussung durch entsprechende Sexualpraktiken naheliegend ist (Cowan et al., 2002). Zudem sind epidemiologische Unterschiede beschrieben worden, inwiefern HSV-1 oder HSV-2 genitalen Herpes auslöst, auch abhängig von sexuellen Praktiken (Lafferty, 2002).

Für den klinisch tätigen Arzt gilt zu beachten, dass der Gebrauch von Kondomen die Übertragung nur leicht einschränkt und möglicherweise auf den Einsatz von oralen Virostatika zurückgegriffen werden muss, um die Übertragungswahrscheinlichkeit zu reduzieren (Crimi et al., 2019). Infiziert das Herpesvirus ein bereits bestehendes atopisches Ekzem, kann sich das Virus auf den Hautregionen gut ausbreiten und zum lebensbedrohlichem Krankheitsbild *Eczema herpeticum* führen. Die Augen können als



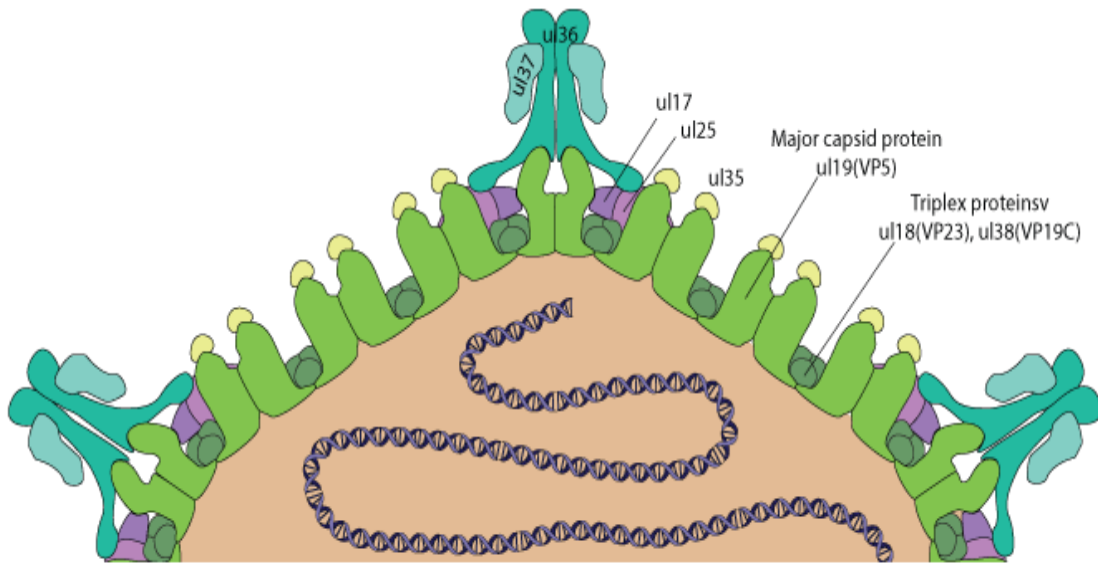
*Keratoconjunctivitis herpetica* oder *Keratitis herpetica* betroffen sein, was Blindheit verursachen kann. Ein selteneres Krankheitsbild stellt der *Herpes gladiatorum* dar, der Befall der Hand. Der martialische Name leitet sich davon ab, dass die Krankheit unter Wrestlern beschrieben wurde. Jedoch kann auch Pflege- oder ärztliches Personal durch die berufliche Tätigkeit eine Infektion an den Händen erleiden (*Herpes whitlow*, eine Infektion an den Fingern). Herpes-simplex-Viren können das Gehirn befallen und das klinische Bild einer lebensbedrohlichen Herpes-simplex-Enzephalitis oder einer viralen Meningitis hervorrufen. Bei einer Infektion von Schwangeren kann es zu Spontanaborten kommen oder zur Infektion von Neugeborenen, die bis zur Sepsis führen können. Bei Patienten mit Immunsuppression sind Beteiligungen innerer Organe und schwerere Verläufe bei Herpesinfektionen zu befürchten (Sodeik, 2016). Interessante Verbindungen zu andere Krankheitsbildern und möglicherweise neue Erklärungsmodelle stellt die Assoziation zwischen erhöhten Serumspiegeln von HSV-1 mit Aufmerksamkeitsstörungen innerhalb psychiatrischer Erkrankungen wie bipolarer Störung, Schizophrenie (Dickerson et al., 2004) oder Alzheimer Erkrankung dar, wobei die Genetik der betroffenen Person berücksichtigt werden muss (Crimi et al., 2019).

Herpes ist nicht kausal therapierbar, eine einmalige Infektion besteht lebenslang (Crimi et al., 2019). Nach Infektion werden Antikörper im Serum gegen den entsprechenden Typ gebildet. Diese Bildung von Antikörpern ermöglicht zusammen mit der hohen Infektionsrate das Durchführen von Plaque Assays mittels humanen Serums. Eine bestehende Infektion mit HSV-1 mildert möglicherweise die Symptomatik einer Infektion mit HSV-2 ab (Crimi et al., 2019). Therapiert wird eine Infektion mit Herpes symptomatisch durch Gabe von Schmerzmittel (wie bspw. Paracetamol, topischer Anwendung von Lidocain) oder Virostatika wie Acyclovir, welche v.a. bei ersten Infektionen wie einer Enzephalitis eine ausschlaggebende Rolle im Verlauf spielen können (Crimi et al. 2019). Außerdem sind sie wichtig für die Therapie von mit Herpes-assoziierten Krebserkrankungen, wie dem Glioblastom. Hier weist die Therapie mit antiviralen Medikamenten eine Verbesserung auf. In diesem Zusammenhang wurde nachgewiesen, dass das von CMV produzierte Protein Us-28 das Tumorstadium fördert (Alibek et al., 2012). Andere Therapiemöglichkeiten stellt der Gebrauch von Docosanol

dar, der als Alkohol die Lipidhülle des Virus zerstören kann oder der Einsatz transdermaler elektrischer Stimulatoren (TENS). Ernährungsmedizinische Therapieansätze oder pflanzliche Polyphenole sind weitere Optionen (Crimi et al., 2019). Unter dem Aspekt, dass auch bei Herpesviren Resistenzentwicklung gegen gängige Virostatika möglich ist (Morfin, 2003), sind diese therapeutischen Ansätze relevant (Crimi et al., 2019).

### 1.5. Beschreibung des Tegumentproteins pUL36

pUL36 (nach dem Genabschnitt UL36 oder Synonym ICP 1-2 (McNabb et Courtney, 1992) ) ist das größte Protein von Herpes simplex (Roizman, 2013). Dieser Umstand spiegelt sich bereits im Namen wider: Die ersten beiden (deshalb 1/2) Banden bei Auftrennung der Proteine Gelelektrophorese werden durch pUL36 gebildet (Heine et al., 1974). Aufgrund seiner Größe steht es in Kontakt zu den anderen Tegumentproteinen und hat damit das Potenzial als „Organisator“ für die Struktur des Teguments zu fungieren (Newcomb et Brown, 2010) Die Bezeichnung UL36 leitet sich von „unique long“ ab, dem langen Genabschnitt des Herpesvirus (Szpara et al., 2014). Das pUL36 Tegumentprotein ist unter allen Herpesviren konserviert (Schlieker et al., 2005). Abbildung 3 zeigt einen schematischen Ausschnitt von viralen Tegumentproteinen, die an das Kapsid gebunden sind zusammen mit einer elektronenmikroskopischen Darstellung. Deutlich zu sehen ist, dass pUL36 sich in der Größe von den anderen Tegumentproteinen abhebt.



**Abbildung 3: Schematische Übersicht (A) über virale Tegumentproteine:** UL36 bezeichnet den Genabschnitt zu pUL36. pUL36 bildet das größte Tegumentprotein. Mit freundlicher Genehmigung SIB Swiss Institute of Bioinformatics.

pUL36 enthält eine Deubiquitinasefunktion (Schlieker et al., 2005). Es bindet als inneres Tegumentprotein einen Proteinkomplex aus pUL17-pUL25, welcher das sog. CVSC-Komplex (CVSC für Kapsid vertex- spezifische Komponente) bildet, an das Kapsid (Fan et al., 2015). Ein Virion enthält etwa 100-150 Kopien von pUL36 auf der Oberfläche des Kapsids (Newcomb et Brown, 2010). pUL36 ist für die Infektion essentiell (Desai, 2000) und ist multifunktional. So spielt es bei der Initiation der Infektion (Roberts et al., 2009) oder, wie Versuche bei CMV zeigen, bei der Regulation der Genexpression eine Rolle (Colberg-Poley, 1992). Eine weitere Funktion ist die Einführung der DNA in den Kern (Desai, 2000). Hierzu wird es proteolytisch umgebaut, worauf es zu einer Konformationsänderung kommt, die den genannten Release erlaubt (Jovasevic et al, 2008). Es enthält ein Signal für die Lokalisation im Kern (Abaitua et Hare, 2008), das wahrscheinlich an dem Andocken des Kapsides an den Kern beteiligt ist, zumindest legen Studien an Pseudorabiesvirus dies nahe (Möhl, 2011). Im Zellkern verhindert es den Abbau von CRL (cullin- Ring- Ubiquitin ligase-) Substraten, wodurch die Replikation des Virus erleichtert wird (Gastaldello et al., 2010).

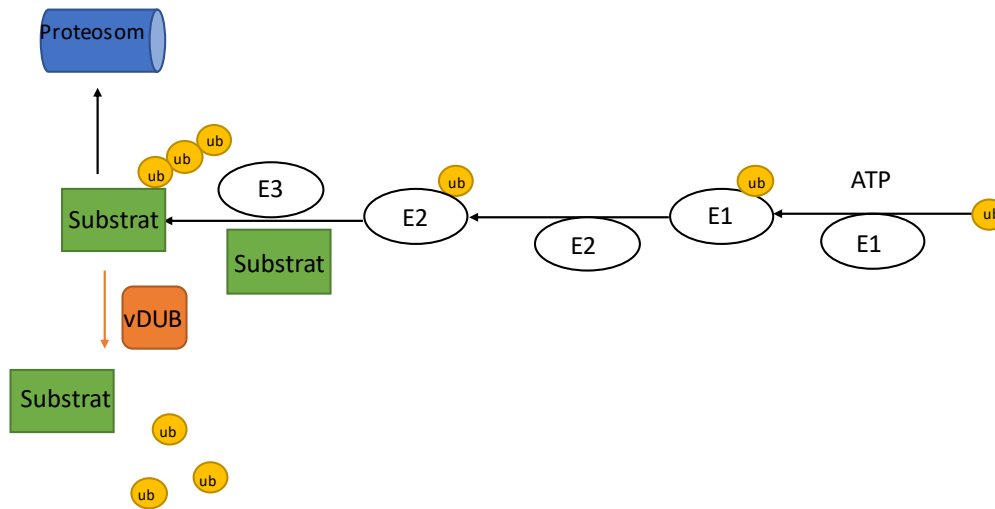
Während pUL36 bei der Infektion mit HSV beim Zusammenfügen von Tegumentproteinen und der Hülle an das Kapsid im Zytoplasma eine Rolle spielt (Roberts et al., 2009), ist es bei der Infektion mit Pseudorabiesvirus, einem Herpesvirus aus dem Tierreich, für den Austritt aus dem Kern sowie beim Transport der Kapside essentiell (Luxton et al., 2006). Außerdem spielt es zusammen mit pUL37 eine Rolle bei der zweiten Umhüllung während dem Ausschleusen aus der Zelle (Mijatov et al., 2007). Hier haben Studien gezeigt, dass Mutanten ohne UL36 oder UL37 als C-Capside ohne Hülle im Zytoplasma anreichern und nicht aus der Zelle ausgeschleust werden (Roberts et al., 2009). Das Zusammenspiel von pUL36 mit Dynein beim mikrotubuli-vermittelten Transport ist bedeutend für den Transport entlang der Axone und damit für die Neuroinvasion (Zaichick et al., 2013). Hierbei ist pUL36 ein Teil des sog. Kapsid assoziierten Tegument Komplex (CATC), welcher für am Transport entlang der Axone involviert ist (Dai et Zhou, 2018).

## 1.6. Wirkungsweise und Funktionen von Protein-Ubiquitinierung

Die für diese Arbeit untersuchte Deubiquitinasefunktion kann die Physiologie der Zelle weitreichend beeinflussen, nachdem Ubiquitinierung von Proteinen nicht nur deren Abbau über das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) dient, sondern einen wichtigen Mechanismus in der Regulierung von Abläufen in der Zelle darstellt (Wilkinson, 1997), wie beispielsweise beim Transport von Membranproteinen (Hicke et Dunn, 2003). Nicht nur bei den Mechanismen innerhalb der Zelle, sondern auch bei den Abläufen, die während einer Infektion stattfinden, spielt Ubiquitinierung bzw. Deubiquitinierung eine wichtige Rolle (Lindner, 2007). Denn Ubiquitinierung kann sowohl von dem Virus für die Infektion, als auch von der Zelle zum Schutz genutzt werden. Der Ubiquitinierungsprozess läuft in drei Schritten ab: Ubiquitin wird zunächst von einer E1 – Ligase ATP-abhängig aktiviert, und anschließend über E2 und E3 Ligasen an das jeweilige Substrat konjugiert, wobei die E3-Ligasen – abhängig von der jeweiligen E3-Ligasen-Familie – entweder erst mit E2 interagiert und dann Ubiquitin auf das Substrat überträgt, oder direkt im Zusammenspiel mit der E2-Ligase Ubiquitin auf das Zielprotein überträgt. Es existiert eine E1-Ligase, mehrere E2-Ligasen und mehrere hundert E3 Ligasen (Kwon et Ahn, 2013). Abbildung 4 zeigt eine Übersicht über das Ubiquitinierungsverfahren.

Posttranslationale Modifizierungen über diesen Mechanismus verändern einerseits die Funktionalität von viralen Proteinen, andererseits bildet es durch den Abbaumechanismus über das Proteasom einen wichtigen antiviralen Faktor. Denn die Ubiquitinierung stellt eine Markierung für den intrazellulären Abbau dar (Wilkinson, 2000) (Abb. 5). Gleichzeitig schützt sich das Virus durch Ubiquitinierung, indem antivirale Proteine wie bspw. ND 10 durch ICP0, einer viralen E3 Ligase, ubiquitiniert und dadurch degradiert werden (Gu et Roizman, 2003). Die damit einhergehenden Mechanismen sind komplex: Beispielsweise interagiert bei Herpes simplex Virus ICP0 mit der zellulären Deubiquitinase Ubiquitin-spezifischen-Protease 7, DUB7, um sich vor der

Autodegradierung zu schützen, gleichzeitig löst es dessen Degradierung aus.



**Abbildung 4: Übersicht über das Ubiquitinierungsverfahren.** Ubiquitin wird zunächst an E1 gebunden (ATP - abhängig). Anschließend wird das aktivierte Ubiquitin an die E2 Ligase gebunden. E2 bindet an E3, welches an das Substrat gebunden ist und es erfolgt die Ubiquitinierung des Substrats. (Ye et Rape, 2009) Deubiquitinasen lösen das Ubiquitin wieder vom Substrat. Ansonsten wird das Substrat über das Proteosomsystem degradiert. Abbildung erstellt mit Powerpoint.

Diese auf den ersten Blick paradoxe Funktionsweise lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass mdm2 durch die Degradierung von DUB7 abgebaut wird. Durch diesen Vorgang wiederum wird p53, ein Protein, das eine wesentliche Rolle in der Zellzykluskontrolle spielt, indirekt stabilisiert (Boutell et al., 2005).

Zelluläre Mechanismen, wie bspw. die Ubiquitinierung von viralen Kapsiden, markieren sie für den Abbau. Durch Ubiquitinierung und proteosomalen Abbau wird virale DNA nach Eindringen in die Zelle freigesetzt, zelluläre DNA-Sensoren aktiviert, wodurch Interferon ausgeschüttet wird (Horan et al., 2013). Beate Sodeik konnte zeigen, dass etwa 60% der Kapside vier Stunden nach Infektion den Nukleus erreicht haben (Sodeik, 1997). Dies lässt vermuten, dass die PAMPs etwa ein Zeitfenster von ein vier Stunden haben, um ein Eindringen des Virus in den Kern zu verhindern (Horan et al., 2013).

Deubiquitinasen (DUBs) können Ubiquitinierung aufheben und stellen somit wichtige Regulatorproteine dar und können Viren vor dem zellulären Abbau schützen. Sie stellen sogar einen Überlebensvorteil unter Viren dar (Lindner, 2007). DUBs, die eine

Cysteinprotease darstellen, können hinsichtlich ihres biochemischen Aufbaus unterteilt werden in UCHs (Ub-C-terminal-hydrolase), USPs (ubiquitin-specific-protease), sowie OTUs (ovarian tumor protease), MJP (Machado – Joseph – Protease) (Nijman et al., 2005). Möglicherweise bildet die DUB auf pUL36 auch eine eigenständige DUB- Klasse (Sulea et al., 2006).

### 1.7. Die Rolle der HSV-1 DUB auf pUL36 in der Infektion

Deubiquitinierungsvorgänge stehen im Kontext mit der viralen Immunevasion (Kumari et Kumar , 2018). PUL36 enthält eine Cysteinprotease als DUB (Kattenhorn et al., 2005). Das pUL36 Tegumentprotein ist unter allen Herpesviren konserviert (Schlieker et al., 2005) und innerhalb der pUL36-Homologe ist unter vielen Herpesviren eine Deubiquitinasefunktion beschrieben. (González, et al. 2009; Kim et al., 2009; Wang et al., 2006, Whitehurst et al., 2009) Wenn diese sich in der Primärsequenz auch unterscheiden, ist die katalytische Triade, die Cystein enthält, streng konserviert, was eine wichtige Funktion nahe legt (Schlieker et al., 2005). Diese DUB hydrolysiert Ubiquitin, aber schneidet nicht die UBI (Ubiquitin-like Proteines, ubiquitinähnliche Proteine) NEDD8, ISG15 oder SUMO-1 (Schlieker et al., 2005; Sulea et al., 2006). Um den Mechanismus des Schneideprozesses besser zu verstehen, wurde das Cystein am katalytischen Zentrum durch Alanin im Rahmen einer Klonierung ersetzt (C65A), wodurch die enzymatische Funktion nicht mehr vorhanden ist (Kattenhorn et al., 2005).

Eine bekannte Funktion der DUB ist die Hemmung der Interferon  $\beta$  Produktion (Wang et al., 2013). Die DUB von pUL36 schränkt außerdem die Interferon  $\beta$ -vermittelte Immunantwort von mit Sendai Virus infizierten Zellen ein, indem es die Dimerisierung von IRF3 (IRF3 für Interferonregulationsfaktor 3, einem Transkriptionsfaktor für antivirale Proteine (Liu, 2012)) und damit den einhergehenden Signalweg, Promotoraktivierung, Transkription sowie Produktion von Interferon  $\beta$  hemmt (Wang, et al.,2013).

Ye et al. zeigten, dass die DUB auf UL36 die NF- $\kappa$ B Aktivierung einschränkt, woraufhin

die antivirale Zellabwehr geschwächt ist. (Ye et al., 2017)

Ein weiterer Signalweg, in den pUL36 eingreift ist die zytoplasmatische Erkennung von viralen Pathogenen (Kwon et Ahn, 2013): RIG I, ein zytoplasmatischer PRR („*pattern-recognition-receptor*“), erkennt selektiv RNA. Dies führt zu ATP-abhängigen Veränderungen in RIG I, die wiederum zu einer Dimerisierung und Assoziation an MAVS, („*mitochondrial anti-viral signaling protein*“) führen. Nach der Bindung an MAVS erfolgt über weitere Signale die Aktivierung von IRFs und NF- $\kappa$ Bs, sowie TRAF3, was letztlich in der Produktion von IFN-1 mündet. PUL36 inhibiert die Produktion von Interferon  $\beta$ , indem von TRAF 3 Polyubiquitinketten abgelöst werden. Eine DUB Mutante des HSV-1 F Virenstrang, auf dem eine Punktmutation von Cystein an Punkt 40 zu Alanin zu einem Fehlen der DUB Funktion auf pUL36 führt (C40A) konnte nicht TRAF 3 deubiquitinieren, was in einer vermehrten Produktion von Interferon  $\beta$  und ISG-Proteinen mündete (Wang et al., 2013). Eine Funktion der DUB von UL36 scheint also die Antagonisierung des RIG-I Signalweges zu sein (Kwon et Ahn, 2013).

Versuche bei denen die DUB auf Marek`s disease virus, einem Herpesvirus aus dem Tierreich, durch Punktmutation deletiert worden ist, zeigten, dass das Virus anschließend ein verringertes onkogenes Potenzial aufwies (Jarosinski et al., 2007).

Die DUB blockiert zudem die Dimerisierung von Interferonrezeptoren unabhängig von seiner Deubiquitinase-funktion (Yuan et al., 2018).

Nachdem die virale DUB sich von eukaryontischer DUB unterscheidet, könnte sie auch einen Angriffspunkt bei der Etablierung neuer antiviraler Medikamente darstellen (Kattenhorn et al., 2005).

## 1.8. Einfluss von HSV-1 auf die Zelle, Zellabwehrmechanismen und Interferon als antiviral wirksame Substanz

Herpesviren beeinflussen die Zellabläufe über mehrere Mechanismen: Es inhibiert die Transkription von zelleigenen Genen und löst die Degradierung der zellulären mRNA und bestimmter Proteine aus, womit die zelluläre Abwehr behindert wird (Taddeo et al.,



2013). Es verhindert Apoptose, Autophagie und die Präsentation von Antigenen an der Zelloberfläche mit dem Ziel, der Immunabwehr zu entkommen (Jugovic et al., 1998). Wichtig für die Etablierung der viralen Infektion ist der Eingriff in die Synthese von Interferon bzw. der dadurch induzierten Proteine (Roizman, 2013). Denn Interferon ist für die antivirale Zellantwort nach Herpesinfektion entscheidend (Domke-Opitz et al., 1986).

Zellen weisen sowohl ohne Kontakt zu Viren (intrinsisch) als auch nach Kontakt zu Viren einen Abwehrmechanismus auf. Bestandteile der intrinsischen Immunität werden beständig exprimiert, aber deren Expression wird oft durch Interferon verstärkt. Wichtige Proteine der Zellimmunität sind die zytoplasmatischen sog. „*pattern recognition receptors*“ (PRRs), die Pathogene anhand von bestimmtem Oberflächenmerkmalen erkennen können (Roizman, 2013). Bei Erkennen eines Pathogens können sie den u.a. Signalwege zur Bildung von Interferon auslösen, wobei De- und Ubiquitinierungsprozesse eine wichtige Rolle bei der Regulation spielen (Kwon et Ahn, 2013).

Es existieren zytosolische Rezeptoren wie bspw. AIM-2, welche virale DNA erkennen, nachdem das Virus in die Zelle eingedrungen ist (Unterholzner et al., 2010). AIM-2 kann durch das virale Herpesprotein VP22 blockiert werden (Maruzuru, et al. 2018).

Ist die virale DNA an ihrem Ziel- dem Zellkern – angelangt, wird sie Ziel von Repressoren der Genexpression wie ND10 („*nuclear bodies*“) (Cuchet-Lourenço et al., 2011). Andere Proteine wie IFI-16 blockieren ebenfalls durch Verhinderung der Transkription, die Produktion von viralen Proteinen. Dies wird auch als Stilllegen („*silencing*“) des Genoms bezeichnet (Unterholzner et al., 2010, Orzalli et al., 2013)

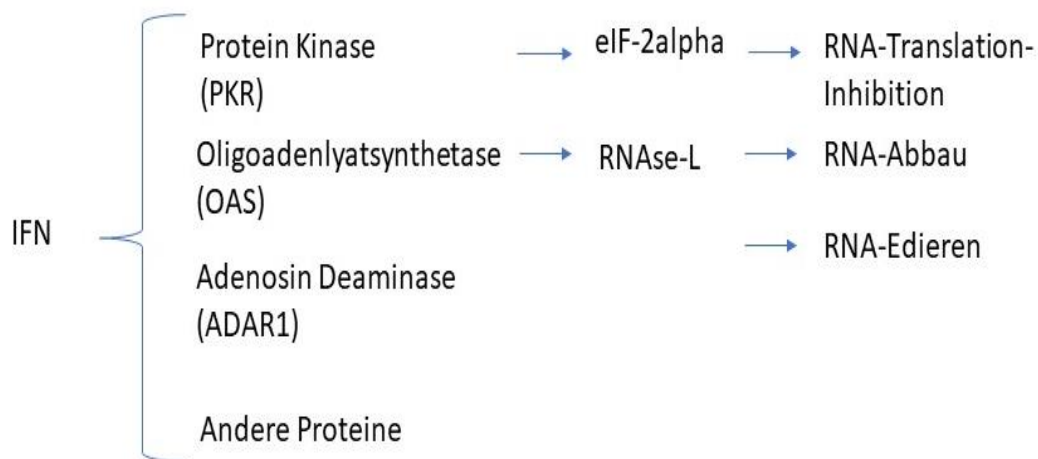
In der Zellperipherie kann eine zu starke Abwehr des Virus durch das Ausschütten von zu vielen lysosomalen Enzymen in der Zerstörung der Zelle enden oder aufgrund der Infektion wird der Apoptoseweg über die Aktivierung von PKR und damit die Autodestruktion der Zelle eingeleitet (García et al., 2006). PKR muss durch jedes Virus, welches doppelsträngige RNA synthetisiert, geblockt werden, da es über die Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$  die Transkription von viraler RNA und damit die virale

Proteinsynthese hemmt (Samuel, 2001). Dieser Abwehrmechanismus muss durch den eindringenden Virus blockiert werden. Bei Herpes fungieren hierfür die Proteine ICP34.5 und Us11 (Roizman, 2013) ICP34.5 Mutanten zeigen eine deutliche Reduktion der Replikation im Mausmodell (Bolovan et al., 1994) und werden als onkolytische Viren eingesetzt (Liu et al., 2003).

Interferon wird als Abwehrmechanismus von Zellen nach Infektion durch Pathogene, besonders durch Viren gebildet, wobei eine niedrige-kaum nachweisbare Sekretion dauerhaft besteht und auch infolge von fehlgefalteten Proteinen in der Zelle im Rahmen von Auto-immunerkrankungen es zu einer Interferonsekretion kommen kann (Rehwinkel et Gack, 2020). Sie wirken autokrin und parakrin und bestehen aus 130-170 Aminosäuren (Wang et al., 2017). Sie stimulieren die adaptive Immunantwort, wobei Typ I und Typ III Interferone v.a. antiviral wirken und Typ II (IFN- $\gamma$ ) immunmodulierend wirkt. (Wang et al., 2017). Wie essenziell die Interferonantwort für das Überleben ist, zeigen Patienten, die aufgrund einer Mutation von Stat1 eine gestörte Signalweitergabe aufweisen. Solche Mutationen führen zu einem frühen Tod im Kindesalter aufgrund nicht kontrollierbarer viraler Infektionen (Bustamante et al., 2008).

Interferon wird zunächst unterteilt in die Typen I, II und III. Diese Einteilung orientiert sich an dem Rezeptor, an welchen das Interferon bindet. Beispielsweise bindet Interferon der Klasse I an den IFNAR1/2, der Klasse II an IFNGR1/2. Zudem kann Interferon unterteilt werden in IFN  $\alpha$ ,  $\beta$  (Typ I),  $\gamma$  (Typ II) und  $\lambda$  (Typ III). Diese Unterteilung orientierte sich zunächst an den Zellen, die das jeweilige Interferon produzieren. Neben Interferon  $\alpha$  und  $\beta$  existieren als Typ I diverse andere Gruppen (wie bspw. Interferon  $\kappa$  oder  $\delta$ ). Außerdem gibt es Untergruppen, welche selbst weiter untergliedert werden können. Interferon  $\alpha$  wird beispielsweise in 13 weitere Subklassen untergliedert, welche wiederum unterteilt werden können (Wang et al., 2017).

Typ II Interferon wird hauptsächlich von T-Zellen gebildet (Kasahara et al., 1983), während Typ I Interferon von allen Zellen gebildet wird und Typ III Interferon vorwiegend von epithelialen Zellen (Levy et al., 2011).



