

Identifizierung und Charakterisierung neuer Cytomegalovirus-kodierter Interferon-Antagonisten

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für Biologie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Mareike Eilbrecht

aus Düsseldorf

07.10.2020

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden, falls nicht anders angegeben, am Institut für Virologie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter:
2. Gutachter:
3. Gutachterin:

Prof. Dr. Mirko Trilling
Prof. Dr. Matthias Gunzer
Prof. Dr. Elke Bogner

Vorsitzende des Prüfungsausschusses:

Prof. Dr. Astrid Westendorf

Tag der mündlichen Prüfung:

11.01.2021

DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT
DUISBURG
ESSEN

Offen im Denken

ub | universitäts
bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

DOI: 10.17185/duepublico/74254

URN: urn:nbn:de:hbz:465-20240730-142428-9

Alle Rechte vorbehalten.

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

Mouse Cytomegalovirus M34 Encodes a Non-Essential, Nuclear, Early-Late Expressed Protein Required for Efficient Viral Replication

Eilbrecht, Mareike; Le-Trilling, Vu Thuy Khanh and Trilling, Mirko

Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 10 (2020). doi: 10.3389/fcimb.2020.00171

Datum der Veröffentlichung: 05.05.2020

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Summary	2
1 Einleitung	3
1.1 Viren	3
1.1.1 Cytomegaloviren	4
1.1.2 HCMV Epidemiologie und Pathogenese	4
1.1.3 CMV Genom	6
1.1.4 CMV Genexpression	7
1.1.5 MCMV als Modellvirus	8
1.2 Das Immunsystem	9
1.2.1 Das adaptive Immunsystem	10
1.2.2 Das angeborene Immunsystem	11
1.2.3 Interferone	12
1.2.4 Interferon-induzierte JAK-STAT-Signaltransduktion	13
1.3 CMV-vermittelte Immunevasion	16
1.3.1 CMV-kodierte Antagonismen der IFN-Induktion	16
1.3.2 CMV-kodierte Antagonismen der IFN-Signaltransduktion	17
1.3.3 CMV-kodierte Antagonismen der ISG-Induktion	19
1.4 CMV Proteine pM33 und pUL33	20
1.4.1 CMV-kodierte G-Protein gekoppelte Rezeptoren	22
1.4.2 Die Bedeutung von UL33, M33 und R33 für die Replikation	26
1.5 CMV Proteine pM34 und pUL34	27
1.6 Zielsetzung	29
2 Material und Methoden	30
2.1 Material	30
2.1.1 Reagenzien	30
2.1.2 Kits	32
2.1.3 Puffer und Lösungen	32
2.1.4 Verbrauchsmaterialien	34
2.1.5 Geräte	35
2.1.6 Zellkulturmedien, Inhibitoren und Zytokine	37
2.1.7 Zellen	37

2.1.8	Mäuse	38
2.1.9	Bakterien	38
2.1.10	Plasmide	38
2.1.11	<i>Bacterial artificial chromosomes (BAC)</i>	39
2.1.12	Viren	40
2.1.13	Oligonukleotide	40
2.1.14	Antikörper	42
2.1.15	Computer-Programme und Datenbanken	43
2.2	Arbeiten mit eukaryotischen Zellen	44
2.2.1	Zellkultur	44
2.2.2	Kryokonservierung eukaryotischer Zellen	44
2.2.3	Transfektion mit Polyethylenimin	45
2.2.4	Transfektion mit SuperFect	45
2.2.5	Luziferase-Reportergen-Assay	46
2.3	Proteinbiochemische Methoden	47
2.3.1	Herstellung von Gesamtzell-Lysaten	47
2.3.2	Bradford Assay	47
2.3.3	Natriumdodecylacetat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	47
2.3.4	Western Blot	48
2.3.5	Immunfluoreszenzmikroskopie	49
2.3.6	<i>IgG-Enzyme-linked Immunosorbent Assay (IgG-ELISA)</i>	49
2.4	Molekularbiologische Methoden	50
2.4.1	Agarose-Gelelektrophorese und DNA-Gelextraktion	50
2.4.2	Polymerase-Kettenreaktion	51
2.4.3	Quick Change Mutagenese	51
2.4.4	Restriktionsspaltung	51
2.4.5	Ligation	52
2.4.6	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	52
2.4.7	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	52
2.4.8	Herstellung elektrokompenter <i>E. coli</i>	53
2.4.9	Transformation elektrokompenter <i>E. coli</i>	53
2.4.10	DNA-Minipräparation	54
2.4.11	BAC-DNA-Präparation	54
2.4.12	Southern Blot	55
2.4.13	Synthese DIG-markierter Sonden	56

2.5	BAC Mutagenese	56
2.5.1	Insertion einer HA-Epitop-Markierung mittels <i>en passant</i> Mutagenese	57
2.5.1.1	Generierung von HA-Epitop-Rekombinationskassetten mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	57
2.5.1.2	Erste homologe Rekombination zur Insertion einer HA-Epitop-Rekombinationskassette	57
2.5.1.3	Zweite homologe Rekombination zur Entfernung eines Selektionsmarkers	58
2.5.2	Deletionsmutagenese durch Red $\alpha\beta$ -vermittelte homologe Rekombination	58
2.5.2.1	Generierung von Deletionskassetten mittels PCR	58
2.5.2.2	Insertion einer Deletionskassette	59
2.5.2.3	Entfernung einer Deletionskassette mittels Flippase-vermittelter Rekombination	59
2.5.3	Southern Blot Kontrollen zur BAC-Mutagenese	60
2.5.4	PCR Kontrollen zur BAC-Mutagenese	60
2.5.5	Teilsequenzierung zur BAC-Mutagenese	60
2.5.6	Virusrekonstitution	61
2.6	Virologische Methoden	61
2.6.1	Infektionen	61
2.6.2	Präparation von Virusstocks	62
2.6.3	Präparation konzentrierter Virusstocks	62
2.6.4	<i>Immediate-early</i> -Expression	64
2.6.5	<i>Early-late</i> -Expressionskinetik	64
2.6.6	Oberflächenfärbung und Durchflusszytometrie von MCMV-infizierten Zellen	64
2.6.7	Infektionen zur <i>in vitro</i> Replikation	65
2.6.8	Virustitration	65
2.6.9	Adenovirusinfektion	66
2.6.10	Vakziniavirusinfektion	66
2.7	Arbeiten mit Mäusen	67
2.7.1	Präparation von Virusstocks nach Mauspassage	67
2.7.2	Infektionen von Mäusen zur <i>in vivo</i> Replikation	67
2.7.3	Serum- und Organentnahme	67
3	Ergebnisse	69
3.1	Charakterisierung neuer potenzieller CMV-kodierter IFN γ -Antagonisten	69
3.1.1	Die MCMV-kodierten Genprodukte M33 und M34 inhibieren die IFN γ -induzierte Genexpression	70

3.1.2	pM33 inhibiert die IFN γ -induzierte Genexpression mittels eines G-Protein-unabhängigen Mechanismus	74
3.1.3	Der N-Terminus von pM34 ist nicht essenziell für die Inhibition der IFN γ -induzierten Genexpression	76
3.1.4	Die HCMV-kodierten Homologe UL33 und UL34 inhibieren die IFN γ -induzierte Genexpression	81
3.2	Generierung und Charakterisierung von M33HA-MCMV und M34HA-MCMV	85
3.2.1	Generierung von M33HA-MCMV und M34HA-MCMV mittels BAC-Mutagenese	85
3.2.2	pM34HA wird mit einer early/late Expressionskinetik exprimiert	87
3.2.3	pM34HA ist nukleär lokalisiert	89
3.3	Generierung der Deletionsviren Δ M33-MCMV und Δ M34-MCMV mittels BAC-Mutagenese	92
3.3.1	M33 und M34 sind nicht essenziell für die MCMV-Replikation <i>in vitro</i>	92
3.4	Die Replikation von Δ M34-MCMV- und Δ M33- Δ M34-MCMV ist <i>in vitro</i> attenuiert	95
3.4.1	Δ M34HA-MCMV bestätigt die korrekte Deletion von M34 und die attenuierte Replikation <i>in vitro</i>	99
3.4.2	wt- und Δ M34-MCMV replizieren in NIH3T3-Zellen schlechter als in CIM-Zellen	102
3.5	Charakterisierung der IFN γ -Sensitivität von Δ M33-MCMV, Δ M34-MCMV und Δ M33- Δ M34-MCMV	104
3.5.1	Deletion von <i>M34</i> führt zu mehr Oberflächenexpression von MHC-I nach IFN γ -Behandlung in MCMV-infizierten Zellen	107
3.6	Etablierung eines <i>gain-of-function</i> -Experimentalsystems zur Untersuchung redundanter IFN γ -Antagonisten in MCMV	108
3.6.1	Ad5 ist nicht als <i>gain-of-function</i> -Experimentalsystem für die Untersuchung von IFN γ -Antagonisten geeignet	109
3.6.2	Die Replikation von VACV wird durch IFN γ inhibiert und eignet sich als <i>gain-of-function</i> -Experimentalsystem für IFN γ -Antagonisten	112
3.7	Charakterisierung von Δ M34-MCMV <i>in vivo</i>	114
3.7.1	Virusisolation von Δ M34-MCMV nach einer Mauspassage	114
3.7.2	Δ M34-MCMV-Replikation ist <i>in vivo</i> attenuiert	115
3.7.3	Δ M34-MCMV Replikation induziert MCMV-spezifische IgG	117

4 Diskussion	119
4.1 Die MCMV-kodierten Genprodukte M33 und M34 sind Antagonisten der IFN γ -induzierten Genexpression	120
4.1.1 Die HCMV-Homologe pUL33 und pUL34 inhibieren ebenfalls die IFN γ -induzierte Genexpression	121
4.1.2 pM33 inhibiert die IFN γ -induzierte Genexpression mittels eines G-Protein-unabhängigen Mechanismus	121
4.1.3 Mögliche Mechanismen der pM33- und pUL33-vermittelten Antagonismen der IFN γ -induzierten Genexpression	122
4.1.4 pM34 inhibiert die IFN γ -induzierte Genexpression	125
4.2 M34 ist nicht essenziell	129
4.2.1 Die Auswahl geeigneter Zell-Linien ist für den Erfolg einer Rekonstitution stark attenuierter MCMV-Virusmutanten entscheidend	130
4.2.2 Δ M34-MCMV ist <i>in vitro</i> stark attenuiert	131
4.3 M33 und M34 sind nicht die einzigen MCMV-kodierten IFN γ -Antagonisten . .	133
4.3.1 Deletion von <i>M34</i> führt zu mehr Oberflächenexpression von MHC-I in MCMV-infizierten Zellen IFN γ -Stimulation	134
4.3.2 Etablierung eines <i>gain-of-function</i> -Experimentalsystems zur Untersuchung redundanter IFN γ -Antagonisten in MCMV	136
4.4 Δ M34-MCMV ist <i>in vivo</i> attenuiert	137
4.4.1 Bedeutung der inhibierten IFN γ -Signaltransduktion für die adaptive Immunität	139
4.4.2 Δ M34-MCMV ist ein vielversprechender Kandidat für Lebend-attenuierte Vakzin-Vektoren	141
 Abbildungsverzeichnis	 144
 Tabellenverzeichnis	 146
 Abkürzungsverzeichnis	 147
 Literaturverzeichnis	 152
 Danksagung	 183
 Lebenslauf	 184
 Erklärungen	 186

Zusammenfassung

Interferone dienen der ersten Abwehr von Pathogenen und stellen eine frühe Herausforderung für Virusinfektionen dar. Cytomegaloviren haben daher mehrere Evasionsmechanismen gegen die Funktionen des Interferonsystems entwickelt. In der Forschung zu Cytomegaloviren und den gegen sie gerichteten Immunantworten wird das Maus-CMV (MCMV) als Modell eingesetzt. Dieser Arbeit vorausgehend wurde bereits gezeigt, dass von MCMV mindestens ein IFN- γ -Antagonist kodiert wird, welcher die STAT1-abhängige Transkription von Interferon-stimulierten Genen (ISG) inhibiert. In einem Screening wurden aus einer MCMV-ORF Library zwei MCMV-kodierte Gene als potenzielle IFN γ -Antagonisten identifiziert. Diese Genprodukte sollten allgemein charakterisiert und bezüglich ihrer potenziellen Immunevasionsfunktion analysiert werden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die MCMV-kodierten Gene *M33* und *M34* nach einer ektopten Expression die IFN γ -induzierte Genexpression signifikant und dosisabhängig inhibieren. Auch die HCMV-kodierten Homologe *UL33* und *UL34* inhibierten die IFN γ -induzierte Genexpression signifikant. pM33 und pUL33 sind als virale G-Protein-gekoppelte Rezeptorhomologe mit konstitutiver Aktivität beschrieben. Für pM33 konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der IFN γ -induzierten Genexpression mittels eines G-Protein-unabhängigen Mechanismus erfolgt. Für pM34 wurde eine nukleäre Lokalisation gezeigt, welche auf eine mögliche Funktion von pM34 als transkriptionellen Regulator, wie es für pUL34 publiziert ist, hindeutet. Für die Charakterisierung der Gene *M33* und *M34* und ihrer Bedeutung für die Virusreplikation wurden Virusmutanten mit einer vollständigen Deletion der ORFs *M33* und *M34* generiert. Entgegen bereits publizierten Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass *M34* nicht essenziell für die MCMV-Replikation ist, Δ M34-MCMV jedoch *in vitro* bis zu 100-fach schlechter repliziert als das parentale wt-MCMV. Die Deletion der Gene *M33* und *M34* führte nicht zu einer erhöhten IFN γ -Sensitivität im Vergleich zu wt-MCMV, was darauf hindeutet, dass *M33* und *M34* nicht die einzigen MCMV-kodierten IFN γ -Antagonisten sind. Dennoch wurde in Δ M34-MCMV-infizierten Zellen eine stärkere durch IFN γ -induzierte Oberflächenexpression von MHC-I nachgewiesen als in wt-MCMV-infizierten Zellen. Dies bestätigt die Inhibition der IFN γ -induzierten Expression eines ISGs von *M34* in infizierten Zellen. *In vivo* wurde nach 3 Tagen eine Replikation von Δ M34-MCMV in Milz, Leber, Nieren und Lunge nachgewiesen. Nach 21 Tagen war Δ M34-MCMV dagegen in den meisten Organen nicht nachweisbar. Dennoch wurden in den Seren aller Mäuse MCMV-spezifische Antikörper detektiert. Diese Ergebnisse zeigen, dass Δ M34-MCMV trotz einer stark eingeschränkten Replikation adaptive Immunantworten induziert. Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass *M33* und *M34* Antagonisten der IFN γ -induzierten Genexpression sind und das attenuierte Deletionsvirus Δ M34-MCMV ein vielversprechender Kandidat für einen Lebend-Vakzin-Vektor im Mausmodell ist.

Summary

Interferons act as first line of defense against pathogens and establish an early challenge for viral infections. Cytomegaloviruses have evolved several mechanisms of immune evasion to overcome the interferon system facilitating a productive replication and spread throughout their host. The murine CMV (MCMV) is broadly established as a mouse model in cytomegalovirus infection research. Prior to this work, the existence of a MCMV-encoded IFN antagonist targeting the STAT1-mediated transcription of interferon stimulated genes (ISG) has been observed. In a comprehensive screen of a MCMV ORF library two candidate genes have been identified. Aim of this study was to characterize these two candidate genes and their potential role in immune evasion. Following ectopic expression both MCMV-encoded Genes *M33* and *M34* significantly and dose-dependently inhibited the IFN γ -stimulated gene expression. The HCMV-encoded homologues *UL33* and *UL34* also significantly inhibited the IFN γ -stimulated gene expression. pM33 and pUL33 have previously been described as viral G protein-coupled receptors and displayed constitutive signaling capacity. Here, pM33 was shown to inhibit the IFN γ -stimulated gene expression independently of G protein-mediated signaling. As a transcriptional regulator, the HCMV-encoded pUL34 has been described to localize to the nucleus. In agreement with this, pM34 was detected in the nucleus of transfected and M34HA-MCMV infected cells, indicating a function as transcriptional regulator. For further characterization of *M33* and *M34* and their role in replication, recombinant virus mutants harboring deletions of the entire ORF *M33* and *M34* were generated. Δ M34-MCMV was replication competent, albeit strongly attenuated to 100-fold reduced replication compared to wt-MCMV, contradicting data published by others stating *M34* as an essential gene. Deletion of both *M33* and *M34* did not reveal enhanced IFN γ -sensitivity, indicating the presence of additional IFN γ antagonists. However, infection with Δ M34-MCMV led to increased surface expression of MHC-I induced by IFN γ when compared to wt-MCMV, confirming a *M34*-mediated inhibition of an ISG in MCMV-infected cells. Replication of Δ M34-MCMV was detected 3 days post infection in spleen, liver, kidney and lungs of BALB/c mice. After 21 days Δ M34-MCMV was not detectable in most organs, in contrast to wt-MCMV. However, MCMV-specific IgG antibodies were present in sera of all Δ M34-MCMV mice. These results suggest an induction of adaptive immune responses despite attenuated replication. Taken together, this work revealed *M33* and *M34* as antagonists of IFN γ -stimulated gene expression and suggests Δ M34-MCMV as a promising candidate for a life attenuated vaccine vector in mouse models.

1 Einleitung

1.1 Viren

Viren sind subzelluläre Infektionserreger ohne eigenen Stoffwechsel. Sie sind für die Vervielfältigung ihrer Erbinformationen auf die Stoffwechsel- und Syntheseprozesse von Wirtszellen angewiesen und sind daher obligat intrazellulär mit parasitären Eigenschaften. Zur extrazellulären Verbreitung können Viren in der Form von Virionen vorliegen. Diese infektiösen Partikel enthalten die viralen Erbinformationen in Form von Nukleinsäuren. Das virale Genom wird als Bauplan für die intrazelluläre Vervielfältigung in infizierte Zellen eingebracht, wo die Synthese neuer Viren unter Ausnutzung der zellulären Prozesse und Ressourcen erfolgt. Die neu gebildeten Virionen werden nach Fertigstellung in großen Mengen freigesetzt und zerstören dabei in vielen Fällen die infizierte Zelle. Viren stellen demzufolge obligat intrazellulär replizierende Parasiten dar. Ob Viren als Lebewesen oder Lebensformen bezeichnet werden sollten, ist Gegenstand anhaltender Diskussionen. Diese führen soweit, dass für Viren aufgrund der Abwesenheit von Ribosomen eine neue Gruppe der Kapsid-kodierenden Organismen vorgeschlagen wurde, die den drei aktuellen Domänen Eukaryoten, Bakterien und Archaeen als Gruppe der Ribosomen-kodierenden Organismen gegenübergestellt werden sollen (Raoult und Forterre, 2008).

Das virale Genom besteht je nach Virus aus *deoxyribonucleic acid* (DNA) oder aus *ribonucleic acid* (RNA). Es kann einzelsträngig oder doppelsträngig vorliegen und bei einzelsträngigem Genom entweder die normale 5' 3' (positive) oder die komplementäre (negative) Kodierung aufweisen. Das Genom ist in ein Kapsid aus Proteinen integriert. Diese Kapside können unbehüllt vorliegen oder im Fall von behüllten Viren von einer Lipiddoppelschicht (*envelope*) umgeben sein. Der Ursprung dieser Lipidhüllen liegt in den Membranen der Wirtszelle, sodass die Hülle verschiedener Viren aus der Zellmembran, aber auch aus Strukturen des Golgi-Apparats oder aus endosomalen Membranen gebildet wird. Abhängig vom zellulären Ort der Umhüllung befinden sich daher in den Hüllen der verschiedenen Viren neben viral kodierten auch zelluläre Glykoproteine. Einige der umhüllten Viren enthalten außerdem eine zusätzliche Proteinschicht zwischen Kapsid und Hülle, welche als Tegument bezeichnet wird. Zur Klassifikation werden Viren anhand der Nukleinsäuren ihrer Genome und den damit einhergehenden Replikationsstrategien nach der Baltimore-Klassifikation (Baltimore, 1971) gruppiert. Diese rein molekularbiologische Einteilung wird jedoch zunehmend von der offiziellen taxonomischen Einteilung des *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) abgelöst, welche Viren gemäß ihres genomischen

Verwandtschaftsgrads einteilt und auch Eigenschaften wie die Form des Kapsids und die Präsenz einer Virushülle berücksichtigt (Lefkowitz *et al.*, 2018).

1.1.1 Cytomegaloviren

Cytomegaloviren (CMV) sind behüllte Viren mit einem doppelsträngigen (ds) DNA-Genom und gehören zu den β -Herpesviren. Wie die meisten Herpesviren haben sich die Cytomegaloviren in einer langen Koevolution über Millionen von Jahren mit ihren Wirten an die jeweilige Wirtspezies adaptiert und daher eine starke Speziesspezifität entwickelt. Infektionen verschiedener Spezies durch das CMV einer anderen Spezies finden daher unter natürlichen Umständen nicht statt. CMV wurden zunächst aus den Speicheldrüsen von Mäusen und kurz darauf aus humanen Speicheldrüsen isoliert (Smith, Margaret G., 1956; Smith, 1954). Sie zeichnen sich durch eine langsame Replikation aus, die zu einer Vergrößerung des Zytoplasmas und Zellkerns der infizierten Zelle führt. Dieser charakteristische cytopathische Effekt (CPE) ist lichtmikroskopisch erkennbar und wird als namensgebend für das Virus als Cytomegalie bezeichnet (Weller *et al.*, 1960).

1.1.2 HCMV Epidemiologie und Pathogenese

Das humane Cytomegalovirus (HCMV; auch humanes Herpesvirus 5) ist ein weit verbreitetes Virus mit einer geschätzten weltweiten Durchseuchungsrate von 45 bis 100%, welche von Faktoren wie dem Geschlecht und Alter sowie dem sozioökonomischen Status abhängt (Cannon *et al.*, 2010). In Deutschland wurde eine Seroprävalenz von 56,7% der erwachsenen Bevölkerung festgestellt (Lachmann *et al.*, 2018). Die Primärinfektion mit CMV verläuft in den meisten Fällen subklinisch und findet über die meisten Körperflüssigkeiten wie Blut, Speichel, Genitalsekrete oder auch Muttermilch statt, kann aber auch während der Schwangerschaft intrauterin über die Plazenta oder durch Organtransplantationen erfolgen. In den meisten Fällen verläuft die Primärinfektion symptomlos, sie kann aber in manchen Fällen auch in scheinbar immunkompetenten Infizierten schwere Verläufe nehmen (Rafailidis *et al.*, 2008). Das Virus infiziert primär mononukleäre Zellen und Endothelzellen, kann sich aber im Verlaufe der Infektion in fast alle Organe verbreiten. Dabei wurde die Verbreitung des Virus bisher klassisch in zwei Hauptphasen der primären und sekundären Dissemination eingeteilt. Demzufolge erreicht das Virus nach dem initialen Eintritt über den oberen Respirationstrakt zunächst die Lunge und von dort über rekrutierte und infizierte Immunzellen mit dem Blut die Milz und Leber. Nach hochproduktiver Replikation

werden in einer sekundären Dissemination weitere Organe infiziert, von welchen die Verbreitung des Virus an den nächsten Wirt stattfindet, wie den Speicheldrüsen, aber auch Milchdrüsen und Nieren (Jackson und Sparer, 2018). Aktuelle Daten aus dem Mausmodell weisen aber auf eine mögliche direkte Route zur Speicheldrüse durch die Zirkulation von Immunzellen, vor allem von Dendritischen Zellen, hin (Farrell *et al.*, 2019; Farrell und Stevenson, 2019; Farrell *et al.*, 2017). Jede Infektion mit CMV resultiert wie bei allen Herpesviren in einer lebenslangen Latenz des Virus, welche sich bei CMV besonders in Monozyten und CD34⁺-Blutvorläuferzellen etabliert (Goodrum *et al.*, 2002). Etablierung und Erhalt der Latenz unterliegen einer komplexen Regulation, sodass während der Latenz nur eine stark eingeschränkte Expression von wenigen viralen Genen stattfindet (Elder und Sinclair, 2019). Eine Reaktivierung der latenten Infektion zu einer produktiven Replikation und Dissemination des Virus kann jederzeit unter bestimmten Umständen erfolgen und wird mit der Differenzierung der latent infizierten Zellen in Verbindung gebracht (Poole *et al.*, 2015; Reeves und Sinclair, 2013).

Das Risiko für eine Reaktivierung ist für Individuen mit einem geschwächten oder unausgereiften Immunsystem besonders hoch (Crough und Khanna, 2009). Schwere Krankheitsverläufe durch Primärinfektion oder Reaktivierung können zu diversen Krankheitsbildern wie Myokarditis, Pneumonie, Hepatitis, Colitis und Retinitis sowie bei Infektionen des zentralen Nervensystems zu Enzephalitis und Meningitis führen (Gugliesi *et al.*, 2020). Hauptrisikogruppen sind Transplantationspatienten, besonders in der Kombination eines seronegativen Empfängers eines seropositiven Spenderorgans, aber auch durch Krankheit immunsupprimierte AIDS-Patienten (Gianella und Letendre, 2016; Azevedo *et al.*, 2015; Humar und Snyderman, 2009). Darüber hinaus werden onkomodulatorische Eigenschaften von HCMV kontrovers diskutiert (Nauclér *et al.*, 2019; Herbein, 2018).

Primärinfektionen oder Reinfektionen sowie Reaktivierungen während der Schwangerschaft können über die Plazenta auf den Fötus oder perinatal während der Geburt sowie postnatal (z. B. durch Stillen) auf das Neugeborene übertragen werden. Besonders die Primärinfektion während der Schwangerschaft kann zu Fehlgeburten oder schweren Entwicklungsschäden des Fötus führen, welche häufig das zentrale Nervensystem betreffen und zu Spätfolgen wie Sehstörungen, Schwerhörigkeit, Taubheit und geistiger Retardierung führen (Marsico und Kimberlin, 2017; Iwasenko *et al.*, 2011; Rawlinson *et al.*, 2008).

Ein Impfstoff gegen HCMV ist trotz jahrzehntelanger Bemühungen bisher nicht verfügbar (Plotkin und Boppana, 2019). Für die Behandlung von CMV-Infektionen kann die virale DNA-Polymerase mittels Nukleosid-Analoga (Ganciclovir), Nukleotid-Analoga (Cidofovir) oder Pyrophosphat-Analoga (Foscarnet) gehemmt werden. Allerdings können Nebenwirkungen wie Anämie, Leukozytopenie, Neutropenie oder Thrombozytopenie (Danziger-Isakov und Baillie,

2009) und nach längerer Verwendung auch Resistenzen gegen diese Wirkstoffe auftreten (Göhring *et al.*, 2015; Lurain und Chou, 2010; Erice, 1999). Cidofovir und Foscarnet gelten außerdem als nephrotoxisch (Izzedine *et al.*, 2005). Einen neuen Wirkmechanismus nutzt das kürzlich zugelassene CMV-Medikament Letemovir, welches als Terminase-Inhibitor die Prozessierung der viralen DNA und dessen Verpackung in die Virionen verhindert (El Helou und Razonable, 2019; Goldner *et al.*, 2011). Allerdings wurden auch gegen Letemovir bereits Resistenzen dokumentiert (Frietsch *et al.*, 2019; Cherrier *et al.*, 2018).

1.1.3 CMV Genom

Das Genom von CMV liegt im Virion als lineares, doppelsträngiges DNA-Genom mit einer Länge von über 230 kbp vor. Es ist somit das größte Genom aller Herpesviren. Nach den aktuellsten Voraussagen kodiert CMV für mehr als 700 Translationsprodukte, welche durch überlappende *open reading frames* (ORFs), Transkription von beiden DNA-Strängen, *splicing* und alternative Startcodons zustande kommen (Erhard *et al.*, 2018; Stern-Ginossar *et al.*, 2012). Auch wenn die Expression einiger der vorhergesagten Translationsprodukte bereits bestätigt wurde, sind die tatsächlichen Expressionslevel und die Funktionen vieler Translationsprodukte nicht bekannt (Stern-Ginossar *et al.*, 2012).

Der Aufbau des HCMV-Genoms lässt sich in die zwei Hauptsequenzen mit der Bezeichnung *unique long* (UL) und *unique short* (US) unterteilen, welche in verschiedenen Richtungen vorliegen können und daher die Grundlage für vier verschiedene Genom-Isoformen bilden (Tamashiro *et al.*, 1984; Oram *et al.*, 1982). Diese einmaligen Sequenzen werden an ihren Enden von kurzen repetitiven Sequenzen flankiert. Diese *repeats* werden als TRS/IRS oder TRL/IRL bezeichnet, wobei sich die Abkürzung aus ihrer Position (*terminal repeat*, TR oder *internal repeat*, IR) und der flankierten Sequenz (UL oder US) zusammensetzt (Sijmons *et al.*, 2014; Oram *et al.*, 1982). Die Nomenklatur der einzelnen Gene in HCMV folgt einer Nummerierung und bedient sich zusätzlich der Position in den verschiedenen Genomregionen. So wird beispielsweise das in der *unique long* (UL) Region liegende Gen 34 als *UL34* beschrieben. Da das Genom des als Modell weit verbreiteten murinen CMV (MCMV) kolinear zum Genom von HCMV ist, werden Gene in MCMV entsprechen der HCMV-Gene in der UL Region nummeriert. Zu HCMV homologe Gene werden mit einem großen *M* beschrieben (*M34*), Gene ohne Homologie werden klein geschrieben (*m*) (Rawlinson *et al.*, 1996).

Eine große Erleichterung für die CMV-Forschung waren die Klonierungen der Genome von MCMV und HCMV als *bacterial artificial chromosomes* (BAC). Dazu wurde jeweils eine BAC-

Kassette in eine Genomregion mit nicht essenziellen Genen integriert, sodass jeweils das gesamte Genom als BAC vorliegt (Borst *et al.*, 1999; Messerle *et al.*, 1997). Dies ermöglicht es, durch molekularbiologische Standardmethoden in *E. coli* an den BACs mittlerweile spurlos zielgerichtete Mutationen wie Punktmutationen, Insertionen oder Deletionen ganzer Gene vorzunehmen (Tischer und Kaufer, 2012). Da für die Expression der ersten Gene des CMV-Genoms keine viralen Proteine notwendig sind (s. Kap. 1.1.4), ist eine Transfektion des CMV-BACs in permissive Zellen infektiös und löst die Replikation des viralen Genoms aus. Dies ermöglicht eine zügige Rekonstitution von Virusmutanten.

1.1.4 CMV Genexpression

Die Infektion einer Zelle mit CMV beginnt durch eine Bindung des Virions an die Zellmembran, welche zelltypabhängig von den viralen Proteinkomplexen gH/gL/pUL128/130/131A oder gH/gL/gO vermittelt wird (Nogalski *et al.*, 2013; Ryckman *et al.*, 2008; Hahn *et al.*, 2004). Die Infektionsfähigkeit von Epithel- und Endothelzellen durch den Pentamerkomplex gH/gL/pUL128/130/131A geht allerdings in der Zellkultur durch Passagierung in Fibroblasten verloren. Für die Infektion von Fibroblasten hat sich der trimere Komplex gH/gL/gO als ausreichend erwiesen (Wang und Shenk, 2005a; Wang und Shenk, 2005b). Welche zellulären Membranproteine als Rezeptoren für HCMV dienen, ist dagegen noch Gegenstand anhaltender Forschung und kontroverser Diskussionen. Unter den in der Vergangenheit besonders diskutierten möglichen Rezeptoren sind beispielsweise der *epidermal growth factor receptor* (EGFR), *platelet-derived growth factor receptor- α* (PDGFR- α) und verschiedene Integrine (Vanarsdall und Johnson, 2012). Neuere Studien bestätigten unabhängig voneinander PDGFR- α und schlugen Neuropilin 2 (Martinez-Martin *et al.*, 2018) und OR14I1 (Xiaofei *et al.*, 2019) vor.

Nach einer Fusion der Membranen von Zelle und Virion werden Kapsid und Tegumentproteine in das Zytoplasma entlassen (*entry*) und Mikrotubuli-abhängig zum Zellkern transportiert (Bosse *et al.*, 2012; Ogawa-Goto *et al.*, 2003). Dort wird die lineare virale DNA über die Kernporen in den Zellkern transportiert und zirkularisiert. Die Expression der viralen Gene findet anschließend in drei aufeinander folgenden Phasen statt (Wathen und Stinski, 1982; Wathen *et al.*, 1981). Die Expression der ersten Gene (*immediate early*, *IE*) wird durch zelluläre Transkriptionsfaktoren induziert und ist nicht von der Expression viraler Proteine abhängig. Die zweite Phase (*early*, *E*) kann dagegen erst nach der Translation der IE-Proteine beginnen, da diese für die Transkription der *early*-Gene erforderlich sind (Marchini *et al.*, 2001; Mocarski *et al.*, 1996). Zu den *early*-Genen zählen Gene, welche für die virale DNA-Replikation essenziell sind, wie beispielsweise die virale DNA-Polymerase. Erst mit Erreichen dieser Phase kann daher die virale Genom-

Replikation beginnen. Die Replikation der zirkularisiert vorliegenden DNA führt zunächst zu langen Concatemeren an neuer DNA, die später durch den Terminase-Komplex in die einzelnen Genomeinheiten gespalten und in die Kapside verpackt werden (Theiß *et al.*, 2019; Scheffczik *et al.*, 2002; McVoy und Adler, 1994).

Durch die virale DNA-Replikation wird wiederum die späte Genexpression der dritten Phase eingeleitet (*late*, L). Deren Genprodukte werden mittlerweile anhand ihrer Abhängigkeit von der viralen DNA-Replikation weiter unterteilt. Im Gegensatz zu echten *late*-Genen (*true late*), die erst nach der Genom-Replikation exprimiert werden können, werden andere *late* Gene schon früher exprimiert, aber nach dem Beginn der viralen DNA-Replikation deutlich hochreguliert. Gene dieser Klasse werden als *early/late* (E/L) eingruppiert. Die Expression der *late*-Gene wird daher im Gegensatz zu den *early/late* Genen aufgrund ihrer Abhängigkeit von der viralen DNA-Replikation durch Inhibitoren der viralen DNA-Polymerase (wie *Phosphonoacetic acid*) vollständig verhindert (Huang, 1975). Bei den *Late*-exprimierten Genen handelt es sich vor allem um Strukturproteine, die für den Zusammenbau (*assembly*) der Virionen und deren Entlassung aus der Zelle (*egress*) notwendig sind. Zusätzlich zu dieser klassischen Einteilung nach funktionellen Klassen der viralen Genexpression wurden nach einer zeitlichen Analyse mittels Massenspektrometrie (MS) von Weekes *et al.* weitere, zeitlich zu unterscheidende Expressionsklassen beobachtet (Weekes *et al.*, 2014; Stern-Ginossar *et al.*, 2012).

1.1.5 MCMV als Modellvirus

Da CMV einer starken Speziespezifität unterliegen, sind Infektionen mit HCMV in Tiermodellen in der Regel nicht durchführbar. Infektionen von Primaten mit ihrem speziesspezifischen CMV, im Besonderen Rhesus Makaken mit Rhesus CMV, werden zwar in Studien zu CMV-Infektionen und in der Vakzinvektor-Forschung eingesetzt (Früh und Picker, 2017; Itell *et al.*, 2017), sind aber aus ethischen Gründen und aufgrund der teuren und anspruchsvollen Haltung der Tiere nicht die erste Wahl für die Grundlagenforschung zu CMV-Infektionen, -Pathogenese und -Immunologie. Die Infektion von verschiedenen humanisierten Mäusen mit HCMV ist möglich, diese Modelle stellen aber eher ein System für Fragestellungen zur Infektion, Latenz und Reaktivierung in gezielten Organen oder Zellen des Immunsystems dar, als ein umfassendes *in vivo* Modell im natürlichen Infektionskontext. Da je nach generiertem Mausstamm nur einzelne Organgewebe oder Immunzellen humanisiert sind, wie beispielsweise die aus CD34⁺-Blutvorläuferzellen entstammenden Zellen, tragen die Infektionen der entsprechenden Zellen mit HCMV nur eingeschränkt zum Verständnis der allgemeinen Wechselwirkungen zwischen Virus und der Immunantwort des Wirtes *in vivo* bei (Crawford *et al.*, 2015). Stattdessen haben sich für die

breite Grundlagenforschung Nagetiermodelle mit den entsprechenden speziesspezifischen CMV durchgesetzt (MCMV, RCMV). Insbesondere das MCMV-Mausmodell ist weltweit etabliert, und profitiert von der außerordentlich hohen Verfügbarkeit verschiedenster genetisch modifizierter Mausstämme, die mit ihrem natürlichen CMV infiziert werden können. Das MCMV-Mausmodell bietet sich auch aufgrund der im Vergleich zu Primaten kurzen Reproduktionszeiten und der einfacheren und günstigeren Haltung der Tiere für die CMV-Infektionsforschung an, aus welcher die gewonnenen Erkenntnisse dann die Grundlagen für gezielte Translationsstudien in Primaten bilden können. Die Pathogenese sowie die Immunantworten gegen MCMV und HCMV sind sich ähnlich, und durch die kolinearen Genome gibt es einige Positions- und Sequenzhomologe zwischen HCMV und MCMV (Rawlinson *et al.*, 1996). Bei diesen Homologen handelt es sich häufig um konservierte Strukturproteine oder um für die Replikation benötigte Proteine mit ähnlichen oder gleichen Funktionen. Beispiele für solche Sequenzhomologe sind die für diese Arbeit relevanten Gene *UL33/M33* und *UL34/M34*, die sowohl im HCMV- als auch im MCMV-Genom in direkter Nachbarschaft zueinander liegen und die in Kapitel 1.4 und 1.5 ausführlicher beschrieben werden. Für einige CMV-Proteine liegen auch ohne eine Sequenzhomologie ähnliche oder gleiche Funktionen vor, welche sich als Analoge unabhängig voneinander entwickelt haben. Ein kürzlich publiziertes Beispiel dafür sind die Proteine pM27 (MCMV) und pUL145 (exprimiert in zwei Isoformen) (s. Kap. 1.3.2). Obwohl die Proteine in ihren Sequenzen nicht homolog sind, induzieren beide eine proteasomale Degradation von STAT2 (Le-Trilling *et al.*, 2020; Trilling *et al.*, 2011; Zimmermann *et al.*, 2005). pUL27, das HCMV-Positionshomolog zu pM27, ist dagegen nicht für die Degradation von STAT2 notwendig (Le *et al.*, 2008a).

1.2 Das Immunsystem

Das Immunsystem ist ein komplexes System aus verschiedenen zirkulierenden und gewebean-sässigen Zellen und löslichen Faktoren, welches dem Schutz des Organismus vor von extern eingedrungenen Pathogenen und vor körpereigenen, pathologisch proliferierenden Tumorzellen dient. Dabei ist eine empfindliche Balance zu gewährleisten zwischen der Erkennung und Inaktivierung von fremden Pathogenen und körpereigenen, potenziell schädlichen entarteten Zellen, und harmlosen, körpereigenen Zellen und Strukturen. Fehlfunktionen von Teilen des Immunsystems durch ein Ungleichgewicht oder fehlerhafte Selbst-/Fremderkennung können zu Allergien, schweren Immunschwächen oder Autoimmunerkrankungen führen. Bei Wirbeltieren wird das Immunsystem in zwei Arme eingeteilt, welche als angeborenes und adaptives Immunsystem bezeichnet werden.

1.2.1 Das adaptive Immunsystem

Da sich diese Arbeit hauptsächlich mit Komponenten des angeborenen Immunsystems auseinandersetzt, soll das sehr komplexe adaptive Immunsystem hier nur kurz und oberflächlich thematisiert werden.

Das adaptive Immunsystem wird durch spezifische Rezeptoren aktiviert. Die Erkennung eines Pathogens erfolgt anhand von speziellen Strukturen eines Erregers (Antigene), die nur von bestimmten Rezeptoren von B- und T-Zellen (Lymphozyten) erkannt werden. Während B-Zellrezeptoren (BCR) Antigene ohne weitere Korezeptoren binden können, muss ein Antigen für eine Erkennung mittels T-Zell-Rezeptor (TCR) in einem Komplex mit sogenannten *major histocompatibility complex* (MHC)-I-Molekülen auf der Oberfläche von infizierten Zellen und Tumorzellen, oder mittels MHC-II-Komplexen von einer antigenpräsentierenden Zelle (dendritische Zellen, Makrophagen, B-Zellen) präsentiert werden. Erkennen T-Zell-Rezeptoren ihr Antigen und erhalten ein weiteres kostimulatorisches Signal von der präsentierenden Zelle, wird die T-Zelle aktiviert und zur Proliferation angeregt. Diese klonal expandierten Zellen reagieren dann in der Effektorphase je nach T-Zell-Subtyp mit direkten zellulären, lokalen Antworten gegen infizierte Zellen (CD8⁺-zytotoxische T-Zellen, CTL) und lösen deren Zelltod aus, oder übermitteln mittels Zytokinen aktivierende, differenzierende oder regulative Signale an weitere Immunzellen (CD4⁺-T-Helferzellen, CD4⁺-regulatorische T-Zellen) (Arce-Sillas *et al.*, 2016; DuPage und Bluestone, 2016; Chaplin, 2010).

Eine naive B-Zelle kann bei einer gleichzeitigen Aktivierung mehrerer Rezeptoren durch polymere Antigene direkt aktiviert werden und Antikörper mit niedriger Affinität produzieren. Die meisten B-Zellen werden aber erst nach einer zweiten Aktivierung durch T-Helferzellen mit dem passenden T-Zell-Rezeptor aktiviert. Dazu internalisiert sie die erkannten Antigene und präsentiert Fragmente davon in MHC-II-Komplexen auf ihrer Oberfläche. Erst wenn eine T-Zelle mit einem für dieses Antigen spezifischen T-Zell-Rezeptor an die MHC-II-Antigen-Komplexe auf der B-Zelle bindet, führt dies zur Aktivierung. Aktivierte B-Zellen produzieren anschließend spezifische Antikörper und bilden durch eine Subgruppe langlebiger Zellen ein immunologisches Gedächtnis zum Schutz vor Reinfektionen aus (Seifert und Küppers, 2016). Die Antikörper haben die gleichen Bindungseigenschaften wie der B-Zell-Rezeptor der entsprechenden B-Zelle und vermitteln als lösliche Form einen wichtigen humoralen Schutz vor Infektionen. Sie binden spezifisch an eingedrungene Erreger und können diese alleine durch die Bindung an wichtige Strukturen inaktivieren (Neutralisierende Antikörper) oder die Erreger für die Erkennung durch andere Immunzellen oder das Komplementsystem dekorieren (Opsonisierung) oder NK-Zellen zur antikörperabhängigen zellulären Zytotoxizität aktivieren (Chaplin, 2010).

Das adaptive Immunsystem unterliegt außerdem einer ständigen Reifung und Spezifizierung der Antigenerkennung, da während der ausgelösten Proliferation der B-Zellen eine Mutation der Rezeptor-kodierenden Gene zur Veränderung der Affinität der B-Zell-Rezeptoren und Antikörper erfolgt (somatische Hypermutation), und nur die B-Zellen mit einer guten Rezeptoraffinität positiv selektiert werden (Seifert und Küppers, 2016). Aufgrund dieser Prozesse und der Dauer der Abfolge von Antigenerkennung, Aktivierung, klonaler Expansion und Migration der Zellen zum Infektionsort ist das adaptive Immunsystem in der Erkennung, Kontrolle und Eliminierung einer Infektion zwar sehr effektiv, für eine Eindämmung in den ersten Tagen einer beginnenden Infektion jedoch zu langsam. Da außerdem Zytokine und antigenpräsentierende Zellen des angeborenen Immunsystems in der Aktivierung des adaptiven Immunsystems eine Rolle spielen, sind beide Arme des Immunsystems für die Kontrolle einer Infektion notwendig.

1.2.2 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem reagiert als erste Abwehrreaktion schnell auf eine Infektion, und ist daher für eine Eindämmung der Infektion in den ersten Tagen essenziell. Die schnelle Reaktionsfähigkeit des angeborenen Immunsystems basiert auf einer unspezifischen Erkennung von Erregern anhand von Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptor*, PRR). Diese Rezeptoren detektieren in Pathogenen konservierte molekulare Muster (*pathogen-associated molecular pattern*, PAMP), welche in den gesunden Körperzellen nicht vorkommen und daher zwar unspezifisch, aber dennoch als körperfremd erkannt werden. Zu den bekanntesten Vertretern der Rezeptoren gehören membranständige extra- und intrazelluläre Toll-like-Rezeptoren (TLR) (El-Zayat *et al.*, 2019), die intrazellulären NOD-like Rezeptoren (NLR) (Kim *et al.*, 2016) und RIG-I-like Rezeptoren (RLRs) (Dixit und Kagan, 2013) sowie zytosolische DNA-Sensoren wie *cyclic GMP-AMP synthase* (cGAS) und *IFN-inducible protein 16* (IFI16) (Cheng *et al.*, 2020). Über verschiedene Signalwege vermitteln die aktivierten Rezeptoren eine zügige Sezernierung löslicher Faktoren (Zytokine, Chemokine und das Komplementsystem) sowie die Aktivierung und Migration verschiedener Immunzellen an den Detektionsort. Einige Zellen des angeborenen Immunsystems, wie Monozyten, Makrophagen, Neutrophile Granulozyten und Dendritische Zellen, inaktivieren Pathogene durch deren Aufnahme und intrazellulärer Degradation (Phagozytose) (Gasteiger *et al.*, 2017; Chaplin, 2010). Eine wichtige Rolle für die Abwehr von Virusinfektion spielen NK-Zellen, welche als zytotoxische Zellen des angeborenen Immunsystems die Apoptose von infizierten oder entarteten Körperzellen auslösen können. Dazu verfügen NK-Zellen über Rezeptoren, welche von Zellen mit Stress-induzierten Liganden auf ihrer Oberfläche aktiviert werden. Durch die Oberflächenexpression von MHC-I-Molekülen auf gesunden Zellen werden zudem inhibitorische Rezeptoren der NK-Zellen aktiviert und mit aktivierenden Signalen in

einer Art Gleichgewicht gehalten, sodass eine Aktivierung der NK-Zellen durch gesunde Zellen verhindert wird. Werden dagegen auf Tumorzellen oder durch Virusinfektionen nicht genug MHC-I-Komplexe auf der Oberfläche präsentiert, wird aufgrund der überwiegenden Stimulation aktivierender NK-Zell-Rezeptoren die Sekretion zytotoxischer, lytischer Granula sowie eine rezeptorinduzierte Apoptose der Zielzelle eingeleitet (Abel *et al.*, 2018; Vivier *et al.*, 2012).

Viele der von den Zellen des angeborenen Immunsystems freigesetzten Zytokine rekrutieren und stimulieren auch Zellen des adaptiven Immunsystems, und die Professionellen Antigenpräsentierenden Zellen des angeborenen Immunsystems aktivieren die T-Zellen. Die erst relativ kurz bekannten *innate lymphoid cells* (ILC) stammen zwar wie auch die NK-Zellen von lymphoiden Vorläufern ab, werden funktionell aber dem angeborenen Immunsystem zugeordnet (Gasteiger *et al.*, 2017). In den letzten Jahren wurden außerdem zunehmend unkonventionelle T-Zellen charakterisiert (NKT-Zellen, iNKT-Zellen, γ T-Zellen). Diese stammen zwar von der T-Zell-Linie ab und verfügen über verschiedene, jedoch wenig variable T-Zell-Rezeptoren, werden aber aufgrund ihrer schnellen Reaktionen auf Infektionen ohne eine vorherige Aktivierung und wegen einiger NK-Zell-ähnlicher Funktionen teilweise als *innate-like* T-Zellen bezeichnet (Pellicci *et al.*, 2020; Wolf *et al.*, 2018). All dies zeigt, dass sich die zwei Teile des Immunsystems nicht vollständig isoliert voneinander betrachten lassen.

1.2.3 Interferone

Interferone (IFN) sind Zytokine, die von infizierten Zellen nach einer Erkennung von Pathogenen durch *pattern recognition receptors* (PRR) induziert werden. Sie fungieren als Botenstoffe des angeborenen Immunsystems und lösen durch die Induktion von *interferon-stimulated genes* (ISGs) indirekt immunstimulatorische, antiproliferative und antivirale Effekte in Nachbarzellen (parakrin) oder der sezernierende Zelle selbst (autokrin) aus (Biron, 1998). Interferone werden anhand ihrer strukturellen Homologie und Rezeptoren in drei Typen eingeteilt.

Typ I-Interferone werden von vielen Zellen sekretiert und umfassen die IFN α -Subtypen (Gibbert *et al.*, 2013; Gerlach *et al.*, 2009) und IFN β , welche eine direkte antivirale, immunstimulatorische und antiproliferative Wirkung haben, sowie die weniger bekannten Interferone IFN ϵ , IFN δ , IFN κ , IFN τ , IFN ν , IFN ζ und IFN ω (Pestka, 2007; Bekisz *et al.*, 2004; Hardy *et al.*, 2004). Das einzige Typ II-Interferon IFN γ wurde zunächst als hauptsächlich immunmodulatorisch beschrieben (Boehm *et al.*, 1997) und wird vor allem von Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und T-Zellen sekretiert (Young und Hardy, 1990; Kasahara *et al.*, 1983; Djeu, 1982). Neuere Daten zeigen jedoch, dass IFN γ auch direkt und sehr potent antiviral gegen HCMV und MCMV

wirkt (Trilling *et al.*, 2011; Le *et al.*, 2008a; Trilling, 2008; Zimmermann *et al.*, 2005). Zu den Typ III-Interferonen gehören IFN λ 1-4 (Kotenko *et al.*, 2003; Sheppard *et al.*, 2003). Sie werden hauptsächlich durch Virusinfektionen induziert (Egli *et al.*, 2014) und wirken antiviral (Le-Trilling *et al.*, 2018; Lopusná *et al.*, 2014; Hamming *et al.*, 2013; Pott *et al.*, 2011; Ank *et al.*, 2006).

1.2.4 Interferon-induzierte JAK-STAT-Signaltransduktion

Interferone vermitteln ihre Wirkung durch die Induktion von Effektorgenen, die allgemein als Interferon-stimulierte Gene (ISG) zusammengefasst werden (de Veer *et al.*, 2001; Der *et al.*, 1998). Die große und heterogene Gruppe an Genprodukten kann je nach Expressionsprofil verschiedene Effekte, wie einen antiviralen Status in der Zelle, auslösen. Für die Induktion der ISGs wird durch Bindung von Interferonen an ihre Rezeptoren eine Aktivierung der Jak-STAT-Signaltransduktion ausgelöst (Darnell *et al.*, 1994).

Die Bindung des Interferons an seinen Rezeptor induziert eine kreuzweise Phosphorylierung der intrazellulär mit dem Rezeptor assoziierten Januskinasen (JAK). Die Januskinasen phosphorylieren daraufhin Tyrosinreste des Rezeptors, die so aktiviert als Bindestellen für *signal transducer and activator of transcription* (STAT) zur Verfügung stehen (s. Abb. 1.1). An den Rezeptor rekrutiert, werden die STAT durch Jak an spezifischen Tyrosinresten phosphoryliert und dadurch aktiviert. Durch die Phosphorylierung können die STAT mit der SH2-Domäne eines zweiten STAT interagieren und so Dimere bilden. Lange wurde davon ausgegangen, dass die inaktiven STAT stets als Monomere im Zytoplasma vorliegen und erst durch die Phosphorylierung zur Dimerbildung befähigt werden. Mittlerweile gibt es jedoch Hinweise, dass manche STAT auch ohne die aktivierende Phosphorylierung als Homodimere im Zytoplasma vorliegen. Die Phosphorylierung des spezifischen Tyrosinrests induziert stattdessen eine Veränderung der Orientierung in der Dimerbildung, von der parallelen zur antiparallelen Anordnung (Wenta *et al.*, 2008; Mertens *et al.*, 2006; Zhong *et al.*, 2005; Braunstein *et al.*, 2003). Die aktivierten STAT-Dimere interagieren je nach Signalweg im Zytoplasma mit weiteren Faktoren oder translozieren als Dimere in den Nukleus, binden an die für die verschiedenen STAT-Komplexe spezifischen Promotorsequenzen der DNA und induzieren die Transkription der *downstream* gelegenen Gene (Decker *et al.*, 1997; Darnell *et al.*, 1994). Die Transkription wird zusätzlich von weiteren Proteinen reguliert, welche an die STAT-Komplexe binden können, wie p300/CBP oder *N-myc and STAT interactor* (Nmi) (Shuai, 2000).

Durch einen modularen Aufbau der Signaltransduktion aus unterschiedlichen Varianten der beteiligten Rezeptoruntereinheiten, Januskinasen und STATs wird auf mehreren Ebenen eine Spezifikation des zu übermittelnden Signals erwirkt. Es gibt in Säugetieren vier Januskinasen (Jak 1-3 und Tyk2) (Yamaoka *et al.*, 2004) und sieben STATs (STAT1-4, STAT5A, STAT5B, STAT6) (Darnell, 1997). An der Signaltransduktion der verschiedenen IFN-Typen lässt sich erkennen, wie die Zusammenstellung dieser einzelnen Jaks und STATs verschiedene Genexpressionsprofile induzieren kann (s. Abb. 1.1).

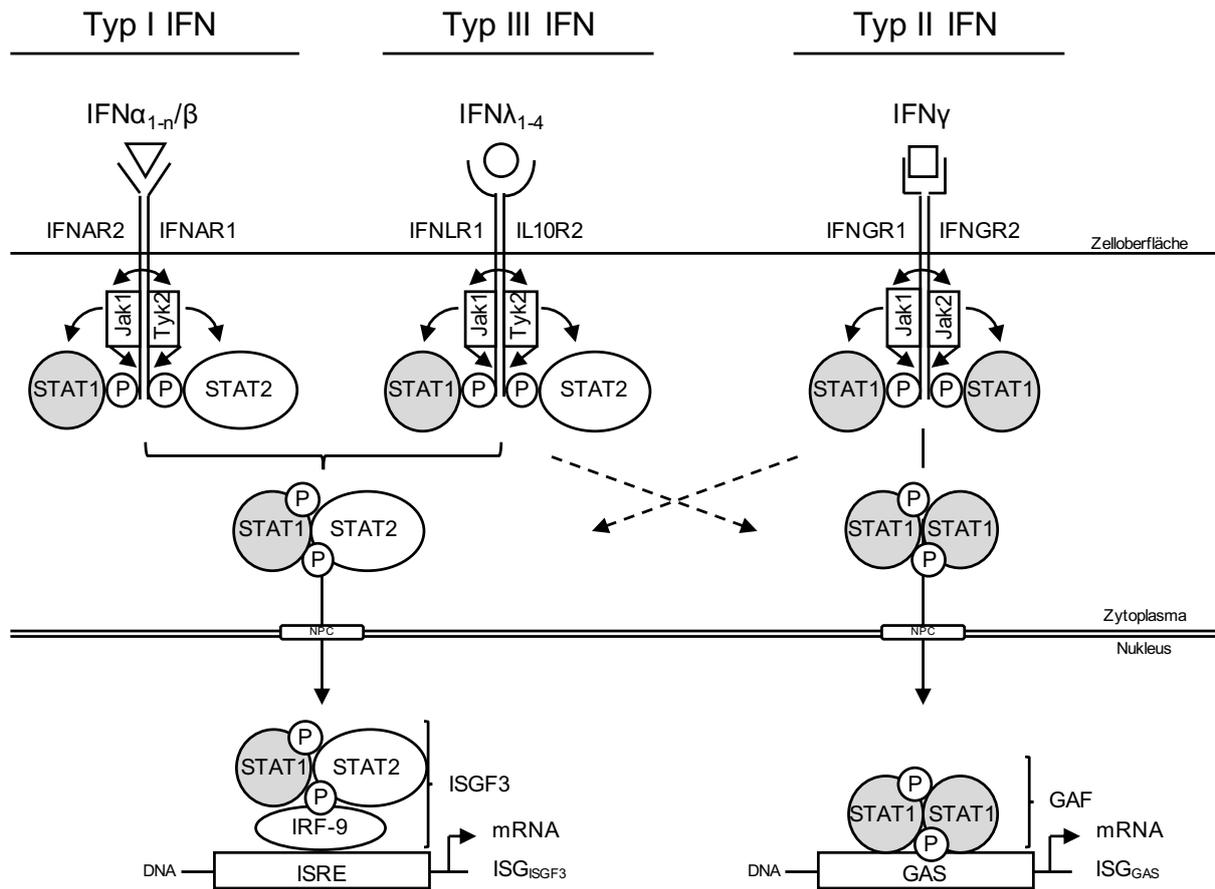


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der IFN-Signaltransduktion. IFN Typ I und III: IFN α/β bindet an Rezeptorkomplex IFNGR1:IFNGR und induziert die Phosphorylierung der assoziierten Kinasen Jak1 und Tyk2. IFN λ bindet an den Rezeptorkomplex IFNLR1:IL10R und induziert dort die Phosphorylierung von Jak1 und Tyk2. Jak1 und Tyk2 phosphorylieren STAT1 und STAT2, welche dimerisieren und mit IRF-9 den Komplex *interferon-stimulated gene factor 3* (ISGF3) bilden. ISGF3 transloziert in den Nucleus und bindet an die *IFN-stimulated response elements* (ISRE) der DNA. IFN Typ II: IFN γ bindet an den Rezeptorkomplex IFNAR1:IFNAR2 und induziert die Phosphorylierung von Jak1 und Jak2, welche daraufhin STAT1 phosphorylieren. STAT1 dimerisiert zum *gamma activated factor* (GAF) und transloziert in den Nucleus und bindet an die *gamma activated sequences* (GAS) der DNA. NPC: *nuclear pore complex*. ISG: *interferon-stimulated genes*. Abbildung angelehnt an Le-Trilling *et al.*, 2018.

Der Rezeptor der Typ-I-Interferone ist ein Heterodimer aus den zwei Untereinheiten IFN α/β -Rezeptor (IFNAR) 1 und 2 (Branca und Baglioni, 1981; Aguet, 1980), an denen intrazellulär die Kinasen Tyrosinkinase 2 (Tyk2 an IFNAR1) und Janus-Kinase 1 (Jak1 an IFNAR2) assoziiert sind (Müller *et al.*, 1993; Velazquez *et al.*, 1992). An die phosphorylierten SH2-Bindestellen des Rezeptors binden STAT1 und STAT2, welche an den Tyrosinresten Y701 (STAT1) oder Y690 (STAT2) phosphoryliert werden (pSTAT). pSTAT1 und pSTAT2 bilden zusammen mit dem *interferon regulatory factor 9* (IRF9) trimere STAT1:STAT2:IRF9-Komplexe (ISGF3), translozieren in den Zellkern (Veals *et al.*, 1992; Levy *et al.*, 1989) und binden dort an *interferon-stimulated response elements* (ISRE) (Levy *et al.*, 1988), wodurch die Transkription von ISG induziert wird (Ivashkiv und Donlin, 2014) (s. Abb. 1.1).

Die Signaltransduktion der Typ-III-IFN ähnelt der Typ-I-Signaltransduktion und aktiviert STAT1 und STAT2 über die Kinasen Jak1 und Tyk2 (s. Abb. 1.1). Die Bindung der Typ-III-IFN und die Aktivierung von Jak1 und Tyk2 findet aber an einem abweichenden Rezeptor-Dimer statt, welches aus den Untereinheiten IFNLR1 (auch IL-28R α) und IL-10R2 zusammengesetzt ist und besonders von Epithelzellen exprimiert wird (Sommereyns *et al.*, 2008; Kotenko *et al.*, 2003).

Der IFN γ -Rezeptor (IFNGR) besteht dagegen aus den Untereinheiten IFNGR1 und IFNGR2 (Farrell *et al.*, 2017), an denen Jak1 (IFNGR1) und Jak2 (IFNGR2) assoziiert vorliegen und aktiviert werden (Sakatsume *et al.*, 1995; Müller *et al.*, 1993; Silvennoinen *et al.*, 1993; Watling *et al.*, 1993). Jak1 und Jak2 phosphorylieren die SH2-Bindestellen des Rezeptors für STAT1, welches nach dessen Phosphorylierung aktivierte STAT1:STAT1-Homodimere mit einer parallelen Konformation bildet, welche *gamma activated factor* genannt werden (GAF) (Shuai *et al.*, 1992; Decker *et al.*, 1991). Die aktivierten STAT1:STAT1-Homodimere aktivieren die ISG-Expression durch eine Bindung an die *gamma activated sequences* (GAS) (s. Abb. 1.1). Es konnte gezeigt werden, dass IFN γ zusätzlich zu dieser Aktivierung auch eine Repression verschiedener Gene erwirkt (*IFN-repressed genes*, IRepGs) (Megger *et al.*, 2017; Trilling *et al.*, 2013).

Zwischen den Signalwegen der verschiedenen IFN-Typen existieren jedoch Überschneidungen, da zusätzlich zum kanonischen STAT1:STAT2:IRF9-Komplex durch IFN α -Inkubation auch STAT1-Homodimere gebildet werden (Decker *et al.*, 1991), und auch STAT2/IRF9-Komplexe die Transkription mancher ISGs regulieren können (Blaszczyk *et al.*, 2015). Es scheint außerdem ein *cross-talk* zwischen der IFN γ -Signaltransduktion und der Typ-I-IFN-Signaltransduktion vorzuliegen, da auch STAT2 durch die IFN γ -Signaltransduktion unabhängig vom IFN-Typ-I-Rezeptor (IFNAR1/2) phosphoryliert wird und STAT1:STAT2:IRF9-Komplexe (ISGF3) entstehen (Le-Trilling *et al.*, 2018; Trilling *et al.*, 2013; Zimmermann *et al.*, 2005; Matsumoto *et al.*, 1999).

1.3 CMV-vermittelte Immunevasion

Gegen die meisten Infektionen bildet das angeborene, unspezifische Immunsystem eine effektive erste Verteidigungslinie, die zu einer schnellen Kontrolle der Infektion beiträgt. Daher haben nahezu alle Viren Mechanismen entwickelt, verschiedenen Funktionen des Immunsystems zu entgehen. Aufgrund ihres großen Genoms verfügen Cytomegaloviren über viel Kodierungskapazität, sodass sie über zahlreiche Gene mit spezialisierten Funktionen gegen verschiedene Immunfunktionen verfügen können. Viele der Immunevasionsmechanismen sind in den Cytomegaloviren mehrerer Spezies zu finden. Sie haben sich jeweils unabhängig voneinander während der eigenen Virus-Wirt-Koevolutionen entwickelt und ähneln sich oft in ihren Angriffspunkten und Mechanismen. CMV verfügen über einige Antagonisten gegen Komponenten aller Ebenen des IFN-Systems, was eine hohe Bedeutung des Interferonsystems im Kontext einer CMV-Infektion erkennen lässt. Die CMV-Genome kodieren für Antagonisten gegen die Induktion von Interferonen, gegen die IFN-Signalwege und gegen die Effektorproteine, welche durch die IFN-Signaltransduktion induziert werden. Im weiteren Verlauf soll der Fokus auf ausgewählten Beispielen oder für diese Arbeit relevanten IFN-Immunevasionsmechanismen von CMV liegen.

1.3.1 CMV-kodierte Antagonismen der IFN-Induktion

PRR detektieren den Eintritt eines Virions in die Zelle, beispielsweise als DNA- oder RNA-Sensoren, und aktivieren über verschiedene Signalwege die Transkriptionsfaktoren NF κ B, ATF/c-Jun und IRF3, welche dann zusammen die Expression von IFN β induzieren (Levy *et al.*, 2011). Das neu synthetisierte IFN β aktiviert dann autokrin und parakrin über die IFN-Signalwege die Transkription von weiteren IFN und ISGs. Die Erkennung einer Virusinfektion durch PRR und die schnelle Induktion von IFN β führen daher zu einer zügigen Eindämmung der Virusreplikation in der betroffenen Zelle sowie einem antiviralen Status in den parakrin gewarnten Nachbarzellen. Daher ist es für die Virusreplikation von großem Vorteil, bereits die Induktion von IFN β als Starter der sich selbst verstärkenden und regulierenden IFN-Reaktion zu inhibieren.

In HCMV-infizierten Zellen wird die IFN β -Induktion durch pUL122 (auch IE2 oder pp86) verhindert, welches die DNA-Bindung des Transkriptionsfaktors NF κ B an Promotorregionen mit κ B-Bindestellen und folglich die Transkription von IFN β inhibiert (Taylor und Bresnahan, 2006a; Taylor und Bresnahan, 2006b; Taylor und Bresnahan, 2005). Auch für das Tegumentprotein pUL83 (pp65) wurde beschrieben, dass es die IFN β -Transkription antagonisiert. Dabei wurde sowohl eine Inhibition der Translokation und DNA-Bindung von NF κ B (Browne und Shenk, 2003) als auch

eine Inhibition der IRF3 Phosphorylierung und Kern-Translokation beschrieben (Abate *et al.*, 2004). Da allerdings in beiden Studien die gleiche UL83-Deletionsmutante verwendet worden war, deren Infektion zu einer geringeren und verzögerten Expression von pUL122 im Vergleich zum wt-Virus führte, ist dies als anteilige Ursache für die Reduktion der IFN β -Transkription denkbar (Taylor und Bresnahan, 2006a). Neueren Daten zufolge inhibiert die pUL83-IFI16-Interaktion auch die Oligomerisierung des DNA-Sensors IFI16 und somit die IFI16-abhängige Induktion von ISGs wie den antiviralen Cytokinen CCL5/RANTES, CCL20, CXCL10 und IFN β über den STING/TBK1/IRF3-Signalweg, auch in Abwesenheit von viraler Genexpression und somit unabhängig von pUL122 (IE2) (Li *et al.*, 2013). Auch cGAS, ein weiterer beteiligter DNA-Sensor, welcher über die STING/TBK1/IRF3-Achse die IFN β -Expression aktiviert, wird durch pUL83-Interaktionen inhibiert (Biolatti *et al.*, 2018). Hinweise auf eine Interaktion von pUL83 mit noch einem weiteren DNA-Sensor, absent in melanoma 2 (AIM2), deuten auf eine Inhibition des AIM2-Inflammasoms und der Spaltung vom pro-IL- β zu dessen aktiver Form IL- β hin (Huang *et al.*, 2017). Da es sich bei IFI16 und cGAS selbst um Interferon-stimulierte Gene (ISG) handelt, ist pUL83 also schon alleine ein Beispiel für die CMV-vermittelte Inhibition auf mehreren Ebenen: Auf der Ebene der Induktion der Interferone selbst (IFN β), auf der Ebene der Funktion von IFN-induzierten Effektorgenen (IFI16- und cGAS als PRR/DNA-Sensoren) sowie auf der Ebene der Induktion von ISGs (IL- β , RANTES, u. v. m.). Darüber hinaus stellt IFI16 ein gutes Beispiel dafür dar, wie HCMV zelluläre Proteine nicht nur antagonisiert, sondern deren Funktion auch für seine eigenen Zwecke einsetzt, da die Interaktion von pUL83 mit IFI16 dieses an den viralen *major immediate early promoter* (MIEP) rekrutiert und zu dessen Aktivierung nutzt (Cristea *et al.*, 2010).