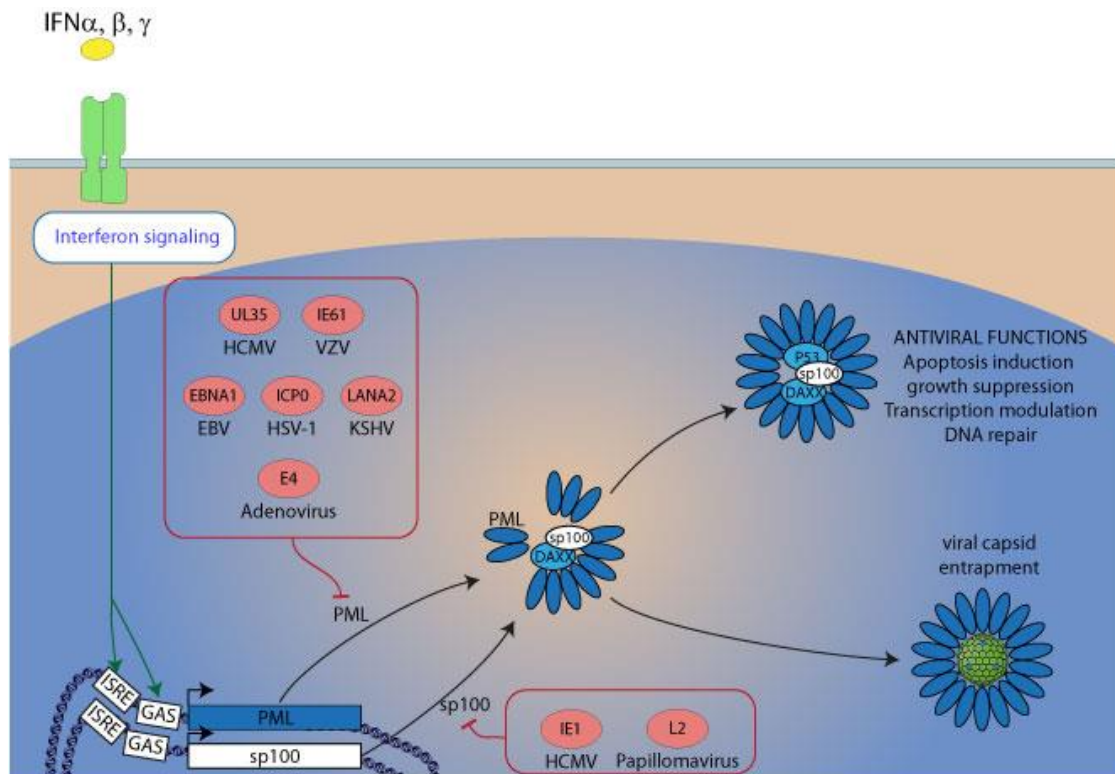
**Abbildung 5: Übersicht über die wichtigsten durch Interferon induzierten Proteine, ihre Signalwege und Wirkungen.** *Abbildung erstellt mit Powerpoint.*

Der Interferonrezeptor Typ I bezeichnet einen heterodimeren Rezeptor, der aus zwei Untereinheiten (IFNAR1 und IFNAR2 ) besteht (Uzé et al., 2007). Nach Ligandenbindung durch Interferon  $\alpha$  oder  $\beta$  werden durch die Vermittlung der Januskinasen Jak 1 und Tyk 2 die STAT (STAT für „signal transducers and activators of transcription“ (Pellegrini et Dusanter-Fourt, 1997)) Proteine 1 und 2 aktiviert (Schindler et Darnell, 1995). Diese dimerisieren und binden an den Interferonregulationsfaktor 9 (IRF-9). Dieser Komplex (ISGF3) löst schließlich die Expression von Interferon-stimulierten Genen (ISG) aus, von denen mehrere hundert existieren (Horvath, 2004). Während manche Proteine von allen Interferonen stimuliert werden, werden manche nur bei Bindung eines bestimmten Interferons exprimiert. Beispielsweise wird die Expression von Oligoadenylsynthetase (OAS) nur von Interferon  $\alpha$  und  $\beta$ , nicht aber von Interferon  $\gamma$  stimuliert. Neben der Homodimerisierung von STAT 1 und 2 können andere STAT-Homo- oder Heterodimere gebildet werden, welche an die sog. Interferon  $\gamma$  activated site binden und damit eine Verbindung zwischen den nach Bindung von Interferon  $\gamma$  stimulierten Genen und den durch Interferon  $\alpha$  und  $\beta$  bilden (Platanias, 2005). Abbildung 5 zeigt eine Übersicht über die wichtigsten durch Interferon induzierte Proteine.

Zwischen den verschiedenen STAT Proteinen existieren Interaktionen, die die jeweilige Interferonproduktion beeinflussen können. Beispielsweise löst ein durch Interferon  $\alpha$  oder  $\beta$  induzierte STAT4 Aktivierung Interferon- $\gamma$  Produktion aus, während STAT1,

aktiviert durch Interferon  $\alpha$ , die Interferon- $\gamma$  Produktion hemmt (Platanias, 2005).

Ein Beispiel für ein durch Interferon induziertes Protein bildet PML (Promyelocytisches Leukämie Protein), welches im Kern zusammen mit Daxx und Sp100 eine Komplexbildung eingeht und damit die ND 10 („*nuclear domain bodies 10*“) bildet. ND-10 Körperchen hemmen die virale Replikation (Chelbi-Alix et de Thé, 1999). Für ihre Bildung ist PML-10 entscheidend (Ishov et al., 1999). Das Herpesvirus-Protein ICP0, welches ein immediate-early protein darstellt antagonisiert diesen Mechanismus, indem es durch seine E3-Ubiquitinligase den Abbau von PML auslöst. (Chelbi-Alix et de Thé, 1999) Es konnte gezeigt werden, dass PML-/- Zellen eine höhere Infektionsrate durch ICP0 Mutanten aufweisen als PML+/+ Zellen, was das Zusammenspiel zwischen diesen interferoninduzierbaren Proteinen und ICP0 unterstreicht (Ishov et al., 1999). PML und Sp100 werden außerdem durch sowohl Interferon  $\alpha$ ,  $\beta$  als auch durch Interferon  $\gamma$  induziert (Tavalai et Stamminger, 2009). Bei Infektion durch CMV konnte dargestellt werden, dass diese Proteine v.a. in der lytischen Infektion und in der Reaktivierung als zelluläre Restriktionsfaktoren dienen (Wagenknecht et al., 2015) . Außerdem können bei VZV Infektion Nukleokapside am Verlassen des Kerns durch sphärenartiges Einschließen durch PML gehindert werden (Reichelt et al., 2011). Abbildung 6 zeigt eine Übersicht über die Effekte von PML.



**Abbildung 6: Übersicht über durch Interferon ausgelöste PML Transkription und Effekte von PML.** Verschiedene virale Proteine, bei HSV-1 ICP0 versuchen die antivirale Funktion von PML einzuschränken, in dem es nach Ubiquitinierung durch ICP-0 degradiert werden kann (Zheng, 2016). PML blockiert ansonsten die virale Replikation (Alandijany, 2018). Bei VZV konnte außerdem gezeigt werden, dass die viralen Kapside von PML sphärenartig „eingekesselt“ werden (Reichelt et al., 2011). Abbildung mit freundlicher Genehmigung des Swiss Institute of Bioinformatics.

*In vivo* ist die Interferonantwort nicht nur wichtig, um die lokale Ausbreitung einzudämmen, sondern auch, um der Ausbreitung des Virus von der Peripherie zum zentralen Nervensystem entgegenzuwirken. Es gibt mehrere virale Herpesproteine, die diese Mechanismen antagonisieren und zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Infektion aktiv sind. So hemmt ICP0 früh in der Infektion die antivirale Wirkung von Interferon. Es assoziiert mit ND10 Bodies, welche an DNA-Reparatur, Interferonantwort, oder Regulation von p53 beteiligt sind und möglicherweise bevorzugte Stellen der Transkription und Replikation von viralem Genom darstellen. ICP0 induziert den Abbau von PML, welches die ND10 organisiert (Lindner, 2007).

p53 ist zentraler Bestandteil bei der antiviralen Immunantwort der Zelle, indem es entweder durch Einleitung der Apoptose oder durch Suppression des viralen Genoms

die Verbreitung der Infektion verhindert (Luo et al., 2016). Möglicherweise bildet die Deubiquitinierung viralen Proteinen einen Schutz vor dem durch Aggresome vermittelten p53 abhängigen Abbau (Lindner, 2007).

Neben ICP0 existieren andere virale Proteine, die zu einem frühen Zeitpunkt aktiv über unterschiedliche Mechanismen der Interferonwirkung, wie vhs („*virion host shut off protein*“). Vhs-defizitäre Mutanten wiesen eine verringerte Replikation auf und waren nach 24h von der Zelle ausgelöscht. Außerdem war der Interferoneffekt bei ihnen deutlich größer (Roizman, 2013).

Herpes simplex Virus verhindert Apoptose durch die viralen Proteine Glycoprotein J oder die Proteinkinase Us3 (Yu et al., 2016). Die Apoptoseverhinderung von Herpes ist dermaßen effektiv, dass Zellen, die Sorbitol ausgesetzt werden, trotz des osmotischen Stresses nicht in Apoptose übergehen (Roizman, 2013).

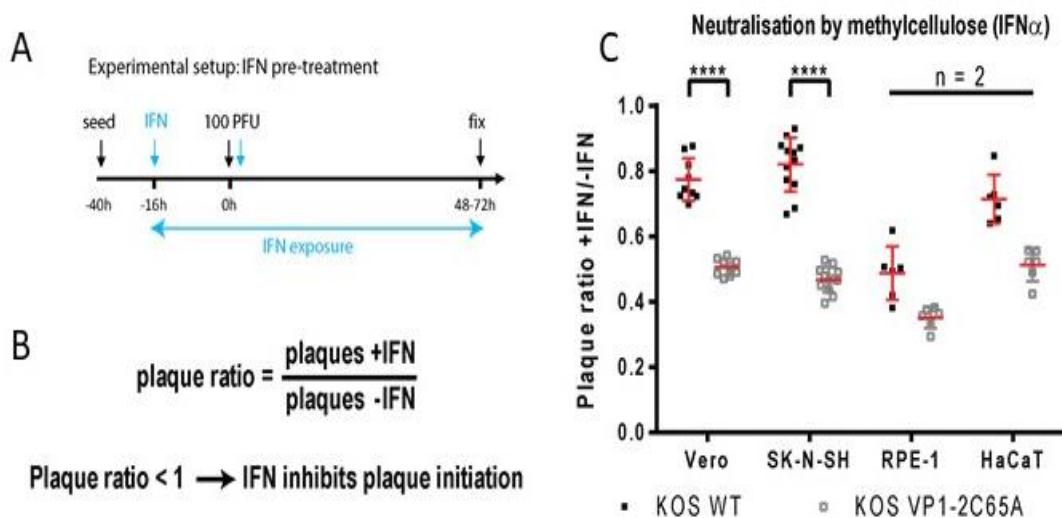
Unter dem Gesichtspunkt, dass die Modulation von Ubiquitinierung eine wichtige Rolle bei der Regulation der Zellabläufe durch das Virus spielt (Lindner, 2007), spielt die Deubiquitinasefunktion bei vielen Abläufen in der Zelle eine Rolle (Kwon et Ahn, 2013).

Bei Versuchen mit unterschiedlichen Zelllinien muss auf die Beschaffenheit der jeweiligen Zelllinie Rücksicht genommen werden. Für U-2 OS Zellen ist beispielsweise bekannt, dass sie bei einer Infektion durch eine ICP0 Mutante, die normalerweise geringe Infektiosität aufweist, dennoch eine Infektionsrate aufweisen, die 100-mal höher ist als bei Verozellen (Yao et Schaffer, 1995). Diese Unterschiede in der Zellbeschaffenheit ermöglichen es, Unterschiede in den Ergebnissen der Experimente zu erklären.

## 1.9. Bereits vorliegende Daten und Ziel der Arbeit

Viele der Funktionen des Tegumentproteins pUL36 sind bekannt. Die DUB-Funktion dieses Proteins ist jedoch nicht vollständig geklärt. Daten aus vorherigen Versuchen ergaben eine stärkere Hemmung der Plaquebildung der DUB-Mutante im Vergleich zum

Wildtyp Virus, wenn man die Zellen mit Interferon  $\alpha$ -2a vorbehandelte. Dieser Effekt konnte in mehreren Zelllinien mit jeweils unterschiedlicher Interferonkonzentration bestätigt werden. Hierzu wurden die Plaques (Loch im Zellrasen, das durch virusinfizierte und dadurch lysierte Zellen im Zellrasen entsteht) der Viren im Plaque-Assay unter Interferoneinfluss gezählt und anschließend ein Verhältnis zu den Plaque-Assays ohne Interferoneinfluss ermittelt. Die Ergebnisse werden zusammengefasst dargestellt in Abbildung 7. Die vorhandenen Daten könnten zeigen, dass die DUB-Mutante beim Eindringen in den Zellkern gehemmt wird und dadurch weniger Plaques ausbilden kann. Ziel der Arbeit war es nun, die Funktion der Deubiquitinase von pUL36 in der Infektion näher zu bestimmen.



**Abbildung 7: Übersicht über die vor Beginn der Arbeit bestehende Datenlage.** Die Mutante zeigte sich deutlich gehemmt im Infektionsverhalten bei Vorbehandlung der Zellen mit Interferon ( $p < 0,0001$ ), nachdem die Zellen mit Interferon vorbehandelt wurden und nach der Infektion Interferon  $\alpha$  2a zugegeben worden ist. **(A)** Zur Messung des Effekts wurde die Ratio aus der Plaquezahl mit Interferon  $\alpha$  2a vorbehandelten Zellen und nicht mit Interferon vorbehandelten Zellen gebildet. **(B)** **(C)** zeigt die Verhältnisse des WT und der Mutante bei unterschiedlichen Zelllinien im Vergleich. Deutlich sichtbar ist die größere Hemmung der Mutante als des Wildtyps. Abgebildet werden kann dies mathematisch durch die Bildung der Ratio aus den Plaquezahlen mit interferonbehandelten Platten und den Plaquezahlen ohne Interferonbehandlung.

Wir erwarteten durch die Versuche eine Bestätigung der bereits erhobenen Daten. Außerdem erhofften wir uns neue Ergebnisse durch die Weiterbeobachtung der

infizierten Zellen nach Abnahme des Interferons, um damit den Mechanismus hinter der stärkeren Hemmung der Mutante aufzudecken. Ein Zelltyp, der keinen Unterschied bei der Infektion mit DUB-Mutante und Wildtyp aufweist, wäre ebenfalls nützlich für die Klärung des Mechanismus, denn Unterschiede in der Zellbeschaffenheit ermöglichen Rückschlüsse auf die beteiligten molekularbiologischen Strukturen.

Weitere Fragen, die wir klären wollten, waren: Wenn das virale Genom der DUB-Mutante wegen interferoninduzierten Faktoren wie bspw. IFI-16 (Orzalli et al., 2013) „stillgelegt“ worden ist, reaktivieren die Herpesviren nach Abnahme des Interferons? Oder hat das Interferon eine dauerhafte Abtötung der Viren hervorgerufen? Oder stirbt die Zelle als Ganzes unter den Interferoneinfluss ab? Inwiefern unterscheidet sich die DUB Mutante C65A dabei vom Wildtyp? Ist der Versuch in allen Zelllinien replizierbar?

Zur Klärung dieser Fragen, wurden verschiedene Plaque-Assays entwickelt, durchgeführt und die Daten statistisch ausgewertet. Plaque-Assays stellen ein in der Virologie etabliertes Verfahren dar (Russell, 1962). Unterschiedliche Zelllinien wurden mit und ohne Interferonvorbehandlung mit einer PFU-Konzentration von 100 / Zellrasen infiziert („Plaque-forming-unit“, Begriff für die Infektionsdosis, die einen Plaque (Loch im Zellrasen, das durch virusinfizierte und dadurch lysierte Zellen im Zellrasen entsteht) formt).



## 2. Material und Methoden

### 2.1. Verwendete Zelllinien und Materialien zur Zellkultivierung

Die Zelllinien wurden bei 37°C im Inkubator in geeignetem Zellmedium kultiviert.

zeigt eine Übersicht über die verwendeten Zelllinien, sowie die verwendete FBS-Konzentration im Medium. Das Medium enthielt zusätzlich zum FBS Penicillin/Streptomycin sowie nicht-essenzielle Aminosäuren.

zeigt die verwendeten Materialien.

Zelllinie (Abkürzung)	Beschreibung	FBS-Konzentration im Medium	Herkunft
BHK	Baby hamster kidney cells	10 % FBS Medium	Prof. Dölken Labor
Sk-N-Sh	Human neuroblastoma cells	10 % FBS Medium	Prof. Sodeik Labor
HEK293T	Human embryonic kidney cells	5 % FBS Medium	Prof. Dölken Labor
Vero	African green monkey kidney epithelial cells	10 % FBS Medium	Prof. Sodeik Labor
U-2 OS	Human bone osteosarcoma epithelial cells	10 % FBS Medium	Prof. Dölken Labor

***Tabelle 2: Verwendete Zelllinien und das jeweils benutzte Medium.***

Beschreibung	Zusammensetzung	Hersteller	Finale Konzentration im Medium
Zellmedium	4,5g/L D-Glucose, L-Glutamin Pyruvat	DMEM Dulbecco`s modified Medium	-
Fetales Rinderserum (FBS)	Fetales Rinderserum	Firma anprotect	5-10%
Penicillin/Streptomycin	Penicillin 100000 IU/ml Streptomycin 100mg/ml	Firma gibco	0,2%
Nicht-essenzielle Aminosäuren (NEAA)	Nicht-essenzielle Aminosäuren (NEAA)	Firma gibco	1,0%
Kollagenlösung	Kollagenlösung	Firma cell	-
Trypsin	Trypsin-EDTA Solution 0,25%, steril gefiltert, 2,5g Schweinetrypsin, 0,2g EDTA 4 Na per Liter von Hanks balancierter Salzlösung mit Phenolrot	Firma Sigma- aldrich	-
Phosphat-buffered-saline (PBS)	NaCl, KCl, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O	Virologisches Institut Würzburg	-

***Tabelle 3: Verwendete Materialien für die Zellkultivierung.***

## 2.2. Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Der Transport zum Labor erfolgte auf Trockeneis. Anschließend wurden die Zellen bei  $37^{\circ}\text{C}$  für zwei Minuten aufgewärmt und in 9ml auf Raumtemperatur vorgewärmtes Medium gegeben. Die Lösung wurde für drei Minuten bei 250rcf Raumtemperatur zentrifugiert. Das überschüssige Medium wurde abpipettiert und das Zellpellet mit 1ml Medium vermischt. Diese Zellsuspension wurde anschließend in 14ml frisches Medium gegeben und in eine Zellkulturflasche transferiert.

## 2.3. Aufteilen von Zellen auf neue Zellkulturflaschen

Die Zellen wurden bei zu dichtem Wachstum auf neue Zellkulturflaschen umverteilt. Hierzu wurde das Medium von den Zellen abgenommen. Anschließend erfolgte die Waschung der Zellen mittels PBS, um das im Medium enthaltene FBS gänzlich von den Zellen zu entfernen. Anschließend erfolgte der Zusatz von 2-3ml Trypsin um die Zellen vom Boden der Zellflasche zu lösen. Nachdem sich die Zellen gelöst hatten, wurde das Trypsin mit 7-8ml Medium neutralisiert. Die Zellsuspension wurde in einer sich an dem Bedarf orientierenden Menge auf frisches Medium verteilt und anschließend in frische Flaschen gefüllt.

## 2.4. Beschichten der Platten mit Kollagen

Zur besseren Haftung wurden Sk-N-Sh Zellen auf mit Kollagen beschichteten Platten kultiviert. Hierzu wurde Kollagenlösung (Stammkonzentration von 2mg/ml) 1:200 verdünnt und mind. Eine Stunde auf die betreffende Platte aufgetragen. Anschließend erfolgte die mindestens einmalige Waschung mit PBS.

## 2.5. Aussähen der Zellen auf Platten

Zunächst wurde, wie unter Punkt 2.3 verfahren um eine freie Zellsuspension zu gewinnen. Anschließend erfolgte die Zählung der Zellen mittels einer Neubauerkammer: Hierzu wurden 10µl von der Zellsuspension abgenommen und mit 10µl Trypanblau versetzt, um tote Zellen anzufärben. Anschließend erfolgte die Zählung am Mikroskop und die Berechnung der Zellkonzentration. Je nach Zellart und Platte wurden die Zellen in unterschiedlicher Konzentration ausgesät.

## 2.6. Behandlung der Zellen mit Interferon

Für die Behandlung der Zellen wurde IFN $\alpha$  2a als Interferon gewählt. Hierzu wurde das Medium von den Zellen abgenommen und mit IFN $\alpha$  versetztem Medium, wobei sich die IFN $\alpha$ -Konzentration an die Zelllinie orientierte (siehe **Error! Reference source not found.**). Denn die Empfindlichkeit der Zelllinien gegenüber Interferon ist unterschiedlich und bei zu hohen Interferon-Konzentrationen kann es zu Zellschäden kommen, wie beobachtet werden konnte.

Verwendete Zelllinie	Interferonkonzentration
Vero Zellen	100U/ml, 500U/ml
Sk-N-Sh Zellen	50U/ml
U-2 OS Zellen	500U/ml

***Tabelle 4: Übersicht über die Zelllinie und die jeweils verwendete Interferonkonzentration.** Abhängig von der Empfindlichkeit der Zellen konnte beobachtet werden, dass die Interferonkonzentration an die Empfindlichkeit der jeweiligen Zelllinie angepasst werden musste.*

## 2.7. Verwendete Materialien für die Infektion

Nach Aussähen der Zellen auf Zellplatten wurden die Zellen mit Interferon  $\alpha$  zum Teil behandelt, inkubiert und anschließend mit Viren infiziert. zeigt die verwendeten

Materialien für die Infektion.

Beschreibung	Abkürzung	Herkunft/Hersteller
Herpes simplex Virus Wildtyp Bacmid	WT	Lars Dölken Labor
Herpes simplex Virus DUB-Mutante Bacmid	C65A	Lars Dölken Labor
Herpes simplex Virus Wildtyp strain 17 Bacmid	Strain 17 WT	Lars Dölken Labor
Herpes simplex Virus mCherry Wildtyp Bacmid	mCherry WT	Lars Dölken Labor
Herpes simplex Virus mCherry DUB- Mutante Bacmid	mCherry C65A	Lars Dölken Labor, Mara Fischer
Interferon $\alpha$ 2a	IFN – $\alpha$	Firma ImmunoTools

***Tabelle 5: Verwendete Materialien für die Infektion.***

Bei der Verwendung von 96- well Platten wurden Sk-N-Sh Zellen in einer Konzentration von 2,5E4/Well auf sechs mit 1:200 Kollagen beschichteten 96 -well Platten ausgesät (die geringere Konzentration wurde gewählt, um die Interferonwirkung zu verstärken). Nach sechs bis acht Stunden wurde IFN $\alpha$  in einer finalen Konzentration von 50U/ml auf vier Platten zugegeben. 12-16h nach der Interferonbehandlung erfolgte die Infektion mit einer PFU von 0,221875/Well (DUB- Mutante C65A) und 0,1775/Well (Wildtyp). Hierbei wurde auf den mit Interferon vorbehandelten Zellen 50U/ml IFN $\alpha$  (finale Konzentration) zugegeben. Außerdem wurden erneut Zellen auf einer 96 -well Platte ausgesät (Kontrollplatte).

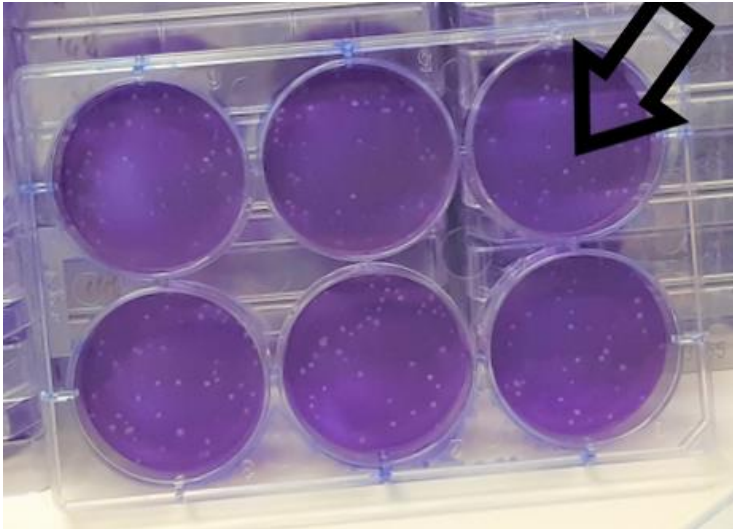
Am Folgetag wurde das Virusinoculum durch die Zugabe von humanem Serum in einer finalen Konzentration von 2% und Inkubation für ca. 4h neutralisiert. Zur Überprüfung der Neutralisation wurden 100 $\mu$ l/Well probeweise auf die am Vortag ausgesäte

Kontrollplatte transferiert, welche im Verlauf auf Infektionszeichen überprüft wurde. Nach Ablauf der vier Stunden wurden die Zellen gewaschen, um residuale Antikörper des humanen Serums zu entfernen. Das Medium wurde auf 1% FBS gewechselt, um ein zu starkes Zellwachstum zu verhindern. Es wurde auf die IFN $\alpha$ -haltigen Platten erneut IFN $\alpha$  zugegeben. Am Folgetag erfolgte das Aussähen von Reporterzellen in einer Konzentration von 3,5E4/Well auf sechs 96-well Platten in 150 $\mu$ l Medium. Am nächsten Tag erfolgte ein Transferieren von 100 $\mu$ l pro Well auf die Reporterzellplatten, die anschließend bei 800g RT zentrifugiert wurden, um eine Infektion der Zellen sicherzustellen. Auf den IFN $\alpha$ -haltigen Platten wurde das Medium gewechselt. Die IFN $\alpha$ -Kontrollplatten erhielten eine erneute IFN $\alpha$  – Behandlung. Zwei Tage später wurden die zweiten Reporterzellen ausgesät und am Folgetag analog zu den ersten infiziert. Nach weiteren zwei Tagen wurden die ersten Reporterzellen fixiert und nach weiteren zwei-drei Tagen erfolgte die Fixierung der zweiten Reporterzellplatten.

In die Zelllösung wurde eine Formaldehydlösung gegeben, damit wurden die Zellen fixiert und es wurde eine sichere Abtötung und Fixierung der Zellen erreicht. Anschließend erfolgte die Entfernung der Formaldehydlösung unter Beachtung entsprechender Sicherheitsmaßnahmen. Hierauf wurde Kristallviolett zugegeben, welches ebenfalls unter Berücksichtigung von Sicherheitsmaßnahmen nach Anfärben der Zellen entfernt wurde. Die Zellplatten wurden anschließend mit Wasser nachgewaschen, um verbleibendes Kristallviolett zu entfernen. Abbildung 8 zeigt eine Fotografie einer fixierten und gefärbten 6-well Platte. **Error! Reference source not found.** zeigt eine Übersicht über die verwendeten Materialien.

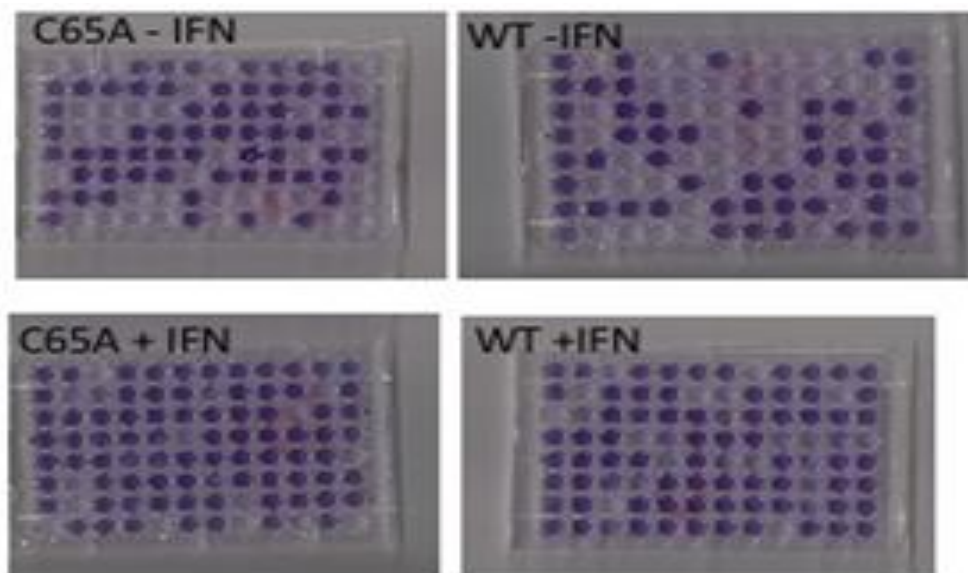
Beschreibung	Hersteller/Herkunft
Formaldehyd	Firma Sigma-aldrich, Firma Roth
Kristallviolett	Firma Merck

***Tabelle 6: Verwendete Materialien für Färbung und Fixation.***

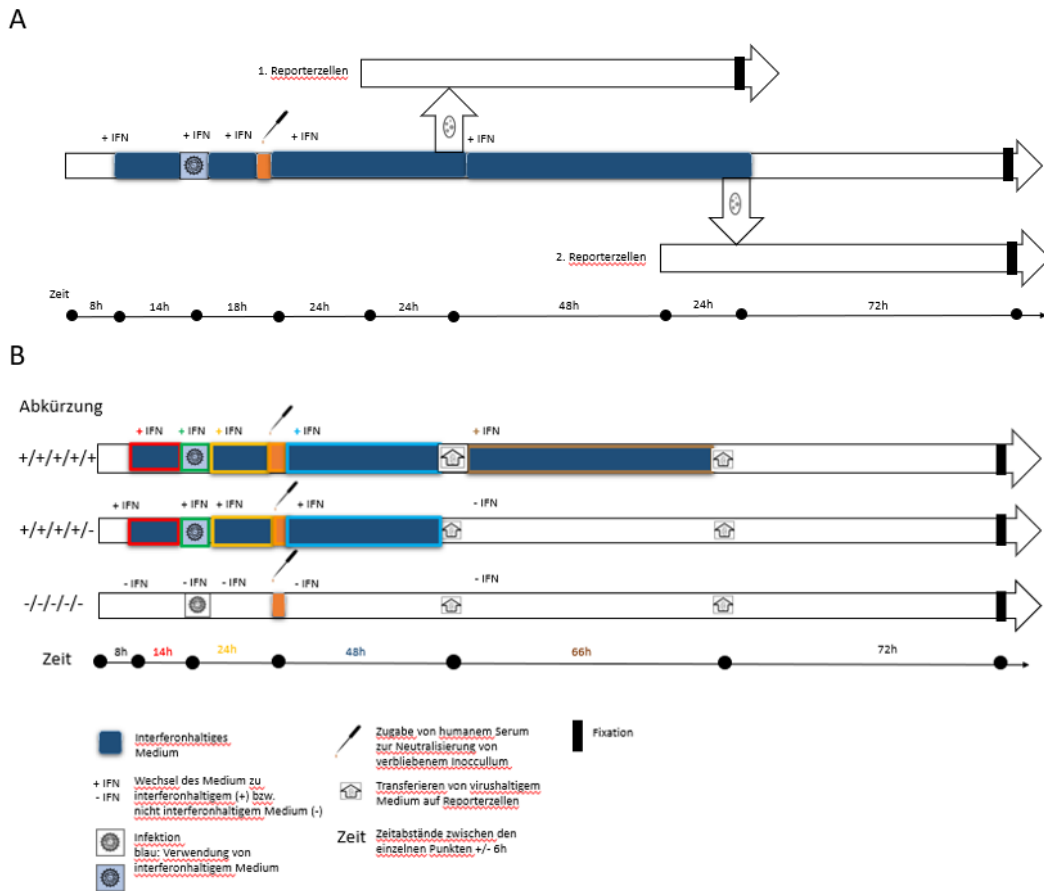


**Abbildung 8:** *Fotografie einer fixierten und mit Kristallviolett gefärbten 6-well Platte. Der schwarze Pfeil deutet auf einen Plaque in einem Well.*

Abbildung 9 zeigt Scanbilder von gefärbten und fixierten Reporterzellplatten. Deutlich zu sehen ist die vollständige Auslöschung von Zellrasen durch das Virus im infizierten Well. Abbildung 10 zeigt eine Übersicht über das Protokoll.



**Abbildung 9:** *Abbildung von Reporterzellplatten. Deutlich zu erkennen ist die eindeutige Auslöschung von infizierten Well durch das Virus. Wells, in denen durch Infektion die Zellen lysiert wurden, bieten keine Angriffsfläche mehr für die Kristallviolettlösung und erscheinen deshalb „leer“.*



**Abbildung 10: Darstellung des Prinzips der Reporterzellen (A) und schematisch vereinfachte Darstellung des Protokolls (B).** Die Zellen wurden 8h nach dem Aussäen mit Interferon behandelt. Nach ca. 14h wurden die Zellen infiziert und mit Interferon weiterbehandelt. Nach 24h die Eliminierung von residualem Virus durch Waschen mit humanem Serum. Nach weiteren 48h erfolgte der Übertrag auf Reporterzellplatten und der Wechsel des Mediums. Nach 66h erfolgte dann der Wechsel auf Reporterzellplatten. Nach weiteren 72h die Fixation der Platten.

Zur Zählung und Auswertung wurden die Platten am Lichtmikroskop mikroskopiert und die Plaques pro Nöpfchen („Well“) gezählt. Bei einem beschädigten Well wurde die unbeschädigte Fläche ausgewertet und auf den gesamten Well hochgerechnet, sofern weniger als 50% der Fläche beschädigt waren. Pro Behandlung wurde eine Platte mit 6 Well angesetzt. Die Auswertung erfolgte mittels des Software-programmes GraphPad Prism. Bei Verwendung von 96-well Platten wurden die leeren Well pro Platte gezählt und als infiziert gewertet.

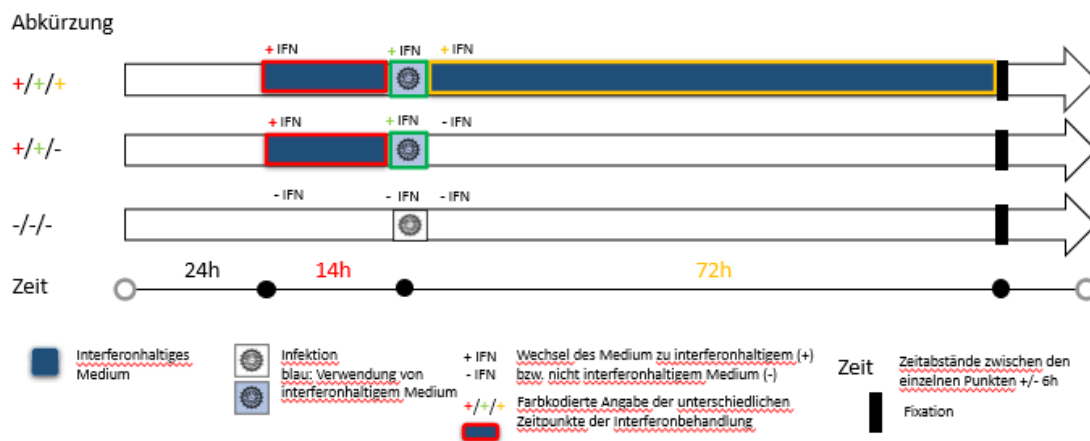


## 2.9. Experimente zur Darstellung des Phänotyps der DUB-Mutante C65A

### 2.9.1. Plaque-Assays zur Darstellung des Phänotyps der DUB- Mutante

#### 2.9.1.1. Abhängigkeit des Interferoneffekts von der Interferondosis

Um zu untersuchen, inwiefern sich die Mutante von dem Wildtyp unter Interferoneinfluss in der Infektion unterscheidet und inwieweit der Effekt von der Interferondosis abhängig ist, wurden Verzellen einer Interferonkonzentration von 100U/ml, sowie 500U/ml ausgesetzt und anschließend infiziert. Hierfür wurde ein Plaque-Assay entwickelt. Verzellen wurden nach Behandlung mit den unterschiedlichen Interferonkonzentrationen auf sechs 6-well Platten ausgesät. Davon wurden vier Platten 24 h nach Aussäen mit IFN $\alpha$  behandelt. Anschließend erfolgte die Infektion mit Mutante und Wildtyp. Abbildung 11 zeigt eine Übersicht über die unterschiedlichen Zeitpunkte der Behandlung mit Interferon bei den jeweiligen Platten.

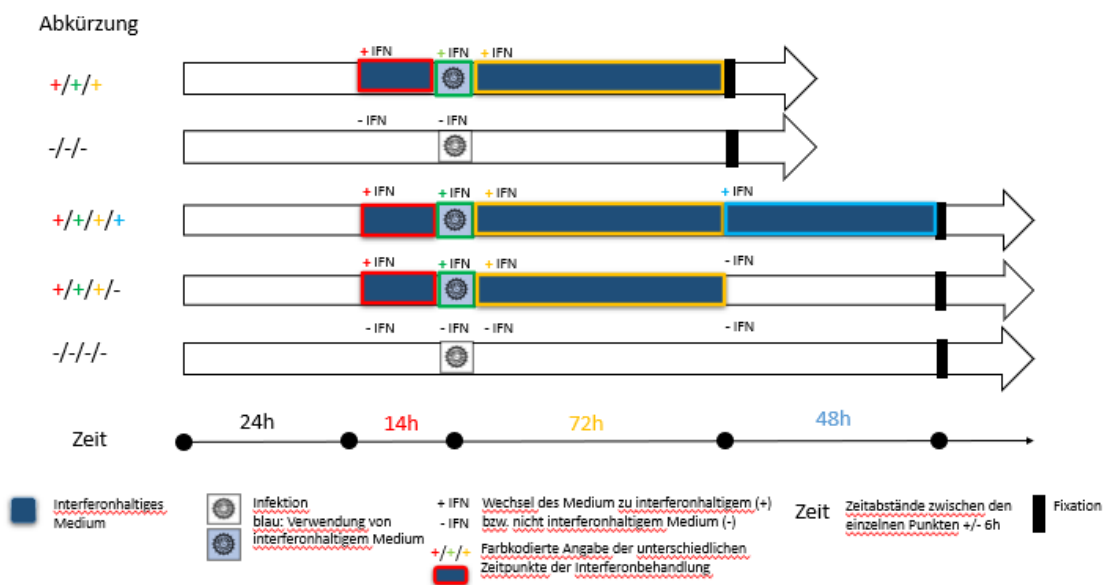


**Abbildung 11: Übersicht über die unterschiedlichen Zeitpunkte der Behandlung mit IFN bei den jeweiligen Platten.** Links geben die „+“ oder „-“ Zeichen das Wechseln zu interferonhaltigem (+) oder nicht interferonhaltigem (-) Medium wieder. Der Zeitstrahl unten gibt die einzelnen Zeitabschnitte wieder. Die Platten wurden pro Virus einmal pro Versuch angefertigt. Es wurde folgendes Schema festgesetzt: Auf einer Platte pro Virus erfolgte die Behandlung der Zellen mit IFN $\alpha$  in einer Konzentration von 100U/ml oder 500U/ml auch unter Infektion, das bedeutet, das IFN $\alpha$  wurde in der wie unter Punkt beschriebenen Konzentration der Virussuspension beigemischt und diese Konzentration

wurde anschließend beibehalten. Auf zwei weiteren Platten (eine pro Virus) wurde das  $IFN\alpha$  nach Ablauf der Infektionsdauer abgenommen. Zwei weitere Platten wurden nicht mit  $IFN\alpha$  behandelt und nur mit Virus infiziert. Ein Mediumwechsel wurde dennoch durchgeführt, um die Bedingungen vergleichbar zu halten.

## 2.9.1.2. Plaque-Assay zur Untersuchung einer möglichen viralen Reaktivierung nach Interferonabnahme

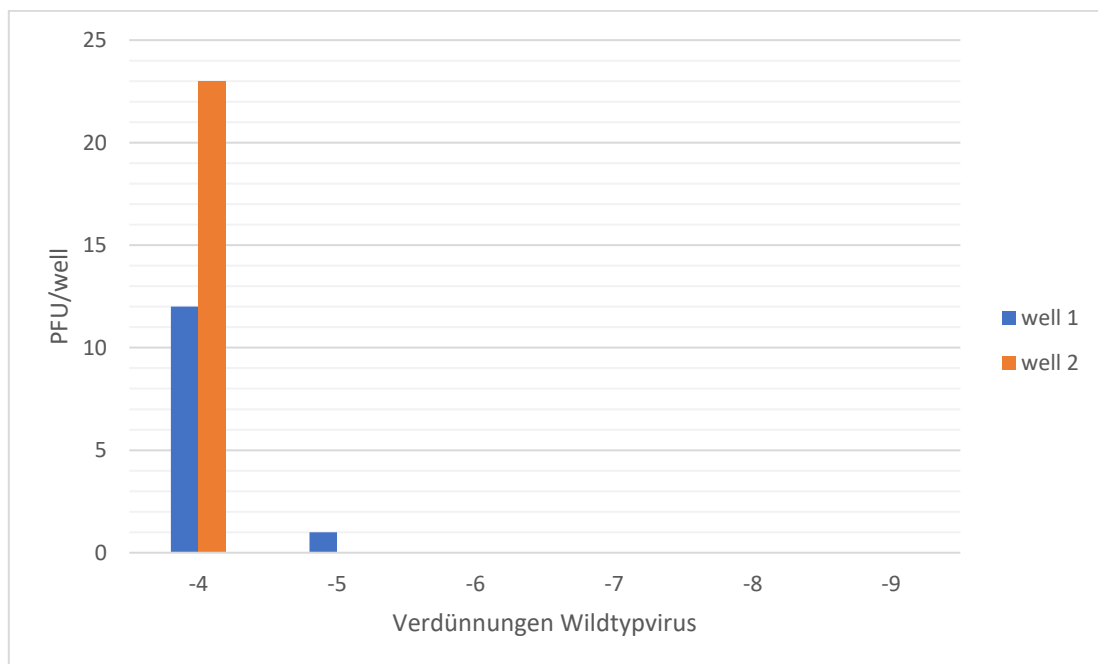
Um zu untersuchen, inwiefern eine Abnahme des Interferons das Infektionsgeschehen beeinflusst, wurde das Interferon drei Tage nach Infektion von den Platten abgenommen. Hierfür wurden Platten 24h nach Aussäen mit IFN $\alpha$  behandelt und am Folgetag infiziert. Anschließend wurde nach Infektion die Verbreitung des Virus im Well mit 2 oder 4% humanem Serum verhindert, um einen späteren Wechsel des Mediums möglich zu machen. Am gleichen Tag wurden als Kontrollplatten pro Virus mit und ohne IFN $\alpha$  behandelte Platten fixiert und gefärbt. Die übrigen Platten wurden nach Wechsel des Mediums, zu dem nicht interferon-haltigem Medium zwei weitere Tage



**Abbildung 12: Protokoll der Platten, welche am 3.dpi fixiert wurden (Kontrollplatten) und unten das Protokoll der Platten, die am 5dpi fixiert wurden.** Links geben die „+“ und „-“ Zeichen die Zu- oder Abnahme von Interferon wieder. Die Platten wurden pro Virus einmal je Versuch angefertigt. Die Infektion erfolgte bei der DUB-Mutante C65A zunächst mit 20 $\mu$ l einer 1:10 000 Verdünnung und bei WT mit 3,85 $\mu$ l einer 1:10 000 Verdünnung. Nachdem in den ersten beiden Experimenten die Plaquezahlen bei der Mutante zu gering waren, erfolgte schlussendlich die Infektion bei der Mutante mit 40 $\mu$ l einer 1:10 000 Verdünnung.

inkubiert und anschließend fixiert und gefärbt. zeigt das Protokoll der Platten welche am 3 dpi (dpi: „days post infection“) einen Wechsel des Interferons erfuhren und am 5dpi fixiert wurden, sowie der Platten, die 3dpi fixiert wurden.

Im Vorfeld wurde durch Titration des humanen Serums die Neutralisationskraft desselben getestet. Hierbei wurden Zellen mit unterschiedlichen Virenkonzentrationen (Ausgangskonzentration 3,7E5/ml in unterschiedlichen Verdünnungen) infiziert und anschließend mit humanem Serum in 2% Konzentration für 3 Tage inkubiert und am 3dpi fixiert. Hierbei ergab sich, dass das humane Serum den Titer beim Wildtyp 1000x verringert. Abbildung 13 zeigt die PFU/Well bezogen auf die Konzentration des Virus.

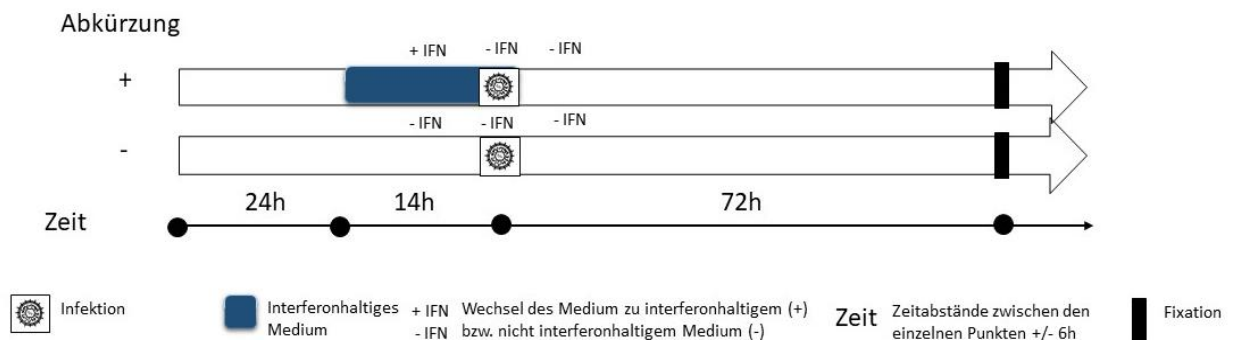


**Abbildung 13: Übersicht über die Neutralisationskraft von humanem Serum.** Bei einem Titer von 3,7E5/ml Wildtypvirus wurde der Titer 1000fach verringert. Die y-Achse gibt die PFU/Well, die x-Achse die Verdünnungen des Wildtyps in einer Konzentration von 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup> ... wieder. Es wurden jeweils zwei Wells entsprechend behandelt.

### 2.9.1.3. Verkürztes Protokoll mit reiner Vorbehandlung von Vero und U2-OS Zellen ohne Behandlung während oder nach der Infektion mit Interferon

Um zu untersuchen, inwiefern eine Vorbehandlung mit Interferon der Zellen ohne Behandlung während oder nach der Infektion das Infektionsgeschehen beeinflusst, wurde das Interferon vor der Infektion auf die Zellen gegeben, anschließend nicht mehr. Die Zellen wurden später infiziert und fixiert.

Abbildung 14 zeigt die Protokolle der DUB-Mutante und des Wildtyps.



**Abbildung 14: Übersicht über das Protokoll bei Vorbehandlung der Zellen mit Interferon  $\alpha$ .** Die Zellen wurden 24h nach dem Aussäen mit Interferon behandelt und nach weiteren 14h infiziert. Nach 72h erfolgte die Fixation der Platten. Pro Virus wurde pro Versuch dieses Schema einmal angefertigt. Es wurden auf vier 6-well Platten Verozellen oder U-2 OS Zellen in einer Dichte von  $2,5E5/m$  (Vero) bzw.  $3E5/ml$  (U-2 OS) in 2 ml ausgesät. Am Folgetag wurde auf zwei Platten  $IFN\alpha$  in einer Konzentration von 500 U/ml zugegeben und das Medium auf den Übrigen ausgetauscht. Anschließend erfolgte am dritten Tag nach dem Aussäen die Infektion ohne erneute Zugabe von  $IFN\alpha$  während der Infektion und ohne die Beimengung von  $IFN\alpha$  in die Methylcellulosemischung. Drei Tage nach Infektion wurden die Platten mit Formaldehyd in 4% finaler Konzentration im Medium fixiert und mit Kristallviolett gefärbt. Um das Bilden von späteren Plaques sicher ausschließen zu können, erfolgte die Fixierung bei den U-2 OS Zellen bei den mit Interferon behandelten Platten einen Tag später.

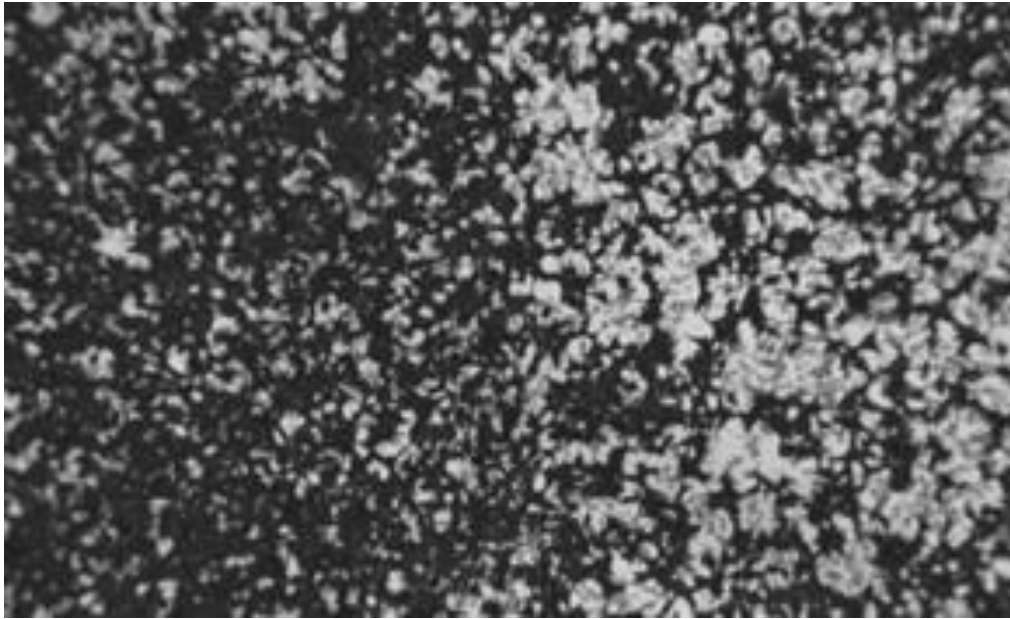
### 2.9.1.4. Plaque-Assay mit mCherry mutierten Viren

Es wurde ein Plaque-Assay mit Vorbehandlung der Zellen mit Interferon durchgeführt. Die Infektion erfolgt durch einen mutierten Virus, das eine mCherry Mutation auf VP26

trug und auf dem DUB-Abschnitt mutiert war (Hennig et al., 2021). Das Virus wurde nicht selbst hergestellt, sondern in dieser Arbeit benutzt, um die Reproduzierbarkeit durch eine weitere Viruslinie zu testen.

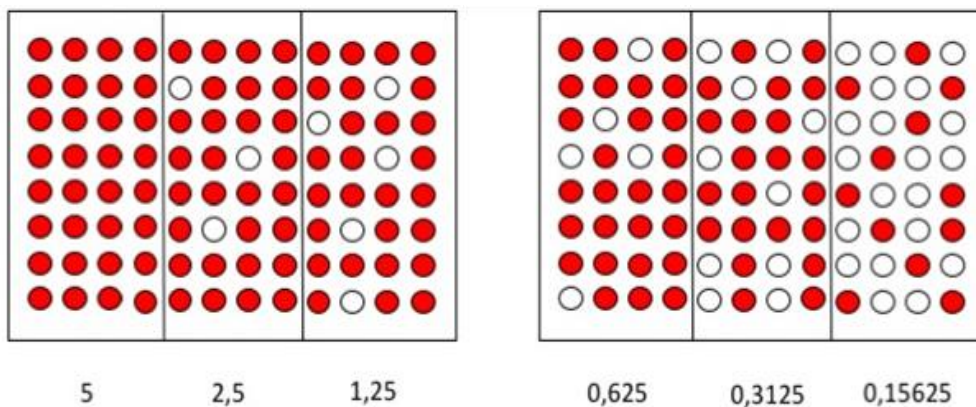
### 2.9.2. Entwicklung eines 96-well Assay zur Darstellung des Phänotyps von der DUB Mutante C65A nach Interferonabnahme

Es wurden 96-well Platten verwendet, welche zur besseren Haftung der Zellen mit Kollagen beschichtet wurden. Zunächst erfolgte die Ermittlung der optimalen Zelldichte durch HEK 293 T Zellen. Hierzu wurden die Zellen in unterschiedlichen Konzentrationen (1,5E5/ Well, 8E4/Well, 1,5E4/Well, 5E4/Well, 2E4/Well, 1E4/Well, jeweils 16 Wells; 0,8E5/Well, 0,75E5/Well, 5E4/Well, 3,5E4/Well, 2E4/Well, 1E4/Well jeweils 16 Wells) ausgesät und am Folgetag mit und jeweils 8 Wells mit 0,1% Kristallviolett gefärbt. Durch anschließende Mikroskopie und Bildaufnahmen wurde ermittelt, welche Konzentration am besten geeignet für die Infektion ist, da eine zu hohe oder zu niedrige Zelldichte die Infektionsrate bzw. die nachfolgende Mikroskopie negativ beeinflussen kann. Für die Infektion schienen 3,5 E4 Zellen/ Well am besten geeignet. Abbildung 15 zeigt HEK 293T Zellen einen Tag nach dem Aussähen. Die Konzentration wurde auf Sk-N-Sh Zellen übertragen. Nachdem sich bei Versuchen zeigte, dass diese Konzentration zu hoch gewählt war, wurde in einer Konzentration von 2,5E4 fortgefahren.



**Abbildung 15:** HEK 293 T Zellen einen Tag nach dem Aussähen in einer Konzentration von  $3,5E4$ /Well. Aufnahme mit dem Lichtmikroskop.

Anschließend erfolgte die Bestimmung des besten Virustiters. Hierzu wurden Sk-N-Sh Zellen auf 96 -well-Platten in der Konzentration  $3,5 E4$ /Well gesät und am Folgetag mit unterschiedlichen Virenmengen infiziert, wie in Abbildung 16 abgebildet. Nach zwei Tagen (am dritten Tag nach Infektion) erfolgte die Detektion der infizierten Wells durch Mikroskopie und die Zählung der infizierten Wells.



**Abbildung 16: Übersicht über die Titration.** Infizierte Well sind rot markiert. Die Zahlen geben die gewählte PFU/Well wieder. Man sieht, wie abhängig von der Infektionsdosis sich die infizierte Well-Zahl ändert. Während bei einer PFU von 5 alle Well infiziert wurden sind bei einer PFU von 0,15625 lediglich ein Teil infiziert.

Zunächst wurden an Tag 1 SK-N-Sh Zellen in einer Konzentration von  $3,5E4$ /Well auf sechs 96 Well Platten ausgesät. Sechs bis acht Stunden später erfolgte die Behandlung mit Interferon in einer Konzentration von 50U/ml finale Konzentration. Sechzehn Stunden nach Behandlung wurde die Infektion mit einer Konzentration von 0,221875 PFU-Well (DUB- Mutante C65A) und 0,1775 PFU – Well (Wildtyp). Am Tag fünf wurden die infizierten Well gezählt und  $IFN\alpha$  durch mindestens einmaligen Mediumwechsel bei nichtinfizierten Wells gewaschen. Am Tag acht erfolgte die Zählung

Problematisch war hierbei die Hyperkonfluenz der Zellen, die die Auswertung erschwerte. Das Protokoll musste deshalb um Reporterzellen erweitert werden. Dieser Begriff wurde für Zellen verwendet, die indirekt infiziert wurden, indem das Medium der hyperkonfluenten Zellen auf sie übertragen worden ist.