In MCMV wurde pM35 als Antagonist der IFN β -Induktion beschrieben, welcher mit dem Virion in die Zelle eingebracht wird und so bereits zu Beginn der Infektion durch eine Inhibition der NF κ B-vermittelten Transkription agiert (Chan *et al.*, 2017). Die Transkription von IFN β wird jedoch nicht nur durch die Promotorbindung von NF κ B induziert, sondern unterliegt der Kontrolle eines komplexen IFN β -Enhanceosoms, welches die zusätzlichen Transkriptionsfaktoren ATF2/c-Jun und IRF3 oder IRF7 sowie weitere regulative Proteine beinhaltet. Alle drei Transkriptionsfaktoren werden von MCMV nach einer kurzen Phase der IFN β -Induktion inhibiert (Le *et al.*, 2008b).

1.3.2 CMV-kodierte Antagonismen der IFN-Signaltransduktion

Zu Beginn aller IFN-induzierten Signalwege ist die rezeptorassoziierte Kinase Jak1 für die Signalweiterleitung durch die aktivierende Phosphorylierung der Rezeptoren und von STAT1 und STAT2 essenziell. Eine Inhibition von Jak1 stellt daher schon sehr früh in der Signaltransduktion

einen effektiven Angriffspunkt für virale Antagonisten dar und beeinträchtigt sowohl die IFN $\alpha/\beta/\lambda$ -Signalweiterleitung als auch das IFN γ -induzierte Signaling. Tatsächlich wird Jak1 in HCMV-infizierten Zellen durch einen bisher nicht bekannten Antagonisten proteasomal degradiert, wodurch die Phosphorylierung von STAT1 und STAT2 verhindert wird (Miller *et al.*, 1999; Miller *et al.*, 1998).

Die erste Identifizierung und mechanistische Aufklärung eines CMV-kodierten Antagonisten der IFN-induzierten Jak/STAT-Signalkaskade erfolgte allerdings in MCMV. Das *early/late* exprimierte pM27 von MCMV inhibiert die Bildung funktioneller ISGF3-Komplexe dadurch, dass es eine proteasomale Degradation der Komplexkomponente STAT2 einleitet (Trilling *et al.*, 2011; Zimmermann *et al.*, 2005). Dazu initiiert pM27 als virales Adapterprotein eine Komplexbildung von STAT2 und *DNA-damage DNA-binding protein 1* (DDB1), welches seinerseits die Rekrutierung von Cullin4A/B-Ubiquitin-Ligasekomplexen vermittelt. Eine durch den Ligasekomplex vermittelte Ubiquitinierung von STAT2 führt daraufhin zur dessen proteasomalen Degradation, wodurch die STAT2-abhängige Signaltransduktion von IFN α/β (Typ-I) und IFN λ (Typ-III) inhibiert wird (Le-Trilling *et al.*, 2018; Trilling *et al.*, 2011). *In vitro* ist M27 nicht essenziell, eine Inkubation der Zellen mit IFN γ zeigt jedoch eine hochgradig antivirale Wirkung gegen Δ M27-MCMV, welche die antivirale Wirkung von IFN α weit übertrifft (Le-Trilling *et al.*, 2018; Trilling *et al.*, 2011; Zimmermann *et al.*, 2005). In STAT2-defizienten Zellen oder in der Gegenwart des Jak-Inhibitors Ruxolitinib repliziert Δ M27-MCMV dagegen unbeeinträchtigt (Le-Trilling *et al.*, 2018; Zimmermann *et al.*, 2005). Dies zeigt, dass die Beeinträchtigung der Replikation von Δ M27-MCMV durch IFN γ von STAT2 abhängig ist und zeigt eine Bedeutung von STAT2 für die Typ-II-Signaltransduktion auf (Le-Trilling *et al.*, 2018; Trilling *et al.*, 2011; Zimmermann *et al.*, 2005). *In vivo* ist die Replikation von Δ M27-MCMV in wt-Mäusen stark attenuiert (Zimmermann *et al.*, 2005; Abenes *et al.*, 2001). In STAT2-KO-Mäusen ist Δ M27-MCMV replikationsfähig, weist aber verglichen mit wt-MCMV in manchen Organen noch eine etwas reduzierte Replikation auf, welche auf eine zusätzliche, STAT2-unabhängige Rolle von pM27 für die virale Replikation hinweist (Le-Trilling *et al.*, 2018).

Auch HCMV induziert eine proteasomale Degradation von STAT2, welche allerdings nicht vom pM27-Homolog pUL27 vermittelt wird (Le *et al.*, 2008a). Kürzlich konnte von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass es sich bei diesem HCMV-kodierten STAT2-Antagonisten um pUL145 handelt, welches sich in zwei Isoformen als Analog von pM27 ebenfalls der zellulären DDB1-Cullin-Ubiquitinligasenkomplexe bedient (Le-Trilling *et al.*, 2020). Diese Ergebnisse zeigen eindrucksvoll wie wichtig eine Inhibition der IFN-Signaltransduktion für die Replikation von CMV ist, da sich unabhängig voneinander in den CMV verschiedener Spezies die gleiche Immunevasion durch zwei verschiedene Gene entwickelt hat, die sich gegen das gleiche zelluläre Ziel der IFN-Signaltransduktion richten und sogar die gleichen zellulären

Mechanismen zweckentfremden. In diesem Zusammenhang wurde außerdem ein für die DDB1-Bindung essenzielles Motiv in der Sequenz von pUL145 entdeckt, welches anschließend auch in pM27 und im HCMV-Protein pRL1 nachvollziehbar wurde und so auch eine bisher unbekannte DDB1-Interaktion mit pRL1 zu Tage brachte (Le-Trilling *et al.*, 2020). Die Ergebnisse sind außerdem ein Beispiel dafür, dass sich Funktionen von MCMV-kodierten Proteinen zwar nicht unbedingt auf die sequenzhomologen Proteine in HCMV übertragen lassen, aber trotzdem eine Translation der zunächst *in vitro* und im MCMV-Modell gewonnenen Erkenntnisse auf Analoge von HCMV möglich sein kann.

Bereits vor diesen Erkenntnissen war bekannt, dass STAT2 auch auf der Ebene der Transkriptionsaktivierung von ISGs ein Ziel für einen HCMV-Antagonismus darstellt. So wird die Bindung des ISGF3-Komplexes an die ISG-Promotoren inhibiert, indem pUL123 (auch IE1 oder pp72) im Zellkern mit STAT2 interagiert und es so der Komplexbildung mit IRF9 und STAT1 entzieht (Paulus *et al.*, 2006).

Auch STAT1 ist für die Signaltransduktion aller IFN-Typen von großer Bedeutung und wird von HCMV inhibiert. Eine Induktion der Phosphatase *Src homology region 2-containing protein tyrosine phosphatase 2* (SHP-2) durch HCMV führt zur Dephosphorylierung von STAT1 und folglich zu dessen Inaktivierung (Baron und Davignon, 2008). Dem stehen allerdings Publikationen gegenüber, welche eine Induktion von ISGs durch pUL123 (IE1) vorschlagen, die als Umleitung von IL-6 induziertem STAT3-Signaling auf *downstream* gelegene, IFN γ -unabhängige STAT1-Induktion von ISGs beschrieben wird (Harwardt *et al.*, 2016; Knoblach *et al.*, 2011).

1.3.3 CMV-kodierte Antagonismen der ISG-Induktion

Für HCMV wurde beschrieben, dass pUL23 mit dem *N-myc and STAT interactor* (Nmi) interagiert. Nmi interagiert unter anderem mit STAT1 und aktiviert die IFN γ -induzierte Transkription. Durch die Interaktion mit pUL23 wird die nukleäre Translokation von Nmi und STAT1 verhindert und die Transkription IFN γ -induzierter Gene folglich inhibiert (Feng *et al.*, 2018).

Die Induktion von ISGs wird von HCMV auch durch zweckentfremdetes Roquin inhibiert, welches als zelluläres Protein die Genexpression durch eine Bindung an die 3' *untranslated region* (UTR) von mRNAs inhibiert. Es wurde gezeigt, dass HCMV-induziertes Roquin einige proinflammatorische Zytokine sowie den Transkriptionsfaktor IRF1 inhibiert, welcher in der Transkription von ISRE-regulierten ISGs eine wichtige Rolle spielt (Song *et al.*, 2019).

Auch für den vGPCR US28 (s. Kap. 1.4.1) wurde eine Regulation von ISGs beschrieben. In experimentell nachgestellter Latenz in primären, undifferenzierten Monozyten zeigten Elder *et al.*, dass unter anderem die Proteinabundanz von IFI16 und MHC-II US28-abhängig reduziert wurde (Elder *et al.*, 2019). Dabei wurde insgesamt weniger STAT1 und pSTAT1 sowie eine geringere Phosphorylierung von STAT1 in US28-transduzierten Zellen beobachtet. Die Autoren zeigten außerdem, dass IFI16 den MIEP während der Latenz pUL83-unabhängig durch NF κ B aktiviert, und schlugen vor, dass die Reduktion von IFI16 daher zur Etablierung der Latenz beiträgt (Elder *et al.*, 2019).

In MCMV-infizierten Zellen sind die STAT1-Mengen und STAT1-Phosphorylierung, Translokation in den Nukleus und die DNA-Bindung an spezifische GAS enthaltende Promotoren wie den IRF1-Promotor unbeeinträchtigt (Trilling *et al.*, 2014; Popkin *et al.*, 2003). Dennoch wird in MCMV-infizierten Makrophagen die IFN γ -induzierte Aktivität von IFN γ -responsiven Promotoren durch eine Inhibition der Rekrutierung von IRF1 und Polymerase II verhindert (Popkin *et al.*, 2003).

In MCMV-infizierten Fibroblasten findet unabhängig vom IFN-Antagonisten pM27 keine Reporterexpression von einem IFN γ -responsiven GAS-Reportergenkonstrukt statt, und auch die Expression klassischer ISGs wie IRF1 und *suppressor of cytokine signaling* (SOCS) 1 und 3 ist stark reduziert (Trilling *et al.*, 2014).

Im Gegensatz zu den unveränderten Leveln an STAT1 und pSTAT1 wurden in der MCMV-Infektion geringere Mengen von STAT3 bei gleichzeitig mehr phosphoryliertem pSTAT3 detektiert (Trilling *et al.*, 2014). Trotz der höheren pSTAT3-Mengen wurden jedoch STAT3-induzierte Gene wie SOCS3 nach IL-6-Stimulation nicht transkribiert. Es wird daher davon ausgegangen, dass es weitere MCMV-kodierte Antagonismen gegen die STAT1- und STAT3-regulierte Genexpression gibt, die vermutlich auf der transkriptionellen Ebene agieren (Trilling *et al.*, 2014).

1.4 CMV Proteine pM33 und pUL33

pM33 und das HCMV-kodierte pUL33 gehören zu den CMV-kodierten vGPCR. Die Sequenzen der beiden Proteine sind homolog (Rawlinson *et al.*, 1996). G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) sind eine Gruppe von Rezeptoren, die der Signalweiterleitung nach einer extrazellulären Bindung ihrer Liganden (wie Chemokine oder Zytokine) in das Innere der Zelle dienen, und

dort über eine Aktivierung von membranständigen, rezeptorgekoppelten G-Proteinen vielfältige intrazelluläre Signalwege induzieren. Einige β - und γ -Herpesviren kodieren für virale G-Protein gekoppelte Rezeptoren (*viral G-protein coupled Receptors*, vGPCR). Diese vGPCRs sind zu zellulären GPCR homolog und wurden in den meisten Fällen vermutlich im Laufe der Koevolution aus dem Wirtsgenom in das virale Genom integriert. HCMV kodiert neben pUL33 für drei weitere vGPCR pUS27, pUS28 und pUL78, von denen pUS28 mit Abstand am besten erforscht ist (de Munnik *et al.*, 2015). Für das weitere Verständnis zu vGPCRs soll hier nachfolgend zunächst auf die allgemeine Signaltransduktion der GPCRs eingegangen werden.

GPCR bestehen aus α -Helices, die als Transmembrandomänen (TMD) siebenmal die Zellmembran durchlaufen und dazwischen jeweils durch extrazelluläre und intrazelluläre Loops (ECL und ICL) verbunden sind. Der extrazelluläre N-Terminus und die ECL dienen der Ligandenbindung, die Signalweiterleitung an gekoppelte Proteine innerhalb der Zelle wird über ICL und den intrazellulären C-Terminus vermittelt (de Munnik *et al.*, 2015). Unter den vielen hoch konservierten Sequenzmotiven innerhalb der verschiedenen Domänen ist für diese Arbeit ein DRY Motiv in der zweiten ICL besonders relevant, welches für die Aktivierung von gekoppelten G-Proteinen wichtig ist. Mutationen in diesem Motiv können die Bindung und Aktivierung von G-Proteinen beeinträchtigen oder zu einem konstitutiven Signaling führen (Gether, 2000; Rasmussen *et al.*, 1999).

Bei den für die Rezeptorklasse namensgebenden Proteinen handelt es sich um Guanosindiphosphat- bzw. Guanosintriphosphat-bindende Proteine (GDP und GTP). Die Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteine werden mit α , β , und γ bezeichnet. Inaktiv liegt die $G\alpha$ -Untereinheit an einem GDP gebunden vor, welches durch GPCR-Aktivierung durch ein GTP ausgetauscht wird und zur Dissoziation des G-Proteins in die Untereinheiten $G\alpha$ und $G\beta\gamma$ und deren Ablösung vom Rezeptor führt (de Munnik *et al.*, 2015; Oldham und Hamm, 2007). Die Untereinheiten $G\alpha$ und $G\beta\gamma$ induzieren dann über weitere Effektorproteine verschiedene Signalwege, die letztendlich die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren auslösen (Oldham und Hamm, 2008). Entsprechend der von ihnen aktivierten Signalwege können die $G\alpha$ -Proteine in vier Familien unterteilt werden: $G\alpha_s$ -Proteine aktivieren eine Signalkaskade über die Adenylylcyclase (AC), cyclic AMP (cAMP) und Proteinkinase A (PKA) die Aktivierung des Transkriptionsfaktors CRE (cAMP-responsives Element). Demgegenüber inhibieren die $G\alpha_{i/o}$ -Proteine die Adenylylcyclase und reduzieren somit die CRE-Aktivität. $G\alpha_{q/11}$ -Proteine induzieren über die Phospholipase $C\beta$ (PLC β) die Akkumulierung von Inositol 1,4,5-Triphosphat (IP $_3$) und Diacylglycerol (DAG). Während DAG daraufhin direkt die Proteinkinasen C (PKC) aktiviert, vermittelt IP $_3$ die PKC-Aktivierung über eine Ca $^{2+}$ -Freisetzung aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) mittels des ER-ständigen IP $_3$ -Rezeptors. Die über beide Wege aktivierbaren PKC aktivieren nachfolgend den Transkriptionsfaktor *nuclear factor of activated T-cells* (NFAT) (Pfeifhofer *et al.*, 2003;

San-Antonio *et al.*, 2002). $G_{\alpha_{12/13}}$ Proteine aktivieren über *guanine nucleotide exchange factors* (GEFs) und RhoA die RhoA-Kinase (ROCK) und dadurch schließlich den *serum response factor* (SRF). Die $G\beta\gamma$ Untereinheiten regulieren verschiedene Ionenkanäle und außerdem ebenfalls die Phospholipase $C\beta$ (PLC β) und Adenylylcyclase (AC) (McCudden *et al.*, 2005).

Zusätzlich zum G-Protein-abhängigen Signaling induzieren GPCRs auch G-Protein-unabhängige Signalwege. So können beispielsweise durch β -Arrestine, welche zum Zweck der Rezeptorinternalisierung an GPCR binden, auch einige *mitogen-activated protein kinases* (MAP) aktiviert werden, unter anderem ERK1/2, JNK3 oder p38 (DeWire *et al.*, 2007). Da MAP-Kinasen einen der vielen Wege zur Aktivierung und Regulation von NF κ B darstellen, ist somit auch NF κ B als regulierter Transkriptionsfaktor am Ende einer G-protein-unabhängigen Signaltransduktion möglich (Saha *et al.*, 2007).

1.4.1 CMV-kodierte G-Protein gekoppelte Rezeptoren

Für die CMV-kodierten vGPCRs pUS27, pUL33 und pUL78 sind bisher keine Liganden bekannt, für pUS28 sind dagegen die Chemokine Makrophagen-Chemoattraktorprotein-1 (MCP-1), MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES und Fraktalkin als Liganden beschrieben (Krishna *et al.*, 2018; Kledal *et al.*, 1998; Gao und Murphy, 1994; Neote *et al.*, 1993). pUS28 induziert außerdem konstitutiv G_{α_q} - und MAPK-abhängige Signalwege (Waldhoer *et al.*, 2002; Casarosa *et al.*, 2001) und aktiviert einige Transkriptionsfaktoren wie CREB, NFAT und NF κ B (McLean *et al.*, 2004; Miller *et al.*, 2003; Waldhoer *et al.*, 2003; Casarosa *et al.*, 2001). Allerdings zeigten Krishna *et al.*, dass in undifferenzierten Monozyten dagegen keine Aktivierung, sondern eine Inhibition einiger proliferativer Signale durch pUS28 erfolgt, unter anderem von MAPK und NF κ B (Krishna *et al.*, 2017). Das vielfältige, zelltypabhängige Signaling von pUS28 reguliert unter anderem Latenz und Reaktivierung, Zellmotilität und Onkomodulation (Krishna *et al.*, 2018). Zu pUL33 und pUL78 gibt es Homologe in MCMV (pM33, pM78) und RCMV (pR33, pR78) (Beisser *et al.*, 1999; Beisser *et al.*, 1998; Rawlinson *et al.*, 1996), aber auch die humanen β -Herpesviren 6 (HHV6) und 7 (HHV7) kodieren für Homologe zu pUL33 und pUL78 (pU12 und pU51) (Nicholas, 1996; Gompels *et al.*, 1995).

Wie für zelluläre GPCR finden sich auch für CMV-kodierte GPCR Hinweise auf erweiterte Funktionen und Regulationen durch Heterodimerisierungen mit anderen GPCRs. Dimere aus pUL33 oder pUL78 mit dem humanen CCR5 beeinträchtigen zwar beide dessen Internalisierung und die CCL5-vermittelte Zellmigration, regulieren aber das Signaling via PLC-Aktivierung und Ca^{2+} -Akkumulierung gegensätzlich zueinander (Tadagaki *et al.*, 2012). Dimerisierungen von

pUS28 mit pUL33 oder pUL78 haben eine Inhibition der pUS28-induzierten NF κ B-Aktivierung zur Folge (Tschische *et al.*, 2011).

Eine Besonderheit der CMV-kodierten GPCRs ist das besonders stark vertretene Liganden-unabhängige, konstitutive Signaling. Während für pUS28 bereits einige Chemokin-Liganden beschrieben wurden, sind weder für pM33 noch für pUL33 Liganden bekannt. Für pM33 wurde RANTES als Ligand vorgeschlagen (Melnichuk *et al.*, 2005). Sowohl pUS28 als auch pM33 induzieren konstitutives G α_q - und PLC-vermitteltes Signaling (Waldhoer *et al.*, 2002). Beide aktivieren auch NFAT, CREB und NF κ B (Case *et al.*, 2008; Sherrill und Miller, 2006; McLean *et al.*, 2004), wobei an der CREB-Aktivierung, aber nicht an der NF κ B-Aktivierung, die p38 *mitogen-activated protein* (MAP) Kinase beteiligt ist (s. Abb. 1.2 für pM33) (Waldhoer *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu zeigt pUL33 laut den Autoren nur eine geringe konstitutive Aktivierung von Gq, PLC und CREB und keine konstitutive Aktivierung von NF κ B (Waldhoer *et al.*, 2002). Stattdessen wurde für pUL33 eine eher breite konstitutive Aktivierung verschiedener G-Proteine (G α_q , G $\alpha_{i/o}$ und G α_s) beschrieben (Casarosa *et al.*, 2003). Die von pUL33 induzierte CRE-abhängige Transkription wurde dort eher mit einer Interaktion mit G-Proteinen der Familien G $\alpha_{i/o}$ und G α_s sowie mit Rho/p38-Aktivierung durch G $\beta\gamma$ -Untereinheiten in Verbindung gebracht (Casarosa *et al.*, 2003). Als mögliche Ursache für die fehlende konstitutive NF κ B-Aktivität von pUL33 schlugen die Autoren Abweichungen in dem in GPCR stark konservierten DRY Motiv vor, welches in pUL33 mit der konservierten Asparaginsäureäure (D) und in pM33 mit einem Asparagin (N) kodiert wird (NRY Motiv) (Waldhoer *et al.*, 2002). Eine pM33-Mutante mit DRY Motiv zeigte zwar eine stärkere CRE- und NFAT-Aktivierung als mit dem wt Motiv NRY, wurde aber nicht auf Effekte bezüglich der konstitutiven NF κ B-Aktivierung untersucht (Case *et al.*, 2008).

Eine neuere Arbeit stellte vergleichbar starke konstitutive Aktivierungen von *activator protein 1* (AP-1), Hypoxie-induzierter Faktor 1 (HIF-1), NFAT, STAT3, *T cell factor/lymphoid enhancer-binding factor* (TCF/LEF), und der Promotoren von *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und Cyclooxygenase-2 (COX-2) durch pUL33 und pUS28 fest. Diesen Daten zufolge aktiviert pUL33 doch NF κ B und SRF, allerdings deutlich weniger stark als pUS28 (van Senten *et al.*, 2019). Insbesondere die auch in Glioblastomzellen beobachtete Induktion von pSTAT3, eine Transformation von pUL33-exprimierenden NIH3T3-Zellen und Tumorwachstum in T-Zell-defizienten *athymic nude* Mäusen nach einer Striatum-Injektion von Zellen mit pUL33- oder pUS28-Expression bringt pUL33 wie zuvor auch schon pUS28 in Verbindung mit onkomodulatorischen Eigenschaften (van Senten *et al.*, 2019; Maussang *et al.*, 2009; Maussang *et al.*, 2006).

In einer pM33-Mutante mit einem Aminosäureaustausch des Arginins im NRY Motiv zu Glutamin (NQY) ist das konstitutive Signaling inhibiert (Case *et al.*, 2008). Experimente einer weiteren Gruppe mit einer Mutation zu Alanin (NAY) zeigten den gleichen Verlust des konstitutiven Signalings über $G_{\alpha_{q/11}}$, und verdeutlichten, dass das NRY Motiv in pM33 essenziell für die Aktivierung, aber nicht für die Bindung der $G_{\alpha_{q/11}}$ -Proteine an den Rezeptor ist (Sherrill und Miller, 2006). Es wurde zudem gezeigt, dass die pM33-induzierte Aktivierung von CREB durch $G_{\alpha_{q/11}}$ und PLC-C β -Aktivierung nicht zu einer IP₃-induzierten Ca²⁺-Akkumulation führt, sondern DAG-abhängig über die Proteinkinase C (PKC) erfolgt. Weitere Experimente mit der pM33-NAY-Mutante und einem Inhibitor der Proteinkinase C (PKC) spezifizierten, dass die konstitutive p38-MAPK- und NF κ B-Aktivierung G-Protein- und PKC-unabhängig stattfindet (Sherrill *et al.*, 2009).

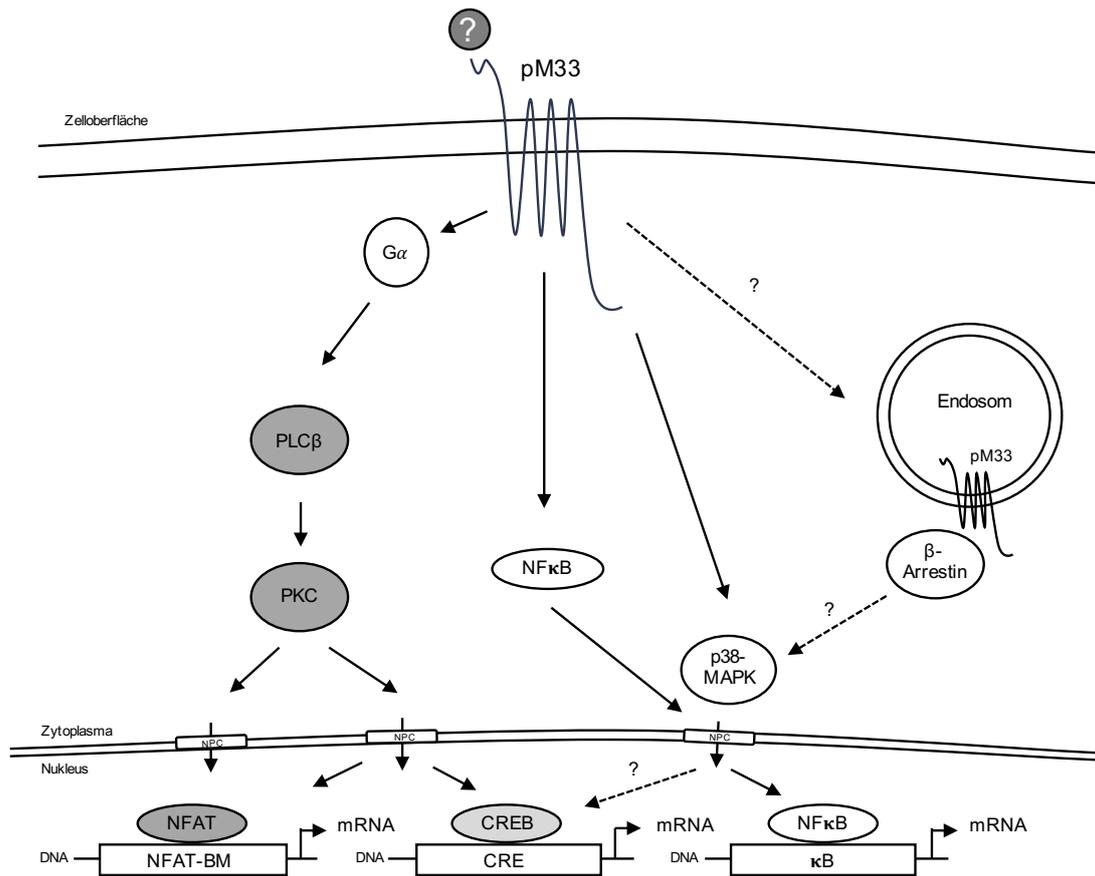


Abbildung 1.2: Vereinfachtes Schema der pM33-Signaltransduktion. pM33 induziert Liganden-unabhängig über eine konstitutive $G\alpha_q$ - und PLC-vermittelte Signaltransduktion die Transkriptionsfaktoren *nuclear factor of activated T-cells* (NFAT) und *cAMP response element-binding protein* (CREB). Eine konstitutive Aktivierung von *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells* NF κ B und *p38-mitogen-activated protein kinase* (MAPK) erfolgt G-Protein-unabhängig. Die p38-MAPK ist möglicherweise auch an der Aktivierung von CREB beteiligt. Eine mögliche Aktivierung der p38-MAPK von pM33 über β -Arrestin wurde vorgeschlagen. NFAT-BM: NFAT *binding motif*. Für detaillierte Informationen s. Kap. 1.4.1. Abbildung angelehnt an Sherrill *et al.*, 2009.

Das pUL33- und pM33-Homolog in RCMV aktiviert konstitutiv die Phospholipase C über $G\alpha_{q/11}$ -Proteine. Auch eine NF κ B-Aktivierung wurde für pR33 beschrieben, diese findet aber, anders als durch M33, $G\alpha_{i/o}$ -Protein-abhängig statt (Casarosa *et al.*, 2003; Gruijthuijsen *et al.*, 2002). Im Gegensatz zu pUL33 und pM33 inhibiert pR33 die CREB-Aktivität über die aktivierten $G\alpha_{i/o}$ -Proteine durch Inhibition der Adenylatcyclase (Gruijthuijsen *et al.*, 2002). Mutationen des konservierten pR33-NRY Motivs zu NAY führen wie in pM33 zum Verlust des konstitutiven Signaling. Eine Mutation zu ARY scheint dagegen nur die Aktivierung von $G\alpha_{q/11}$ -Proteinen zu beeinträchtigen, während die Fähigkeit der Aktivierung von $G\alpha_{i/o}$ -Proteinen erhalten bleibt. Eine Mutation zu DRY, welches dem am meisten unter den GPCR konservierten Motiv entspricht,

hatte dagegen keinen Einfluss auf das konstitutive pR33-Signaling (Gruijthuijsen *et al.*, 2004).

1.4.2 Die Bedeutung von UL33, M33 und R33 für die Replikation

Die Replikation von HCMV scheint *in vitro* nicht von der Expression von pUL33 abhängig zu sein, da für HCMV mit Deletionen von *UL33* oder Transposoninsertion im *UL33*-ORF keine Replikationsphänotypen beobachtet wurden (Casarosa *et al.*, 2003; Dunn *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2003; Margulies *et al.*, 1996). In diesen Studien wurde die Replikation jedoch nur in Fibroblasten (HFF und MRC-5) untersucht. Damit konsistent zeigte sich für Virusmutanten mit einer *lacZ*-Insertion in den *M33*-ORF oder für *M33*-Deletionsviren ebenfalls eine wt-MCMV-ähnliche Replikation in Fibroblasten (MEF und NIH/3T3) (Sherrill *et al.*, 2009; Davis-Poynter *et al.*, 1997). Allerdings wurde in differenzierten Makrophagen aus dem Knochenmark (BMM) eine etwa 10-fach reduzierte Replikation von *M33*-null-MCMV mit einer *lacZ*-Insertion oder einer Stop-Codon-Mutante von *M33* festgestellt (Farrell *et al.*, 2013). *In vivo* zeigen sich für *M33*-deletiertes MCMV dagegen organabhängige Phänotypen. *M33* spielt eine Rolle für die Replikation in Pankreas und Milz, ist allerdings besonders für die Replikation in der Speicheldrüse von Bedeutung (Bittencourt *et al.*, 2014; Cardin *et al.*, 2009). Das G-Protein-abhängige Signaling durch *M33* hat sich dabei als wichtiger Faktor für die Replikation in der Speicheldrüse und für die Etablierung bzw. die Reaktivierung der Replikation aus der Latenz in Lungen- und Milz-Explantaten erwiesen (Farrell *et al.*, 2011). *M33* scheint auch für die Etablierung einer Latenz in Knochenmarkzellen und abhängig von der Infektionsroute auch in Peritonealzellen und der Lunge eine Rolle zu spielen (Cardin *et al.*, 2009). Sowohl *US28* als auch *UL33* können die reduzierte Replikation der *M33*-Signaling-Mutante in Pankreas und Milz vollständig, und die Replikation in der Speicheldrüse sowie die Reaktivierung aus Milz- und Lungen-Latenzexplantaten teilweise, komplementieren (Farrell *et al.*, 2011). Dabei erfolgt die Komplementation des *M33*-null-MCMV-Replikationsdefizits in der Speicheldrüse durch *US28* hauptsächlich über G-Protein-abhängige Mechanismen, für die Reaktivierung aus der Latenz scheinen dagegen sowohl G-Protein-abhängige- als auch G-Protein-unabhängige Signalwege notwendig zu sein. *US28* komplementiert außerdem die eingeschränkte Replikation von *M33*-null-MCMV in Makrophagen aus dem Knochenmark G-Protein unabhängig (Farrell *et al.*, 2013).

Auch *R33* ist nicht essenziell für die *in vitro* Replikation in primären embryonalen Rattenfibroblasten und einer Endothelzelllinie. *R33*-null-RCMV mit einem teilweise deletierten und daher unterbrochenen *R33*-ORF, ist jedoch wie *M33* in den Speicheldrüsen attenuiert, und in immunkomprimierten Ratten war die Überlebensrate nach einer Δ R33-RCMV-Infektion höher

als die der wt-RCMV-infizierten Ratten (Beisser *et al.*, 1998).

Eine besondere Bedeutung von *M33* wurde für die Dissemination von MCMV nachgewiesen. Farrell *et al.* zeigten, dass die Dissemination von MCMV in intranasal-infizierten Mäusen über infizierte CD11c⁺-Zellen aus der Lunge (Dendritische Zellen und möglicherweise DC-ähnliche Alveolarmakrophagen) erfolgt, die zu den naheliegenden Lymphknoten migrieren, aus diesen über *high endothelial venules* (HEV) in das Blut migrieren und so die Speicheldrüse erreichen und infizieren. Die Migration über die HEV erfolgt dabei über eine CD44-abhängige Migration der Dendritischen Zellen. Interessanterweise konnten die Autoren zeigen, dass sowohl *M33*-deletiertes MCMV als auch die G-Protein-Signaling defiziente Mutante (*M33NQY*) in den Lymphknoten akkumulierten, nicht über die HEV in die Blutzirkulation gelangten und auch nicht die Speicheldrüse infizierten (Farrell *et al.*, 2017). Eine Komplementation der DC-Migration von der Lunge (intranasal infiziert) bis zur Blutzirkulation durch *US28* findet zwar statt, diese führt allerdings nicht zu einer nachweisbaren Infektion der Speicheldrüse. Die G-Protein-Signaling-defiziente Mutante *US28R129Q* gelangte ebenso wie *M33NQY* nicht in die Blutzirkulation. Es liegt daher nahe, dass für die MCMV-Dissemination nach einer intranasalen Infektion die G-Protein-Aktivierung von pM33 benötigt wird und durch pUS28 kompensiert werden kann, die Infektion der Speicheldrüse aber von pM33-induzierten Mechanismen abhängig ist, die nicht durch *US28* induziert werden können (Farrell *et al.*, 2018). Trotz der Unterschiede in den aktivierten Signalwegen durch die verschiedenen Mitglieder der *UL33*-GPCR-Rezeptorfamilie deuten diese Studien auf ähnliche Funktionen der Homologe aus HCMV, MCMV und RCMV in der *in vivo* Replikation und Dissemination hin.

1.5 CMV Proteine pM34 und pUL34

Das HCMV-kodierte *UL34* ist laut mehreren Arbeiten für die Replikation essenziell (Rana und Biegalka, 2014; Dunn *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2003). Im Verlauf der Infektion liegen drei verschieden lange RNA-Transkripte vor, die früh in der Infektion von zwei verschiedenen Transkriptions-Initiationsstellen und später in der Infektion von einer dritten Initiationsstelle starten (Rana und Biegalka, 2014; Biegalka *et al.*, 2004). Ein weiteres detektiertes Transkript entspricht in der Größe dem beschriebenen *UL33-UL34 read-through* Transkript (Welch *et al.*, 1991). Als Translationsprodukte beschrieben Biegalka *et al.* ein 43 kDa Protein und ein etwas weniger abundantes 45 kDa-Protein ab 4 h p. i., und im späteren Infektionsverlauf ein weiteres abundantes Protein von etwa 40 kDa, welches den Vorhersagen eines Produkts vom späten Transkript entspricht (Biegalka *et al.*, 2004). Im weiteren Verlauf werden zur Vereinfachung

soweit nicht anders angegeben die pUL34-Proteine als pUL34 zusammengefasst.

Biegalka et. al. zeigten eine pUL34-vermittelte Repression der viralen Gene US3 und US9 durch eine Bindung von pUL34 an *transcriptional repressive elements* (tre) (Liu und Biegalka, 2013; LaPierre und Biegalka, 2001). Konsistent zu DNA-bindenden Proteinen liegt pUL34 im Zellkern vor (Biegalka, 2013; LaPierre und Biegalka, 2001). Durch ein Panel an Verkürzungsmutanten von UL34 konnten die minimal für die DNA-Bindung notwendige Proteinsequenz und die minimale funktionell notwendige Sequenz für die Repression von US3 den Aminosäuren 22 bis 243 zugeordnet werden (Lester *et al.*, 2006). Vorhersagen zufolge enthält das HCMV Genom (AD169) 14 Konsensus-Sequenzen (AAACACCGT[G/T]) für die Bindung von pUL34, von denen sich drei in der Region des *origin of lytic replication* (*oriLyt*) befinden (Liu und Biegalka, 2013). Im Rahmen der Bestätigung der pUL34-Bindung an diese drei Sequenzen mittels Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) wurde auch eine vierte, nicht vorhergesagte Bindestelle mit einer vom Konsensus abweichenden Sequenz (AAACGCCGTC) gefunden (Slayton *et al.*, 2018). Die funktionelle Relevanz wurde mittels Mutagenese der einzelnen Bindestellen (*oriLyt*) bestätigt, welche die Replikation stark attenuierten (Slayton *et al.*, 2018). Zusätzlich wurden Protein-Protein-Interaktionen von pUL34 mit den viralen Proteinen pIE2, pUL44 und pUL84 beschrieben (Slayton *et al.*, 2018). pUL34 ist nach aktuellem Kenntnisstand kein Bestandteil des HCMV Virions (Varnum *et al.*, 2004).

Das MCMV-Homolog *M34* ist bisher weitaus weniger charakterisiert als *UL34*. Die Präsenz von Transkripten des *M34* ORFs und des dort erstmals beschriebenen ORFs *m34.2* in MCMV-infizierten NIH/3T3 Zellen wurde mittels Microarray und RT-PCR nachgewiesen (Tang *et al.*, 2006). Ektope Expression von *m34.2* führte zu einer mitochondrialen Lokalisation, und eine *m34.2*-Deletionsmutante zeigte eine reduzierte Replikation *in vitro* (Tang *et al.*, 2006). Zwei weitere ORFs auf dem komplementären Strang (*m33.1*, *m34.1*) sowie ein verkürzter interner *in-frame* ORF (*M34.iORF*) mit einem abweichenden Initiations-Codon wurden vorhergesagt, aber bisher nicht experimentell bestätigt (Brocchieri *et al.*, 2005). In MS-Analysen unserer Arbeitsgruppe wurde eine Proteinexpression von pM34 detektiert (Le-Trilling *et al.*, 2016). Wie pUL34 wurde auch pM34 nicht im MCMV-Virion detektiert (Kattenhorn *et al.*, 2004).

Baluchova et. al. generierten ein MCMV-BAC mit einer vollständigen Deletion des *M34* ORFs, konnten daraus aber kein *M34*-deletiertes MCMV rekonstituieren. Die Autoren schlossen daraus, dass *M34* wie das HCMV-Homolog *UL34* essenziell ist (Baluchova *et al.*, 2008). Eine *M34*-Transposon-Insertionsmutante sowie C-terminale Verkürzungsmutanten von *M34* wurde dagegen als attenuiert, aber prinzipiell replikationsfähig beschrieben (Baluchova *et al.*, 2008).

1.6 Zielsetzung

In den Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass MCMV für einen IFN-Antagonisten kodiert, welcher die STAT1-abhängige Induktion von ISGs inhibiert (Trilling *et al.*, 2014). In einem initialen Screening einer MCMV-ORF Library mittels eines IFN γ -responsiven Luciferase Assays stellten sich die zwei MCMV-kodierten Gene *M33* und *M34* als aussichtsreiche Kandidaten für den IFN-Antagonismus heraus. Diese zwei potenziellen Antagonisten der IFN γ -induzierten Genexpression sollten in dieser Arbeit charakterisiert werden. Dazu sollten zunächst die initialen Befunde des Screenings nach ektopter Expression verifiziert und die HCMV-kodierten Homologe *UL33* und *UL34* als mögliche funktionshomologe Antagonisten der IFN γ -induzierten Genexpression mit einbezogen werden. Für eine allgemeine Charakterisierung der MCMV-kodierten Gene sollten mittels BAC-Mutagenese Virusmutanten mit Epitop-markierten Zielgenen und die entsprechenden *loss-of-function* Mutanten $\Delta M33$ -MCMV und $\Delta M34$ -MCMV generiert und anschließend *in vitro* charakterisiert werden. Da $\Delta M27$ -MCMV bereits *in vitro* eine starke Sensitivität gegenüber einer IFN γ -Inkubation zeigt und *in vivo* hochgradig attenuiert ist, sollte die Replikation der neu zu generierenden Deletionsviren $\Delta M33$ -MCMV und $\Delta M34$ -MCMV zunächst *in vitro* in Hinsicht auf ihre IFN γ -Sensitivität analysiert werden. Bei entsprechenden Ergebnissen sollten die Replikationsanalysen auf eine *in vivo*-Charakterisierung ausgeweitet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien

Acrylamid/Bisacrylamid (30%)	Roth
Agarose	Biozym
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth
Ampicillin	AppliChem
AmpliTaq DNA Polymerase	Applied Biosystems
β -Mercaptoethanol	Aldrich
<i>Beetle-Juice</i>	PJK
Borsäure	Roth
Brilliant Blau G250	Roth
Bromphenolblau	Roth
Calciumchlorid	Roth
<i>CDP Star</i>	Roche
Chloramphenicol	Roth
4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma
DIG Blocking-Reagenz	Roche
<i>DIG Easy Hyb</i>	Roche
<i>DIG High Prime</i>	Roche
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth
DpnI	New England Biolabs
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	New England Biolabs
Dithiothreitol (DTT)	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth
Essigsäure (96%)	Roth
Formaldehyd	Roth
Ethanol	Roth
Glycerol	Roth
Glycin	Roth
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Roth

Isopropanol	Roth
Kaliumacetat	Roth
Kanamycinsulfat	Roth
Leupeptin	Roth
Lysogeny broth (LB)-Medium	Roth
Lysogeny broth (LB)-Agar	Roth
Magnesiumchlorid	Roth
Maleinsäure	Roth
Methanol	JT Baker
Natriumacetat	Roth
Natriumazid	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumhydroxid	Roth
Natriumorthovanadat (Na_3VO_4)	AppliChem
N,N-Dimethylformamid	Roth
NP40/IGEPAL	Sigma
Pepstatin A	Roth
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roth
Phosphorsäure	Roth
Phusion DNA-Polymerase	New England Biolabs
Polyethylenimin (PEI)	Sigma
Ponceau S	Roth
RNase A	AppliChem
Saccharose	Roth
Salzsäure (HCl)	Roth
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth
Trinatriumcitratdihydrat	Roth
Tris-Base	Roth
Triton X-100	Roth
Trypan Blue Stain (0,4%)	Gibco
Tween 20	Roth

2.1.2 Kits

<i>AmpliTaq DNA Polymerase, SixPaq with Gene Amp</i>	Roche
In Fusion HD Cloning Kit	Takara
NucleoBond® Xtra Midi und PC100	Macherey-Nagel
<i>NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit</i>	Macherey-Nagel
<i>QIAshredder</i>	Qiagen
QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies
<i>RNeasy Mini Kit</i>	Qiagen
SampleIN Direct PCR Kit high Qu	High Qu
<i>SignalFire ECL Reagent</i>	Cell Signaling Technology

2.1.3 Puffer und Lösungen

10x Alkalische-Phosphatase (AP)-Puffer	0,1 mM Tris/HCl, pH 9,5 0,1 M NaCl
Bradford-Reagenz	8,5% (v/v) Phosphorsäure 4,75% (v/v) Ethanol 100 mg/l Coomassie Blau G-250
ELISA Binding Puffer	0,1 M Na ₂ HPO ₄ , pH 9.0
ELISA Blocking Puffer	10 % (v/v) FCS in PBS
ELISA Probenpuffer	10 % (v/v) FCS in PBS-T
ELISA Waschpuffer (PBS-T)	0,1 % (v/v) Tween 20 in PBS
10x Lämmli-Elektrophoresepuffer	250 mM Tris 1,92 M Glycin 1% (w/v) SDS
Luc Lyse Puffer	25 mM Tris-HCL, pH 7,8 2 mM DTT 10% (v/v) Glycerol 1% (v/v) Triton X-100
Maleinsäurepuffer	0,1 M Maleinsäure, pH 7,5 150 mM NaCl
Methylzellulose	8,8 g Methylzellulose in 360 ml ddH ₂ O autoklaviert und bei 4 °C gerührt vor Benutzung zugegeben: 40 ml 10x MEM 20 ml FCS

	20 ml NaHCO ₃ (55g/l)
	5 ml Penicillin (10.000 U/ml)/
	Streptomycin (10.000 µg/ml)
	5 ml L-Glutamin (250 mM)
5% (w/v) Milchpulverlösung	5% (w/v) Milchpulver
	1xTBST
20x Natriumchlorid Natriumcitrat (SSC)	1,5 M NaCl
	0,15 M Trinatriumcitratdihydrat
P1 Puffer	50 mM Tris-HCl, pH 8,0
	100 µg/ml RNase A
	10 mM EDTA
P2 Puffer	200 mM NaOH
	1% (w/v) SDS
P3 Puffer	3 M Kaliumacetat, pH 5,5
1x Semi-Dry-Blot-Puffer	48 mM Tris
	28 mM Glycin
	20% (v/v) Methanol
6x TBE-Probenpuffer	10% (v/v) Glycerol
	6x TBE
	Bromphenolblau
10x TBE	900 mM Tris
	900 mM Borsäure
	20 mM EDTA, pH 8,0
10x TBST	100 mM Tris/HCl
	1,5 M NaCl
	0,5% (v/v) Tween 20
VSB-Puffer	50 mM Tris/HCl, pH 7,8
	12 mM KCl
	5 mM EDTA
Wasch-Puffer 1 (SB)	2x SSC
	0,1 % SDS
Wasch-Puffer 2 (SB)	0,2x SSC
	0,1 % SDS
4x Western Blot-Probenpuffer	0,25 M Tris/HCl, pH 6,8
	40% (v/v) Glycerol
	8% (w/v) SDS
	20% (v/v) β-Mercaptoethanol
	Bromphenolblau

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

<i>Color Protein Standard</i>	New England Biolabs
<i>Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets</i>	Roche
Cryo.s™	Greiner Bio-One
ECL Substrat	Cell Signaling
Fuji medical X-Ray Film	Fujifilm
<i>GelRed</i>	Biotium
Gene Pulser/MicroPulse Electroporation Cuvettes, #1652086	Bio-Rad
<i>Gene Ruler DNA Ladder Mix</i>	Thermo Scientific
Hyperfilme ECL	GE-Healthcare
LumiNunc F96 MicroWell Platten	Nunc
Magermilchpulver	Sucofin
Multiwell Platten Cellstar (24-wells #662160, 48-wells #677180)	Greiner Bio-One
Multiwell Platten Cellstar (6-wells #657160, 12-wells #665180)	Greiner Bio-One
Multiwell Platten Cellstar (96-wells # 353072)	Greiner Bio-One
Nitrozellulose-Membran Protran BA 85	GE-Healthcare
Nunc MaxiSorp™ <i>flat-bottom</i> Platten	Nunc
Nylonmembran, positiv geladen	Roche
Pipettenspitzen TipOne	Starlab
Reaktionsgefäße, 1,5 ml und 2 ml Safe Lock	Eppendorf
Reblot Plus Strong Solution (10x)	Millipore
<i>RNA Loading Dye (2x)</i>	New England Biolabs
Roentoroll 25	Tetenal
Saran-Folie	Sarogold
Serologische Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml, Cellstar	Greiner Bio-One
<i>Serva DNA Stain Clear G</i>	Serva
Superfix 25	Tetenal
Whatman 3MM Chr Papier	Whatman
Zellkulturflaschen Cellstar #690175, #658175, #660175	Greiner Bio-One
Zellschaber M #99003	TTP
Zellsiebe MACS SmartStrainer (70 µm)	Miltenyi Biotech
Zentrifugenröhrchen (Falcontubes) 15 ml und 50 ml	Greiner Bio-One

2.1.5 Geräte

Absaugvorrichtung	2-9336, Neolab KNF, Neuberger Vacusafe, Integra
Bioreader-7000 F z	BIO-SYS
Blotting-Apparatur	PerfectBlue Semi-Dry-Elektroblotter, Peqlab
Durchflusszytometer	BD FACSCan to™ II, BD Biosciences
Einfrierbehälter	CoolCell® FTS 30, biocision
Eismaschine	AF 80, Scotsman
Elektrophorese-Kammern	PerfectBlue™ Horizontale Gelsysteme, Mini S und L, Peqlab
Entwicklungsmaschine	Cawomat 2000 IR, Cawo
Gefrierschrank, -20°C	Liebherr Comfort UG1211 Liebherr Medline
Gefrierschrank, -80°C	Ultra low temperature freezer, Sanyo
Gene Pulser X Cell	Bio-Rad
Gel-Dokumentationssystem	GeneGenius Gel Imaging System, Syngene
Homogenisator	Dounce Tissue Grinders, Wheaton
Hybridisierungsöfen	OV 3, Biometra
Inkubatoren	CB150 E3, Binder Heraeus function line, Thermo Scientific Max Q6000, Thermo Scientific Incubat, Melag
Kühlschränke	Liebherr Liebherr UK 1720
Luziferase/Mikroplatten Reader	Mithras2 LB 943 Multimode Reader, Berthold Technologies
Magnetrührer	MR Hei-Standard, Heidolph
Mikrowelle	HF12M240, Siemens
Mikroskop	Leica DM IL LED Olympus CKX41
pH-Messgerät	Lab 850, Schott Instruments
Pipetten	ErgoOne, Starlab Research, Eppendorf Pipetboy 2, Integra Biosciences Pipetman, Gilson Pipetus-akku, Hirschmann Laborgeräte

Reinstwasseranlage	Milli Q, Millipore
SDS-Gelapparatur	PerfectBlue™ Vertikale Doppelsysteme, Twin S und ExW S, Peqlab
Spannungsquellen	Power Pack PS300T, Biometra
Spektralphotometer	Bio Photometer plus, Eppendorf NanoDrop2000, Thermo Scientific
Sterilbank	Hera safe, Thermo Scientific
Taumler	Reax 2, Heidolph
Thermoblöcke	HLC, Biotech MBT 250, Kleinfeld Labortechnik Thermomixer Comfort, Eppendorf ThermoStat plus, Eppendorf
Thermocycler	T Professional Trio, Biometra
Transilluminator	MWG-Biotech
Turbo-Blotter	GE Healthcare
Vortexer	Vortex Genius 3, IKA-Werke Vortexer™, Heathrow Scientific
Waage	EMB 1000-2, Kern R 160 P, Sartorius Research 572, Kern
Wasserbad	GFL
Wiegeschüttler	Duomax 1030, Heidolph 3013, GFL
Zentrifugen	Allegra X-15 R, Beckman Coulter Avanti® J-26 XP, Beckman Coulter Rotanta 460 R, Hettich Sigma 4-16K Sprout, Hettich 5415 D, 5417 R, 5424, 5427 R, Eppendorf

2.1.6 Zellkulturmedien, Inhibitoren und Zytokine

Actinomycin D	AppliChem
Ciprofloxacin Hydrochlorid	MP Biomedicals
Cycloheximid	Roth
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco
FBS Superior (Fetal bovine serum)	Biochrom
Ganciclovir	Sigma
Geneticin (G418)	Roth
HEPES	Gibco
Interferon γ (human)	pbl Assay Service
Interferon γ (murin)	Merck Millipore
L-Glutamin (250 mM)	Gibco
MEM (10x)	Sigma
Penicillin (10.000 U/ml)/Streptomycin (10.000 $\mu\text{g/ml}$)	GE-Healthcare
Phosphate buffered saline (PBS)	Gibco
RPMI-1640 Medium	Gibco
Ruxolitinib	cell guidance systems
Trypsin	Gibco

2.1.7 Zellen

CIM	<i>crisis-immortalized</i> MEF aus C57BL/6 Embryonen (Rattay, 2015)
Cloudman S91	murine Melanomzellen, ATCC CCL-53.1, zur Verfügung gestellt von Prof. Ingo Drexler
HEK293A	Humane embryonale Nierenzellen mit stabiler AdV-E1a und -E1b-Expression, Microbix Biosystems, zur Verfügung gestellt von Dr. Wibke Bayer
HeLa	Humane Gebärmutterhalskrebszellen, ATCC CCL-2
MEF	<i>primary mouse embryonic fibroblasts</i> , isoliert aus C57BL/6 oder BALB/c (Le-Trilling und Trilling, 2017)
MNC	<i>primary mouse embryonic newborn cells</i> , isoliert aus BALB/c (Le-Trilling und Trilling, 2017)
NIH3T3	Murine embryonale Fibroblasten, ATCC CRL-1658

2.1.8 Mäuse

BALB/c *Baggs albino* Inzucht-Mausstamm, Histokompatibilität H-2^d

2.1.9 Bakterien

Escherichia coli

DH10B

GS1783

abgeleitet von DH10B (Tischer et al., 2006)

multiple deletion strain (MDS42)

14% Genomreduktion, Scarab Genomics
(Pósfai et al., 2006)

XL1-Blue F

endA1 gyrA96(nalR) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44

F'[:,Tn10 proAB+ lacIq Δ(lacZ)M15] hsdR17 (rK- mK+)

Stratagene

2.1.10 Plasmide

Die nachfolgenden Plasmide wurden, soweit nicht anders angegeben, aus dem Laborbestand zur Verfügung gestellt.

Expressionsvektor

Herkunft

Kana S Plasmid

bereitgestellt von Dr. Khanh Le-Trilling

pcDNA3.1+ und pcDNA3.1-

Invitrogen

pcDNA3.1-M33HA

Kloniert und bereitgestellt von Dr. Khanh Le-Trilling

pcDNA3.1-M33-V5-His

bereitgestellt von Dr. Ann Hill

pcDNA3.1-M34-V5-His

bereitgestellt von Dr. Ann Hill

pcDNA3.1-M78-V5-His

bereitgestellt von Dr. Ann Hill

pcDNA3.1-UL23HA

Kloniert und bereitgestellt von Dr. Khanh Le-Trilling

pcDNA3.1-UL33HA

Kloniert von Dr. Tanja Becker und bereitgestellt
von Dr. Khanh Le-Trilling

pCP20

bereitgestellt von Dr. Khanh Le-Trilling
(Cherepanov und Wackernagel, 1995)

pFRT1

bereitgestellt von Dr. Khanh Le-Trilling (Atalay *et al.*, 2002)

pFRT-Z-EF1-pr

Kloniert und bereitgestellt von Dr. Khanh Le-Trilling

pGAS-Luc

Clontech

pIRES2-EGFP	Clontech
pISRE-Luc	Stratagene
pMiniT	New England Biolabs

Die folgenden Expressionsvektoren wurden im Rahmen dieser Arbeit kloniert.

Expressionsvektor	Translationsprodukt
pcDNA3.1-M33-V5-His-R131A	pM33-V5/His, Aminosäureaustausch R131A
pcDNA3.1-M33-V5-His-R131Q	pM33-V5/His, Aminosäureaustausch R131Q
pcDNA3.1-M34HA	pM34HA, C-terminale HA-Epitop-Markierung
pcDNA3.1-M34HA-ATG1mut	pM34HA _{Δ1-215} , Nukleotiddeletion im Startcodon (ATG zu AG)
pcDNA3.1-UL34HA	pUL34HA, C-terminale HA-Epitop-Markierung
pMiniT-M33HA	pM33HA, C-terminale HA-Epitop-Markierung (Klonierungsvektor)
pMiniT-UL34HA	pUL34HA, C-terminale HA-Epitop-Markierung (Klonierungsvektor)

2.1.11 *Bacterial artificial chromosomes (BAC)*

Die folgenden BACs wurden, soweit nicht anders angegeben, im Rahmen dieser Arbeit generiert.

wt-MCMV-BAC	mck2-repaired wt-MCMV-BAC (Hintergrund pSM3fr BAC) bereitgestellt von Dr. Khanh Le-Triling (Jordan et. al., 2011)
M33HA-MCMV-BAC	MCMV-BAC mit Insertion einer Kodierungssequenz für eine C-terminale HA-Epitop-Markierung in frame mit <i>M33</i>
M34HA-MCMV-BAC	MCMV-BAC mit Insertion einer Kodierungssequenz für eine C-terminale HA-Epitop-Markierung in frame mit <i>M34</i>
ΔM33-MCMV-BAC	MCMV-BAC mit einer Deletion des ORFs <i>M33</i> und integrierter Kanamycin-Deletionskassette
ΔM34-MCMV-BAC	MCMV-BAC mit einer Deletion des ORFs <i>M34</i> und integrierter Kanamycin-Deletionskassette
ΔM33-ΔM34-MCMV-BAC	MCMV-BAC mit einer Deletion der ORFs <i>M33</i> und <i>M34</i> und integrierter Kanamycin-Deletionskassette

Δ M33 ^{KanaR} -MCMV-BAC	Δ M33-MCMV-BAC ohne integrierte Kanamycin-Deletionskassette
Δ M34 ^{KanaR} -MCMV-BAC	Δ M34-MCMV-BAC ohne integrierte Kanamycin-Deletionskassette
Δ M34HA-MCMV-BAC	Deletion des ORFs <i>M34</i> mit integrierter Kanamycin-Deletionskassette auf dem Hintergrund von M34HA-MCMV-BAC

2.1.12 Viren

wt-MCMV	rekonstituiert aus wt-MCMV-BAC zur Verfügung gestellt von Dr. Khanh Le-Trilling
Δ M27-MCMV	rekonstituiert aus Δ M27-MCMV-BAC (Le-Trilling <i>et al.</i> , 2018) zur Verfügung gestellt von Dr. Khanh Le-Trilling
M33HA-MCMV	rekonstituiert aus M33HA-MCMV-BAC
M34HA-MCMV	rekonstituiert aus M34HA-MCMV-BAC
Δ M33-MCMV	rekonstituiert aus Δ M33-MCMV-BAC
Δ M34-MCMV	rekonstituiert aus Δ M34-MCMV-BAC
Δ M33- Δ M34-MCMV	rekonstituiert aus Δ M33- Δ M34-MCMV-BAC
Δ M33 ^{KanaR} -MCMV	rekonstituiert aus Δ M33 ^{KanaR} -MCMV-BAC
Δ M34 ^{KanaR} -MCMV	rekonstituiert aus Δ M34 ^{KanaR} -MCMV-BAC
Δ M33HA-MCMV	rekonstituiert aus Δ M33HA-MCMV-BAC
Δ M34HA-MCMV	rekonstituiert aus Δ M34HA-MCMV-BAC
Ad5.GFP	Ad5 mit einer GFP-Insertion anstelle des E1 ORFs, zur Verfügung gestellt von Dr. Wibke Bayer (Morris and Wildner, 2000)
VACV-gfp	rekombinantens VACV-gfp, Stamm Western Reserve, zur Verfügung gestellt von Prof. Ingo Drexler

2.1.13 Oligonukleotide

Tabelle 2.1: Oligonukleotide

Gen	Primer-Sequenz
Kana ctrl1	5'-CAACAAAGCCACGTTGTGTCTC-3'
Kana ctrl2	5'-CCATAGGATGGCAAGATCCTGG-3'
KL-MCMV IE2-1 ¹	5'-GAGAAGCTTATGGAGCGTGTTCGGGGAGC-3'

Kursiv: Restriktionsschnittstellen, ¹: HindIII, ²: EcoRI, ³: BamHI, ⁴: XhoI, Unterstrichen: HA-Epitop-Markierung

Tabelle 2.1: Oligonukleotide (Fortsetzung)

Gen	Primer-Sequenz
KL-MCMV IE2-HA2 ²	5'-CGGAATTCTCAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTACTGAATCTTC- TTCCTGACGGTC-3'
KL-MCMV-IE1-1 ³	5'-GAGGGATCCATGGAGCCCGCCGCACCCAG-3'
KL-MCMV-IE1-1a	5'-ATGGAGCCCGCCGCACCCAG-3'
KL-MCMV-IE1- HA2 ²	5'-CGGAATTCTCAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTACTTCTTGCTC- TTCTTCTTGGGC-3'
M33 R131A 1	5'-CGCTGATCTCGGTGAACGCGTATCGAGTGATCCACC-3'
M33 R131A 2	5'-GGTGGATCACTCGATACGCGTTCACCGAGATCAGCG-3'
M33 R131Q 1	5'-CGCTGATCTCGGTGAACCAGTATCGAGTGATCCACC-3'
M33 R131Q 2	5'-GGTGGATCACTCGATACTGGTTCACCGAGATCAGCG-3'
M33-1 ³	5'-GACGGATCCATGGACGTCTTTTGGGCCGG-3'
M33HA-1	5'-CGGAGCTGCAGAGGTCGGCGAGCGCTCCTCCGCCCCAGTACCCATACG- ATGTTCCAGATTACGCTTGATCGCAGCGCGGCCGAGGATGACGACGA- TAAGTAGGG-3'
M33HA-2 ⁴	5'-GCATCTCGAGTCAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTACTGGGGCG- GAGGAGCGC-3'
M33HA-2	5'-GCGAAAGAGAAGAGAGAGCGGCCCGCGCTGCGATCAAGCGTAA- TCTGGAACATCGTATGGGTACTGGGGCGGAGGAGCGCTCAACCAATTA- ACCAATTCTGATTAG-3'
M33HA-3	5'-CGGAGCTGCAGAGGTCGGCG-3'
M33HA-seq1	5'-TTCCTCGGGCGGGACTTCAA-3'
M33HA-seq2	5'-TGC GCGGTGATGTGTCTCTT-3'
M34-1 ³	5'-GACGGATCCATGGAAACCGCGTCGGC-3'
M34-For In Fusion	5'-TACCGAGCTCGGATCCATGGAAACCGCGTCGGCTTCT-3'
M34_seq-for2	5'-TCGGACGGAGACATCTGGAG-3'
M34HA-1	5'-CCGCCAGAAACATTCTGAGTGCATCAACATCCTGCTCTACCCATACG- ATGTTCCAGATTACGCTTAAGGGGGCGCGGGACGAGGATGACGACGA- TAAGTAGGG-3'
M34HA-2 ²	5'-GACTCGAATTCTTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAGAGCAGG- ATGTTGATGCACTCAG-3'
M34HA-2	5'-CGTGTCTCGACCGTTCCCCTCGTCCCGCGCCCCCTTAAGCGTAATCT- GGAACATCGTATGGGTAGAGCAGGATGTTGATGCACAACCAATTAACC- AATTCTGATTAG-3'
M34HA-3	5'-CCGCCAGAAACATTCTGAG-3'
M34HA-rev In Fusion	5'-GATATCTGCAGAAATTCTTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAGA- GCAGGATGTTGATGCACTCAG-3'
M34HA-seq1	5'-TCGACGCGTTTCACCACCAA-3'
M34HA-seq2	5'-CCCCGATGGATGGGTAAATAATG-3'
UL34-1 ⁴	5'-CCGCTCGAGATGAACTTCATCATCACCACCC-3'
UL34HA-2 ³	5'-CGCGGATCCTTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAAATACACAA- CGGGTTATGGGG-3'

Kursiv: Restriktionsschnittstellen, ¹: HindIII, ²: EcoRI, ³: BamHI, ⁴: XhoI, Unterstrichen: HA-Epitop-Markierung

Tabelle 2.1: Oligonukleotide (Fortsetzung)

Gen	Primer-Sequenz
Universal Kana S rev	5'-CAACCAATTAACCAATTCTGA-3'
Δ M33 ctrl1	5'-GCTGTCGAACCGCATCTATC-3'
Δ M33 ctrl2	5'-GCTTGCCAGTTATGCATTGC-3'
Δ M33-Kana1	5'CGAGCGGACATCGTTAAATACAGCGACTCGCGGAAGTTCTCCGGCGAC- GACCGGCTCGAGCCAGTGAATTCGAGCTCGGTAC-3'
Δ M33-Kana2	5'-AAGGGACGACGACGAGAGGAGAGAAGCGAAAGAGAAGAGAGAGCG- GCCGCCGCGCTGCGAGACCATGATTACGCCAAGCTCC-3'
Δ M34 ctrl1	5'-CAGAGACGCTACTCTGATCGC-3'
Δ M34 ctrl2	5'-GAGGTCTCGGTTCTTCTCCAC-3'
Δ M34-Kana1	5'-CAGCGGTGCTACGCATCACCTCAGACGCCGCGCCGCCACTAACAG- TTTGCTCGCTCGCCAGTGAATTCGAGCTCGGTAC-3'
Δ M34-Kana2	5'-GTGAGGGAGACGGTGTGCGGACGCCGTGTCTCGACCGTTCCCCTCGT- CCC GCGCCCCCGACCATGATTACGCCAAGCTCC-3'

Kursiv: Restriktionsschnittstellen, ¹: HindIII, ²: EcoRI, ³: BamHI, ⁴: XhoI, Unterstrichen: HA-Epitop-Markierung

2.1.14 Antikörper

Tabelle 2.2: Primäre Antikörper

Bezeichnung	Spezies	Hersteller	Produktnr.	Verdünnung	Methode
α -Aktin	Maus	Sigma	A2228	1:5.000, 1:10.000	WB
α -GAPDH	Maus	Santa Cruz	sc-25778	1:10.000	WB
α -gB	Maus	CAPRI Rijeka	15A12-H9	1:2.000	WB
α -HA	Kaninchen	Sigma	H6908.5ml	1:2.000, 1:5.000	WB
α -HA	Maus	Sigma	H3663	1:500	IF
α -MHC-I (H-2Db)	Maus	ebioscience	28-14-8	1:200	FC
Biotin α -MHC-I (H-2Db)	Maus	BD Biosciences	553573	1:200	FC
FITC α -pp89	Maus	CAPRI Rijeka	CROMA101	1:100	WB

WB: Western Blot, IF: Immunfluoreszenz, FC: Durchflusszytometrie

Tabelle 2.3: Sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Spezies	Hersteller	Produktnr.	Verdünnung	Methode
Goat Anti-Mouse POD	Ziege	Dianova*	115-035-062	1:10.000	WB
Goat Anti-Rat POD	Ziege	Dianova*	112-035-003	1:10.000	WB
α -Digoxigenin-AP	Schaf	Roche	11093274910	1:20.000	SB
α -rabbit Cy2	Ziege	Dianova*	111-225-144	1:200	IF
α -rabbit POD	Ziege	Sigma	A6154	1:10.000	WB
Streptavidin FITC	S. avidinii	ebioscience	11-4317-87	1:1000	FC

POD: Peroxidase, AP: Alkalische Phosphatase, Cy: Cyanin-Farbstoff, FITC: Fluorescein, IF: Immunfluoreszenz, SB: Southern Blot, FC: Durchflusszytometrie,*Jackson ImmunoResearch, bezogen über Dianova

2.1.15 Computer-Programme und Datenbanken

Adobe Reader

Apple Fotos

Apple Vorschau

ElabFTW

EMBOSS Needle Alignment

FlowJo

GIMP

GraphPad Prism

ImageJ

Intas GDS

LAS V4.0

MacTeX-2020

Microsoft Office (Excel, PowerPoint, Word)

Nanodrop2000

NCBI BLAST

ProtParam

SnapGene
Subversion
TeXstudio
Visual Studio Code
Zotero

2.2 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen

2.2.1 Zellkultur

Zum Erhalt steriler Bedingungen fanden alle Arbeiten mit eukaryotischen Zellen unter einer Sterilbank (Hera safe, Thermo Scientific) statt. Alle adhärenenten Zellen wurden, soweit nicht anders angegeben, in *Dulbeccos Modified Eagle Medium* (DMEM) (Gibco) mit 10% [v/v] hitze-inaktiviertem *fetal bovine serum* (FBS) (Biochrom), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Gibco) sowie 20 µg/ml Ciprofloxacin (MP Biomedicals) kultiviert. Die konstante Inkubation aller Zellen bei 37°C und 5% CO₂ wurde durch die Zellkulturinkubatoren CB150 E3 gewährleistet. Für die Passagierung adhärenenten Zellen wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit 37°C warmen *phosphate buffered saline* (PBS) gewaschen. Die Zellen wurden durch anschließende kurze Inkubation mit Trypsin (0,05% [w/v] in PBS, Gibco) vom Boden der Zellkulturflasche gelöst und in frischem Medium resuspendiert. Je nach gewünschter Verdünnung wurde ein Teil der Zellsuspension in ein neues Zellkulturgefäß überführt und mit frischem Medium auf das entsprechende Endvolumen aufgefüllt.