## 2.10 Statistische Auswertung

Wichtig bei der Erhebung bzw. Auswertung von experimentellen Daten ist die Reliabilität, Objektivität und Validität (Himme, 2009). Zur Testung der Objektivität wurde stichprobenartig ausgezählte Wells von einem weiteren Labormitarbeiter, Dr. Anand, nachgezählt und die Ergebnisse miteinander verglichen. Hierbei ergab sich kein signifikanter Unterschied in den Ergebnissen. Validität der Testungen wurde angenommen.

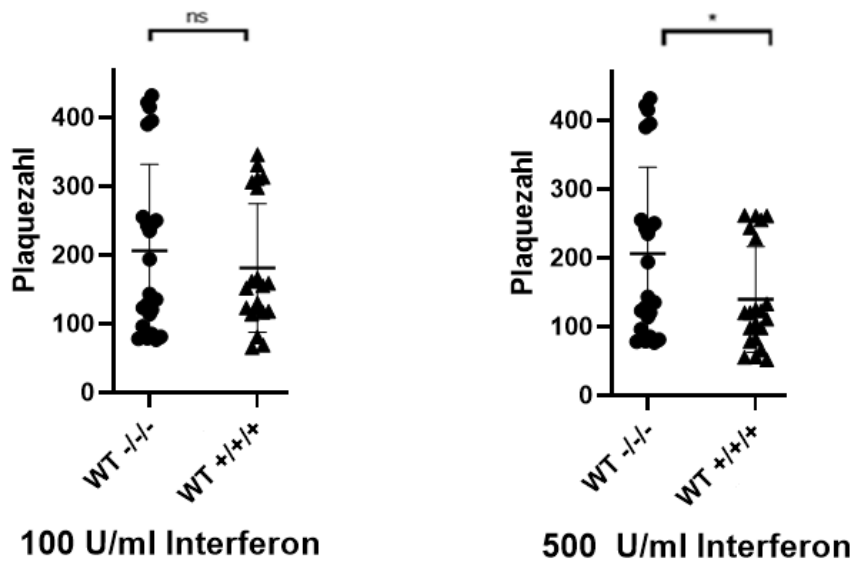
Es erfolgte eine Auswertung mittels multifaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) via GraphPad Prism durch die Autorin. ANOVA wurde genutzt, nachdem es eine weitverbreitete Methode in der Wissenschaft zur Abbildung von Unterschieden zwischen Gruppen ist und empfohlen wird (Toothaker et Newman, 1994). Eine Normalverteilung wurde vorausgesetzt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Interferons $\alpha$ 2a Wirkung bei Abnahme direkt nach Infektion

Interferon hemmt die Infektion der Zellen durch Herpes simplex Virus (Domke-Opitz, 1986). Zur Untersuchung, inwiefern der Interferoneinfluss auf das Infektionsgeschehen auch bei Abnahme des Interferons nach der Infektion auf die DUB-Mutante bzw. das Wildtyp Herpes Virus vorliegt und ob sich beide darin unterscheiden, wurde das Interferon bei Platten nach der Infektion abgenommen und zum Vergleich auf Kontrollplatten weiterhin zugegeben. Außerdem wurde untersucht, inwiefern der Interferoneffekt von der Konzentration abhängig ist.

Betrachtete man die Plaquezahl des Wildtyps wurde bei der Behandlung mit einer Interferonkonzentration von 500 U/ml die Plaquezahl im Mittel um 32% vom Ausgangswert gesenkt, während bei einer Behandlung mit 100 U/ml die Plaquezahl im Mittel nur um 12% vom Ausgangswert gesenkt wurde (siehe hierzu Abbildung 17). Für die weiteren Versuche wurde aufgrund der stärkeren Hemmung der Plaquezahlen eine Interferonkonzentration von 500 U/ml gewählt.



**Abbildung 17: Übersicht über die Plaquezahl des Wildtyps bei Exposition der Verozellen mit 100U/ml Interferon bzw. 500U/ml. Interferon wurde nach der Infektion weiter zugegeben (+/+ +/), bzw. blieben die Verozellen davon unbeeinflusst (-/-/-). Nach 3 Tagen erfolgte die Fixierung und Auswertung. N=48 bei 4 Versuchen mit jeweils einer Platte mit 6 Vertiefungen. ns= nicht signifikant, \* $p < 0,05$ , one way ANOVA.**

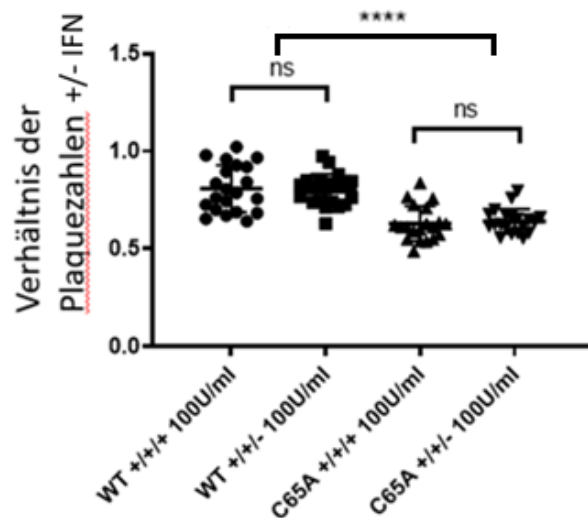
Um einen Vergleich zwischen dem Einfluss des Interferons auf den Wildtyp und der DUB-Mutante ziehen zu können, wurden die Plaquezahlen zueinander ins Verhältnis gesetzt. Hierbei gilt:

Verhältnis der Plaquezahlen unter Interferoneinfluss (+) zu Plaquezahlen ohne Interferoneinfluss (-) =  $\text{Plaquezahl unter Interferon} \alpha \text{ Einfluss} / \text{Plaquezahl ohne Interferonbehandlung}$

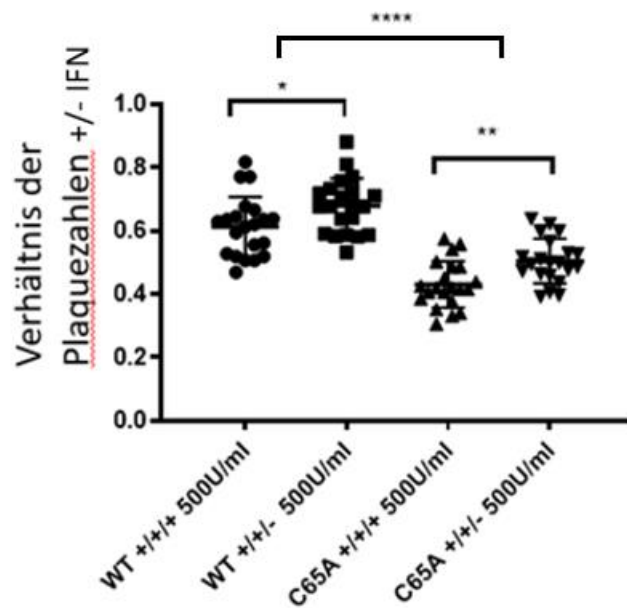
Bei einer Verwendung von 500 U/ml Interferonkonzentration betrug das Verhältnis der Plaquezahlen mit dauerhafter Interferonbehandlung zu den Plaquezahlen ohne Interferonbehandlung 0,613 beim Wildtyp bei der Mutante 0,430. Bei Abnahme des Interferons direkt nach der Infektion betrug das Verhältnis 0,679 (Wildtyp) versus 0,504 bei Infektion mit der Mutante (siehe Abbildung 19).

Die Mutante zeigte sich damit sowohl bei der Verwendung von 100U/ml als auch 500 U/ml Interferonkonzentration signifikant deutlicher von dem Interferon in der Plaquebildung beeinflusst als der Wildtyp ( $p < 0,0001$ ). Wenn das interferonhaltige

Inokulum abgenommen wurde, zeigte sich keine signifikante Änderung des Plaquezahlverhältnisses bei der Verwendung einer Interferonkonzentration von 100 U/ml im Vergleich zur dauerhaften Interferonbehandlung (Wildtyp :  $p=0,8219$ , Mutante  $p=0,6776$ , siehe Abbildung 18). Interessant war, dass bei der Verwendung von 500U/ml sich eine signifikante Erholung sowohl beim Wildtyp als auch bei der Mutante abzeichnete (WT:  $p<0,05$ , Mutante:  $p< 0,01$ ). Möglicherweise hängt dies mit einem deutlicheren Interferoneffekt bei der Verwendung von 500 U/ml als Interferonkonzentration zusammen: Die deutlichere Hemmung der viralen Infektion könnte nach Abnahme des Interferons einen Erholungseffekt sichtbar machen, der bei einer Verwendung einer geringeren Interferonkonzentration weniger deutlich ausfällt.



**Abbildung 18: Verozellen wurden mit Interferon vorbehandelt und mit Wildtyp und DUB-Mutante infiziert.** Eine Kontrollplatte wurde nicht mit Interferon behandelt. Die Abbildung zeigt eine Übersicht über das Verhältnis der Plaquezahlen der mit Interferon behandelten Verozellen zu den Plaquezahlen bei Behandlung ohne Interferon der DUB-Mutante C65A und des Wildtyps bei Abnahme des Inokulums nach Infektion. Die x-Achse zeigt die entsprechende Behandlung und das verwendete Virus an. „+/+/+“ bedeutet, dass auf die Verozellen während der Infektion Interferon hinzugegeben wurde und nach der einstündigen Infektion durch ein interferonhaltiges Medium ersetzt wurde. „+/+/-“ bedeutet dagegen eine Abnahme des interferonhaltigen Mediums nach Infektion mit Ersatz durch ein nicht-interferonhaltiges Medium. Es wurden in dieser Versuchsreihe 100U/ml als Interferonkonzentration benutzt. Die y- Achse zeigt das Plaquezahlenverhältnis an. Die Balken geben jeweils den Mittelwert bzw. die Standardabweichung wieder.  $N=131$  aus vier Versuchen mit jeweils 6-well Platten. ( $ns$  = nicht signifikant, \*\*\*\*  $p<0,0001$ ), two way ANOVA.



**Abbildung 19: Verzellen wurden mit Interferon behandelt und mit der DUB-Mutante und dem Wildtyp infiziert.** Hierbei wurde eine Interferonkonzentration von 500 U/ml gewählt. Eine Kontrollplatte wurde nicht mit Interferon behandelt. Diese Übersicht zeigt das Verhältnis der Plaquezahlen der mit Interferon behandelten Verzellen zu den Plaquezahlen bei Behandlung ohne Interferon der DUB-Mutante C65A und des Wildtyps bei Abnahme des Inokulums nach Infektion. „+/+“ bedeutet, dass auf die Verzellen während der Infektion Interferon hinzugegeben wurde und nach der einstündigen Infektion durch ein interferonhaltiges Medium ersetzt wurde. „+/-“ bedeutet dagegen eine Abnahme des interferonhaltigen Mediums nach Infektion mit Ersatz durch ein nicht-interferonhaltiges Medium. (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ ). Die Balken geben jeweils den Mittelwert bzw. die Standardabweichung wieder.  $N=130$  aus 4 Versuchen, two way ANOVA.

### 3.2 Interferon $\alpha$ 2a Wirkung bei Abnahme 3 Tage nach Infektion

Durch Interferon werden Faktoren induziert, die zur Hemmung des Ablesens des viralen Genoms führen (Orzalli et al., 2013). Nachdem bekannt ist, dass Herpes simplex Virus reaktivieren kann (Burnett et Williams, 1939), wurde in dieser Versuchsreihe untersucht, inwiefern und ob es zur Reaktivierung kommt, wenn man das mit Interferon  $\alpha$  2a versetzte Medium 3 Tage nach Infektion abnimmt, also die Zellen nach Infektion vorerst weiter mit Interferon stimuliert und ob sich der Wildtyp hierbei von der DUB-Mutante

unterscheidet. Angenommen, die DUB-Mutante könnte im Gegensatz zum Wildtyp nicht reaktivieren, gäbe das Aufschluss über die DUB-Funktion während der Infektion. Um den Mediumwechsel durchführen zu können, wurde humanes Serum statt Methylcellulose verwendet. Bei der Abnahme von Methylcellulose besteht die Gefahr, dass das Virus im Zellmedium durch die Abnahme verteilt wird, während bei der Suspension zugesetzten humanem Serum die Antikörper im Medium eine Verbreitung verhindern. Eine unerwünschte Verbreitung des Virus im Zellmedium kann zur Bildung von kometenähnlichen Plaques, die kaum zählbar sind, oder zur vollständigen Auslöschung des Zellrasens führen. Zur Klärung, ob die Verwendung von humanem Serum der Verwendung von Methylcellulose ebenbürtig ist, wurden die Daten aus den vorhergehenden Experimenten hinzugezogen. Der Unterschied zwischen der Fixierung 3 Tage nach Infektion („days post infection“, dpi) bei Verwendung von Methylcellulose und der Verwendung von humanem Serum war nicht signifikant (Wildtyp:  $p=0,37$ , Mutante:  $p=0,20$ ). Humanes Serum verhindert somit vergleichbar effektiv wie Methylcellulose die unerwünschte Verbreitung des Virus im Zellmedium.

Es wurde zunächst das Verhältnis zwischen den Plaquezahlen bei Abnahme des Interferons (+/+/-) und das Verhältnis der Plaquezahlen bei dauerhafter Interferonstimulierung zu den Plaquezahlen ohne Interferonbehandlung berechnet (+/+/+). Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied ( $p=0,105$ , siehe Abbildung 20).

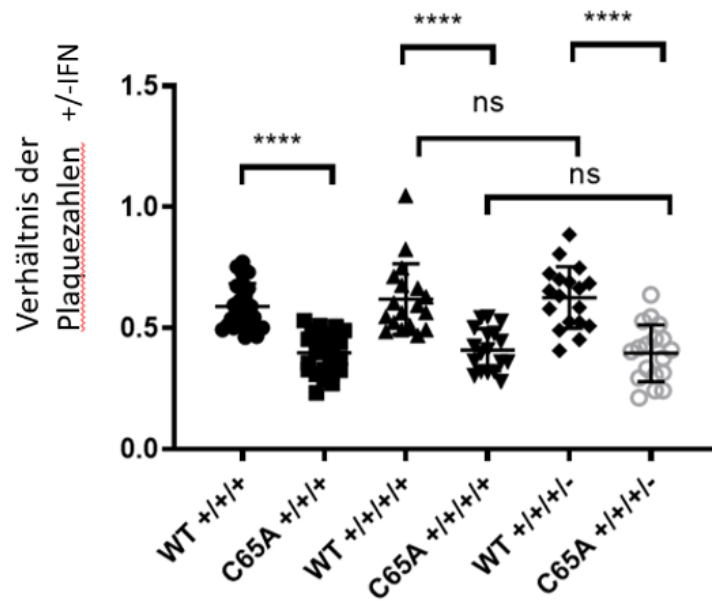
Der Wildtyp zeigte im vorliegenden Plaque-Assay keine Reaktivierung. Es war kein signifikanter Anstieg in den Plaquezahlen nach Abnahme des Interferons zu beobachten. Die Mutante zeigte sich stärker als der Wildtyp von dem Interferon gehemmt, zeigte jedoch auch keine Reaktivierung. Möglicherweise basiert der stärkere Interferoneffekt auf die Mutante auf Abläufen, die früh in der Infektion, vor oder beim Eindringen des Virus in den Zellkern stattfinden und damit hat eine Abnahme des Interferons keinen weiteren Effekt mehr.

Bei Betrachtung der Verhältnisse zeigt sich die bereits vorherig beschriebene stärkere Beeinflussung der Mutante durch die Interferonbehandlung:

Der Mittelwert des +/- IFN Verhältnis des Wildtyps liegt bei einer durchgängigen Behandlung und Fixierung 3dpi bei 0,58 (Standardabweichung= 0,094), bei der Mutante dagegen bei 0,39 (Standardabweichung=0,085). Der Effekt ist mit einer Differenz der Mittelwerte von 0,192 ( $p < 0,0001$ ) statistisch signifikant. Dies zeigt den stärkeren Einfluss des Interferons auf die Mutante im Vergleich zum Wildtyp.

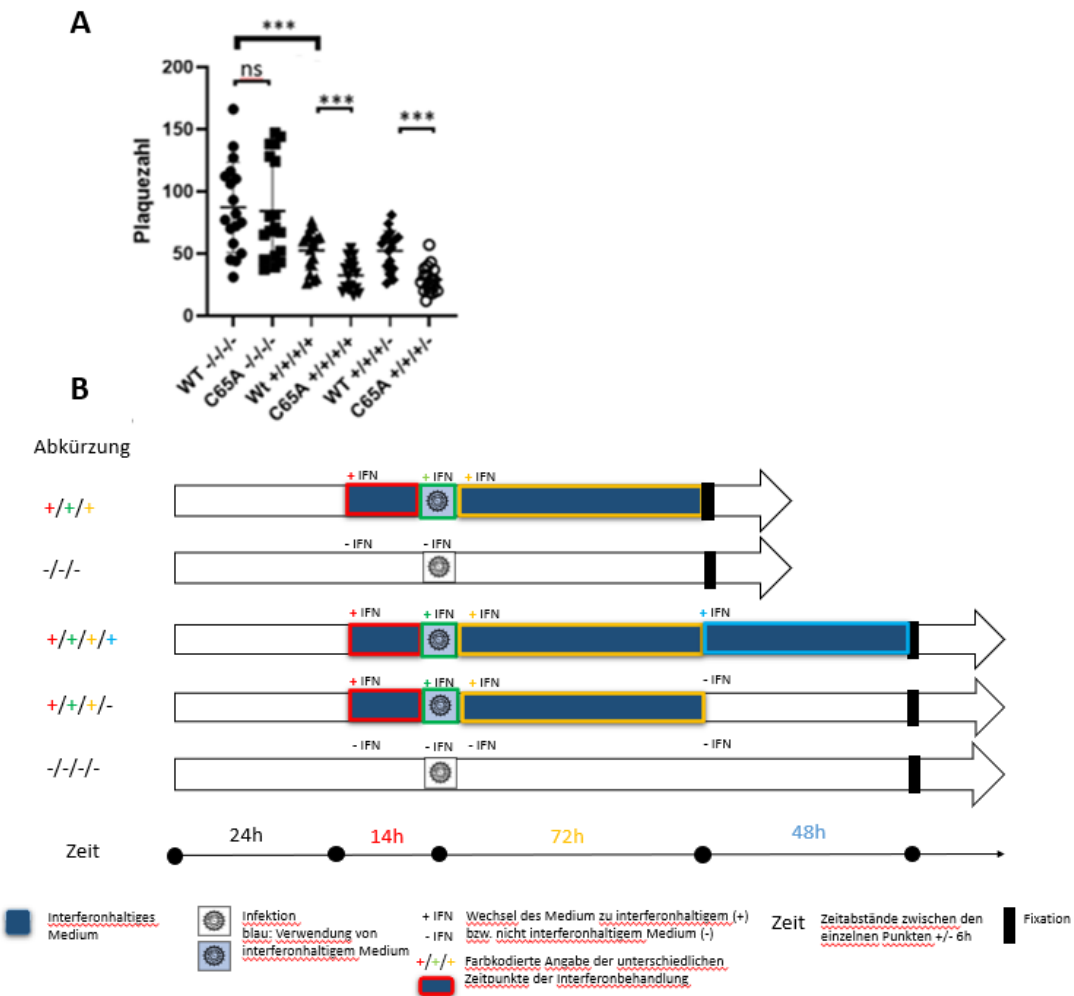
Bei einer durchgängigen Behandlung des Wildtyps mit Interferon und Fixierung 5dpi betrug beim Wildtyp der Mittelwert des Plaquezahlenverhältnisses 0,62 (Standardabweichung= 0,146), bei der Mutante 0,41 (Standardabweichung= 0,087). Der Unterschied in den Verhältnissen der Plaquezahlen war auch hierbei signifikant bei Vergleich der beiden Viren mit einer Differenz von 0,211 ( $p < 0,0001$ ). Das bedeutet, der Interferoneinfluss ist auch nach 5 Tagen bei der Mutante stärker ausgeprägt.

Ein Wechsel des Mediums von interferonhaltigem Medium zu nicht interferonhaltigem Medium zeigte beim Wildtyp keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur durchgängigen Interferonbehandlung. ( $p=0,85$ ). Bei der Mutante zeigte sich ein ähnliches Ergebnis ( $p=0,51$ ) bei Vergleich der Gruppen mit durchgehender Interferonbehandlung im Vergleich zur Abnahme des Interferons 3dpi. Ein Vergleich zwischen Wildtyp und Mutante bei Wechsel des interferonhaltigen Mediums ergab einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,0001$ ).



**Abbildung 20:** Übersicht über das Verhältnis der Plaquezahlen von mit interferonbehandelten Verozellen (+) zu nicht mit Interferon behandelten Verozellen (-) des Wildtyps und der Mutante bei Abnahme des Interferons 3dpi. Die x-Achse zeigt die entsprechende Behandlung und das verwendete Virus an. Hierbei bedeutet „+/+/+“, dass dreimal Interferon hinzugegeben wurde (vor, während und nach der Infektion bis zur Fixierung) und die Platte 3dpi fixiert worden ist. „+/+/+“ bedeutet eine Interferonbehandlung über 5 Tage, wobei zusätzlich Interferon 3d nach der Infektion ausgetauscht wurde. „+/+/+/-“ eine Abnahme des Interferons 3dpi. Die Balken geben jeweils den Mittelwert bzw. die Standardabweichung wieder, N=162 \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , one way ANOVA.

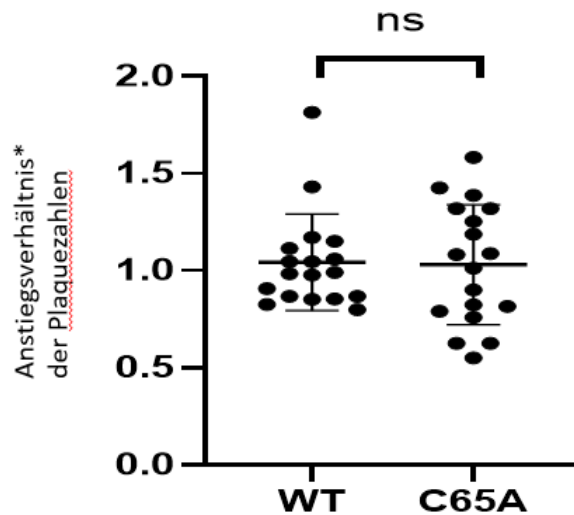




**Abbildung 21: Übersicht über die Plaquezahlen (A) in der vorliegenden Versuchsreihe bei Abnahme des Interferons drei Tage nach Infektion und des Protokolls (B).** Abbildung A zeigt in der x-Achse den Wildtyp und die Plaquezahlen ohne Interferonstimulation (-/-/-/-), die dauerhafte Interferonstimulation (+/+ / + / + / +), sowie die Abnahme 72h nach Infektion (+ / + / + / -). Die y-Achse gibt die zugehörigen Plaquezahlen wieder. Während die Plaquezahlen ohne Interferoneinfluss (- / - / - / -) unter beiden Viren vergleichbar erscheinen, zeigt sich durch Interferonstimulation ein Abfall in der Plaquezahl, deutlicher bei der Mutante, als beim Wildtyp (+ / + / + / +). Wird der Interferoneinfluss aufgehoben (+ / + / + / -) besteht dieser weiter, wie an der annähernd gleichbleibenden Plaquezahl zu erkennen ist. Die Balken geben jeweils den Mittelwert bzw. die Standardabweichung wieder, \*  $p < 0,05$  \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , one way ANOVA.

Nachdem bei der Verwendung von humanem Serum auch am 3dpi Platten fixiert wurden, konnte direkt der Anstieg der Plaquezahlen gemessen werden. Hierzu wurde das Verhältnis gebildet aus den Plaquezahlen (+ / + / + / -) / (5dpi) / (+ / + / +) (3dpi). Bei beiden Viren betrug das Anstiegsverhältnis etwa 1, d.h. es gab keinen deutlichen Anstieg.

Es zeigte sich zudem kein signifikanter Unterschied zwischen den Viren ( $p=0,903$ ), siehe Abbildung 22.



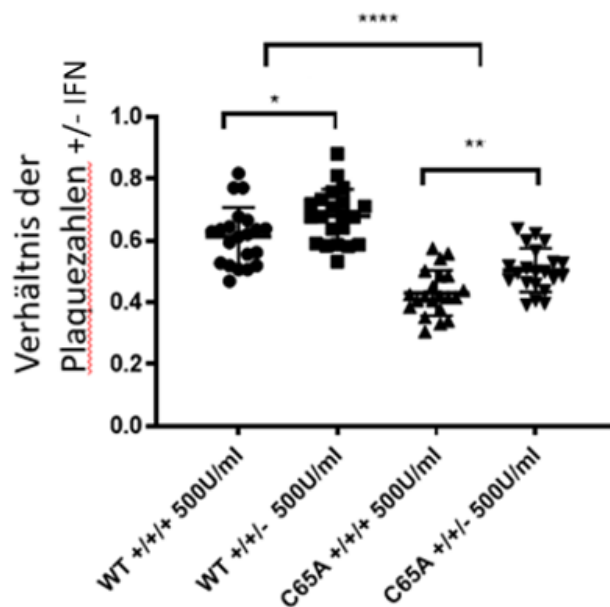
**Abbildung 22: Übersicht des Anstiegs beider Viren.** Hierzu wurden die Plaquezahlen nach 5 Tagen mit Interferonwechsel und die Werte der Plaquezahlen nach 3 Tagen zueinander in das Verhältnis gesetzt. Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied.  $N=35$  mit Werten aus drei Versuchen,  $p=0,8537$ , one way ANOVA

\* Anstiegsverhältnis: Verhältnis der Plaquezahlen mit Interferonabnahme 5dpi zu den Plaquezahlen ohne Interferonabnahme (3dpi).

Ein Interferoneffekt war gegeben wie aus dem signifikanten Plaqueabfall bei Behandlung der Platten mit Interferon zu ersehen ist ( $p<0,001$ , siehe Abbildung 21). Eine Abnahme des Interferons 3dpi erbrachte ebenfalls einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur unbehandelten Gruppe ( $p<0,001$ ) sowohl beim Wildtyp als auch bei der DUB-Mutante. Während die Abnahme des Interferons direkt nach Infektion beim Wildtyp bei der Verwendung von 500U/ml Interferon  $\alpha$  eine signifikante Erholung der Plaquezahlen beschrieb (siehe Abbildung 23), zeigte sich bei Abnahme des Interferons 3dpi kein signifikanter Unterschied in der Erholung der Plaquezahlen ( $p=1$ ). Bei der Mutante zeigte sich ein ähnliches Ergebnis ( $p=0,906$ ), siehe auch Abbildung 20.

Die Ergebnisse zeigen, dass die DUB-Mutante von Interferon  $\alpha$  stärker in der

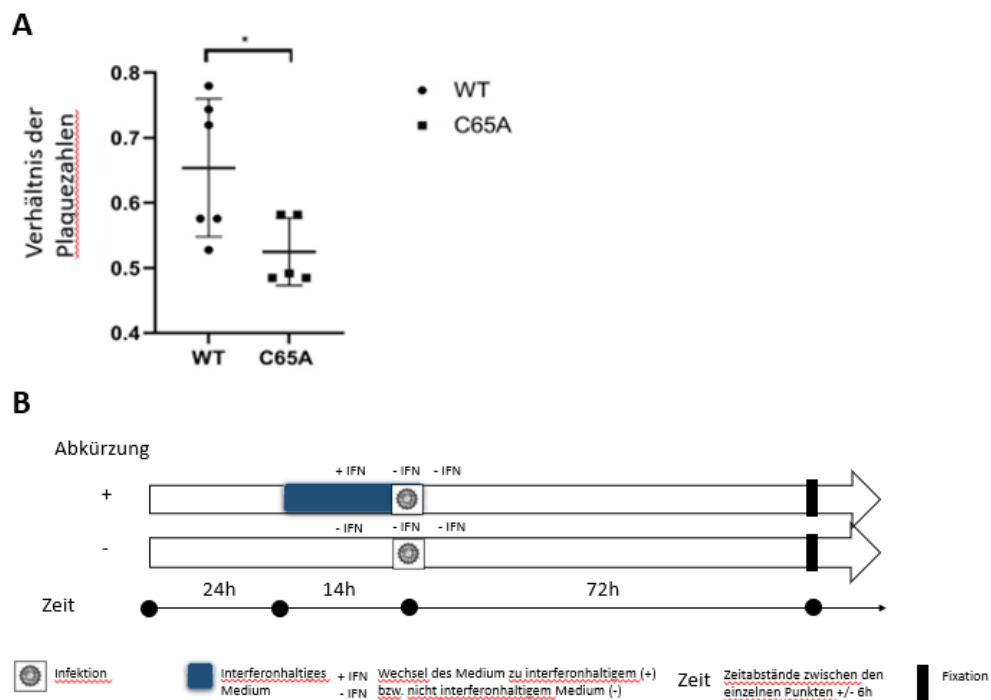
Plaquezahlenbildung gehemmt wird als der Wildtyp. Auch nach Abnahme des Interferons – sowohl drei Tage nach Infektion als auch direkt nach der Infektion - bleibt der Unterschied zwischen Wildtyp und DUB – Mutante bestehen. Es kommt nach Abnahme des Interferons direkt nach Infektion zu einer signifikanten Erholung der Plaquezahlen bei Wildtyp und DUB- Mutante (siehe Abbildung 23). Bei der Abnahme drei Tage nach Infektion zeigt sich keine signifikante Erholung weder bei Wildtyp noch Mutante (siehe Abbildung 20).