2.2.2 Kryokonservierung eukaryotischer Zellen

Für eine Einlagerung von eukaryotischen Zellen wurden diese wie unter Kapitel 2.2.1 beschrieben vom Boden des Kulturgefäßes gelöst, in frischem Zellkulturmedium aufgenommen und für 3 min je nach Zell-Linie bei 800 bis 1200 *rounds per minute* (rpm) (Rotanta 460 R, Hettich, oder Allegra X-15R, Beckman Coulter) pelletiert. Fibroblasten wurden in Einfriermedium aus 50% FBS [v/v], 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) [v/v] und 40% Zellkulturmedium [v/v] aufgenommen, primäre Zellen (MEF, *mouse newborn cells* (MNC)) wurden in 90% FBS [v/v] mit 10% DMSO [v/v] resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zu jeweils 1 ml pro Kryoröhrchen in einem Einfrierbehälter bei -80°C gelagert und darin pro Minute um 1°C abgekühlt und folglich langsam

eingefroren. Für die langfristige Lagerung wurden die Kryoröhrchen in einen Stickstofftank überführt.

Um in einem Stickstofftank gelagerte Zellen aufzutauen, wurden diese zügig in Zellkulturmedium aufgetaut und 3 min bei 1200 rpm (Rotanta 460 R, Hettich oder Allegra X-15R, Beckman Coulter) zentrifugiert. Das Pellet wurde in frischem Kulturmedium resuspendiert, in ein Zellkulturgefäß überführt und bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert (CB150 E3, Binder). Nach einem Tag wurde je nach Konfluenz ein Mediumwechsel vorgenommen oder die Zellen passagiert und 20 µg/ml Ciprofloxacin sowie gegebenenfalls benötigte Selektionsantibiotika zugegeben.

2.2.3 Transfektion mit Polyethylenimin

Die transiente Transfektion adhärenter Zellen erfolgte bei einer Konfluenz von etwa 70 bis 80% mit Polyethylenimin (PEI, Stocklösung 1 µg/µl). Dazu wurden 3 µg PEI pro 1 µg DNA eingesetzt. Entsprechend des Formats der Zellkulturgefäße wurden die Mengen der Plasmid-DNA und PEI-Transfektionslösung angepasst (Tab. 2.4) und zusammen für 20 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Währenddessen wurde ein Mediumwechsel der zu transfizierenden Zellen vorgenommen. Nach der Inkubationszeit wurden die Transfektionsansätze tröpfchenweise auf die Zellen pipettiert und für 18 bis 24 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Tabelle 2.4: Transfektionsansätze

	6-well-Platte	12-well-Platte	48-well-Platte *	96-well-Platte **
DNA	2 µg	1,5 µg	1,5 µg [#]	0,5 - 1 µg [#]
in DMEM	50 µl DMEM	25 µl DMEM	17 µl DMEM	12,5 µl
Polyethylenimin	6 µl PEI	4,5 µl PEI	4,5 µl PEI	3 µl PEI
in DMEM	50 µl DMEM	25 µl DMEM	17 µl DMEM	12,5 µl DMEM ***

* Master Mix für 2 wells inkl. Pipettierreserve

** Master Mix für 7 wells inkl. Pipettierreserve

*** Nach der Inkubationszeit auf 70 µl Gesamtvolumen aufgefüllt

Soweit nicht anders angegeben

2.2.4 Transfektion mit SuperFect

Die transiente Transfektion mittels SuperFect erfolgte für die Immunfluoreszenzmikroskopie bei einer Konfluenz von etwa 50%, für die Rekonstitution von Viren aus BAC-DNA bei etwa

70%. Dazu wurden die Transfektionsansätze abhängig von den benutzten Zellkulturplatten und Zellzahlen gemäß des Herstellerprotokolls vorbereitet und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Die dem Herstellerprotokoll entsprechende Menge Medium wurde zu den Transfektionsansätzen pipettiert und anschließend tröpfchenweise auf die Zellen gegeben. Für die Virus-Rekonstitution wurde zwei bis drei Stunden nach der Transfektion ein Mediumwechsel durchgeführt. Alle Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

2.2.5 Luziferase-Reportergen-Assay

Zur Analyse verschiedener Signaltransduktionswege wurden Luziferase-Reportergen-Assays durchgeführt. Dazu wurden HeLa-Zellen in 48-*well*-Platten oder 96-*well*-Platten ausgelegt und am nächsten Tag mit dem Reporterplasmid (pGAS-Luc oder pEF1-Luc) sowie einem der zu testenden Expressionsplasmide kotransfiziert (2.2.3). Als Vektorkontrolle wurde der entsprechende Leervektor pcDNA3.1 verwendet. Bei der Nutzung von 48-*well*-Platten wurde jede Transfektionsbedingung in drei unabhängigen Ansätzen vorbereitet. Aus diesen einzelnen Transfektionsansätzen wurde jeweils ein *well* der Triplikate für eine Induktion der Signaltransduktion sowie ein *well* der Triplikate ohne Induktion transfiziert. Für Luziferase-Reportergen-Assays im 96-*well*-Format wurde ein Master Mix pro Transfektionsbedingung vorbereitet und auf 6 *wells* aufgeteilt, aus denen jeweils drei induziert wurden und drei als nicht-induzierte Kontrolle dienten.

Am Tag nach der Transfektion wurden die Zellen für 6 h mit 250 U/ml IFN γ induziert oder als nicht-induzierte Kontrolle (w/o) inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde das Medium abgesaugt. In 48-*well*-Platten wurde jedes *well* mit 200 μ l Luc Lyse Puffer (s. Kap. 2.1.3) lysiert. Für das 96-*well*-Plattenformat wurden 80 μ l pro *well* verwendet. Alle Platten wurden bei -20°C eingefroren und gelagert. Für die Messung wurden die Platten aufgetaut. Die Zellsuspension aus den 48-*well*-Platten wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und für 2 min bei 13.500 rpm zentrifugiert (5427 R, Eppendorf). Die Zellsuspension aus den 96-*well*-Platten wurden in *v-bottom*-Platten transferiert und diese bei 4000 rpm für 5 min zentrifugiert (Allegra X-15R, Beckman Coulter). Anschließend wurden jeweils 50 μ l der Überstände in eine weiße 96-*well*-Platte überführt (LumiNunc F96, Nunc). Die Luziferase-Aktivität wurde bei einer Wellenlänge von 255 nm gemessen (Mithras² LB 943 Multimode Reader, Berthold Technologies). Für die Messung wurde mit einem Auto-Injektor ein Substratvolumen von 50 μ l pro *well* injiziert (Beetle-Juice, PJK) und die Lumineszenz nach einer Messverzögerung von 1,5 s für eine Dauer von 5,0 s gemessen.

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Herstellung von Gesamtzell-Lysaten

Zur Herstellung von Gesamtzelllysaten für Westen Blots wurden die Zellen vom Boden der *wells* gespült oder mittels eines Zellschabers abgelöst und im Kulturmedium in 1,5-ml-Reaktionsgefäße oder 15 ml *Falcons* überführt. Die Zellen wurden je nach benutzten Röhrchen für 3 min bei 3500 rpm (5417 R, Eppendorf) oder bei 1200 rpm (Allegra X-15 R, Beckman Coulter) pelletiert und die Zellpellets zweimal in 1 ml PBS gewaschen (2 min, 3500 rpm, 5417 R, Eppendorf). Abhängig vom geplanten Verwendungszweck und der vorherigen Konfluenz wurden die Zellen in 80 bis 200 µl Lysepuffer (s. Kap. 2.1.3) lysiert und bei -20°C gelagert. Vor einer Weiterverwendung der gefrorenen Lysate wurden diese aufgetaut, für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert (5417 R, Eppendorf) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Lysate wurden abhängig vom jeweiligen Experiment direkt mit 4x Western-Blot-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C im Heizblock (ThermoStat plus, Eppendorf) denaturiert oder zuvor per Bradford-Assay in ihrer Proteinmenge angeglichen (siehe Kap. 2.3.2).

2.3.2 Bradford Assay

Für die Angleichung der Gesamtproteinmenge in Zell-Lysaten wurden 3 oder 5 µl der Lysat-Überstände in 997 oder 995 µl Bradford-Reagenz verdünnt und bei einer Wellenlänge von 595 nm photometrisch gemessen (Nanodrop2000, Thermo Scientific). Die Lysate wurden entsprechend der gemessenen optischen Dichte durch eine Verdünnung im entsprechenden Lysepuffer an das Lysat mit der niedrigsten Proteinmenge angeglichen und die Normalisierung der Lysate nach dem Blotten des SDS-Gels anhand einer Ponceau S Färbung der Membran überprüft.

2.3.3 Natriumdodecylacetat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen aus Lysaten und Immunopräzipitationen nach ihrer Molekülmasse erfolgte mittels diskontinuierlicher *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE). Die verwendeten Sammel- und Trenngele wurden entsprechend Tabelle 2.5 gegossen:

Tabelle 2.5: Zusammensetzungen der SDS-Polyacrylamidgele

	Trenngel 8%		Trenngel 10%		Sammelgel	
	S	ExW	S	ExW	S	ExW
30% Polyacrylamid [ml]	1,6	3,2	2	4	0,5	1,0
2 M Tris/HCl (pH 8.8) [ml]	1,25	2,5	1,25	2,5	-	-
0,5 M Tris/HCl (pH 6.8) [ml]	-	-	-	-	0,4	0,8
20% (w/v) SDS [μ l]	30	60	30	60	15	30
60% (w/v) Saccharose [ml]	-	-	-	-	0,8	1,4
dH ₂ O [ml]	3,05	6,1	2,65	5,3	1,4	2,8
TEMED [μ l]	6	12	6	12	4	8
10% (w/v) APS [μ l]	36	72	36	72	20	40
12 V, mA	20	40	20	40		
Laufzeit [h]	1 h	2 h	1 h	2 h		

Die Lysate wurden gegebenenfalls mittels Bradford-Messung angeglichen und in Western-Blot-Probenpuffer denaturiert (95°C für 5 min). Nach einer kurzen Zentrifugation (1 min, 10000 rpm, 5415 D, Eppendorf) wurden die Proben auf das Polyacrylamidgel aufgetragen.

2.3.4 Western Blot

Mithilfe des *semi-dry*-Blotverfahren wurden die aufgetrennten Proteine aus einem *sodium dodecyl sulfate* (SDS)-Gel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (*PerfectBlue Semi-Dry*-Elektroblotter, Peqlab). Dazu wurde das SDS-Gel auf einen zuvor mit dem *Semi-Dry-Blot*-Puffer äquilibrierten Stapel aus drei Blättern Whatman-Papier und einer Nitrozellulosemembran gelegt. Der Stapel wurde mit drei weiteren äquilibrierten Schichten Whatman-Papier bedeckt. Der Proteintransfer erfolgte bei 12 bis 14 V und max. 2000 mA für 60 bis 85 min, abhängig von der Größe des SDS-Gels. Zur optischen Beurteilung des Proteintransfers und der Proteinmengen angeglicherer Lysate wurde eine reversible Färbung der Proteine mit Ponceau S vorgenommen. Die Entfärbung der Membran erfolgte durch Waschen mit *Tris-buffered saline with Tween20* (TBST).

Zur Detektion der Proteine wurde die Membran mindestens 60 min bei RT auf dem Wiegeschüttler oder über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper inkubiert. Die verwendeten Antikörper (Tab. 2.2) wurden in 0,5% [w/v] Milchpulverlösung verdünnt. Anschließend wurde die Membran für 5 min in TBST gewaschen und mit einem Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper

(Tab. 2.3) mindestens 45 min bei RT inkubiert. Vor der Detektion der Zielproteine wurden ungebundene Antikörper durch dreimaliges Waschen mit TBST entfernt. Die Visualisierung der Proteine erfolgte mittels *SignalFire ECL Reagent* (Cell Signaling) auf den Fotofilmen Hyperfilme ECL (GE Healthcare) oder Fuji *medical X-Ray Film* (Fujifilm). Zur Beurteilung der Molekulargewichte wurde ein Größenstandard (Color Protein Standard, New England Biolabs) verwendet. Für Detektionen weiterer Proteine wurde die Membran kurz in TBST und anschließend in H₂O gewaschen und wenige Minuten mit *Reblot Plus Strong Solution* (Millipore) inkubiert. Nach dem Waschen in TBST wurde die Membran erneut geblockt und mit Primär- und Sekundärantikörpern inkubiert.

2.3.5 Immunfluoreszenzmikroskopie

Transfizierte HeLa-Zellen (s. Kap. 2.2.3) oder infizierte *crysis immortalized MEF* (CIM)-Zellen (s. Kap. 2.6.1) wurden mit PBS gewaschen und mit 4% (v/v) Paraformaldehyd (PFA) in PBS für 20 min bei RT fixiert. Zwischen allen folgenden Inkubationen wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden für 5 min mit 0,02% [w/v] Triton X-100 in PBS für 15 min permeabilisiert und unspezifische Bindestellen mit 2% FBS oder naivem Mausserum [v/v] in PBS für 20 min geblockt. Der Primärantikörper (α -HA, Spezies Kaninchen) wurde 1:500 in 0,2% Blockierungslösung verdünnt und für mindestens 1 h inkubiert. Der sekundäre Antikörper α -rabbit-Cy2 wurde nach dreimaligem Waschen für mindestens 45 min abgedunkelt inkubiert (1:500 in 0,2% Blockierungslösung). Für eine vergleichende Kernfärbung wurde die DNA der Zellen 5 min mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) angefärbt und abschließend mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden im Fluoreszenzmikroskop in 40-facher Vergrößerung mikroskopiert (Leica DM IL LED, Software LAS V4.0). Für die Bildbearbeitung wurden die Programme ImageJ und GIMP benutzt.

2.3.6 IgG-Enzyme-linked Immunosorbent Assay (IgG-ELISA)

Für die Generierung von infizierten Zell-Proteinlysaten wurden CIM-Zellen mit MCMV infiziert, nach 72 h pelletiert und zweimal mit PBS gewaschen (Allegra X-15R, Beckman Coulter). Das Pellet wurde anschließend in 1 ml PBS mit 30 μ l Complete Protease Inhibitors Cocktail (Roche) pro 1,5 ml Reaktionsgefäß resuspendiert und bei 4 °C pelletiert (13000 rpm, 5417 R, Eppendorf). Pellets wurden in PBS mit einer Menge von etwa $1 \cdot 10^6$ Zellen pro 100 μ l aufgenommen und 3 mal für 10 Sekunden sonifiziert (Branson Sonifier 450, Sonorex). Die Lysate wurden anschließend in

Aliquots von 200 µl bei -20°C gelagert.

MaxiSorp Surface NUNC Platten wurden mit etwa $2 \cdot 10^6$ lysierten Zellen oder $2 \cdot 10^7$ PFU MCMV Virionen aus einem gereinigten Virusstock in einem Volumen von 50 µl pro *well* in ELISA Binding Puffer (0,1 M Na₂HPO₄, pH 9,0) beschichtet und über Nacht bei 4°C gelagert. Am Folgetag wurde die Flüssigkeit verworfen und die Platten mit 100 µl pro *well* (10% (v/v) FBS in PBS) für 1 h bei RT geblockt. Nach zwei Waschschrritten mit PBS mit 0,1% (v/v) Tween 20 (PBS-T) wurden Serumproben und naive Kontrollseren in ELISA Proben Puffer (PBS-T mit 10% FBS) verdünnt (1/50, 1/250, 1/1250, 1/6250, 1/31.250, 1/156.250) und 50 µl pro Serumprobe in Triplikaten beschichtet. Nach mindestens 1,5 h Inkubation wurden die Platten dreimal gewaschen (PBS-T) und 50 µl des Sekundärantikörpers goat anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratory) pro *well* in ELISA Probenpuffer (1:5000) für mindestens 1 h inkubiert.

Die Platten wurden erneut vier mal mit PBS-T gewaschen. Für die Farbentwicklung wurden 50 µl/well 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) Substrat (Thermo Scientific) inkubiert, bis eine beginnende blaue Färbung der naiven Kontrollproben erkennbar wurde. Die Reaktion wurde mit 1 M H₂SO₄ (50 µl/well) gestoppt und die Platten bei 450/620 nm im Mithras² LB 943 Multimode Reader (Berthold Technologies) gemessen.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Agarose-Gelelektrophorese und DNA-Gelextraktion

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Aufreinigung von DNA-Molekülen nach Amplifizierung mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) oder nach Restriktionen sowie zur Bilddokumentation von PCR-Kontrollen während der BAC-Mutagenese durchgeführt. Die Größenbeurteilung der DNA-Fragmente wurde anhand eines Abgleichs mit einem Größenstandard (Gene Ruler DNA Ladder Mix, Thermo Scientific) vorgenommen. Es wurden 1 bis 2%-ige [w/v] Agarosegele gegossen (Agarose, Roth, in 1x TBE-Puffer) und für eine Anfärbung der DNA mit dem Marker DNA Stain Clear G (Serva) versetzt. Die Elektrophorese wurde je nach Größe der Gelkammer mit 120 V oder 140 V bei 400 mA durchgeführt. Für eine Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde die entsprechende Bande am UV-Geltisch ausgeschnitten und mit dem *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit* (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben extrahiert. Die DNA wurde mit 25 bis 50 µl autoklaviertem ddH₂O eluiert.

2.4.2 Polymerase-Kettenreaktion

Mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden DNA-Sequenzen spezifisch amplifiziert (TPProfessional TRIO Thermocycler, Biometra). Der zu amplifizierende Bereich wurde für jede PCR durch die Generierung entsprechender Primer spezifisch festgelegt. Zusätzlich zu den erforderlichen komplementären Basen enthielten die Primer weitere Sequenzen wie Kodierungssequenzen (CDS) für Epitop-Markierungen oder Schnittstellen für Restriktionsenzyme (s. Kap. 2.1.13). Abhängig von den verschiedenen Primereigenschaften und den durchgeführten Methoden wurde die PCR-Programme den einzelnen Reaktionen angepasst.

2.4.3 Quick Change Mutagenese

Zur Generierung von gezielten Punktmutationen in Expressionsvektoren mittels PCR wurde das *QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit* (Agilent Technologies) verwendet. Mittels gezielter *mismatches* in den an der Mutationsstelle bindenden Primern wurden einzelne Basen in der PCR-Reaktion ausgetauscht und das gesamte Expressionsplasmid amplifiziert (s. Kap. 2.1.13). Nach einer anschließenden DpnI-Restriktion des Reaktionsprodukts zur Entfernung der Template-DNA wurden 50 µl chemisch kompetente XL1 blue oder DH10B mit 5 µl der PCR-Reaktion transformiert.

2.4.4 Restriktionsspaltung

Zur Klonierung von Kodierungssequenzen der gewünschten Gene in einen Expressionsvektor wurden die DNA-Fragmente mittels Restriktionsendonukleasen gespalten. Es wurden entweder die PCR-amplifizierte DNA an den inserierten Restriktionsschnittstellen gespalten oder die entsprechenden DNA-Fragmente aus einem vorliegenden Expressionsvektor oder Zwischenvektor ausgeschnitten. Dazu wurden die PCR-Produkte oder das Ausgangskonstrukt und der Zielvektor mit den Restriktionsendonukleasen gemäß der Herstellerangaben zu den Restriktionsenzymen (New England Biolabs) bei 37°C inkubiert. Zur Vermeidung einer Religation der linearisierten Zielvektoren wurden diese anschließend mit *Calf intestine phosphatase* (CIP, New England Biolabs) für 1 h bei 37 °C an ihrem 3'-Ende dephosphoryliert.

2.4.5 Ligation

Die mittels Restriktionsendonukleasen gespaltenen DNA-Inserts und Expressionsvektoren wurden durch eine Verwendung der T4-DNA-Ligase kovalent verknüpft. Alle Ligationen wurden nach Herstellerprotokoll über Nacht bei 16°C durchgeführt. Für Klonierungen von größeren oder anderweitig schwer zu klonierenden Fragmenten wurde eine Ligation mit einem Zwischenvektor durchgeführt. Mit dem *NEB PCR Cloning Kit* (New England Biolabs) wurden PCR-Produkte mit *blunt end* nach den Angaben des Herstellers direkt in den pMiniT-Vektor ligiert.

2.4.6 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*

100 ml *lysogeny broth* (LB)-Medium wurden mit einer Übernachtskultur (XL1 Blue oder DH10B) angeimpft und bei 37°C inkubiert, bis eine Optische Dichte (OD) von 0,4 bis 0,5 (Wellenlänge 600 nm) erreicht wurde. Die Bakterien wurden für 10 min bei 4000 rpm pelletiert (Allegra X-15R, Beckman Coulter). Das Pellet wurde in 50 ml 0,1 M MgCl₂ resuspendiert, für 10 min bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert (Allegra X-15R, Beckman Coulter) und auf Eis in 50 ml 0,05 M CaCl₂ aufgenommen. Die Zellen wurden erneut pelletiert (10 min, 4000 rpm, 4°C, Allegra X-15R, Beckman Coulter), anschließend in 2 ml 0,05 M CaCl₂ in 15% Glycerol resuspendiert und auf Eis inkubiert. Nach 20 min wurde die Bakteriensuspension als 50 µl und 100 µl Aliquots bei -80°C eingefroren.

2.4.7 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*

Chemisch kompetente Bakterien (XL1 Blue oder DH10B) wurden auf Eis aufgetaut, die zu transformierende DNA hinzugefügt (1-5 µl Plasmid-DNA oder 10 µl einer Ligationsreaktion) und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde ein Hitzeschock für 60 s bei 42°C durchgeführt (Thermomixer Comfort, Eppendorf) und die Bakterien im Eisbad mit 1 ml LB-Medium versetzt. Die Bakterien wurden für 1 h bei 37°C und 750 rpm (Thermomixer Comfort, Eppendorf) inkubiert und anschließend für 5 min bei 6500 rpm (5415 D, Eppendorf) zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden in wenig verbliebenem Überstand resuspendiert und auf Agarplatten ausplattiert. Die benutzten Agarplatten enthielten für die Selektion verschiedene Antibiotika entsprechend der transfizierten DNA. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C (Incubat, Melag) wurden angewachsene Kolonien mit sterilen Pipettenspitzen von den Agarplatten gepickt und Kulturen für DNA-Präparationen angeimpft.

2.4.8 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*

Kulturen aus 10 ml LB-Medium mit Chloramphenicol (25 µg/ml) wurden mit GS1783 oder DH10B *E. coli* angeimpft und bei 150 rpm über Nacht inkubiert (Thermomixer Comfort, Eppendorf). Alle Inkubationschritte erfolgten für GS1783 bei 32°C und für DH10B bei 37°C. Mit 1 bis 10 ml der Vorkulturen wurden 150 ml LB-Medium (mit Chloramphenicol, 25 µg/ml) angeimpft und bei 32°C oder 37°C und 150 rpm (Max Q6000, Thermo Scientific) bis zu einer OD von 0,5 bis 0,7 (Wellenlänge 600 nm) inkubiert (Bio Photometer plus, Eppendorf). GS1783-Kulturen wurden bei 42°C im Wasserbad für 15 min geschwenkt, auf 50 ml Falcon Röhren aufgeteilt und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien für 4 min bei 3724 g und 4°C (Sigma 4-16K) pelletiert und der Überstand verworfen. Die Pellets wurden zweimal durch resuspendieren in 50 ml kaltem 10% Glycerol (v/v) und Zentrifugation (4 min, 3724 g bei 4°C) gewaschen und anschließend in 1,5 ml kaltem 10% Glycerol (v/v) aufgenommen. Ein Teil der Bakterien wurde direkt für Transformationen verwendet und der Rest in Aliquots zu je 75 µl bei -80°C eingefroren.

2.4.9 Transformation elektrokompetenter *E. coli*

Elektrokompetente GS1783 oder DH10B *E. coli* wurden auf Eis aufgetaut und 75 µl pro Transformation in eine Küvette (Gene Pulser/MicroPulse Electroporation Cuvettes, Bio-Rad) pipettiert. Von der zu transformierenden DNA (BAC-DNA oder eine gewünschte Rekombinationskassette) wurden 10 bis 15 µl zugegeben und die Bakterien bei 2,5 kV, 25 µF und 200 Ω elektroporiert (Gene Pulser X Cell, Bio-Rad). Die Bakterien wurden zügig in 1 ml LB Medium aufgenommen, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für etwa 1,5 h bei 32°C (GS1783) oder 37°C (DH10B) und 750 rpm inkubiert (Thermomixer Comfort, Eppendorf). Die Bakterien wurden für 5 min bei 6500 rpm zentrifugiert (5415 D, Eppendorf), der Überstand abgekippt und die pelletierten Bakterien im verbliebenen Überstandrest auf Agarplatten mit Chloramphenicol (25 µg/ml) und gegebenenfalls Kanamycin (50 µg/ml für Rekombinationskassetten) ausplattiert. Nach ein bis zwei Tagen Inkubation bei 32°C oder 37°C (Inkubat, Melag) wurden angewachsene Kolonien mit einer sterilen Pipettenspitze von der Agarplatte abgenommen und in einer Vorkultur mit 1 ml LB-Medium und den benötigten Antibiotika (Chloramphenicol, 25 µg/ml, ggf. Kanamycin, 50 µg/ml) bei 32°C oder 37°C und 750 rpm über Nacht inkubiert (Thermomixer Comfort, Eppendorf). Am nächsten Tag wurden angewachsene Vorkulturen zum Animpfen von 10 ml Übernachtskulturen verwendet (32°C oder 37°C, 150 rpm, Max Q6000, Thermo Scientific). Die Kulturen wurden am Folgetag für 10 min bei 4000 rpm (Allegra X-15 R, Beckman Coulter) pelletiert und die BAC-DNA wie in Kapitel 2.4.10 beschrieben präpariert.

2.4.10 DNA-Minipräparation

E. coli-Vorkulturen in 1 ml LB-Medium mit entsprechenden Selektions-Antibiotika wurden aus einem Glycerolstock oder aus Kolonien von einer Agarplatte angeimpft und abhängig vom verwendeten Bakterienstamm bei 32°C oder 37°C und 750 rpm inkubiert (Thermomixer Comfort, Eppendorf). Mit 100 µl dieser Vorkulturen wurden 4 bis 10 ml Übernachtkulturen angeimpft und über Nacht bei 32 oder 37°C und 150 rpm inkubiert (Max Q6000, Thermo Scientific). Am nächsten Tag wurden die Kulturen je nach Kulturvolumen und verwendeten Kulturröhrchen pelletiert: Kleinere Volumina wurden in 2-ml Reaktionsgefäße überführt und pelletiert (13000 rpm, 2 min, 5417 R, Eppendorf). Die Pellets wurden in 300 µl P1-Puffer resuspendiert und durch Zugabe von 300 µl P2-Puffer und mehrmaligem Invertieren lysiert. Größere Kulturen für die BAC-DNA-Präparation wurden im 15-ml Falcon zentrifugiert (4000 rpm, 10 min, Allegra X-15 R, Beckman Coulter), in 300 µl P1-Puffer resuspendiert und für die Lyse mit 300 µl P2-Puffer in die 2-ml Reaktionsgefäße überführt. Nach 5 min wurde die Lyse mit 300 µl P3-Puffer gestoppt und die Proben für 20 min bei 13500 rpm zentrifugiert (5417 R, Eppendorf). Die Überstände wurden in ein neues 1,5-ml Reaktionsgefäß mit 650 µl Isopropanol pipettiert, für mindestens 30 min bei -20°C inkubiert und anschließend 30 min zentrifugiert (4°C, 13500 rpm, 5417 R, Eppendorf). Die Überstände wurden verworfen und die DNA-Pellets durch Zentrifugation in 600 µl Ethanol (70% [v/v]) für 10 min bei 13000 rpm und 4°C gewaschen (5417 R, Eppendorf). Die Überstände wurden durch Absaugen entfernt und die DNA bei RT für einige Stunden getrocknet. Anschließend wurde die DNA in 30 bis 50 µl ddH₂O resuspendiert und die Reinheit und DNA-Konzentration von Plasmid-DNA-Präparationen bestimmt (NanoDrop2000, Thermo Scientific).

2.4.11 BAC-DNA-Präparation

Die Aufreinigung von BAC-DNA erfolgte wie für DNA-Minipräparationen beschrieben (s. Kap. 2.4.10). Davon abweichend wurde ein höheres Kulturvolumen von 10 ml LB-Medium verwendet und die Kulturen im ersten Schritt bei 4000 rpm (Allegra X-15 R, Beckman Coulter) für 10 min pelletiert. Für eine größere DNA-Ausbeute oder bessere Reinheit wurde das *NucleoBond PC100 Kit* (Macherey Nagel) nach Herstellerangaben verwendet.

2.4.12 Southern Blot

Für die Extraktion viraler DNA aus infizierten Zellen wurden Proteinase und Lysepuffer des *SampleIN Direct PCR Kit* (high Qu) nach Herstellerangaben verwendet. Je nach Menge der Zellen und Infektionsgrad wurden die Extrakte unverdünnt oder 1:5 verdünnt verwendet.

Die extrahierte zelluläre und virale DNA oder präparierte BAC-DNA (s. Kap. 2.4.11) wurde mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* bei 37°C über Nacht gespalten und mittels Agarosegel-Elektrophorese (0,6% Agarose [w/v] in 0,5x TBE) bei 90 V und 400 mA für 90 min aufgetrennt (s. Kap. 2.4.1). Die Auftrennung der DNA wurde anhand einer Überprüfung der Banden unter Ultraviolettstrahlung (UV) Licht kontrolliert und dokumentiert (GeneGenius Gel Imaging System, Syngene). Das Agarosegel wurde in 250 mM HCl-Lösung für 20 bis 30 min inkubiert und anschließend dreimal mit ddH₂O gewaschen, einmal kurz mit *southern blot* (SB)-Denaturierungslösung gespült und dann darin für 30 min inkubiert. Nach erneutem dreimaligem waschen in ddH₂O wurde die Membran mit SB-Neutralisationspuffer einmal kurz und dann für 30 min inkubiert. Vor dem Transfer der DNA auf eine Nylonmembran (Roche) wurde das Gel noch dreimal mit ddH₂O gewaschen und in 20xSSC gelagert.

Für den Kapillarblot wurde die Membran in 20xSSC Nylonmembran äquilibriert. In einem Turbo Blotter (GE Healthcare) wurden Zellstoff, drei trockene Blätter Whatman-Papier und ein mit 20xSSC angefeuchtetes Whatman-Papier gestapelt und die Nylonmembran darauf gelegt. Das Agarosegel wurde mit 20xSSC gewaschen, auf dem Stapel platziert und mit drei Schichten befeuchteten Whatman-Papiers bedeckt. Eine in 20xSSC eingeweichte Whatman-Papier-Brücke wurde als Verbindung zwischen dem Blotstapel und einem 20xSSC-Reservoir aufgelegt, und die DNA durch die Kapillarwirkung aus dem Agarosegel auf die Membran über Nacht transferiert.

Am nächsten Tag wurde die transferierte DNA durch UV-Licht (0,150 J/cm², MWG-Biotech) mit der Membran kovalent verlinkt. Diese wurde mit ddH₂O gewaschen und mit Digoxigenin (DIG) EASY Hyb Lösung (Roche) mindestens 1 h bei 42°C im Hybridisierungsöfen (OV 3, Biometra) prähybridisiert. Die DIG-markierte Sonde wurde für 10 min im Wasserbad aufgekocht, auf Eis 5 min abgekühlt und die Membran damit über Nacht bei 42°C hybridisiert.

Am nächsten Tag wurde die Membran jeweils für 5 min mit Waschpuffer 1 und für 20 min bei 68 °C mit Waschpuffer 2 gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit ddH₂O mit Maleinsäurepuffer gewaschen und für mindestens 30 min mit DIG Blocking Lösung (Roche) geblockt. Der α -DIG-Alkalische Phosphatase (AP) Antikörper (1:20.000 in Blocking Lösung, Roche) wurde für mindestens 30 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Maleinsäurepuffer

wurde die Membran 5 min in AP Puffer inkubiert, kurz mit Whatman Papier getrocknet und für 2 bis 5 min in CDP-Star Substrat (1:100, Roche) inkubiert. Die Detektion der Signale erfolgte auf Fotofilm (Fuji medical X-Ray Film, Fujifilm) oder Hyperfilm (ECL, GE Healthcare).

Im Falle einer erneuten Detektion mit einer weiteren Sonde wurde die Membran nach kurzem waschen mit ddH₂O für 15 min bei 42°C mit Stripping-Lösung inkubiert und anschließend mit 2xSSC und ddH₂O gewaschen. Die Prähybridsierung und weiteren Inkubation erfolgten wie oben beschrieben.

2.4.13 Synthese DIG-markierter Sonden

Für die spezifische Detektion von DNA in Southern Blots wurden mit *DIG*-markierten dNTPs (Roche) DIG-markierte Sonden synthetisiert. Basierend auf entsprechenden Expressionsvektoren als Templates wurden PCR gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt und die PCR-Produkte mit dem *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit* (Macherey-Nagel) aufgereinigt. Die generierten Sonden wurden in 20 bis 25 ml DIG EASY Hyb Lösung (Roche) gelöst und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

2.5 BAC Mutagenese

Für die Generierung rekombinanter MCMV-Mutanten werden *bacterial artificial chromosome* (BAC) verwendet. Als Plasmide mit hoher Aufnahmekapazität von mehreren hundert Basenpaaren ermöglichen BACs die Mutagenese des großen CMV Genoms in *E. coli* mit molekularbiologischen Methoden. MCMV-BACs wurden mittels Integration einer BAC-Kassette in das Virusgenom generiert. Zusätzlich zum Resistenzgen Chloramphenicol für eine Selektion enthält die BAC-Kassette alle für eine Replikation in *E. coli* benötigten Elemente (Messerle *et al.*, 1997). Durch identische Abschnitte vor und nach der BAC-Kassette geht diese nach der Rekonstitution und einigen Passagen in eukaryotischen Zellen verloren (Wagner *et al.*, 1999). Für diese Arbeit wurde ein MCMV-BAC verwendet, in dem eine im Ursprungs-BAC (pSM3fr) vorliegende Mutation des Gens MCK-2 repariert wurde (Jordan *et al.*, 2011).

2.5.1 Insertion einer HA-Epitop-Markierung mittels *en passant*

Mutagenese

Im vorliegenden MCMV-*bacterial artificial chromosome* (BAC) sollten die *coding sequence* (CDS) von *M33* und *M34* mit einer HA-Markierung versehen werden. Dazu wurde die *en passant* Mutagenese nach Tischer durchgeführt (Tischer *et al.*, 2010; Tischer *et al.*, 2006).

2.5.1.1 Generierung von HA-Epitop-Rekombinationskassetten mittels PCR

Die Rekombinationskassetten für eine Insertion von HA-Epitop-Sequenzen wurden durch zwei PCR mit dem *AmpliTaq DNA Polymerase Kit* (Roche) generiert. Für die erste PCR wurde das Plasmid Kana S als Template verwendet, um die Sequenz für den Selektionsmarker Kanamycin und eine *I-SceI*-Schnittstelle zu amplifizieren und mittels eines entsprechend konzipierten Primers die HA-Epitop-Kodierungssequenz sowie einen zur viralen Sequenz homologen Bereich anzufügen. Die methylierte Plasmid-DNA des Templates wurde anschließend mittels *DpnI*-Restriktionsspaltung gespalten und das PCR-Produkt durch Agarosegel-Extraktion (*NucleoSpin Gel and PCR-Clean-up Kit*, Macherey-Nagel) extrahiert. Dieses erste PCR-Produkt diente als Template für die zweite PCR, durch die der homologe Sequenzbereich mit der HA-Epitopsequenz erneut amplifiziert wurde, sodass der Kanamycin Selektionsmarker von den Duplikaten flankiert wurde (Tischer *et al.*, 2006).

2.5.1.2 Erste homologe Rekombination zur Insertion einer HA-Epitop-Rekombinationskassette

Von der aufgereinigten Rekombinationskassette (s. Kap. 2.4.1) wurden 10 μ l durch Elektroporation in elektrokompetente GS1783 *E. coli* eingebracht (s. Kap. 2.4.9). Durch das in den Bakterien induzierte Red $\alpha\beta$ -Rekombinationsystem erfolgte eine homologe Rekombination der Rekombinationskassette in das MCMV-BAC (Tischer *et al.*, 2010; Tischer *et al.*, 2006). Nach einer positiven Selektion auf Chloramphenicol- und Kanamycin-haltigen Agarplatten bei 32°C wurden mittels PCR- oder Southern Blot-Kontrollen (s. Kap. 2.4.12) geeignete Klone mit integrierter Rekombinationskassette für die zweite Rekombination ausgewählt.

2.5.1.3 Zweite homologe Rekombination zur Entfernung eines Selektionsmarkers

Mittels einer zweiten homologen Rekombination in GS1783-*E. coli* wurde das Kanamycin-Resistenzgen aus dem BAC entfernt. Dazu wurde die Expression des Restriktionsenzym I-*SceI* induziert. Eine Kultur aus 1 ml LB-Medium (Chloramphenicol, 25 µg/ml) wurde mit etwa 100 µl einer Übernachtskultur angeimpft und bei 32°C und 750 rpm inkubiert. Nach 2 h wurden der Kultur 2 ml LB-Medium mit Chloramphenicol und 1% Arabinose zugegeben und diese erneut für 30 min bei 32°C und 750 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Expression des Red $\alpha\beta$ -Rekombinasesystems bei 42°C für 15 min induziert, und die zweite homologe Rekombination durch eine anschließende Inkubation für 2 h bei 32°C und 750 rpm ermöglicht. Nach der Inkubation wurden die Bakterien pelletiert (6.500 rpm, 5 min 5415 D, Eppendorf) und 100 µl der Bakterien 1:100 und 1:10.000 verdünnt auf Arabinoseplatten mit 1% Arabinose und Chloramphenicol (25 µg/ml) ausplattiert. Nach der Selektion für 24 bis 48 h bei 32°C wurden Einzelkolonien mit einer sterilen Pipettenspitze auf getrennte Agarplatten mit Chloramphenicol (25 µg/ml) sowie mit Chloramphenicol und Kanamycin (50 µg/ml) übertragen (Tischer *et al.*, 2010; Tischer *et al.*, 2006). Nach 24 bis 48 h bei 32°C wurden Kanamycin-sensitive Kolonien für BAC-DNA-Präparationen gepickt (s. Kapitel 2.4.11). Die BAC-DNA wurde mittels PCR und Sequenzierung auf die gewünschte Insertion der HA-Epitop-Markierung überprüft und korrekt mutierte BACs für die Rekonstitution verwendet.

2.5.2 Deletionsmutagenese durch Red $\alpha\beta$ -vermittelte homologe Rekombination

Für eine Deletion der Gene *M33* und *M34* aus dem MCMV-Genom wurde mittels homologer Rekombination das entsprechende Gen durch eine Deletionskassette mit einem Kanamycin-Selektionsmarker ersetzt (Wagner *et al.*, 2002). Dazu wurde in dieser Arbeit abweichend von Wagner *et al.* das Red $\alpha\beta$ -Rekombinationssystem in GS1783 *E. coli* verwendet (Tischer *et al.*, 2010).

2.5.2.1 Generierung von Deletionskassetten mittels PCR

Für die Generierung der Deletionskassette wurde das pFRT1-Plasmid als Template verwendet, von welchem das Kanamycin-Gen amplifiziert wurde. Dazu wurden Primer mit Bindesequenzen für die Amplifizierung des Kanamycin-Gens und etwa 60 bp lange, das zu deletierende Gen

flankierenden, Sequenzen benutzt (Wagner *et al.*, 2002). Für eine spätere Entfernung des Kanamycin-Gens wurden diese zusätzlich durch zwei *flippase recognition target* (frt)-Sequenzen flankiert. Für die PCR zur Amplifizierung der Deletionskassette wurden die PCR-Programme nach Tischer *et al.* verwendet (Tischer *et al.*, 2006). Das PCR-Produkt wurde mit dem *NucleoSpin Gel and PCR-Clean-up Kit* (Macherey-Nagel) aufgereinigt.

2.5.2.2 Insertion einer Deletionskassette

Für die Insertion der Deletionskassette in das zu mutierende MCMV-Genom wurden 10 µl DNA in elektrokompente GS1783 *E. coli* elektroporiert (s. Kap. 2.4.9). Nach dem Puls wurden die Bakterien für 32°C bei 750 rpm (Thermomixer Comfort, Eppendorf) für 1,5 h inkubiert und durch das Red $\alpha\beta$ -Rekombinasesystem eine homologe Rekombination der Deletionskassette in die Zielsequenz induziert. Nach der Inkubation wurden die Bakterien pelletiert (5 min, 6500 rpm; 5415 D, Eppendorf) und zur Selektion auf Chloramphenicol- (25 µg/ml) und Kanamycin-haltigen (50 µg/ml) Agarplatten ausplattiert. Angewachsene Kolonien wurden mittels PCR und Southern Blots auf eine korrekte Insertion der Kanamycin-Deletionskassette und die Deletion des Zielgens überprüft (s. Kap. 2.5.4 und 2.4.12).

2.5.2.3 Entfernung einer Deletionskassette mittels Flippase-vermittelter Rekombination

Die in der Deletionskassette enthaltenen frt-Sequenzen ermöglichen eine Entfernung des in das MCMV-Genom integrierten Kanamycin-Gens mittels Flippase-vermittelter Rekombination. (Cherepanov und Wackernagel, 1995). Die Deletion des Kanamycin-Gens wurde in chemisch kompetenten *E. coli* (DH10B) durchgeführt, die das entsprechende mutierte MCMV-BAC enthielten. Für die Expression der für die Rekombination benötigten Flippase wurden 2 µg des pCP20 Plasmids transformiert (s. Kap. 2.4.7). Die Expression der Flippase und die Rekombination erfolgte für 1,5 h bei 30°C und 750 rpm (Thermomixer Comfort, Eppendorf). Zur Selektion wurden die Bakterien pelletiert (5 min, 6500 rpm; 5415 D, Eppendorf), auf Chloramphenicol- (25 µg/ml) und Ampicillin-haltigen (50 µg/ml) Agarplatten ausplattiert und bei 32°C über Nacht inkubiert. Angewachsene Kolonien wurden gepickt und zur Entfernung des pCP20 Plasmids auf Chloramphenicol-haltigen Agarplatten (25 µg/ml) vereinzelt. Nach einer Inkubation über Nacht bei 42°C wurden erneut Kolonien gepickt und auf zwei getrennte Agarplatten mit Chloramphenicol (25 µg/ml) oder Kanamycin (50 µg/ml) und Chloramphenicol (25 µg/ml) übertragen. Kanamycin-sensitive Klone wurden anschließend per PCR und Southern Blot auf die Deletion des Kanamycin-Gens überprüft (s. Kap. 2.5.4 und 2.4.12).

2.5.3 Southern Blot Kontrollen zur BAC-Mutagenese

Zur Kontrolle von BAC-DNA oder des viralen Genoms auf die gewünschten Mutationen nach der BAC-Mutagenese wurden Southern Blots durchgeführt. Für die Genomkontrolle aus infizierten Zellen wurde DNA mit dem *SampleIN Direct PCR Kit* (high Qu) nach Herstellerangaben extrahiert. BAC-DNA (10 µl) oder DNA-Extrakt aus infizierten Zellen (10 µl) wurde mittels *EcoRI* über Nacht bei 37°C gespalten und wie unter Kapitel 2.4.12 beschrieben elektrophoretisch aufgetrennt und geblottet. Die für die Southern Blots verwendeten Sonden wurden mit DIG-markierten dNTPs (Roche) (s. Kap. 2.4.13) und den aufgelisteten Primern hergestellt (s. Kap. 2.1.13).

2.5.4 PCR Kontrollen zur BAC-Mutagenese

Zur Kontrolle von BAC-Mutagenesen wie Insertion von HA-Epitop-Markierungen, Deletion viraler Gene oder Deletionen der Kanamycin-Deletionskassette wurden PCR-Kontrollen durchgeführt. Dazu wurde der PCR-Mix des *SampleIN Direct PCR Kit* (high Qu) verwendet. Bei direkter Kontrolle von BAC-DNA wurden 1 bis 2 µl einer BAC-DNA-Präparation für die PCR eingesetzt. Für die Kontrolle des Genoms rekonstituierter MCMV-Mutanten wurden infizierte Zellen direkt aus der Rekonstitutionskultur verwendet, oder mit der entsprechenden Virusmutante infiziert. Die DNA-Extraktion aus infizierten Zellen erfolgte mit dem *SampleIN Direct PCR Kit* (high Qu) nach Herstellerangaben. Als Primer für die Deletionskontrollen der Zielgene wurden die Mutageneseprimer mit flankierenden Bindestellen, Klonierungsprimer oder Kontrollprimer mit Bindestellen innerhalb der zu deletierenden Sequenzen verwendet (s. Tab. 2.1.13). Als Kontrolle dienten Primer für die viralen Gene IE1 oder IE2.

2.5.5 Teilsequenzierung zur BAC-Mutagenese

Für eine Teilsequenzierung mutierter BAC-DNA wurden PCRs wie in Kapitel 2.5.4 beschrieben mit den angegebenen Primern durchgeführt (s. Kap. 2.1.13). DNA-Banden der erwarteten Größe wurden durch eine Gelextraktion mit dem Kit aufgereinigt. Die Sequenzierung wurde als *Ready to Run* Ansatz vorbereitet. Dazu wurden 10 µl der extrahierten DNA (etwa 100 µg/µl) mit 2 µl Primer und 2 µl H₂O versetzt und zur Sequenzierung eingeschickt (LGC Genomics Berlin).

2.5.6 Virusrekonstitution

Für die Rekonstitution von Virusmutanten wurden MEF oder CIM-Zellen im 12-well-Platten mit der mutierten BAC-DNA transfiziert. Dazu wurde Superfect (Qiagen) verwendet. Abweichend vom Herstellerprotokoll wurde pro Mutante je ein Transfektionsansatz mit 7,5 oder 15 µl frischer BAC-DNA und 7,5 µl Superfect in serumfreiem Medium (Gesamtvolumen 70 µl) vorbereitet. Die Transfektion erfolgte wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben. Die transfizierten Zellen wurden anschließend kultiviert und abhängig von Zustand und Konfluenz der Zellen auf das nächstgrößere Zellkulturgefäß expandiert bis Plaquebildung auftrat oder zwei T175-Zellkulturflaschen erreicht wurden. Rekonstitutionskulturen mit Plaquebildung wurden weiter kultiviert, bis alle Zellen durchinfiziert waren und ein initialer, ungereinigter Virusstock präpariert werden konnte (s. Kap. 2.6.2). Zellen ohne ersichtlichen zytopathischen Effekt und Plaquebildung wurden in Kultur gehalten, bis die Zellen auf Grund schlechten Zustands entsorgt werden mussten oder eine für die entsprechende Virusmutante zu erwartende Rekonstitutionszeit um mehrere Wochen überschritten war.

2.6 Virologische Methoden

2.6.1 Infektionen

Die *multiplicity of infection* (MOI) für die Infektionen von adhärenenten Zellen wurde anhand der Zellzahl berechnet und das Virus in der entsprechenden Menge DMEM (3 bis 10% FBS [v/v], 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) für die jeweiligen Zellkulturplatten zu den Zellen pipettiert (Tab. 2.6). Für eine erhöhte Infektionseffizienz durch *centrifugal enhancement* (Osborn und Walker, 1968) wurden die Zellkulturplatten zweimal für 15 min bei 2000 rpm zentrifugiert (Rotanta 460 R, Hettich oder Allegra X-15 R, Beckman Coulter).

Tabelle 2.6: Infektionsvolumina für *centrifugal enhancement*

Pro well	6-well-Platte	12-well-Platte	48-well-Platte
Zellen	7,0·10 ⁵	4,0·10 ⁵	1,3·10 ⁵
DMEM	3 ml	1,5 ml	0,5 ml

2.6.2 Präparation von Virusstocks

Für die Präparation von MCMV Stocks wurden CIM-Zellen in ein bis zwei T175-Zellkulturflaschen mit einer niedrigen MOI (0,01 bis 0,05) durch Zugabe der entsprechenden Menge eines Stocks infiziert. Für Virusmutanten mit beeinträchtigter Replikation wurden die Zellen in 6-*well*-Platten ausgelegt, darin mittels *centrifugal enhancement* infiziert (s. Kap. 2.6.1) und je nach Konfluenz der Zellen in den folgenden Tagen auf mehrere T175-Zellkulturflaschen expandiert.

Vom Kulturüberstand durchinfizierter Zellen wurden aus jeder Flasche 300 µl für eine Mykoplasmen-Kontrolle mittels PCR 10 min bei 95 °C aufgeköcht (ThermoStat plus, Eppendorf) und zur Lagerung bei -20°C eingefroren. Die PCRs für die Mykoplasmen-Kontrolle wurden zusammen mit anderen Proben von Benjamin Katschinski durchgeführt. Die Zellen wurden im Medium mit einem Zellschaber vom Flaschenboden gelöst und die gesamte Suspension in 50 ml *Falcons* transferiert. Suspensionsreste aus den Zellkulturflaschen wurden für PCR- und Southern Blot-Kontrollen für 3 min bei 4000 rpm (5417 R, Eppendorf) pelletiert. Das Pellet wurde einmal mit PBS gewaschen (3 min, 4000 rpm; 5417 R, Eppendorf), der Überstand verworfen und die Pellets bei -20°C gelagert.

Die Zellen wurden für 5 min bei 300 bis 350 g (Rotanta 460 R, Hettich) pelletiert, und der Überstand in frischen 50 ml *Falcons* gelagert. Zum Zellaufschluss wurden die Pellets in 6 ml des Überstands aufgenommen und in einem 7 ml Douncer 30 mal homogenisiert. Das Homogenat wurde wieder mit dem restlichen Überständen zusammengeführt und für 10 min bei 3500 bis 4000 g zentrifugiert (Rotanta 460 R, Hettich). Der virushaltige Überstand wurde in frische 50 ml *Falcons* transferiert und in 1,5 ml oder 2 ml Reaktionsgefäßen in verschiedenen Mengen aliquotiert (0,5 ml, 1 ml oder 1,5 ml) bei -80°C eingefroren. Die Konzentration infektiöser Einheiten aller Stocks (*Plaque forming units per ml*, PFU/ml) wurde mittels *Plaque Titration Assays* ermittelt (s. Kap. 2.6.8).

2.6.3 Präparation konzentrierter Virusstocks

Zur Präparation konzentrierter MCMV Stocks wurden CIM-Zellen in zwei 6-*well*-Platten mit einer MOI von 0,01 bis 0,05 mittels *centrifugal enhancement* infiziert (s. Kap. 2.6.1). Nach drei Tagen wurden die Zellen vom Plattenboden gespült oder geschabt und in 10 bis 20 vorbereitete T175-Zellkulturflaschen (CIM) überführt, abhängig von der Replikation der verwendeten Virusmutante. Bei Erreichen voller Konfluenz des Zellrasens vor einer ausreichenden Infektion aller Zellen wurden die entsprechenden Kulturflaschen auf die 2- bis 3-fache Anzahl an T175-

Zellkulturflaschen expandiert. Die Stockpräparation wurde vorgenommen wenn alle Flaschen durchinfiziert waren. Vor dem Ablösen möglicher noch adhärenter Zellen vom Flaschenboden wurde aus allen Flaschen ein Teil des Mediumüberstands für eine Mykoplasmen-Kontrolle mittels PCR entnommen, bei 95°C für 10 min aufgekocht (ThermoStat plus, Eppendorf) und bei -20°C eingefroren.

Die Zellsuspensionen aus allen Flaschen wurden in maximal 6 Zentrifugenbecher (250 ml) überführt und für 5 min bei 6000 rpm und 10°C (J2-21 Beckmann) zentrifugiert. Reste der Zellsuspension aus den Kulturflaschen wurden für Southern Blot- oder PCR-Kontrollen (s. Kap. 2.5.3 und 2.5.4) in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß pelletiert und einmal mit PBS gewaschen (3 min, 4000 rpm, 5417 R, Eppendorf) und als trockenes Pellet bei -20°C gelagert.

Nach der Zentrifugation wurden die Überstände aus den 250 ml-Zentrifugenbechern in frische Becher umgefüllt und die pelletierten Zellen jeweils in 6 ml der Überstände durch Homogenisierung (30 mal) in einem 7 ml Douncer aufgeschlossen. Die aufgeschlossenen Zellen wurden in den benutzten 250 ml-Zentrifugenbechern mit den gesamten Überständen zusammengeführt und für 10 min bei 6000 rpm und 10°C (J2-21 Beckmann) zentrifugiert. Anschließend wurden die Überstände auf die anderen 250 ml-Zentrifugenbecher überführt und bei 10°C entweder für 4 h bei 10000 rpm und 10°C oder für mindestens 6 h bei 8000 rpm (J2-21 Beckmann) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und den Virus-Pellets frisches Kulturmedium ohne Resuspension zugegeben. Auf drei Zentrifugenbecher wurden dazu 15 ml Medium aufgeteilt, und die Pellets vom Medium bedeckt auf Eis bei 4°C über Nacht inkubiert.

Am Folgetag wurden die Pellets im Medium resuspendiert und im 7 ml Douncer homogenisiert. Jeweils 15 ml des Homogenats wurden vorsichtig ohne Verwirbelungen in einem 35 ml Ultrazentrifugenröhrchen auf ein Saccharosekissen (20 ml 15% Saccharose in VSB-Puffer) pipettiert und im Ultrazentrifugenbecher platziert. Die Zentrifugation erfolgte für 70 min bei 27000 rpm und 10°C (OptimaL-70K, Beckman). Anschließend wurde der Überstand verworfen und abhängig von der Größe und Anzahl der Pellets 1 bis 2 ml 15% Saccharose in *virus standard puffer* (VSB)-Puffer ohne Resuspension zugegeben. Nach einer weiteren Inkubation auf Eis bei 4°C (mindestens 3 h oder über Nacht) wurde die Virussuspension in einem 1 ml Douncer vollständig homogenisiert. Abhängig von der erwarteten Konzentration des Stocks wurden Aliquots verschiedener Mengen (10 µl, 20 µl, 50 µl) bei -80°C eingefroren und die Konzentration infektiöser Einheiten (*Plaque forming units*, PFU/ml) mittels *Plaque Titration Assay* bestimmt (s. Kap. 2.6.8).

2.6.4 *Immediate-early-Expression*

CIM-Zellen wurden vor der Infektion vorsichtig mit Cycloheximid (CHX)-haltigem (50 µg/ml) DMEM (10% FBS [v/v], 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) gewaschen und anschließend in ebenfalls CHX-haltigem Medium (MOI 10) infiziert (s. Kap. 2.6.1). Eine Inkubation mit CHX inhibiert die Proteinsynthese, während die mRNA Transkription der *immediate early* Gene sowie der zellulären Gene weiterhin erfolgt.

Nach 4 h Inkubation wurden die Zellen zweimal mit Actinomycin D (ActD)-haltigem (5 µg/ml) DMEM (10% FBS [v/v], 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) gewaschen und darin für weitere 4 h inkubiert. Durch das Entfernen des CHX wird die Hemmung der Translation aufgehoben, während die gleichzeitige Inkubation mit ActD die Transkription inhibiert. Unter diesen Bedingungen kann eine Proteinsynthese der zuvor transkribierten *immediate early* mRNA und der zellulären mRNA stattfinden, wohingegen eine Expression von *early* und *late* Genen nicht erfolgt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen lysiert (s. Kap. 2.3.1) und die Lysate bei -20°C gelagert.

2.6.5 *Early-late-Expressionskinetik*

CIM-Zellen wurden in 6-*well*-Platten mit einer MOI von 10 infiziert (siehe Kapitel 2.6.1) oder uninfiziert gelassen (mock). Pro Virusmutante wurde jeweils eine Bedingung bereits 25 min vor der Infektion für die gesamte Infektionsdauer von 48 h mit 50 µM Ganciclovir (GCV) (Sigma) oder 250 µg/ml *phosphonoacetic acid* (PAA) behandelt. Jeweils 4, 24, und 48 h nach der Infektion wurden die Zellen lysiert (s. Kap. 2.3.1). Nicht infizierte mock-Kontrollzellen wurden 24 h und 48 h nach der Infektion lysiert, die mit GCV oder PAA inkubierten Zellen nach 48 h (s. Kap. 2.3.1). Alle Lysate wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.6.6 **Oberflächenfärbung und Durchflusszytometrie von MCMV-infizierten Zellen**

Zur Färbung der Oberflächenexpression von MHC class I (MHC-I) in MCMV-infizierten Zellen wurden CIM-Zellen in 96-*well* Platten infiziert und nach 18 h mit IFN γ (250 U/ml) inkubiert. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen, kurz mit Alphazym gespült, vom Plattenboden durch Resuspension in PBS gelöst und in eine *v-bottom* Platte überführt.

Bei möglichen Zellverlust durch bereits abgelöste Zellen wurde das zuvor abgenommene Überstandmedium zuerst in eine *v-bottom* Platte überführt und die abgelösten Zellen dazu pipettiert. Die Zellen wurden in der *v-bottom* Platte insgesamt dreimal bei 1200 rpm für 3 min mit PBS mit 3% FBS gewaschen und danach für 30 min in PBS + 3 % Mausserum blockiert. Nach zweimaligem Waschen (PBS mit 3% FBS) wurde der Primäantikörper (Ak, 30 µl pro *well*, 1:200 in PBS + 3 % Mausserum oder FBS) inkubiert. Die Pellets wurden erneut dreimal gewaschen (PBS mit 3% FBS) und mit Streptavidin-*Fluorescein isothiocyanate* (FITC) (1:1000) inkubiert (30 µl pro *well*, 1:200 in PBS mit 3 % FBS, 30 min abgedunkelt). Die Zellen wurden anschließend dreimal gewaschen (PBS mit 3% FBS), und bis zur Messung abgedunkelt bei 4°C gelagert. Die Durchflusszytometrie wurde mit dem FACSCanto™ II von BD Biosciences durchgeführt.

2.6.7 Infektionen zur *in vitro* Replikation

Für die Infektion von adhären Zellen für Wachstumskinetiken wurden die Zellen am Tag vor der Infektion in 12-*well*-Platten ausgelegt. Im Fall einer Vorinkubation mit IFN γ wurden die Zellen bereits in der Zellkulturflasche 48 h vor dem Infektionszeitpunkt inkubiert (250 U/ml) und am Tag vor der Infektion in Anwesenheit von IFN γ ausgelegt. Für die Infektion wurde das Virus entsprechend der erforderlichen MOI im DMEM verdünnt (0 bis 5% FBS [v/v], 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) und auf die Zellen gegeben. Nach der Infektion durch *centrifugal enhancement* (siehe Kapitel 2.6.1) wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO $_2$ (CB150 E3, Binder) inkubiert und an den Tagen 0, 3 und 4 oder 5 nach der Infektion jeweils eine Platte bei -80°C eingefroren.

2.6.8 Virustitration

MEF oder MNC der Passage 2 wurden am Tag vor der Titration in 48-*well*-Platten mit einem Gesamtvolumen von 500 µl/*well* ausgelegt. Für die Titration von Zellkulturüberständen aus *in vitro* Experimenten wurden jeweils drei *wells* der ersten Spalte (*wells* A bis C und D bis F) mit 50 µl des aufgetauten Überstandes aus einer Infektionsbedingung versetzt und dabei das Medium der *wells* durch 12-maliges Pipettieren gemischt. Für die Titration von Organhomogenaten wurden jeweils 50 µl zu vier *wells* der ersten Reihe (*wells* 1 bis 8) einer 48-*well*-Platte pipettiert. Anschließend wurden abhängig von der Plattenorientierung je 55 µl Medium aus der ersten Spalte oder Reihe in die nächste Spalte/Reihe transferiert und gemischt. Die auf diese Weise durchgeführte sequenzielle Verdünnung wurde bis zu den letzten *wells* der Platte fortgeführt.

Abschließend wurden je 55 µl der letzten Verdünnung verworfen.

Alle Platten wurden zur Infektion mittels *centrifugal enhancement* zentrifugiert und inkubiert (37°C und 5% CO₂, CB150 E3, Binder). Zwei Stunden nach der Infektion wurden die Überstände abgesaugt und durch vorsichtige Überschichtung der Zellen mit Methylzellulose (s. Kap. 2.1.3) eine Bildung von sekundären Plaques durch Virusverteilung über den Überstand verhindert. Für Titrations von Leberhomogenisaten wurde die Virussuspension bereits nach einer Stunde durch Methylzellulose ersetzt. Organtitrations wurden mit technischer Assistenz von Benjamin Katschinski oder Kerstin Wohlgemuth durchgeführt. Nach vier Tagen Inkubation (37°C und 5% CO₂, CB150 E3, Binder) wurden die Plaques mikroskopisch quantifiziert.

2.6.9 Adenovirusinfektion

HEK293A-Zellen wurden in schwarzen 96-*well*-Platten mit Ad5-gfp jeweils in 4 *wells* der ersten Spalte mit oder ohne IFN γ (250 U/ml), infiziert und seriell über die gesamte Platte 1:10 verdünnt. Ab dem ersten Tag nach der Infektion wurde bis einschließlich Tag 7 die Replikation von Ad5-gfp anhand der Fluoreszenz sowohl im Bioreader optisch dokumentiert als auch im Berthold Mitras² vergleichend gemessen (RFU).

2.6.10 Vakziniavirusinfektion

Alle Experimente mit VACV wurden in den Laboren von Prof. Ingo Drexler an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt. MEF, MNC und Cloudman S91 Zellen wurden 48 h vor der Infektion mit IFN γ (250 U/ml) oder mit IFN γ (250 U/ml) und dem Januskinasen-Inhibitor Ruxolitinib (4 µM) inkubiert oder unbehandelt gelassen. 24 h vor der Infektion wurden die Zellen unter Erhalt der Inkubationsbedingungen in 12-*well*-Platten ausgelegt. Nach insgesamt 48 h Inkubation wurden die Zellen unter Erhalt der Inkubationsbedingungen mit VACV-gfp (VACV-Stamm *western reserve* (WR)-gfp) infiziert und täglich bis 4 d p. i. lichtmikroskopisch cytopathische Effekte (CPE) dokumentiert. Zusätzlich wurde täglich gfp-Expression in VACV-gfp-infizierten Zellen am Immunfluoreszenzmikroskop beurteilt, konnte jedoch nicht bildlich dokumentiert werden.

2.7 Arbeiten mit Mäusen

Die Arbeiten mit Mäusen wurden mit technischer Assistenz von Benjamin Katschinski oder Kerstin Wohlgemuth durchgeführt.

2.7.1 Präparation von Virusstocks nach Mauspassage

Für *in vivo*-Experimente wurden gereinigte Virusstocks nach einer Mauspassage präpariert. Dazu wurden Mäuse (BALB/c) mit einem gereinigten Virusstock mit $2 \cdot 10^5$ PFU/ml intraperitoneal (i. p.) in sterilem PBS und einem Injektionsvolumen von 100 μ l/Maus infiziert. Nach 3 Tagen (Milz) oder 21 Tagen (Speicheldrüse) wurden die Mäuse mittels CO₂-Inhalation getötet und die entsprechenden Organe entnommen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Die Organe wurden wie in Kapitel 2.7.3 homogenisiert und die Organhomogenate in 1 ml Aliquots bei -80°C eingefroren. Mit 1 ml der frischen Organhomogenate wurden CIM-Zellen einer 6-well-Platte durch *centrifugal enhancement* (Osborn und Walker, 1968) infiziert. Zwei bis drei Stunden nach der Infektion wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Das weitere Vorgehen zur Präparation von gereinigten Virusstocks ist in Kapitel 2.6.3 beschrieben.

2.7.2 Infektionen von Mäusen zur *in vivo* Replikation

Für die Evaluierung der Virusreplikation *in vivo* wurden Mäuse (BALB/c) mit gereinigten Virusstocks der Passage 2 nach einer Mauspassage infiziert. Dazu wurden $2 \cdot 10^5$ PFU/ml pro Maus in sterilem PBS als Mastermix für alle Mäuse vorbereitet und in einem Injektionsvolumen von 100 μ l/Maus i. p. injiziert.

2.7.3 Serum- und Organentnahme

Drei und 21 Tage nach der Infektion wurden die Mäuse mittels CO₂-Inhalation getötet und zügig Blut durch Herzpunktion sowie anschließend die benötigten Organe Milz, Nieren, Leber, Lunge und Speicheldrüse entnommen. Die Vollblutproben wurden zweimal jeweils für 10 min bei 1500 g (5417 R, Eppendorf) zentrifugiert und die Serumüberstände in frischen 1,5 ml Reaktionsgefäßen

bei -20°C eingefroren. Die Organe wurden sofort nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bis zur Titration bei -80°C gelagert.

Vorbereitend für die Titration wurden die Organe mittels eines 70 µm Zellsiebs (MACS SmartStrainer, Miltenyi Biotech) in 5 ml PBS mit 3 % oder 5 % (Leber) FBS pro Organ homogenisiert und in einem 50 ml Falcon Röhrchen zentrifugiert (1.200 rpm, Leber 2.000 rpm, 3 min, 4°C, Rotanta 460 R, Hettich). Die Überstände wurden in 15 ml Falcon Röhrchen überführt, erneut zentrifugiert (2000 rpm, Leber 3.000 rpm, 3 min, 4°C, Rotanta 460 R, Hettich) und anschließend von diesen Überständen sofort 50 µl pro Replikat für die Titration verwendet (s. Kap. 2.6.8).

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung neuer potenzieller CMV-kodierter IFN γ -Antagonisten

Durch Arbeiten der Arbeitsgruppe war bereits bekannt, dass es neben dem ausführlich charakterisierten MCMV-kodierten IFN-Antagonisten pM27 (Le-Trilling *et al.*, 2018; Trilling *et al.*, 2011; Zimmermann *et al.*, 2005) mindestens einen weiteren IFN-Antagonisten in MCMV geben muss, der unabhängig von pM27 die IFN γ -induzierte Signaltransduktion inhibiert (Trilling *et al.*, 2014).

Zur Identifikation dieses unbekanntes Antagonisten wurde daher im Vorfeld dieser Arbeit ein Screening durchgeführt, in welchem MCMV ORFs mittels eines Reporterassays auf inhibitorische Effekte auf die IFN γ -abhängige Signaltransduktion getestet wurden. Ein Schema der Funktionsweise des Reporterassays ist in Abb. 3.1 dargestellt. Es wurden zunächst Kotransfektionen von MCMV-kodierten ORFs (ORF *library* bereitgestellt von A. Hill) mit dem IFN γ induzierbaren Reporterassaykonstrukt pGAS-Luziferase (nachfolgend pGAS-Luc) vorgenommen. Die Expression des Reporters steht unter der Kontrolle eines IFN γ -induzierbaren Promotors, der die GAS enthält. Die Aktivierung der Jak-STAT-Signaltransduktion kann nach einer Inkubation mit IFN γ quantifiziert werden, da die exprimierte Luziferase eine Reaktion katalysiert, welche durch Entstehung von Biolumineszenz gemessen werden kann. Im Rahmen dieses Screenings wurden zwei ORFs als Kandidaten für einen Antagonismus der IFN γ -induzierten Signaltransduktion in Erwägung gezogen.

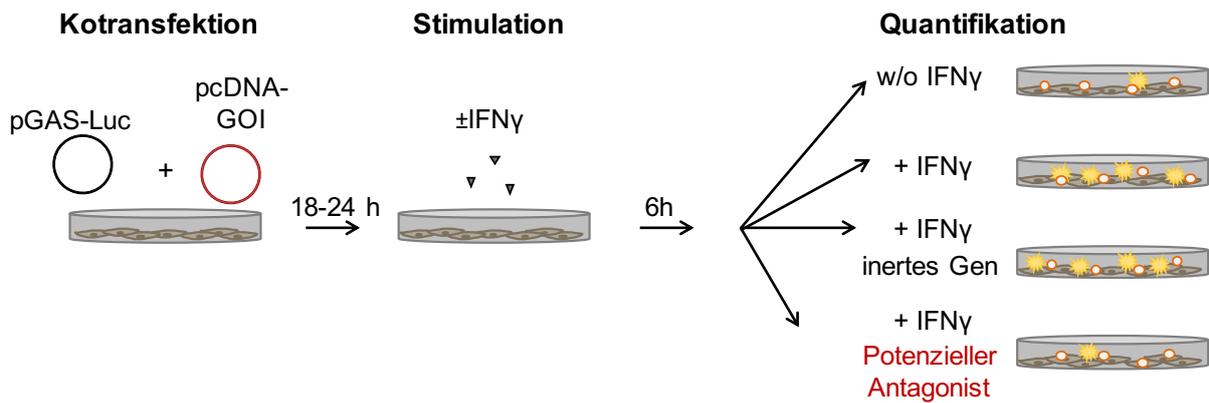


Abbildung 3.1: Luziferase-Reporterassay zur Quantifizierung der IFN γ -induzierten GAS-Promotoraktivität. Schematische Darstellung eines pGAS-Reporterassays. HeLa-Zellen werden mit dem Reporter-Konstrukt pGAS-Luc und einem Expressionsvektor für ein zu untersuchendes Gen (*gene of interest*, GOI) koftransfiziert und nach 18 bis 24 h mit IFN γ (250 U/ml) stimuliert. Nach 6 h Inkubationszeit werden die Zellen lysiert. Die GAS-Promotoraktivität wird durch Messung der Biolumineszenz aufgrund der Aktivität der exprimierten Luziferase (RLU) quantifiziert.

3.1.1 Die MCMV-kodierten Genprodukte M33 und M34 inhibieren die IFN γ -induzierte Genexpression

In dieser Arbeit sollten die zwei MCMV-kodierten Gene *M33* und *M34* als potenzielle IFN γ -Antagonisten untersucht werden. Dazu wurden HeLa-Zellen mit dem Reporter-Konstrukt pGAS-Luc und dem Expressionsvektor pcDNA3.1-M33-V5/His oder pcDNA3.1-M34-V5/His aus der bereitgestellten MCMV-ORF *Library* koftransfiziert. In dem in Abbildung 3.2 dargestellten repräsentativen Experiment wurden jeweils zwei verschiedene DNA-Präparationen parallel getestet. Als Negativkontrolle wurde das in dem bisherigen Screening inerte MCMV-Gen pcDNA3.1-M78-V5/His verwendet, für eine Kontrolle möglicher unspezifischer Effekte durch den Expressionsvektor diente der entsprechende Leervektor pcDNA3.1. In Abbildung 3.2 wurden die Mittelwerte der Lumineszenz (RLU) (s. Abb. 3.2A) und die Induzierbarkeit des pGAS-Promotors durch Inkubation mit IFN γ (x-fache Induktion, s. Abb. 3.2B) dargestellt.

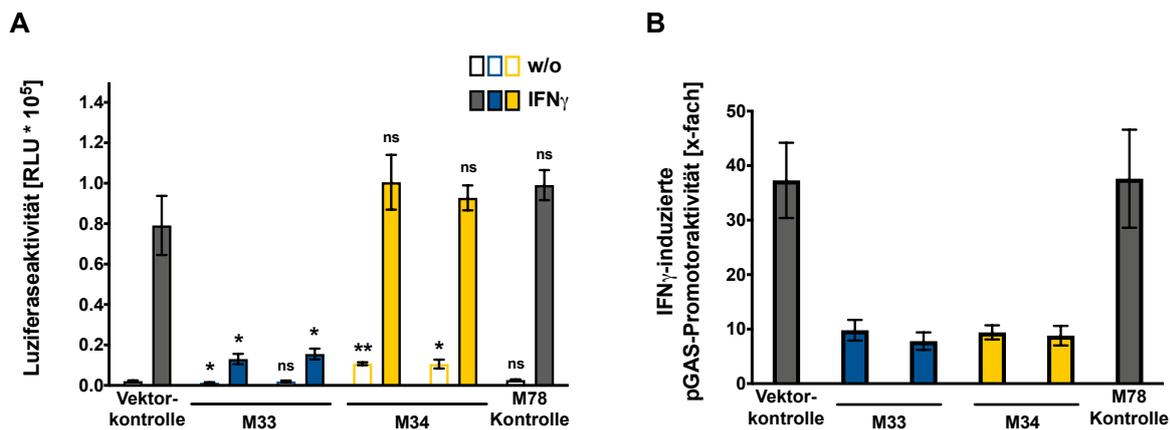


Abbildung 3.2: pM33 und pM34 inhibieren die IFN γ -induzierte GAS-Promotoraktivität. HeLa-Zellen wurden mit dem Reportergen-Konstrukt pGAS-Luc (*Luziferase*) und den Expressionsvektoren pcDNA3.1-M33-V5/His, pcDNA3.1-M34-V5/His, pcDNA3.1-M78-V5/His oder dem Leervektor pcDNA3.1 kotransfiziert. Von den Expressionsvektoren pcDNA3.1-M33-V5/His und pcDNA3.1-M34-V5/His wurden zwei verschiedene DNA-Präparationen verwendet. Nach 18 bis 24 h wurden die Zellen für 6 h mit IFN γ (250 U/ml) oder nur mit Medium (w/o) inkubiert. Die Messung der Luziferaseaktivität erfolgte in Triplikaten (s. Kap. 2.2.5). (A) Gezeigt sind die Mittelwerte der Luziferaseaktivität (*relative light units*, RLU) \pm Standardabweichung eines repräsentativen Experiments. *: $p < 0,05$. **: $p < 0,01$. ns: nicht signifikant (zweiseitiger T-Test zur entsprechenden Vektorkontrolle, ungleiche Varianz). (B) Daten wie in A, gezeigt ist die x-fache Induzierbarkeit \pm relativer Fehler.

In der Kontroll-Transfektion des Leervektors pcDNA3.1 wurde wie erwartet die Luziferase-Aktivität durch eine Stimulation des Signalwegs mit IFN γ -induziert. Für das virale Protein pM78 wurde bisher kein Antagonismus der IFN γ -Signaltransduktion beschrieben, entsprechend zeigte pM78-V5/His keinen Effekt auf die pGAS-Aktivierung nach einer Induktion mit IFN γ (s. Abb. 3.2). Bei einer Expression von pM33-V5/His wurde ein inhibitorischer Effekt von pM33-V5/His auf die IFN γ -induzierte Reporterexpression, sowohl in den absolut gemessenen Werten (RLU, s. Abb. 3.2A) als auch in der Induzierbarkeit (s. Abb. 3.2B), gemessen. Eine Transfektion von pcDNA3.1-M34-V5/His führte dagegen zu erhöhten Messwerten für die Luziferaseaktivität ohne IFN γ -Stimulation (s. Abb. 3.2A). Aufgrund eines geringeren Ansprechens des pGAS-Promotors auf die Inkubation mit IFN γ wurde jedoch eine insgesamt reduzierte Induzierbarkeit der IFN γ -stimulierten Reporterexpression festgestellt (s. Abb. 3.2B).

Zur Überprüfung, ob die Inhibition der pGAS-Promotoraktivität vom Expressionslevel der Proteine pM33-V5/His und pM34-V5/His abhängt, wurden absteigende DNA-Mengen der Expressionsvektoren pcDNA3.1-M33-V5/His und pcDNA3.1-M34-V5/His transfiziert. Wie in Abb. 3.3 dargestellt, wurde eine dosisabhängige Inhibition der IFN γ -induzierten Luziferase-Aktivität entsprechend der transfizierten Mengen von pM33-V5/His gemessen. Dabei wurde

eine leicht erhöhte Hintergrundaktivität in den nicht induzierten, mit niedrigen pcDNA3.1-M33-V5/His-Mengen transfizierten Bedingungen beobachtet (RLU, s. Abb. 3.3A). Die Induzierbarkeit des pGAS-Promotors durch IFN γ war dagegen bereits bei der geringsten transfizierten DNA-Menge inhibiert (Fold, s. Abb. 3.3B).

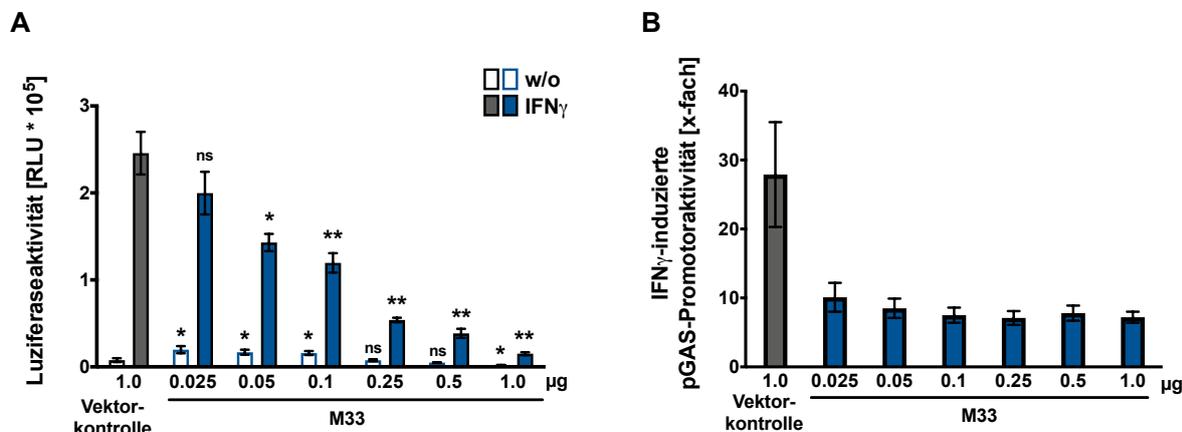


Abbildung 3.3: pM33 inhibiert die IFN γ -induzierte GAS-Promotoraktivität dosisabhängig. HeLa-Zellen wurden in 48-well-Platten mit dem Reporter-Gen-Konstrukt pGAS-Luc ($0,5 \mu\text{g}/\text{well}$) und ansteigenden Mengen des Expressionsvektors pcDNA3.1-M33-V5/His kotransfiziert. Nach 18 bis 24 h wurden die Zellen für 6 h mit IFN γ ($250 \text{ U}/\text{ml}$) oder nur mit Medium (w/o) inkubiert. Die Messung der Luziferaseaktivität erfolgte in Triplikaten (s. Kap. 2.2.5). (A) Gezeigt sind die Mittelwerte der Luziferaseaktivität (*relative light units*, RLU), \pm Standardabweichung eines repräsentativen Experiments. *: $p < 0,05$. **: $p < 0,01$. ns: nicht signifikant (zweiseitiger T-Test zur entsprechenden Vektorkontrolle, ungleiche Varianz). (B) Daten wie in A, gezeigt ist die x-fache Induzierbarkeit \pm relativer Fehler.

Ein dosisabhängiger Effekt wurde ebenfalls für pM34-V5/His beobachtet. Im Gegensatz zu pM33-V5/His führten Transfektionen geringerer Mengen von pcDNA3.1-M34-V5/His im Vergleich zur Leervektor-Kontrolle zu erhöhten Luziferase-Aktivitäten (s. Abb. 3.4A). Dabei wurde sowohl die nicht-induzierte Hintergrundaktivität als auch die IFN γ -induzierte pGAS-Promotoraktivität erhöht. Anders als in der Expression von pM33-V5/His blieb bei der Transfektion von pcDNA3.1-M34-V5/His die Hintergrundaktivität auch bei den höchsten transfizierten DNA-Mengen signifikant erhöht. Die Induzierbarkeit des Promotors durch IFN γ wurde jedoch durch pM34-V5/His bereits mit sehr geringen transfizierten DNA-Mengen inhibiert (s. Abb. 3.4B). In den höchsten Konzentrationen der Transfektion konnte interessanterweise trotz weiterhin signifikant erhöhter, unstimulierter Aktivität eine Reduktion in der IFN γ -induzierten pGAS-Promotoraktivität festgestellt werden.

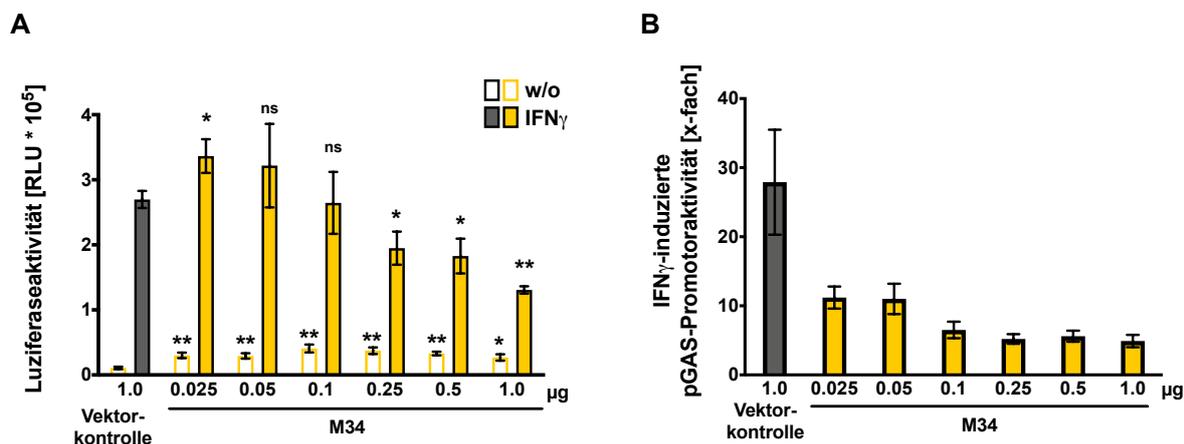


Abbildung 3.4: pM34 reduziert die Induzierbarkeit des GAS-Promotors durch IFN_γ trotz erhöhter unstimulierter Promotoraktivität. HeLa-Zellen wurden in 48-*well*-Platten mit dem Reporter-Gen-Konstrukt pGAS-Luc (0,5 µg/*well*) und ansteigenden Mengen des Expressionsvektors pcDNA3.1-M34-V5/His kotransfiziert. Nach 18 bis 24 h wurden die Zellen für 6 h mit IFN_γ (250 U/ml) oder nur mit Medium (w/o) inkubiert. Die Messung der Luciferaseaktivität erfolgte in Triplikaten (s. Kap. 2.2.5). (A) Gezeigt sind die Mittelwerte der Luciferaseaktivität (*relative light units*, RLU) ± Standardabweichung eines repräsentativen Experiments. *: p<0,05. **: p<0,01. ns: nicht signifikant (zweiseitiger T-Test zur entsprechenden Vektorkontrolle, ungleiche Varianz). (B) Daten wie in A, gezeigt ist die x-fache Induzierbarkeit ± relativer Fehler.

Die vorliegenden Ergebnisse legen daher nahe, dass pM33-V5/His und pM34-V5/His eine Reduktion der IFN_γ-abhängigen pGAS-Promotoraktivität mit unterschiedlichen Mechanismen bewirken, welche durch pM33-V5/His zu einer allgemeinen Inhibition der pGAS-Promotoraktivität führt, während pM34-V5/His trotz einer Erhöhung der konstitutiven Aktivität des pGAS-Promotors die IFN_γ-abhängige Induktion blockiert.

Für einige Immunevasionsmechanismen von Cytomegaloviren wurden mehrere verantwortliche redundante Gene mit verschiedenen Funktionen beschrieben. Da in infizierten Zellen durch die zeitgleiche Expression vieler Gene eine funktionelle Ergänzung oder gegenseitige Regulation stattfinden kann, sollte untersucht werden, ob eine Kotransfektion von pcDNA3.1-M33-V5/His und pcDNA3.1-M34-V5/His Einfluss auf die Inhibition der pGAS-Reporter-Genaktivität hat. Dazu wurden pcDNA3.1-M33-V5/His und pcDNA3.1-M34-V5/His entweder einzeln oder gemeinsam mit dem pGAS-Reporter-Genkonstrukt transfiziert. Die Inhibition der IFN_γ-induzierten pGAS-Promotoraktivität erfolgte wie zuvor bei pM33-V5/His durch die insgesamt reduzierte Promotoraktivität, bei pM34-V5/His-Expression dagegen durch die verringerte Induzierbarkeit bei erhöhten absoluten Messwerten mit und ohne IFN_γ-Inkubation (s. Abb. 3.5). Eine Kotransfektion beider Gene führte zu einer Reduktion der absoluten Messwerte für die IFN_γ-induzierte pGAS-Promotoraktivität ähnlich der Einzeltransfektion von pcDNA3.1-M33-V5/His. Interessanterweise

wurde ebenfalls die durch pM34-V5/His erhöhte unstimulierte Luziferaseaktivität durch die gleichzeitige Expression von pM33-V5/His reduziert. Dies deutet darauf hin, dass die pM33-V5/His-vermittelte Inhibition der pGAS-Promotoraktivität dominant über die beobachteten pM34-V5/His-vermittelten Effekte ist.

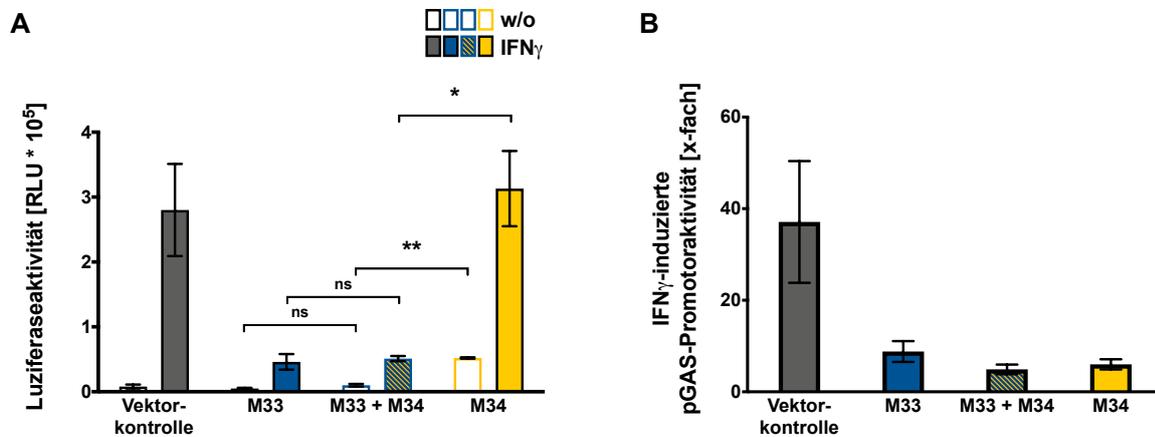


Abbildung 3.5: Die Inhibition der GAS-Promotoraktivität durch pM33 ist in der Kotransfektion dominant über pM34. HeLa-Zellen wurden in 48-well-Platten mit dem Reportergen-Konstrukten pGAS-Luc und den Expressionsvektoren pcDNA3.1-pM33-V5 und pcDNA3.1-M34-V5/His oder pcDNA3.1 zum DNA-Mengenausgleich kotransfiziert. Nach 18 bis 24 h wurden die Zellen für 6 h mit IFN γ (250 U/ml) oder nur mit Medium (w/o) inkubiert. Die Messung der Luziferaseaktivität erfolgte in Triplikaten (s. Kap. 2.2.5). (A) Gezeigt sind die Mittelwerte der Luziferaseaktivität (*relative light units*, RLU) \pm Standardabweichung eines repräsentativen Experiments. *: $p < 0,05$. **: $p < 0,01$. ns: nicht signifikant (zweiseitiger T-Test zur entsprechend inkubierten Kotransfektion, ungleiche Varianz). (B) Daten wie in A, gezeigt ist die x-fache Induzierbarkeit \pm relativer Fehler.

3.1.2 pM33 inhibiert die IFN γ -induzierte Genexpression mittels eines G-Protein-unabhängigen Mechanismus

pM33 und das HCMV-Homolog pUL33 wurden als virale G-Protein-gekoppelte Rezeptorhomologe (vGPCR) beschrieben, für die bisher keine Liganden bekannt sind. Beide Proteine aktivieren die CREB-, NFAT- und NF κ B-vermittelten Signaltransduktion (Case *et al.*, 2008; Sherrill und Miller, 2006; Waldhoer *et al.*, 2002), jedoch wurde die Aktivierung von NF κ B durch pUL33 als vergleichsweise gering beschrieben (van Senten *et al.*, 2019).

Um zu untersuchen, ob die Inhibition der IFN γ -induzierten GAS-Aktivierung von der Signaltransduktionskapazität von pM33 abhängig ist, wurden mittels *site-directed mutagenesis* zwei Mutanten von pM33-V5/His generiert. Dabei wurde das für das G-Protein-abhängige Signaling

essenzielle NRY Motiv durch einen gezielten Aminosäureaustausch zu NAY (R131A) oder NQY (R131Q) mutiert. Beide Mutationen führen zum Verlust der PLC- und G-Protein-vermittelten Signaltransduktion, während die NF κ B-Aktivierung erhalten bleibt (Sherrill *et al.*, 2009; Case *et al.*, 2008; Sherrill und Miller, 2006). In Abbildung 3.6 wurde die Mutationsstelle des konservierten NRY-Motivs in einem Alignment von pM33 und pUL33 markiert (EMBOSS Needle Alignment).

pM33_MUHV1	1	MDVLLGRDETMDESDYLHVNNTCAPSLGLSIARDAETAINTVIILIGGPM	50
		: : : : : :	
pUL33_HHV	1	MDTII-HNTTNRSTDTPHVNITCNITEPLSAIRTEAVINTFIIIFVGGPL	49
pM33_MUHV1	51	NFVVLTTQLLSNRIYRSSAPTLYMTNLYFANLLTVTMLPFLILSNRGQIS	100
		. : . : : : . . . : : : :	
pUL33_HHV	50	NAIVLITQLLTNRVLGYSTPTIYMTNLYSTNFLTLTVLPPFIVLSNQWLLP	99
pM33_MUHV1	101	SSPEGCKLVAVTYASCTAGFSTLALISV NRY RVIHQSTNKNAAGSKKKT	150
		: . . . : : : . : . : : : . : : :	
pUL33_HHV	100	ASVASCKFLSVIYYSSCTVGFATVALIAA DRY RVLHKRT--YARQSYRST	147
pM33_MUHV1	151	YGV LALVWLTSLMCASPATYVTVLAHDGDPDSV--HETCIIFFNYDQV	198
		. : : : : : : : . . .	
pUL33_HHV	148	YIILLTWFAGLIFSMPAAVYTTVVIHNGTNGQSSNGHATCVLYFIADEV	197
pM33_MUHV1	199	KTVLATFKILICIVWGVMPVMMTWFYLFYKRLKLTSYRRSHTLAFVS	248
		. . : : : : : . : : : .	
pUL33_HHV	198	YTVLLSWKVLLTLVWGAAPVIMMTWFYAFFYSTVQRASQKQRSRTLTFVS	247
pM33_MUHV1	249	TLILSFLVLQTPFVGIMIFDSYAVIEWDVTCESINSRDAVAMLARVVPNF	298
		. : : : . : . : : : : .	
pUL33_HHV	248	VLLISFVALQTPYVSIMIFNSYATAAWPMDCEHLTLRRTIGTLRSLVPHL	297
pM33_MUHV1	299	HCMLNPVLYAFLGRDFNKRFMQCITGKLFRRRMLQERAGVRSPSTPHRA	348
		: : : . . . : : : :	
pUL33_HHV	298	HCLINPILYALLGHDFLQRMRCFRGQLLDRRAFLRSQQNRATAETNLA	347
pM33_MUHV1	349	ARQ-----LAKIGTLTRSCSRSELQRSASAPPPQ-----	377
	 : : : : : . . : 	
pUL33_HHV	348	AGNNSQSVATSLDTSSKNCNQ-HAKRSVSNFNFPSGTWKGGQKTASNDTST	396
pM33_MUHV1	378	-----	377
pUL33_HHV	397	KIPHRLSQSHHNLSGV	412

Abbildung 3.6: Alignment der MCMV- und HCMV-kodierten homologen Proteine pM33 und pUL33. Ein Alignment der Proteinsequenzen von pM33 (MuHV1, Q83207.1) und pUL33 (HHV5/HCMV, YP081492.1) wurde mithilfe von EMBOSS Needle durchgeführt.

Im Vergleich beider pM33-V5/His-Mutanten mit dem wt pM33-V5/His im pGAS-Promotorassay zeigte sich, dass die G-Protein-abhängige Signaltransduktion von pM33-V5/His nicht für die beobachtete Inhibition der IFN γ -induzierten pGAS-Promotoraktivität essenziell ist. Da beide *loss of function*-Mutanten die IFN γ -induzierte Luziferase-Aktivität weiterhin inhibieren (s. Abb. 3.7), kann davon ausgegangen werden, dass die pM33-V5/His-vermittelte Inhibition der

IFN γ -induzierten pGAS-Promotoraktivität durch einen G-Protein-unabhängigen Mechanismus erfolgt.

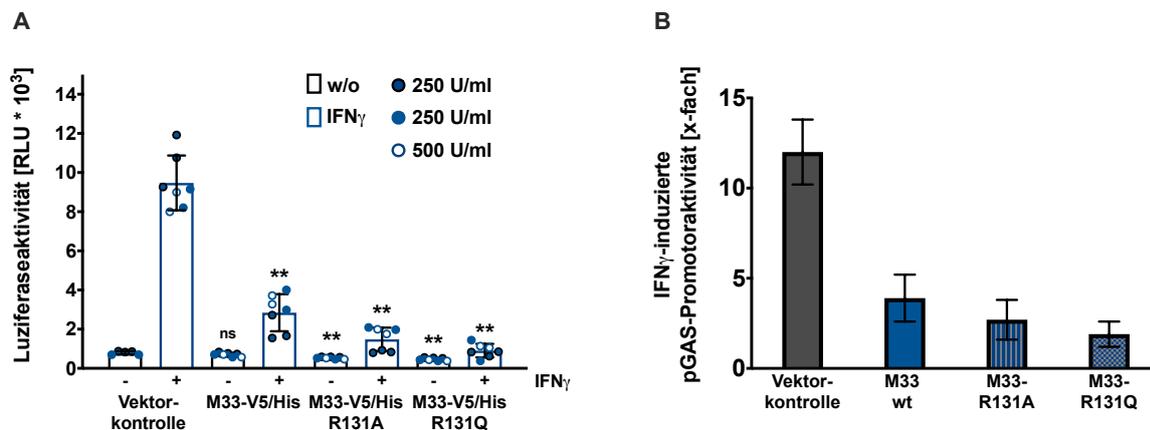


Abbildung 3.7: Die Inhibition der GAS-Promotoraktivität durch pM33 ist unabhängig von der G-Protein-vermittelten Signaltransduktion. HeLa-Zellen wurden in 96-*well*-Platten mit dem Reporter-Gen-Konstrukt pGAS-Luc und den Expressionsvektoren pcDNA3.1, pcDNA3.1-M33-V5/His, pcDNA3.1-M33-V5/His_{R131A} oder pcDNA3.1-M33-V5/His_{R131Q} kotransfiziert. Nach 18 bis 24 h wurden die Zellen für 6 h mit IFN γ (250 U/ml oder 500 U/ml) oder nur mit Medium (w/o) inkubiert. Die Messung der Luziferaseaktivität erfolgte in Duplikaten (s. Kap. 2.2.5). (A) Gezeigt sind die Mittelwerte der Luziferaseaktivität aus zwei unabhängigen Experimenten (*relative light units*, RLU), \pm Standardabweichung. *: $p < 0,05$. **: $p < 0,01$. ns: nicht signifikant (zweiseitiger T-Test zur entsprechenden Vektorkontrolle, ungleiche Varianz). (B) Daten wie in A, gezeigt ist die x-fache Induzierbarkeit \pm relativer Fehler.

3.1.3 Der N-Terminus von pM34 ist nicht essenziell für die Inhibition der IFN γ -induzierten Genexpression

Für die His-Epitop-Markierung wurde eine mögliche Interferenz mit der DNA-Bindung von Transkriptionsfaktoren beschrieben (Büning *et al.*, 1996). Da für pM34 durch die vorliegenden Daten und die Homologie zu pUL34 eine Funktion als transkriptioneller Regulator angenommen wird, sollten eventuelle Effekte durch die V5/His-Epitop-Markierung auf die Funktion von pM34-His/V5 untersucht werden. Dazu wurde *M34* für eine Expression als pM34HA-Fusionsprotein umklontiert. Während der Klonierung von pcDNA3.1-M34-V5/His zu pcDNA3.1-M34HA wurde in den Sequenzierungen eines eingeschickten Klon eine Mutation im Startcodon von M34 entdeckt, welche zu der Expression eines N-terminal verkürzten pM34-HA_{ATG1mut}, startend am zweiten verfügbaren ATG an Position 216, führen sollte. Dementsprechend wurde im Western Blot ein abweichendes Laufverhalten des kodierten Fusionsproteins festgestellt, welches eine Verkürzung des Proteins bestätigt (Abb.3.9A,B).

Zu beachten ist, dass diese Verkürzungsmutante dennoch den hochkonservierten Teil, der im homologen pUL34 für die DNA-Bindung verantwortlich ist, enthält (Biegalka, 2013; Biegalka *et al.*, 2004). In dem in Abbildung 3.8 gezeigten Alignment von pM34 und pUL34 wurde dieser hochkonservierte Bereich und das Startcodon der pM34-Verkürzungsmutante dargestellt. Im Vergleich von pM34-V5/His und pM34HA wurde auch diese Verkürzungsmutante pM34HA_{ATG1mut} auf eine Bedeutung des N-Terminus auf die pGAS-Promotorinhibition untersucht.

Wie in Abb. 3.9 dargestellt, unterscheiden sich die Fusionsproteine pM34-V5/His und pM34HA in der Inhibition der pGAS-Luziferaseaktivität. Wie in den zuvor beschriebenen Experimenten führt pM34-V5/His zu einer erhöhten Luziferase-Aktivität in unbehandelten und IFN γ -stimulierten Zellen, reduziert aber die Induzierbarkeit des Promotors durch IFN γ . Im Gegensatz dazu reduziert pM34HA die pGAS-kontrollierte Luziferaseaktivität ohne die für pM34-V5/His beobachtete Hintergrundaktivität. Ein Einfluss der V5/His-Epitop-Markierung auf die Hintergrundaktivierung der Reporterexpression kann daher nicht ausgeschlossen werden. Jedoch entspricht die pUL34HA-vermittelte Inhibition der pGAS-Luziferaseaktivität (vergl. Abb. 3.12) trotz der HA-Epitop-Markierung dem für pM34-V5/His beobachteten Effekt.

Der Vergleich zwischen wt-pM34HA und der Verkürzungsmutante pM34HA_{ATG1} zeigt, dass der N-Terminus von pM34HA nicht für die Inhibition der pGAS-Promotoraktivität essenziell ist (s. Abb. 3.9). Dies grenzt den von pM34 für die Inhibition benötigten Sequenzbereichs N-terminal ein und zeigt, dass dieser mit dem Beginn des stark konservierten Teils und somit auch mit den funktionell relevanten Domänen von pUL34 zusammen fällt.

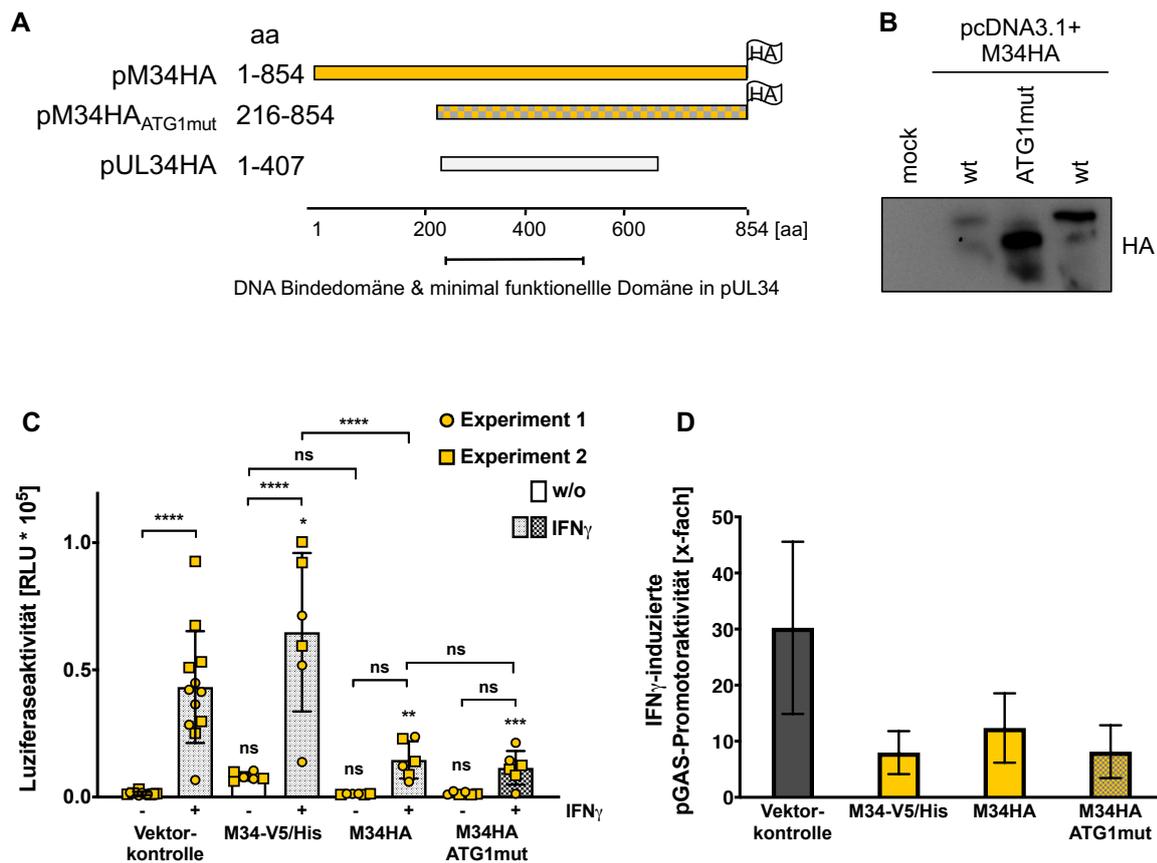


Abbildung 3.9: Der N-Terminus von pM34 ist nicht essenziell für die Inhibition der IFN γ -induzierten Genexpression. (A) Skizze der Fusionsproteine pM34HA, pUL34HA und der Verkürzungsmutante pM34HA_{ATG1mut}. (B) HeLa-Zellen wurden in 12-*well*-Platten mit drei Klonen des Expressionsvektors pcDNA3.1-pM34HA transfiziert und nach 24 h lysiert. Die Expression der Fusionsproteine wurde im Western Blot mittels eines spezifischen HA-Antikörpers detektiert. (C) HeLa-Zellen wurden in 96-*well*-Platten mit dem Reporter-Gen-Konstrukt pGAS-Luc und den Expressionsvektoren pcDNA3.1-M34-V5/His, pcDNA3.1-pM34HA (#6) oder pcDNA3.1-pM34HA_{ATG1mut} (#2) kotransfiziert. Nach 18 bis 24 h wurden die Zellen für 6 h mit IFN γ (250 U/ml) oder nur mit Medium (w/o) inkubiert. Die Messung der Luziferaseaktivität erfolgte in Triplikaten (Kap. 2.2.5). Gezeigt sind die Mittelwerte der Luziferaseaktivität aus zwei unabhängigen Experimenten (*relative light units*, RLU), \pm Standardabweichung. **: $p < 0,005$. ***: $p < 0,001$. ****: $p < 0,0001$. ns: nicht signifikant (*one-way ANOVA with multiple comparisons*). (D) Daten wie in C, gezeigt ist die x-fache Induzierbarkeit \pm relativer Fehler.

Um mögliche unspezifische oder generelle Effekte der Proteine auf die Genexpression zu untersuchen, wurden Experimente mit einem pEF1-Reporterkonstrukt durchgeführt. Der EF1 α -Promotor reguliert die Expression des humanen Gens *EEF1A1* (*alpha subunit of eukaryotic elongation factor 1*) und ist konstitutiv aktiv. Die Reporterexpression unter der Kontrolle des pEF1-Promotors wurde durch eine Inkubation mit IFN γ nicht signifikant erhöht (s. Abb. 3.10). Das verwendete pEF1-Reporterkonstrukt ist daher nicht IFN γ -responsiv und als Kontrolle

zur Bewertung einer IFN γ -unabhängigen Inhibition oder Induktion des Promotors durch die kotransfizierten Gene geeignet.

Interessanterweise wurde die pEF1-regulierte Luziferase-Aktivität sowohl durch pM33-V5/His als auch durch pM34-V5/His inhibiert. Die Reduktion der Promotoraktivität war dabei unabhängig von einer Inkubation mit IFN γ (s. Abb. 3.10A, B). Zu den gleichen Zeitpunkten durchgeführte Kontrollen mit dem pGAS-Reporterkonstrukt bestätigten die zuvor beschriebenen Effekte von pM33 und pM34 auf den pGAS-Promotor sowie die Funktionalität des verwendeten IFN γ (Daten nicht gezeigt). Um Effekte durch die V5/His-Epitop-Markierung auf die Funktion der getesteten Fusionsproteine auszuschließen, wurden die Expressionsvektoren pcDNA3.1-M33HA und pcDNA3.1-M34HA wie oben beschrieben ebenfalls in der Kotransfektion mit pEF1-Luc auf ihre inhibitorische Funktion überprüft. Wie in Abb. 3.10C und D, dargestellt, inhibierte auch die Expression der HA-markierten Proteine pM33HA und pM34HA signifikant die EF1-Promotoraktivität, während erneut keine Induktion oder Inhibition durch IFN γ beobachtet wurde.

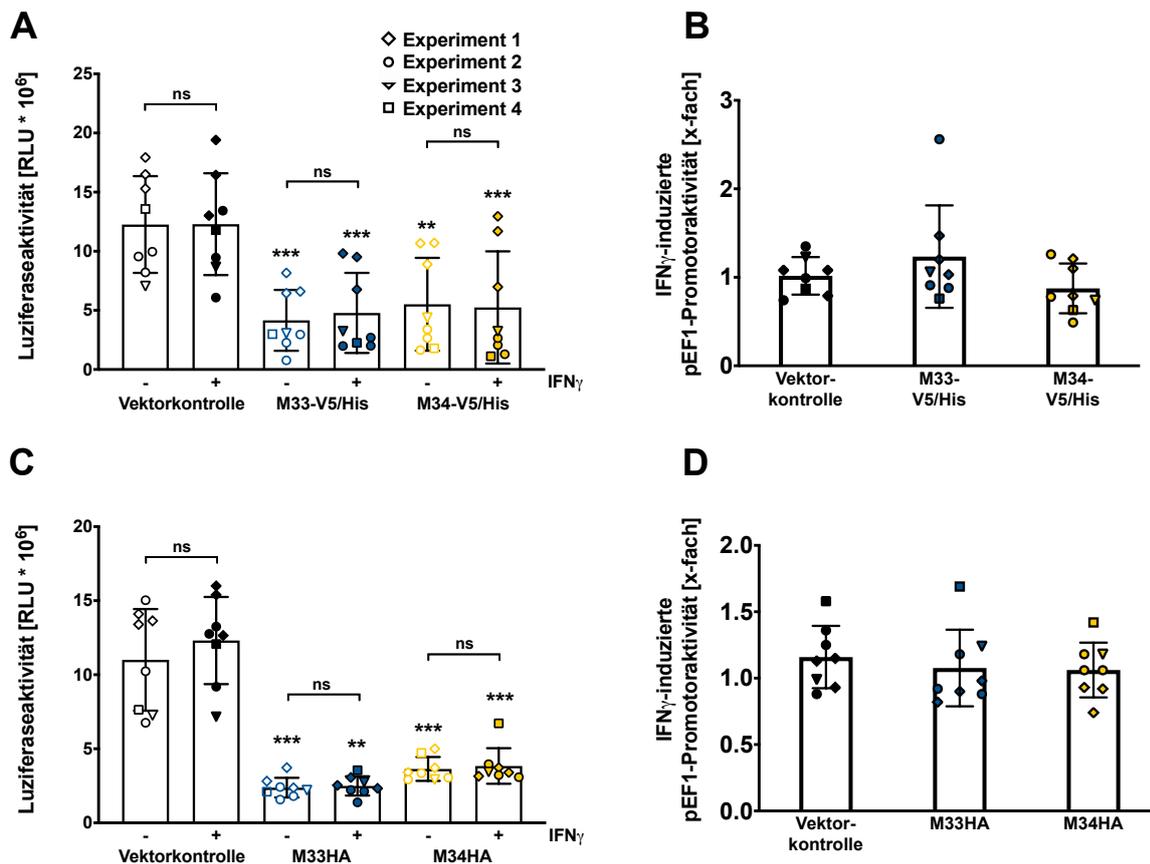


Abbildung 3.10: Die konstitutive EF1-Promotoraktivität wird von pM33 und pM34 $\text{IFN}\gamma$ -unabhängig inhibiert. HeLa-Zellen wurden in 96-well-Platten mit dem Reporter-Gen-Konstrukt pEF1-Luc und den Expressionsvektoren pcDNA3.1-M33-V5/His oder pcDNA3.1-M34-V5/His (A, B), oder pcDNA3.1-M33HA oder pcDNA3.1-M34HA (C, D) kotransfiziert. Nach 18 bis 24 h wurden die Zellen für 6 h mit $\text{IFN}\gamma$ (250 U/ml) oder nur mit Medium (w/o) inkubiert. Die Messung der Luziferaseaktivität erfolgte je Experiment in Triplikaten. Datenpunkte stellen jeweils den Mittelwert aus Triplikaten eines Experiments dar (s. Kap. 2.2.5). (A, C) Gezeigt sind die Mittelwerte der Luziferaseaktivität (*relative light units*, RLU, \pm Standardabweichung) aus acht Experimenten aus unabhängigen Transfektionsansätzen. Die verschiedenen Symbole markieren zum gleichen Zeitpunkt durchgeführte Experimente und Messungen. **: $p < 0,005$. ***: $p < 0,0001$. ns: nicht signifikant (*one-way ANOVA with multiple comparisons* zur entsprechenden Vektorkontrolle oder wie durch Klammern markiert). (B, D) Daten wie in A, und C, gezeigt ist die x-fache Induzierbarkeit \pm relativer Fehler.

3.1.4 Die HCMV-kodierten Homologe UL33 und UL34 inhibieren die $\text{IFN}\gamma$ -induzierte Genexpression

Die Genome von MCMV und HCMV sind kollinear und kodieren für einige homologe Proteine, welche aber nicht zwangsläufig auch funktionelle Homologe sind (Rawlinson *et al.*, 1996).

Das zum IFN-Antagonist pM27 homologe Protein pUL27 ist beispielsweise nicht für die Degradation von STAT2 in HCMV-infizierten Zellen verantwortlich, welche in HCMV durch pM27 vermittelt wird (Le *et al.*, 2008a). Auch für pM33 und pM34 gibt es homologe Proteine in HCMV (s. Abb. 3.6 und 3.8 für Alignments). pM33 ist zu 44% seiner Sequenz identisch mit pUL33 (NCBI BLAST/Alignment, pM33 [Q83207.1] und pUL33 [YP081492.1]). Beide Proteine gehören zu den viralen G-Protein gekoppelten Rezeptorhomologen (vGPCRs) (Davis-Poynter *et al.*, 1997; Chee *et al.*, 1990). pUL34 wurde dagegen bereits als Transkriptionsrepressor viraler Gene charakterisiert (Biegalka *et al.*, 2004; LaPierre und Biegalka, 2001). Die Sequenzen von pUL34 und pM34 sind zu 34% identisch (NCBI BLAST/Alignment, pM34 [YP214047.1]) und pUL34 [YP081493.1]).

Für diese Arbeit sollten die HCMV-kodierten Proteine pUL33 und pUL34 auf eine mögliche Funktionshomologie zu pM33 und pM34 bezüglich einer Inhibition der IFN γ -induzierten Genexpression untersucht werden. Dazu wurden die zuvor beschriebenen pGAS-Promotorassays im Vergleich mit pUL33 und pUL34 durchgeführt. pUL33 zeigte wie pM33 einen inhibitorischen Effekt auf die Luziferase-Aktivität unter der Kontrolle des pGAS-Promotors (s. Abb. 3.11). Dabei wurde wie auch durch pM33 sowohl die nach IFN γ -Induktion gemessene Luziferaseaktivität (RLU) als auch die Induzierbarkeit durch IFN γ im Vergleich zur nicht-induzierten Kontrolle inhibiert.

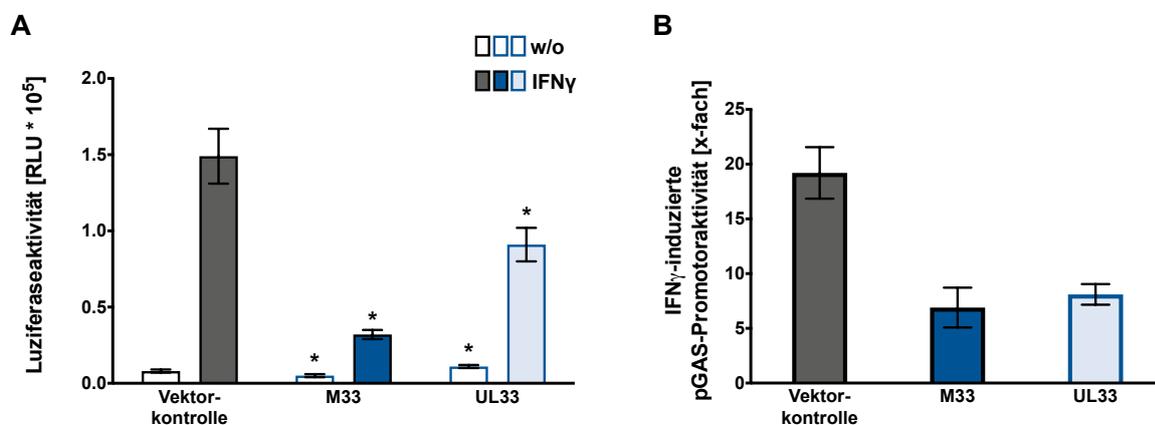


Abbildung 3.11: Das HCMV-kodierte pM33-Homolog pUL33 inhibiert die IFN γ -induzierte GAS-Promotoraktivität. HeLa-Zellen wurden in 48-well-Platten mit dem Reporter-Gen-Konstrukt pGAS-Luc und den Expressionsvektoren pcDNA3.1-M33-V5/His oder pcDNA3.1-pUL33HA kotransfiziert. Nach 18 bis 24 h wurden die Zellen für 6 h mit IFN γ (250 U/ml) oder nur mit Medium (w/o) inkubiert. Die Messung der Luziferaseaktivität erfolgte in Triplikaten (s. Kap. 2.2.5). (A) Gezeigt sind die Mittelwerte der Luziferaseaktivität (*relative light units*, RLU), \pm Standardabweichung eines repräsentativen Experiments. *: $p < 0,05$. ns: nicht signifikant (zweiseitiger T-Test zur entsprechenden Vektorkontrolle, ungleiche Varianz). (B) Daten wie in A, gezeigt ist die x-fache Induzierbarkeit \pm relativer Fehler.

Auch die Expression von pUL34 inhibierte wie pM34 die durch $\text{IFN}\gamma$ -induzierbare pGAS-Promotoraktivität. Es wurde wie für pM34-V5/His eine erhöhte pGAS-kontrollierte Luzifera-sektivität durch pUL34 ohne Inkubation mit $\text{IFN}\gamma$ beobachtet (s. Abb. 3.12). Da eine andere Arbeitsgruppe pUL23 im Verlauf dieser Arbeit als HCMV-kodierten $\text{IFN}\gamma$ -Antagonisten publizierte (Feng *et al.*, 2018), wurde pcDNA3.1-UL23HA (von Dr. Khanh Le-Trilling zur Verfügung gestellt) ebenfalls überprüft. Es konnte bestätigt werden, dass pUL23 die pGAS-abhängige Luziferaseaktivität fast vollständig inhibierte (s. Abb. 3.12A). Die Induzierbarkeit des Promotors durch $\text{IFN}\gamma$ wurde jedoch im Vergleich zu pUL34 durch pUL23 deutlich weniger reduziert (s. Abb. 3.12B).

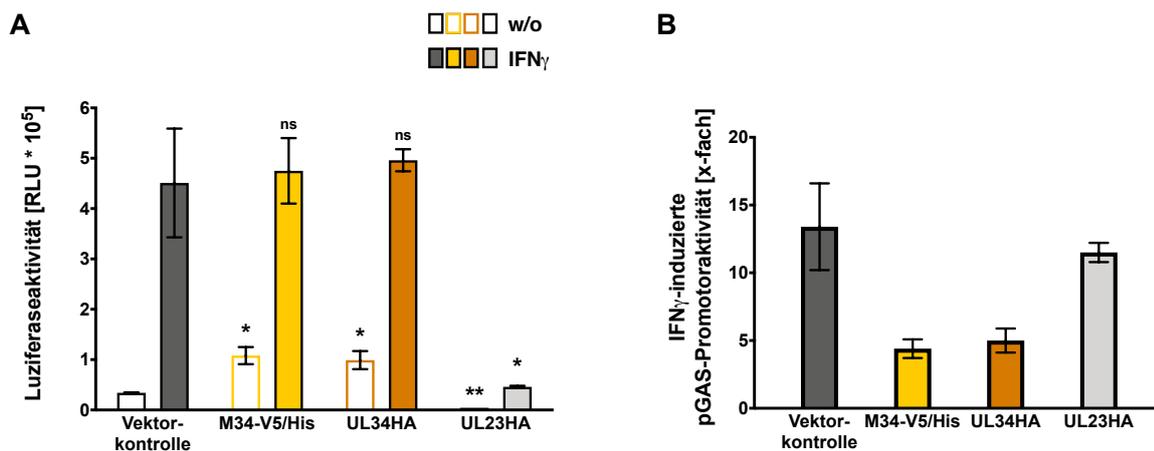


Abbildung 3.12: Das HCMV-kodierte pM34-Homolog pUL34 inhibiert die $\text{IFN}\gamma$ -induzierte GAS-Promotoraktivität. HeLa-Zellen wurden in 96-well-Platten mit dem Reporter-gen-Konstrukt pGAS-Luc und den Expressionsvektoren pcDNA3.1-M34-V5/His, pcDNA3.1-pUL34HA oder pcDNA3.1-UL23HA kotransfiziert. Nach 18 bis 24 h wurden die Zellen für 6 h mit $\text{IFN}\gamma$ (250 U/ml) oder nur mit Medium (w/o) inkubiert. Die Messung der Luziferaseaktivität erfolgte in Triplikaten (s. Kap. 2.2.5). (A) Gezeigt sind die Mittelwerte der Luziferaseaktivität (*relative light units*, RLU), \pm Standardabweichung eines repräsentativen Experiments. *: $p < 0,05$. **: $p < 0,01$. ns: nicht signifikant (zweiseitiger T-Test zur entsprechenden Vektorkontrolle, ungleiche Varianz). (B) Daten wie in A, gezeigt ist die x-fache Induzierbarkeit \pm relativer Fehler.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass beide HCMV-kodierten Proteine, pUL33 und pUL34, die $\text{IFN}\gamma$ -induzierte Genexpression unter der Kontrolle eines GAS-Promotors inhibieren, sodass von einer funktionellen Homologie zu den MCMV-kodierten Proteinen pM33 und pM34 ausgegangen werden kann. Sowohl die MCMV-Proteine pM33 und pM34 als auch die HCMV-kodierten Homologe pUL33 und pUL34 scheinen dabei die $\text{IFN}\gamma$ -induzierte Genexpression des pGAS-Reporterkonstrukts durch verschiedene Mechanismen bzw. auf unterschiedlichen Ebenen der Signaltransduktion zu inhibieren.

Auch pUL33HA und pUL34HA wurden wie ihre MCMV-Homologe auf eine Inhibition der EF1-Promotoraktivität untersucht. Wie die MCMV-kodierten Proteine inhibierten sowohl pUL33HA als auch pUL34HA die EF1-Promotoraktivität (s. Abb. 3.13). Für pUL34 wurde eine spezifische Bindung an DNA mit der Sequenz AAAC[A/G]CCGT[C/G/T] beschrieben (Slayton *et al.*, 2018). Eine Durchsuchung des EF1-Promotors im benutzten Reporter-genkonstrukt pcDNA-EF1-Luc zeigte, dass der Kernbereich CGCCGTG dieser Sequenz nahe des 3'-Endes des EF1-Promotors zu finden ist, und dass nur 8 bp hinter der UL34-Teilbindestelle außerdem eine GAS-Konsensus-Sequenz (TTTTCGCAA) liegt (Decker *et al.*, 1997; Darnell *et al.*, 1994). Beide Bindestellen könnten die beobachtete Inhibition der pEF1-Promotoraktivität durch pM33/pUL33 und pM34/pUL34 erklären.

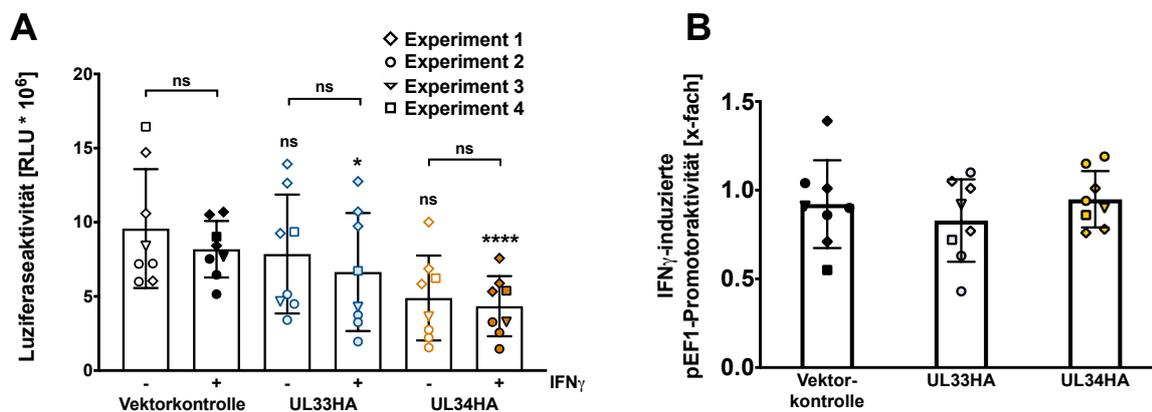


Abbildung 3.13: Die konstitutive EF1-Promotoraktivität wird von pUL33 und pUL34 inhibiert. HeLa-Zellen wurden in 96-well-Platten mit dem Reporter-gen-Konstrukt pEF1-Luc und den Expressionsvektoren pcDNA3.1-UL33HA oder pcDNA3.1-UL34HA kotransfiziert. Nach 18 bis 24 h wurden die Zellen für 6 h mit IFN γ (250 U/ml) oder nur mit Medium (w/o) inkubiert. Die Messung der Luziferaseaktivität erfolgte je Experiment in Triplikaten. Datenpunkte stellen jeweils den Mittelwert aus Triplikaten eines Experiments dar (s. Kap. 2.2.5). (A) Gezeigt sind die Mittelwerte der Luziferaseaktivität (*relative light units*, RLU, \pm Standardabweichung) aus acht Einzelexperimenten. Die verschiedenen Symbole markieren zum gleichen Zeitpunkt durchgeführte Experimente mit unabhängigen Transfektionsansätzen. *: $p < 0,05$. ****: $p < 0,0001$. ns: nicht signifikant (*one-way ANOVA with multiple comparisons* zur entsprechenden Vektor-kontrolle oder wie durch Klammern markiert). (B) Daten wie in A, gezeigt ist die x-fache Induzierbarkeit \pm relativer Fehler.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse eine Inhibition der IFN γ -induzierten GAS-Reporter-genexpression sowie des konstitutiven EF1-Promotors durch pM33, pM34, pUL33 und pUL34. Eine unspezifische Inhibition der Genexpression kann anhand der vorliegenden Daten aktuell nicht ausgeschlossen werden, in Anbetracht der Anwesenheit einer pUL34-Bindestelle sowie einer GAS-Konsensus-Sequenz ist jedoch eine spezifische Inhibition des GAS-Promotors und des EF1-Promotors nach wie vor möglich. Dies sollte in Zukunft mittels Mutagenese der beiden

Sequenzen weiter untersucht werden.

3.2 Generierung und Charakterisierung von M33HA-MCMV und M34HA-MCMV

Zur Charakterisierung der MCMV-kodierten Proteine pM33 und pM34 im Kontext der MCMV Infektion wurden entsprechende Virusmutanten hergestellt. Die Generierung der Virusmutanten wurde mittels BAC-Mutagenese durchgeführt (Tischer *et al.*, 2006; Wagner *et al.*, 2002). *Bacterial artificial chromosomes* (BACs) sind Vektoren mit einer großen Aufnahmekapazität von über 300 kbp DNA und hoher genetischer Stabilität. Von besonderem Vorteil ist die vergleichsweise einfache Mutation der BAC-DNA mittels molekularbiologischer Methoden. Durch die Nutzung der homologen Rekombination in *E. coli* können kleinere gezielte Mutationen, aber auch Insertionen und Deletionen größerer Sequenzabschnitte vorgenommen werden (Tischer und Kaufer, 2012). Nach Selektion der mutierten BACs können die Virusmutanten schließlich mittels Transfektion der BAC-DNA in eukaryotische Zellen rekonstituiert werden. Für die BAC-Mutagenesen in dieser Arbeit wurde das MCMV-Genom des Virusstamms Smith in Form eines bereits vorliegenden BACs verwendet (Jordan *et al.*, 2011).

3.2.1 Generierung von M33HA-MCMV und M34HA-MCMV mittels BAC-Mutagenese

Für die Charakterisierung der Expression von pM33 und pM34 wurden Virusmutanten hergestellt, in denen die Kodierungssequenz (*coding sequence*, CDS) für eine Hämagglutinin-(HA)-Epitop-Markierung *in frame* mit den ORFs *M33* oder *M34* C-terminal inseriert wurde. Die Insertion der HA-Epitop-Markierung erfolgte mittels einer Red $\alpha\beta$ -vermittelten Rekombination in GS1783 *E. coli* (Tischer *et al.*, 2006). Dazu wurde, wie in Kapitel 2.5.1 beschrieben, eine Rekombinationskassette mit zwei zur viralen Insertionssequenz homologen Sequenzen, einer CDS für den Selektionsmarker Kanamycin, einer I-*SceI*-Erkennungssequenz und der CDS für die HA-Epitop-Markierung spezifisch in das BAC integriert (s. Abb. 3.14A). Durch die Insertion der Rekombinationskassette wurden die das BAC-Genom enthaltenden *E. coli* zusätzlich resistent gegen Kanamycin. Nach der positiven Selektion mittels Chloramphenicol- und Kanamycin-haltigen Agarplatten wurde die Integration des *Kanamycin*-Resistenzgens in das BAC mittels Southern Blot (s. Kap. 2.5.3 und Abb. 3.14B) sowie durch eine PCR-Amplifizierung der Insertionsstel-

le (s. Kap. 2.5.5, Daten nicht gezeigt) kontrolliert. In den Klonen M33HA-MCMV #13 und M34HA-MCMV #10 wurde anschließend mittels Arabinose-induzierten Doppelstrangbruchs an der I-*SceI*-Erkennungssequenz die zweite homologe Rekombination zur Entfernung des *Kanamycin*-Resistenzgens erwirkt (s. Kap. 2.5.2.3 und Abb. 3.14C).

E. coli mit den korrekt rekombinierten BACs wurden durch eine negative Selektion und Vereinzelung Kanamycin-sensitiver Klone mittels getrennter Chloramphenicol- und Chloramphenicol-Kanamycin-haltigen Agarplatten sowie nachfolgend mittels PCR-Amplifizierung der Mutationsstelle und anschließender Sequenzierung überprüft (Daten nicht gezeigt). Für die Rekonstitution (s. Kap. 2.5.6) der erwünschten Virusmutanten wurde die BAC-DNA der Klone M33HA-MCMV #13.1 und M34HA-MCMV #10.14 verwendet. Nach der Virusrekonstitution wurde in den Lysaten infizierter Zellen per Western Blot (s. Kap. 2.3 und Abb. 3.14D) die Expression der HA-Epitop-Markierung Proteine pM33HA und pM34HA nachgewiesen (s. Abb. 3.14D).

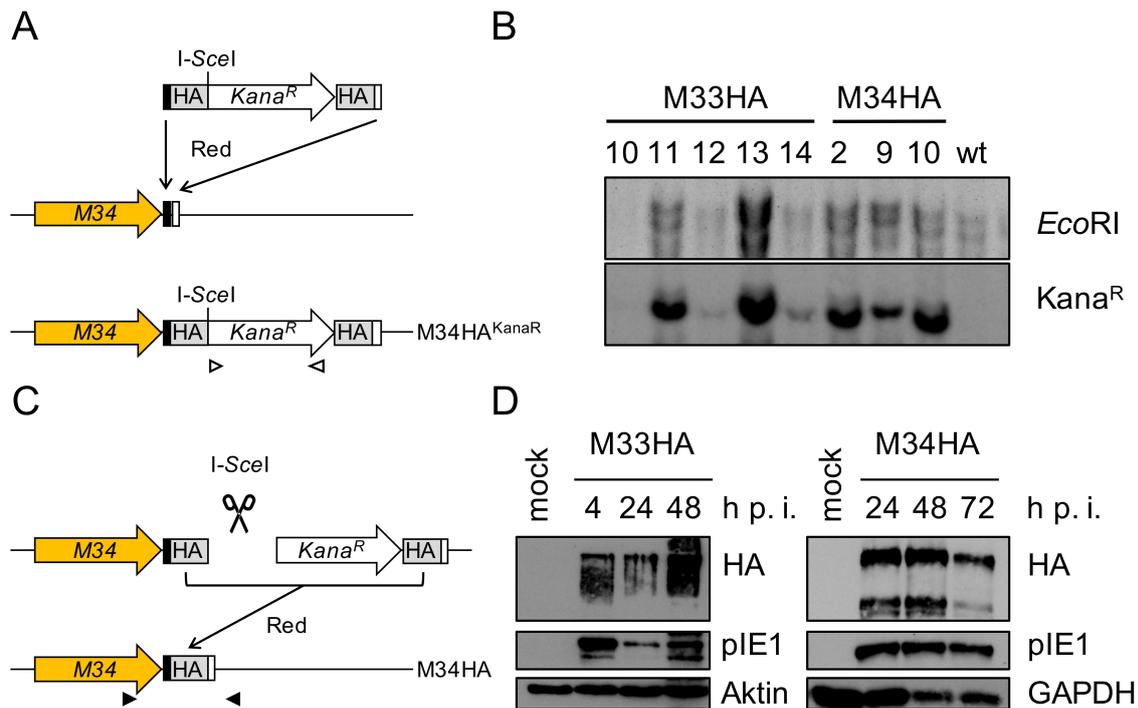


Abbildung 3.14: Generierung von M33HA-MCMV und M34HA-MCMV mittels BAC-Mutagenese. (A) Schema zur Insertion einer HA-Epitop-Markierung mittels BAC-Mutagenese (exemplarisch für M34HA-MCMV, Kap. 2.5.1). *M34*: *M34* ORF (gelb), *Kana^R*: Kanamycin Resistenzgen (weiß), schwarze Boxen: 5' homologe Region, weiße Boxen: 3' homologe Region, HA: HA-Epitop-Markierung (hellgrau), *I-SceI*: *I-SceI*-Restriktionsschnittstelle, Red: Red-Rekombinase (aus λ -Bakteriophagen), schwarze Pfeilspitzen: Bindestellen Sequenzierprimer. (B) BAC-DNA wurde mittels *EcoRI*-Restriktion gespalten und die Fragmente per Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Insertion des *Kanamycin*-Resistenzgens wurde mittels Southern Blot bestätigt. (C) Schema der zweiten homologen Rekombination zur Entfernung des *Kanamycin*-Resistenzgens nach Arabinose-induzierter *I-SceI*-Expression und Doppelstrangbruch an der *I-SceI*-Erkennungssequenz. (D) Die Expression der HA-Fusionsproteine in M33HA-MCMV- und M34HA-MCMV-infizierten Zellen (MOI 3) wurde zu den angegebenen Zeitpunkten per Western Blot mittels eines HA-spezifischen Antikörpers kontrolliert.

3.2.2 pM34HA wird mit einer early/late Expressionskinetik exprimiert

Für eine Charakterisierung der Expression von pM34HA während der MCMV-Infektion wurden CIM-Zellen mit M34HA-MCMV infiziert (s. Kap. 2.6.1) und die Proteinexpression detektiert. Dazu wurden infizierte Zellen 4, 24, und 48 h nach der Infektion lysiert und per Western Blot (s. Kap. 2.3.4) analysiert.