**Abbildung 23: Verozellen wurden mit Interferon behandelt und mit der DUB-Mutante und dem Wildtyp infiziert, wobei eine Interferonkonzentration von 500 U/ml gewählt worden ist.** Eine Kontrollplatte wurde nicht mit Interferon behandelt. Diese Übersicht zeigt das Verhältnis der Plaquezahlen der mit Interferon behandelten Verozellen zu den Plaquezahlen bei Behandlung ohne Interferon der DUB-Mutante C65A und des Wildtyps bei Abnahme des Inokulums nach Infektion. „+/+ +“ bedeutet, dass auf die Verozellen während der Infektion Interferon hinzugegeben wurde und nach der einstündigen Infektion durch ein interferonhaltiges Medium ersetzt wurde. „+/-“ bedeutet dagegen eine Abnahme des interferonhaltigen Mediums nach Infektion mit Ersatz durch ein nicht-interferonhaltiges Medium. (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ). Die Balken geben jeweils den Mittelwert bzw. die Standardabweichung wieder. N=130 aus 4 Versuchen, two way ANOVA.

### 3.3. Ergebnis bei Vorbehandlung der Zellen mit Interferon ohne erneute Zugabe während oder nach der Infektion

Um den Effekt des stärkeren Einflusses des Interferons auf die DUB-Mutante im Infektionsablauf besser eingrenzen zu können, wurde überprüft ob eine alleinige Vorbehandlung der Zellen mit Interferon  $\alpha$  2a einen Interferoneffekt hervorruft, wurde ein verkürztes Protokoll durchgeführt, bei dem die Zellen nur mit Interferon  $\alpha$  2a vorbehandelt wurden, und nicht während oder nach der Infektion erneut Interferon zugegeben wurde. Der Vergleich der Verhältnisse der Plaquezahlen mit Interferonbehandlung zu den Plaquezahlen ohne Interferonbehandlung ergab einen signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante ( $p = 0,0357$ ).



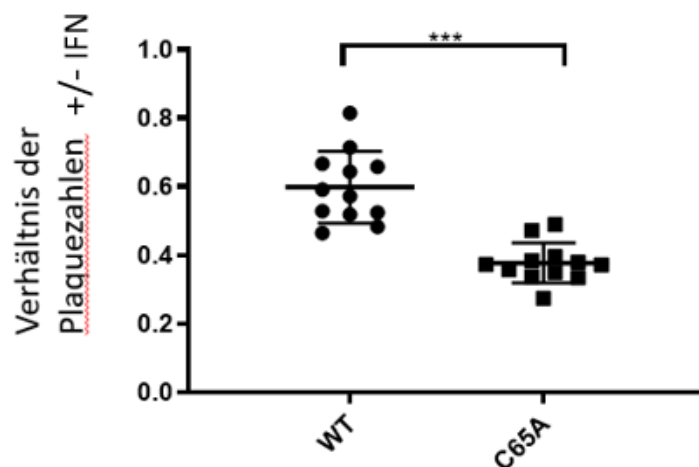
**Abbildung 24: Verhältnis der Plaquezahlen nach Infektion mit Wildtyp und der DUB-Mutante nach Vorbehandlung mit Interferon.** Zur Infektion wurden Verozellen benutzt. **A zeigt das Verhältnis der Plaquezahlen mit Interferonbehandlung zu ohne Interferonbehandlung.** Es zeigte sich auch hier ein signifikanter Unterschied zwischen

Mutante und Wildtyp. **B zeigt das Protokoll** mit den unterschiedlichen Zeitpunkten der Interferonzugabe, n=11 \*p<0,05, one way ANOVA

### 3.4. Ergebnisse bei Einsatz eines anderen Virenstammes

Um zu überprüfen, ob die Ergebnisse bei Einsatz eines anderen Virenstranges replizierbar sind, wurde ein Virusstrang mit mCherry Mutation zur Infektion von mit Interferon vorbehandelten Verozellen eingesetzt. Das fluoreszierende mCherry – Protein, das die Viren aufgrund einer molekulargenetischen Veränderung tragen, wird im Fluoreszenzmikroskop rotleuchtend sichtbar (Subach et al., 2009). Hier wurde die Arbeit damit durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Ergebnisse mit einem weiteren Virusstrang replizierbar sind.

Eine reine Vorbehandlung der Zellen ergab bei der Infektion mit durch mCherry-Mutation veränderte Viren ähnliche Resultate. Bei Betrachtung der Verhältnisse der Plaquezahlen mit Interferon behandelten Platten (+) zu unbehandelten Platten (-) zueinander ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Viren (p=0,0002), siehe Abbildung 25.

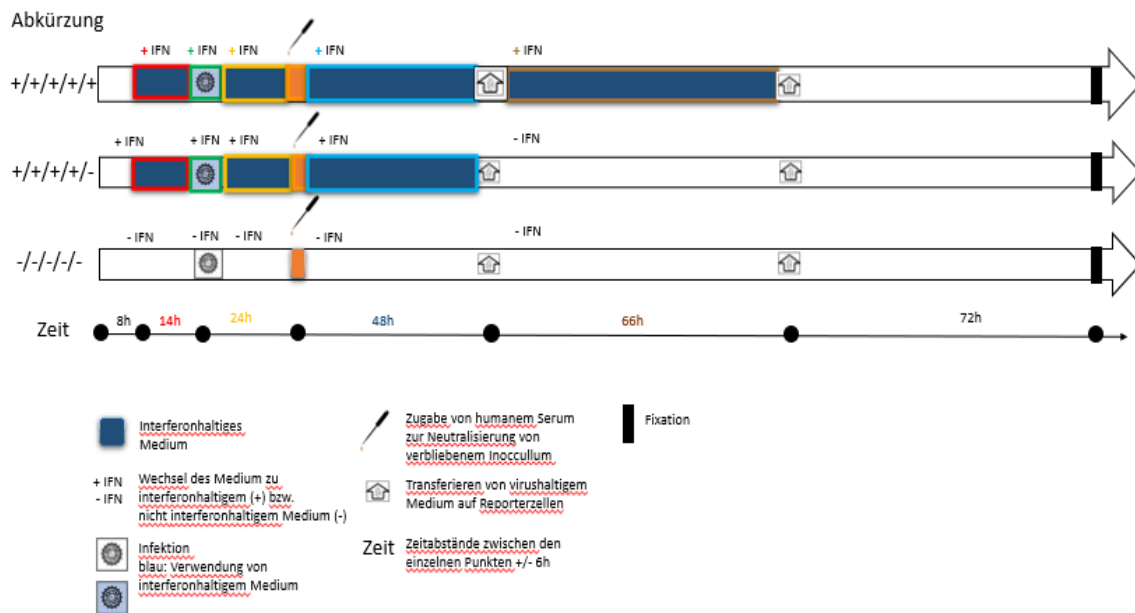


**Abbildung 25: Übersicht über die Ergebnisse bei der Verwendung von mit mCherry veränderten Virus.** Die y-Achse zeigt das Verhältnis der Plaquezahlen an. Hier zeigt sich derselbe Effekt wie in den vorhergegangenen Versuchen. Dies zeigt, dass der stärkere Einfluss des Interferons auf die DUB Mutante auch in einem anderen Virenstrang replizierbar ist. Die y-Achse zeigt das Verhältnis zwischen den Plaquezahlen an. Der

*Wildtyp und die Mutante unterscheiden sich hierbei signifikant ( $p=0,0002$ )  $n=24$ , one way ANOVA.*

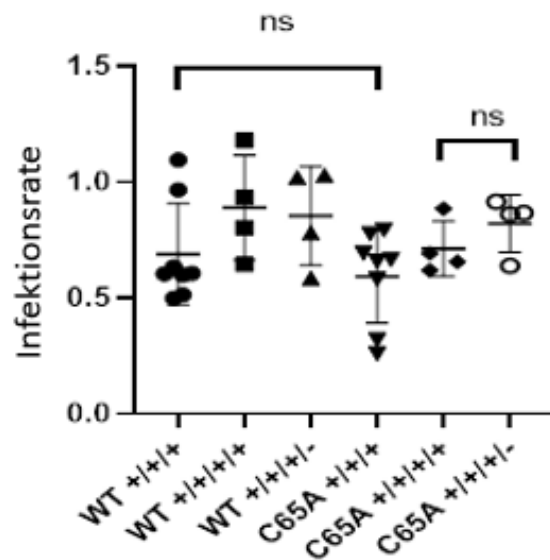
### 3.5. Entwicklung eines Reaktivierungs-Test-Systems

Um eine mögliche Reaktivierung von Wildtyp und Mutante nach Abnahme des Interferons weiter zu untersuchen, wurde ein Versuch mit Platten mit 96 Vertiefungen entwickelt. Als Zelllinie wurden Verozellen verwendet. Die Verwendung von Platten mit 6 Vertiefungen hat den Nachteil, dass die Zellen infiziert werden könnten, ohne dass die Virusproduktion ausreicht, um einen sichtbaren Plaque zu bilden, womit die Zellen nicht als infiziert erkannt werden können. Außerdem könnte die Neutralisierung durch humanes Serum nicht ausreichen, um die Bildung von Sekundärplaques nach Infektion zu verhindern. Deshalb wurde ein Versuch mit Platten mit 96 Vertiefungen entwickelt. Hierzu wurden Platten mit Interferon behandelt, infiziert mit einer PFU, die etwa 60% der Platte infiziert (0,221875 PFU/Well (DUB- Mutante C65A) und 0,1775 PFU/Well (Wildtyp)) Später wurde das Medium von den Platten abgenommen und auf Zellplatten mit ebenfalls 96 Vertiefungen, die weiter inkubiert wurden, übertragen, um ein eindeutiges Ergebnis zu ermitteln. Die Zellplatten, auf welche das Medium übertragen wurde, wurden als Reporterzellplatten bezeichnet und weiter inkubiert. Die weitere Inkubation der Reporterzellplatten, die mit einer vollständigen Auslöschung einhergeht, verhindert, dass Zellen fälschlicherweise als nicht infiziert angesehen werden. Abbildung 26 zeigt das Protokoll schematisch.



**Abbildung 26: Übersicht über das Protokoll. „+“ und „-“ gibt die Zugabe (+) oder Abnahme (-) von Interferon an. Der Pfeil zeigt die Zeit mit den jeweiligen Zeitabständen zwischen einem Ereignis an. Zunächst wurden die Platten mit Interferon behandelt und dann infiziert. Anschließend erfolgte eine Weiterbehandlung mit Interferon. Dann die Neutralisation von potenziell noch vorhandenem Virus der Infektionsdosis im Medium durch Waschen mit humanem Serum, um eine Übertragung von Virus aus dem Inoculum, das keine Zellen infiziert hat, auf die Reporterzellplatten zu vermeiden. Denn dies könnte das Ergebnis verfälschen. Nach zwei Tagen fand die erste Übertragung auf Reporterzellplatten statt. Nach weiteren 66h die zweite Übertragung. Nach drei Tagen erfolgte die Fixierung.**

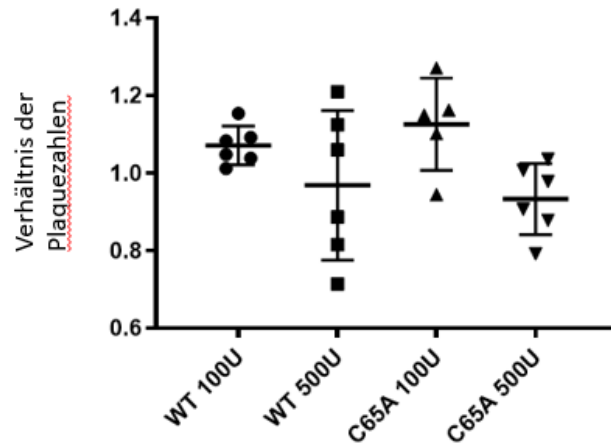
Insgesamt betrachtet zeigte sich ein Interferoneffekt, wie an dem Verhältnis der infizierten Well von mit Interferon behandelten Platten zu unbehandelten Platten ersichtlich ist. Der Vergleich beider Viren zeigte keinen signifikanten Unterschied bei Vergleich der Platten drei Tage nach Infektion bei Betrachtung der Verhältnisse der infizierten Well der mit Interferon behandelten Platten zu den unbehandelten Platten (siehe Abbildung 27).



**Abbildung 27: Übersicht über die Infektionsrate bei der Verwendung von 96-well Platten, n=4.** Die Infektionsrate ist das Verhältnis der infizierten Wells zu allen 96-wells. Die x-Achse gibt den verwendeten Virus sowie die Häufigkeit des hinzugegebenen Interferons (+) bzw. seine Abnahme (-) wieder. Es zeigte sich entgegen den vorherigen Versuchen kein signifikanter Unterschied zwischen Mutante und Wildtyp. Die Balken zeigen den Mittelwert bzw. die Standardabweichung, one way ANOVA.

Interessanterweise konnten gleichzeitig stattfindende Versuche mit Platten mit 6 Vertiefungen, wobei die Zellen wie vorher beschrieben mit Interferon behandelt, infiziert, neutralisiert und später fixiert wurden, keinen signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante zeigen bei ausbleibenden Interferoneffekt (siehe Abbildung 28).





**Abbildung 28:** Um die Qualität des Materials zu prüfen, wurde ein Versuch mit Vorbehandlung der Zellen und Zugabe des Interferons während der Infektion durchgeführt. Hier zeigte sich entgegen den anderen Plaque-versuchen kein signifikanter Interferoneffekt ( $p > 0,05$ , one way ANOVA) und kein Unterschied zwischen der DUB-Mutante und dem Wildtyp. Nachdem mit demselben Material gearbeitet wurde, mit dem auch die Versuche an den Platten mit 96 Vertiefungen durchgeführt wurden, ist am ehesten von einem Materialfehler auszugehen, der auch die Ergebnisse der 96-well Platten negativ beeinflusst. Vermutlich reichte die Qualität des Interferons nicht aus.

Das komplette Versuchsmaterial wurde ausgewechselt, einschließlich der verwendeten Viren. Anschließend zeigte sich wieder der vorher beschriebene Phänotyp in den durchgeführten Plaque-versuchen. Es ist daher möglich, dass zum Zeitpunkt der Durchführung ein Defekt im verwendeten Material vorlag, weshalb die Ergebnisse nicht aussagekräftig sind. Wie an Abbildung 27 ersichtlich ist, war der Interferoneffekt sehr gering bis kaum vorhanden. Vermutlich war daher das Interferon in der Struktur beschädigt, wodurch der Interferoneffekt beeinträchtigt wird.

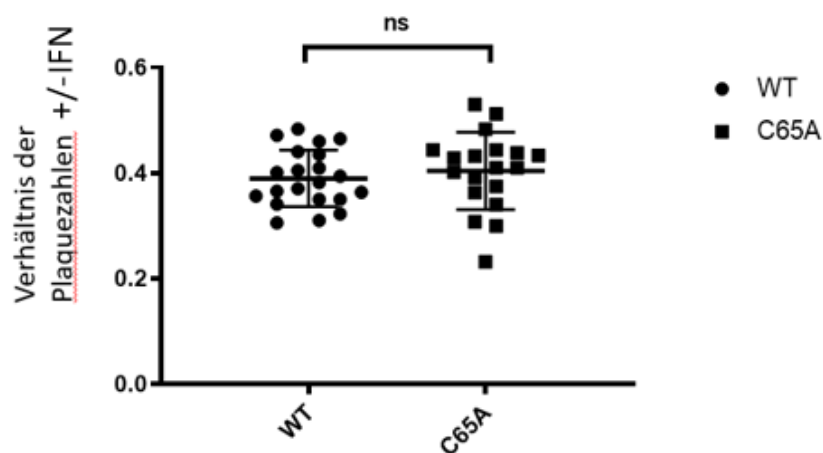
### 3.6. Ergebnisse des Plaque-Assays mit Vorbehandlung mit Interferon vor Infektion bei Verwendung von U-2 OS Zellen statt Verozellen

Nachdem bekannt ist, dass U-2 OS Zellen mit ICPO Mutanten infiziert werden können, obwohl ICPO Mutanten in Verozellen kaum infektiös sind, (Yao et Schaffer, 1995) wurde untersucht, inwiefern und ob sich die Infektion von U-2 OS Zellen mit einer DUB-Mutante von Verozellen unterscheidet. U-2 OS Zellen weisen eine Beeinträchtigung im

Interferonsignalweg aufgrund eines Defekts im STING-Signalweg auf (Deschamps et Kalamvoki, 2017) Von einer Untersuchung unter der Verwendung von U-2 OS Zellen erhoffte man sich weitere Erkenntnisse, die auf den beteiligten Signalweg, der bei Verozellen die stärkere Hemmung der DUB-Mutante unter Interferoneinfluss bewirkt, hindeuten könnten.

Hierfür wurden U-2 OS Zellen mit Interferon vorbehandelt und anschließend mit der DUB-mutante und dem Wildtyp infiziert, nachdem wie in Abbildung 24 ersichtlich ist, eine Vorbehandlung der Zellen mit Interferon ausreichend ist, um den stärkeren Effekt von Interferon auf die DUB-Mutante zu zeigen. In U-2 OS Zellen konnte der stärkere Interferoneinflusses auf die Mutante nicht gezeigt werden, obwohl ein deutlicher Interferoneffekt zu erkennen war. Sowohl der Wildtyp, als auch die Mutante waren durch das Interferon gehemmt, jedoch beide in gleichem Ausmaß. Der Mittelwert in den Verhältnissen der Plaquezahlen zueinander betrug beim Wildtyp 0,40, bei der Mutante 0,38, der Unterschied war nicht signifikant (siehe Abbildung 29,  $p=0,48$ , one way ANOVA).

Dies steht im Gegensatz zu den Versuchen mit Verozellen, bei denen sich der Wildtyp und die Mutante signifikant hinsichtlich der Stärke des Interferoneffekts unterscheiden (siehe Abbildung 24).



**Abbildung 29: Übersicht über die Verhältnisse der Plaquezahlen von mit Interferon behandelten Platten (+) zu unbehandelten Platten (-) von Wildtyp und Mutante bei der Verwendung von U-2 OS Zellen, welche vor Infektion mit Interferon vorbehandelt**

worden sind. Die Balken geben den Mittelwert bzw. die Standardabweichung wieder ( $p=0,48$ , one way ANOVA).

## 4. Diskussion

### 4.1. Diskussion der eingesetzten Methoden

Ubiquitinierung und Deubiquitinierungsprozesse sind ein wichtiger Faktor für die Zellregulation und damit wichtig für die virale Evasion der zellulären Immunantwort (Kumari et Kumar, 2018).

Zur Untersuchung, ob das Wildtyp-Herpesvirus im Vergleich zur DUB-Mutante nach Abnahme des Interferons reaktiviert wird, wurde ein Plaque-versuch entwickelt, der durch die Verwendung von humanem Serum eine Abnahme des interferonhaltigen Mediums nach Infektion ermöglicht, sowie ein Versuchsablauf, der durch die Verwendung von Reporterzellen eine Übertragung des virushaltigen Mediums nach Interferonstimulation ermöglicht.

Vorteil eines Plaque-Assays ist, dass Plaque-Assays eine etablierte Methode in der virologischen Forschung seit den 1960er Jahren bilden (Russell, 1962). Fehler in den Ergebnissen sind also weniger in der Methode an sich zu erwarten, sondern in dem verwendeten Material oder Fehlern in der Durchführung. Initiale Versuche zeigten keinen Unterschied im Phänotyp zwischen Wildtyp und DUB-Mutante. Nach Auswechseln des gesamten Versuchsmaterials, zeigte sich der Phänotyp wieder. Unterschiedliche Erklärungsansätze sind hierzu denkbar: Die Zellen wurden in unterschiedlichen Passagen mit Virus infiziert. Zwar wurde darauf geachtet, die Zellen nur bis zu einer gewissen Passagezahl zu verwenden, jedoch steigt mit zunehmender Zeit der Nutzung der Zelllinie die Gefahr von Alterung oder Kontamination. Auch das Aussäen der Zellen in unterschiedlicher Dichte ist eine potenzielle Fehlerquelle, nachdem ein zu dichtes Zellwachstum ebenfalls einen Stressfaktor bildet. Des Weiteren sind potenzielle Fehlerquellen die Kontamination des Mediums oder die unterschiedliche Temperatur des Mediums. Wenn auch darauf geachtet wurde, die Zellen nicht mit kaltem Medium zu splitten oder zu behandeln, wurde die Temperatur des Mediums vorher nicht

gemessen, woraus sich je nach Menge des Mediums in der Flasche oder nach Standdauer unterschiedliche Temperaturen ergeben. Zu geringe Temperatur kann Stress auf die Zellen ausüben (Gibco, 2016). Gestresste Zellen können unterschiedlich in den Experimenten reagieren (Halliwell, 2014).

Bei der Verwendung von humanem Serum könnte eine zu geringe Neutralisationskraft des humanen Serums trotz des Nachweises einer 1000-fachen Reduktion (siehe Abbildung 13) die Quelle von Plaques sein, die sich nach Infektion durch Verteilung von Virus im Medium neu bilden. Ebenso bei zu geringer Menge von Methylcellulose, welche die Verbreitung von Sekundärplaques begünstigt. Mikroplaques konnten vereinzelt beobachtet werden, wenn sich eine Plaque kometenschweifartig durch Bewegung der Platte oder zu wenig Neutralisationskraft ausbreiten konnte oder um einen großen Plaque mehrere Mikroplaques sichtbar waren und diesem als zugehörig interpretiert wurden. Selbst bei Ausschluss betroffener Versuche ist nicht auszuschließen, dass bei den anderen Versuchen entsprechende Mikroplaques vorlagen, die als solche nicht erkannt worden sind. Versuche mit Platten mit 96 Vertiefungen ermöglichen es, diese Limitierungen zu umgehen, in dem ein Well entweder vollständig lysiert ist oder nicht.

Bei Durchführung der Plaque-Assays musste darauf geachtet werden, dass die Plaques noch auszählbar waren, was die Frage aufwirft, ob sich neue Plaques gebildet hätten, wenn die Platten länger beobachtet worden wären. Am 6. Tag wäre aber eine Auszählung nicht mehr aufgrund der weiteren Ausbreitung der Plaques möglich gewesen. Eine Verschiebung der ersten Auszählung auf den 2. Tag wäre denkbar gewesen. Hier wäre es aber möglich gewesen, kleine Plaques auf den mit Interferon vorbehandelten Platten zu übersehen, die im Anschluss sich weiter ausbilden und fälschlicherweise der Reaktivierung des Virus zugeschrieben worden wären. Experimente mit mCherry-Virus hätte hierbei geholfen, die infizierten Zellen von den nicht infizierten bereits früher zu unterscheiden aufgrund der Fluoreszenz des molekularbiologisch veränderten Virus.

Die Verwendung von Reporterzellen bei Verwendung von Platten mit 96 Vertiefungen bietet eine Möglichkeit, diese Einschränkungen in der Beurteilbarkeit zu umgehen, nachdem bei vollständiger Lyse des Zellrasens ein eindeutiges Ergebnis vorliegt. Denn die Vertiefungen in den Platten erscheinen dann „leer“. Einschränkungen zeigte die

Verwendung von Reporterzellen jedoch hinsichtlich der langen Dauer der Experimente. Auch könnte in ein einzelnes Well eine Infektionsdosis gelangen, die bspw. zwei oder mehr PFU entspricht.

Erneute Versuche mit einem verkürzten Protokoll könnten weiteren Aufschluss bringen.

## 4.2. Diskussion der erzielten Ergebnisse

Viele der Funktionen des größten herpesviralen Tegumentproteins pUL36 sind bekannt. Die DUB-Funktion dieses Proteins ist jedoch nicht vollständig geklärt. In den vorliegenden Versuchen konnte eine stärkere Hemmung des Infektionsgeschehens durch Interferon bei der DUB-Mutante im Vergleich zum Herpesvirus-Wildtyp gezeigt werden. Die Ergebnisse zeigen, dass die Funktion der DUB für das Virus einen Vorteil im Infektionsgeschehen unter Interferoneinfluss darstellt. Bisher war dieser Effekt in Zellkultur nicht nachweisbar. Bei der Verwendung von U-2 OS Zellen zeigte sich kein Unterschied in der Plaquezahlbildung zwischen Wildtyp und der DUB-Mutante trotz Vorbehandlung mit Interferon. Dies könnte durch einen Defekt der U-2 OS Zellen im STING-Signalweg (Deschamps et Kalamvoki, 2017) begünstigt sein. Interessanterweise zeigen neuere Studien, dass die Deubiquitinase den STING-pathway und damit die IFN-1 Expression hemmt, womit die Infektion des Gehirns erleichtert wird (Bodda et al., 2020). Eine Abnahme des Interferons bewirkte in den meisten durchgeführten Versuchen weder beim Herpesvirus- Wildtyp noch bei der DUB-Mutante eine Reaktivierung mit Bildung von Viren. Bei der direkten Abnahme des Interferons nach Infektion war bei der Exposition der Zellen mit 500 U/ml Interferon eine leichte Reaktivierung bei beiden Viren, die bei der Mutante etwas deutlicher ausfiel, zu erkennen, nicht bei der Abnahme des Interferons 3 Tage nach Infektion. Das könnte bedeuten, dass bei Abnahme des Interferons direkt nach Infektion noch einzelne Viren aus der Zellperipherie in den Kern eindringen können, die bei einer längeren Exposition mit Interferon abgebaut werden, sowohl bei Wildtyp als auch bei der DUB-Mutante. Dies würde bedeuten, dass das Interferon neben der längerfristigen Hemmung einen kurzlebigen Effekt aufweist.

Je nach Zelllinie bzw. Dauer der Behandlung und Interferondosis sind 500-1000 durch Interferon stimulierbare Gene bekannt. (Schoggins et Rice, 2011) Es werden 50-300 E3-Ligasen, die an der Ubiquitinierung durch Interferon stimuliert (Medvar et al., 2016). Sie stellen somit die „Gegenspieler“ zu einer Deubiquitinase dar. Es ist durch die Vielzahl an stimulierten Genen und gebildeten E3-Ligasen schwierig den biomechanischen Ablauf nachzuvollziehen.