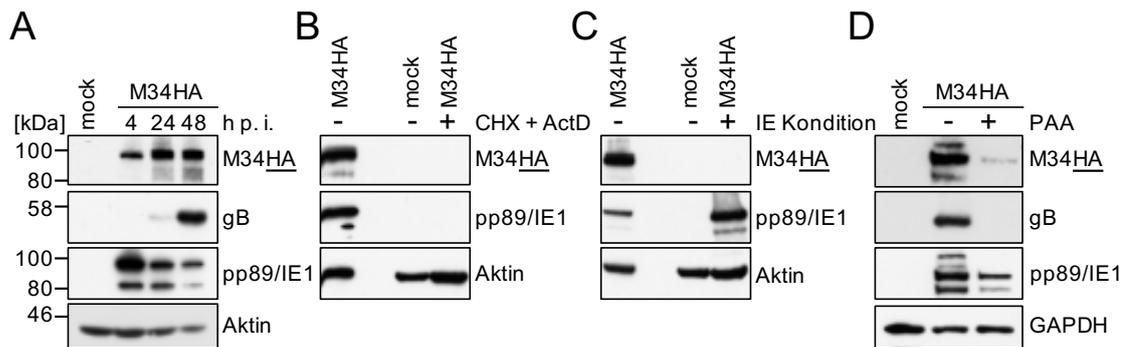


Abbildung 3.15: pM34HA wird mit einer early/late Expressionskinetik exprimiert. (A) CIM-Zellen wurden mit M34HA-MCMV (MOI 10) infiziert oder uninfiziert gelassen (mock). Nach 4, 24 und 48 h wurden die Zellen lysiert und im Western Blot mittels der angegebenen spezifischen Antikörper detektiert. (B) CIM-Zellen wurden kurz mit 50 $\mu\text{g/ml}$ Cycloheximid (CHX) und 5 $\mu\text{g/ml}$ ActD vorinkubiert und mit oder ohne Anwesenheit der Inhibitoren mit M34HA-MCMV (MOI 10) infiziert oder uninfiziert gelassen (mock). Nach 4 h wurden Lysate angefertigt und mittels Western Blot analysiert. (C) CIM-Zellen wurden mit CHX vorinkubiert oder unbehandelt gelassen und mit M34HA-MCMV oder mock infiziert (MOI 10). Nach 4 h Inkubation wurde CHX ausgewaschen, die Zellen mit ActD für weitere 4 h inkubiert und anschließend lysiert. (D) CIM-Zellen wurden mit PAA vorinkubiert oder unbehandelt gelassen, mit M34HA-MCMV oder mock infiziert (MOI 10) und nach 48 h Inkubation lysiert.

Die Expression von pM34HA wurde bereits 4 h nach Infektion detektiert (s. Abb. 3.15A). Die Laufhöhe der prominentesten Bande bei etwa 90 bis 100 kDa entspricht dem vorhergesagten Molekulargewicht von 94,5 kDa (Rawlinson *et al.*, 1996). Bei einer Infektion während gleichzeitiger Anwesenheit von CHX und ActD zur Inhibition der viralen Genexpression wurde pM34HA dagegen nicht detektiert (s. Abb. 3.15B), sodass ein Vorhandensein von pM34HA im Virion, wie bereits beschrieben (Kattenhorn *et al.*, 2004), ausgeschlossen werden kann. Zur Untersuchung der Expressionskinetik von pM34HA wurde mittels reversibler Translations-Inhibition (CHX) gefolgt von einer Inhibition der Transkription mit ActD eine ausschließliche Expression von *immediate early* (I/E) Genen erwirkt (s. Kap. 2.6.4). Unter diesen Bedingungen konnte pM34HA im Gegensatz zu pp89/IE1 nicht detektiert werden (s. Abb. 3.15C). Ein Teil der Zellen wurde zudem 25 min vor der Infektion mit 250 μM PAA behandelt, um die virale Genomreplikation und somit die Expression von *late* Genen zu hemmen (s. Kap. 2.6.5). Die Expression von pM34HA nach 48 h wurde durch die Inhibition der viralen Replikation stark reduziert, jedoch nicht vollständig inhibiert, während das als Kontrolle detektierte *late* Gen gB vollständig inhibiert wurde (s. Abb. 3.15D). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen daher, dass die Expression von pM34HA einer *early late* Kinetik unterliegt (Eilbrecht *et al.*, 2020).

3.2.3 pM34HA ist nukleär lokalisiert

Für die HCMV-kodierten pUL34 Proteine wurde bereits eine nukleäre Lokalisation beschrieben (Rana und Biegelke, 2014). Da der hochkonservierte Sequenzbereich von pM34 und pUL34 die notwendigen Domänen für die DNA Bindung, transkriptionelle Regulation und nukleäre Lokalisation von pUL34 enthält (Biegelke, 2013; Biegelke *et al.*, 2004), liegt bei einer möglichen funktionellen Homologie eine damit einhergehende nukleäre Lokalisation von pM34 nahe. Für die Analyse der subzellulären Lokalisation von pM34HA im direkten Vergleich mit pUL34HA wurden HeLa-Zellen mit den Expressionsvektoren pcDNA3.1-UL34HA oder pcDNA3.1-M34HA transfiziert (s. Kap. 2.2.4). Nach 24 h wurden die exprimierten Proteine mittels der Antikörper α -HA und α -rabbit-Cy2 spezifisch gefärbt und detektiert (s. Kap. 2.3.5). In der Immunfluoreszenzmikroskopie zeigte sich in UL34HA-exprimierenden Zellen eine mit der DAPI-Färbung übereinstimmende HA-Färbung, konsistent mit vorherigen Daten der nukleären Lokalisation von pUL34 (Rana und Biegelke, 2014). M34HA-exprimierende Zellen wiesen die gleiche mit der DAPI-gefärbten DNA überlagernde HA-Färbung auf. In untransfizierten Zellen wurde dagegen keine unspezifische Färbung der Zellkerne beobachtet. Die Färbung der HA-Epitop-markierten Proteine pUL34HA und pM34HA ist daher spezifisch und zeigt eine nukleäre Lokalisation beider homologen Proteine in transient transfizierten HeLa-Zellen.

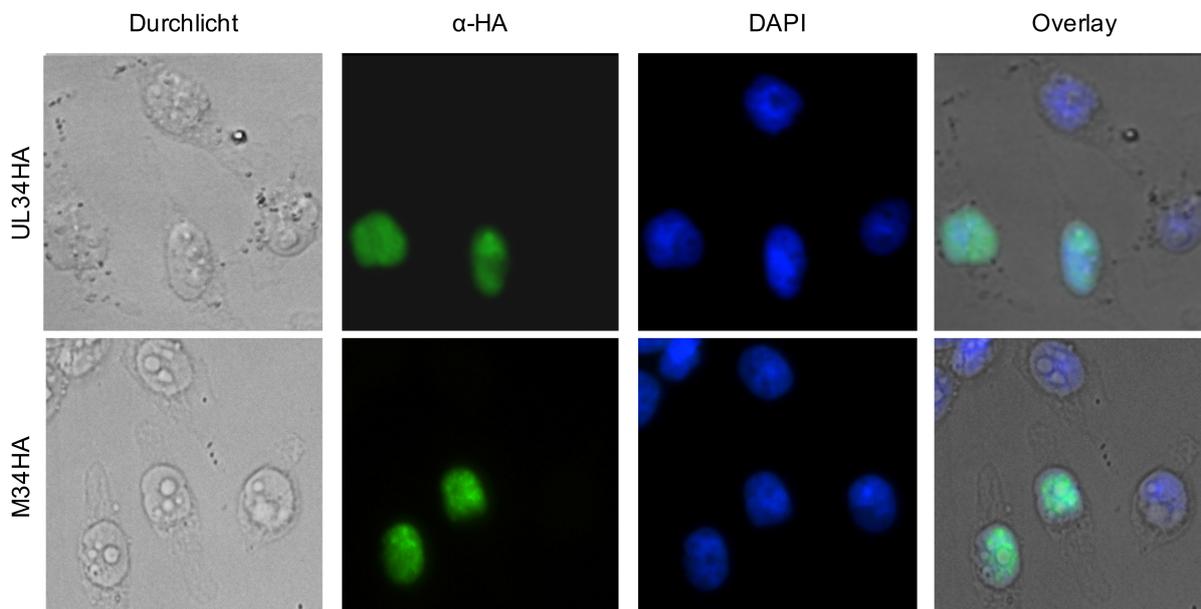


Abbildung 3.16: Nukleäre Lokalisation von pM34HA in transfizierten HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden mit den Expressionsvektoren pcDNA3.1-UL34HA oder pcDNA3.1-M34HA transfiziert, nach 24 h fixiert und mit Triton X-100 permeabilisiert. Die Proteine wurden anhand der HA-Epitop-Markierung mit dem Primärantikörper α -HA (Spezies Kaninchen) und dem Sekundärantikörper α -rabbit-Cy2 gefärbt. Für die Kernfärbung wurde DAPI verwendet. Vergrößerung: 40-fach.

Für eine Bestätigung der nukleären Lokalisation von pM34HA in MCMV-infizierten Zellen wurden CIM-Zellen mit M34HA-MCMV infiziert (s. Kap. 2.6.1) und 24 h nach Infektion wie zuvor beschrieben eine Immunfluoreszenz-Färbung durchgeführt. Zur Beurteilung einer möglichen, unspezifischen Hintergrundfärbung wurden wt-MCMV-infizierte und uninfizierte Zellen auf die gleiche Weise gefärbt. Um unspezifische Bindungen des Fc-Teils der verwendeten Antikörper an MCMV-kodierte Fc-bindende Proteine zu reduzieren, wurde als Blockierungslösung Serum von MCMV-naiven Mäusen anstelle des üblichen FBS verwendet und auf eine Nutzung von Antikörpern aus der Maus verzichtet. Wie in Abbildung 3.17 dargestellt, wurde pM34HA in den Nuklei der M34HA-MCMV-infizierten Zellen, aber nicht in den benachbarten, uninfizierten Zellen detektiert. In der uninfizierten mock-Kontrolle wurde keine Färbung beobachtet (s. Abb. 3.17). Eine schwache unspezifische Hintergrundfärbung in wt-MCMV infizierten Zellen konnte nur bei deutlich verlängerten Belichtungszeiten beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen eine Kernlokalisierung von M34HA auch in MCMV-infizierten Zellen (Eilbrecht *et al.*, 2020).

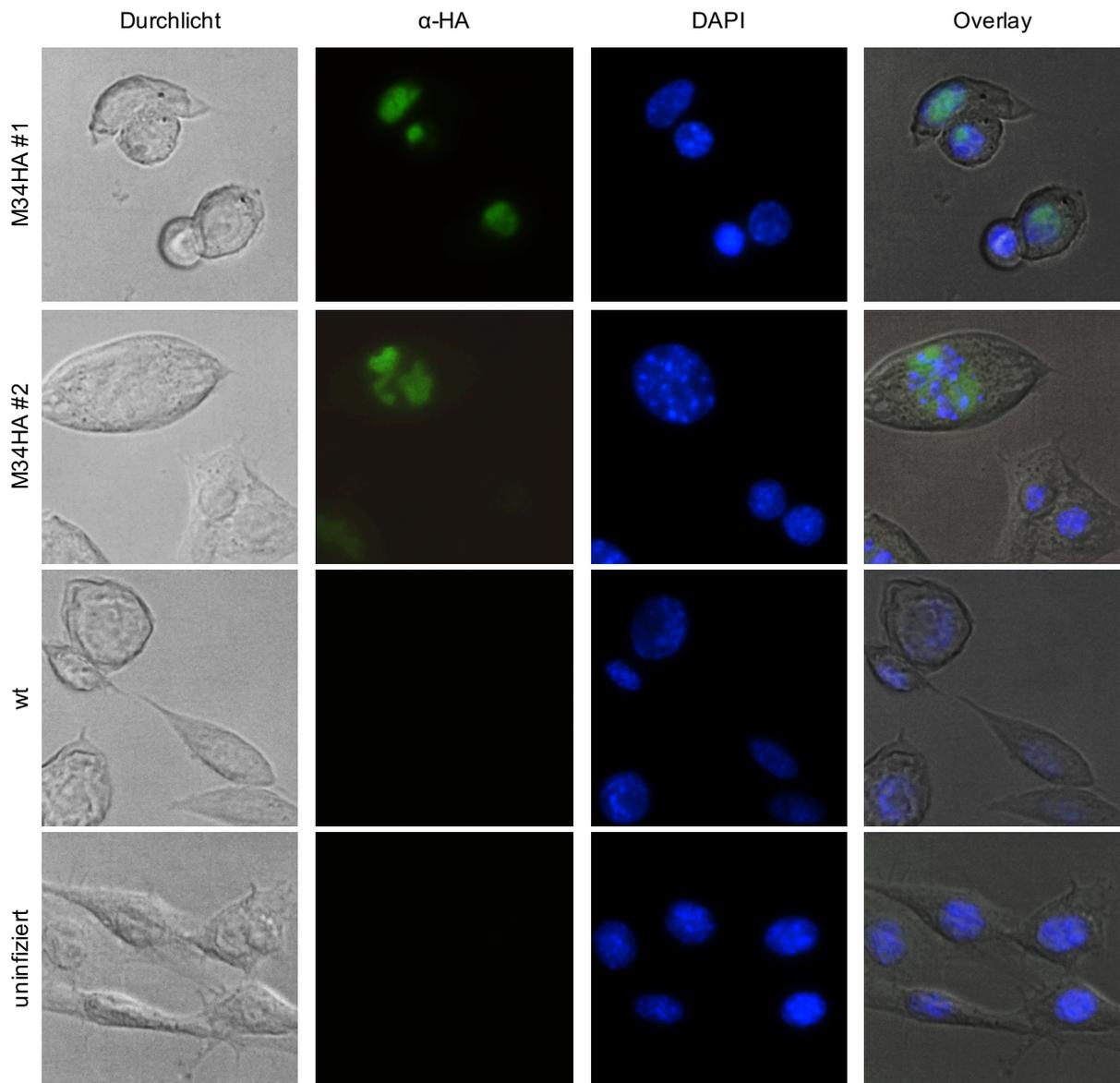


Abbildung 3.17: Nukleäre Lokalisation von pM34HA in infizierten CIM-Zellen. CIM-Zellen wurden mit M34HA-MCMV oder wt-MCMV infiziert (MOI 0,7) oder uninfiziert gelassen (mock). Nach 24 h wurden die Zellen fixiert, mit Triton X-100 permeabilisiert und mit dem Primäntikörper α -HA (Spezies Kaninchen) und dem Sekundäntikörper α -rabbit-Cy2 gefärbt. Für die Kernfärbung wurde DAPI verwendet. Vergrößerung: 40-fach.

3.3 Generierung der Deletionsviren $\Delta M33$ -MCMV und $\Delta M34$ -MCMV mittels BAC-Mutagenese

Zur Charakterisierung der Bedeutung der MCMV-kodierten Gene *M33* und *M34* für die Virusreplikation wurden die ORFs spezifisch aus dem MCMV-BAC deletiert (s. Kap. 2.5.2). Für die Deletion wurden mittels PCR Deletionskassetten generiert, welche ein *Kanamycin*-Resistenzgen enthielten, das von zwei *frt*-Sequenzen und zwei zu den ORF-benachbarten Bereichen des viralen Genoms homologen Sequenzen flankiert wurden (s. Abb. 3.18A,C). Durch die Red $\alpha\beta$ -Rekombinasesystem-vermittelte homologe Rekombination in GS1783 *E. coli* wurden die zu deletierenden ORFs mit der Deletionskassette ersetzt, und die *E. coli* somit durch das eingebrachte *Kanamycin*-Resistenzgen gegen Kanamycin resistent. Die Insertion des *Kanamycin*-Resistenzgens wurde mittels Southern Blot (s. Kap. 2.5.3 und Abb. 3.18B,D) kontrolliert. Die Deletion der Zielgene durch den Austausch mit der Deletionskassette wurde zusätzlich mittels PCR überprüft (Daten nicht gezeigt). Nach der Rekonstitution sowie von jedem neuen Virusstock wurde die virale DNA aus den infizierten Zellen extrahiert und mittels PCR (s. Kap. 2.5.4) auf die zu deletierenden Gene kontrolliert (s. Abb. 3.18E).

3.3.1 *M33* und *M34* sind nicht essenziell für die MCMV-Replikation *in vitro*

Die erfolgreiche Rekonstitution und Generierung normal konzentrierter Virusstocks der Deletionsmutante $\Delta M33$ -MCMV bestätigt, dass *M33* für die Virusreplikation *in vitro* nicht essenziell ist. Dies ist mit bereits publizierten Daten konsistent, nach denen die Replikation von $\Delta M33$ -MCMV *in vivo* in der Speicheldrüse attenuiert ist, aber *in vitro* in Fibroblasten wie wt-MCMV repliziert (Sherrill *et al.*, 2009; Case *et al.*, 2008; Davis-Poynter *et al.*, 1997).

Im Gegensatz zu *M33* wurde *M34* von Baluchova *et al.* als essenziell beschrieben (Baluchova *et al.*, 2008). Überraschenderweise gelang entgegen dieser vorherigen Publikation auch für $\Delta M34$ -MCMV die Rekonstitution replikationsfähiger Viren. Dabei war jedoch die Rekonstitutionsdauer im Vergleich zu wt-MCMV deutlich verlängert. Eine erste Plaquebildung in der Rekonstitution von $\Delta M34$ -MCMV wurde erst nach 17 Tagen beobachtet, und bis zur Infektion aller Zellen zur Generierung eines ersten Virusstocks wurden insgesamt 24 Tage benötigt. Auch für die Produktion aller weiteren Virusstocks waren deutlich längere Infektionszeiten und eine größere Menge an Zellen als für wt-MCMV erforderlich, welche dennoch in geringerer Ausbeute an infektiösen Einheiten (Plaque forming units, PFU) resultierte. Dies deutet auf eine reduzierte

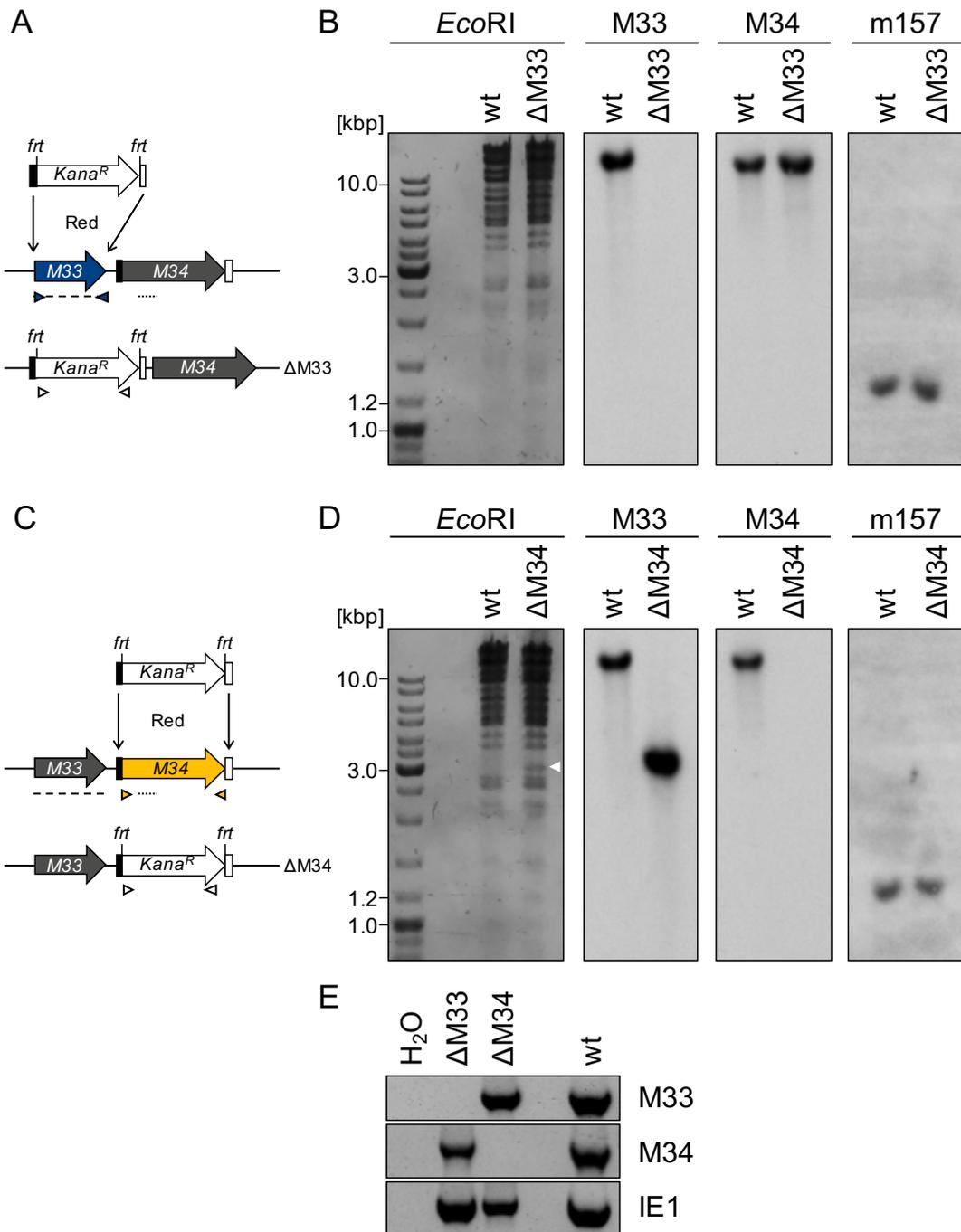


Abbildung 3.18: Generierung von $\Delta M33$ -MCMV und $\Delta M34$ -MCMV mittels BAC-Mutagenese. (A, C) Schemata zur Deletion von *M33* und *M34* mittels BAC-Mutagenese (s. Kap. 2.5.2). *M33*: *M33* ORF (blau), *M34*: *M34* ORF (gelb), Kana^R: Kanamycin Resistenzgen (weiß), schwarze Boxen: 5' homologe Region, weiße Boxen: 3' homologe Region, frt: Flippase-Erkennungssequenz, Red: Red-Rekombinase (aus λ -Bakteriophagen), gestrichelte Linien: *M33*-Sonde, gepunktete Linien: *M34*-Sonde, blaue, gelbe und weiße Pfeilspitzen: Bindestellen PCR-Kontrollprimer. (B, D) Die Deletion der ORFs *M33* und *M34* aus der BAC-DNA wurde mittels Southern Blot bestätigt. (E) Die Deletion von *M33* und *M34* aus dem Genom replizierender Viren wurde mittels PCR der DNA aus infizierten Zellen kontrolliert.

Replikation von Δ M34-MCMV in den verwendeten murinen Fibroblasten hin (CIM).

Um Effekte der integrierten Deletionskassette auf die Replikation der Virusmutanten auszuschließen, wurde das *Kanamycin*-Resistenzgen mittels der flankierenden *frt*-Sequenzen wieder aus dem BAC-Genom entfernt (s. Kap. 2.5.2.3 und Abb. 3.19). Dazu wurden die entsprechenden BACs in DH10B *E. coli* eingebracht und diese mit dem Flippase-kodierenden Expressionsvektor pCP20 transformiert. Durch die folgende Flippase-vermittelte homologe Rekombination wurde das zwischen den *frt*-Sequenzen liegende *Kanamycin*-Resistenzgen deletiert (s. Abb. 3.19A,D). Mittels getrennter Chloramphenicol- und Chloramphenicol-Kanamycin-haltigen Agarplatten wurden Kanamycin-sensitive Klone ermittelt und anschließend per Southern Blot (s. Kap. 2.5.3) auf die Deletion des *Kanamycin*-Resistenzgens kontrolliert (Daten nicht gezeigt). Ausgehend von den BACs Δ M33^{KanaR}- und Δ M34^{KanaR}- konnten erneut die entsprechenden Deletionsviren rekonstituiert werden. Die Deletion wurde mittels PCR basierend auf extrahierter DNA infizierter Zellen bestätigt (s. Kap. 2.5.4 und Abb. 3.19B,C,E,F). Für die Rekonstitution von Δ M34^{KanaR}-MCMV war wie zuvor eine deutlich verlängerte Kultivierungsdauer notwendig.

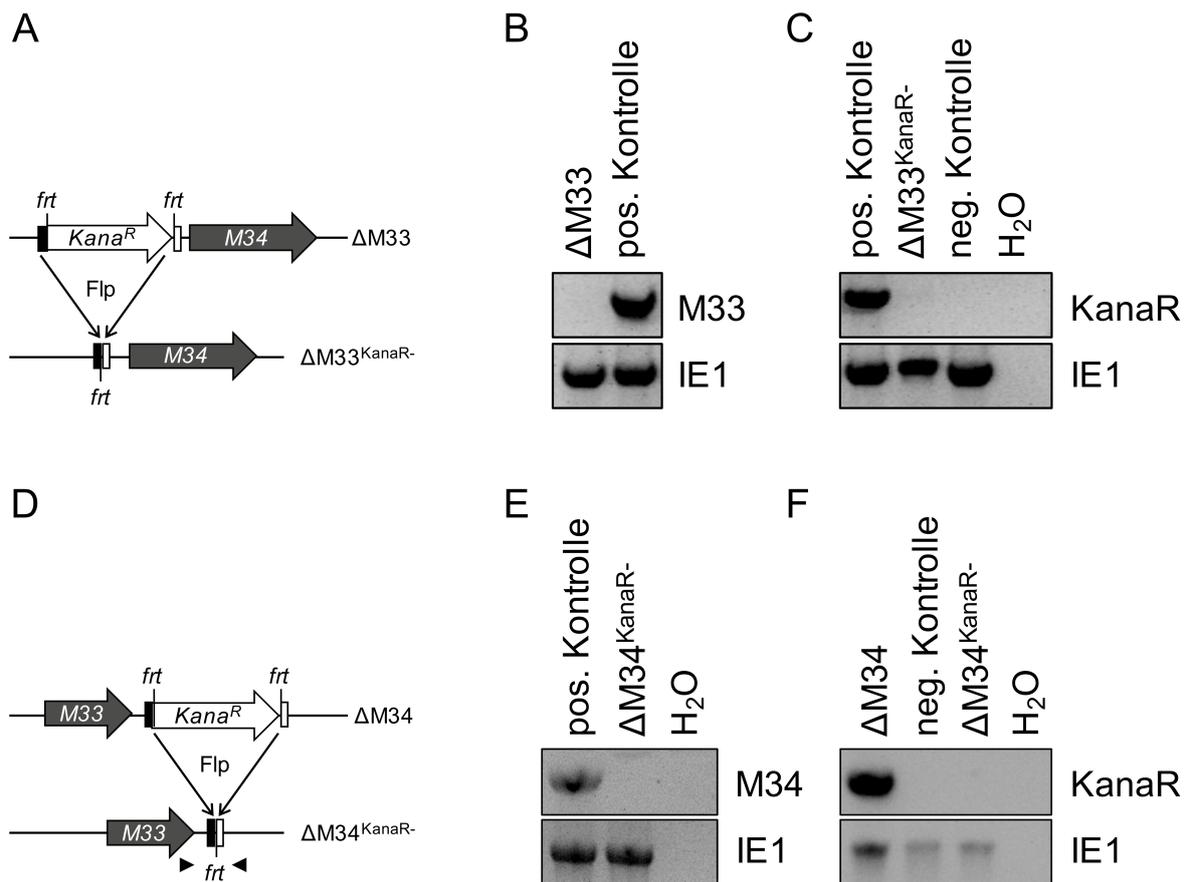


Abbildung 3.19: Deletion des Kanamycin-Resistenzgens aus $\Delta M33$ -MCMV und $\Delta M34$ -MCMV. (A, D) Schemata zur Deletion des Kanamycin-Resistenzgens mittels BAC-Mutagenese (s. Kap. 2.5.2). $M33$: $M33$ ORF (grau), $M34$: $M34$ ORF (grau), $Kana^R$: Kanamycin Resistenzgen (weiß), schwarze Boxen: 5' homologe Region, weiße Boxen: 3' homologe Region, frt : Flippase-Erkennungssequenz, Flp : Flippase, graue Pfeilspitzen: Bindestellen für Sequenzierungs-Primer. (B, C, D, E) Die Deletion des Kanamycin-Resistenzgens (C, F) und der ORFs $M33$ (B) und $M34$ (E) wurde mittels PCR bestätigt. Die Deletion von $M34$ wurde zusätzlich mittels Sequenzierung des entsprechenden Sequenzabschnitts bestätigt (Daten nicht gezeigt).

3.4 Die Replikation von $\Delta M34$ -MCMV- und $\Delta M33$ - $\Delta M34$ -MCMV ist *in vitro* attenuiert

Wie zuvor erwähnt beschrieben Baluchova *et al.* $M34$ als nicht rekonstituierbar und folglich als essenziell für die Virusreplikation (Baluchova *et al.*, 2008). Im Rahmen dieser Arbeit konnte dagegen replizierendes Virus mit einer vollständigen Deletion des $M34$ ORFs rekonstituiert werden (Eilbrecht *et al.*, 2020). Für eine quantitative Beurteilung der Replikation von $\Delta M34$ -MCMV *in vi-*

tro wurden Wachstumskinetiken durchgeführt. MNC wurden mit $\Delta M33$ -MCMV, $\Delta M34$ -MCMV und wt-MCMV vergleichend infiziert (MOI 0,01) und die Menge an Virus nach 1, 3 und 4 Tagen Infektionsdauer mittels *Plaque Titration Assay* ermittelt (s. Kap. 2.6.8). Dabei replizierte $\Delta M33$ -MCMV wie wt-MCMV, die Infektion mit $\Delta M34$ -MCMV zeigte dagegen eine je nach Experiment 10- bis 100-fach reduzierte Replikation im Vergleich zu wt-MCMV (s. Abb. 3.20).

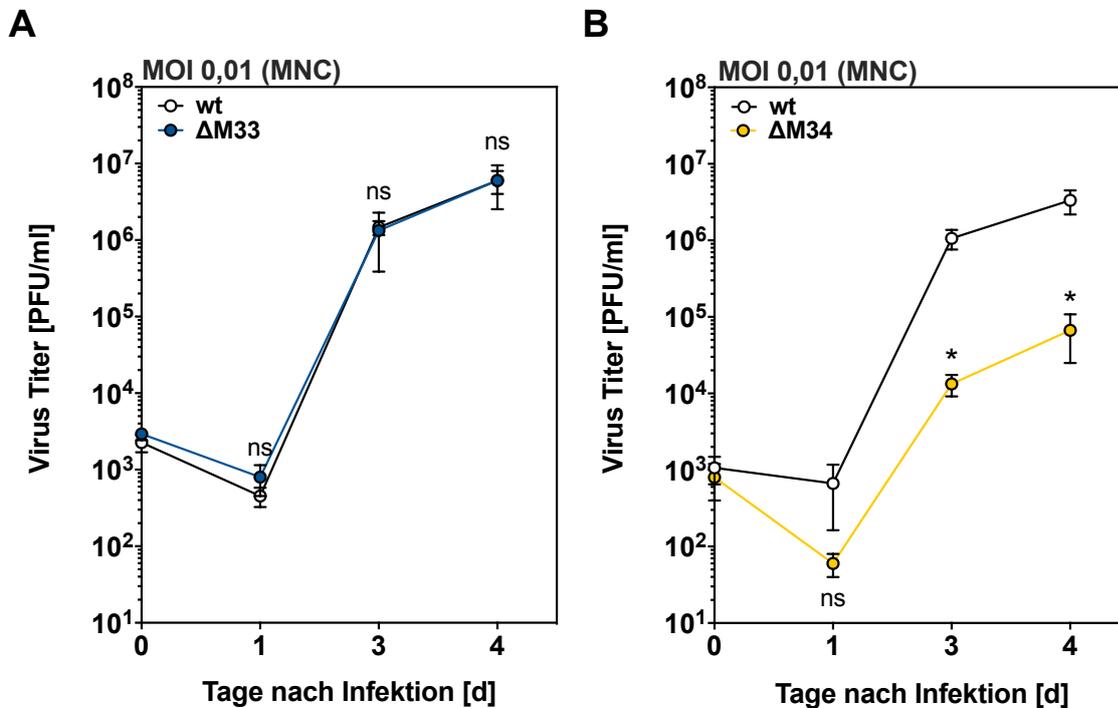


Abbildung 3.20: $\Delta M34$ -MCMV ist *in vitro* attenuiert. Primary mouse newborn cells (MNC) wurden mit wt-MCMV, $\Delta M33$ -MCMV oder $\Delta M34$ -MCMV infiziert (MOI 0,01). Ein, drei und vier Tage nach Infektion wurden die Virustiter mittels *Plaque Titration Assay* quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus Triplikaten \pm Standardabweichung. *: $p < 0,05$. ns: nicht signifikant (zweiseitiger T-Test).

M33 und *M34* liegen als direkt benachbarte ORFs in einer Genomregion zusammen mit weiteren MCMV-kodierten Antagonisten des angeborenen Immunsystems wie pM27 und pM35 (Chan *et al.*, 2017; Trilling *et al.*, 2011; Rawlinson *et al.*, 1996). Die räumliche Nähe der ORFs könnte auf einen funktionellen Zusammenhang, aber auch auf eine ähnliche, voneinander abhängige oder gegensätzliche Regulation der Expression umliegender Gene durch naheliegende Promotoren, Enhancer- oder Repressorelemente hindeuten. Eine Deletion eines der beiden Gene könnte daher Effekte auf die Expression und Funktion des verbliebenen Gens haben. Außerdem wäre eine Redundanz der beiden Kandidaten für den $IFN\gamma$ -Antagonismus, *M33* und *M34*, denkbar, welche die Beobachtung eines Phänotyps bei Deletion nur eines der beiden Gene erschweren würde. Es wurde daher wie in Kapitel 2.5.2 beschrieben ein $\Delta M33$ - $\Delta M34$ -MCMV-BAC für eine

Doppeldeletionsmutante generiert, rekonstituiert und wie für die Einzeldelensionsviren (s. Abb. 3.3) die erfolgreiche Deletion von *M33* und *M34* kontrolliert (Daten nicht gezeigt). Die erfolgreiche, aber ebenso verzögerte Rekonstitution dieser Doppeldeletionsmutante $\Delta M33\text{-}\Delta M34\text{-MCMV}$ bestätigt eine wichtige Rolle von *M34* für die Virusreplikation.

CIM-Zellen wurden im Anschluss mit $\Delta M33\text{-MCMV}$, $\Delta M34\text{-MCMV}$ und der Doppeldeletionsmutante $\Delta M33\text{-}\Delta M34\text{-MCMV}$ infiziert und vergleichend mit wt-MCMV auf Replikationsdefizite untersucht. Wie in Abb. 3.21 dargestellt, entspricht die Replikation von $\Delta M33\text{-}\Delta M34\text{-MCMV}$ nahezu der attenuierten Replikation von $\Delta M34\text{-MCMV}$. Eine zusätzliche Deletion von *M33*, dessen Verlust alleine nicht zu einer Reduktion der Virusreplikation führte, zeigte keinen signifikanten additiven Effekt auf die Virusreplikation in Fibroblasten, wenn *M34* deletiert ist.

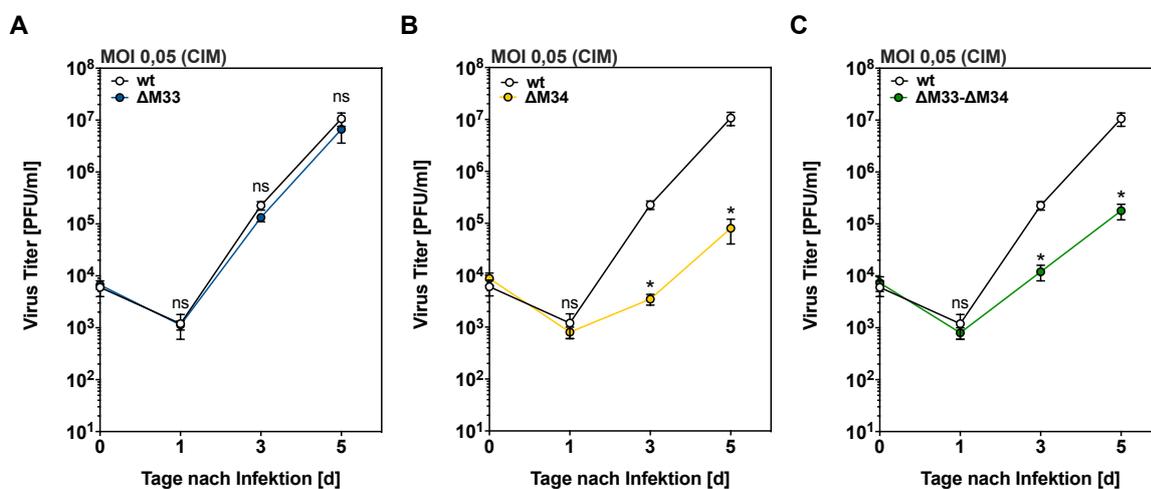


Abbildung 3.21: $\Delta M33\text{-}\Delta M34\text{-MCMV}$ ist *in vitro* attenuiert. CIM-Zellen wurden mit einer MOI von 0,05 mit wt-MCMV, $\Delta M33\text{-MCMV}$, $\Delta M34\text{-MCMV}$ oder $\Delta M33\text{-}\Delta M34\text{-MCMV}$ infiziert und die Virustiter nach ein, drei und fünf Tagen mittels *Plaque Titration Assay* bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus Triplikaten \pm Standardabweichung. *: $p < 0,05$. ns: nicht signifikant (zweiseitiger T-Test, ungleiche Varianz).

Die attenuierte Replikation in Abwesenheit der CDS von *M34* wurde in mehreren unabhängigen Experimenten mit verschiedenen MOIs und Zellen beobachtet (s. Abb. 3.22).

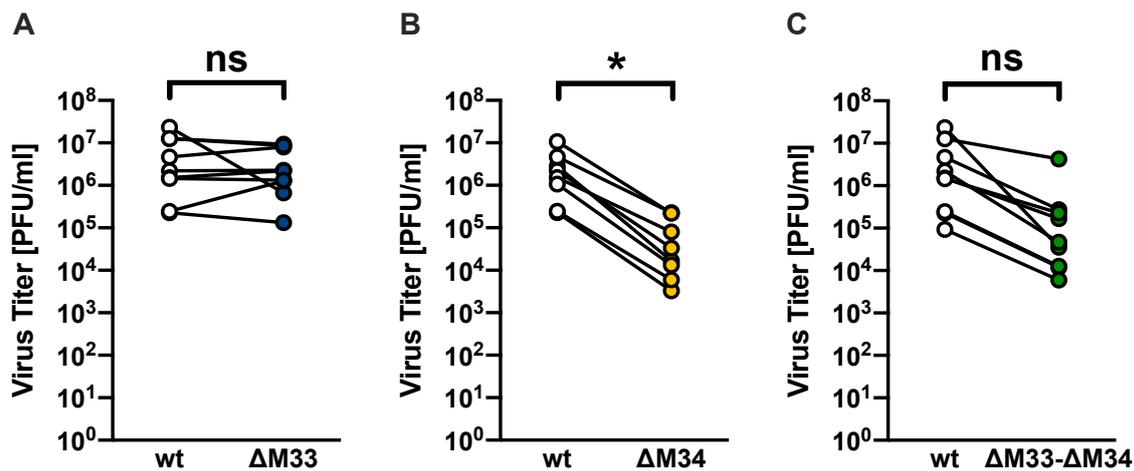


Abbildung 3.22: Die Replikation von Δ M34-MCMV und Δ M33- Δ M34-MCMV ist sowohl in primären Zellen als auch in immortalisierten Fibroblasten attenuiert. Zusammenfassende Darstellung mehrerer Experimente mit wt-MCMV und Δ M33-MCMV (A), Δ M34-MCMV (B) oder Δ M33- Δ M34-MCMV (C) (MOI 0,01 bis 0,05) in CIM- und MNC-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte der Titer von Tag drei (3 d p. i., *Plaque Titration Assay*) aus Triplikaten \pm Standardabweichung. *: $p < 0,05$. ns: nicht signifikant (*paired t-test*). Ein Teil der Daten wurde auch in anderen Abbildungen dieser Arbeit gezeigt.

Eine vergleichende Analyse der Virusmutanten Δ M34-MCMV und Δ M34^{KanaR}-MCMV zeigte zudem, dass die attenuierte Replikation unabhängig von der integrierten Kanamycinkassette ist. Zwischen den Mutanten Δ M34-MCMV, in welcher die *Kanamycin*-Resistenzgenkassette noch integriert ist, und Δ M34^{KanaR}-MCMV mit deletierter Kassette (s. Abb. 3.23A) wurde kein signifikanter Unterschied in der Replikation festgestellt (s. Abb. 3.23B). Die integrierte *Kanamycin*-Resistenzgenkassette kann daher als Ursache für die attenuierte Replikation von Δ M34-MCMV ausgeschlossen werden (Eilbrecht *et al.*, 2020).

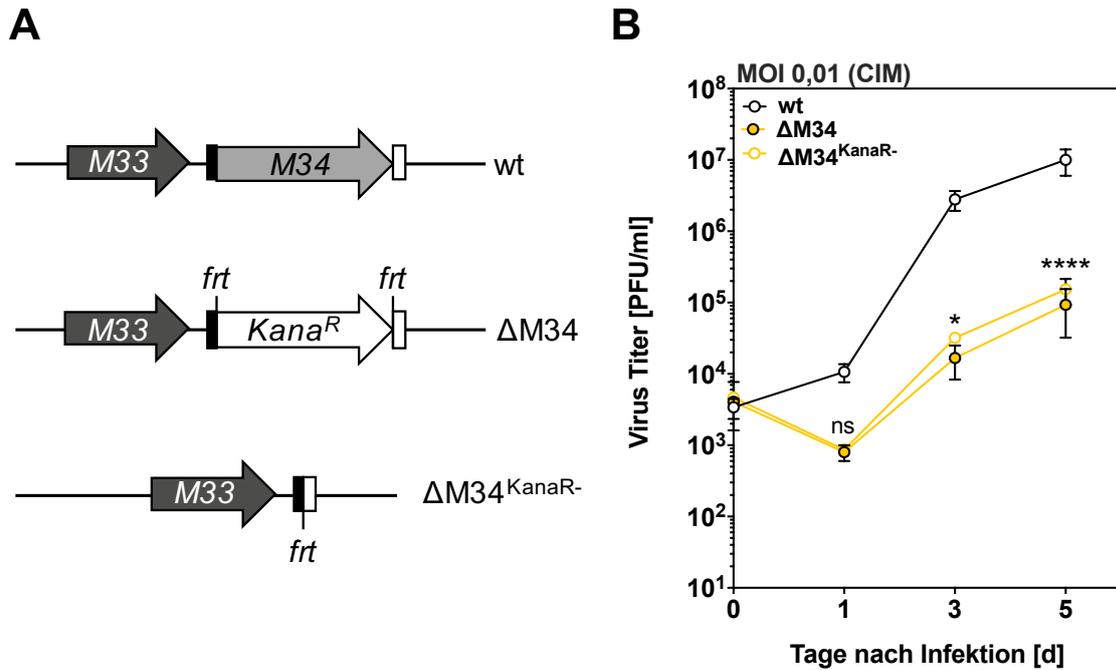


Abbildung 3.23: Die attenuierte Replikation von $\Delta M34$ -MCMV ist unabhängig von der integrierten Deletionskassette. CIM-Zellen wurden mit wt-MCMV, $\Delta M34$ -MCMV oder $\Delta M34^{KanaR-}$ -MCMV infiziert (MOI 0,01). (A) Schema der relevanten MCMV-Genomregion von wt-MCMV, $\Delta M34$ -MCMV oder $\Delta M34^{KanaR-}$ -MCMV. *M33*: *M33* ORF (grau), *M34*: *M34* ORF (hellgrau), Kana^R: Kanamycin Resistenzgen (weiß), schwarze Boxen: 5' homologe Region, weiße Boxen: 3' homologe Region, *frt*: Flippase-Erkennungssequenz. (B) Die Titer wurden nach ein, drei und fünf Tagen mittels *Plaque Titration Assay* bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus Triplikaten \pm Standardabweichung. *: $p < 0,05$. ****: $p < 0,0001$. ns: nicht signifikant (*two-way ANOVA with multiple comparisons*).

3.4.1 $\Delta M34HA$ -MCMV bestätigt die korrekte Deletion von *M34* und die attenuierte Replikation *in vitro*

Die attenuierte, aber dennoch produktive Replikation von $\Delta M34$ -MCMV war aufgrund der Literatur (Baluchova *et al.*, 2008) unerwartet, da *M34* als essenziell beschrieben wurde. Daher sollte jegliche Möglichkeit einer Expression von p*M34* in $\Delta M34$ -MCMV infizierten Zellen, beispielsweise durch unvollständige Selektion der korrekt mutierten $\Delta M34$ -MCMV-BACs ausgeschlossen werden. Dazu wurde die Deletion von *M34* auf dem Hintergrund des *M34HA*-Genoms wiederholt. Durch die Position der zum Virusgenom homologen Sequenzen (s. Abb. 3.24A) in der Deletionskassette wurde der gesamte *M34HA* ORF, inklusive der zuvor inserierten HA-Epitop-Markierung, wie in Kapitel 2.5.2 beschrieben ersetzt. Die Deletion des *M34* ORFs aus dem *M34HA*-BAC wurde wie zuvor beschrieben mittels Southern Blot kontrolliert (s. Abb. 3.24B)

und erneut anhand der DNA aus infizierten Zellen mittels PCR bestätigt (s. Abb. 3.24C). Für die Kontrolle der pM34HA Expression wurden Lysate infizierter Zellen im Western Blot mit einem spezifischen Antikörper auf eine Expression der HA-Epitop-Markierung überprüft. Im Gegensatz zum parentalen M34HA-MCMV konnte in Δ M34HA-MCMV-infizierten Zellen keine HA-Expression detektiert werden (s. Abb. 3.24D). Eine Proteinexpression von pM34HA in Δ M34HA-MCMV-infizierten Zellen wurde daher ausgeschlossen.

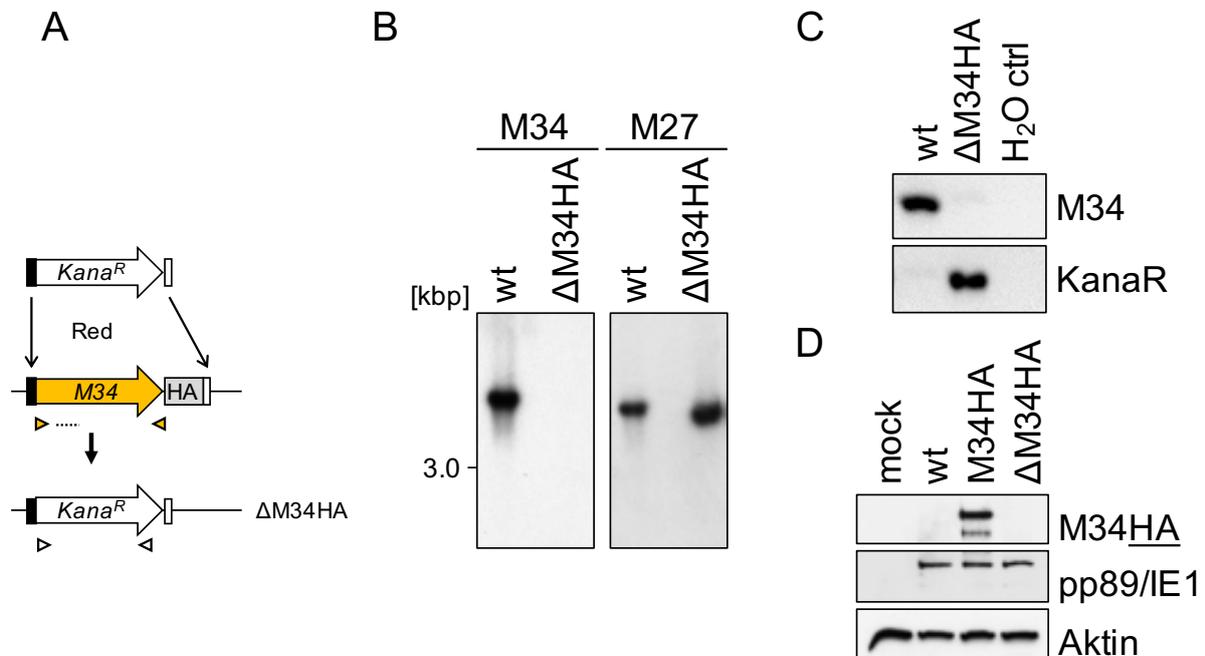


Abbildung 3.24: Generierung von Δ M34HA-MCMV mittels BAC-Mutagenese. (A) Schema zur Deletion von M34HA aus M34HA-MCMV mittels BAC-Mutagenese (s. Kap. 2.5.2). *M34*: *M34* ORF (gelb), *KanaR*: Kanamycin Resistenzgen (weiß), schwarze Boxen: 5' homologe Region, weiße Boxen: 3' homologe Region, HA: HA-Epitop-Markierung (hellgrau), Red: Red-Rekombinase (aus λ -Bakteriophagen), gepunktete Linien: *M34* Sonde, gelbe und weiße Pfeilspitzen: Bindestellen der PCR-Kontrollprimer. (B) Die Deletion von M34HA aus der BAC-DNA wurde mittels Southern Blot bestätigt. (C) Die Deletion von M34 aus dem replizierten Virusgenom wurde mittels PCR von extrahierter DNA aus infizierten Zellen kontrolliert. (D) CIM-Zellen wurden mit wt-MCMV, M34HA-MCMV oder Δ M34HA-MCMV infiziert (MOI 0,05) und nach 4 Tagen die Expression von M34HA mittels Western Blot überprüft.

Auf Basis der vorliegenden Virusmutante Δ M34HA-MCMV, für die zusätzlich zur üblichen Genomkontrolle auch die Proteinexpression von pM34HA ausgeschlossen werden konnte, wurde die Replikation mit der zuvor evaluierten Deletionsmutante Δ M34-MCMV und wt-MCMV mit zwei verschiedenen MOIs verglichen. Dabei replizierten Δ M34-MCMV und Δ M34HA-MCMV in nahezu identischen Replikationskurven etwa 10- bis 100-fach schlechter als wt-MCMV (s. Abb. 3.25).

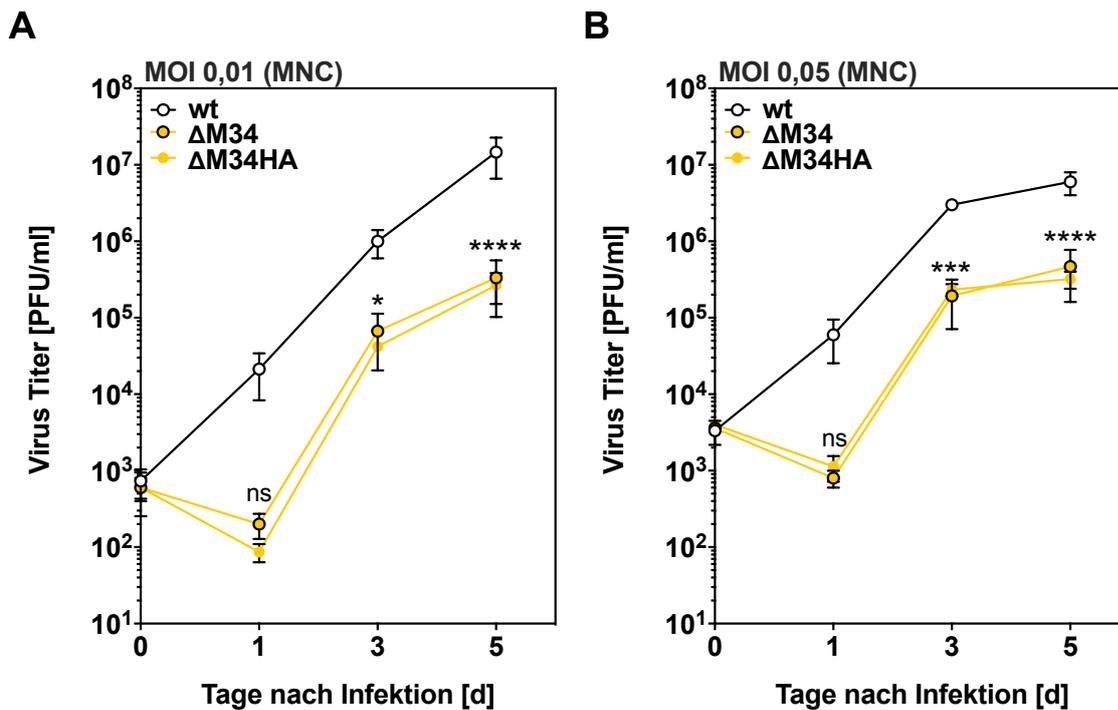


Abbildung 3.25: $\Delta M34HA$ -MCMV ist wie $\Delta M34$ -MCMV *in vitro* attenuiert. Primary mouse newborn cells (MNC) wurden mit wt-MCMV, $\Delta M34$ -MCMV, oder $\Delta M34HA$ -MCMV mit MOI 0,01 (A) oder MOI 0,05 (B) infiziert. An den Tagen eins, drei und fünf nach der Infektion wurden die Virustiter mittels *Plaque Titration Assay* bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus Triplikaten \pm Standardabweichung. *: $p < 0,05$. ***: $p < 0,001$. ****: $p < 0,0001$. ns: nicht signifikant (*two-way ANOVA with multiple comparisons*).

Bei einer Wiederholung des Experiments (MOI 0,025) wurde ein Teil der Zellen für Lysatkontrollen verwendet. Wie in Abb. 3.26 gezeigt, wurde bei gleichem Replikationsdefizit von $\Delta M34$ -MCMV und $\Delta M34HA$ -MCMV keine Expression von pM34HA in der $\Delta M34HA$ -MCMV-Infektion detektiert (s. Abb. 3.26B). Anhand von mehreren unabhängig generierten M34-Deletionsviren wurde daher bestätigt, dass der M34-ORF nicht für die MCMV-Replikation essenziell ist (Eilbrecht *et al.*, 2020).

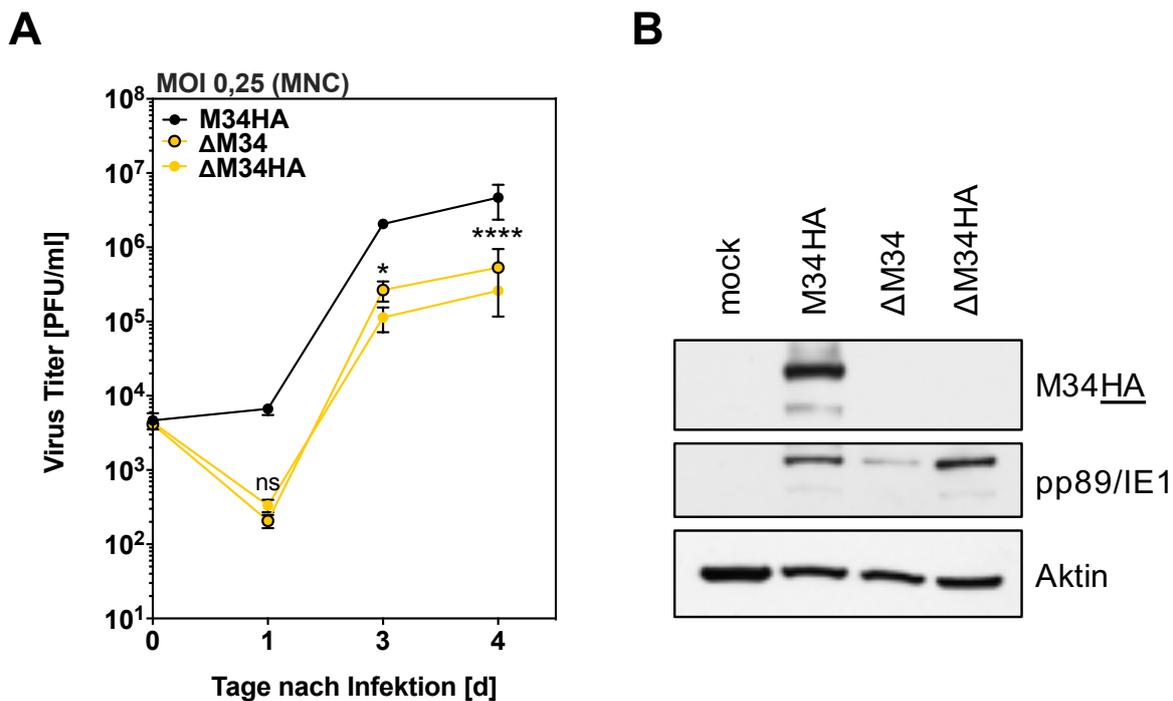


Abbildung 3.26: Δ M34HA-MCMV bestätigt die Abwesenheit der pM34HA-Expression und die attenuierte Replikation *in vitro*. (A) Primary mouse newborn cells (MNC) wurden mit M34HA-MCMV, Δ M34-MCMV, oder Δ M34HA-MCMV mit MOI 0,025 infiziert und die Titer nach ein, drei und vier Tagen mittels *Plaque Titration Assay* bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus Triplikaten \pm Standardabweichung. *: $p < 0,05$. ****: $p < 0,0001$. ns: nicht signifikant (*two-way ANOVA with multiple comparisons*). (B) Vier Tage nach Infektion wurde ein Teil der infizierten Zellen lysiert und per Western Blot mittels HA-spezifischem Antikörper auf M34HA-Expression überprüft.

3.4.2 wt- und Δ M34-MCMV replizieren in NIH3T3-Zellen schlechter als in CIM-Zellen

Die attenuierte Replikation von Δ M34-MCMV wurde sowohl in CIM-Zellen als auch in MNC und MEF beobachtet. Baluchova *et al.* beschrieben, dass in Rekonstitutionsversuchen mit NIH3T3-Zellen trotz erkennbaren cytopathischen Effekten keine ausreichende Ausbeute für Virusstocks erzielt werden konnte. Die Autoren schlossen daraus, dass *M34* ein essenzielles Gen sei (Baluchova *et al.*, 2008). Im Rahmen dieser Arbeit wurden für die Rekonstitutionen und Virusstockpräparationen aller Deletionsmutanten CIM-Zellen verwendet (s. Kap. 2.5.6). Um zu überprüfen, ob die Rekonstitutionen der *M34*-Deletionsviren aufgrund der Nutzung von CIM-Zellen erfolgreich waren, wurden mehrere Rekonstitutionsversuche mit verschiedenen *M34*-Deletionsviren (Δ M34-MCMV, Δ M34^{KanaR}-MCMV und Δ M33- Δ M34-MCMV) auf NIH3T3-

Zellen und MEF-Zellen unternommen. Tatsächlich konnten auch nach langer Kultivierung und Passagierung dieser Zellen, teilweise bis zu vier Wochen oder bis zur Seneszenz der primären MEFs, keine der Deletionsviren rekonstituiert werden.

Für eine Beurteilung der Replikation von Δ M34-MCMV-Replikation in NIH3T3-Zellen wurden diese mit Δ M34-MCMV, Δ M34HA-MCMV und wt-MCMV infiziert und nach drei Tagen mittels *Plaque Titration Assay* quantitativ ausgewertet. Für beide unabhängigen Mutanten, Δ M34-MCMV und Δ M34HA-MCMV, wurden in NIH3T3-Zellen etwa 100-fach schlechtere Titer ermittelt als für wt-MCMV (s. Abb. 3.27A). Dies bestätigt eine starke Attenuierung von Δ M34-MCMV in NIH3T3-Zellen.

In einem direkten Vergleich der Zellen zeigte sich eine geringere Replikation von wt-MCMV und Δ M34HA-MCMV in NIH3T3-Zellen als in CIM-Zellen. Dies deutet darauf hin, dass in NIH3T3-Zellen bei niedriger MOI nach drei Tagen keine oder nur eine stark verzögerte produktive Virusvermehrung von Δ M34-MCMV stattfindet. Es wird daher angenommen, dass auch eine Transfektion von NIH3T3-Zellen mit BAC-DNA zur Rekonstitution nicht ausreichen könnte, um eine produktive Replikation von stark attenuierten Virusmutanten wie Δ M34-MCMV zu erreichen.

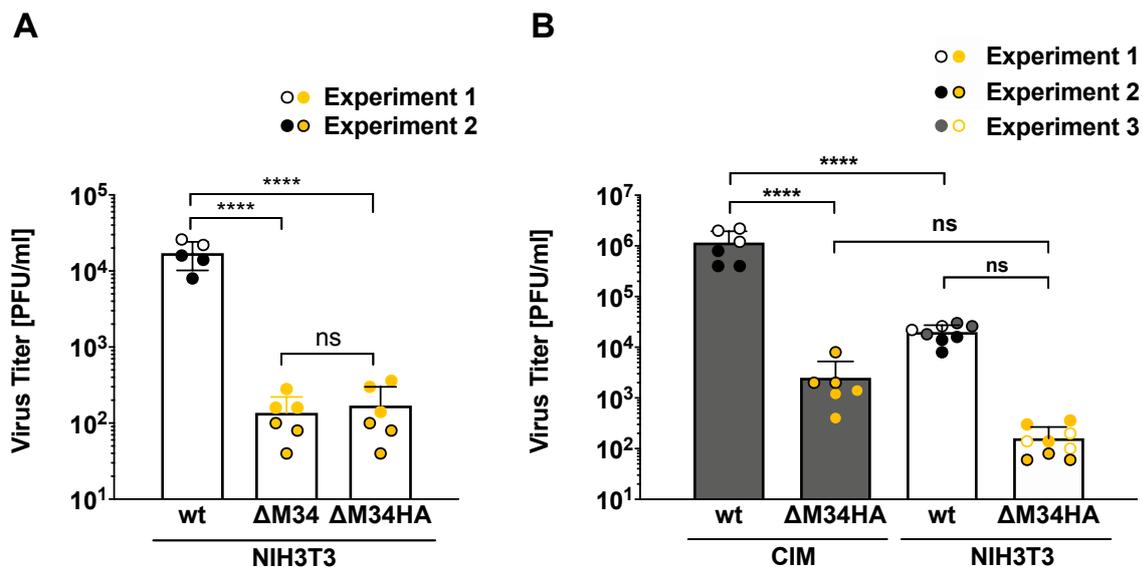


Abbildung 3.27: wt- und Δ M34-MCMV repliziert in NIH3T3-Zellen schlechter als in CIM-Zellen. (A) NIH3T3 wurden mit wt-MCMV, Δ M34-MCMV, oder Δ M34HA-MCMV infiziert (MOI 0,025) und die Titer nach drei Tagen mittels *Plaque Titration Assay* bestimmt. Dargestellt sind die Triplikate aus zwei Experimenten \pm Standardabweichung. *: $p < 0,05$. ***: $p < 0,001$. ****: $p < 0,0001$. ns: nicht signifikant (*one-way ANOVA with multiple comparisons*). (B) Vergleichende Darstellung von drei Experimenten inklusive der in A gezeigten Daten: CIM und NIH3T3 wurden mit wt-MCMV oder Δ M34HA-MCMV infiziert (MOI 0,025). Drei Tage nach Infektion wurden die Titer mittels *Plaque Titration Assay* bestimmt. Dargestellt sind die Messwerte aus drei Experimenten \pm Standardabweichung. *: $p < 0,05$. ***: $p < 0,001$. ****: $p < 0,0001$. ns: nicht signifikant (*one-way ANOVA with multiple comparisons*).

3.5 Charakterisierung der IFN γ -Sensitivität von Δ M33-MCMV, Δ M34-MCMV und Δ M33- Δ M34-MCMV

Da die zuvor beschriebenen Ergebnisse auf eine Inhibition der IFN γ -Signaltransduktion durch *M33* und *M34* hindeuteten, und *M34*, aber nicht *M33*, für die Replikation von MCMV eine wichtige Rolle spielt, sollte untersucht werden, ob Δ M33-MCMV, Δ M34-MCMV und Δ M33- Δ M34-MCMV in IFN γ -behandelten Zellen einen Replikationsnachteil gegenüber wt-MCMV haben. Dazu wurden CIM-Zellen 48 h vor der Infektion mit 250 U/ml IFN γ inkubiert und dann unter Erhalt der IFN γ -Behandlung mit Δ M33-MCMV, Δ M34-MCMV, Δ M33- Δ M34-MCMV und wt-MCMV infiziert. In den unbehandelten Zellen entsprach die Replikation von Δ M33-MCMV wie zuvor gezeigt nahezu der wt-MCMV Replikation, während erneut für Δ M34-MCMV und

$\Delta M33$ - $\Delta M34$ -MCMV eine im Vergleich zu wt-MCMV stark attenuierte Replikation beobachtet wurde (3.28A-E). Durch die Inkubation mit IFN γ wurde wie erwartet die Replikation von wt-MCMV um etwa $1,5 \cdot \log_{10}$ reduziert. Es wurde jedoch weder für $\Delta M33$ -MCMV noch für $\Delta M34$ -MCMV ein zusätzlicher Wachstumsnachteil durch IFN γ beobachtet (3.28A-C). Während $\Delta M33$ -MCMV auch in der Anwesenheit von IFN γ erneut eine nahezu mit wt-MCMV identische, aber gegenüber der nicht-behandelten Kontrolle reduzierte Replikation aufwies, replizierten $\Delta M34$ -MCMV und $\Delta M33$ - $\Delta M34$ -MCMV in beiden Bedingungen vergleichbar weniger als wt-MCMV (3.28A-E). Abb. 3.28F stellt zur besseren Übersichtlichkeit die Titer von $\Delta M33$ -MCMV, $\Delta M34$ -MCMV und $\Delta M33$ - $\Delta M34$ -MCMV an Tag 3 aus mehreren Experimenten vergleichend mit wt-MCMV dar.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die Reduktion der MCMV-Replikation durch IFN γ nicht durch eine Deletion von *M33* oder *M34* verstärkt wird. Bei einer Deletion eines IFN γ -Antagonisten aus dem MCMV-Genom wird erwartet, dass die entsprechende Virusmutante deutlich stärker durch die antivirale Wirkung von IFN γ in ihrer Replikation beeinträchtigt wäre als wt-MCMV. Allerdings sollte an dieser Stelle berücksichtigt werden, dass CMV für einige Immunantworten des Wirts mehrere Gene mit redundanten Immunevasionsmechanismen kodiert. Im Falle einer solchen Redundanz bezüglich eines IFN γ -Antagonismus könnte eine Deletion von nur einem von mehreren möglichen Antagonisten ohne ersichtlichen Replikationsphänotyp verbleiben. Wie in Abb. 3.28 ersichtlich, führte auch die gleichzeitige Deletion von *M33* und *M34* nicht zu einer gesteigerten IFN γ -Suszeptibilität. Dies deutet darauf hin, dass es einen oder mehrere weitere MCMV-kodierte IFN γ -Antagonisten geben könnte.

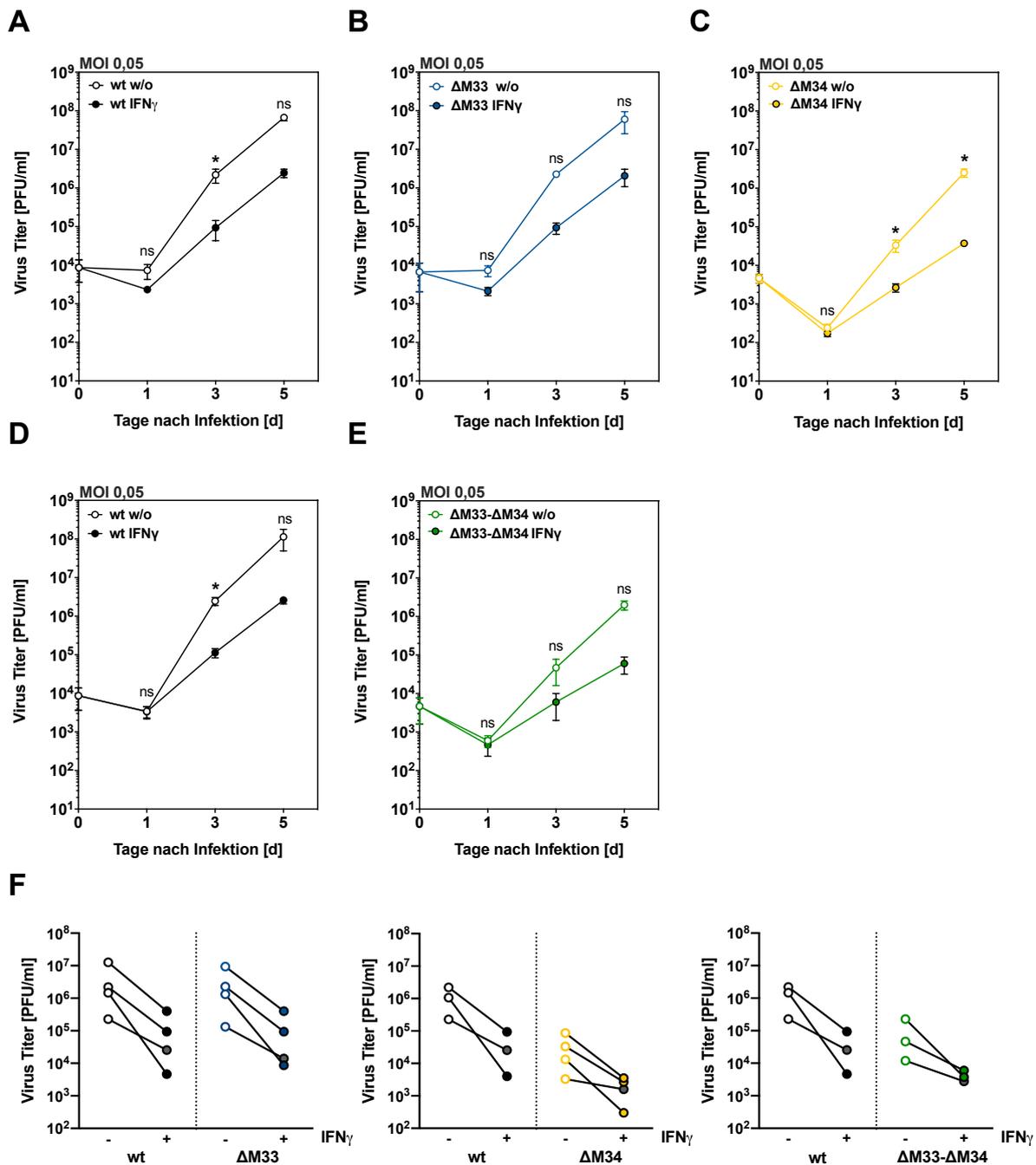


Abbildung 3.28: Die Deletion von M33 oder M34 führt nicht zu einer erhöhten IFN γ -Suszeptibilität im Vergleich zu wt-MCMV. (A-E) CIM-Zellen wurden 48 h mit IFN γ (250 U/ml) vorinkubiert und unter Erhalt der IFN γ -Konzentration mit wt-MCMV und Δ M33-MCMV, Δ M34-MCMV, oder Δ M33- Δ M34-MCMV infiziert (MOI 0,05). Die Titer wurden nach ein, drei und fünf Tagen mittels *Plaque Titration Assay* bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus Triplikaten \pm Standardabweichung. *: $p < 0,05$. ns: nicht signifikant (zweiseitiger T-Test, ungleiche Varianz). Ein Teil der Daten wurde bereits in Abb. 3.21 dargestellt. (F) Vergleichende Darstellung mehrerer Experimente (3 d p. i.) inklusive der in A bis E gezeigten Daten. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde ein Teil der wt-MCMV-Kontrollen mehrfach gezeigt. Die grau gefärbten Datenpunkte markieren ein Experiment mit einer IFN γ -Inkubation zum Zeitpunkt der Infektion ohne Vorinkubation.

3.5.1 Deletion von *M34* führt zu mehr Oberflächenexpression von MHC-I nach IFN γ -Behandlung in MCMV-infizierten Zellen

Bisherige Experimente verdeutlichten zwar eine generell beeinträchtigte Replikation *M34*-deletierter Viren, zeigten jedoch keinen unter IFN γ -Inkubation verstärkten Replikationsphänotyp, sodass ein IFN γ -Antagonismus von *M33* oder *M34* zwar nicht auszuschließen, aber schwer nachweisbar ist. Um in einem anderen *loss-of-function*-Ansatz einen Effekt der Deletionen auf die Expression von ISGs zu untersuchen, wurden infizierte Zellen auf Veränderungen in ihrer Oberflächenexpression von MHC-I-Molekülen als klassisches ISG überprüft. CIM-Zellen wurden dazu mit Δ M33-MCMV, Δ M34-MCMV oder wt-MCMV infiziert und nach 18 bis 24 h mit IFN γ für weitere 24 h inkubiert. Nach einer Oberflächenfärbung mit einem MHC-I-spezifischen Biotin-gekoppelten Primärantikörper und Streptavidin-FITC wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Wie in Abbildung 3.29 dargestellt, induzierte die Inkubation von nicht-infizierten CIM-Zellen mit IFN γ eine stark gesteigerte Oberflächenexpression von MHC-I-Molekülen. Im Gegensatz dazu wurde in wt-MCMV durch IFN γ keine signifikante Steigerung der MHC-I-Oberflächenexpression induziert (s. Abb. 3.29). Diese Ergebnisse entsprachen aufgrund der von MCMV-kodierten Antagonisten den Erwartungen. Eine Deletion von *M33* führte ebenfalls nicht zu einer IFN γ -induzierten, gesteigerten Oberflächenexpression von MHC-I (s. Abb. 3.29). Dagegen exprimierten Δ M34-MCMV-infizierte Zellen nach einer IFN γ -Inkubation signifikant mehr MHC-I auf ihrer Oberfläche als infizierte, aber nicht IFN γ -behandelte Zellen (s. Abb. 3.29). Diese höhere Induzierbarkeit der MHC-I-Expression in Δ M34-MCMV-infizierten Zellen deutet darauf hin, dass *M34* zur Inhibition der Expression eines klassischen durch IFN γ regulierten ISG in infizierten Zellen beiträgt.

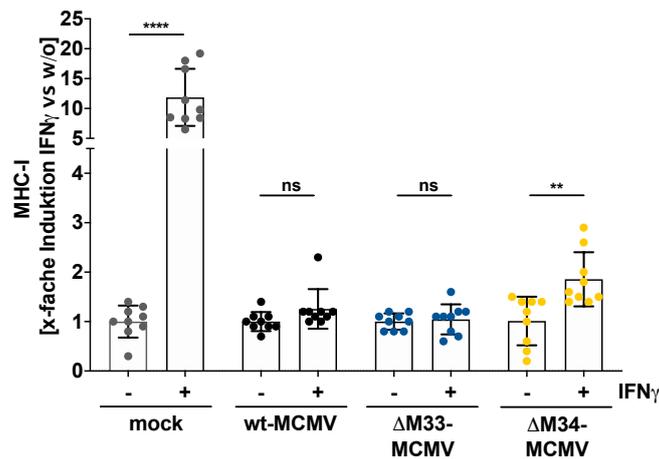


Abbildung 3.29: M34 reduziert die Oberflächenexpression von MHC-I in MCMV-infizierten Zellen. CIM-Zellen wurden mit wt-MCMV, Δ M33-MCMV oder Δ M34-MCMV (MOI 5) infiziert. Nach 18 bis 24 h wurden die Zellen mit IFN γ (250 U/ml) inkubiert oder unbehandelt gelassen und nach weiteren 24 h mittels eines MHC-I-spezifischen Biotin-gekoppelten Primärantikörpers und Streptavidin-FITC oder eines MHC-I-spezifischen FITC-gekoppelten Antikörpers gefärbt. Dargestellt ist die x-fache Induktion der MHC-I-Oberflächenexpression durch IFN γ im Vergleich zu mock-behandelten Zellen. Dargestellt sind die gemessenen Triplikate aus drei Experimenten mit zwei verschiedenen MHC-I-spezifischen Antikörpern \pm Standardabweichung. **: $p < 0,01$. ****: $p < 0,0001$. ns: nicht signifikant (*unpaired t-test*).

3.6 Etablierung eines *gain-of-function*-Experimentalsystems zur Untersuchung redundanter IFN γ -Antagonisten in MCMV

Durch das große Genom und die Vielfalt an CMV-kodierten Antagonisten des Interferonsystems (Trilling *et al.*, 2012) kann sich eine Untersuchung von Deletionsviren schwierig gestalten, da mögliche weitere, nicht deletierte Gene mit redundanten Mechanismen zu einer Maskierung des zu untersuchenden Phänotypen führen können. Um die Charakterisierung potenzieller IFN-Antagonisten in MCMV ohne die Anwesenheit von möglichen weiteren bekannten oder unbekanntem Antagonisten, wie z. B. pM27, zu vereinfachen, sollte ein *gain of function*-Ansatz etabliert werden.

3.6.1 Ad5 ist nicht als *gain-of-function*-Experimentalsystem für die Untersuchung von IFN γ -Antagonisten geeignet

Für die Untersuchung einzelner MCMV-kodierter IFN γ -Antagonisten sollten HEK293A-Zellen mit pcDNA3.1-M33HA oder -M34HA transfiziert und mit IFN γ behandelt werden, um anschließend die Replikation von Ad5 in diesen Zellen zu beurteilen. Adenoviren sind unbehüllte Viren mit einem doppelsträngigen DNA-Genom in einem ikosaedrischen Kapsid (San Martín, 2012). Die Länge des Genoms variiert und liegt für Adenovirus 5 bei etwa 36 kbp (Sugarman *et al.*, 2003; Chroboczek *et al.*, 1992). Infektionen verlaufen häufig mild oder ganz ohne Symptome und betreffen vor allem die Bindehäute, Atemwege und den Gastrointestinaltrakt, in immunsupprimierten Patienten können Adenovirusinfektionen jedoch auch zu schweren bis fatalen Verläufen führen (Lion, 2019; Lion, 2014). Besondere Bedeutung haben Adenoviren in der Entwicklung von viralen Vektoren für Impfungen oder Gentherapien. Am weitesten verbreitet sind Vektoren basierend auf dem humanen Adenovirus 5 (Ad5) (Coughlan, 2020; Ricobaraza *et al.*, 2020). Von Dr. Wibke Bayer wurde rekombinantes Ad5-*green fluorescent protein* (Ad5-gfp) mit einer Deletion der adenoviralen E1-Region und HEK293A-Zellen zur Verfügung gestellt, welche stabil die adenoviralen E1 Proteine (E1a und E1b) exprimieren. Diese Zellen ermöglichen daher die produktive Replikation des ansonsten replikationsinkompetenten Ad5-gfp (Graham *et al.*, 1977).

Zunächst wurde die IFN γ -Suszeptibilität von Ad5 untersucht. Dazu wurden HEK293A-Zellen mit Ad5-gfp und mit oder ohne IFN γ (250 U/ml) infiziert und ab dem ersten Tag nach der Infektion die Replikation von Ad5-gfp anhand der Fluoreszenz gemessen. Wie in Abbildung 3.30 gezeigt, wurden bis einschließlich Tag 7 keine optisch wahrnehmbaren Unterschiede in der Replikation von Ad5-gfp in unbehandelten oder IFN γ -behandelten Zellen festgestellt (s. Abb. 3.30A,B exemplarisch für Tag 2 und 5). Auch die Messung der Fluoreszenzintensität ergab keine Unterschiede zwischen den unbehandelten und IFN γ -behandelten Zellen (s. Abb. 3.30C,D exemplarisch für Tag 2 und 5).

Da für Adenoviren ein E1-vermittelter IFN Typ I-Antagonismus beschrieben wurde, wurden die verwendeten HEK293A-Zellen auf ein funktionales IFN γ Signaling hin überprüft. HEK293A-Zellen und HeLa-Zellen wurden mit pGAS-Luc und pcDNA3.1 transfiziert und nach 18 bis 24 h mit IFN γ (250 U/ml) inkubiert. Nach 6 h wurde die Luziferaseaktivität gemessen (s. Abb. 3.30E-G). Während in den HEK293A-Zellen die pGAS-regulierte Luziferaseaktivität kaum durch IFN γ induziert wurde (s. Abb. 3.30E), bestätigte die deutlich durch IFN γ -induzierte Luziferaseaktivität in HeLa-Zellen die prinzipielle Funktionalität des verwendeten Reportergenkonstrukts (s. Abb. 3.30F). Die geringe Induzierbarkeit des Reporterkonstrukts pGAS-Luc durch IFN γ

zeigt, dass die Expression von E1a und E1b bereits ohne eine Infektion mit Ad5-gfp die IFN γ -Signaltransduktion inhibiert (s. Abb. 3.30G). Es liegt nahe, dass aus diesen Grund auch keine reduzierte Replikation von Ad5-gfp in Anwesenheit von IFN γ nachgewiesen werden konnte. Daher wird davon ausgegangen, dass auch ein IFN γ -Antagonismus durch transfiziertes pcDNA3.1-M33HA oder pcDNA3.1-M34HA in diesem experimentellen Ansatz nicht zu auswertbaren Unterschieden in der Replikation von Ad5-gfp führt. Ad5 ist daher aufgrund eines eigenen viralen IFN γ -Inhibitors nicht als *gain-of-function*-Experimentalsystem für die Untersuchung von anderen IFN γ -Antagonisten geeignet.

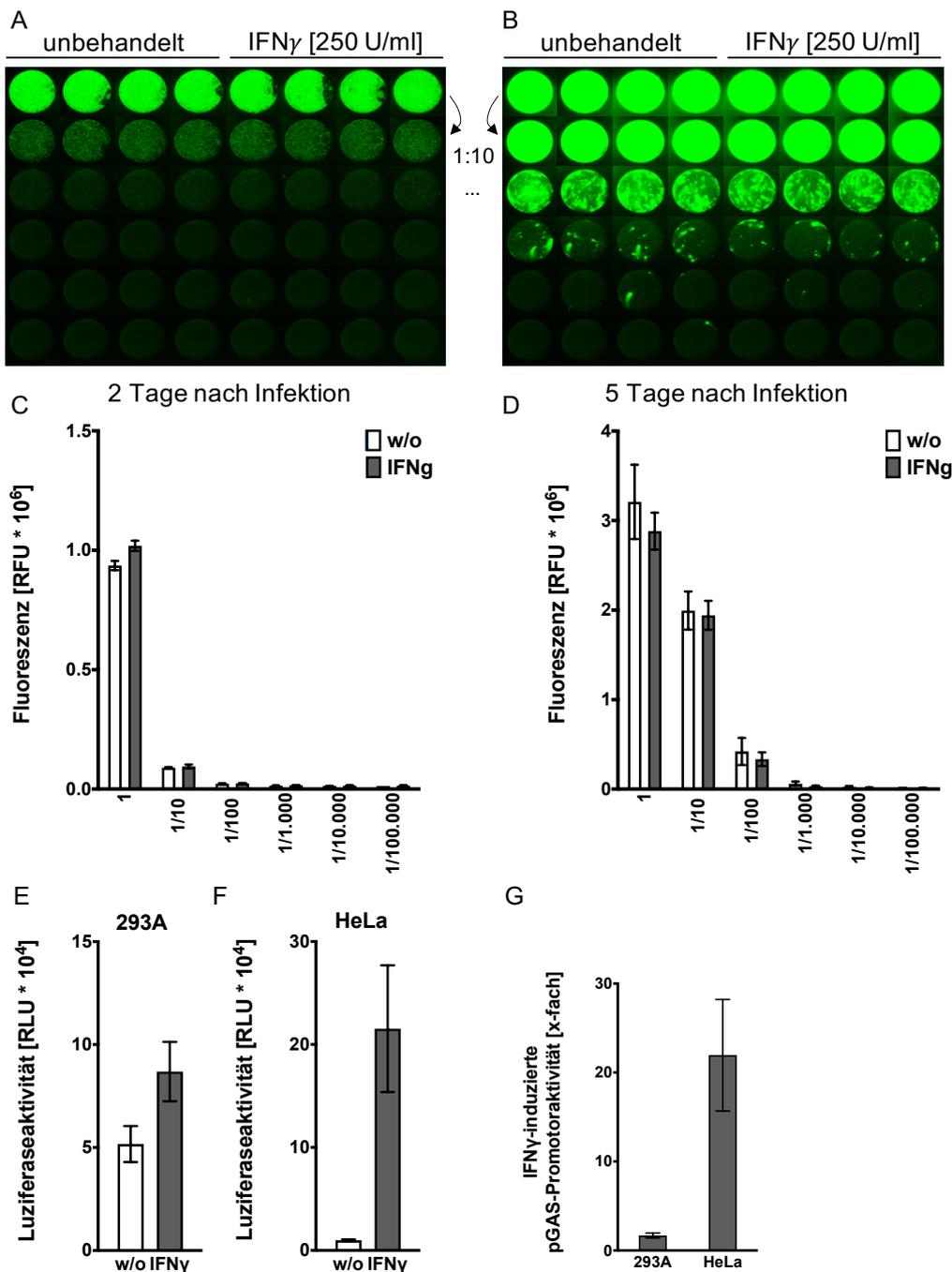


Abbildung 3.30: IFN γ wirkt nicht antiviral gegen Ad5 in 293A-Zellen. 293A-Zellen wurden in 96-well-Platten mit Ad5 in einer 1:10 Verdünnungsreihe infiziert und dabei unbehandelt gelassen oder mit IFN γ (250 U/ml) inkubiert. Nach 24 h wurden täglich Bilder der Zellen aufgenommen und die Fluoreszenz quantitativ bestimmt (A, B). Aufnahmen der infizierten Zellen 2 und 5 Tage nach der Infektion. Gezeigt sind die ersten sechs Reihen der Platte. (C, D) Fluoreszenzmessung der Zellen aus A und B, dargestellt sind die Mittelwerte aus Quadruplikaten der ersten sechs Reihen in *relative fluorescence units* (RFU). (E-G) 293A-Zellen (E) oder HeLa-Zellen (F) wurden in 96-well-Platten mit dem Reportergen-Konstrukt pGAS-Luc transfiziert. Nach 18 bis 24 h wurden die Zellen für 6 h mit IFN γ (250 U/ml) oder mit Medium (w/o) inkubiert. Die Messung der Luziferaseaktivität erfolgte in Triplikaten (s. Kap. 2.2.5). Gezeigt sind die Mittelwerte der Luziferaseaktivität (*relative light units* RLU, \pm Standardabweichung) (E,F) aus einem von zwei repräsentativen Experimenten und die x-fache Induzierbarkeit (G) \pm relativer Fehler.

3.6.2 Die Replikation von VACV wird durch IFN γ inhibiert und eignet sich als *gain-of-function*-Experimentalsystem für IFN γ -Antagonisten

Im Rahmen einer Kooperation mit der AG Ingo Drexler (HHU, Düsseldorf) sollte die Vakziniavirus (VACV)-Infektion in primären murinen Zellen als *gain of function*-Experimentalsystem für die Untersuchung von pM33 und pM34 als IFN γ -Antagonisten etabliert werden. Das VACV ist ein DNA-Virus mit doppelsträngigem Genom von mehr als 190 kbp und gehört zu den Pockenviren (Genus Orthopoxvirus) (Goebel *et al.*, 1990). Es spielte als Lebend-Impfvirus gegen das humanpathogene Pockenvirus (*Variola vera*) im weltweiten Impfprogramm der WHO von 1958 bis zur Erklärung der Ausrottung 1980 die zentrale Rolle. Heute gibt es einige Ansätze für das modifizierte Vaccinia Virus Ankara (MVA) als Vektor für Impfstoffe gegen Infektionserreger oder für die Tumorthherapie (Guo *et al.*, 2019; Samreen *et al.*, 2019; de Vries *et al.*, 2018; Carroll und Moss, 1997).

Für die Etablierung von VACV als *gain of function*-Experimentalsystem zur Untersuchung von IFN γ -Antagonisten sollte zunächst ein antiviraler Effekt von IFN γ gegen das Vakziniavirus (VACV) in murinen Zellen bestätigt werden (Trilling *et al.*, 2009). Dabei sollten im direkten Vergleich außerdem Cloudman S91 Zellen, welche für Experimente der AG Drexler benutzt werden, untersucht werden, da diese möglicherweise einen Defekt im IFN γ -Signaling aufweisen (Peter *et al.*, 2001; Kameyama *et al.*, 1989). Bei Nachweis einer entsprechenden IFN γ -Sensitivität von VACV in MNC und MEF könnte das VACV System die Analyse von M33 und M34 in der VACV-Replikation in einem *gain of function*-Infektionsexperiment ohne eine Maskierung der Effekte durch redundante MCMV-Antagonisten ermöglichen.

MNC, MEF und Cloudman S91 Zellen wurden 48 h vor der Infektion nur mit IFN γ oder mit IFN γ und dem Januskinasen-Inhibitor Ruxolitinib inkubiert oder mock-behandelt. Nach 48 h wurden die Zellen mit VACV-gfp (WR-gfp) infiziert und nachfolgend täglich bis 4 d p. i. lichtmikroskopisch auf cytopathische Effekte (CPE) untersucht. Zusätzlich wurde auch die gfp-Expression in VACV-gfp-infizierten Zellen am Immunfluoreszenzmikroskop täglich beurteilt, konnte jedoch nicht bildlich dokumentiert werden. Bereits am ersten Tag nach der Infektion wurde in MEF und MNC eine antivirale Wirkung von IFN γ gegen VACV beobachtet, welche durch die Inkubation mit dem Januskinasen-Ruxolitinib teilweise aufgehoben wurde (s. Abb. 3.31). Bis einschließlich Tag vier wurden in den IFN γ -behandelten MEF und MNC keine cytopathischen Effekte und nur sehr vereinzelte, durch die gfp-Fluoreszenz als infiziert identifizierbare Zellen, beobachtet. In den Cloudman S91 Zellen wirkte IFN γ dagegen wie erwartet nur geringfügig antiviral. Dies deutet darauf hin, dass Cloudman S91 Zellen tatsächlich kaum IFN γ -responsiv sind. Im Gegensatz dazu wirkt IFN γ in MNC und MEF antiviral gegen VACV und ist daher

als *gain of function*-Experimentalsystem zur Untersuchung eines IFN γ -Antagonismus geeignet. Die Generierung und Analyse von M33- bzw. M34-exprimierenden rekombinanten VACV soll zukünftig zeigen, ob die Funktion von M33 bzw. M34 die IFN γ -Sensitivität von VACV reduziert.

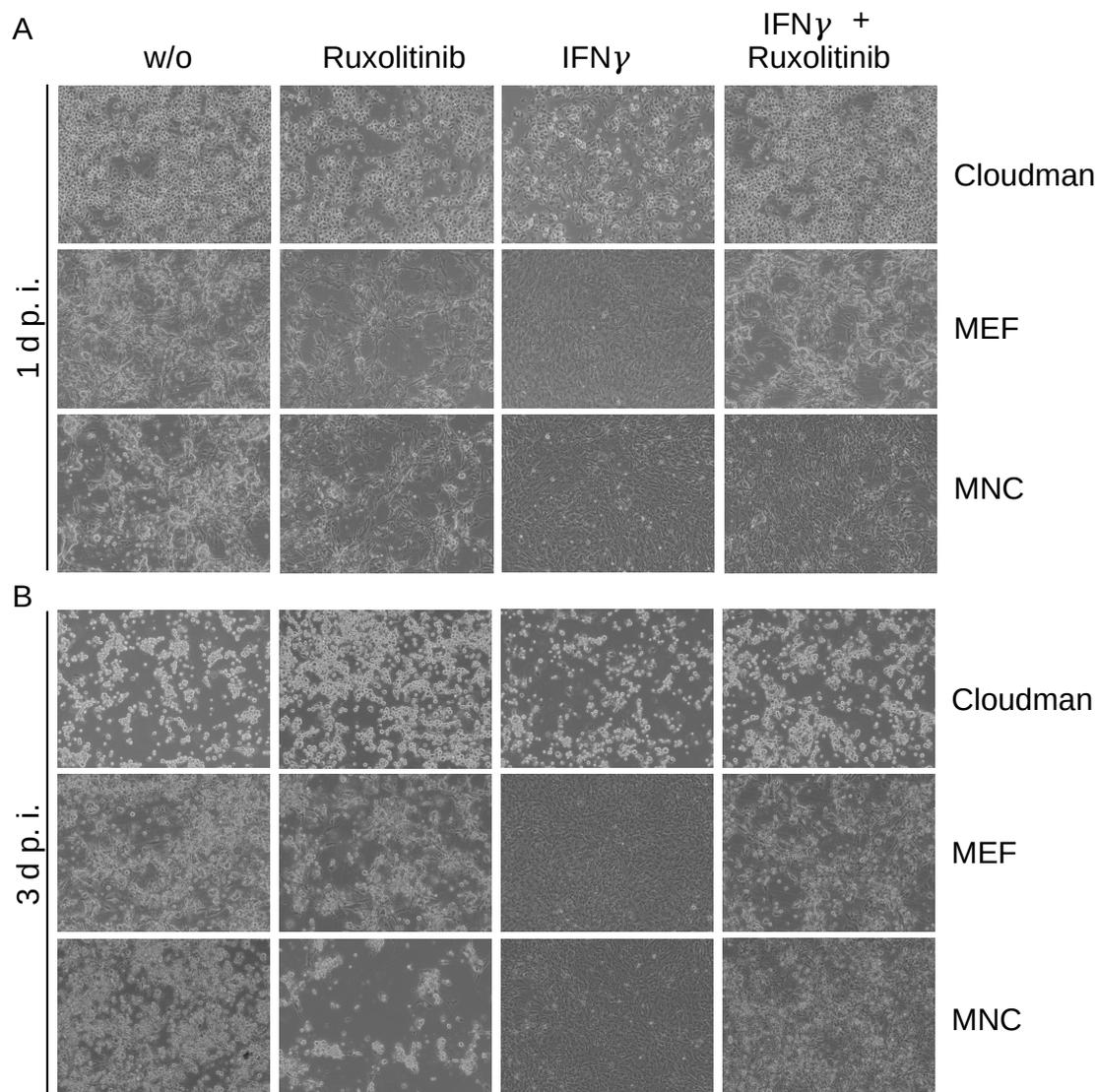


Abbildung 3.31: IFN γ wirkt antiviral gegen VACV in infizierten MNC- und MEF-Zellen. MNC-, MEF- und Cloudman S91 Zellen wurden mit IFN γ (250 U/ml), Ruxolitinib (4 μ M) oder beidem inkubiert oder mock-behandelt. Nach 48 h wurden die Zellen unter Erhalt der Inkubationsbedingungen mit VACV-gfp (WR-gfp) infiziert (MOI 1). (A) Exemplarische lichtmikroskopische Aufnahmen von Tag 1 (A) (1 d p. i.) und Tag 3 (B) nach der Infektion (3 d p. i.).

3.7 Charakterisierung von Δ M34-MCMV *in vivo*

3.7.1 Virusisolation von Δ M34-MCMV nach einer Mauspassage

Für die Infektion von Mäusen zur Analyse der Virusreplikation *in vivo* sollten konzentrierte Virusstocks nach einer Mauspassage aus der Speicheldrüse präpariert und nach zwei anschließenden Zellkulturpassagen verwendet werden. Für diese Mauspassage wurden jeweils zwei BALB/c-Mäuse mit einem gereinigten Stocks infiziert und nach 21 Tagen die Speicheldrüsen entnommen. Die Virusisolation von Δ M34-MCMV aus den Speicheldrüsen waren jedoch nicht erfolgreich.

Zur Überprüfung ob mit den benutzten Virusmutanten in den Mäusen überhaupt eine produktive Infektion stattgefunden hat, wurden gleichzeitig genommene Serumproben mittels ELISA auf MCMV-spezifische Antikörper der Klasse Immunglobulin G (IgG) getestet (s. Kap. 2.3.6). Trotz der fehlgeschlagenen Virusisolation aus den Speicheldrüsen der Mäuse wurden MCMV-spezifische IgG-Antikörper detektiert (s. Abb. 3.32). Die Antikörper aus den Seren banden sowohl an Proteine in den Lysaten infizierter Zellen als auch an die aufgereinigten Virionen. Die Anwesenheit MCMV-spezifischer Antikörper in den Serumproben legten nahe, dass zumindest eine geringe MCMV-Replikation in den früheren Phasen der Infektion stattgefunden hat. Daher wurden weitere Isolierungsversuche von Δ M34-MCMV nach 3 Tagen Infektionsdauer aus der Milz vorgenommen, aus denen erfolgreich Virus isoliert werden konnte (Daten nicht gezeigt).

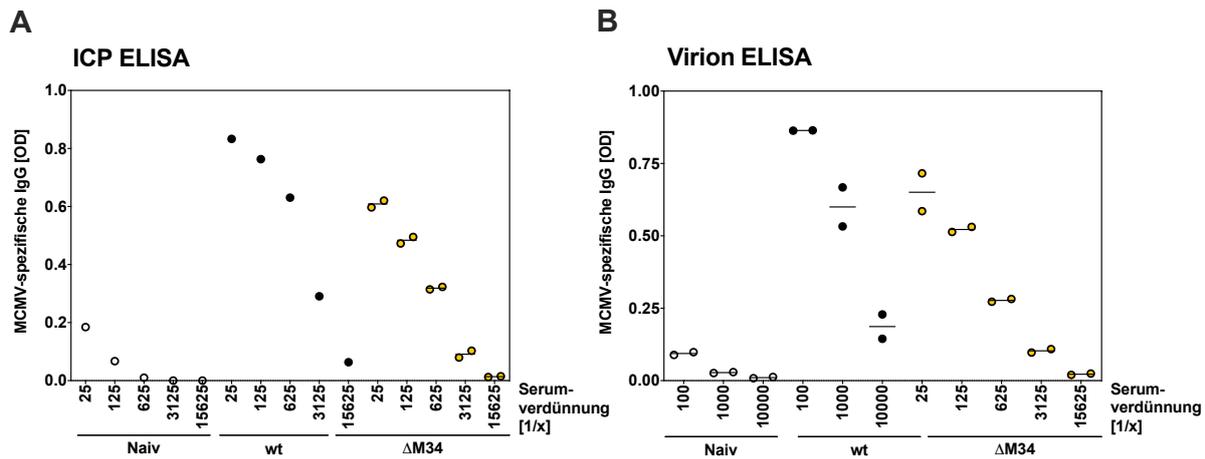


Abbildung 3.32: MCMV-spezifische Antikörper im Serum von $\Delta M34$ -MCMV-infizierten Mäusen deuten auf eine *in vivo*-Replikation hin. Zwei BALB/c Mäuse wurden mit $\Delta M34$ -MCMV infiziert (i. p.). Nach 21 Tagen wurden die Seren und Speicheldrüsen zur Virusisolierung entnommen. (A) IgG-ELISA basierend auf Lysaten MCMV-infizierter CIM-Zellen. (B) IgG-ELISA basieren auf aufgereinigten MCMV-Virionen. 96-*well*-Platten wurden mit Lysaten von MCMV-infizierten CIM (A) oder mit Virionen aus einem gereinigten MCMV-Stock (B) beschichtet, mit den Serumproben inkubiert und gebundene IgG-Antikörper aus dem Serum mit einem Peroxidase (POD)-gekoppelten Sekundärantikörper detektiert. Datenpunkte repräsentieren die Messwerte der einzelnen Mäuse, Striche markieren die Mittelwerte. Negative (naiv) und positive Kontrollseren wurden aus dem Laborbestand zur Verfügung gestellt.

3.7.2 $\Delta M34$ -MCMV-Replikation ist *in vivo* attenuiert

Für eine Untersuchung der Bedeutung von *M34* für die Replikation *in vivo* wurden BALB/c Mäuse mit wt-MCMV oder $\Delta M34$ -MCMV infiziert und 3 und 21 Tage nach der Infektion für eine Serum- und Organentnahme getötet. Organhomogenate wurden auf die Virustiter (PFU pro Gramm Organgewicht, PFU/g Organ) untersucht (s. Kap. 2.7.3 und 2.6.8).

Die höchsten wt-MCMV Titer in der frühen Infektionsphase waren wie erwartet an Tag 3 in der Milz zu beobachten, wogegen kein Virus in den Speicheldrüsen nachgewiesen wurde (s. Abb. 3.33A). Replikation von wt-MCMV wurde in geringerem Maße auch in Leber, Niere und Lunge nachgewiesen. $\Delta M34$ -MCMV replizierte nur geringfügig weniger als wt-MCMV in Milz, Leber und Niere. In der Lunge war die Replikation von wt-MCMV und $\Delta M34$ -MCMV vergleichbar (s. Abb. 3.33A). Zum späteren Zeitpunkt der Infektion an Tag 21 wies bis auf eine wt-MCMV positive Milz keine der Mäuse eine Virusreplikation in der Milz oder Niere auf (s. Abb. 3.33B). In der Leber konnten jeweils für einen Teil der Mäuse beide Viren nachgewiesen werden. Wie erwartet wurde aus den Speicheldrüsen aller wt-MCMV-infizierten Mäuse Virus

isoliert. Δ M34-MCMV wurde im Gegensatz zu wt-MCMV dagegen nicht in den Speicheldrüsen nachgewiesen. Auch in der Lunge dreier Mäuse replizierte nur wt-MCMV, wogegen in keiner mit Δ M34-MCMV-infizierten Maus Virus detektiert wurde (s. Abb. 3.33B).

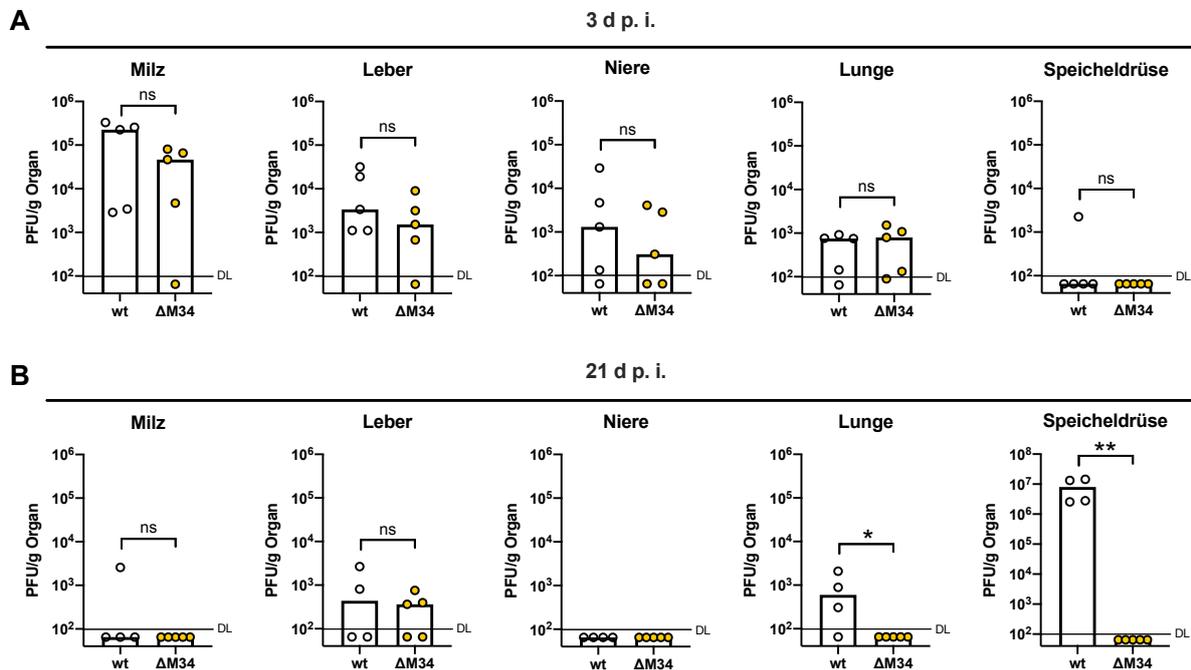


Abbildung 3.33: Δ M34-MCMV-Replikation *in vivo*. BALB/c Mäuse wurden mit wt-MCMV oder Δ M34-MCMV infiziert (i. p.). Nach 3 (A) und 21 Tagen (B) wurden die Virustiter aus Organhomogenaten mittels *plaque titration assay* bestimmt. Datenpunkte repräsentieren die Mittelwerte der Triplikatbestimmungen pro Maus, Balken zeigen den Median aller Mäuse pro Gruppe. DL: Detektionslimit. *: $p < 0,05$. **: $p < 0,01$. ns: nicht signifikant (Mann-Whitney Test).

Die moderat reduzierte Replikation von Δ M34-MCMV im Vergleich zu wt-MCMV an Tag 3 nach der Infektion zeigt, dass die Deletion von M34 nicht zu einer vollständigen Attenuierung der Virusreplikation *in vivo* führt (s. Abb. 3.33A). Trotz der deutlich attenuierten Replikation *in vitro*, infiziert Δ M34-MCMV nicht nur isoliert kultivierte permissive Zellen in Zellkultur, sondern erreicht und infiziert auch verschiedene Organe nach intraperitonealer Injektion *in vivo*. Da nach 21 Tagen Δ M34-MCMV zwar aus der Leber, im Gegensatz zur wt-MCMV jedoch nicht aus den Speicheldrüsen und Lungen isoliert werden konnte, könnte ein Effekt von M34 auf die Dissemination oder den Organotropismus von MCMV vorliegen (s. Abb. 3.33B).

3.7.3 Δ M34-MCMV Replikation induziert MCMV-spezifische IgG

Δ M27-MCMV ist *in vivo* stark attenuiert und repliziert nur zu Beginn der Infektion zu geringen Titern in der Milz (Le-Trilling *et al.*, 2018; Zimmermann *et al.*, 2005). Diese auf die ersten Tage der Infektion begrenzte Replikation von Δ M27-MCMV induziert dennoch Immunantworten, welche in *Challenge*-Experimenten mit wt-MCMV zum Schutz vor einer produktiven MCMV-Infektion führt (Le-Trilling, Jagnjić, Brizić *et al.*, Manuskript in Vorbereitung). Die Ergebnisse zeigen, dass attenuiertes MCMV mit einer Deletion eines IFN-Antagonisten im Mausmodell als eine Art attenuierter Lebendimpfstoff gegen MCMV eingesetzt werden kann und außerdem als Vakzin-Vektor für andere Impfstrategien in Frage kommt.

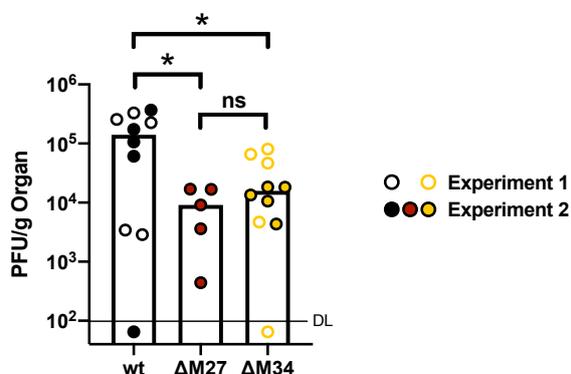


Abbildung 3.34: Δ M34-MCMV-repliziert in der Milz wie Δ M27-MCMV. BALB/c Mäuse wurden mit wt-MCMV, Δ M27-MCMV oder Δ M34-MCMV infiziert (i. p.). Nach 3 Tagen wurden die Virustiter aus Milzhomogenaten mittels *Plaque Titration Assay* bestimmt. Datenpunkte repräsentieren die Mittelwerte der Triplikatbestimmungen pro Maus, Balken zeigen den Median aller Mäuse pro Gruppe aus zwei Experimenten (wt-MCMV und Δ M34-MCMV) oder einem Experiment (Δ M27-MCMV). DL: Detektionslimit. *: $p < 0,05$. ns: nicht signifikant (*two-way ANOVA with Dunnett's T3 multiple comparisons test*).

zuvor gezeigt (s. Abb. 3.32), wurden im Zuge der Virusisolation für eine Mauspassage von Δ M34-MCMV in zwei Mäusen ebenfalls MCMV-spezifische Antikörper nachgewiesen. Im

Um zu beurteilen, ob sich auch Δ M34-MCMV für solche Experimente eignet, sollte die Replikation von Δ M34-MCMV und Δ M27-MCMV in der Milz verglichen werden. BALB/c Mäuse wurden dazu mit wt-MCMV, Δ M34-MCMV und Δ M27-MCMV infiziert und die Virustiter aus der Milz bestimmt. In Abb. 3.34 sind die Titer im Vergleich mit dem zuvor beschriebenen Experiment dargestellt. Erneut replizierte Δ M34-MCMV schlechter als wt-MCMV. Δ M27-MCMV und Δ M34-MCMV erreichten in diesem Experiment vergleichbare Titer in der Milz.

Der durch Δ M27-MCMV-Infektion vermittelte Schutz vor einer nachfolgenden wt-MCMV-Infektion wird zumindest zum Teil durch eine Induktion von MCMV-spezifischen Antikörpern vermittelt, welche sowohl in BALB/c-Mäusen als auch in den weniger suszeptiblen C57BL/6-Mäusen nachgewiesen wurden (Le-Trilling/Brizić/Jagnjić *et al.*, Manuskript in Vorbereitung) und von den Muttertieren auf deren Nachkommen übertragbar waren. Wie

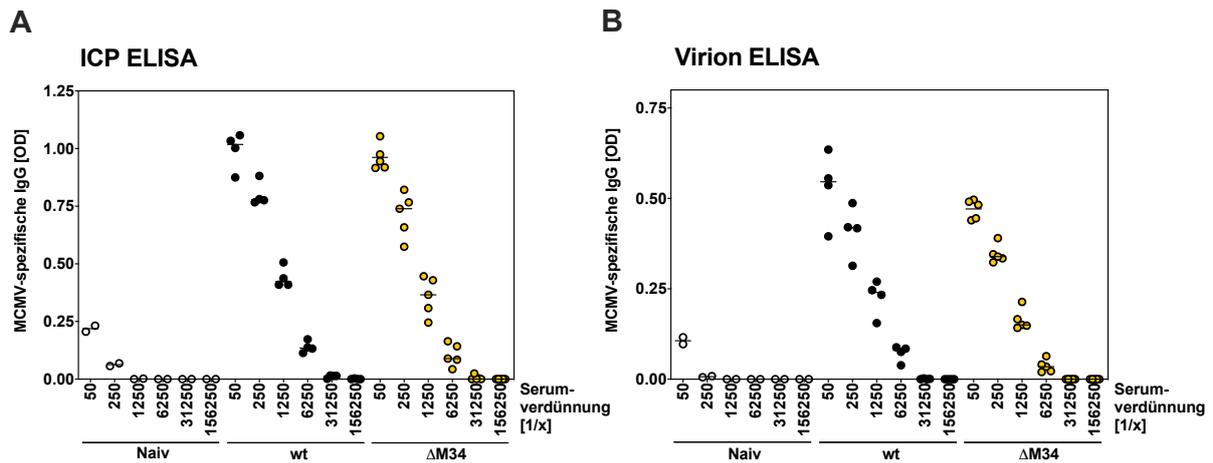


Abbildung 3.35: Δ M34-MCMV induziert MCMV-spezifische Antikörper. BALB/c Mäuse wurden mit wt-MCMV oder Δ M34-MCMV infiziert. Nach 21 Tagen wurden Seren und Organe entnommen. (A) IgG-ELISA basierend auf Lysaten MCMV-infizierter CIM-Zellen. (B) IgG-ELISA basierend auf aufgereinigten MCMV-Virionen. Datenpunkte repräsentieren die Messwerte der einzelnen Mäuse, Striche markieren die Mittelwerte. Negative (naive) Kontrollseren wurden aus dem Laborbestand zur Verfügung gestellt.

Rahmen der Untersuchung zur *in vivo*-Replikation von Δ M34-MCMV wurden die Seren der Mäuse daher ebenfalls auf die Induktion von MCMV-spezifischen IgG durch den potenziellen IFN γ -Antagonisten M34 überprüft. In den Seren aller Δ M34-MCMV-infizierten Mäuse wurden IgG-Antikörper detektiert. Die Antikörpertiter waren vergleichbar zu wt-MCMV-infizierten Mäusen, und banden sowohl an Proteine aus MCMV-infizierten Zellen als auch an MCMV-Virionen (s. Abb. 3.35).

Zusammenfassend zeigen die vorgestellten Daten, dass die an Tag 3 nachweisbare, aber attenuierte Replikation von Δ M34-MCMV mit einer Deletion eines Antagonisten der IFN γ -induzierten Genexpression zu einer Induktion humoraler Immunantworten führt.

4 Diskussion

Viren treffen bereits früh in der Infektion auf die ersten Abwehrmechanismen des Immunsystems, welche eine produktive Replikation verhindern und so zu einer zügigen Kontrolle und Elimination der Infektion führen. Sie müssen daher bereits den ersten Funktionen des angeborenen Immunsystems effektive Mechanismen entgegensetzen, um zunächst in der einzelnen Zelle replizieren und sich auf weitere Zellen und Organe des infizierten Wirts ausbreiten zu können. Das Interferonsystem spielt sehr früh in der Infektion eine wichtige Rolle für Eindämmung viraler Infektionen durch das angeborene Immunsystem sowie die Regulierung der adaptiven Immunantwort und wird von Cytomegaloviren inhibiert. Die hohe Bedeutung einer effektiven Antagonisierung des Interferonsystems ist an der Vielfalt der CMV-kodierten Antagonisten auf nahezu allen Ebenen erkennbar, die sich gegen die Induktion der Expression von Interferonen, gegen die Signaltransduktion durch Interferone und gegen die Induktion der Expression der Effektorgene richten (s. Kap. 1.3). Von der Arbeitsgruppe wurde bereits der MCMV-kodierte IFN-Antagonist pM27 umfassend charakterisiert, und erst kürzlich das HCMV-kodierte Analog pUL145 beschrieben (Le-Trilling *et al.*, 2020; Le-Trilling *et al.*, 2018; Trilling *et al.*, 2011; Zimmermann *et al.*, 2005). Während der Untersuchungen zu pM27 konnte gezeigt werden, dass MCMV mindestens einen weiteren IFN-Antagonisten exprimieren muss, welcher die STAT1-abhängige Transkription von ISGs inhibiert (Trilling *et al.* 2014). In einem Screening mittels eines Luziferase-Reportergen-Assays mit dem IFN γ -responsiven *promotor element* GAS (*gamma activated sequence*) wurden aus einer MCMV-ORF *Library* zwei MCMV-kodierte Gene als potenzielle IFN γ -Inhibitoren identifiziert. Diese potenziellen IFN-Antagonisten, *M33* und *M34*, wurden hier charakterisiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass nach einer ektopten Expression von *M33* und *M34* die IFN γ -induzierte Genexpression signifikant und dosisabhängig inhibiert wird (s. Kap. 3.1.1). Auch für die zwei homologen Gene aus HCMV, *UL33* und *UL34*, wurde eine Inhibition der IFN γ -induzierten Genexpression im Luziferase-Reportergen-Assay gezeigt (s. Kap. 3.1.4). Für die weitere Charakterisierung der Gene *M33* und *M34* und ihrer Bedeutung für die virale Replikation wurden mittels BAC-Mutagenese entsprechende Deletionsviren und Virusmutanten mit Epitop-markierten Zielgenen generiert (s. Kap. 3.2 und 3.3). Dabei wurde gezeigt, dass *M34* entgegen bereits publizierten Ergebnissen (Baluchova *et al.*, 2008) nicht essenziell für die MCMV-Replikation ist (s. Kap. 3.3.1). Während die *in vitro*-Replikation von Δ M33-MCMV dem wt-Virus entspricht, ist Δ M34-MCMV jedoch stark attenuiert und repliziert bis zu 100-fach schlechter als wt-MCMV (s. Kap. 3.4). In Δ M34-MCMV-infizierten Zellen konnte eine stärkere Oberflächenexpression von MHC-I nach IFN γ -Stimulus im Vergleich zu wt-MCMV-infizierten

Zellen nachgewiesen werden, dessen Expression als *interferon-stimulated gene* (ISG) durch IFN γ induziert und in wt-MCMV-infizierten Zellen nahezu vollständig inhibiert wird (s. Kap. 3.5.1). Dies bestätigt die im Transfektionskontext gezeigte Inhibition der IFN γ -induzierten Genexpression durch pM34 auch in infizierten Zellen. Trotz stark attenuierter Replikation von Δ M34-MCMV *in vitro* konnte in infizierten Mäusen eine initiale Replikation nach 3 Tagen in Milz, Leber und Lunge nachgewiesen werden, welche im Gegensatz zu wt-MCMV nach 21 Tagen aber nicht die Speicheldrüsen erreichte (s. Kap. 3.7.2). Dennoch wurden mittels IgG-ELISA in den Seren der Δ M34-MCMV-infizierten Mäuse nach 21 Tagen MCMV-spezifische Antikörper detektiert, welche die IgG-Titer der mit dem wt-MCMV-infizierten Mäuse erreichten (s. Kap. 3.7.3). Im Folgenden sollen die Ergebnisse dieser Arbeit detaillierter beleuchtet und deren Bedeutung diskutiert werden.

4.1 Die MCMV-kodierten Genprodukte M33 und M34 sind Antagonisten der IFN γ -induzierten Genexpression

Wie in Kapitel 3.1.1 gezeigt wurde, inhibieren die MCMV-kodierten Genprodukte *M33* und *M34* in einem Luziferase-Reportergen Assay mit dem IFN γ -responsiven Promotorelement GAS (*gamma activated sequence*) nach einer ektope Expression signifikant und dosisabhängig die IFN γ -induzierte Genexpression (s. Abb. 3.2 und 3.3). Dabei inhibiert die Expression von pM33 sowohl die unstimulierte basale als auch die IFN γ -induzierte Reportergenaktivität, die Expression von pM34 führt dagegen teilweise zu erhöhten Messwerten für die Luziferaseaktivität ohne IFN γ -Stimulation (s. Abb. 3.2A) bei stets inhibiertem Ansprechen des pGAS-Promotors auf IFN γ (s. Abb. 3.2B). Die gleichzeitige ektope Expression beider Gene führte zu einer Inhibition der IFN γ -induzierten Genexpression, wie sie für *M33* alleine gezeigt wurde, und zu einer Reduktion der durch *M34* erhöhten, nicht-stimulierten Aktivität des GAS-Promotors (s. Abb. 3.5). Der Effekt von *M33* auf die nicht-stimulierte GAS-Promotoraktivität kann daher als dominant über die von *M34* vermittelten Effekte auf den GAS-Promoter betrachtet werden. Der Inhibition der Reportergenexpression liegen daher zwei verschiedene Mechanismen von *M33* und *M34* zugrunde. Einer generellen Inhibition der Genexpression unter der Kontrolle eines GAS-Promotorelements durch *M33* steht ein Mechanismus durch *M34* gegenüber, welcher die konstitutive Genexpression GAS-regulierter Gene teilweise erhöht, aber die Steigerung der Promotoraktivität durch eine IFN γ -Inkubation limitiert.

4.1.1 Die HCMV-Homologe pUL33 und pUL34 inhibieren ebenfalls die IFN γ -induzierte Genexpression

Das MCMV-Mausmodell wird für die Erforschung von CMV-Infektionen und der darauf folgenden Immunreaktionen eingesetzt. Die Genome von MCMV und HCMV sind kollinear und teilen einige homologe Proteine, welche aber nicht zwangsläufig auch funktionelle Homologe sind. Die Identifizierung und Charakterisierung von Funktionen MCMV-kodierter Gene kann daher häufig zum Verständnis der Rolle der entsprechenden Genfunktionen für die Virusinfektion führen, die Erkenntnisse sind aber nicht immer auch auf entsprechende Gene in HCMV übertragbar.

Für die HCMV-kodierten homologen Proteine pUL33 und pUL34 konnte hier allerdings gezeigt werden, dass sie wie auch die MCMV-kodierten pM33 und pM34 die Reporterexpression unter der Kontrolle des pGAS-Promotors inhibieren (s. Kap. 3.1.4). Für pUL33 wurde gezeigt, dass es wie pM33 die GAS-Promotoraktivität mit oder ohne eine Induktion durch IFN γ inhibiert (s. Abb. 3.11). Die ektope pUL34-Expression führte dagegen zu einer Inhibition der Induzierbarkeit der pGAS-Promotoraktivität trotz einer erhöhten unstimulierten Promotoraktivität (s. Abb. 3.12). Beide HCMV-Homologe pUL33 und pUL34 inhibieren also die IFN γ -induzierte Genexpression des pGAS-Reporterkonstrukts durch verschiedene Mechanismen bzw. auf unterschiedlichen Ebenen der Signaltransduktion, welche in den vorliegenden Ergebnissen den Effekten von pM33 und pM34 entsprechen. Diese funktionellen Homologien zu den MCMV-kodierten Proteinen pM33 und pM34 sind vielversprechend hinsichtlich einer Übertragbarkeit weiterer Ergebnisse bezüglich pM33 und pM34 auf die HCMV-Infektion.

4.1.2 pM33 inhibiert die IFN γ -induzierte Genexpression mittels eines G-Protein-unabhängigen Mechanismus

Wie in Kapitel 3.1.1 gezeigt wurde, inhibiert pM33 nach ektope Expression sowohl die unstimulierte als auch die IFN γ -induzierte GAS-regulierte Reporteraktivität (s. Abb. 3.2 und Abb. 3.3). pM33 ist ein konserviertes virales G-Protein-gekoppeltes Rezeptorhomolog (vGPCR). Bisher wurden für pM33 keine Liganden beschrieben, jedoch ist pM33 wie auch das HCMV-Homolog pUL33 konstitutiv aktiv und induziert konstitutives G α_q - und PLC-vermitteltes Signaling sowie G-Protein-unabhängig auch NFAT, CREB und NF κ B (Sherrill *et al.*, 2009; Case *et al.*, 2008; Waldhoer *et al.*, 2002). Interessanterweise konnte in dieser Arbeit anhand von zwei pM33-Mutanten gezeigt werden, dass die Aktivierung von G-Proteinen durch pM33 nicht für die beobachtete Inhibition der IFN γ -induzierten pGAS-Promotoraktivität notwendig ist. Zwei pM33-

Mutanten, in denen mittels einer gezielten Punktmutation ein hochkonserviertes NRY-Motiv zu NAY (R131A) oder NQY (R131Q) mutiert wurde, inhibierten die IFN γ -induzierte Luziferase-Aktivität (s. Abb. 3.7). In anderen Arbeiten wurde zuvor gezeigt, dass diese Mutationen des NRY-Motivs, welches in den meisten zellulären GPCRs als DRY-Motiv konserviert ist, zu einem Verlust der G-Protein-vermittelten Signaltransduktion führen. Die Aktivierung von NF κ B erfolgt dagegen weiterhin (Sherrill *et al.*, 2009; Case *et al.*, 2008; Sherrill und Miller, 2006). Während diese Mutationen die Interaktionen zwischen G-Proteinen und pM33 nicht beeinträchtigen, wird die Aktivierung der G-Proteine dagegen inhibiert. Daher wird hier der Schluss gezogen, dass die nachgewiesene Inhibition der IFN γ -induzierten pGAS-Promotoraktivität durch pM33 mittels eines G-Protein-unabhängigen Mechanismus erfolgt.

4.1.3 Mögliche Mechanismen der pM33- und pUL33-vermittelten Antagonismen der IFN γ -induzierten Genexpression

Entsprechend der Lokalisation, Funktionsweise und beschriebenen Signalwege von GPCRs ist die Annahme naheliegend, dass die Inhibition der GAS-regulierten Genexpression durch pM33 über die Modulation der Aktivierung von *downstream* befindlichen Transkriptionsfaktoren stattfindet und pM33 wahrscheinlich keine direkte Wirkung auf die GAS-Sequenzen der Promotoren ausübt. Die Spezifität der regulierten Promotoren könnte daher durch die von pM33 aktivierten, *upstream* gelegenen, *Second Messenger* vermittelt werden, oder von den modulierten Transkriptionsfaktoren und weiteren Kofaktoren abhängig sein. Die Vielschichtigkeit GPCR-aktivierter Signalwege kann eine Erklärung dafür sein, dass die Genexpression im GAS-Reporterassay bereits ohne eine Induktion durch IFN γ nahezu vollständig inhibiert wird, und pM33 auch inhibitorisch auf das IFN γ -unabhängige, konstitutiv aktive pEF1-Reporterkonstrukt einwirkt. Auch dass diese Inhibition dominant über die von pM34-V5/His-induzierte GAS-Hintergrundaktivierung ist, könnte dadurch erklärt werden, da die von pM34 möglicherweise rekrutierten und aktivierten Transkriptionsfaktoren und Kofaktoren (diskutiert in Kap. 4.1.4) durch einen pM33-vermittelten Signalweg inaktiviert, umgeleitet oder sequestriert werden könnten. In Abb. 4.1 ist ein Modell möglicher Mechanismen der pM33- und pUL33-vermittelten Inhibition der GAS-Promotoraktivität dargestellt.

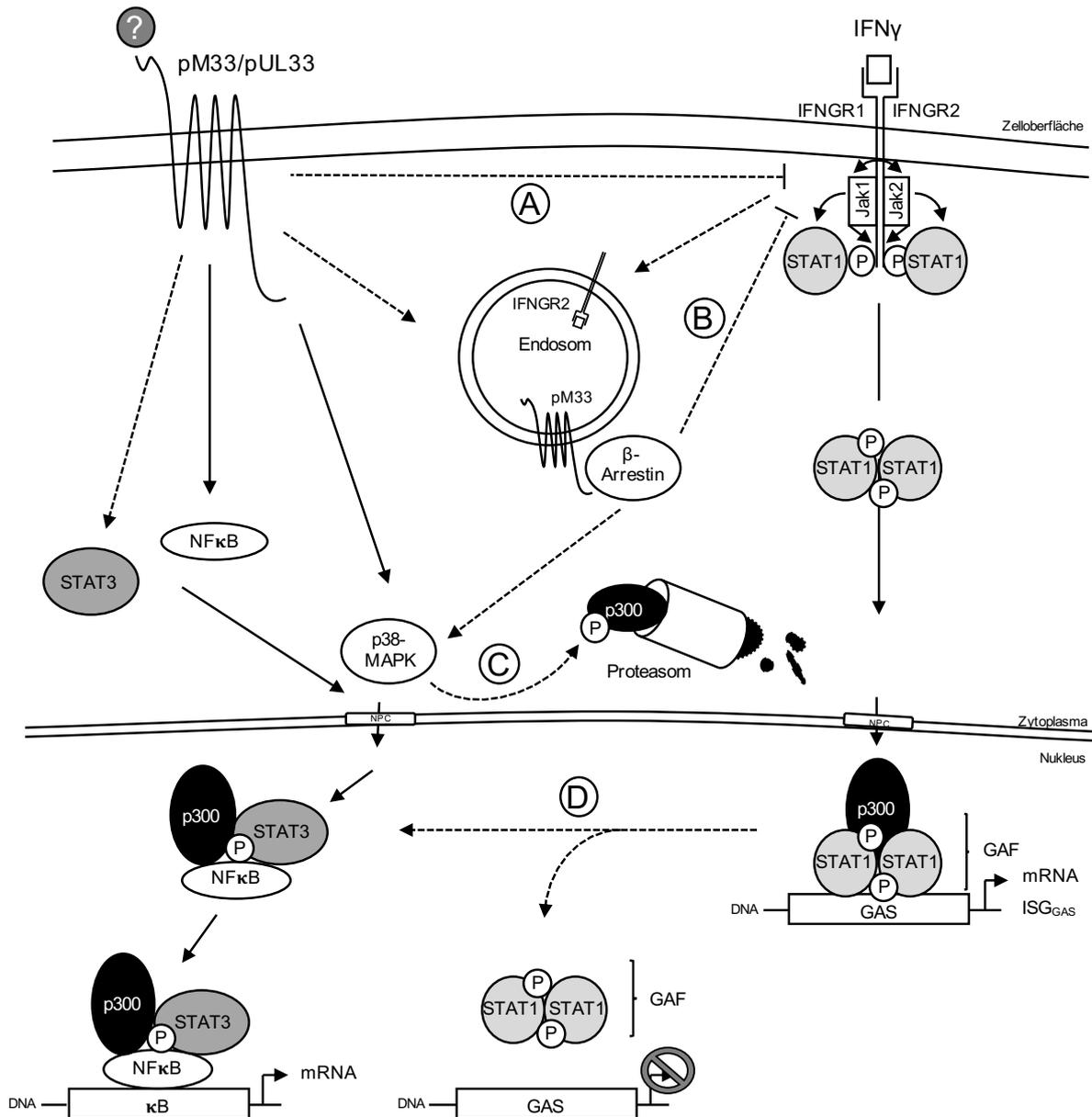


Abbildung 4.1: Modell zu möglichen Mechanismen der pM33/pUL33-vermittelten Inhibition der GAS-Promotoraktivität. (A) Heterodimerisierung von pM33/pUL33 mit dem IFN γ -Rezeptor (IFNGR). (B) Internalisierung des IFNGR durch pM33/pUL33-aktiviertes β -Arrestin. (C) Proteasomale Degradation von Kofaktoren des *signal transducer and activator of transcription* (STAT)1-Transkriptionskomplexes durch pM33/pUL33-induzierte Kinasen, gezeigt am Beispiel von p38-mitogen-activated protein kinase (MAPK) und p300. (D) Entzug von Kofaktoren des STAT1-Transkriptionskomplexes durch Sequestrierung oder Umleitung durch pM33/pUL33-aktivierte Proteine, gezeigt am Beispiel der Transkriptionsfaktoren *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells* (NF κ B) und STAT3. Für detaillierte Informationen s. Kap. 4.1.3. Eigene Abbildung in Anlehnung an Sherrill *et al.*, 2009.

Für das HCMV-homolog pUL33 wurde kürzlich beschrieben, dass es wie pUS28 den Transkriptionsfaktor STAT3 konstitutiv aktiviert. Die Autoren beschrieben auch eine Aktivierung von NF κ B durch pUL33, welche aber weniger stark ausgeprägt war als durch pUS28 (van Senten *et al.*, 2019). Für STAT3 und NF κ B sind bereits Komplexbildung und *Cross-Talks* verschiedener Signalwege bekannt (Yoshida *et al.*, 2004). In Tumorzellen wurde beispielsweise gezeigt, dass eine Acetylierung der NF κ B-Untereinheit RelA für dessen Retention im Zellkern notwendig ist und diese von einer Komplexbildung mit STAT3 und p300 abhängt (Lee *et al.*, 2009). Auch STAT3 wird durch p300/CBP acetyliert (Wang *et al.*, 2005). p300/CPB interagiert jedoch auch mit STAT1 und ist für die STAT-abhängige Transkription notwendig (Zhang *et al.*, 1996). Es ist daher denkbar, dass die G-Protein-unabhängige Aktivierung von NF κ B und STAT3 aufgrund der kooperativen Bindung von p300/CBP dieses einer Bindung an STAT1 entzieht. Dies könnte zu einer Reduktion einer IFN γ -induzierten Genexpression führen, welche von einer Bindung von aktiviertem STAT1 an die GAS-Promotorsequenzen abhängt (s. Abb. 4.1). Da für pM33 bisher keine Aktivierung von STAT3 gezeigt wurde, sollte dies zukünftig untersucht werden.

Für GPCRs wurden Heterodimerisierungen beschrieben, welche das Signaling anderer Rezeptoren modulieren. So inhibiert die Heterodimerisierung von pUL33 und pUS28 die konstitutive Aktivierung von NF κ B durch pUL33, während der G $_{\alpha_q}$ -, PLC- und IP $_3$ -abhängige Signalweg unbeeinträchtigt bleibt (Tschische *et al.*, 2011). Da aber nicht nur mit viralen oder zellulären GPCRs Heterodimere gebildet werden können, sondern auch mit anderen Rezeptoren wie den Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) (de Munnik *et al.*, 2015), sollten auch Rezeptor-Interaktionen als Mechanismen für eine Inhibition der GAS-Promotoraktivität in Erwägung gezogen werden (s. Abb. 4.1). Interaktionen mit Interferonrezeptoren sind zwar bisher nicht bekannt, es wurde aber für β -Arrestin-2, welches durch GPCR-Signalwege aktiviert werden kann, eine Internalisierung von IFNAR (Williams *et al.*, 2019) beschrieben. Interessanterweise wird die pM33-induzierte G $_{\alpha_{q/11}}$ -Aktivität unter anderem durch eine Phosphorylierung von pM33 durch die *G protein-coupled receptor kinase* (GRK2) reguliert. Da Phosphorylierungen von Rezeptoren durch GRK2 zu β -Arrestin-2-Bindung und Rezeptor-Internalisierungen führen können, schlugen die Autoren eine Interaktion von β -Arrestin-2 mit pM33 und eine mögliche Internalisierung vor (Sherrill und Miller, 2006). β -Arrestine können außerdem unter anderem die *mitogen-activated protein kinases* (MAP) ERK1/2, JNK3 und p38 aktivieren (DeWire *et al.*, 2007). Die p38-MAPK kann wiederum über eine Phosphorylierung des mit STAT1-interagierenden p300/CPB die proteosomale Degradation von p300/CPB einleiten (Wang *et al.*, 2013; Poizat *et al.*, 2005). Dies stellt ebenfalls einen möglichen Mechanismus für die GAS-Promotoraktivität dar (s. Abb. 4.1), da die p38-MAPK auch von pM33 G-Protein-unabhängig aktiviert wird (Sherrill *et al.*, 2009).