Die stärkere Hemmung der Mutante im Infektionsgeschehen im Vergleich zum Wildtyp nach Stimulation der Zellen durch Interferon lässt deshalb verschiedene Erklärungsmöglichkeiten zu. Die stärkere Hemmung der DUB-Mutante könnte durch eine geringere Geschwindigkeit auf dem Weg zum Zellkern und damit einem höheren Abbau bedingt sein, einer verminderten Fähigkeit der Mutante zum Eindringen in den Zellkern sein. Sie könnte auch stärker als der Wildtyp unter Interferoneinfluss in der viralen Genexpression behindert sein. Nachdem Reaktivierung in Zellen vorbeschrieben ist, (Burnett et Williams, 1939) könnte die Mutante entweder interferonvermittelt an der Transkription gehindert werden, wie für MCMV bereits demonstriert (Dağ et al., 2014), oder die Ausbreitung im Zellrasen durch antivirale zelluläre Signalwege, wie bspw. Apoptose der infizierten Zelle, blockiert werden (Yu et al., 2016). Nachdem sowohl bei dem Wildtyp als auch der Mutante kein deutlicher Unterschied nach Abnahme des Interferons drei Tage nach Infektion im Vergleich zur weiteren Interferonstimulierung vorliegt, jedoch ein signifikanter nach Abnahme des Interferons direkt nach Infektion, sowohl beim Wildtyp als auch der Mutante, zeigt einen kurzlebigen Effekt. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Abläufe früh in der Infektion geschehen, beispielsweise beim mikrotubuli-vermittelten Transport zum Zellkern. Dass sich sowohl beim Wildtyp als auch der Mutante die Plaquezahl nach Abnahme von Interferon eine Stunde nach Infektion leicht erhöht, kann damit erklärt werden, dass Viren, die in der einstündigen Infektionszeit mit Interferonstimulation den Zellkern noch nicht erreicht haben, anschließend noch in den Nukleus eindringen. Würde die Mutante nach Abnahme des Interferons deutlich weniger Plaques als der Wildtyp ausbilden, spräche dies für eine Unterdrückung der Replikation der Mutante mit Reaktivierung nach ausbleibender Interferonstimulation. Durch Interferon induzierbare Proteine, wie Lymphozyten

Antigen 6 (Ly6) bei Coronavirusinfektionen (Pfaender, 2020), oder NCOA7 bei der Infektion mit Influenza A Virus (Doyle, 2018) hemmen die Fusion des Virus mit der Zellmembran, behindern also die Infektion bereits bei einem sehr frühen Zeitpunkt. Bei Eindringen in die Zelle wird durch Erkennen des herpesviralen Oberflächenproteins gD3 Interferon ausgeschüttet und dadurch IRF-3 aktiviert, welches ein Transkriptionsfaktor antiviraler Proteine ist. Möglicherweise versucht die Zelle dadurch möglichst direkt nach Infektion zu verhindern, dass sich das Herpesvirus in der Zelle etablieren kann (Roizman et al., 2013). Die Endozytose des Virus wird bei Hepatitis – C Viren durch interferoninduzierte Proteine der IFITM – Gruppe („IFITM“ für Interferon induzierte transmembrane Proteine) gestört, die die in den Vesikeln sich befindenden Viren zum lysosomalen Abbau markieren (Narayana, 2015). In Sendai-Virus wurde gezeigt, dass der Transport zum Zellkern durch ADAP-2, ein durch Interferon stimuliertes Protein, gestört wird (Shu, 2015). Außerdem wird die virale Replikation durch die durch das durch Interferon stimulierte PKR gestört, sowie die virale mRNA durch OAS und die RNase L abgebaut. Im Nucleus erkennt das das Interferoninduzierte Protein 16 (IFI-16) virales Genom und supprimiert dessen Expression bei Hepatitis B Viren (Yang, 2020). Außerdem nutzt Influenza Virus A die zelleigene endosomale Zellstruktur für das Ausschleusen aus der Zelle. (Sanyal et al., 2013) Interferon hemmt also die virale „Übernahme“ der zellulären Strukturen. Diese Beispiele zeigten, dass Interferoninduzierte Gene die Infektion an verschiedenen Punkten des Infektionsablaufes hemmen oder blockieren können, und bereits bei der Fusion des Virus mit der Zellmembran die Infektion behindern. Die DUB Funktion könnte also an vielen verschiedenen Punkten den zellulären Abwehrmechanismus hemmen.

Dass ein Effekt vorliegt, zeigt die Replizierbarkeit der Ergebnisse von mehreren Personen. Wiederholungen mit dem Wildtyp und der DUB-Mutant, die mCherry exprimieren, ein Protein welches Fluoreszenzmikroskopie der infizierten Zellen ermöglicht, zeigten ebenfalls die stärkere Hemmung der DUB-Mutante. Für die Infektionsdosis wurden 100 PFU pro Well als Zielgröße gewählt, um die Ergebnisse vergleichbar zu halten. Es ist möglich, dass der Effekt bei einer anderen PFU/Well Dosis unterschiedlich ausfällt. Ein

Zusammenhang zwischen MOI und dem Interferoneffekt wird beispielsweise bei der Verwendung von ICP0 Mutanten beschrieben (Härle et al., 2002).

Neben einer Deubiquitinierung könnten auch andere Prozesse zum beobachteten Phänotyp beitragen. Es wurde bereits beschrieben, dass die DUB auf pUL36 unabhängig von seiner enzymatischen Funktion die Interferonwirkung hemmt, indem sie die Interaktion zwischen dem Interferonrezeptor IFNAR-2 und Jak-1 stört, so dass weniger Interferon-stimulierte Gene exprimiert werden (Yuan et al., 2018). Im vorliegenden Versuchen waren die Zellen jedoch bereits mit Interferon vorbehandelt, also die interferonstimulierten Proteine bereits exprimiert.

Der gezeigte stärkere Einfluss des Interferons auf die Mutante ohne eine relevante Auswirkung der Abnahme des Interferons, könnte ein Hinweis sein, dass die beobachteten Unterschiede im Infektionsverhalten nach Gabe von Interferon auf Effekte basieren, die früh in der Infektion stattfinden, so dass die Interferonabnahme keine relevante weitere Wirkung zeigt. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass bereits benachbart zu der DUB auf PUL36 ein NLS, nukleäres Lokalisationssignal, beschrieben wurde. Das NLS ist essenziell für die Infektion. (Abaitua et al., 2008).

Eine weitere Möglichkeit der Erklärung des Phänotyps, ist der Schutz der Kapside vor dem Abbau durch Ubiquitinierung vor Eindringen in den Zellkern, denn Ubiquitinierung, und damit Markierung zum Abbau, ist ein bekannter Zellabwehrmechanismus gegen virale Infektionen (Roizman, 2013). Ubiquitinierung und Abbau von Herpesviren bewirkt ein Freisetzen viraler DNA im Zytoplasma, welche wiederum von zellulären DNA-Sensoren erkannt wird. Dies führt zum Ausschütten von Interferon (Horan et al., 2013)

Im Zellkern reprimieren zelluläre Faktoren wie ND10 die Expression viralen Genoms. (Cuchet-Lourenço, 2011). Möglicherweise bildet die Deubiquitinierung viralen Proteinen einen Schutz vor diesem Abbau (Lindner, 2007).

Die Abnahme des Interferons erfolgte, um zu untersuchen, ob es zur Reaktivierung



kommt, d.h. ob die Plaquezahlen nach Abnahme des Interferons ansteigen und ob sich der Wildtyp und die Mutante hierbei unterscheiden. Bei Abnahme des Interferons direkt nach Infektion konnte bei beiden eine geringe Reaktivierung festgestellt werden, nicht mehr bei Abnahme des Interferons drei Tage nach Infektion. Dies könnte bedeuten, dass Virus aus der Zellperipherie, der sonst aufgrund der Interferonantwort abgebaut worden wäre, noch in den Zellkern eindringen kann und spräche für einen kurzlebigen Interferoneffekt.

In U-2 OS Zellen konnte der Effekt der stärkeren Hemmung in der Infektion bei der DUB-Mutante nach Stimulation mit Interferon im Gegensatz zu Verozellen nicht nachgewiesen werden, obwohl Interferon einen ähnlich starken Effekt auf die Infektion mit dem Wildtyp zeigte. Trotz einer signifikanten Wirkung des Interferons, zeigte sich die DUB-Mutante im Gegensatz zu den vorherigen Experimenten mit Verozellen also nicht stärker von dem Interferon beeinflusst als der Wildtyp. Ein ähnliches Phänomen der fehlenden Hemmung wird in der Literatur bei der Verwendung von ICPO Mutanten beschrieben: Während Herpesviren, die aufgrund einer Mutation kein ICPO, eine virale E3-Ligase (Boutell et al., 2005), bilden können ( $\Delta$ ICPO – Herpesvirus), in den meisten Zelllinien in niedriger Infektionsdosis in ihrem Wachstum gehemmt sind, weisen U-2 OS Zellen bei Infektion durch eine ICPO-mutante eine im Vergleich stärkere Produktion von Virus auf ( Yao et Schaffer, 1995). Untersuchungen von Deschamps und Kalamkovi hierzu ergaben, dass dabei vermutlich eine fehlerhafte Expression des STING-Signalweges (STING: „Stimulatorprotein der Interferongene“, DNA-Sensorprotein) eine Rolle spielt: Eine fehlerhafte Stimulation von Interferon-induzierbaren Genen aufgrund eines defekten STING-Proteins führt bei U-2 OS Zellen also zur Suszeptibilität gegenüber ICPO Mutanten, die bei anderen Zelllinien kaum virales Wachstum zeigen können (Deschamps et Kalamvoki, 2017). Dieselbe Zelllinie U-2 OS, die laut Studien einen Defekt im STING-Signalweg aufweist, zeigt keinen Unterschied zwischen dem Wildtyp und der DUB-Mutante bei einem deutlichen Interferoneffekt. Ein möglicher Erklärungsansatz wäre also, dass die DUB-Mutante mit dem STING-Protein, welches an der Detektion viraler DNA im Zellkern beteiligt ist und die Bildung von antiviralen Proteinen stimuliert (Pan et al., 2018) , interagiert, nachdem bei Verozellen bei Infektion mit einer DUB-Mutante eine

stärkere Hemmung nach Interferonstimulierung erkennbar ist, bei U-2 OS Zellen, die einen Defekt im STING-Protein aufweisen, jedoch keine stärkere Hemmung im Vergleich zum Wildtyp erkenntlich ist. Studien weisen nach, dass die Ubiquitinierung des STING-Proteins die Induktion von Interferon- $\beta$ - stimulierten Genen erhöht. Eine DUB-mutante könnte das STING-Protein deubiquitinieren und so diese Immunantwort stören (Zhang et al., 2012). In den vorliegenden Untersuchungen waren die Zellen jedoch bereits durch Interferon stimuliert, d.h. der STING- Signalweg bereits aktiv, womit dieser Erklärungsansatz eher unwahrscheinlich scheint.

Wichtig für die Deutung der Ergebnisse scheint, ob die Interferonwirkung auch nach Abnahme des Interferons weiterhin anhält. Untersuchungen an einer humanen Fibroblasten-zelllinie (FS2) zeigen, dass 4h nach Exposition gegenüber Interferon der Effekt des durch Interferon exprimierten Promotors ISG-3 deutlich nachlässt. Ähnliches gilt für andere Zelllinien wie Hela, 2fTGH sowie S2 (Lee, 1997). Nicht klar zu ersehen ist jedoch, wie lange die antiviralen Proteine, die durch die Promotoraktivität von ISG-3 gebildet werden in der Zelle aktiv sind. Es ist jedoch bei einer durchschnittlichen Halbwertszeit von neu gebildeten, langlebigen Proteinen von über 15 Stunden wie sie bei Hep2G Zellen (Zelllinie aus humanem Leberzellkarzinom) eher unwahrscheinlich, dass der Effekt noch Tage nach der Abnahme des Interferons andauert (Chen, 2015). Studien an HSV 1 zeigten jedoch, dass eine Abnahme des Interferons zuerst eine deutliche Abnahme in der antiviralen Aktivität gemessen an der Abnahme der Plaquezahlen bewirkt, jedoch diese bei einer Interferonkonzentration von 950U/ml humanen Interferons nach 3 Tagen wieder ansteigt und Interferon auch fünf Tage nach Abnahme noch einen deutlichen Effekt auf die Zellen aufweist (Rasmussen et Ferly, 1975). Diese Ergebnisse sind kongruent zu den Daten, die zeigen, dass eine frühe Abnahme des Interferons mit Fixation der Platten 3 Tage nach Infektion sowohl bei der DUB Mutante als auch beim Wildtyp eine signifikante Reaktivierung zulässt. Dass sowohl der Wildtyp als auch die DUB-Mutante nach Abnahme des Interferons drei Tage nach Infektion nicht reaktivieren, spricht dafür, dass die Prozesse früh in der Infektion stattfinden, d.h. durch das Interferon kein Virus in den Zellkern eindringen könnte, der reaktivieren könnte oder dass durch die verlängerte Interferonexposition das virale

Genom auch nach Abnahme im Zellkern weiterhin supprimiert wird.

Ein weiterer möglicher Erklärungsansatz ist, dass die DUB bei der Antagonisierung der Interferonantwort, welche durch ND10 Körperchen vermittelt wird, eine Rolle spielt. ND10 Körperchen, ein nukleärer, zellulärer, antiviraler Proteinkomplex, hemmen die virale Replikation (Chelbi-Alix et de Thé, 1999). PML ist wesentliches Protein dieses Komplexes (Ishov et al., 1999). Zudem ist bekannt, dass ICPO ein virales Protein, an die HADUB, eine zelluläre Deubiquitinase bindet, und die Immunantwort durch ND10 hemmt. (Everett et al., 2020) ICPO ist dabei vor allem für die Reaktivierung des Virus aus dem lytischen Zyklus bedeutend (Harris et al., 1989) und wie bereits beschrieben, ist die verminderte Bildung von Herpesvirus bei Infektion durch eine ICPO Mutante in U-2 OS Zellen im Gegensatz zu anderen Zelllinien nicht nachgewiesen (Sacks et Schaffer, 1987) (Deschamps et Kalamvoki, 2017). ICPO bindet ebenfalls an die HAUSP, wodurch es stabilisiert wird. Es ist wie ICPO an der Reaktivierung der viralen Infektion aus dem latenten Stadium beteiligt (Boutell et al., 2005). Somit sind mindestens zwei Proteine bekannt, die an der Reaktivierung aus dem latenten Stadium der Infektion beteiligt sind, und beide binden an eine zelluläre Deubiquitinase um ihre volle Funktion zu erreichen. Dies unterstreicht, wie relevant Deubiquitinierungsprozesse für die Reaktivierung aus dem latenten Stadium sind. Die DUB-Domäne von pUL36 könnte ein bisher unbekanntes Zielprotein stabilisieren. Versuche an PML deletierten Zelllinien mit Vorbehandlung der Zellen durch Interferon zeigten einen höheren Effekt des Interferons in PML +/+ Zellen als PML -/- Zellen (Chee et al., 2003). Versuche auf entsprechend deletierten Zellen wären möglicherweise hinweisgebend auf den entsprechenden Mechanismus: Wenn bei Deletion des Proteins und Vorbehandlung die Ratio bei Infektion mit Wildtyp ähnlich den obigen Infektionsraten ist, könnte PML ein Zielprotein der DUB darstellen.

Bereits vorliegende Untersuchungen an immunfluoreszierenden DUB-Mutanten zeigen, dass die sekundäre Umhüllung bei Deletion der DUB und weiterer Alanin-Prolinreichen Regionen in pUL36 in Pseudorabies-Virus, einem Herpesvirus, das Schweine befällt, gestört ist (Möhl, 2011). Der Virus könnte durch die gestörte Umhüllung am Ausschleusen an der Zelle behindert sein und dadurch leichter Ziel für die interferoninduzierten antiviralen Proteine sein. Auch dies würde mit einer verminderten

Plaqueszahlbildung einhergehen, da die infizierte Zelle weniger Virus bildet.

Eine weitere Möglichkeit wäre, dass der beschriebene Effekt sich durch interferoninduzierte Hemmung des Transports entlang des Mikrotubuli – Dynein – Systems erklären lässt. Herpesviren sind auf den Transport durch Mikrotubuli zum Kern angewiesen. Zudem spielen Mikrotubuli beim Ausschleusen aus dem Kern eine wichtige Rolle (Jovasevic et al, 2015) und pUL36 ist am Transport beteiligt (Luxton et al., 2006, Desai, 2000). Die DUB könnte an dem Transport zum Kern beteiligt sein. Durch einen langsameren Transport zum Zellkern bei einer Deletion der Funktion könnte die DUB-Mutante leichter „Ziel“ der antiviralen interferoninduzierten Proteine werden.

In U-2 OS Zellen wurde beschrieben, dass ICP0 Mutanten etwas schneller als der Wildtyp aus dem Kern gelangten, wahrscheinlich aufgrund einer geringeren Retention im Nucleus (Samrat et al., 2018). Dieser Umstand könnte bedeuten – nachdem es sich bei ICP0 um eine E3-Ligase handelt (Boutell et al., 2005) dass Ubiquitinierungsvorgänge durch ICP0 das Ausschleusen aus dem Kern in U-2 OS Zellen verlangsamen (Samrat et al., 2018). Die DUB könnte in diesem Zusammenhang das Ausschleusen aus dem Kern erleichtern, so dass im Gegensatz zu Vero-Zellen kein Unterschied zwischen dem Wildtyp und der DUB-Mutante vorhanden ist.

Weitere Versuche zur näheren Erforschung wären möglicherweise der Einsatz von Proteasominhibitoren. Man könnte Zellen Proteasominhibitoren zusetzen und beobachten, ob die DUB-Mutante davon stärker beeinträchtigt wird. Bereits vorliegende Versuche an Herpesvirus mit Proteasominhibitoren zeigen, dass unter Einfluss von Proteasominhibitoren durch Hemmung von NF- $\kappa$ B Aktivierung die virale Replikation gehemmt ist (La Frazia et al., 2006). Eine stärkere Hemmung könnte ein Hinweis auf die Beteiligung des NfKbs-Abschnitts sein, nachdem auch dieser durch Interferon stimuliert wird.

Wie bereits erwähnt, könnten jedoch die Prozesse zur Erklärung des Phänotyps auch später in der Infektion stattfinden. Hierfür wäre eine immunzytologische Untersuchung mit dem Mikroskop an entsprechenden Mutationsträgern aufschlussreich, um die Abläufe während der Infektion unter dem Mikroskop zu beobachten. Alternativ könnten

Untersuchungen über das unterschiedliche interferonstimulierte Proteom in Vero und in U-2 OS Zellen weiteren Aufschluss geben.

## 5. Zusammenfassung

Die Erforschung viraler Proteine ist wichtig, um virale Infektionen besser verstehen und damit therapieren zu können. Die Aufklärung der DUB-Funktion auf dem viralen Herpesprotein pUL36 ermöglicht ein besseres Verständnis des Infektionshergangs und könnte zur Entwicklung eines Enzyminhibitors führen, der nur an diesem Enzym ansetzt, nachdem es sich von den zellulären DUBs unterscheidet (Kattenhorn et al., 2005). In dieser Arbeit konnten die vorherigen Daten, die eine stärkere Hemmung der DUB-Mutante unter Interferoneinfluss zeigten, in unterschiedlichen Assay-Designs bestätigt werden. Auch Versuche mit einem anderen Herpes simplex Virus Strang, bestätigten die vorherigen Daten. Die Ergebnisse zeigen, dass die DUB-Funktion für HSV-1 wichtig ist für die virale Evasion der zellulären Immunantwort. Die genaue Funktion der DUB in der Infektion ist jedoch unklar. Aufgrund der vorbestehenden Datenlage erschien am wahrscheinlichsten, dass die DUB-Funktion vor Eindringen des Herpes Simplex Virus in den Zellkern zum Tragen kommt, womit es nach Abnahme des Interferons nicht zu einer viralen Reaktivierung käme. Deshalb wurden Untersuchungen unternommen, um eine mögliche Reaktivierung nach Abnahme des Interferons näher zu untersuchen. Hierfür wurden zwei verschiedene Experimente entwickelt. Einmal wurde das Interferon direkt nach Infektion und einmal 3 Tage nach Infektion (3dpi) abgenommen. Die Ergebnisse zeigten beide eine stärkere Hemmung der DUB-HSV-1-Mutante unter Interferoneinfluss. Bei Abnahme des Interferons direkt nach Infektion lag bei Wildtyp und Mutante ein leichter Anstieg der Plaquezahlen vor, wobei dieser Effekt von der Dosis des Interferons abhängig war. Eine hohe Interferondosis begünstigte bei beiden eine stärkere Hemmung, allerdings bei beiden auch eine leichte Erhöhung der Plaquezahl nach Abnahme. Bei einer niedrigen Dosis konnte nur eine stärkere Hemmung der DUB-Mutante, jedoch keine Reaktivierung bei Wildtyp und Mutante nach Abnahme des Interferons gezeigt werden. Bei Abnahme drei Tage nach Infektion zeigte sich sowohl bei dem Wildtyp-Virus als auch der DUB- Mutante kein Anstieg in den Plaquezahlen. Es sind, nachdem Deubiquitinierung nicht nur eine Rolle in der Verhinderung des proteosomalen Abbaus von in die Zelle eingedrungenem Virus spielt, sondern auch der Zellregulation, mehrere Szenarien denkbar, die diesen Phänotyp erklären könnten. Die DUB-Funktion könnte

zwar den proteosomalen Abbau durch Deubiquitinierung und damit Verhinderung der Markierung des Virus zum zellulären Abbau verhindern. Allerdings könnten sich durch einen langsameren Transport aus der Zelle oder in den Nucleus auch weniger Plaques bei der Mutante als wie beim Wildtyp unter Interferoneinfluss bilden, nachdem das Virus dann leichter Ziel antiviraler Proteine werden könnte. Oder die DUB-Funktion spielt eine Rolle beim Eintritt in den Kern durch Modifikationen anderer Proteine. Virengenome könnten auch durch eine fehlende DUB-Funktion reprimiert werden oder die Zelle durch Apoptose absterben. Interessanterweise konnte keine Hemmung der DUB-Mutante in Interferon behandelten U-2 OS Zellen gezeigt werden, von denen ein Defekt im STING-vermittelten Signalweg bekannt ist. Vielleicht zeigt dies, dass das STING-Protein an dem gezeigten DUB-Phänotyp beteiligt ist. Nachgewiesen ist außerdem bereits eine Funktion des Enzyms bei der zweiten Umhüllung der Kapside bei Pseudorabiesvirus (Möhl, 2011). Weitere Untersuchungen unter Einsatz bspw. von Immunfluoreszenz, Proteasominhibitoren oder weiteren Zelllinien wie Saos-2, sind nötig, um die genaue Funktion zu klären.

## **6. Summary**

The study of viral proteins is important to better understand and thus treat viral infections. Elucidation of DUB function on the viral herpes protein pUL36 provides a better understanding of the infection process and could lead to the development of an enzyme inhibitor that targets only this enzyme after it is different from cellular DUBs (Kattenhorn et al., 2005). In this work, previous data showing greater inhibition of the DUB- mutant under interferon influence were confirmed in different assay designs. Also, experiments with a different herpes simplex virus strand, confirmed the previous data. The results indicate that DUB function for HSV-1 is important for viral evasion of the cellular immune response. However, the exact function of DUB in infection is unclear. Based on the preexisting data, it seemed most likely that DUB function would come into play before herpes simplex virus enters the nucleus, which would mean that viral reactivation would not occur after interferon depletion. Therefore, studies were undertaken to further investigate a possible reactivation after decrease of interferon. Two different experiments were developed for this purpose. Once the interferon was

withdrawn immediately after infection and once 3 days after infection (3dpi). The results both showed a stronger inhibition of the DUB-HSV-1 mutant under interferon influence. When interferon was decreased immediately after infection, a slight increase in plaque counts was present in both wild type and mutant, although this effect was dependent on the dose of interferon. A high dose of interferon promoted greater inhibition in both, but also a slight increase in plaque numbers after decrease in both. A low dose showed only greater inhibition of the DUB mutant but no reactivation in wild type and mutant after decrease of interferon. When decreased three days after infection, there was no increase in plaque counts for either the wild-type virus or the DUB- mutant. Given that deubiquitination plays a role not only in preventing proteosomal degradation of virus that has entered the cell but also in cell regulation, several scenarios are conceivable that could explain this phenotype. To be sure, DUB function could prevent proteosomal degradation by deubiquitinating and thereby preventing the virus from being labeled for cellular degradation. However, slower transport out of the cell or into the nucleus could also result in fewer plaques forming in the mutant than in the wild type under interferon influence, after which the virus could more easily become a target of antiviral proteins. Alternatively, DUB function may play a role in entry into the nucleus through modifications of other proteins. Viral genomes could also be repressed by a lack of DUB function or the cell could die by apoptosis. Interestingly, no inhibition of the DUB mutant was shown in interferon-treated U-2 OS cells, which are known to have a defect in the STING-mediated signaling pathway. Perhaps this indicates that the STING protein is involved in the DUB phenotype shown. Furthermore, a function of the enzyme in the second envelope of capsids in pseudorabies virus has already been demonstrated (Möhl, 2011). Further studies using e.g. immunofluorescence, proteasome inhibitors or additional cell lines such as Saos-2, are necessary to clarify the exact function.



## 6. Literaturverzeichnis

Abaitua, F., & Hare, P. (2008). Identification of a Highly Conserved, Functional Nuclear Localization Signal within the N-Terminal Region of Herpes Simplex Virus Type 1 PUL36 Tegument Protein. *Journal of virology*, *82*(11), 5234. doi:10.1128/JVI.02497-07

Alandijany, T. R.oberts A.P.E., Conn K., Loney C., McFarlane S., Orr A.,Boutell C. (2018). Distinct temporal roles for the promyelocytic leukaemia (PML) protein in the sequential regulation of intracellular host immunity to HSV-1 infection. *PLOS*.

Alibek, K., Bekmurzayeva, A., Mussabekova, A., & Sultankulov, B. (2012). Using antimicrobial adjuvant therapy in cancer treatment: a review. *Infectious Agents and Cancer*, *7*(1), 33. doi:10.1186/1750-9378-7-33

Bolovan, C. A., Sawtell, N. M., & Thompson, R. L. (1994). ICP34.5 mutants of herpes simplex virus type 1 strain 17syn+ are attenuated for neurovirulence in mice and for replication in confluent primary mouse embryo cell cultures. *Journal of virology*, *68*(1), 48-55. doi:10.1128/jvi.68.1.48-55.1994

Bodda, C., Reinert, L. S., Fruhwürth, S., Richardo, T., Sun, C., Zhang, B. C., Kalamvoki, M., Pohlmann, A., Mogensen, T. H., Bergström, P., Agholme, L., O'Hare, P., Sodeik, B., Gyrd-Hansen, M., Zetterberg, H., & Paludan, S. R. (2020). HSV1 VP1-2 deubiquitinates STING to block type I interferon expression and promote brain infection. *The Journal of experimental medicine*, *217*(7), e20191422. <https://doi.org/10.1084/jem.20191422>

Boutell, C., Canning, M., Orr, A., & Everett, R. D. (2005). Reciprocal Activities between Herpes Simplex Virus Type 1 Regulatory Protein ICP0, a Ubiquitin E3 Ligase, and Ubiquitin-Specific Protease DUB7. *Journal of virology*, *79*(19), 12342. doi:10.1128/JVI.79.19.12342-12354.2005

Brown et Newcomb. (2011). Herpesvirus capsid assembly: insights from structural analysis. *Current opinion in virology*, *1*(2), 142-149. doi:10.1016/j.coviro.2011.06.003

Burnett F.M & Williams S.W. (1939). Herpes simplex: new point of view. *Med J Aust*, *1*:637–640.

Bustamante, J., Biosson-Dupuis, S., Jounaguy, E., Picard, C., Puel, A., Abel, L., & Casanova J.-L. (2008). Novel primary immunodeficiencies revealed by the investigation of paediatric infectious diseases. *Current Opinion in Immunology*, *20*, 39-48.

Campadelli-Fiume G, Roizman B. The egress of herpesviruses from cells: the unanswered questions. *J Virol*. 2006 Jul;*80*(13):6716-7; author replies 6717-9. doi: 10.1128/JVI.00386-06. PMID: 16775362; PMCID: PMC1488928.

Cardone, Giovanni, Newcomb, William, Cheng, Naiqian, Wingfield, Paul Trus, Benes, Brown, Jay,

Steven, Alasdair. The UL36 Tegument Protein of Herpes Simplex Virus 1 Has a Composite Binding Site at the Capsid Vertices. *Journal of Virology*. 86. 2012

Chee, A., Lopez, P., Pandolfi, P.-P., & Roizman, B. (2003). Promyelocytic Leukemia Protein mediates interferon-based Anti-Herpes-Simplex Virus 1 Effects. *Journal of virology*, 12(77), 7101-7105.