4.1.4 pM34 inhibiert die IFN γ -induzierte Genexpression

Wie in Kapitel 3.1.1 gezeigt, reduziert pM34 die Induzierbarkeit des GAS-Promotors durch IFN γ (s. Abb. 3.2B und 3.4B). Dabei findet nach ektopter Expression von pM34-V5/His eine basale GAS-Aktivität weiterhin statt und wird sogar teilweise erhöht (s. Abb. 3.2A und 3.4A). Dies könnte daran liegen, dass pM34 von einem verwendeten Expressionsvektor als Fusionsprotein mit einer V5/His-Epitop-Markierung kodiert wird, da ein möglicher Einfluss eines His-Epitops auf die DNA-Bindung von His-Epitop-markierten Transkriptionsfaktoren beschrieben wurde (Büning *et al.*, 1996). Tatsächlich wird durch die Expression von pM34HA die pGAS-kontrollierte Luziferaseaktivität generell inhibiert (s. Abb. 3.9). Es kann daher hier nicht ausgeschlossen werden, dass die His-Sequenz der V5/His-Epitop-Markierung einen Einfluss auf die Hintergrundaktivierung der Reportergenexpression hat. Da aufgrund der Homologie von pM34 zum transkriptionellen Regulator pUL34 eine DNA-Bindung von pM34 angenommen wird, ist in diesem Zusammenhang eine durch die His-Epitop-Markierung verstärkte DNA-Bindung möglich. Auch allgemein verstärkende oder maskierende Effekte der C-terminalen Epitop-Markierung auf die Funktion von Aminosäuren des C-Terminus von pM34 könnten durch die Größe der V5/His-Epitop-Markierung stärker ausgeprägt sein als durch das wesentlich kleinere HA-Epitop. Die beiden Fusionsproteine pM34-V5/His und pM34HA unterscheiden sich jedoch interessanterweise nicht in ihrer Inhibition des konstitutiv aktiven pEF1-Promotors. Zu beachten ist auch, dass die von pUL34HA vermittelte Inhibition der pGAS-Luziferaseaktivität trotz einer HA-Epitop-Markierung dem für pM34-V5/His beobachteten Effekt der erhöhten GAS-Promotor-Aktivität in unbehandelten und IFN γ -stimulierten Zellen bei gleichzeitig reduzierter Induzierbarkeit durch IFN γ entspricht (s. Abb. 3.12). Möglich wäre daher, dass eine prinzipielle Aktivität von GAS-regulierten Promotoren für die Virusreplikation benötigt wird. Dies erscheint allerdings zunächst widersprüchlich, da IFN γ über eine Aktivierung von GAS-regulierten Promotoren antiviral wirkt. Ein Antagonismus der IFN γ -induzierten Signaltransduktion durch pM34 bzw. pUL34 ist daher in Hinsicht auf die Inhibition dieser antiviralen Wirkung für das Virus ein evolutionärer Vorteil, für mögliche provirale GAS-Promotorsequenzen jedoch von Nachteil. Es ist daher davon auszugehen, dass sich die Aktivierung von GAS-Promotoren durch IFN γ von einer möglichen Aktivierung durch pM34 oder pUL34 unterscheidet. Dies könnte über verschiedene Zusammensetzungen der transkriptionell aktiven Komplexe erfolgen. Denkbar wären auch voneinander abweichend aufgebaute Promotorelemente, welche beispielsweise über die Anzahl der GAS-Sequenzen oder weitere flankierende Elemente von unterschiedlichen Kofaktoren gebunden würden. Naheliegend ist in diesem Zusammenhang die Betrachtung des *major immediately early promoters* (MIEP), welcher die Transkription der ersten Gene (*immediately early*) vom viralen Genom in den frühen Phasen der Infektion reguliert. Die Aktivität dieser Promotorregion, welche auch Promotor- und Enhancer-Elemente wie GAS-

und NF κ B-Bindestellen enthält, ist von größter Bedeutung für die Anfangsphase des viralen Replikationszyklus (Netterwald *et al.*, 2005). Besondere Bedeutung hat die Regulation des MIEP auch für die Etablierung und den Erhalt der Latenz sowie die Reaktivierung zur lytischen Infektion (Reeves, 2011). Die Regulation von GAS-Promotorelementen durch pM34 und pUL34 könnte daher auch mit einer möglichen Regulation des MIEP in Verbindung stehen, welche anhand von Reporterassays mit MIEP-Luziferase-Reporterkonstrukten untersucht werden könnte.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Virusmutante generiert, welche ein HA-Epitop-markiertes pM34 exprimiert (s. Abb. 3.14D). Die Expression von pM34HA wurde bereits 4 h nach der Infektion nachgewiesen, und erwies sich dabei als abhängig von der Expression viraler *immediate/early* Gene (s. Abb. 3.15A,C). Durch eine Inhibition der viralen Replikation wurde die Expression von pM34HA dagegen stark reduziert, wenn auch nicht vollständig inhibiert (s. Abb. 3.15D). Aufgrund dieser Ergebnisse wird pM34HA als *early/late* Gen kategorisiert (Eilbrecht *et al.*, 2020). Die Expressionskinetik von pM34HA ist außerdem konsistent mit den *early/late* exprimierten Isoformen des HCMV-Homologs pUL34 (Biegelke *et al.*, 2004). Nach einer Infektion mit M34HA-MCMV bei gleichzeitiger Inhibition der Neusynthese von Proteinen in den infizierten Zellen wurde kein pM34HA detektiert (s. Abb. 3.15B). Es wird daher davon ausgegangen, dass pM34HA nicht als Teil des Virions in die infizierte Zelle gebracht wird. Dies ist konsistent mit publizierten Daten, nach denen M34 mittels Massenspektrometrie (MS) nicht in MCMV-Partikeln detektiert wurde (Kattenhorn *et al.*, 2004). Auch für pUL34 wurde beschrieben, dass es kein Bestandteil des HCMV Virions ist (Varnum *et al.*, 2004). Interessanterweise wurde für pUL34 bereits gezeigt, dass es als DNA-bindendes Protein die Transkription viraler Gene reprimiert sowie Promotoren in der *oriLyt*-Region reguliert (Slayton *et al.*, 2018; Liu und Biegelke, 2013; Biegelke *et al.*, 2004). Die in pUL34 für die DNA-Bindung und funktionell minimal notwendige Proteinsequenz (Lester *et al.*, 2006) ist in pM34 hoch konserviert (s. Abb. 3.8). Eine Verkürzungsmutante von pM34HA, in welcher der nicht konservierte N-Terminus von pM34HA fehlt, aber der zu pUL34 homologe, hochkonservierte Bereich noch vorhanden ist, zeigte die gleiche Inhibition des GAS-Promotors wie pM34HA (s. Abb. 3.9). Es liegt daher die Annahme nahe, dass pM34 aufgrund dieser hochkonservierten Sequenz ebenfalls transkriptionell regulative Eigenschaften aufweisen und daher *downstream* in der IFN-Signaltransduktion direkt auf der Ebene des Promotors agieren könnte. Damit einhergehend wäre eine nukleäre Lokalisation von pM34HA, wie es für pUL34HA beschrieben ist. Tatsächlich wurde in dieser Arbeit im direkten Vergleich mit pUL34HA auch für pM34HA eine Kernlokalisation in transfizierten HeLa-Zellen gezeigt und außerdem in M34HA-MCMV-infizierten Zellen bestätigt (s. Abb. 3.16 und 3.17). Die nukleäre Lokalisation von pM34HA deutet daher auf eine dem Zellkern zuzuordnende Funktion von pM34 hin, wo es möglicherweise als Transkriptionsfaktor agiert. Eine DNA-Bindung von pM34 könnte dementsprechend zu einer Regulation viraler Gene oder Genomreplikation führen,

wie es für pUL34 beschrieben ist (Slayton *et al.*, 2018; Liu und Biegelke, 2013; Biegelke *et al.*, 2004).

Nach der aktuellen Datenlage findet in MCMV-infizierten Zellen eine Bindung von STAT1-Komplexen (GAF) an die Promotorelemente von ISGs statt (Trilling *et al.*, 2014). Es wäre daher eine sterische Blockierung der DNA-Bindung von Transkriptionsfaktoren wie den IFN γ -induzierten STAT-Komplexen und deren Kofaktoren durch eine Besetzung der Bindestellen durch pM34 denkbar (s. Modell in Abb. 4.2). Interessanterweise ist beschrieben, dass MCMV in Makrophagen die IFN γ -induzierte Promotoraktivität des *chromosomal class II transactivator* (CIITA) inhibiert, aber gleichzeitig die basale Transkription erhalten bleibt (Popkin *et al.*, 2003). Die Autoren zeigten, dass in MCMV-infizierten Zellen die IFN γ -induzierte Bindung von IRF-1 und der RNA Polymerase II an CIITA-Promotor-Elementen reduziert war. Möglich wäre auch, dass die Balance der GAS-Regulation durch pM34 über Unterschiede in der Zusammensetzung oder der DNA-Bindungsaffinität der Komplexe aus Transkriptionsfaktoren und weiteren Kofaktoren gesteuert wird (s. Abb. 4.2). Dass für eine durch IFN induzierte Transkription von ISGs neben den STAT-Komplexen auch weitere Kofaktoren notwendig sind, wurde beispielsweise für p300/CBP (Zhang *et al.*, 1996) und Nmi (Zhu *et al.*, 1999) und den Mediator Komplex (Wienerroither *et al.*, 2015) beschrieben. Mittels der M34HA-MCMV-Mutante sollten *electromobility shift assays* und Immunopräzipitationen zur Aufklärung einer Bindung von pM34HA an die DNA bzw. an mögliche Interaktionspartner durchgeführt werden. Chromatin-Immunopräzipitationen mit anschließender Sequenzierung der präzipitierten DNA-Fragmente können Aufschluss darüber bieten, ob pM34HA und pUL34HA an GAS-Promotorsequenzen binden.

Einen ersten Hinweis auf das DNA-Bindemotiv für pM34 bieten die für pUL34 beschriebenen Konsensus-Sequenzen (Slayton *et al.*, 2018; Liu und Biegelke, 2013). Wie in Kapitel 3.1.1 gezeigt, wird von pM34 auch der konstitutiv aktive pEF1-Promotor im Reporterassay inhibiert (s. Abb. 3.10). Ein Abgleich der Promotorsequenz ergab, dass in dem benutzten Reportergenkonstrukt eine verkürzte Variante der für pUL34 beschriebenen Konsensus-Sequenz sowie eine GAS-Konsensus-Sequenz in der pEF1-Promotorregion zu finden sind. Die Inhibition der pEF1-Reporter-Expression könnte daher sowohl durch eine Bindung von pM34 an die kurze Variante der pUL34-Konsensus-Sequenz als auch an die GAS-Konsensus-Sequenz erklärt werden. Es bieten sich daher in Zukunft zielgerichtete Mutationen beider Motive im pEF1-Reportergenkonstrukt sowie der GAS-Sequenz im verwendeten pGAS-Reportergenkonstrukt an, um die Spezifität von pM34 und die Bedeutung dieser Motive für die pM34-vermittelte Inhibition der IFN γ -induzierten Genexpression im Detail aufzuklären.

In einem Vergleich mit dem während dieser Arbeit von anderen als IFN γ -Antagonisten beschriebenen pUL23 (Feng *et al.*, 2018) wurde bestätigt, dass pUL23 ebenfalls die pGAS-abhängige

Luziferaseaktivität inhibiert. Dabei reduziert pUL23 die Reporterexpression auch unabhängig von einer Inkubation mit IFN γ (s. Abb. 3.12A). Im direkten Vergleich von pUL23 mit pUL34 ist dahingehend besonders interessant, dass pUL23 laut der Publikation von Feng et. al. eine Translokation von STAT1 in das Zytoplasma induziert. pUL23 interagiert dazu mit Nmi, einem beschriebenen Interaktionspartner von STAT1 für die Aktivierung von Promotoren (Feng *et al.*, 2018). Durch die zytoplasmatische Lokalisation von STAT1 wäre die DNA-Bindung von STAT1 für die Aktivierung des GAS-Promotors räumlich verhindert. Wie zuvor diskutiert wurde, wird für pUL34 dagegen angenommen, dass die Inhibition der GAS-Promotorinduktion durch IFN γ durch Mechanismen vermittelt wird, welche eine DNA-Bindung beinhalten. Darin kann eine mögliche Erklärung der unterschiedlichen GAS-Promotoraktivitäten durch pUL23 und pUL34 liegen, da die zwei verschieden agierenden Antagonisten eine Feinregulation zwischen bestimmten pUL34- und ggf. auch pM34-regulierbaren Promotoren und einer generellen Inhibition der IFN γ -induzierten Genexpression durch pUL23 erwirken könnten. Die Balance zwischen einer Grundaktivität, Induzierbarkeit oder nahezu vollständiger Inhibition von GAS-Promotoren könnte dabei durch verschiedene Expressionszeitpunkte, Proteinabundanz und subzelluläre Lokalisationen erwirkt werden. Mit pUL23 übereinstimmende Peptide wurde von Varnum et. al. in MS-Analysen von HCMV-Virionen detektiert, aber aufgrund der für die Auswertung festgelegten Kriterien nicht als Virionprotein kategorisiert (Varnum *et al.*, 2004). Basierend auf Elektronenmikroskopischen Bildern und Western Blots von Virionen wurde pUL23 als Tegumentprotein beschrieben (Adair *et al.*, 2002). Es ist daher möglich, dass pUL23 im Gegensatz zu pM34 und pUL34 mit Virioneneintritt sofort in der Zelle vorliegt, während pUL34 und das MCMV-Homolog pM34 als *early/late* Gene früh exprimiert werden (s. Abb. 3.15A,C und (Biegalka *et al.*, 2004)). Es wäre daher denkbar, dass zu Beginn der Infektion durch pUL23 die Kernlokalisierung von STAT1 als Sofortmaßnahme inhibiert wird, mit beginnender Abundanz von pUL34 aber die Anwesenheit von STAT1 in der Nähe der GAS-Promotorregionen nicht mehr vollständig verhindert werden soll oder sogar erwünscht ist, um eine Aktivität von bestimmten GAS-Promotorelementen für die Transkription viraler Gene durch pUL34 zu regulieren. In diesem Fall wäre es möglich, dass die durch pUL34, und bei einer Funktionshomologie auch durch pM34, induzierte GAS-Aktivität in den Reporterassays nur aufgrund der isolierten ektopen Expression ohne die Anwesenheit weiterer viraler Proteine detektierbar wurde, da STAT1 im Transfektionskontext nicht durch weitere virale Proteine wie pUL23 von einer Translokation in den Zellkern abgehalten würde. Die Verfügbarkeit weiterer beteiligter viraler oder zellulärer Proteine kann sich auch zelltyp-abhängig oder durch weitere Faktoren, wie verschiedene Expressionsprofile in lytisch oder latent infizierten Zellen, unterscheiden. Es ist daher empfehlenswert, die durchgeführten GAS-Reporterassays auch in anderen Zellen durchzuführen. Zellen der häufig eingesetzten HEK293-Linien sollten aufgrund stabil exprimierter, die IFN-Signaltransduktion beeinflussender viraler Gene, für solche Reporterassays jedoch vermieden werden (s. Kap. 4.3.2) (Forero *et al.*, 2014; Chatterjee-Kishore *et al.*, 2000; Look *et al.*, 1998; Routes *et al.*, 1996).

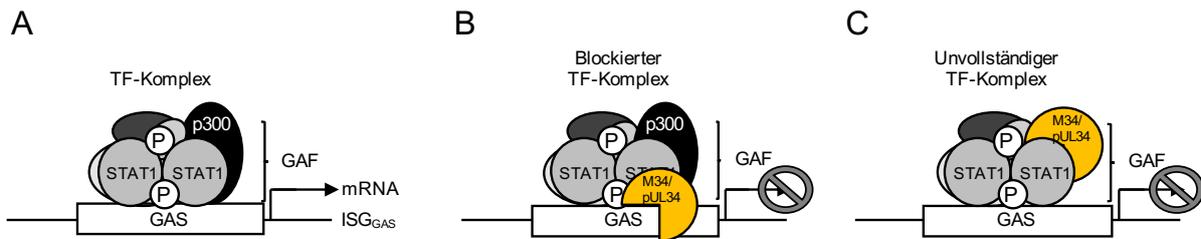


Abbildung 4.2: Modell zu möglichen Mechanismen der pM34/pUL34-vermittelten Inhibition der GAS-Promotoraktivität. (A) Der aus *signal transducer and activator of transcription* (STAT)1-Homodimeren gebildete *gamma activated factor* (GAF)-Komplex bindet zusammen mit weiteren benötigten Kofaktoren an die *gamma activated sequence* (GAS)-Promotorsequenz und aktiviert die Transkription von *interferon-stimulated genes* (ISGs). (B) pM34/pUL34-Bindung an die DNA arretiert den GAF-Kofaktor-Komplex und verhindert die Transkription. (C) Die Bindung von pM34/pUL34 verhindert die korrekte Assemblierung eines oder mehrerer Kofaktoren und inhibiert die Transkription, gezeigt am Beispiel p300. TF: Transkriptionsfaktor. Eigene Abbildung in Anlehnung an Le-Trilling *et al.*, 2018.

4.2 M34 ist nicht essenziell

Für die Bewertung der Bedeutung von *M33* und *M34* für die MCMV-Replikation und die Untersuchung möglicher Replikationsphänotypen wurden im Zuge dieser Arbeit Virusmutanten generiert, in welchen jeweils der gesamte ORF *M33* und *M34* mittels BAC-Mutagenese aus dem MCMV-Genom deletiert wurden (s. Kap. 3.3). Virusmutanten mit vollständigen Deletionen oder *lacZ* in den *M33*-ORFs wurden bereits mehrfach als replikationskompetent in Fibroblasten *in vitro* beschrieben (Sherrill *et al.*, 2009; Davis-Poynter *et al.*, 1997). Wie erwartet war daher eine Rekonstitution von $\Delta M33$ -MCMV ausgehend vom einem entsprechend mutierten MCMV-BAC Genom in dieser Arbeit erfolgreich (s. Kap. 3.3).

Für *M34* war dagegen bereits vor Beginn dieser Arbeit beschrieben, dass *M34* essenziell ist (Baluchova *et al.*, 2008). Entgegen der Erwartungen konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich $\Delta M34$ -MCMV nach einer vollständigen Deletion des *M34* ORFs rekonstituiert werden (s. Kap. 3.3.1). Die Deletion von *M34* wurde durch die Rekonstitution einer zweiten Virusmutante ausgehend vom $\Delta M34^{\text{KanaR}}$ -MCMV-BAC-Genom bestätigt, aus welchem das für die Deletion im Austausch für den *M34*-ORF integrierte Kanamycin-Resistenzgen wieder entfernt wurde (s. Kap. 3.3.1). Mehrfache Kontrollen mittels Southern Blot, PCR und einer Teilsequenzierung der Mutationsstelle von $\Delta M34^{\text{KanaR}}$ -MCMV bestätigen die vollständige Deletion von *M34* und die kontaminationsfreie Rekonstitution der Deletionsmutanten (s. Abb. 3.19). Mittels einer dritten, unabhängig generierten Deletionsmutante auf dem Hintergrund des M34HA-

MCMV-BAC-Genoms, wurde außerdem im Western Blot keine Proteinexpression von pM34HA mehr nachgewiesen und somit bestätigt, dass MCMV ohne die Anwesenheit von pM34HA rekonstituiert werden kann (s. Abb. 3.24). Anhand der unabhängigen Deletionsmutanten Δ M34-MCMV, Δ M34^{KanaR}-MCMV und Δ M34HA-MCMV wurde daher mehrfach nachgewiesen, dass *M34* im Gegensatz zu den veröffentlichten Daten (Baluchova *et al.*, 2008) nicht für die MCMV-Replikation *in vitro* essenziell ist (Eilbrecht *et al.*, 2020).

4.2.1 Die Auswahl geeigneter Zell-Linien ist für den Erfolg einer Rekonstitution stark attenuierter MCMV-Virusmutanten entscheidend

Für die erfolgreiche Rekonstitution der verschiedenen M34-Deletionsviren im Rahmen dieser Arbeit kommen verschiedene mögliche Ursachen in Betracht. Baluchova *et al.* beschrieben, dass nach einer Transfektion permissiver Zellen mit einem Δ M34-MCMV-BAC trotz erkennbaren cytopathischen Effekts keine Virusstocks mit verwendbaren Titern generiert werden konnten (Baluchova *et al.*, 2008). Die Autoren verwendeten für die Rekonstitutionversuche der Deletionsmutante NIH/3T3-Zellen. Diese weit verbreitete Fibroblasten-Zell-Linie wurde ausgehend von *c/Swiss* Maus Embryonen generiert (Jainchill *et al.*, 1969). In der vorliegenden Arbeit wurden dagegen für die Rekonstitution aller Virusmutanten *crisis immortalized mouse embryonic fibroblasts* (CIM) verwendet (Rattay *et al.*, 2015). Vergleichende Bestimmungen der Replikation von Δ M34-MCMV in CIM-Zellen und NIH/3T3-Zellen zeigten, dass sowohl Δ M34-MCMV als auch wt-MCMV in NIH/3T3-Zellen schlechter replizieren als in CIM-Zellen (s. Abb. 3.27). Es ist daher wahrscheinlich, dass die Transfektion von BAC-DNA für die Rekonstitution in CIM-Zellen schneller zu einer produktiven Replikation und Infektion nicht-transfizierter Zellen geführt hat als in NIH/3T3-Zellen. Da CIM-Zellen aus C57BL/6-Mäusen stammen und NIH/3T3-Zellen aus Swiss Mäusen generiert wurden, ist aber nicht ganz auszuschließen, dass der genetische Hintergrund der Zellen auch einen Einfluss auf die Replikationsfähigkeit und somit die Rekonstitution von Δ M34-MCMV in diesen Zellen hat. Wahrscheinlicher erscheint jedoch, dass aufgrund der stark attenuierten Replikation von Δ M34-MCMV die verwendeten CIM-Zellen für die lange benötigte Rekonstitutionsdauer besser geeignet sind, da sich NIH/3T3-Zellen im Vergleich zu CIM-Zellen deutlich schneller vom Zellkulturgefäß lösen und daher häufiger passagiert werden müssen. Die hier verwendeten CIM-Zellen unterliegen außerdem als immortalisierte Zell-Linie im Gegensatz zu den ebenfalls häufig verwendeten primären MEF nicht der Seneszenz. Dementsprechend konnten die CIM-Zellen während der hier beschriebenen Rekonstitutionen nach der BAC-Transfektion so lange passagiert werden, bis eine produktive Replikation erfolgte und schließlich aus den vollständig durchinfizierten Zellen eine ausreichende Viruskonzentration

für die Anfertigung von Virusstocks erreicht wurde (s. Kap. 3.3.1). Nachträgliche vergleichende, aber erfolglos durchgeführte Rekonstitutionsversuche von $\Delta M34$ -MCMV in NIH/3T3-Zellen und primären MEF bis zur Ablösung oder Seneszenz der jeweiligen Zellen bestätigen diese Annahme (Daten nicht gezeigt). Für die Rekonstitution und Virusstock-Präparation von stark attenuierten MCMV-Mutanten sollten daher in Zukunft CIM-Zellen aufgrund ihrer langen Kultivierbarkeit anderen, weniger gut passagierbaren Zell-Linien vorgezogen werden (Eilbrecht *et al.*, 2020).

4.2.2 $\Delta M34$ -MCMV ist *in vitro* stark attenuiert

In vergleichenden Wachstumsanalysen wurde gezeigt, dass die Replikation von $\Delta M34$ -MCMV in Fibroblasten im Vergleich zum parentalen wt-MCMV 10- bis 100-fach reduziert ist. Die Replikation von $\Delta M33$ -MCMV ist jedoch, wie bereits mehrfach publiziert (Sherrill *et al.*, 2009; Davis-Poynter *et al.*, 1997), *in vitro* nicht beeinträchtigt (s. Abb. 3.20). Der Wachstumsdefekt von $\Delta M34$ -MCMV wurde sowohl in primären *mouse newborn cells* (MNC) als auch in CIM nachgewiesen, unabhängig von der Herkunft der primären Zellen aus C57BL/6 oder BALB/c Mäusen (s. Abb. 3.20, 3.21 und 3.22). Aufgrund der nahezu identischen Replikation von $\Delta M34$ -MCMV und $\Delta M34^{\text{KanaR}}$ -MCMV können Auswirkungen der für die Deletion inserierten Fremd-DNA auf die Replikation ausgeschlossen werden (s. Abb. 3.23). Es kann außerdem davon ausgegangen werden, dass kein Effekt auf die Replikation durch eine genomische Instabilität aufgrund der Deletion eines größeren Genomabschnitts vorliegt. Die Replikation der Doppeldeletionsmutante $\Delta M33$ - $\Delta M34$ -MCMV zeigt, dass eine gleichzeitige Deletion der direkt benachbarten ORFs *M33* und *M34* nicht zu einer stärkeren Attenuierung führt als die einzelne Deletion von *M34* (s. Abb. 3.21).

Auch die Replikation von $\Delta M34\text{HA}$ -MCMV erwies sich als gleichermaßen attenuiert wie $\Delta M34$ -MCMV und bestätigt, dass MCMV bei einer Abwesenheit des Proteins pM34HA *in vitro* stark attenuiert ist (s. Abb. 3.25 und 3.26). Dies verdeutlicht, dass *M34* zwar nicht essenziell, aber für eine produktive Replikation von hoher Bedeutung ist. Baluchova *et al.* benutzten für ihre Studien weitere Mutanten, welche mit einer Transposon-Insertion in *M34* an Position 44,827 (Codon 582) oder einer C-terminalen Verkürzung durch Deletion der CDS für die AS 548 bis 854 ebenfalls replikationskompetent blieben. Auch diese Mutanten zeigten laut den Autoren einen Replikationsnachteil von bis zu 100-fach gegenüber des wt-MCMV, eine Verkürzungsmutante ohne die N-terminale CDS für die AS 1 bis 605 wurde dagegen als nicht rekonstituierbar beschrieben (Baluchova *et al.*, 2008). Die Autoren schlossen daher darauf, dass der N-terminale Teil von *M34* für die Replikation essenziell ist (Baluchova *et al.*, 2008). Neure Ergänzungen zur ursprünglichen MCMV-Annotation schlugen innerhalb der Sequenz von

M34 weitere überlappende ORFs *m33.1*, *m34.1* und *m34.2* vor (Tang *et al.*, 2006; Brocchieri *et al.*, 2005). Die in dieser Arbeit vorgenommene und auch von Baluchova *et al.* beschriebene vollständige Deletion von *M34* umfasst daher auch die ORFs *m33.1* und *m34.1*. Der Befund, dass $\Delta M34$ -MCMV replikationsfähig ist, zeigt daher auch, dass weder *m33.1* noch *m34.1* essenziell sind. Im Gegensatz zu *m33.1* und *m34.1* wurde der auf dem komplementären Strang kodierte ORF *m34.2* nur teilweise deletiert, sodass vom kodierten Protein pm34.2 nur ein C-terminaler Teil fehlen würde. Das verbliebene pm34.2 würde in $\Delta M34$ -MCMV-infizierten Zellen als Fusionsprotein aus den ursprünglichen 66 N-terminalen Codons und weiteren artifiziellen AS exprimiert. Für pm34.2 wurde von Tang *et al.* eine mitochondriale Lokalisation beschrieben. Dessen Deletion führte zu einem deutlichen Replikationsdefekt von fast $2 \log_{10}$ und einer von den Autoren beobachteten kleineren Plaquegröße als bei wt-MCMV (Tang *et al.*, 2006). Auch während der Experimente zur vorliegenden Arbeit wurden für $\Delta M34$ -MCMV deutlich kleinere Plaques beobachtet als für das parentale wt-MCMV (Daten nicht gezeigt). Es kann daher aktuell nicht ausgeschlossen werden, dass die attenuierte Replikation auch teilweise durch die veränderte und verkürzte Sequenz von *m34.2* oder die Deletion der ORFs *m33.1* und *m34.1* bedingt sein kann (Eilbrecht *et al.*, 2020). Für eine experimentelle Beurteilung der Bedeutung dieser ORFs für die Replikation könnte versucht werden, stille Punktmutationen in den Startcodons der kleineren ORFs bei gleichzeitigem Erhalt der korrekten CDS für *M34* einzufügen.

Das HCMV-Homolog UL34 ist im Gegensatz zu *M34* für die Replikation essenziell. Es bindet an die Konsensus-Sequenzen AAACACCGT[G/T] und reguliert als transkriptioneller Repressor virale Gene wie US3 und US9 (Liu und Biegelke, 2013; LaPierre und Biegelke, 2001). Kürzlich wurde gezeigt, dass pUL34 außerdem die *oriLyt*-abhängige DNA-Replikation steigert, und dort auch an die leicht abweichende Sequenz AAACGCCGTT bindet (Slayton *et al.*, 2018). Wie bereits diskutiert, ist die minimal funktionelle Domäne von pUL34 hochgradig konserviert (s. Kap. 4.1.4). Es liegt daher nahe, dass eine funktionelle Homologie von pM34 vorliegt, welche durch dessen Deletion zu Veränderungen in der Regulation viraler Gene und/oder zu einer geringeren DNA-Replikation führt und in eine reduzierte Replikation von $\Delta M34$ -MCMV resultieren kann. Eine Durchsichtung des MCMV-Genoms (Strain Smith, GenBank GU305914) ergab vier vollständig konservierte pUL34-Konsensus-Sequenzen (AAACACCGT[G/T]) sowie sechs weitere ähnliche pUL34 Bindestellen (AAAC[A/G]CCGT[C/G/T]). Jedoch wurde keine dieser Konsensus-Sequenzen in der Nähe des *major immediately early promoter* (MIEP) oder der *oriLyt*-Region von MCMV gefunden (Masse *et al.*, 1997; Dorsch-Häsler *et al.*, 1985). Es ist daher möglich, dass die Bindestellen für pM34 in ihrer Sequenz von der pUL34-Konsensus-Sequenz abweichen, oder dass in MCMV andere Gene durch pM34 reguliert werden als in HCMV durch pUL34 (Eilbrecht *et al.*, 2020). Ein Hinweis darauf ist eine verkürzte pUL34-Konsensus-Sequenz, welche im pEF1-Promotor möglicherweise noch von pUL34 und pM34 gebunden wird (s. Kap. 3.1.1).

4.3 M33 und M34 sind nicht die einzigen MCMV-kodierten IFN γ -Antagonisten

Die im Transfektionskontext nach ektopter Expression generierten Ergebnisse bestätigen, wie in Kapitel 3.1.1 diskutiert, eine Inhibition der IFN γ -Signaltransduktion durch pM33 und pM34 und die HCMV-kodierten Homologe pUL33 und pUL34. Experimente zur Untersuchung eines Replikationsphänotyps von Δ M33-MCMV, Δ M34-MCMV und Δ M33- Δ M34-MCMV aufgrund der Deletion der Antagonisten in IFN γ -behandelten Zellen ergaben jedoch keine erhöhte IFN γ -Sensibilität der Deletionsviren im Vergleich zum parentalen wt-MCMV. Eine Vorinkubation der Zellen mit IFN γ 48 h vor der Infektion wirkt antiviral gegen MCMV und führt, wie aufgrund vorheriger Publikationen bereits erwartet, zu einer Reduktion der Replikation von wt-MCMV um etwa $1,5 \cdot \log_{10}$ (Zimmermann *et al.*, 2005). Auch gegen die drei Virusmutanten Δ M33-MCMV, Δ M34-MCMV und Δ M33- Δ M34-MCMV wurde ein vergleichbarer antiviraler Effekt von IFN γ nachgewiesen. Es wurde jedoch weder für Δ M33-MCMV noch für Δ M34-MCMV oder Δ M33- Δ M34-MCMV ein größerer Wachstumsnachteil durch die Inkubation der Zellen mit IFN γ als von wt-MCMV beobachtet. Dies widerspricht dennoch nicht der Hypothese, dass pM33 und pM34 IFN γ -Antagonisten sind, da CMV über weitere Antagonisten des Interferonsystems verfügt, welche in den hier generierten Deletionsmutanten weiterhin exprimiert werden. In MCMV ist der IFN-Antagonist pM27 besonders gut charakterisiert. Eine Deletion von M27 führt zu einer starken Sensitivität von Δ M27-MCMV gegen eine IFN-Inkubation. Insbesondere für IFN γ ist eine hochgradig antivirale Wirkung gegen Δ M27-MCMV beschrieben (Le-Trilling *et al.*, 2018; Zimmermann *et al.*, 2005). Da die CDS für pM27 in allen drei Deletionsmutanten Δ M33-MCMV, Δ M34-MCMV und Δ M33- Δ M34-MCMV noch vorhanden ist, liegt nahe, dass eine Deletion eines IFN γ -Antagonisten nicht zwangsläufig zu offensichtlichen Replikationsdefekten führen muss. Die hier vorliegenden Ergebnisse lassen daher nicht die Aussage zu, dass M33 und M34 keine Antagonisten der IFN γ -induzierten Genexpression sind. Sie verdeutlichen aber, dass M33 und M34 nicht die einzigen MCMV-kodierten IFN γ -Antagonisten sind. Für eine experimentelle Bestätigung, dass der pM27-vermittelte IFN γ -Antagonismus zu der verbliebenen Replikationsfähigkeit von Δ M33-MCMV, Δ M34-MCMV und Δ M33- Δ M34-MCMV in IFN γ -behandelten Zellen beiträgt, sollten zukünftig Virusmutanten mit Deletionen von M33, M34 oder beiden ORFs und jeweils der zusätzlichen Deletion von M27 generiert und deren IFN γ -Sensitivität analysiert werden. Eine weitere Herangehensweise wäre die Infektion von STAT2^{-/-}-Zellen mit Δ M33-MCMV, Δ M34-MCMV und Δ M33- Δ M34-MCMV, welche mögliche redundante Effekte durch das weiterhin kodierte M27 aufzeigen könnten, da der IFN-Antagonismus von pM27 über eine proteasomale Degradation von STAT2 erfolgt (Le-Trilling *et al.*, 2018; Trilling *et al.*, 2011; Zimmermann *et al.*, 2005).

4.3.1 Deletion von *M34* führt zu mehr Oberflächenexpression von MHC-I in MCMV-infizierten Zellen IFN γ -Stimulation

Wie in Abbildung 3.29 gezeigt, wurde in einem *loss-of-function*-Ansatz ein Effekt der Deletionen von *M33* und *M34* auf die Expression von ISGs untersucht. Dazu wurden infizierte Zellen auf Veränderungen ihrer Oberflächenexpression von MHC-I-Molekülen als klassische ISGs überprüft. Die Inkubation von nicht-infizierten CIM-Zellen mit IFN γ induzierte eine starke Steigerung der Oberflächenexpression von MHC-I-Molekülen. Somit wurde gezeigt, dass wie in humanen Fibroblasten (Megger *et al.*, 2017) auch in den hier verwendeten murinen, immortalisierten Fibroblasten, die Expression der Gene für die MHC-I-Komplexe durch IFN γ stimulierbar ist und diese experimentell als Indikatorgene für ISGs herangezogen werden können. Im Gegensatz zu den nicht-infizierten Zellen wurde in der Infektion mit wt-MCMV nach einer Inkubation mit IFN γ keine signifikante Steigerung der MHC-I-Oberflächenexpression induziert (s. Abb. 3.29). Diese Ergebnisse entsprechen den Erwartungen, da für MCMV drei MHC-I-Antagonisten bekannt sind. Diese Antagonisten agieren alle auf der Ebene der korrekten Assemblierung von MHC-I-Antigen-Komplexen oder deren Translokation und Präsentation an der Zelloberfläche. In den mit Δ M33-MCMV-infizierten Zellen ist die IFN γ -induzierte MHC-I-Oberflächenexpression mit den wt-MCMV-infizierten Zellen vergleichbar. Allerdings kann auf der Basis dieser Ergebnisse *M33* nicht als Antagonist der MHC-I-Expression ausgeschlossen werden, da wie zuvor erwähnt eine Redundanz mit weiterhin exprimierten Antagonisten vorliegen kann. Interessanterweise wurde dennoch in Δ M34-MCMV-infizierten Zellen eine höhere Induzierbarkeit der MHC-I-Expression festgestellt als in wt-MCMV infizierten Zellen. Aufgrund der zuvor diskutierten Ergebnisse der *M34*-vermittelten Inhibition der IFN γ -induzierten GAS-Promotoraktivität liegt die Schlussfolgerung nahe, dass *M34* die Expression der MHC-I-Gene inhibiert, welche als klassische ISGs normalerweise durch IFN γ induziert werden. Dass bei einer Deletion von *M34* keine vollständige Wiederherstellung der MHC-I-Oberflächenexpression, wie in den nicht-infizierten Zellen, erfolgt, ist dadurch zu erklären, dass in Δ M34-MCMV weiterhin bereits bekannte MHC-I-Antagonisten exprimiert werden, welche den Transport der MHC-I-Antigenkomplexe zur Zelloberfläche weiterhin verhindern. Das MCMV-kodierte *m06* führt die MHC-I-Komplexe nach ihrer Assemblierung im ER der lysosomalen Degradation zu (Reusch *et al.*, 1999), während *m152* eine Arretierung von MHC-I-Komplexen auf ihrem Weg vom ER zur Zellmembran im ER-Golgi *intermediate compartment* auslöst, sodass diese nicht die Zellmembran erreichen (Ziegler *et al.*, 1997). Ein weiterer Antagonist *m04* interagiert bereits im ER mit den MHC-Komplexen. Im Gegensatz zu *m06* und *m152* inhibiert *m04* den Transport der MHC-I-Komplexe aber nicht, sondern lässt zusammen mit einem weiteren viralen Protein, MATp1, einen Teil der Komplexe die Zellmembran erreichen und ermöglicht in der Folge weiterhin eine Erkennung der Selbst-Präsentation über MHC-I an NK-Zellen, trotz der durch *m06* und *m152* insgesamt

stark reduzierten MHC-I-Oberflächenlokalisation (Železnjak *et al.*, 2019; Babić *et al.*, 2010; Kleijnen *et al.*, 1997). Das Virus hat diese Mechanismen im Laufe der Evolution entwickelt, da die MHC-I-Präsentation an der Oberfläche jeder Körperzelle notwendig ist, um den Schutz gesunder Zellen vor der NK-Zell-vermittelten Apoptose zu gewährleisten. Werden Peptide aus Virus-kodierten, zellfremden Proteinen durch MHC-I auf der Zelloberfläche präsentiert, werden diese durch CD8⁺-T-Zellen mit ihrem spezifischen T-Zell-Rezeptor erkannt und die infizierten Zellen durch deren zytotoxische Funktionen eliminiert. Fehlt die Expression von MHC-I auf einer Zelle jedoch aufgrund viruskodierter Antagonisten vollständig, werden NK-Zellen wegen einer *missing-self* Erkennung zur Ausübung ihrer zytotoxischen Funktionen aktiviert, da spezielle inhibitorische NK-Zell-Rezeptoren nicht durch eine Bindung an MHC-I-Moleküle aktiviert werden. Interessanterweise wirkt MCMV dem entgegen, indem durch spezifische Interaktionen von *m04* und *MATp1* die MHC-I-Moleküle zur Zellmembran transportiert werden, welche als Liganden mit inhibitorischen NK-Zell-Rezeptoren interagieren (Železnjak *et al.*, 2019). Dass jedoch manche Kombinationen aus MHC-I-Komplexen und aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren zur Erkennung MCMV-infizierter Zellen und einer NK-Zell-abhängigen Kontrolle der Infektion führen können (Kielczewska *et al.*, 2009), führen die Autoren auf eine mögliche evolutionäre Anpassung des Wirts an die durch *m04* erwirkte, vermehrte Oberflächenlokalisation des inhibitorischen NK-Zell-Rezeptors zurück (Železnjak *et al.*, 2019).

Wie in Abb. 3.29 gezeigt, konnte trotz dieser mehrschichtigen Antagonismen durch MCMV nach einer Deletion von *M34* eine erhöhte MHC-I-Oberflächenexpression nach IFN γ -Stimulation beobachtet werden. Da *M34* nach den vorliegenden Ergebnissen die IFN γ -induzierte GAS-Promotoraktivität inhibiert, wirkt sich diese Inhibition der IFN γ -induzierten Genexpression aller Voraussicht nach nicht nur auf Gene des MHC-I-Komplexes aus. Beispielsweise sind auch die Untereinheiten des Immunproteasoms ISGs und werden folglich durch IFN γ induziert (Aki *et al.*, 1994). Das Immunproteasom spaltet Proteine intrazellulärer Erreger und stellt so eine größere Verfügbarkeit an optimalen Peptiden für die Oberflächenexpression in MHC-I-Komplexen zur Verfügung als das konstitutive Proteasom (Driscoll *et al.*, 1993; Gaczynska *et al.*, 1993). Ein pM34-vermittelter Antagonismus der ISG-Expression würde daher dazu führen, dass sowohl die vermehrte Spaltung viraler Proteine zu präsentierbaren Peptiden als auch die Expression der MHC-I-Komplexe, welche diese Präsentation vornehmen, ab dem Zeitpunkt der pM34-Expression gleichzeitig inhibiert würden. Daher wäre es nachvollziehbar, dass zusätzlich zu den MHC-I-Antagonisten, welche die Antigenpräsentation über die zuvor beschriebenen Retentionsmechanismen inhibieren, außerdem die Expression einiger für die Präsentation verantwortlichen Gene herunterreguliert würde. Es kann anhand der hier diskutierten Daten bisher nicht von einem gezielten, spezifischen Antagonismus der MHC-I-Präsentation ausgegangen werden. Angesichts der bereits bekannten Vielschichtigkeit CMV-kodierter Antagonisten gegen wichtige Immunfunktionen erscheint es eher wahrscheinlich, dass das delikate Gleichgewicht aus

den bekannten MHC-I-Antagonismen zur Prävention einer Antigen-Erkennung virusinfizierter Zellen durch CD8⁺-T-Zellen und der weiterhin zum Teil erhaltenen MHC-I-Präsentation zum Schutz vor einer NK-Zell-vermittelten Apoptose durch eine zusätzliche Inhibition der MHC-I-Expression von *M34* feinreguliert oder ergänzt wird.

4.3.2 Etablierung eines *gain-of-function*-Experimentalsystems zur Untersuchung redundanter IFN γ -Antagonisten in MCMV

Da CMV über mehrere Antagonisten des Interferonsystems verfügt, kann sich die Untersuchung von IFN-Antagonisten mittels Deletionsviren, in welchen nur einzelne Antagonisten deletiert sind, in *loss-of-function*-Experimenten als schwierig erweisen. Die Abwesenheit eines einzelnen Antagonisten durch dessen Deletion aus dem CMV-Genom muss nicht zwangsläufig zu offensichtlichen Phänotypen der Deletionsmutante führen, da redundante, nicht deletierte Antagonisten die fehlenden Funktionen kompensieren können. Auch im Rahmen dieser Arbeit konnten anhand einer Beurteilung der *in vitro* Replikation von Δ M33-MCMV, Δ M34-MCMV und Δ M33- Δ M34-MCMV keine Phänotypen einer stärkeren IFN γ -Sensitivität der Deletionsviren im Vergleich zu wt-MCMV beobachtet werden, obwohl die Gene in der ektopen Expression die IFN γ -induzierten Genexpression inhibieren. Eine andere Herangehensweise zur Untersuchung der hier beschriebenen IFN γ -Antagonismen durch pM33/pUL33 und pM34/pUL34 im Kontext einer viralen Infektion ist die Etablierung eines *gain-of-function* Experimentalsystems. In einem geeigneten System wäre zu erwarten, dass IFN γ -Antagonisten auch antivirale Effekte von IFN γ gegen andere Viren reduzieren oder aufheben können. Im Rahmen dieser Arbeit wurden entsprechende Experimente zur Etablierung eines solchen *gain-of-function*-Systems vorgenommen. Wie in Kapitel 3.6.1 gezeigt ist, wurde zunächst ein adenoviraler Vektor auf dem Hintergrund des DNA-Virus Adenovirus 5 für derartige Experimente in Erwägung gezogen. Antivirale Effekte von IFN γ gegen Ad5-gfp sollten anhand der während einer Infektion entstehenden Fluoreszenz quantifiziert werden. Eine vorherige Transfektion der Zellen mit *M33* und *M34* sollte durch die beschriebenen Antagonismen die antivirale Wirkung von IFN γ gegen Ad5-gfp reduzieren. Allerdings wirkte IFN γ gegen das getestete Ad5-gfp nicht antiviral (s. Kap. 3.6.1). Für das Experiment wurden HEK-293A-Zellen verwendet, welche das adenovirale E1a und E1b stabil exprimieren und so die Replikationsfähigkeit von adenoviralen Vektoren wie Ad5-gfp gewährleisten, in welchen die E1-Region deletiert wurde (Morris und Wildner, 2000; Graham *et al.*, 1977). Die Ursachen dafür, dass IFN γ in diesem System nicht antiviral wirkt, sind daher vermutlich adenovirale IFN-Antagonismen der E1-Proteine. Für E1a wurde unter anderem beschrieben, dass es durch Bindung an p300/CBP-Komplexe mit ISGF3 und GAF die Expression von IFN-induzierten ISGs inhibieren kann (Routes *et al.*, 1996). Es wurde auch gezeigt, dass E1a direkt mit STAT1

interagieren und die IFN γ -induzierte, STAT1-abhängige Transkription verhindern kann (Look *et al.*, 1998). Auch mit unphosphoryliertem STAT1 und IRF1 kann E1a interagieren und die Bindung von STAT1-IRF1 an GAS-enthaltende Promotorregionen, wie das LMP2-regulierende ICS-2/GAS Element, inhibieren (Chatterjee-Kishore *et al.*, 2000). Wie in Kapitel 3.6.1 gezeigt, wird nach einer Inkubation mit IFN γ in HEK-293A-Zellen keine Reportergenexpression unter der Kontrolle des pGAS-Promotors detektiert. Die vorliegenden Daten zeigen daher, dass ein oder mehrere der beschriebenen IFN-Antagonismen von E1 auch die antivirale Aktivität von IFN γ in diesen Zellen inhibieren. Ad5-gfp ist in dem vorgestellten Ansatz daher nicht als *gain-of-function*-Experimentalsystem für die Untersuchung von IFN γ -Antagonisten geeignet.

Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass sich eine Vakziniavirus-Infektion muriner Zellen prinzipiell für die Untersuchung von IFN γ -Antagonisten eignet. Für das DNA-Virus Vaccinia sind ebenfalls mehrere IFN-Antagonisten beschrieben (Perdiguero und Esteban, 2009). Beispielsweise bindet der lösliche VACV-kodierte IFN γ -Rezeptor B8 (B8R im VACV Stamm *Western Reserve*) an IFN γ und entzieht es so der Bindung an die zellulären IFN γ -Rezeptoren (Alcamí und Smith, 1995). Dabei kann B8R an IFN γ einiger Spezies binden, hat aber für murines IFN γ nur eine geringe Affinität und keine inhibitorische Wirkung (Symons *et al.*, 2002; Alcamí und Smith, 1995). Dazu konsistent wurde gezeigt, dass murines IFN γ in primären murinen Fibroblasten und in der NIH/3T3-Zell-Linie antiviral gegen das VACV wirkt (Trilling *et al.*, 2009). Für die Etablierung eines VACV-*gain-of-function*-Experimentalsystems wurde im Rahmen dieser Arbeit die antivirale Wirkung von IFN γ gegen das VACV vergleichend in MEF und MNC untersucht. Wie in Kapitel 3.6.2 beschrieben, konnte eine hochgradig antivirale Wirkung von murinem IFN γ in MEF und MNC gegen VACV bestätigt werden, welche über die IFN γ -induzierte Jak-STAT-Signaltransduktion vermittelt wurde. Die Infektion von murinen Zellen mit VACV eignet sich daher prinzipiell als *gain-of-function-Ansatz* für eine Wiederherstellung der VACV-Replikation in der Gegenwart von potenziellen IFN γ -Antagonisten. Eine Generierung von rekombinanten VACV-Mutanten mit stabiler Expression von pM33, pUL33, pM34 und pUL34 soll zukünftig dem Nachweis dienen, ob diese Gene auch im Infektionskontext als IFN γ -Antagonisten agieren.

4.4 Δ M34-MCMV ist *in vivo* attenuiert

Die Infektion von BALB/c Mäusen mit Δ M34-MCMV und eine anschließende Bestimmung der Virustiter in den Organen der Mäuse ergab, dass Δ M34-MCMV an Tag 3 nach der Infektion entgegen den Erwartungen nur etwas weniger in Milz, Leber, Lunge und Niere repliziert als wt-MCMV (s. Kap. 2.7.2A). An Tag 21 wurde dagegen kein Δ M34-MCMV in der Speicheldrüse,

Milz, Lunge oder Niere nachgewiesen. Lediglich in der Leber von drei Mäusen wurde eine Replikation von $\Delta M34$ -MCMV beobachtet (s. Kap. 2.7.2B). $\Delta M34$ -MCMV ist daher *in vivo* stark attenuiert. Es ist überraschend, dass $\Delta M34$ -MCMV trotz der starken Attenuierung *in vitro* zu den frühen Zeitpunkten der Infektion nachweisbar ist. Die Replikation von $\Delta M27$ -MCMV, in welchem der IFN-Antagonist *M27* deletiert wurde, repliziert *in vitro* ohne eine Inkubation der Zellen mit IFN nur wenig schlechter als wt-MCMV. In der Gegenwart von IFN, insbesondere $IFN\gamma$, ist $\Delta M27$ -MCMV dagegen *in vitro* stark attenuiert (Le-Trilling *et al.*, 2018; Zimmermann *et al.*, 2005). *In vivo* ist nur zu Beginn der Infektion eine geringe Replikation von $\Delta M27$ -MCMV in der Milz, Leber und in Speicheldrüsen von BALB/c-Mäusen nachweisbar, und im weiteren Infektionsverlauf vollständig attenuiert (Le-Trilling *et al.*, 2018). In Hinblick auf den *in vitro* deutlich stärker ausgeprägten Replikationsdefekt von $\Delta M34$ -MCMV im Vergleich zu den vorliegenden Daten zu $\Delta M27$ -MCMV wurde daher eine hochgradige bis vollständig attenuierte Replikation von $\Delta M34$ -MCMV erwartet. In einem direkten Vergleich der Replikation von $\Delta M34$ -MCMV und dem stark attenuierten $\Delta M27$ -MCMV in der Milz replizierten $\Delta M27$ -MCMV und $\Delta M34$ -MCMV jedoch an Tag 3 vergleichbar schlechter als wt-MCMV.

Eine mögliche Erklärung für die Replikation von stark attenuierten Viren wie $\Delta M34$ -MCMV und $\Delta M27$ -MCMV ist die sogenannte forcierte Virusreplikation (*enforced viral replication*) in der Milz. Honke *et al.* zeigten, dass in $CD169^+$ -Makrophagen der Milz die Replikation von vesicular stomatitis virus (VSV) lokal, und daher in einer kontrollierten Umgebung, zugelassen wird (Honke *et al.*, 2012). Als erstes dafür verantwortliches Gen wurde die *Ubiquitin-specific peptidase 18* (Usp18) identifiziert. Neben der ursprünglich namensgebenden Peptidase-Funktion inhibiert Usp18 als ISG im Sinne eines negativen *Feedback*-Mechanismus auch die IFN-Typ-I-Signaltransduktion durch eine Inhibition der Bindung von Jak1 an den Interferonrezeptor IFNAR2 (Malakhova *et al.*, 2006). In $CD169^+$ -Makrophagen führt dagegen eine erhöhte Expression von Usp18 aufgrund der inhibierten IFN-Signaltransduktion zu einer besseren Virusreplikation (Honke *et al.*, 2012). Dies führt zu einer Aktivierung der dort zirkulierenden und ansässigen B- und T-Zellen und verstärkt dadurch die Induktion und Differenzierung der spezifischen adaptiven Immunantworten. Eine solche *enforced viral replication* könnte daher auch erklären, warum die geringe und vergleichsweise kurze Replikation von $\Delta M34$ -MCMV und $\Delta M27$ -MCMV dennoch eine Induktion von MCMV-spezifischen IgG zur Folge hat (s. Abb. 3.35 und Le-Trilling, Jagnjić, Brizić *et al.*, Manuskript in Vorbereitung). Es sollte zukünftig untersucht werden, ob die forcierte Virusreplikation im Allgemeinen, oder die Expression von Usp18 als ISG und negativer Regulator der IFN-Signaltransduktion im Speziellen, tatsächlich für die $\Delta M34$ -MCMV-Replikation in der Milz verantwortlich ist. Ob und welche Rolle Usp18 bei der Inhibition der ebenfalls Jak1-abhängigen $IFN\gamma$ -Signaltransduktion spielt, ist derzeit nicht bekannt. Erste Anhaltspunkte dazu könnten *in vitro*-Replikationsanalysen in $CD169^+$ -Makrophagen und anderen, nicht zur forcierten Virusreplikation fähigen $F4/80^+$ -Makrophagen, bieten. Auch die ektope Expression von Usp18

durch eine Transfektion der Zellen vor einer Infektion mit Δ M34-MCMV oder die Nutzung von stabil Usp18-exprimierenden Zellen könnte in Erwägung gezogen werden.

Zu beachten ist, dass Δ M34-MCMV für drei der Mäuse auch nach 21 Tagen noch in der Leber gefunden wurde (s. Kap. 2.7.2B). Nach derzeitigem Kenntnisstand wurde für die Leber keine forcierte Virusreplikation beschrieben, da die untersuchten Kupferzellen die Virusreplikation nicht zulassen (Honke *et al.*, 2012). Es wäre aber denkbar, dass in Hepatozyten oder anderen Leber-residenten Zellen eine basale Expression von Usp18 stattfindet oder durch eine Virusinfektion eine besonders starke Induktion von Usp18 erfolgt. Für erste Hinweise könnten auch hier *in vitro* Replikationsanalysen von Δ M34-MCMV in Hepatozyten durchgeführt und die Expressionlevel von Usp18 überprüft werden. Es sollte außerdem zukünftig mit größeren Testgruppen weiter untersucht werden, ob die teilweise beobachtete Replikation von Δ M34-MCMV in der Leber nach 21 Tagen bestätigt werden kann, und ob Δ M34-MCMV tatsächlich weder die Speicheldrüse als primären Ort der Dissemination erreicht noch eine Latenz etablieren kann. Da in den vorliegenden Experimenten die Mäuse durch eine intraperitoneale Infektion infiziert wurden, wäre es auch möglich, dass eine Infektion der physiologisch eher sekundär infizierten Organe wie Milz und Leber in der experimentellen Infektion nur aufgrund des direkten Weges die CD169⁺-Makrophagen in der Milz erreicht hat. Von besonderem Interesse für weiterführende Experimente wäre daher, die Dissemination und Replikation von Δ M34-MCMV und Δ M27-MCMV vergleichend mit wt-MCMV über physiologische Infektionsrouten, wie die intranasale Inokulation, zu untersuchen.

4.4.1 Bedeutung der inhibierten IFN γ -Signaltransduktion für die adaptive Immunität

NK-Zellen gelten als Hauptproduzenten von IFN γ im angeborenen Immunsystem. Aber auch für adaptiven Immunität spielt IFN γ eine zentrale Rolle. Für eine effektive adaptive Immunantwort ist die Antigenpräsentation durch professionelle Antigenpräsentierende Zellen (APCs) des angeborenen Immunsystems, den Makrophagen und Dendritischen Zellen, nötig. Wie in Kapitel 4.3.1 diskutiert, wird die Expression der MHC-Moleküle durch IFN γ induziert. Diese Genregulation erfolgt über die IFN γ -Signaltransduktion und eine Aktivierung der IRF1-Expression, welches selbst als Transkriptionsfaktor die Transkription vieler ISGs reguliert, darunter auch MHC-I (Chang *et al.*, 1992). Die Induktion der MHC-II-Expression ist dagegen vom Transaktivator CIITA abhängig, welcher selbst durch IFN γ induziert wird und folglich ebenfalls ein ISG ist (Steimle *et al.*, 1994). IFN γ reguliert in APCs neben den Untereinheiten des Immunproteasoms auch die Transporterproteine *Transporter associated with antigen processing* (TAP)-1 und

TAP-2, welche für einen Transport der zu präsentierenden Peptide in das ER zur Beladung der MHC-I-Moleküle erforderlich sind (Ma *et al.*, 1997; Epperson *et al.*, 1992). Eine Reduktion oder Inhibition der IFN γ -induzierten Signaltransduktion in Makrophagen und Dendritischen Zellen durch einen viralen Antagonismus hätte daher auch weitreichende Folgen auf die Verfügbarkeit vieler Komponenten der Antigenpräsentation, welche sich auf die Funktion der spezifischen Pathogenerkennung des adaptiven Immunsystems auswirken würden.

Aber nicht nur die Antigenpräsentation für die spezifische Antigenerkennung durch T-Zellen, sondern auch deren Differenzierung wird durch IFN γ gesteuert. Für eine vollständige Differenzierung naiver T-Zellen ist eine Stimulation durch IFN γ erforderlich, da der Transkriptionsfaktor *T-box expressed in t cells* (t-bet), welcher eine zentrale Rolle für die Differenzierung von T-Zellen zu Typ 1 T-Helferzellen (T_H1)-Zellen spielt, durch IFN γ induziert wird (Lighvani *et al.*, 2001). Dieser induziert die Expression der IL-12 Rezeptoruntereinheit IL-12R β 2, wodurch die T-Zellen responsiv für das von APCs sekretierte IL-12 werden, welches wiederum die Produktion von IFN γ in T-Zellen aktiviert (Afkarian *et al.*, 2002). Auch CD8⁺-T-Zellen, welche als zytotoxische T-Zellen besonders für eine spezifische Abwehr virusinfizierter Zellen von Bedeutung sind, werden durch IFN γ aktiviert (Whitmire *et al.*, 2005; Siegel, 1988). Die aktivierten T_H1-Zellen und zytotoxischen CD8⁺-T-Zellen sekretieren nach ihrer Aktivierung selbst große Mengen von IFN γ und tragen so ebenfalls zur Aktivierung und Stimulation weiterer Immunzellen sowie einer Induktion der MHC-I-Expression bei. IFN γ verstärkt also in einem selbstverstärkenden positiven *Feedback* Mechanismus nicht nur die angeborenen, sondern auch die adaptiven Immunantworten. Die Sekretion und Signaltransduktion von IFN γ sind daher wichtig für die Ausbildung der T-Zell-Antworten gegen intrazelluläre Erreger. Eine Inhibition der IFN γ -induzierten Signaltransduktion durch CMV-kodierte Antagonisten würde also auch einer Ausreifung potenter zellulärer, adaptiver Immunantworten entgegenwirken.

Einige CMV-kodierte Antagonisten wirken gezielt den einzelnen Mechanismen der adaptiven Immunreaktion entgegen. Als Beispiele seien hier die in Kapitel 4.3.1 erwähnten MCMV-kodierten MHC-I-Antagonisten erwähnt. Auch HCMV verfügt über mehrere MHC-Antagonisten, wie beispielsweise US3 und US11 Ahn *et al.*, 1996; Jones *et al.*, 1995, sowie einen Antagonisten des TAP (US6) (Hengel *et al.*, 1997). Eine virale Inhibition der IFN γ -induzierte Signaltransduktion würde zusätzlich einen breit gefächerten Einfluss sowohl auf angeborene Immunantworten zu Beginn der Infektion als auch auf die verzögert eintretenden, aber spezifischen adaptiven Immunantworten nehmen. Während die lokale Inhibition antiviraler Effekte in den infizierten Zellen und den umliegenden Nachbarzellen zu Beginn der Infektion die initiale Replikation und Dissemination im Wirt gewährleisten kann, würde eine Inhibition der immunmodulatorischen Eigenschaften von IFN γ auf das Zusammenspiel zwischen angeborenen und adaptiven Effektorzellen helfen, die Eliminierung des Virus in der latenten und reaktivierenden Infektion zu

verhindern. Daher wäre zu erwarten, dass eine Infektion mit CMV vom adaptiven Immunsystem besser kontrolliert wird, wenn ein oder mehrere der IFN γ -Antagonisten aus dem CMV-Genom deletiert sind. Tatsächlich führt die Deletion des IFN γ -Antagonisten *M34*, wie in Kapitel 4.4 diskutiert, nach einer initialen Replikation in den ersten Tagen zu einer starken Attenuierung *in vivo*. Die vorliegenden Ergebnisse lassen auf eine bessere Kontrolle der Infektion durch die mit einigen Tagen Verzögerung eintretenden adaptiven Immunantworten aufgrund eines beeinträchtigten IFN γ -Antagonismus von Δ M34-MCMV schließen.

4.4.2 Δ M34-MCMV ist ein vielversprechender Kandidat für Lebend-attenuierte Vakzin-Vektoren

Δ M27-MCMV repliziert nur zu Beginn der Infektion geringfügig in der Milz und Leber. Dennoch induziert diese stark begrenzte Δ M27-MCMV-Replikation sowohl in BALB/c-Mäusen als auch in C57BL/6-Mäusen MCMV-spezifische IgG-Antikörper (Le-Trilling, Jagnjić, Brizić et. al., Manuskript in Vorbereitung). Δ M27-MCMV eignet sich nach aktuellsten Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe im Mausmodell als Lebend-Vakzin gegen MCMV-Infektionen, und vermittelt sogar einen übertragbaren Schutz neugeborener Mäuse von vakzinierten Muttertieren im congenitalen CMV-Modell (Le-Trilling, Jagnjić, Brizić et. al., Manuskript in Vorbereitung).

Auch gegen andere Virusinfektionen konnten schon MCMV-Vektor-basierte Erfolge verzeichnet werden. Eine einzelne Injektion eines MCMV-Vektors mit einem Epitop des Ebolavirus-Nukleoproteins konnte eine langanhaltende CD8⁺-T-Zell-Immunität in Mäusen induzieren (Tsuda *et al.*, 2015; Tsuda *et al.*, 2011). Gegen das Friend Retrovirus, welches als Mausmodell für die Vakzin-Vektor-Forschung gegen Retroviren eingesetzt wird, induziert ein Friend Virus *envelope* (*env*)-exprimierender MCMV-Vektor eine Schutzwirkung, welche auf Vektor-induzierten CD4⁺T-Zellantworten und neutralisierenden Antikörpern basiert, aber keine *env*-spezifischen CD8⁺T-Zellen induziert (Bongard *et al.*, 2019). In einem Hepatitis-B-Virus (HBV)-Mausmodell, welches durch eine hydrodynamische Injektion das HBV-DNA-Genom hocheffizient in die Leberzellen bringt, induzierten HBV *surface antigen*-Antigen exprimierende MCMV-Vektoren CD8⁺T-Zell-Antworten und induzierten sowohl eine Schutzwirkung vor der primären HBV-Infektion vakzinierter Mäuse als auch eine Eliminierung von HBV im Sinne eines therapeutischen Vakzinierungsmodells mit persistent HBV-infizierten Mäusen (Huang *et al.*, 2020). Interessanterweise konnte Δ M27-HBs in diesen Experimenten eine mit dem wt-MCMV-HBs-Vektor vergleichbare oder sogar teilweise bessere Wirkung erzielen (Huang *et al.*, 2020).

Wie oben gezeigt wurde, induziert auch $\Delta M34$ -MCMV MCMV-spezifische IgG-Antikörper (s. Abb. 3.35). Wie in der Infektion mit $\Delta M27$ -MCMV scheint die früh nachweisbare, im weiteren Infektionsverlauf aber attenuierte Replikation von $\Delta M34$ -MCMV für eine Stimulation des adaptiven Immunsystems mit einer Differenzierung von spezifischen B-Zellen und effektiven humoralen IgG-Immuntantworten gegen MCMV auszureichen. Es wäre daher von großem Interesse, ob die vielversprechenden Vakzin-Erfolge mit $\Delta M27$ -MCMV im Mausmodell auch auf $\Delta M34$ -MCMV übertragen werden können. Im Falle einer $\Delta M34$ -MCMV-induzierten Induktion protektiver Immuntantworten stellt die Deletion von *M34* eine vielversprechende Möglichkeit für attenuierte MCMV-basierte Lebend-Vakzin-Vektoren dar. Daher sollten in Zukunft die bereits für $\Delta M27$ -MCMV durchgeführten Experimente der MCMV-Vakzinierung sowie das Maus-Modell der congenitalen Infektion auch mit $\Delta M34$ -MCMV durchgeführt werden. Außerdem sollten auch Virusmutanten mit einer doppelten Deletion der ORFs *M27* und *M34* auf eine mögliche weiterhin initiale, aber im Verlauf der Infektion vollständig attenuierte Replikation *in vivo* und ihre Immunogenität untersucht werden.

Nicht nur im Mausmodell konnten vielversprechende MCMV-basierte Vektorstrategien gezeigt werden. Besonders in Rhesus-Makaken werden RhCMV-basierte Vektoren als Vakzine intensiv beforscht (Früh und Picker, 2017). Gegen das als *human immunodeficiency virus* (HIV)-Modell eingesetzte *simian immunodeficiency virus* (SIV) wurden langanhaltende CD4⁺- und CD8⁺-T-Zell-vermittelte Immuntantworten nachgewiesen (Hansen *et al.*, 2013; Hansen *et al.*, 2009), und auch ein RhCMV-basierter Vakzin-Vektor gegen *Mycobacterium tuberculosis* induzierte protektive CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellimmunität (Hansen *et al.*, 2018). Gegen das Ebola-Glykoprotein wurden dagegen protektive Antikörperantworten, aber keine T-Zell-Antworten detektiert (Marzi *et al.*, 2016). Für die Entwicklung von HCMV-basierten Vektoren und die Anwendung im Menschen stellt besonders die herpesvirale Latenz eine gute Möglichkeit für langanhaltende Immuntantworten, gleichzeitig aber auch eine große Hürde für die Sicherheit in der klinischen Anwendung dar. Es kommen daher für eine langfristig angestrebte Zulassung CMV-basierter Impfstoffe nur stark attenuierte Vektoren in Frage. Für HCMV wurde kürzlich eine Vektorplattform vorgestellt, welche auf dem Lebend-attenuierten HCMV-Stamm TR3 basiert. Für diesen Vektor wurde gezeigt, dass aufgrund einer Deletion des UL82/pp71-Gens zwar noch eine Latenz in CD34⁺-Zellen etabliert werden kann, das Virus aber aus der Latenz nicht mehr reaktivieren kann (Caposio *et al.*, 2019).