Chelbi-Alix, M. K., & de Thé, H. (1999). Herpes virus induced proteasome-dependent degradation of the nuclear bodies-associated PML and Sp100 proteins. *Oncogene*, 18(4), 935-941. doi:10.1038/sj.onc.1202366

Chen W., Smeekens J., Wu R., Systematic study of the dynamics and half-lives of newly synthesized proteins in human cells, (2015) , *Chemical Science*, pp1393-1400

Cohen J.I. (2010). Introduction to Herpesviridae. In D. a. B. Mandell (Ed.), *Principles and Practice of Infectious Diseases* (7th ed., Vol. 2, pp. 1943-1963). Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier.

Colberg-Poley, A. M., Santomena, L. D., Harlow, P. P., Benfield, P. A., & Tenney, D. J. (1992). Human cytomegalovirus US3 and UL36-38 immediate-early proteins regulate gene expression. *Journal of virology*, 66(1), 95. Retrieved from <http://jvi.asm.org/content/66/1/95.abstract>

Condit R.C. (2013). Principles of Virology. In D. M. H. Knipe, Peter M. (Ed.), *Fields Virology* (6th ed., pp. 22-50): Lippincott Williams and Wilkins.

Cowan, F., Copas, A., Johnson, A., Ashley, R., Corey, L., & Mindel, A. (2002). Herpes simplex virus type 1 infection: a sexually transmitted infection of adolescence? *Sexually transmitted infections*, 78(5), 346-348. doi:10.1136/sti.78.5.346

Crimi, S., Fiorillo, L., Bianchi, A., D'Amico, C., Amoroso, G., Gorassini, F., . . . Cicciù, M. (2019). Herpes Virus, Oral Clinical Signs and QoL: Systematic Review of Recent Data. *Viruses*, 11(5), 463. doi:10.3390/v11050463

Cuchet-Lourenço, D., Boutell, C., Lukashchuk, V., Grant, K., Sykes, A., Murray, J., . . . Everett, R. D. (2011). SUMO Pathway Dependent Recruitment of Cellular Repressors to Herpes Simplex Virus Type 1 Genomes. *PLOS*.

Dağ, F., Dölken, L., Holzki, J., Drabig, A., Weingärtner, A., Schwerk, J., . . . L., Č.-Š. (2014). Reversible Silencing of Cytomegalovirus Genomes by Type I Interferon Governs Virus Latency. *PLOS*.

Domke-Opitz I., Straub P., Kirchner H. : Effect of Interferon on Replication of Herpes Simplex Virus Types 1. *JOURNAL OF VIROLOGY*, Oct. 1986. Vol. 60 p. 37-42.

Dai X., & Zhou, S. (2018). Structure of the herpes simplex virus 1 capsid with associated tegument protein complexes. *Science*, 360(6384), eaao7298. doi:10.1126/science.aao7298

Desai P. J. (2000). A Null Mutation in the UL36 Gene of Herpes Simplex Virus Type 1 Results in Accumulation of Unenveloped DNA-Filled Capsids in the Cytoplasm of Infected Cells. *Journal of virology*, 74(24), 11608. doi:10.1128/JVI.74.24.11608-11618.2000

Deschamps T. & Kalamvoki, M. (2017). Impaired STING Pathway in Human Osteosarcoma U-2 OS Cells Contributes to the Growth of ICP0-Null Mutant Herpes Simplex Virus. *Journal of virology*, 91.

Dickerson, F. B., Boronow, J. J., Stallings, C., Origoni, A. E., Cole, S., Krivogorsky, B., & Yolken, R. H. (2004). Infection with herpes simplex virus type 1 is associated with cognitive deficits in bipolar disorder. *Biological Psychiatry*, 55(6), 588-593. doi:10.1016/j.biopsych.2003.10.008

Doyle T, Moncorgé O, Bonaventure B, Pollpeter D, Lussignol M, Tauziet M, Apolonia L, Catanese MT, Goujon C, Malim MH. The interferon-inducible isoform of NCOA7 inhibits endosome-mediated viral entry. *Nat Microbiol*. 2018 Dec;3(12):1369-1376. doi: 10.1038/s41564-018-0273-9. Epub 2018 Nov 26. Erratum in: *Nat Microbiol*. 2019 Mar;4(3):539. PMID: 30478388; PMCID: PMC6329445.

Everett, R. D., Freemont, P., Saitoh, H., Dasso, M., Orr, A., Kathoria, M., & Parkinson, J. (2020). The Disruption of ND10 during Herpes Simplex Virus Infection Correlates with the ICP0- and Proteasome-Dependent Loss of Several PML Isoforms. *Journal of virology*, 72.

Everett, R. D., Meredith, M., & Orr, A. (2020). The Ability of Herpes Simplex Virus Type 1 Immediate-Early Protein ICP0 To Bind to a Ubiquitin-Specific Protease Contributes to Its Roles in the Activation of Gene Expression and Stimulation of Virus Replication. *Journal of virology*, 73.

Fan, W. H., Roberts, A. P. E., McElwee, M., Bhella, D., Rixon, F.J. , Lauder R. (2015). The Large Tegument Protein pUL36 Is Essential for Formation of the Capsid Vertex-Specific Component at the Capsid-Tegument Interface of Herpes Simplex Virus 1. *Journal of virology*, 89(3), 1502. doi:10.1128/JVI.02887-14

Flint S.J. (2004). *Principles of Virology* (2nd ed.). Washington: American Society for Microbiology Press.

Funk, C., Raschbichler, V., Lieber, D., Wetschky, J., Arnold, E., Leimser, J., . . . Bailer, S. (2019). Comprehensive analysis of nuclear export of herpes simplex virus type 1 tegument proteins and their Epstein-Barr virus orthologs. *Traffic*, 20(2), 152-167. doi:10.1111/tra.12627

García, M. A., Gil, J., Ventoso, I., Guerra, S., Domingo, E., Rivas, C., & Esteban, M. (2006). Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 70(4), 1032-1060. doi:10.1128/MMBR.00027-06

Gastaldello, S., Hildebrand, S., Faridani, O., Callegari, S., Palmkvist, M., Di Guglielmo, C., & Masucci, M. G. (2010). A de neddylase encoded by Epstein–Barr virus promotes viral DNA replication by regulating the activity of cullin-RING ligases. *Nature Cell Biology*, *12*(4), 351-361. doi:10.1038/ncb2035

Gibco, Thermo Fisher (2016). Cell Culture- Basic Handbook

González, C. M., Wang, L., & Damania, B. (2009). Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Encodes a Viral Deubiquitinase. *Journal of virology*, *83*(19), 10224. doi:10.1128/JVI.00589-09

Graham, S., Rawls, W., Swanson, M., & McCurtis, J. (1982). SEX PARTNERS AND HERPES SIMPLEX VIRUS TYPE 2 IN THE EPIDEMIOLOGY OF CANCER OF THE CERVIX. *American Journal of Epidemiology*, *115*(5), 729-735. doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a113355

Gu, H., & Roizman, B. (2003). The degradation of promyelocytic leukemia and Sp100 proteins by herpes simplex virus 1 is mediated by the ubiquitin-conjugating enzyme UbcH5a. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(15), 8963. doi:10.1073/pnas.1533420100

Guo, H., Shen, S., Wang, L., & Deng, H. (2010). Role of tegument proteins in herpesvirus assembly and egress. *Protein & cell*, *1*(11), 987-998. doi:10.1007/s13238-010-0120-0

Halliwell, Barry. (2014). Cell Culture, Oxidative Stress and Antioxidants. Avoiding Pitfalls. *Journal of Biomedicine*. Vol. 37 N 3

Härle, P., Sainz, B., Carr, D. J. J., & Halford, W. P. (2002). The Immediate-Early Protein, ICP0, Is Essential for the Resistance of Herpes Simplex Virus to Interferon- $\alpha/\beta$ . *Virology*, *293*(2), 295-304. doi:<https://doi.org/10.1006/viro.2001.1280>

Harrington, K., Puzanov, I., Hecht, J., Hodi, F., Szabo, Z., Murugappan, S., & Kaufman, H. (2015). Clinical development of talimogene laherparepvec (T-VEC): a modified herpes simplex virus type-1–derived oncolytic immunotherapy. *Expert Review of Anticancer Therapy*, *15*(12), 1389-1403. doi:10.1586/14737140.2015.1115725

Harris, R. A., Everett, R. D., Zhu, X. X., Silverstein, S., & Preston, C. M. (1989). Herpes simplex virus type 1 immediate-early protein ICP0 reactivates latent herpes simplex virus type 2 in an in vitro latency system. *Journal of virology*, *63*.

Heine, J. W., Honess, R. W., Cassai, E., & Roizman B. (1974). Proteins Specified by Herpes Simplex Virus XII. The Virion Polypeptides of Type 1 Strains. *Journal of virology*, *14*(3), 640. Retrieved from <http://jvi.asm.org/content/14/3/640.abstract>

Heming, J. D., Conway, J. D., & Homa, F. L. (2011). Nucleocapsid Structure, Assembly and DNA Packaging of Herpes Simplex Virus. In S. K. Weller (Ed.), *Aherpesvirus Molecular Virology*. Norfolk: Caister Academic Press.

Hennig, T., Abaitua, F., O'Hare, P. (2014) Functional analysis of nuclear localization

signals in PUL36 homologues from all herpesvirus subfamilies, *J Virology* (88), pp5391-405

Hennig, T., Mohnke, J., Stark, I., Fischer, M., Grothey, A., O'Hare, P., . . . Dölken, L. (2021). pUL36 de-ubiquitinase activity augments both the initiation and progression of lytic virus infection in IFN-primed cells. *bioRxiv*, 2021.2001.2029.428770. doi:10.1101/2021.01.29.428770

Hicke L. & Dunn R. (2003). Regulation of Membrane Protein Transport by Ubiquitin and Ubiquitin-Binding Proteins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 19(1), 141-172. doi:10.1146/annurev.cellbio.19.110701.154617

Himme A. . (2009). Gütekriterien der Messung: Reliabilität, Validität und Generalisierbarkeit. . Gabler Verlag, Wiesbaden. Albers S., Klapper D., Konradt U., Walter A., Wolf J. (eds) Methodik der empirischen Forschung.

Horan, K. A., Hansen, K., Jakobsen, M. R., Holm, C. K., Sjøby, S., Unterholzner, L., . . . Paludan, S. R. (2013). Proteasomal Degradation of Herpes Simplex Virus Capsids in Macrophages Releases DNA to the Cytosol for Recognition by DNA Sensors. *The Journal of Immunology*, 190(5), 2311. doi:10.4049/jimmunol.1202749

Horvath C.M. (2004). The Jak-STAT Pathway Stimulated by Interferon  $\alpha$  or Interferon  $\beta$ . *Science's STKE*, 2004(260), tr10-tr10. doi:10.1126/stke.2602004tr10

ICTV Report 2019. (2019). Virus Taxonomy: 2019 Release.

Ishov, A. M., Sotnikov, A. G., Negorev, D., Vladimirova, O. V., Neff, N., Kamitani, T., . . . Maul, G. G. (1999). PML is critical for ND10 formation and recruits the PML-interacting protein daxx to this nuclear structure when modified by SUMO-1. *J Cell Biol*, 147(2), 221-234. doi:10.1083/jcb.147.2.221

Jarosinski K., Kattenhorn L., Kaufer B., Ploegh H., & Osterrieder N. (2007). A herpesvirus ubiquitin-specific protease is critical for efficient T cell lymphoma formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(50), 20025. doi:10.1073/pnas.0706295104

Johnson, A. S., Maronian, N., & Vieira, J. (2005). Activation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus lytic gene expression during epithelial differentiation. *Journal of virology*, 79(21), 13769-13777. doi:10.1128/JVI.79.21.13769-13777.2005

Jovasevic, V., Liang, L., & Roizman, B. (2008). Proteolytic Cleavage of PUL36 Is Required for Release of Herpes Simplex Virus 1 DNA into the Nucleus. *Journal of virology*, 82(7), 3311. doi:10.1128/JVI.01919-07

Jovasevic, V., Naghavi, M. H., & Walsh, D. (2015). Microtubule plus end-associated CLIP-170 initiates HSV-1 retrograde transport in primary human cells. *Journal of Cell Biology*, 211(2), 323-337. doi:10.1083/jcb.201505123

Jugovic, P., Hill, A. M., Tomazin, R., Ploegh, H., & Johnson, D. C. (1998). Inhibition of major histocompatibility complex class I antigen presentation in pig and primate cells by herpes simplex virus type 1 and 2 ICP47. *Journal of virology*, 72(6), 5076–5084. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.6.5076-5084.1998>

Kasahara T, Hooks JJ, Dougherty SF, Oppenheim JJ. Interleukin 2-mediated immune interferon (IFN-gamma) production by human T cells and T cell subsets. *J Immunol*. 1983 Apr;130(4):1784-9. PMID: 6403613.

Kass R.E. (2011). Statistical Inference: The Big Picture. *Statistical science : a review journal of the Institute of Mathematical Statistics*, 26(1), 1-9. doi:10.1214/10-STS337

Kaufman, Howard S., Kahn, Allyson C., Iacobuzio-Donahue, Christine, Talamini, Mark A., Lillemoe, Keith D., Hamilton, Stanley R. (1999). Cytomegaloviral enterocolitis. *Diseases of colon and rectum*. 42(1) p24-30

Kattenhorn, L., Korbelt, G., Kessler, B., Spooner, E., & Ploegh H. (2005). A Deubiquitinating Enzyme Encoded by HSV-1 Belongs to a Family of Cysteine Proteases that Is Conserved across the Family *Herpesviridae*. *Molecular Cell*, 19, 547-557.

Kim, E., Oh, S., Lee, Y.-O., Gibson, W., & Ahn, J.-H. (2009). Cleavage Specificity of the UL48 Deubiquitinating Protease Activity of Human Cytomegalovirus and the Growth of an Active-Site Mutant Virus in Cultured Cells. *Journal of virology*, 83(23), 12046. doi:10.1128/JVI.00411-09

Kumari, P., Kumar, H. (2018). Viral deubiquitinases: role in evasion of anti-viral innate immunity. *Critical Reviews in Microbiology*, 44(3), 304-317. doi:10.1080/1040841X.2017.1368999

Kwon K.M. & Ahn J.H. (2013). Herpesvirus-encoded Deubiquitinating Proteases and Their Roles in Regulating Immune Signaling Pathways. *J Bacteriol Virol*, 43(4), 244-252. Retrieved from <http://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.4167%2Fjbv.2013.43.4.244>

La Frazia S., A. C., Santoro M.G. . (2006). Antiviral activity of proteasome inhibitors in herpes simplex virus-1 infection: role of nuclear factor- $\kappa$ B. *Antiviral Therapy*, 11, 995-1004.

Lafferty, W. E. (2002). The changing epidemiology of HSV-1 and HSV-2 and implications for serological testing. *Herpes*, 9(2), 51-55.

Laine, R. F., Albecka, A., van de Linde S., Rees, E. J., Crump, C. M., & Kaminski, C. F. (2015). Structural analysis of herpes simplex virus by optical super-resolution imaging. *Nature Communications*, 6(1), 5980. doi:10.1038/ncomms6980

Levy, D. E., Marié, I. J., & Durbin, J. E. (2011). Induction and function of type I and III interferon in response to viral infection. *Current opinion in virology*, 1(6), 476-486. doi:10.1016/j.coviro.2011.11.001

- Lindner H.A. (2007). Deubiquitination in virus infection. *Virology*, 362(2), 245-256.
- Liu, B. L., Robinson, M., Han, Z.-Q., Branston, R. H., English, C., Reay, P., . . . Coffin, R. S. (2003). ICP34.5 deleted herpes simplex virus with enhanced oncolytic, immune stimulating, and anti-tumour properties. *Gene Ther*, 10(4), 292-303. doi:10.1038/sj.gt.3301885
- Liu, Y. P., Zeng, L., Tian, A., Bomkamp, A., Rivera, D., Gutman, D., Barber, G. N., Olson, J. K., & Smith, J. A. (2012). Endoplasmic reticulum stress regulates the innate immunity critical transcription factor IRF3. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 189(9), 4630–4639. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102737>
- Luxton, G. W. G., Lee, J. I. H., Haverlock-Moyns, S., Schober, J. M., & Smith, G. A. (2006). The pseudorabies virus VP 1/2 tegument protein is required for intracellular capsid transport. *Journal of virology*, 80, 201-209.
- Maruzuru Y, Ichinohe T, Sato R, Miyake K, Okano T, Suzuki T, Koshiba T, Koyanagi N, Tsuda S, Watanabe M, Arii J, Kato A, Kawaguchi Y. Herpes Simplex Virus 1 VP22 Inhibits AIM2-Dependent Inflammasome Activation to Enable Efficient Viral Replication. *Cell Host Microbe*. 2018 Feb 14;23(2):254-265.e7. doi: 10.1016/j.chom.2017.12.014. PMID: 29447697.
- McNabb D.S. & Courtney R.J. (1992). Analysis of the UL36 open reading frame encoding the large tegument protein (ICP1/2) of herpes simplex virus type 1  
Journal: *Journal of Virology*. *Journal of virology*, 66(12), 7581.
- Medvar, B., Raghuram, V., Pisitkun, T., Sarkar, A., & Knepper, M. A. (2016). Comprehensive database of human E3 ubiquitin ligases: application to aquaporin-2 regulation. *Physiol Genomics*, 48, 502-512.
- Mijatov B., Cunningham L., Diefenbach R.J.. (2007). Residues F593 and E596 of HSV-1 tegument protein pUL36 (VP1/2) mediate binding of tegument protein pUL37. *Virology*, 368, 26-31.
- Möhl, B. S. (2011). Bedeutung des essentiellen Tegumentproteins pUL36 des Pseudorabies Virus für den Virus-Eintritt und die Morphogenese.
- Morfin F., T. D. (2003). Herpes simplex virus resistance to antiviral drugs. *Journal of clinical Virology*, 26, 29-37.
- Nagel, C.-H., Döhner, K., Fathollahy, M., Strive, T., Borst, E., Messerle, M., & Sodeik, B. (2008). Nuclear Egress and Envelopment of Herpes Simplex Virus Capsids Analyzed with Dual-Color Fluorescence HSV1(17<sup>+</sup>+</sup>). *Journal of virology*, 82(6), 3109. doi:10.1128/JVI.02124-07
- Sumudu K. Narayana, Karla J. Helbig, Erin M. McCartney, Auda Eltahla, Andrew R. Lloyd: The Interferon-induced Transmembrane Proteins, IFITM1, IFITM2, and IFITM3

Inhibit Hepatitis C Virus Entry\*. *Journal of biological Chemistry*. | Volume 290, ISSUE 43, P25946-25959, October 2015

Newcomb W.W. & Brown J.C. (2010). Structure and capsid association of the herpesvirus large tegument protein UL36. *Journal of virology*, 84(18), 9408-9414. doi:10.1128/JVI.00361-10

Nijman, S. M. B., Vargas, M. P. A., Velds A., Brummelkamp, T. R., Dirac, A. D. C., Sixma, T. K., & Bernards, R. (2005). A Genomic and Functional Inventory of Deubiquitinating Enzymes. *Cell*, 125(5), 773-786.

Orzalli, M. H., Conwell S. E., Berrios, C., DeCaprio J., & Knipe D.M. (2013). Nuclear interferon-inducible protein 16 promotes silencing of herpesviral and transfected DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(47), E4492. doi:10.1073/pnas.1316194110

Pan, S., Liu, X., Ma, Y., Cao, Y., & He, B. (2018). Herpes Simplex Virus 1  $\gamma(1)34.5$  Protein Inhibits STING Activation That Restricts Viral Replication. *Journal of virology*, 92(20). doi:10.1128/jvi.01015-18

Pellegrini S. & Dusanter-Fourt I. (1997). The Structure, Regulation and Function of the Janus Kinases (JAKs) and the Signal Transducers and Activators of Transcription (STATs). *European Journal of Biochemistry*, 248(3), 615-633. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.00615.x>

Pellet P., Roizman. B. (2013). Herpesviridae. In D. M. H. Knipe, Peter M. (Ed.), *Fields Virology* (6th ed.).

Pfaender, S., Mar, K.B., Michailidis, E. et al. LY6E impairs coronavirus fusion and confers immune control of viral disease. *Nat Microbiol* 5, 1330–1339 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0769-y>

Platanias L.C. (2005). Mechanisms of type-I and type-II-interferon-mediated signalling. *Nature Reviews Immunology*, 5(5), 375-386.

Rasmussen L, Farley LB. Inhibition of Herpesvirus hominis replication by human interferon. *Infect Immun*. 1975;12(1):104–8.

Rehwinkel und Gack. (2020). RIG-I-like receptors: their regulation and roles in RNA sensing. *Nature Reviews Immunology*, 20(9), 537-551. doi:10.1038/s41577-020-0288-3

Reichert, M., Wang, L., Sommer, M., Perrino, J., Nour, A. M., Sen, N., . . . Arvin, A. M. (2011). Entrapment of Viral Capsids in Nuclear PML Cages Is an Intrinsic Antiviral Host Defense against Varicella-Zoster Virus. *PLOS*.

Reichert M. et al. (2011). Entrapment of Viral Capsids in uclear PML Cages Is an intrinsic



antiviral host defense against Varicella Zoster Virus. *Plos Pathogens*, 2(7).

Roberts, A. P. E., Abaitua, F., Hare, P., McNab, D., Rixon, F. J., & Pasdeloup, D. (2009). Differing Roles of Inner Tegument Proteins pUL36 and pUL37 during Entry of Herpes Simplex Virus Type 1. *Journal of virology*, 83(1), 105. doi:10.1128/JVI.01032-08

Roberts K.L. & Baines J.D. (2011). Actin in herpesvirus infection. *Viruses*, 3(4), 336-346. doi:10.3390/v3040336

Roizman B. (2013). Herpes Simplex Viruses. In D. M. H. Knipe, Peter M. (Ed.), *Fields Virology* (6th ed., pp. 1825-1899): Lippincott Williams and Wilkins.

Russell W.C. (1962). A Sensitive and Precise Plaque Assay for Herpes Virus. *Nature*, 195(4845), 1028-1029. doi:10.1038/1951028a0

Sacks W.R. & Schaffer P.A. (1987). Deletion mutants in the gene encoding the herpes simplex virus type 1 immediate-early protein ICP0 exhibit impaired growth in cell culture. *Journal of virology*, 61(3), 829-839. doi:doi:10.1128/jvi.61.3.829-839.1987

Samrat, S. K., Ha, B. L., Zheng, Y., & Gu, H. (2018). Characterization of Elements Regulating the Nuclear-to-Cytoplasmic Translocation of ICP0 in Late Herpes Simplex Virus 1 Infection. *Journal of virology*, 92(2), 01673-01617. doi:10.1128/JVI.01673-17

Samuel, C. E. (2001). Antiviral actions of interferons. *Clinical microbiology reviews*, 14(4), 778-809. doi:10.1128/CMR.14.4.778-809.2001

Sanyal S, Ashour J, Maruyama T, Altenburg AF, Cragnolini JJ, Bilate A, Avalos AM, Kundrat L, García-Sastre A, Ploegh HL. Type I interferon imposes a TSG101/ISG15 checkpoint at the Golgi for glycoprotein trafficking during influenza virus infection. *Cell Host Microbe*. 2013 Nov 13;14(5):510-21. doi: 10.1016/j.chom.2013.10.011. PMID: 24237697; PMCID: PMC3904747.

Format:

Schindler C., & Darnell J.F.Jr. (1995). TRANSCRIPTIONAL RESPONSES TO POLYPEPTIDE LIGANDS: The JAK-STAT Pathway. *Annual Review of Biochemistry*, 64(1), 621-652. doi:10.1146/annurev.bi.64.070195.003201

Schlieker, C., Korbel, G. A., Kattenhorn, L., & Ploegh, H. (2005). A Deubiquitinating Activity Is Conserved in the Large Tegument Protein of the *Herpesviridae*. *Journal of virology*, 79(24), 15582-15585.

Schoggins J.W. & Rice C.M. (2011). Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. *Current opinion in virology*, 1(6), 519-525.

Shu Q., Lenneman N., Sarkar S., Sadovsky Y., Coyne C.: ADAP 2 is an interferon stimulated gene that restricts RNA virus entry. *Plos Pathogens*. 2015

SIB Swiss Institute of Bioinformatics. (12.11.2019). Tegument Formation. Retrieved

from <https://viralzone.expasy.org/5616>

Smith, M. C., Boutell, C., & Davido, D. J. (2011). HSV-1 ICP0: paving the way for viral replication. *Future virology*, 6(4), 421-429. doi:10.2217/fvl.11.24

Smith Jennifer S., Rolando Herrero, Cristina Bosetti, Nubia Muñoz, F. Xavier Bosch, José Eluf-Neto, Xavier Castellsagué, Chris J. L. M. Meijer, Adriaan J. C. Van den Brule, Silvia Franceschi, Rhoda Ashley: Multicentric Cervical Cancer Study Group, Herpes Simplex Virus-2 as a Human Papillomavirus Cofactor in the Etiology of Invasive Cervical Cancer, *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, Volume 94, Issue 21, 6 November 2002, Pages 1604–1613, <https://doi.org/10.1093/jnci/94.21.1604>

Sodeik B. (2016). Herpesviren. In B. G.-D. Suerbaum S., Kaufmann S., Schulz T. (Ed.), *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie* (pp. 553-572). Berlin Heidelberg: Springer Verlag.

Sodeik, B. (1997). Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *The Journal of cell Biology*, 136, 1007-1021.

Subach, Fedor V., Patterson, George H., Manley, Suliana, Gillette, Jennifer M., Lippincott-Schwartz, Jennifer, Verkhusha, Vladislav V. (2009) Photoactivatable mCherry for high-resolution two-color fluorescence microscopy, *Nature Methods*, 6, 153-159

Sulea, T., Lindner, H. A., & Ménard, R. (2006). Structural aspects of recently discovered viral deubiquitinating activities. *Biological chemistry*, 387(7), 853-862. doi:10.1515/bc.2006.108

Szpara, M. L., Gatherer, D., Ochoa, A., Greenbaum, B., Dolan, A. D., Bowden, R. J., . . . Davison, A. J. (2014). Evolution and diversity in human herpes simplex virus genomes. *Journal of virology*, 88(2), 1209--13

Taddeo B, Zhang W, Roizman B. The herpes simplex virus host shutoff RNase degrades cellular and viral mRNAs made before infection but not viral mRNA made after infection. *J Virol*. 2013 Apr;87(8):4516-22. doi: 10.1128/JVI.00005-13. Epub 2013 Feb 6. PMID: 23388723; PMCID: PMC3624343.1227. doi:10.1128/JVI.01987

Tavalai, N., & Stamminger, T. (2009). Interplay between Herpesvirus Infection and Host Defense by PML Nuclear Bodies. *2009*, 3, 1240-1264.

Toothaker, L. E., & Newman, D. (1994). Nonparametric Competitors to the Two-Way ANOVA. *Journal of Educational Statistics*, 19(3), 237-273. doi:10.3102/10769986019003237

Traylen, C. M., Patel, H. R., Fondaw, W., Mahatme, S., Williams, J. F., Walker, L. R., . . . Akula, S. M. (2011). Virus reactivation: a panoramic view in human infections. *Future Virol*, 6(4), 451-463. doi:10.2217/fvl.11.21

Trus, B. L., Newcomb, W. W., Cheng, N., Cardone, G., Marekov, L., Homa, F. L., . . . Steven, A. C. (2009). Allosteric Signaling and a Nuclear Exit Strategy: Binding of UL25/UL17 Heterodimers to DNA-Filled HSV-1 Capsids. *Molecular Cell*, 26(4).

UNAIDS. (2018). Global HIV & AIDS statistics — 2019 fact sheet. Retrieved from <https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>

Unterholzner, L., Keating, S. E., Baran, M., Horan, K. A., Jensen, S. B., Sharma, S., . . . Bowie, A. G. (2010). IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. *Nature Immunology*, 11(11), 997-1004. doi:10.1038/ni.1932

Uzé, G., Schreiber, G., Piehler, J., & Pellegrini, S. (2007). The Receptor of the Type I Family. Pitha P.M. Interferon: The 50th Anniversary. Current Topics in Microbiology and Immunology. Springer Berlin Heidelberg, 316, 72-89.

Wagenknecht, N., Reuter, N., Scherer, M., Reichel, A., Müller, R., & Stamminger, T. (2015). Contribution of the Major ND10 Proteins PML, hDaxx and Sp100 to the Regulation of Human Cytomegalovirus Latency and Lytic Replication in the Monocytic Cell line THP-1. *Viruses*, 6, 2884-2907.

Wang, H., Hu, H., & Zhang, K. (2017). Overview of Interferon: Characteristics, signaling and anti-cancer effect. *Arch Biotechnol Biomed.*, 1, 001-016. doi:10.29328/journal.hjb.1001001

Wang, J., Lovelan, A. N., Kattenhorn, L. M., Pleogh, H. L., & Gibson, W. (2006). High-Molecular-Weight Protein (pUL48) of Human Cytomegalovirus Is a Competent Deubiquitinating Protease: Mutant Viruses Altered in Its Active-Site Cysteine or Histidine Are Viable. *Journal of virology*, 80(12), 6003. doi:10.1128/JVI.00401-06

Wang, S., Wang, K., Li, J., & Zheng, C. (2013). Herpes simplex virus 1 ubiquitin-specific protease UL36 inhibits  $\beta$  interferon production by deubiquitinating TRAF3. *Journal of virology*, 87(21), 11851-11860. doi:10.1128/JVI.01211-13

Whitehurst, C. B., Ning, S., Bentz, G. L., Dufour, F., Gershburg, E., Shackelford, J., . . . Pagano, J. (2009). The Epstein-Barr Virus (EBV) Deubiquitinating Enzyme BPLF1 Reduces EBV Ribonucleotide Reductase Activity. *Journal of virology*, 83(9), 4345. doi:10.1128/JVI.02195-08

Wilkinson K.D. (2000). Ubiquitination and deubiquitination: Targeting of proteins for degradation by the proteasome. *CELL & DEVELOPMENTAL BIOLOGY*, 11, pp. 141–148.

Wilkinson KD. (1997). Regulation of ubiquitin-dependent processes by deubiquitinating enzymes. *The FASEB Journal*, 11, 1245-1256.

Yao F. & Schaffer P. (1995). An activity specified by the osteosarcoma line U-2 OS can substitute functionally for ICPO, a major regulatory protein of herpes simplex virus type 1. *Journal of virology*, 69(10), 6249-6258. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7666525>

Yang, Y., Zhao, X., Wang, Z., Shu, W., Li, L., Li, Y., Guo, Z., Gao, B. and Xiong, S. (2020), Nuclear Sensor Interferon-Inducible Protein 16 Inhibits the Function of Hepatitis B Virus Covalently Closed Circular DNA by Integrating Innate Immune Activation and Epigenetic Suppression. *Hepatology*, 71: 1154-1169.

<https://doi.org/10.1002/hep.30897>

Ye, R., Su, C., Xu, H., & Zheng, C. (2017). Herpes Simplex Virus 1 Ubiquitin-Specific Protease UL36 Abrogates NF- $\kappa$ B Activation in DNA Sensing Signal Pathway. *Journal of virology*, 91(5), e02417-02416. doi:10.1128/jvi.02417-16

Ye, Y., & Rape, M. (2009). Building ubiquitin chains: E2 enzymes at work. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(11), 755-764. doi:10.1038/nrm2780

Yu, X. H., S. (2016). The interplay between human herpes simplex virus infection and the apoptosis and necroptosis cell death pathways. *Virology Journal*, 13(1), 77. doi:10.1186/s12985-016-0528-0

Yuan, Hui, You, Jia, You, Hongjuan, Zheng, Chunfu, Sandri-Goldin Rozanne, M. (2018) Herpes Simplex Virus 1 UL36DUB Antagonizes Type I Interferon-Mediated Antiviral Innate Immunity *Journal of Virology*, 92 pp 01161-18

Zaichick, S. V., Bohannon, K. P., Hughes, A., Sollars, P. J., Pickard, G. E., & Smith, G. A. (2013). The herpesvirus VP1/2 protein is an effector of dynein-mediated capsid transport and neuroinvasion. *Cell host & microbe*, 13(2), 193-203. doi:10.1016/j.chom.2013.01.009

Zhang, J., Hu, M.-M., Wang, Y., & Shu, H. B. (2012). TRIM32 Protein Modulates Type I Interferon Induction and Cellular Antiviral Response by Targeting MITA/STING Protein for K63-linked Ubiquitination\*. *Journal of biological Chemistry*, 287.

Zheng, S., Samrat S.K., Gu H. (2016). A Tale of Two PMLs: Elements Regulating a Differential Substrate Recognition by the ICPO E3 Ubiquitin Ligase of Herpes Simplex Virus 1. *Journal of virology*, 10875-10885.

Zhou ZH, Chen DH, Jakana J, Rixon FJ, Chiu W. Visualization of tegument-capsid interactions and DNA in intact herpes simplex virus type 1 virions. *J Virol*. 1999 Apr;73(4):3210-8. doi: 10.1128/JVI.73.4.3210-3218.1999. PMID: 10074174; PMCID: PMC104084.

## Appendix

### I Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1: Schematisch vereinfachte Darstellung eines Herpesviruspartikels.</b> Die Hülle besteht aus einer Doppelmembran mit Oberflächenproteinen, welche bei der Infektion einer Zelle mit der Zellmembran interagieren. Der Raum zwischen Kern und Hülle ist mit Proteinen angefüllt und wird als „Tegument“ bezeichnet. Im Gegensatz zu dieser vereinfachten Darstellung ist er asymmetrisch. Er kann in inneres und äußeres Tegument unterteilt werden, wobei sich diese Unterteilung daran orientiert, ob die entsprechenden Proteine mit dem Kapsid assoziiert sind oder nicht. Anschließend schließt sich das Kapsid an, welches mit viraler DNA befüllt ist. Abbildung erzeugt mit Powerpoint. ....	10
<b>Abbildung 2: Übersicht über die Abläufe während einer Infektion:</b> Das Virus bindet an die Zellmembran („attachment“) und fusioniert anschließend mit dieser. Das Kapsid gelangt durch mikrotubuli-vermittelten Transport zum Kern. Dort wird das virale Genom in den Zellkern eingebracht und es erfolgt die im Text beschriebene Transkription zunächst der $\alpha$ , $\beta$ und dann $\gamma$ Gene, sofern es keine Latenz eingeht. Anschließend erfolgt der Zusammenbau des Viruspartikels und das Ausschleusen aus dem Kern. Abgebildet ist hierbei der von der Fachwelt präferierte „dual envelopment pathway“, mit einer zweizeitigen Umhüllung des Virus. Die erste Hülle des Virus verliert es wieder an der äußeren Nukleuswand. Es wird ein weiteres Mal am Golgi-apparat umhüllt und verlässt anschließend durch Exozytose die Zelle (Roizman,2013). Abbildung modifiziert und übernommen mit freundlicher Genehmigung von SIB Swiss Institute of Bioinformatics, 2018. ....	14
<b>Abbildung 3: Schematische Übersicht (A) über virale Tegumentproteine:</b> UL36 bezeichnet den Genabschnitt zu pUL36. pUL36 bildet das größte Tegumentprotein. Mit freundlicher Genehmigung SIB Swiss Institute of Bioinformatics.....	18
<b>Abbildung 4: Übersicht über das Ubiquitinierungsverfahren.</b> Ubiquitin wird zunächst an E1 gebunden (ATP - abhängig). Anschließend wird das aktivierte Ubiquitin an die E2 Ligase gebunden. E2 bindet an E3, welches an das Substrat gebunden ist und es erfolgt die Ubiquitinierung des Substrats. (Ye et Rape, 2009) Deubiquitinierung löst das Ubiquitin wieder vom Substrat. Ansonsten wird das Substrat über das Proteasomsystem degradiert. Abbildung erstellt mit Powerpoint. ....	21
<b>Abbildung 5: Übersicht über die wichtigsten durch Interferon induzierten Proteine, ihre Signalwege und Wirkungen.</b> Abbildung erstellt mit Powerpoint. ....	26
<b>Abbildung 6: Übersicht über durch Interferon ausgelöste PML Transkription und Effekte von PML.</b> Verschiedene virale Proteine, bei HSV-1 ICP0 versuchen die antivirale Funktion von PML einzuschränken, in dem es nach Ubiquitinierung durch ICP-0 degradiert werden kann (Zheng, 2016). PML blockiert ansonsten die virale Replikation (Alandijany, 2018). Bei VZV konnte außerdem gezeigt werden, dass die viralen Kapside von PML sphärenartig „eingekesselt“ werden(Reichelt et al., 2011). Abbildung mit freundlicher Genehmigung des Swiss Institute of Bioinformatics. ....	28
<b>Abbildung 7: Übersicht über die vor Beginn der Arbeit bestehende Datenlage.</b> Die Mutante	

zeigte sich deutlich gehemmt im Infektionsverhalten bei Vorbehandlung der Zellen mit Interferon ( $p < 0,0001$ ), nachdem die Zellen mit Interferon vorbehandelt wurden und nach der Infektion Interferon $\alpha$ 2a zugegeben worden ist. <b>(A)</b> Zur Messung des Effekts wurde die Ratio aus der Plaquezahl mit Interferon $\alpha$ 2a vorbehandelten Zellen und nicht mit Interferon vorbehandelten Zellen gebildet. <b>(B) C</b> zeigt die Verhältnisse des WT und der Mutante bei unterschiedlichen Zelllinien im Vergleich. Deutlich sichtbar ist die größere Hemmung der Mutante als des Wildtyps. Abgebildet werden kann dies mathematisch durch die Bildung der Ratio aus den Plaquezahlen mit interferonbehandelten Platten und den Plaquezahlen ohne Interferonbehandlung. ....	30
<b>Abbildung 8: Fotografie einer fixierten und mit Kristallviolett gefärbten 6-well Platte.</b> Der schwarze Pfeil deutet auf einen Plaque in einem Well. ....	38
<b>Abbildung 9: Abbildung von Reporterzellplatten.</b> Deutlich zu erkennen ist die eindeutige Auslöschung von infizierten Well durch das Virus. Wells, in denen durch Infektion die Zellen lysiert wurden, bieten keine Angriffsfläche mehr für die Kristallviolettlösung und erscheinen deshalb „leer“ .....	38
<b>Abbildung 10: Darstellung des Prinzips der Reporterzellen (A)</b> und schematisch vereinfachte Darstellung des Protokolls <b>(B)</b> . Die Zellen wurden 8h nach dem Aussäen mit Interferon behandelt. Nach ca. 14h erfolgte die Infektion und Weiterbehandlung mit Interferon. Nach 24h die Eliminierung von residualem Virus durch Waschen mit humanem Serum. Nach weiteren 48h erfolgte der Übertrag auf Reporterzellplatten und der Wechsel des Mediums. Nach 66h erfolgte dann der Wechsel auf Reporterzellplatten. Nach weiteren 72h die Fixation der Platten. ....	39
<b>Abbildung 11: Übersicht über die unterschiedlichen Zeitpunkte der Behandlung mit IFN bei den jeweiligen Platten.</b> Links geben die „+“ oder „-“ Zeichen das Wechseln zu interferonhaltigem (+) oder nicht interferonhaltigem (-) Medium wieder. Der Zeitstrahl unten gibt die einzelnen Zeitabschnitte wieder. Die Platten wurden pro Virus einmal pro Versuch angefertigt. Es wurde folgendes Schema festgesetzt: Auf einer Platte pro Virus erfolgte die Behandlung der Zellen mit IFN $\alpha$ in einer Konzentration von 100U/ml oder 500U/ml auch unter Infektion, das bedeutet, das IFN $\alpha$ wurde in der wie unter Punkt beschriebenen Konzentration der Virussuspension beigemischt und diese Konzentration wurde anschließend beibehalten. Auf zwei weiteren Platten (eine pro Virus) wurde das IFN $\alpha$ nach Ablauf der Infektionsdauer abgenommen. Zwei weitere Platten wurden nicht mit IFN $\alpha$ behandelt und nur mit Virus infiziert. Ein Mediumwechsel wurde dennoch durchgeführt, um die Bedingungen vergleichbar zu halten. ....	40
<b>Abbildung 12: Protokoll der Platten, welche am 3.dpi fixiert wurden</b> (Kontrollplatten) und unten das Protokoll der Platten, die am 5dpi fixiert wurden. Links geben die „+“ und „-“ Zeichen die Zu- oder Abnahme von Interferon wieder. Die Platten wurden pro Virus einmal je Versuch angefertigt. Die Infektion erfolgte bei der DUB-Mutante C65A zunächst mit 20ul einer 1:10 000 Verdünnung und bei WT mit 3,85ul einer 1:10 000 Verdünnung. Nachdem in den ersten beiden Experimenten die Plaquezahlen bei der Mutante zu gering waren, erfolgte schlussendlich die Infektion bei der Mutante mit 40ul einer 1:10 000 Verdünnung. ... <b>Error! Bookmark not defined.</b>	
<b>Abbildung 13: Übersicht über die Neutralisationskraft von humanem Serum.</b> Bei einem Titer von 3,7E5/ml Wildtypvirus wurde der Titer 1000fach verringert. Die y-Achse gibt die PFU/Well, die x-Achse die Verdünnungen des Wildtyps in einer Konzentration von $10^{-4}$ , $10^{-5}$ , $10^{-6}$ ... wieder. Es wurden jeweils zwei Wells entsprechend behandelt. ....	43
<b>Abbildung 14: Übersicht über das Protokoll bei Vorbehandlung der Zellen mit Interferon <math>\alpha</math>.</b>	

Die Zellen wurden 24h nach dem Aussähen mit Interferon behandelt und nach weiteren 14h infiziert. Nach 72h erfolgte die Fixation der Platten. Pro Virus wurde pro Versuch dieses Schema einmal angefertigt. Es wurden auf vier 6-well Platten Verozellen oder U-2 OS Zellen in einer Dichte von 2,5E5/m (Vero) bzw. 3E5/ml (U-2 OS) in 2 ml ausgesät. Am Folgetag wurde auf zwei Platten IFN $\alpha$  in einer Konzentration von 500 U/ml zugegeben und das Medium auf den Übrigen ausgetauscht. Anschließend erfolgte am dritten Tag nach dem Aussähen die Infektion ohne erneute Zugabe von IFN $\alpha$  während der Infektion und ohne die Beimengung von IFN $\alpha$  in die Methylcellulosemischung. Drei Tage nach Infektion wurden die Platten mit Formaldehyd in 4% finaler Konzentration im Medium fixiert und mit Kristallviolett gefärbt. Um das Bilden von späteren Plaques sicher ausschließen zu können, erfolgte die Fixierung bei den U-2 OS Zellen bei den mit Interferon behandelten Platten einen Tag später. .... 44

**Abbildung 15: HEK 293T Zellen einen Tag nach dem Aussähen in einer Konzentration von 3,5E4/Well.** Aufnahme mit dem Lichtmikroskop. .... 46

**Abbildung 16: Übersicht über die Titration.** Infizierte Well sind rot markiert. Die Zahlen geben die gewählte PFU/Well wieder. Man sieht, wie abhängig von der Infektionsdosis sich die infizierte Well-Zahl ändert. Während bei einer PFU von 5 alle Well infiziert wurden sind bei einer PFU von 0,15625 lediglich ein Teil infiziert. .... 46

**Abbildung 17: Übersicht über die Plaquezahl des Wildtyps bei Exposition der Verozellen mit 100U/ml Interferon bzw. 500U/ml.** Interferon wurde nach der Infektion weiter zugegeben (+/+/+), bzw. blieben die Verozellen davon unbeeinflusst (-/-/-). Nach 3 Tagen erfolgte die Fixierung und Auswertung. N=48 bei 4 Versuchen mit jeweils einer Platte mit 6 Vertiefungen. ns= nicht signifikant, \*p<0,05, one way ANOVA. .... 50

**Abbildung 18: Verozellen wurden mit Interferon vorbehandelt und mit Wildtyp und DUB-Mutante infiziert.** Eine Kontrollplatte wurde nicht mit Interferon behandelt. Die Abbildung zeigt eine Übersicht über das Verhältnis der Plaquezahlen der mit Interferon behandelten Verozellen zu den Plaquezahlen bei Behandlung ohne Interferon der DUB-Mutante C65A und des Wildtyps bei Abnahme des Inokulums nach Infektion. Die x-Achse zeigt die entsprechende Behandlung und das verwendete Virus an. „+/-/+“ bedeutet, dass auf die Verozellen während der Infektion Interferon hinzugegeben wurde und nach der einstündigen Infektion durch ein interferonhaltiges Medium ersetzt wurde. „+/-/-“ bedeutet dagegen eine Abnahme des interferonhaltigen Mediums nach Infektion mit Ersatz durch ein nicht-interferonhaltiges Medium. Es wurden in dieser Versuchsreihe 100U/ml als Interferonkonzentration benutzt. Die y- Achse zeigt das Plaquezahlenverhältnis an. Die Balken geben jeweils den Mittelwert bzw. die Standardabweichung wieder. N=131 aus vier Versuchen mit jeweils 6-well Platten. (ns = nicht signifikant, \*\*\*\* p<0,0001), two way ANOVA. .... 51

**Abbildung 19: Verozellen wurden mit Interferon behandelt und mit der DUB-Mutante und dem Wildtyp infiziert.** Hierbei wurde eine Interferonkonzentration von 500 U/ml gewählt. Eine Kontrollplatte wurde nicht mit Interferon behandelt. Diese Übersicht zeigt das Verhältnis der Plaquezahlen der mit Interferon behandelten Verozellen zu den Plaquezahlen bei Behandlung ohne Interferon der DUB-Mutante C65A und des Wildtyps bei Abnahme des Inokulums nach Infektion. „+/-/+“ bedeutet, dass auf die Verozellen während der Infektion Interferon hinzugegeben wurde und nach der einstündigen Infektion durch ein interferonhaltiges Medium ersetzt wurde. „+/-/-“ bedeutet dagegen eine Abnahme des interferonhaltigen Mediums nach Infektion mit Ersatz durch ein nicht-interferonhaltiges Medium. (\*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001). Die Balken geben jeweils den Mittelwert bzw. die Standardabweichung wieder. N=130 aus 4 Versuchen, two way ANOVA. .... 52

**Abbildung 20: Übersicht über das Verhältnis der Plaquezahlen von mit interferonbehandelten Verozellen (+) zu nicht mit Interferon behandelten Verozellen (-) des Wildtyps und der Mutante bei Abnahme des Interferons 3dpi.** Die x-Achse zeigt die entsprechende Behandlung und das verwendete Virus an. Hierbei bedeutet „+/+/+“, dass dreimal Interferon hinzugegeben wurde (vor, während und nach der Infektion bis zur Fixierung) und die Platte 3dpi fixiert worden ist. „+/+/+“ bedeutet eine Interferonbehandlung über 5 Tage, wobei zusätzlich Interferon 3d nach der Infektion ausgetauscht wurde. „+/+/+/-“ eine Abnahme des Interferons 3dpi. Die Balken geben jeweils den Mittelwert bzw. die Standardabweichung wieder, N=162 \* p<0,05, \*\*\* p<0,001, \*\*\*\* p<0,0001, one way ANOVA.

..... 55

**Abbildung 21: Übersicht über die Plaquezahlen (A) in der vorliegenden Versuchsreihe bei Abnahme des Interferons drei Tage nach Infektion und des Protokolls (B).** Abbildung A zeigt in der x-Achse den Wildtyp und die Plaquezahlen ohne Interferonstimulation (-/-/-/-), die dauerhafte Interferonstimulation (+/+/+/+), sowie die Abnahme 72h nach Infektion (+/+/+/-). Die y-Achse gibt die zugehörigen Plaquezahlen wieder. Während die Plaquezahlen ohne Interferoneinfluss (-/-/-/-) unter beiden Viren vergleichbar erscheinen, zeigt sich durch Interferonstimulation ein Abfall in der Plaquezahl, deutlicher bei der Mutante, als beim Wildtyp (+/+/+/+). Wird der Interferoneinfluss aufgehoben (+/+/+/-) besteht dieser weiter, wie an der annähernd gleichbleibenden Plaquezahl zu erkennen ist. Die Balken geben jeweils den Mittelwert bzw. die Standardabweichung wieder, \* p<0,05\*\*\* p<0,001, \*\*\*\* p<0,0001, one way ANOVA. .... 56

**Abbildung 22: Übersicht des Anstiegs beider Viren.** Hierzu wurden die Plaquezahlen nach 5 Tagen mit Interferonwechsel und die Werte der Plaquezahlen nach 3 Tagen zueinander in das Verhältnis gesetzt. Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied. N=35 mit Werten aus drei Versuchen, p=0,8537, one way ANOVA ..... 57

**Abbildung 23: Verozellen wurden mit Interferon behandelt und mit der DUB-Mutante und dem Wildtyp infiziert, wobei eine Interferonkonzentration von 500 U/ml gewählt worden ist.** Eine Kontrollplatte wurde nicht mit Interferon behandelt. Diese Übersicht zeigt das Verhältnis der Plaquezahlen der mit Interferon behandelten Verozellen zu den Plaquezahlen bei Behandlung ohne Interferon der DUB-Mutante C65A und des Wildtyps bei Abnahme des Inokulums nach Infektion. „+/+/+“ bedeutet, dass auf die Verozellen während der Infektion Interferon hinzugegeben wurde und nach der einstündigen Infektion durch ein interferonhaltiges Medium ersetzt wurde. „+/+/+/-“ bedeutet dagegen eine Abnahme des interferonhaltigen Mediums nach Infektion mit Ersatz durch ein nicht-interferonhaltiges Medium. (\* p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\* p<0,001, \*\*\*\* p<0,0001). Die Balken geben jeweils den Mittelwert bzw. die Standardabweichung wieder. N=130 aus 4 Versuchen, two way ANOVA... 58

**Abbildung 24: Verhältnis der Plaquezahlen nach Infektion mit Wildtyp und der DUB-Mutante nach Vorbehandlung mit Interferon.** Zur Infektion wurden Verozellen benutzt. **A zeigt das Verhältnis der Plaquezahlen mit Interferonbehandlung zu ohne Interferonbehandlung.** Es zeigte sich auch hier ein signifikanter Unterschied zwischen Mutante und Wildtyp. **B zeigt das Protokoll** mit den unterschiedlichen Zeitpunkten der Interferonzugabe, n=11 \*p<0,05, one way ANOVA..... 59

**Abbildung 25: Übersicht über die Ergebnisse bei der Verwendung von mit mCherry veränderten Virus.** Die y-Achse zeigt das Verhältnis der Plaquezahlen an. Hier zeigt sich derselbe Effekt wie in den vorhergegangenen Versuchen. Dies zeigt, dass der stärkere Einfluss des Interferons auf die DUB Mutante auch in einem anderen Virenstrang replizierbar ist. Die y-



Achse zeigt das Verhältnis zwischen den Plaquezahlen an. Der Wildtyp und die Mutante unterscheiden sich hierbei signifikant ( $p=0,0002$ ) $n=24$ , one way ANOVA. ....	60
<b>Abbildung 26: Übersicht über das Protokoll. „+“ und „-“ gibt die Zugabe (+) oder Abnahme (-) von Interferon an.</b> Der Pfeil zeigt die Zeit mit den jeweiligen Zeitabständen zwischen einem Ereignis an. Zunächst wurden die Platten mit Interferon behandelt und dann infiziert. Anschließend erfolgte eine Weiterbehandlung mit Interferon. Dann die Neutralisation von potenziell noch vorhandenem Virus der Infektionsdosis im Medium durch Waschen mit humanem Serum, um eine Übertragung von Virus aus dem Inoculum, das keine Zellen infiziert hat, auf die Reporterzellplatten zu vermeiden. Denn dies könnte das Ergebnis verfälschen. Nach zwei Tagen fand die erste Übertragung auf Reporterzellplatten statt. Nach weiteren 66h die zweite Übertragung. Nach drei Tagen erfolgte die Fixierung. ....	62
<b>Abbildung 27: Übersicht über die Infektionsrate bei der Verwendung von 96-well Platten, <math>n=4</math>.</b> Die Infektionsrate ist das Verhältnis der infizierten Wells zu allen 96-wells. Die x-Achse gibt den verwendeten Virus sowie die Häufigkeit des hinzugegebenen Interferons (+) bzw. seine Abnahme (-) wieder. Es zeigte sich entgegen den vorherigen Versuchen kein signifikanter Unterschied zwischen Mutante und Wildtyp. Die Balken zeigen den Mittelwert bzw. die Standardabweichung, one way ANOVA. ....	63
<b>Abbildung 28: Um die Qualität des Materials zu prüfen,</b> wurde ein Versuch mit Vorbehandlung der Zellen und Zugabe des Interferons während der Infektion durchgeführt. Hier zeigte sich entgegen den anderen Plaque-versuchen kein signifikanter Interferoneffekt ( $p>0,05$ , one way ANOVA) und kein Unterschied zwischen der DUB-Mutante und dem Wildtyp. Nachdem mit demselben Material gearbeitet wurde, mit dem auch die Versuche an den Platten mit 96 Vertiefungen durchgeführt wurden, ist am ehesten von einem Materialfehler auszugehen, der auch die Ergebnisse der 96-well Platten negativ beeinflusst. Vermutlich reichte die Qualität des Interferons nicht aus. ....	64
<b>Abbildung 29: Übersicht über die Verhältnisse der Plaquezahlen von mit Interferon behandelten Platten (+) zu unbehandelten Platten (-) von Wildtyp und Mutante bei der Verwendung von U-2 OS Zellen, welche vor Infektion mit Interferon vorbehandelt worden sind.</b> Die Balken geben den Mittelwert bzw. die Standardabweichung wieder ( $p=0,48$ , one way ANOVA).....	65

## II Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die Taxonomie der humanen Herpesviren.) .....	8
Tabelle 2: Verwendete Zelllinien und das jeweils benutzte Medium.....	32
Tabelle 3: Verwendete Materialien für die Zellkultivierung.....	33
Tabelle 4: Verwendete Materialien für die Infektion. ....	36
Tabelle 5: Verwendete Materialien für Färbung und Fixation.....	37
Tabelle 6: Übersicht über die Zelllinie und die jeweils verwendete Interferonkonzentration. Abhängig von der Empfindlichkeit der Zellen konnte beobachtet werden, dass die Interferonkonzentration an die Empfindlichkeit der jeweiligen Zelllinie angepasst werden musste. ....	35

### III Softwareverzeichnis

GraphPad Prism version 7.00 für Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA,  
[www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)

Endnote 20, Creative Analytics, <https://endnote.com/>

Microsoft PowerPoint, Version 2202

DeepL SE, 50825 Köln, Deutschland, 2022, <https://www.deepl.com>

## IV Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dölken für seine wissenschaftliche und geduldige Unterstützung während der gesamten Bearbeitungszeit der Doktorarbeit.

Außerdem gilt mein Dank Herrn Dr. Thomas Hennig, der durch seine weitreichenden Kenntnisse und seine große wissenschaftliche Erfahrung die Arbeit erst ermöglichte und mich mit Anregungen und Kritik förderte.

Der Graduate School of Life Science möchte ich für die großzügige finanzielle Unterstützung während meines Freisemesters danken.

Frau Arnhild Grothey danke ich nicht nur für die praktische Unterstützung, die sie dank ihrer langjährigen Laborerfahrung als technische Assistentin leisten konnte, sondern auch für die persönliche und freundschaftliche Unterstützung während meiner Zeit im Labor.

Abschließend möchte ich meinen Freunden, vor allem Jojo, und meiner Familie für ihre Nachsicht und Motivierung bedanken.

## **Eidesstaatliche Erklärung**

Ich versichere, dass ich die Arbeit ohne fremde Hilfe und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen angefertigt habe und dass die Arbeit in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen hat. Alle Ausführungen, die wörtlich oder dem Sinn nach übernommen worden sind, sind als solche gekennzeichnet.

Bad Mergentheim, Juni 2022

---

Irmgard Katharina Stark