Von unserer Arbeitsgruppe wurde zu dem MCMV-kodierten IFN-Antagonisten pM27 das funktionelle Analog pUL145 in HCMV beschrieben (Le-Trilling *et al.*, 2020). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass auch die HCMV-kodierten Proteine pUL33 und pUL34 ebenfalls wie ihre MCMV-Homologe pM33 und pM34 die IFN γ -induzierte Genexpression inhibieren. Es liegen daher sowohl für das bereits im Mausmodell erfolgreich getestete $\Delta M27$ -MCMV als

auch für $\Delta M33$ -MCMV und $\Delta M34$ -MCMV entsprechende homologe IFN-Antagonisten als Kandidaten für eine Deletion in HCMV zur Generierung stark attenuierter Vektoren vor. Das dem $\Delta M27$ -MCMV entsprechende HCMV-Deletionsvirus $\Delta UL145$ -HCMV wurde von unserer Arbeitsgruppe bereits erfolgreich generiert (Le-Trilling *et al.*, 2020). *UL34* wurde allerdings von mehreren Gruppen als essenziell beschrieben (Rana und Biegelke, 2014; Dunn *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2003). Dennoch sollte die Generierung von $\Delta UL34$ -HCMV, möglicherweise mit anderen Mutagenese-Ansätzen wie *UL34*-komplementierenden Zellen versucht werden (Chung *et al.*, 2015). Gelingt die Rekonstitution von $\Delta UL34$ -HCMV nicht, weil *UL34* tatsächlich wie von anderen beschrieben essenziell ist, sollten mögliche Teildeletionen von *UL34* sowie das Vektorpotenzial von $\Delta M33$ -MCMV zunächst in der Maus genauer betrachtet und ggf. $\Delta UL33$ -HCMV in Kombination mit einer Deletion von *UL145* in Erwägung gezogen werden. Sollte es aber doch gelingen, eine dem $\Delta M34$ -MCMV ähnliche, stark attenuierte HCMV-Deletionsmutante $\Delta UL34$ -HCMV zu generieren, könnte diese langfristig einen spannenden potenziellen Kandidaten für HCMV-basierte Lebend-Vakzin-Vektoren darstellen. Davon unabhängig werden die schon vorliegenden Deletionsviren $\Delta M33$ -MCMV und $\Delta M34$ -MCMV einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der cytomegaloviralen Immunevasionsmechanismen gegen IFN und der Induktion CMV-spezifischer Immunantworten *in vivo* leisten.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematische Darstellung der IFN-Signaltransduktion	14
1.2	Vereinfachtes Schema der pM33-Signaltransduktion	25
3.1	Luziferase-Reportergenassay zur Quantifizierung der IFN γ -induzierten GAS-Promotoraktivität	70
3.2	pM33 und pM34 inhibieren die IFN γ -induzierte GAS-Promotoraktivität	71
3.3	pM33 inhibiert die IFN γ -induzierte GAS-Promotoraktivität dosisabhängig	72
3.4	pM34 reduziert die Induzierbarkeit des GAS-Promotors durch IFN γ trotz erhöhter unstimulierter Promotoraktivität	73
3.5	Die Inhibition der GAS-Promotoraktivität durch pM33 ist in der Kotransfektion dominant über pM34	74
3.6	Alignment der MCMV- und HCMV-kodierten homologen Proteine pM33 und pUL33	75
3.7	Die Inhibition der GAS-Promotoraktivität durch pM33 ist unabhängig von der G-Protein-vermittelten Signaltransduktion	76
3.8	Alignment der MCMV- und HCMV-kodierten homologen Proteine pM34 und pUL34	77
3.9	Der N-Terminus von pM34 ist nicht essenziell für die Inhibition der IFN γ -induzierten Genexpression	79
3.10	Die konstitutive EF1-Promotoraktivität wird von pM33 und pM34 IFN γ -unabhängig inhibiert	81
3.11	Das HCMV-kodierte pM33-Homolog pUL33 inhibiert die IFN γ -induzierte GAS-Promotoraktivität	82
3.12	Das HCMV-kodierte pM34-Homolog pUL34 inhibiert die IFN γ -induzierte GAS-Promotoraktivität	83
3.13	Die konstitutive EF1-Promotoraktivität wird von pUL33 und pUL34 inhibiert	84
3.14	Generierung von M33HA-MCMV und M34HA-MCMV mittels BAC-Mutagenese	87
3.15	pM34HA wird mit einer early/late Expressionskinetik exprimiert	88
3.16	Nukleäre Lokalisation von pM34HA in transfizierten HeLa-Zellen	89
3.17	Nukleäre Lokalisation von pM34HA in infizierten CIM-Zellen	91
3.18	Generierung von Δ M33-MCMV und Δ M34-MCMV mittels BAC-Mutagenese	93
3.19	Deletion des <i>Kanamycin</i> -Resistenzgens aus Δ M33-MCMV und Δ M34-MCMV	95
3.20	Δ M34-MCMV ist <i>in vitro</i> attenuiert	96
3.21	Δ M33- Δ M34-MCMV ist <i>in vitro</i> attenuiert	97

3.22	Die Replikation von Δ M34-MCMV und Δ M33- Δ M34-MCMV ist sowohl in primären Zellen als auch in immortalisierten Fibroblasten attenuiert	98
3.23	Die attenuierte Replikation von Δ M34-MCMV ist unabhängig von der integrierten Deletionskassette	99
3.24	Generierung von Δ M34HA-MCMV mittels BAC-Mutagenese	100
3.25	Δ M34HA-MCMV ist wie Δ M34-MCMV <i>in vitro</i> attenuiert	101
3.26	Δ M34HA-MCMV bestätigt die Abwesenheit der pM34HA-Expression und die attenuierte Replikation <i>in vitro</i>	102
3.27	wt- und Δ M34-MCMV repliziert in NIH3T3-Zellen schlechter als in CIM-Zellen	104
3.28	Die Deletion von <i>M33</i> oder <i>M34</i> führt nicht zu einer erhöhten IFN γ -Suszeptibilität im Vergleich zu wt-MCMV	106
3.29	<i>M34</i> reduziert die Oberflächenexpression von MHC-I in MCMV-infizierten Zellen	108
3.30	IFN γ wirkt nicht antiviral gegen Ad5 in 293A-Zellen	111
3.31	IFN γ wirkt antiviral gegen VACV in infizierten MNC- und MEF-Zellen	113
3.32	MCMV-spezifische Antikörper im Serum von Δ M34-MCMV-infizierten Mäusen deuten auf eine <i>in vivo</i> -Replikation hin	115
3.33	Δ M34-MCMV-Replikation <i>in vivo</i>	116
3.34	Δ M34-MCMV-repliziert in der Milz wie Δ M27-MCMV	117
3.35	Δ M34-MCMV induziert MCMV-spezifische Antikörper	118
4.1	Modell zu möglichen Mechanismen der pM33/pUL33-vermittelten Inhibition der GAS-Promotoraktivität	123
4.2	Modell zu möglichen Mechanismen der pM34/pUL34-vermittelten Inhibition der GAS-Promotoraktivität	129

Tabellenverzeichnis

2.1	Oligonukleotide	40
2.2	Primäre Antikörper	42
2.3	Sekundäre Antikörper	43
2.4	Transfektionsansätze	45
2.5	Zusammensetzungen der SDS-Polyacrylamidgele	48
2.6	Infektionsvolumina für <i>centrifugal enhancement</i>	61

Abkürzungsverzeichnis

<i>lacZ</i>	Gen für β -Galactosidase
<i>oriLyt</i>	Gen für β -Galactosidase
AC	Adenylylcyclase
ActD	Actinomycin D
Ad5	Adenovirus 5
AIM2	absent in melanoma 2
AMP	Adenosinmonophosphat
AP	Alkalische Phosphatase
AP-1	<i>activator protein 1</i>
AS	Aminosäure
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
BMM	<i>bone marrow-derived macrophages</i>
cAMP	<i>cyclic AMP</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDS	<i>coding sequence</i>
cGAS	<i>cyclic GMP-AMP synthase</i>
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
CHX	Cycloheximid
CIITA	<i>chromosomal class II transactivator</i>
CIM	<i>crysis immortalized MEF</i>
CMV	Cytomegalovirus
COX-2	Cyclooxygenase-2
CPE	Cytopathischer Effekt
CRE	cAMP-responsives Element
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
CTL	<i>cytotoxic T lymphocyte</i>
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DC	<i>dendritic cells</i>
DDB1	<i>DNA-damage DNA-binding protein 1</i>
DIG	Digoxigenin
DMEM	<i>Dulbeccos Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
E	<i>early</i>
E/L	<i>early/late</i>
ECL	<i>extracellular loop</i>
EEF1A1	<i>alpha subunit of eukaryotic elongation factor 1</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
frt	<i>flippase recognition target</i>
GAF	<i>gamma activated factor</i>
GAS	<i>gamma activated sequence</i>
GCV	Ganciclovir
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factors</i>
gfp	<i>green fluorescent protein</i>
GPCR	<i>G protein-coupled receptor</i>
GRK2	<i>G protein-coupled receptor kinase</i>
GTP	Guanosintriphosphat
HA	Hämagglutinin
HBs	<i>HBV surface antigen</i>
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCMV	Humanes Cytomegalovirus
HEV	<i>high endothelial venules</i>
HFF	<i>human foreskin fibroblasts</i>
HIF-1	Hypoxie-induzierter Faktor 1
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
i. p.	intraperitoneal
ICL	<i>intracellular loop</i>
IE	<i>immediate early</i>
IFI16	<i>IFN-inducible protein 16</i>
IFN	Interferon
IFNAR	IFN α/β -Rezeptor
IFNGR	IFN γ -Rezeptor
IFNLR	IFN λ -Rezeptor
IgG	Immunglobulin G
IL-10R2	Interleukin-10 Rezeptor, β -Untereinheit

ILC	<i>innate lymphoid cells</i>
iNKT-Zellen	<i>invariant Natural killer T (NKT)-Zellen</i>
IR	<i>internal repeat</i>
IRepGs	<i>IFN-repressed genes</i>
IRF	<i>interferon regulatory factor</i>
IRL	<i>internal repeat long</i>
IRS	<i>internal repeat short</i>
ISG	<i>interferon-stimulated gene</i>
ISGF3	<i>interferon-stimulated gene factor 3</i>
ISRE	<i>interferon-stimulated response element</i>
Jak	Januskinase
kbp	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilodalton
L	<i>late</i>
LB	<i>lysogeny broth</i>
MAP	<i>mitogen-activated protein</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCMV	Maus Cytomegalovirus
MCP-1	Makrophagen-Chemoattraktorprotein-1
MEF	<i>mouse embryonic fibroblast</i>
MHC	major histocompatibility complex
MHC-I	MHC class I
MIEP	<i>major immediate early promoter</i>
MIP	<i>macrophage inflammatory proteins</i>
MNC	<i>mouse newborn cells</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MRC-5	Humane Lungenfibroblasten
mRNA	messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
MVA	Modifiziertes Vakziniavirus Ankara
NFκB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
NFAT	<i>nuclear factor of activated T-cells</i>
NK	NK-Zellen
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NKT	<i>Natural killer T</i>
NKT-Zellen	Natürliche Killer-T-Zellen
NLR	<i>NOD-like receptor</i>
Nmi	<i>N-myc and STAT interactor</i>

NOD	<i>immunocompetent nonobese diabetic</i>
OD	Optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
PAA	<i>phosphonoacetic acid</i>
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBS-T	PBS mit 0,1% (v/v) Tween 20
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGFR-α	<i>platelet-derived growth factor receptor-α</i>
PEI	Polyethylenimin
PFA	Paraformaldehyd
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PLCβ	Phospholipase C β
PRR	<i>pattern recognition receptors</i>
pSTAT	phosphorylierte STAT
RANTES	<i>regulated on activation, normal T cell expressed and secreted</i>
RCMV	Ratten Cytomegalovirus
RhoA	Ras homolog family member A
RLR	<i>RIG-I-like receptor</i>
RLU	<i>relative light units</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
ROCK	RhoA-Kinase
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SB	<i>southern blot</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SHP-2	<i>Src homology region 2-containing protein tyrosine phosphatase 2</i>
SIV	<i>simian immunodeficiency virus</i>
SOCS	<i>suppressor of cytokine signaling</i>
SRF	<i>serum response factor</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
STAT2^{-/-}	STAT2-defizient
T_H1	Typ 1 T-Helferzellen
t-bet	<i>T-box expressed in t cells</i>
TAP	<i>Transporter associated with antigen processing</i>

TBST	<i>Tris-buffered saline with Tween20</i>
TCF/LEF	<i>T cell factor/lymphoid enhancer-binding factor</i>
TCR	<i>T cell receptor</i>
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TMB	<i>3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin</i>
TR	<i>terminal repeat</i>
TRL	<i>terminal repeat long</i>
TRS	<i>terminal repeat short</i>
Tyk	<i>Tyrosinkinase</i>
UL	<i>unique long</i>
US	<i>unique short</i>
Usp18	<i>Ubiquitin-specific peptidase 18</i>
UTR	<i>untranslated region</i>
UV	<i>Ultraviolettstrahlung</i>
VACV	<i>Vakziniavirus</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
vGPCR	<i>viral G-protein coupled Receptors</i>
VSB	<i>virus standard puffer</i>
VSV	<i>vesicular stomatitis virus</i>
WR	<i>VACV-Stamm western reserve</i>

Literaturverzeichnis

- Abate, Davide A.; Watanabe, Shinya und Mocarski, Edward S. (2004). „Major Human Cytomegalovirus Structural Protein Pp65 (ppUL83) Prevents Interferon Response Factor 3 Activation in the Interferon Response“. ENG. In: *Journal of Virology* 78.20 (Okt. 2004), S. 10995–11006. DOI: 10.1128/JVI.78.20.10995-11006.2004.
- Abel, Alex M.; Yang, Chao; Thakar, Monica S. und Malarkannan, Subramaniam (2018). „Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization“. English. In: *Frontiers in Immunology* 9 (2018). DOI: 10.3389/fimmu.2018.01869.
- Abenes, Gerardo; Lee, Manfred; Haghjoo, Erik; Tong, Tuong; Zhan, Xiaoyan und Liu, Fenyong (2001). „Murine Cytomegalovirus Open Reading Frame M27 Plays an Important Role in Growth and Virulence in Mice“. In: *Journal of Virology* 75.4 (Feb. 2001), S. 1697–1707. DOI: 10.1128/JVI.75.4.1697-1707.2001.
- Adair, Richard; Douglas, Elaine R.; Maclean, Jean B.; Graham, Susan Y.; Aitken, James D.; Jamieson, Fiona E. und Dargan, Derrick J. (2002). „The Products of Human Cytomegalovirus Genes UL23, UL24, UL43 and US22 Are Tegument Components“. In: *Journal of General Virology*, 83.6 (2002), S. 1315–1324. DOI: 10.1099/0022-1317-83-6-1315.
- Afkarian, Maryam; Sedy, John R.; Yang, Jianfei; Jacobson, Nils G.; Cereb, Nezhil; Yang, Soo Y.; Murphy, Theresa L. und Murphy, Kenneth M. (2002). „T-Bet Is a STAT1-Induced Regulator of IL-12R Expression in Naïve CD4 + T Cells“. en. In: *Nature Immunology* 3.6 (Juni 2002), S. 549–557. DOI: 10.1038/ni794.
- Aguet, M. (1980). „High-Affinity Binding of 125I-Labelled Mouse Interferon to a Specific Cell Surface Receptor“. ENG. In: *Nature* 284.5755 (Apr. 1980), S. 459–461.
- Ahn, K; Angulo, A; Ghazal, P; Peterson, P A; Yang, Y und Früh, K (1996). „Human Cytomegalovirus Inhibits Antigen Presentation by a Sequential Multistep Process.“ In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93.20 (Okt. 1996), S. 10990–10995.
- Aki, Masashi; Shimbara, Naoki; Takashina, Makoto; Akiyama, Kinya; Kagawa, Susumu; Tamura, Tomohiro; Tanahashi, Nobuyuki; Yoshimura, Tetsuro; Tanaka, Keiji und Ichihara, Akira (1994). „Interferon- γ Induces Different Subunit Organizations and Functional Diversity of Proteasomes“. en. In: *Journal of Biochemistry* 115.2 (Jan. 1994), S. 257–269.
- Alcamí, A. und Smith, G. L. (1995). „Vaccinia, Cowpox, and Camelpox Viruses Encode Soluble Gamma Interferon Receptors with Novel Broad Species Specificity“. eng. In: *Journal of Virology* 69.8 (Aug. 1995), S. 4633–4639. DOI: 10.1128/JVI.69.8.4633-4639.1995.
- Ank, Nina; West, Hans; Bartholdy, Christina; Eriksson, Kristina; Thomsen, Allan R. und Paludan, Søren R. (2006). „Lambda Interferon (IFN- λ), a Type III IFN, Is Induced by Viruses and IFNs

- and Displays Potent Antiviral Activity against Select Virus Infections In Vivo“. In: *Journal of Virology* 80.9 (Mai 2006), S. 4501–4509. doi: 10.1128/JVI.80.9.4501-4509.2006.
- Arce-Sillas, Asiel; Álvarez-Luquín, Diana Denisse; Tamaya-Domínguez, Beatriz; Gomez-Fuentes, Sandra; Trejo-García, Abel; Melo-Salas, Marlene; Cárdenas, Graciela; Rodríguez-Ramírez, Juan und Adalid-Peralta, Laura (2016). „Regulatory T Cells: Molecular Actions on Effector Cells in Immune Regulation“. In: *Journal of Immunology Research* 2016 (2016). doi: 10.1155/2016/1720827.
- Atalay, Ramazan; Zimmermann, Albert; Wagner, Markus; Borst, Eva; Benz, Christine; Messerle, Martin und Hengel, Hartmut (2002). „Identification and Expression of Human Cytomegalovirus Transcription Units Coding for Two Distinct Fc γ Receptor Homologs“. en. In: *Journal of Virology* 76.17 (Jan. 2002), S. 8596–8608. doi: 10.1128/JVI.76.17.8596-8608.2002.
- Azevedo, Luiz Sergio; Pierrotti, Lígia Camera; Abdala, Edson; Costa, Silvia Figueiredo; Strabelli, Tânia Mara Varejão; Campos, Silvia Vidal; Ramos, Jéssica Fernandes; Latif, Acram Zahredine Abdul; Litvinov, Nadia; Maluf, Natalya Zaidan; Filho, Helio Hehl Caiaffa; Pannuti, Claudio Sergio; Lopes, Marta Heloisa; dos Santos, Vera Aparecida; da Cruz Gouveia Linardi, Camila; Yasuda, Maria Aparecida Shikanai und de Sousa Marques, Heloisa Helena (2015). „Cytomegalovirus Infection in Transplant Recipients“. In: *Clinics* 70.7 (Juli 2015), S. 515–523. doi: 10.6061/clinics/2015(07)09.
- Babić, Marina; Pyzik, Michal; Zafirova, Biljana; Mitrović, Maja; Butorac, Višnja; Lanier, Lewis L.; Krmpotić, Astrid; Vidal, Silvia M. und Jonjić, Stipan (2010). „Cytomegalovirus Immuno-evasion Reveals the Physiological Role of “Missing Self” Recognition in Natural Killer Cell Dependent Virus Control in Vivo“. en. In: *Journal of Experimental Medicine* 207.12 (Nov. 2010), S. 2663–2673. doi: 10.1084/jem.20100921.
- Baltimore, D (1971). „Expression of Animal Virus Genomes.“ en. In: *Bacteriological Reviews* 35.3 (1971), S. 235–241. doi: 10.1128/MMBR.35.3.235-241.1971.
- Baluchova, Katarina; Kirby, Melissa; Ahasan, Mohammad M. und Sweet, Clive (2008). „Preliminary Characterization of Murine Cytomegaloviruses with Insertional and Deletional Mutations in the M34 Open Reading Frame“. eng. In: *Journal of Medical Virology* 80.7 (Juli 2008), S. 1233–1242. doi: 10.1002/jmv.21211.
- Baron, Michel und Davignon, Jean-Luc (2008). „Inhibition of IFN- γ -Induced STAT1 Tyrosine Phosphorylation by Human CMV Is Mediated by SHP2“. en. In: *The Journal of Immunology* 181.8 (Okt. 2008), S. 5530–5536. doi: 10.4049/jimmunol.181.8.5530.
- Beisser, Patrick S.; Grauls, Gert; Bruggeman, Cathrien A. und Vink, Cornelis (1999). „Deletion of the R78 G Protein-Coupled Receptor Gene from Rat Cytomegalovirus Results in an Attenuated, Syncytium-Inducing Mutant Strain“. In: *Journal of Virology* 73.9 (Sep. 1999), S. 7218–7230.
- Beisser, Patrick S.; Vink, Cornelis; Van Dam, Joanne G.; Grauls, Gert; Vanherle, Sabina J. V. und Bruggeman, Cathrien A. (1998). „The R33 G Protein-Coupled Receptor Gene of Rat Cytomegalovirus Plays an Essential Role in the Pathogenesis of Viral Infection“. In: *Journal of Virology* 72.3 (März 1998), S. 2352–2363.

- Bekisz, Joseph; Schmeisser, Hana; Hernandez, Jessica; Goldman, Neil D. und Zoon, Kathryn C. (2004). „Mini Review Human Interferons Alpha, Beta and Omega“. In: *Growth Factors* 22.4 (Dez. 2004), S. 243–251. DOI: 10.1080/08977190400000833.
- Biegalka, B. J.; Lester, E.; Branda, A. und Rana, R. (2004). „Characterization of the Human Cytomegalovirus UL34 Gene“. In: *Journal of Virology* 78.17 (Sep. 2004), S. 9579–9583. DOI: 10.1128/JVI.78.17.9579-9583.2004.
- Biegalka, Bonita J. (2013). „Nontraditional Localization and Retention Signals Localize Human Cytomegalovirus pUL34 to the Nucleus“. In: *Journal of Virology* 87.21 (Nov. 2013), S. 11939–11944. DOI: 10.1128/JVI.02025-13.
- Biolatti, Matteo; Dell’Oste, Valentina; Pautasso, Sara; Gugliesi, Francesca; von Einem, Jens; Krapp, Christian; Jakobsen, Martin Roelsgaard; Borgogna, Cinzia; Gariglio, Marisa; De Andrea, Marco und Landolfo, Santo (2018). „Human Cytomegalovirus Tegument Protein Pp65 (pUL83) Dampens Type I Interferon Production by Inactivating the DNA Sensor cGAS without Affecting STING“. In: *Journal of Virology* 92.6 (Feb. 2018). DOI: 10.1128/JVI.01774-17.
- Biron, Christine A (1998). „Role of Early Cytokines, Including Alpha and Beta Interferons (IFN- α/β), in Innate and Adaptive Immune Responses to Viral Infections“. In: *Seminars in Immunology* 10.5 (Okt. 1998), S. 383–390. DOI: 10.1006/smim.1998.0138.
- Bittencourt, Fabiola M.; Wu, Shu-En; Bridges, James P. und Miller, William E. (2014). „The M33 G Protein-Coupled Receptor Encoded by Murine Cytomegalovirus Is Dispensable for Hematogenous Dissemination but Is Required for Growth within the Salivary Gland“. In: *Journal of Virology* 88.20 (Okt. 2014), S. 11811–11824. DOI: 10.1128/JVI.01006-14.
- Blaszczyk, Katarzyna; Olejnik, Adam; Nowicka, Hanna; Ozgyin, Lilla; Chen, Yi-Ling; Chmielewski, Stefan; Kostyrko, Kaja; Wesoly, Joanna; Balint, Balint Laszlo; Lee, Chien-Kuo und Bluysen, Hans A.R. (2015). „STAT2/IRF9 Directs a Prolonged ISGF3-like Transcriptional Response and Antiviral Activity in the Absence of STAT1“. In: *Biochemical Journal* 466.Pt 3 (März 2015), S. 511–524. DOI: 10.1042/BJ20140644.
- Boehm, Klamp, T.; Groot, M. und Howard, and J. C. (1997). „Cellular Responses to Interferon- γ “. In: *Annual Review of Immunology* 15.1 (1997), S. 749–795. DOI: 10.1146/annurev.immunol.15.1.749.
- Bongard, Nadine; Le-Trilling, Vu Thuy Khanh; Malyskhina, Anna; Rückborn, Meike; Wohlgemuth, Kerstin; Wensing, Ina; Windmann, Sonja; Dittmer, Ulf; Trilling, Mirko und Bayer, Wibke (2019). „Immunization with a Murine Cytomegalovirus Based Vector Encoding Retrovirus Envelope Confers Strong Protection from Friend Retrovirus Challenge Infection“. In: *PLoS Pathogens* 15.9 (Sep. 2019). DOI: 10.1371/journal.ppat.1008043.
- Borst, E. M.; Hahn, G.; Koszinowski, U. H. und Messerle, M. (1999). „Cloning of the Human Cytomegalovirus (HCMV) Genome as an Infectious Bacterial Artificial Chromosome in Escherichia Coli: A New Approach for Construction of HCMV Mutants“. ENG. In: *Journal of Virology* 73.10 (Okt. 1999), S. 8320–8329.

- Bosse, Jens B.; Bauerfeind, Rudolf; Popilka, Leonhard; Marcinowski, Lisa; Taeglich, Martina; Jung, Christophe; Striebinger, Hannah; von Einem, Jens; Gaul, Ulrike; Walther, Paul; Koszinowski, Ulrich H. und Ruzsics, Zsolt (2012). „A Beta-Herpesvirus with Fluorescent Capsids to Study Transport in Living Cells“. In: *PLoS ONE* 7.7 (Juli 2012). DOI: 10.1371/journal.pone.0040585.
- Branca, A. A. und Baglioni, C. (1981). „Evidence That Types I and II Interferons Have Different Receptors“. ENG. In: *Nature* 294.5843 (Dez. 1981), S. 768–770.
- Braunstein, Jutta; Brutsaert, Siska; Olson, Rich und Schindler, Christian (2003). „STATs Dimerize in the Absence of Phosphorylation“. en. In: *Journal of Biological Chemistry* 278.36 (Mai 2003), S. 34133–34140. DOI: 10.1074/jbc.M304531200.
- Brocchieri, Luciano; Kledal, Thomas N.; Karlin, Samuel und Mocarski, Edward S. (2005). „Predicting Coding Potential from Genome Sequence: Application to Betaherpesviruses Infecting Rats and Mice“. In: *Journal of Virology* 79.12 (Juni 2005), S. 7570–7596. DOI: 10.1128/JVI.79.12.7570-7596.2005.
- Browne, Edward P. und Shenk, Thomas (2003). „Human Cytomegalovirus UL83-Coded Pp65 Virion Protein Inhibits Antiviral Gene Expression in Infected Cells“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100.20 (Sep. 2003), S. 11439–11444. DOI: 10.1073/pnas.1534570100.
- Büning, Hildegard; Gärtner, Ulrike; von Schack, David; Baeuerle, Patrick A. und Zorbas, Haralabos (1996). „The Histidine Tail of Recombinant DNA Binding Proteins May Influence the Quality of Interaction with DNA“. en. In: *Analytical biochemistry* 234.2 (Feb. 1996). DOI: 10.1006/abio.1996.0078.
- Cannon, Michael J.; Schmid, D. Scott und Hyde, Terri B. (2010). „Review of Cytomegalovirus Seroprevalence and Demographic Characteristics Associated with Infection“. en. In: *Reviews in Medical Virology* 20.4 (2010), S. 202–213. DOI: 10.1002/rmv.655.
- Caposio, Patrizia; van den Worm, Sjoerd; Crawford, Lindsey; Perez, Wilma; Kreklywich, Craig; Gilbride, Roxanne M.; Hughes, Colette M.; Ventura, Abigail B.; Ratts, Robert; Marshall, Emily E.; Malouli, Daniel; Axthelm, Michael K.; Streblow, Daniel; Nelson, Jay A.; Picker, Louis J.; Hansen, Scott G. und Früh, Klaus (2019). „Characterization of a Live-Attenuated HCMV-Based Vaccine Platform“. en. In: *Scientific Reports* 9.1 (Dez. 2019), S. 19236. DOI: 10.1038/s41598-019-55508-w.
- Cardin, Rhonda D.; Schaefer, Gregory C.; Allen, Janelle R.; Davis-Poynter, Nicholas J. und Farrell, Helen E. (2009). „The M33 Chemokine Receptor Homolog of Murine Cytomegalovirus Exhibits a Differential Tissue-Specific Role during In Vivo Replication and Latency“. In: *Journal of Virology* 83.15 (Aug. 2009), S. 7590–7601. DOI: 10.1128/JVI.00386-09.
- Carroll, Miles W und Moss, Bernard (1997). „Host Range and Cytopathogenicity of the Highly Attenuated MVA Strain of Vaccinia Virus: Propagation and Generation of Recombinant Viruses in a Nonhuman Mammalian Cell Line“. en. In: *Virology* 238.2 (Nov. 1997), S. 198–211. DOI: 10.1006/viro.1997.8845.

- Casarosa, Paola; Bakker, Remko A.; Verzijl, Dennis; Navis, Marjon; Timmerman, Henk; Leurs, Rob und Smit, Martine J. (2001). „Constitutive Signaling of the Human Cytomegalovirus-Encoded Chemokine Receptor US28“. en. In: *Journal of Biological Chemistry* 276.2 (Dez. 2001), S. 1133–1137. DOI: 10.1074/jbc.M008965200.
- Casarosa, Paola; Gruijthuijsen, Yvonne K.; Michel, Detlef; Beisser, Patrick S.; Holl, Jens; Fitzsimons, Carlos P.; Verzijl, Dennis; Bruggeman, Cathrien A.; Mertens, Thomas; Leurs, Rob; Vink, Cornelis und Smit, Martine J. (2003). „Constitutive Signaling of the Human Cytomegalovirus-Encoded Receptor UL33 Differs from That of Its Rat Cytomegalovirus Homolog R33 by Promiscuous Activation of G Proteins of the Gq, Gi, and Gs Classes“. en. In: *Journal of Biological Chemistry* 278.50 (Dez. 2003), S. 50010–50023. DOI: 10.1074/jbc.M306530200.
- Case, Ruth; Sharp, Emma; Benned-Jensen, Tau; Rosenkilde, Mette M.; Davis-Poynter, Nicholas und Farrell, Helen E. (2008). „Functional Analysis of the Murine Cytomegalovirus Chemokine Receptor Homologue M33: Ablation of Constitutive Signaling Is Associated with an Attenuated Phenotype In Vivo“. In: *Journal of Virology* 82.4 (Feb. 2008), S. 1884–1898. DOI: 10.1128/JVI.02550-06.
- Chan, Baca; Gonçalves Magalhães, Vladimir; Lemmermann, Niels A. W.; Juranić Lisnić, Vanda; Stempel, Markus; Bussey, Kendra A.; Reimer, Elisa; Podlech, Jürgen; Lienenklaus, Stefan; Reddehase, Matthias J.; Jonjić, Stipan und Brinkmann, Melanie M. (2017). „The Murine Cytomegalovirus M35 Protein Antagonizes Type I IFN Induction Downstream of Pattern Recognition Receptors by Targeting NF- κ B Mediated Transcription“. In: *PLoS Pathogens* 13.5 (Mai 2017). DOI: 10.1371/journal.ppat.1006382.
- Chang, C. H.; Hammer, J.; Loh, J. E.; Fodor, W. L. und Flavell, R. A. (1992). „The Activation of Major Histocompatibility Complex Class I Genes by Interferon Regulatory Factor-1 (IRF-1)“. eng. In: *Immunogenetics* 35.6 (1992), S. 378–384. DOI: 10.1007/BF00179793.
- Chaplin, David D. (2010). „Overview of the Immune Response“. In: *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2010 Primer on Allergic and Immunologic Diseases 125.2, Supplement 2 (Feb. 2010), S3–S23. DOI: 10.1016/j.jaci.2009.12.980.
- Chatterjee-Kishore, Moitreyee; Akker, Focco van den und Stark, George R. (2000). „Adenovirus E1A Down-Regulates LMP2 Transcription by Interfering with the Binding of Stat1 to IRF1“. en. In: *Journal of Biological Chemistry* 275.27 (Juli 2000), S. 20406–20411. DOI: 10.1074/jbc.M001861200.
- Chee, M. S.; Satchwell, S. C.; Preddie, E.; Weston, K. M. und Barrell, B. G. (1990). „Human Cytomegalovirus Encodes Three G Protein-Coupled Receptor Homologues“. en. In: *Nature* 344.6268 (Apr. 1990), S. 774–777. DOI: 10.1038/344774a0.
- Cheng, Zhangliang; Dai, Tong; He, Xuelin; Zhang, Zhengkui; Xie, Feng; Wang, Shuai; Zhang, Long und Zhou, Fangfang (2020). „The Interactions between cGAS-STING Pathway and Pathogens“. en. In: *Signal Transduction and Targeted Therapy* 5.1 (Juni 2020), S. 1–15. DOI: 10.1038/s41392-020-0198-7.

- Cherepanov, Peter P. und Wackernagel, Wilfried (1995). „Gene Disruption in Escherichia Coli: TcR and KmR Cassettes with the Option of Flp-Catalyzed Excision of the Antibiotic-Resistance Determinant“. In: *Gene* 158.1 (1995), S. 9–14. DOI: 10.1016/0378-1119(95)00193-A.
- Cherrier, Lauren; Nasar, Aasya; Goodlet, Kellie J.; Nailor, Michael D.; Tokman, Sofya und Chou, Sunwen (2018). „Emergence of Lettermovir Resistance in a Lung Transplant Recipient with Ganciclovir-Resistant Cytomegalovirus Infection“. In: *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 18.12 (Dez. 2018), S. 3060–3064. DOI: 10.1111/ajt.15135.
- Chroboczek, Jadwiga; Bieber, Frank und Jacrot, Bernard (1992). „The Sequence of the Genome of Adenovirus Type 5 and Its Comparison with the Genome of Adenovirus Type 2“. en. In: *Virology* 186.1 (Jan. 1992), S. 280–285. DOI: 10.1016/0042-6822(92)90082-Z.
- Chung, Hokyung K.; Jacobs, Conor L.; Huo, Yunwen; Yang, Jin; Krumm, Stefanie A.; Plemper, Richard K.; Tsien, Roger Y. und Lin, Michael Z. (2015). „Tunable and Reversible Drug Control of Protein Production via a Self-Excising Degron“. en. In: *Nature Chemical Biology* 11.9 (Sep. 2015), S. 713–720. DOI: 10.1038/nchembio.1869.
- Coughlan, Lynda (2020). „Factors Which Contribute to the Immunogenicity of Non-Replicating Adenoviral Vected Vaccines“. eng. In: *Frontiers in Immunology* 11 (2020), S. 909. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00909.
- Crawford, Lindsey B.; Streblow, Daniel A.; Hakki, Morgan; Nelson, Jay A. und Caposio, Patrizia (2015). „Humanized Mouse Models of Human Cytomegalovirus Infection“. In: *Current opinion in virology* 13 (Aug. 2015), S. 86–92. DOI: 10.1016/j.coviro.2015.06.006.
- Cristea, Ileana M.; Moorman, Nathaniel J.; Terhune, Scott S.; Cuevas, Christian D.; O’Keefe, Erin S.; Rout, Michael P.; Chait, Brian T. und Shenk, Thomas (2010). „Human Cytomegalovirus pUL83 Stimulates Activity of the Viral Immediate-Early Promoter through Its Interaction with the Cellular IFI16 Protein“. In: *Journal of Virology* 84.15 (Aug. 2010), S. 7803–7814. DOI: 10.1128/JVI.00139-10.
- Crough, Tania und Khanna, Rajiv (2009). „Immunobiology of Human Cytomegalovirus: From Bench to Bedside“. In: *Clinical Microbiology Reviews* 22.1 (Jan. 2009), S. 76–98. DOI: 10.1128/CMR.00034-08.
- Danziger-Isakov, Lara und Baillie, G. Mark (2009). „Hematologic Complications of Anti-CMV Therapy in Solid Organ Transplant Recipients“. en. In: *Clinical Transplantation* 23.3 (2009), S. 295–304. DOI: 10.1111/j.1399-0012.2008.00942.x.
- Darnell, J. E.; Kerr, I. M. und Stark, G. R. (1994). „Jak-STAT Pathways and Transcriptional Activation in Response to IFNs and Other Extracellular Signaling Proteins“. ENG. In: *Science (New York, N.Y.)* 264.5164 (Juni 1994), S. 1415–1421.
- Darnell, James E. (1997). „STATs and Gene Regulation“. en. In: *Science* 277.5332 (Sep. 1997), S. 1630–1635. DOI: 10.1126/science.277.5332.1630.

- Davis-Poynter, N J; Lynch, D M; Vally, H; Shellam, G R; Rawlinson, W D; Barrell, B G und Farrell, H E (1997). „Identification and Characterization of a G Protein-Coupled Receptor Homolog Encoded by Murine Cytomegalovirus.“ In: *Journal of Virology* 71.2 (Feb. 1997), S. 1521–1529.
- de Munnik, Sabrina M.; Smit, Martine J.; Leurs, Rob und Vischer, Henry F. (2015). „Modulation of Cellular Signaling by Herpesvirus-Encoded G Protein-Coupled Receptors“. In: *Frontiers in Pharmacology* 6 (März 2015). DOI: 10.3389/fphar.2015.00040.
- de Veer, M. J.; Holko, M.; Frevel, M.; Walker, E.; Der, S.; Paranjape, J. M.; Silverman, R. H. und Williams, B. R. (2001). „Functional Classification of Interferon-Stimulated Genes Identified Using Microarrays“. ENG. In: *Journal of Leukocyte Biology* 69.6 (Juni 2001), S. 912–920.
- de Vries, Rory D; Altenburg, Arwen F; Nieuwkoop, Nella J; de Bruin, Erwin; van Trierum, Stella E; Pronk, Mark R; Lamers, Mart M; Richard, Mathilde; Nieuwenhuijse, David F; Koopmans, Marion P G; Kreijtz, Joost H C M; Fouchier, Ron A M; Osterhaus, Albert D M E; Sutter, Gerd und Rimmelzwaan, Guus F (2018). „Induction of Cross-Clade Antibody and T-Cell Responses by a Modified Vaccinia Virus Ankara–Based Influenza A(H5N1) Vaccine in a Randomized Phase 1/2a Clinical Trial“. In: *The Journal of Infectious Diseases* 218.4 (Aug. 2018), S. 614–623. DOI: 10.1093/infdis/jiy214.
- Decker, T.; Lew, D. J.; Mirkovitch, J. und Darnell, J. E. (1991). „Cytoplasmic Activation of GAF, an IFN-Gamma-Regulated DNA-Binding Factor“. ENG. In: *The EMBO journal* 10.4 (Apr. 1991), S. 927–932.
- Decker, Thomas; Kovarik, Pavel und Meinke, Andreas (1997). „GAS Elements: A Few Nucleotides with a Major Impact on Cytokine-Induced Gene Expression“. In: *Journal of Interferon & Cytokine Research* 17.3 (März 1997), S. 121–134. DOI: 10.1089/jir.1997.17.121.
- Der, S. D.; Zhou, A.; Williams, B. R. und Silverman, R. H. (1998). „Identification of Genes Differentially Regulated by Interferon Alpha, Beta, or Gamma Using Oligonucleotide Arrays“. ENG. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95.26 (Dez. 1998), S. 15623–15628.
- DeWire, Scott M.; Ahn, Seungkil; Lefkowitz, Robert J. und Shenoy, Sudha K. (2007). „ β -Arrestins and Cell Signaling“. In: *Annual Review of Physiology* 69.1 (Feb. 2007), S. 483–510. DOI: 10.1146/annurev.physiol.69.022405.154749.
- Dixit, Evelyn und Kagan, Jonathan C. (2013). „Intracellular Pathogen Detection by RIG-I-like Receptors“. In: *Advances in immunology* 117 (2013), S. 99–125. DOI: 10.1016/B978-0-12-410524-9.00004-9.
- Djeu, J. Y. (1982). „Positive Self Regulation of Cytotoxicity in Human Natural Killer Cells by Production of Interferon upon Exposure to Influenza and Herpes Viruses“. In: *The Journal of Experimental Medicine* 156.4 (Okt. 1982), S. 1222–1234.
- Dorsch-Häsler, K.; Keil, G. M.; Weber, F.; Jasin, M.; Schaffner, W. und Koszinowski, U. H. (1985). „A Long and Complex Enhancer Activates Transcription of the Gene Coding for the

- Highly Abundant Immediate Early mRNA in Murine Cytomegalovirus“. eng. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82.24 (Dez. 1985), S. 8325–8329. DOI: 10.1073/pnas.82.24.8325.
- Driscoll, J.; Brown, M. G.; Finley, D. und Monaco, J. J. (1993). „MHC-Linked LMP Gene Products Specifically Alter Peptidase Activities of the Proteasome“. ENG. In: *Nature* 365.6443 (Sep. 1993), S. 262–264. DOI: 10.1038/365262a0.
- Dunn, Walter; Chou, Cassie; Li, Hong; Hai, Rong; Patterson, David; Stolc, Viktor; Zhu, Hua und Liu, Fenyong (2003). „Functional Profiling of a Human Cytomegalovirus Genome“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100.24 (Nov. 2003), S. 14223–14228. DOI: 10.1073/pnas.2334032100.
- DuPage, Michel und Bluestone, Jeffrey A. (2016). „Harnessing the Plasticity of CD4+ T Cells to Treat Immune-Mediated Disease“. en. In: *Nature Reviews Immunology* 16.3 (März 2016), S. 149–163. DOI: 10.1038/nri.2015.18.
- Egli, Adrian; Santer, Deanna M.; O’Shea, Daire; Tyrrell, D. Lorne und Houghton, Michael (2014). „The Impact of the Interferon-Lambda Family on the Innate and Adaptive Immune Response to Viral Infections“. eng. In: *Emerging Microbes & Infections* 3.7 (Juli 2014), e51. DOI: 10.1038/emi.2014.51.
- Eilbrecht, Mareike; Le-Trilling, Vu Thuy Khanh und Trilling, Mirko (2020). „Mouse Cytomegalovirus M34 Encodes a Non-Essential, Nuclear, Early-Late Expressed Protein Required for Efficient Viral Replication“. English. In: *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 10 (2020). DOI: 10.3389/fcimb.2020.00171.
- El Helou, Guy und Razonable, Raymund (2019). „Letemovir for the Prevention of Cytomegalovirus Infection and Disease in Transplant Recipients: An Evidence-Based Review“. en. In: *Infection and Drug Resistance* Volume 12 (Juni 2019), S. 1481–1491. DOI: 10.2147/IDR.S180908.
- Elder, Elizabeth und Sinclair, John (2019). „HCMV Latency: What Regulates the Regulators?“ In: *Medical Microbiology and Immunology* 208.3 (2019), S. 431–438. DOI: 10.1007/s00430-019-00581-1.
- Elder, Elizabeth G.; Krishna, Benjamin A.; Williamson, James; Lim, Eleanor Y.; Poole, Emma; Sedikides, George X.; Wills, Mark; O’Connor, Christine M.; Lehner, Paul J. und Sinclair, John (2019). „Interferon-Responsive Genes Are Targeted during the Establishment of Human Cytomegalovirus Latency“. In: *mBio* 10.6 (Dez. 2019). DOI: 10.1128/mBio.02574-19.
- Epperson, D. E.; Arnold, D.; Spies, T.; Cresswell, P.; Pober, J. S. und Johnson, D. R. (1992). „Cytokines Increase Transporter in Antigen Processing-1 Expression More Rapidly than HLA Class I Expression in Endothelial Cells.“ en. In: *The Journal of Immunology* 149.10 (Nov. 1992), S. 3297–3301.
- Erhard, Florian; Halenius, Anne; Zimmermann, Cosima; L’Hernault, Anne; Kowalewski, Daniel J.; Weekes, Michael P.; Stevanovic, Stefan; Zimmer, Ralf und Dölken, Lars (2018). „Improved

- Ribo-Seq Enables Identification of Cryptic Translation Events“. en. In: *Nature Methods* 15.5 (Mai 2018), S. 363–366. DOI: 10.1038/nmeth.4631.
- Erice, Alejo (1999). „Resistance of Human Cytomegalovirus to Antiviral Drugs“. In: *Clinical Microbiology Reviews* 12.2 (Apr. 1999), S. 286–297.
- Farrell, Helen E.; Abraham, Alexander M.; Cardin, Rhonda D.; Mølleskov-Jensen, Ann-Sofie; Rosenkilde, Mette M. und Davis-Poynter, Nicholas (2013). „Identification of Common Mechanisms by Which Human and Mouse Cytomegalovirus Seven-Transmembrane Receptor Homologues Contribute to In Vivo Phenotypes in a Mouse Model“. In: *Journal of Virology* 87.7 (Apr. 2013), S. 4112–4117. DOI: 10.1128/JVI.03406-12.
- Farrell, Helen E.; Abraham, Alexander M.; Cardin, Rhonda D.; Sparre-Ulrich, Alexander H.; Rosenkilde, Mette M.; Spiess, Katja; Jensen, Tine H.; Kledal, Thomas N. und Davis-Poynter, Nicholas (2011). „Partial Functional Complementation between Human and Mouse Cytomegalovirus Chemokine Receptor Homologues“. In: *Journal of Virology* 85.12 (Juni 2011), S. 6091–6095. DOI: 10.1128/JVI.02113-10.
- Farrell, Helen E.; Bruce, Kimberley; Lawler, Clara; Oliveira, Martha; Cardin, Rhonda; Davis-Poynter, Nicholas und Stevenson, Philip G. (2017). „Murine Cytomegalovirus Spreads by Dendritic Cell Recirculation“. en. In: *mBio* 8.5 (Aug. 2017), e01264–17. DOI: 10.1128/mBio.01264-17.
- Farrell, Helen E.; Bruce, Kimberley; Lawler, Clara und Stevenson, Philip G. (2019). „Murine Cytomegalovirus Spread Depends on the Infected Myeloid Cell Type“. en. In: *Journal of Virology* (Mai 2019), JVI.00540–19. DOI: 10.1128/JVI.00540-19.
- Farrell, Helen E.; Bruce, Kimberley; Ma, Jiawei; Davis-Poynter, Nicholas und Stevenson, Philip G. (2018). „Human Cytomegalovirus US28 Allows Dendritic Cell Exit from Lymph Nodes“. In: *Journal of General Virology* 99.11 (2018), S. 1509–1514. DOI: 10.1099/jgv.0.001154.
- Farrell, Helen E. und Stevenson, Philip G. (2019). „Cytomegalovirus Host Entry and Spread“. In: *Journal of General Virology* 100.4 (2019), S. 545–553. DOI: 10.1099/jgv.0.001230.
- Feng, Linyuan; Sheng, Jingxue; Vu, Gia-Phong; Liu, Yujun; Foo, Chingman; Wu, Songbin; Trang, Phong; Paliza-Carre, Marco; Ran, Yanhong; Yang, Xiaoping; Sun, Xu; Deng, Zemin; Zhou, Tianhong; Lu, Sangwei; Li, Hongjian und Liu, Fenyong (2018). „Human Cytomegalovirus UL23 Inhibits Transcription of Interferon- γ Stimulated Genes and Blocks Antiviral Interferon- γ Responses by Interacting with Human N-Myc Interactor Protein“. en. In: *PLOS Pathogens* 14.1 (Jan. 2018), e1006867. DOI: 10.1371/journal.ppat.1006867.
- Forero, Adriana; Giacobbi, Nicholas S.; McCormick, Kevin D.; Gjoerup, Ole V.; Bakkenist, Christopher J.; Pipas, James M. und Sarkar, Saumendra N. (2014). „Simian Virus 40 Large T Antigen Induces IFN-Stimulated Genes through ATR Kinase“. eng. In: *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 192.12 (Juni 2014), S. 5933–5942. DOI: 10.4049/jimmunol.1303470.
- Frietsch, Jochen J.; Michel, Detlef; Stamminger, Thomas; Hunstig, Friederike; Birndt, Sebastian; Schnetzke, Ulf; Scholl, Sebastian; Hochhaus, Andreas und Hilgendorf, Inken (2019). „In

- Vivo Emergence of UL56 C325Y Cytomegalovirus Resistance to Letemovir in a Patient with Acute Myeloid Leukemia after Hematopoietic Cell Transplantation“. en. In: *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases* 11.1 (Jan. 2019), e2019001–e2019001. DOI: 10.4084/mjhid.2019.001.
- Früh, Klaus und Picker, Louis (2017). „CD8+ T Cell Programming by Cytomegalovirus Vectors: Applications in Prophylactic and Therapeutic Vaccination“. In: *Current opinion in immunology* 47 (Aug. 2017), S. 52–56. DOI: 10.1016/j.coi.2017.06.010.
- Gaczynska, M.; Rock, K. L. und Goldberg, A. L. (1993). „Gamma-Interferon and Expression of MHC Genes Regulate Peptide Hydrolysis by Proteasomes“. ENG. In: *Nature* 365.6443 (Sep. 1993), S. 264–267. DOI: 10.1038/365264a0.
- Gao, J. L. und Murphy, P. M. (1994). „Human Cytomegalovirus Open Reading Frame US28 Encodes a Functional Beta Chemokine Receptor.“ en. In: *Journal of Biological Chemistry* 269.46 (Nov. 1994), S. 28539–28542.
- Gasteiger, Georg; D’Osualdo, Andrea; Schubert, David A.; Weber, Alexander; Bruscia, Emanuela M. und Hartl, Dominik (2017). „Cellular Innate Immunity: An Old Game with New Players“. Englisch. In: *Journal of Innate Immunity* 9.2 (2017), S. 111–125. DOI: 10.1159/000453397.
- Gerlach, Nicole; Gibbert, Kathrin; Alter, Christina; Nair, Savita; Zelinskyy, Gennadiy; James, Cassandra M. und Dittmer, Ulf (2009). „Anti-Retroviral Effects of Type I IFN Subtypes in Vivo“. en. In: *European Journal of Immunology* 39.1 (2009), S. 136–146. DOI: 10.1002/eji.200838311.
- Gether, Ulrik (2000). „Uncovering Molecular Mechanisms Involved in Activation of G Protein-Coupled Receptors“. en. In: *Endocrine Reviews* 21.1 (Feb. 2000), S. 90–113. DOI: 10.1210/edrv.21.1.0390.
- Gianella, Sara und Letendre, Scott (2016). „Cytomegalovirus and HIV: A Dangerous Pas de Deux“. en. In: *The Journal of Infectious Diseases* 214.suppl_2 (Okt. 2016), S67–S74. DOI: 10.1093/infdis/jiw217.
- Gibbert, K; Schlaak, JF; Yang, D und Dittmer, U (2013). „IFN- α Subtypes: Distinct Biological Activities in Anti-Viral Therapy“. In: *British Journal of Pharmacology* 168.5 (März 2013), S. 1048–1058. DOI: 10.1111/bph.12010.
- Goebel, S. J.; Johnson, G. P.; Perkus, M. E.; Davis, S. W.; Winslow, J. P. und Paoletti, E. (1990). „The Complete DNA Sequence of Vaccinia Virus“. eng. In: *Virology* 179.1 (Nov. 1990), S. 247–266, 517–563. DOI: 10.1016/0042-6822(90)90294-2.
- Göhring, Katharina; Hamprecht, Klaus und Jahn, Gerhard (2015). „Antiviral Drug- and Multidrug Resistance in Cytomegalovirus Infected SCT Patients“. eng. In: *Computational and Structural Biotechnology Journal* 13 (2015), S. 153–159. DOI: 10.1016/j.csbj.2015.01.003.
- Goldner, Thomas; Hewlett, Guy; Ettischer, Nicole; Ruebsamen-Schaeff, Helga; Zimmermann, Holger und Lischka, Peter (2011). „The Novel Anticytomegalovirus Compound AIC246 (Letemovir) Inhibits Human Cytomegalovirus Replication through a Specific Antiviral

- Mechanism That Involves the Viral Terminase“. In: *Journal of Virology* 85.20 (Okt. 2011), S. 10884–10893. DOI: 10.1128/JVI.05265-11.
- Gompels, U. A.; Nicholas, J.; Lawrence, G.; Jones, M.; Thomson, B. J.; Martin, M. E. D.; Efstathiou, S.; Craxton, M. und Macaulay, H. A. (1995). „The DNA Sequence of Human Herpesvirus-6: Structure, Coding Content, and Genome Evolution“. en. In: *Virology* 209.1 (Mai 1995), S. 29–51. DOI: 10.1006/viro.1995.1228.
- Goodrum, F. D.; Jordan, C. T.; High, K. und Shenk, T. (2002). „Human Cytomegalovirus Gene Expression during Infection of Primary Hematopoietic Progenitor Cells: A Model for Latency“. en. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99.25 (Dez. 2002), S. 16255–16260. DOI: 10.1073/pnas.252630899.
- Graham, F. L.; Smiley, J.; Russell, W. C. und Nairn, R. (1977). „Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5“. In: *Journal of General Virology*, 36.1 (1977), S. 59–72. DOI: 10.1099/0022-1317-36-1-59.
- Gruijthuijsen, Yvonne K.; Beuken, Erik V. H.; Smit, Martine J.; Leurs, Rob; Bruggeman, Cathrien A. und Vink, Cornelis (2004). „Mutational Analysis of the R33-Encoded G Protein-Coupled Receptor of Rat Cytomegalovirus: Identification of Amino Acid Residues Critical for Cellular Localization and Ligand-Independent Signalling“. en. In: *Journal of General Virology* 85.4 (Apr. 2004), S. 897–909. DOI: 10.1099/vir.0.19709-0.
- Gruijthuijsen, Yvonne K.; Casarosa, Paola; Kaptein, Suzanne J. F.; Broers, Jos L. V.; Leurs, Rob; Bruggeman, Cathrien A.; Smit, Martine J. und Vink, Cornelis (2002). „The Rat Cytomegalovirus R33-Encoded G Protein-Coupled Receptor Signals in a Constitutive Fashion“. en. In: *Journal of Virology* 76.3 (Feb. 2002), S. 1328–1338. DOI: 10.1128/JVI.76.3.1328-1338.2002.
- Gugliesi, Francesca; Coscia, Alessandra; Griffante, Gloria; Galitska, Ganna; Pasquero, Selina; Albano, Camilla und Biolatti, Matteo (2020). „Where Do We Stand after Decades of Studying Human Cytomegalovirus?“ In: *Microorganisms* 8.5 (Mai 2020). DOI: 10.3390/microorganisms8050685.
- Guo, Zong Sheng; Lu, Binfeng; Guo, Zongbi; Giehl, Esther; Feist, Mathilde; Dai, Enyong; Liu, Weilin; Storkus, Walter J.; He, Yukai; Liu, Zuqiang und Bartlett, David L. (2019). „Vaccinia Virus-Mediated Cancer Immunotherapy: Cancer Vaccines and Oncolytics“. In: *Journal for Immunotherapy of Cancer* 7 (Jan. 2019). DOI: 10.1186/s40425-018-0495-7.
- Hahn, Gabriele; Revello, Maria Grazia; Patrone, Marco; Percivalle, Elena; Campanini, Giulia; Sarasini, Antonella; Wagner, Markus; Gallina, Andrea; Milanese, Gabriele; Koszinowski, Ulrich; Baldanti, Fausto und Gerna, Giuseppe (2004). „Human Cytomegalovirus UL131-128 Genes Are Indispensable for Virus Growth in Endothelial Cells and Virus Transfer to Leukocytes“. en. In: *Journal of Virology* 78.18 (Sep. 2004), S. 10023–10033. DOI: 10.1128/JVI.78.18.10023-10033.2004.
- Hamming, Ole J.; Terczyńska-Dyla, Ewa; Vieyres, Gabrielle; Dijkman, Ronald; Jørgensen, Sanne E.; Akhtar, Hashaam; Siupka, Piotr; Pietschmann, Thomas; Thiel, Volker und Hartmann,

- Rune (2013). „Interferon Lambda 4 Signals via the IFN λ Receptor to Regulate Antiviral Activity against HCV and Coronaviruses“. eng. In: *The EMBO journal* 32.23 (Nov. 2013), S. 3055–3065. doi: 10.1038/emboj.2013.232.
- Hansen, Scott G.; Sacha, Jonah B.; Hughes, Colette M.; Ford, Julia C.; Burwitz, Benjamin J.; Scholz, Isabel; Gilbride, Roxanne M.; Lewis, Matthew S.; Gilliam, Awbrey N.; Ventura, Abigail B.; Malouli, Daniel; Xu, Guangwu; Richards, Rebecca; Whizin, Nathan; Reed, Jason S.; Hammond, Katherine B.; Fischer, Miranda; Turner, John M.; Legasse, Alfred W.; Axthelm, Michael K.; Edlefsen, Paul T.; Nelson, Jay A.; Lifson, Jeffrey D.; Früh, Klaus und Picker, Louis J. (2013). „Cytomegalovirus Vectors Violate CD8+ T Cell Epitope Recognition Paradigms“. en. In: *Science* 340.6135 (Mai 2013). doi: 10.1126/science.1237874.
- Hansen, Scott G.; Vieville, Cassandra; Whizin, Nathan; Coyne-Johnson, Lia; Siess, Don C.; Drummond, Derek D.; Legasse, Alfred W.; Axthelm, Michael K.; Oswald, Kelli; Trubey, Charles M.; Piatak, Michael; Lifson, Jeffrey D.; Nelson, Jay A.; Jarvis, Michael A. und Picker, Louis J. (2009). „Effector-Memory T Cell Responses Are Associated with Protection of Rhesus Monkeys from Mucosal SIV Challenge“. In: *Nature medicine* 15.3 (März 2009), S. 293–299. doi: 10.1038/nm.1935.
- Hansen, Scott G.; Zak, Daniel E.; Xu, Guangwu; Ford, Julia C.; Marshall, Emily E.; Malouli, Daniel; Gilbride, Roxanne M.; Hughes, Colette M.; Ventura, Abigail B.; Ainslie, Emily; Randall, Kurt T.; Selseth, Andrea N.; Rundstrom, Parker; Herlache, Lauren; Lewis, Matthew S.; Park, Haesun; Planer, Shannon L.; Turner, John M.; Fischer, Miranda; Armstrong, Christina; Zweig, Robert C.; Valvo, Joseph; Braun, Jackie M.; Shankar, Smitha; Lu, Lenette; Sylwester, Andrew W.; Legasse, Alfred W.; Messerle, Martin; Jarvis, Michael A.; Amon, Lynn M.; Aderem, Alan; Alter, Galit; Laddy, Dominick J.; Stone, Michele; Bonavia, Aurelio; Evans, Thomas G.; Axthelm, Michael K.; Früh, Klaus; Edlefsen, Paul T. und Picker, Louis J. (2018). „Prevention of Tuberculosis in Rhesus Macaques by a Cytomegalovirus-Based Vaccine“. en. In: *Nature Medicine* 24.2 (Feb. 2018), S. 130–143. doi: 10.1038/nm.4473.
- Hardy, Matthew P.; Owczarek, Catherine M.; Jermiin, Lars S.; Ejdebäck, Mikael und Hertzog, Paul J. (2004). „Characterization of the Type I Interferon Locus and Identification of Novel Genes“. en. In: *Genomics* 84.2 (Aug. 2004), S. 331–345. doi: 10.1016/j.ygeno.2004.03.003.
- Harwardt, Thomas; Lukas, Simone; Zenger, Marion; Reitberger, Tobias; Danzer, Daniela; Übner, Theresa; Munday, Diane C.; Nevels, Michael und Paulus, Christina (2016). „Human Cytomegalovirus Immediate-Early 1 Protein Rewires Upstream STAT3 to Downstream STAT1 Signaling Switching an IL6-Type to an IFN γ -Like Response“. en. In: *PLOS Pathogens* 12.7 (Juli 2016), e1005748. doi: 10.1371/journal.ppat.1005748.
- Hengel, Hartmut; Koopmann, Jens-Oliver; Flohr, Thomas; Muranyi, Walter; Goulmy, Els; Hämmerling, Günter J; Koszinowski, Ulrich H und Momburg, Frank (1997). „A Viral ER-Resident Glycoprotein Inactivates the MHC-Encoded Peptide Transporter“. en. In: *Immunity* 6.5 (Mai 1997), S. 623–632. doi: 10.1016/S1074-7613(00)80350-7.
- Herbein, Georges (2018). „The Human Cytomegalovirus, from Oncomodulation to Oncogenesis“. In: *Viruses* 10.8 (Aug. 2018). doi: 10.3390/v10080408.

- Honke, Nadine; Shaabani, Namir; Cadeddu, Giuseppe; Sorg, Ursula R.; Zhang, Dong-Er; Trilling, Mirko; Klingel, Karin; Sauter, Martina; Kandolf, Reinhard; Gailus, Nicole; van Rooijen, Nico; Burkart, Christoph; Baldus, Stephan E.; Grusdat, Melanie; Löhning, Max; Hengel, Hartmut; Pfeffer, Klaus; Tanaka, Masato; Häussinger, Dieter; Recher, Mike; Lang, Philipp A. und Lang, Karl S. (2012). „Enforced Viral Replication Activates Adaptive Immunity and Is Essential for the Control of a Cytopathic Virus“. en. In: *Nature Immunology* 13.1 (Jan. 2012), S. 51–57. DOI: 10.1038/ni.2169.
- Huang, E S (1975). „Human Cytomegalovirus. IV. Specific Inhibition of Virus-Induced DNA Polymerase Activity and Viral DNA Replication by Phosphonoacetic Acid.“ en. In: *Journal of Virology* 16.6 (1975), S. 1560–1565. DOI: 10.1128/JVI.16.6.1560-1565.1975.
- Huang, Hongming; Rückborn, Meike; Le-Trilling, Vu Thuy Khanh; Zhu, Dan; Yang, Shangqing; Zhou, Wenqing; Yang, Xuecheng; Feng, Xuemei; Lu, Yinping; Lu, Mengji; Dittmer, Ulf; Yang, Dongliang; Trilling, Mirko und Liu, Jia (2020). „Prophylactic and Therapeutic HBV Vaccination by an HBs-Expressing Cytomegalovirus Vector Lacking an Interferon Antagonist“. en. In: (Jan. 2020). DOI: 10.1101/2020.01.29.924787.
- Huang, Yuan; Ma, Di; Huang, Heyu; Lu, Yuanyuan; Liao, Yi; Liu, Lingling; Liu, Xinglou und Fang, Feng (2017). „Interaction between HCMV pUL83 and Human AIM2 Disrupts the Activation of the AIM2 Inflammasome“. In: *Virology Journal* 14 (Feb. 2017). DOI: 10.1186/s12985-016-0673-5.
- Humar, A. und Snyderman, D. (2009). „Cytomegalovirus in Solid Organ Transplant Recipients“. en. In: *American Journal of Transplantation* 9.s4 (2009), S78–S86. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2009.02897.x.
- Itell, Hannah L.; Kaur, Amitinder; Deere, Jesse D.; Barry, Peter A. und Permar, Sallie R. (2017). „Rhesus Monkeys for a Nonhuman Primate Model of Cytomegalovirus Infections“. In: *Current opinion in virology* 25 (Aug. 2017), S. 126–133. DOI: 10.1016/j.coviro.2017.08.005.
- Ivashkiv, Lionel B. und Donlin, Laura T. (2014). „Regulation of Type I Interferon Responses“. In: *Nature reviews. Immunology* 14.1 (Jan. 2014), S. 36–49. DOI: 10.1038/nri3581.
- Iwasenko, Jenna M.; Howard, Jonathan; Arbuckle, Susan; Graf, Nicole; Hall, Beverley; Craig, Maria E. und Rawlinson, William D. (2011). „Human Cytomegalovirus Infection Is Detected Frequently in Stillbirths and Is Associated with Fetal Thrombotic Vasculopathy“. ENG. In: *The Journal of Infectious Diseases* 203.11 (Juni 2011), S. 1526–1533. DOI: 10.1093/infdis/jir121.
- Izzedine, Hassane; Launay-Vacher, Vincent und Deray, Gilbert (2005). „Antiviral Drug-Induced Nephrotoxicity“. English. In: *American Journal of Kidney Diseases* 45.5 (Mai 2005), S. 804–817. DOI: 10.1053/j.ajkd.2005.02.010.
- Jackson, Joseph W. und Sparer, Tim (2018). „There Is Always Another Way! Cytomegalovirus’ Multifaceted Dissemination Schemes“. In: *Viruses* 10.7 (Juli 2018). DOI: 10.3390/v10070383.

- Jainchill, J. L.; Aaronson, S. A. und Todaro, G. J. (1969). „Murine Sarcoma and Leukemia Viruses: Assay Using Clonal Lines of Contact-Inhibited Mouse Cells“. eng. In: *Journal of Virology* 4.5 (Nov. 1969), S. 549–553.
- Jones, T. R.; Hanson, L. K.; Sun, L.; Slater, J. S.; Stenberg, R. M. und Campbell, A. E. (1995). „Multiple Independent Loci within the Human Cytomegalovirus Unique Short Region Down-Regulate Expression of Major Histocompatibility Complex Class I Heavy Chains.“ en. In: *Journal of Virology* 69.8 (Aug. 1995), S. 4830–4841.
- Jordan, S.; Krause, J.; Prager, A.; Mitrovic, M.; Jonjic, S.; Koszinowski, U. H. und Adler, B. (2011). „Virus Progeny of Murine Cytomegalovirus Bacterial Artificial Chromosome pSM3fr Show Reduced Growth in Salivary Glands Due to a Fixed Mutation of MCK-2“. en. In: *Journal of Virology* 85.19 (Okt. 2011), S. 10346–10353. doi: 10.1128/JVI.00545-11.
- Kameyama, K; Tanaka, S; Ishida, Y und Hearing, V J (1989). „Interferons Modulate the Expression of Hormone Receptors on the Surface of Murine Melanoma Cells.“ en. In: *Journal of Clinical Investigation* 83.1 (Jan. 1989), S. 213–221. doi: 10.1172/JCI113861.
- Kasahara, T.; Djeu, J. Y.; Dougherty, S. F. und Oppenheim, J. J. (1983). „Capacity of Human Large Granular Lymphocytes (LGL) to Produce Multiple Lymphokines: Interleukin 2, Interferon, and Colony Stimulating Factor“. ENG. In: *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 131.5 (Nov. 1983), S. 2379–2385.
- Kattenhorn, L. M.; Mills, R.; Wagner, M.; Lomsadze, A.; Makeev, V.; Borodovsky, M.; Ploegh, H. L. und Kessler, B. M. (2004). „Identification of Proteins Associated with Murine Cytomegalovirus Virions“. en. In: *Journal of Virology* 78.20 (Okt. 2004), S. 11187–11197. doi: 10.1128/JVI.78.20.11187-11197.2004.
- Kielczewska, Agnieszka; Pyzik, Michal; Sun, Tianhe; Krmpotic, Astrid; Lodoen, Melissa B.; Munks, Michael W.; Babic, Marina; Hill, Ann B.; Koszinowski, Ulrich H.; Jonjic, Stipan; Lanier, Lewis L. und Vidal, Silvia M. (2009). „Ly49P Recognition of Cytomegalovirus-Infected Cells Expressing H2-Dk and CMV-Encoded M04 Correlates with the NK Cell Antiviral Response“. en. In: *Journal of Experimental Medicine* 206.3 (März 2009), S. 515–523. doi: 10.1084/jem.20080954.
- Kim, Young Keun; Shin, Jeon-Soo und Nahm, Moon H. (2016). „NOD-Like Receptors in Infection, Immunity, and Diseases“. In: *Yonsei Medical Journal* 57.1 (Jan. 2016), S. 5–14. doi: 10.3349/ymj.2016.57.1.5.
- Kledal, Thomas N.; Rosenkilde, Mette M. und Schwartz, Thue W. (1998). „Selective Recognition of the Membrane-Bound CX3C Chemokine, Fractalkine, by the Human Cytomegalovirus-Encoded Broad-Spectrum Receptor US28“. en. In: *FEBS Letters* 441.2 (1998), S. 209–214. doi: 10.1016/S0014-5793(98)01551-8.
- Kleijnen, Maurits F.; Huppa, Johannes B.; Lucin, Pero; Mukherjee, Siddhartha; Farrell, Helen; Campbell, Ann E.; Koszinowski, Ulrich H.; Hill, Ann B. und Ploegh, Hidde L. (1997). „A Mouse Cytomegalovirus Glycoprotein, Gp34, Forms a Complex with Folded Class I MHC

- Molecules in the ER Which Is Not Retained but Is Transported to the Cell Surface“. In: *The EMBO Journal* 16.4 (Feb. 1997), S. 685–694. DOI: 10.1093/emboj/16.4.685.
- Knoblach, Theresa; Grandel, Benedikt; Seiler, Jana; Nevels, Michael und Paulus, Christina (2011). „Human Cytomegalovirus IE1 Protein Elicits a Type II Interferon-Like Host Cell Response That Depends on Activated STAT1 but Not Interferon- γ “. In: *PLoS Pathogens* 7.4 (Apr. 2011). DOI: 10.1371/journal.ppat.1002016.
- Kotenko, Sergei V.; Gallagher, Grant; Baurin, Vitaliy V.; Lewis-Antes, Anita; Shen, Meiling; Shah, Nital K.; Langer, Jerome A.; Sheikh, Faruk; Dickensheets, Harold und Donnelly, Raymond P. (2003). „IFN- Λ s Mediate Antiviral Protection through a Distinct Class II Cytokine Receptor Complex“. en. In: *Nature Immunology* 4.1 (Jan. 2003), S. 69–77. DOI: 10.1038/ni875.
- Krishna, Benjamin A.; Miller, William E. und O’Connor, Christine M. (2018). „US28: HCMV’s Swiss Army Knife“. In: *Viruses* 10.8 (Aug. 2018). DOI: 10.3390/v10080445.
- Krishna, Benjamin A.; Poole, Emma L.; Jackson, Sarah E.; Smit, Martine J.; Wills, Mark R. und Sinclair, John H. (2017). „Latency-Associated Expression of Human Cytomegalovirus US28 Attenuates Cell Signaling Pathways To Maintain Latent Infection“. en. In: *mBio* 8.6 (Dez. 2017). DOI: 10.1128/mBio.01754-17.
- Lachmann, Raskit; Loenenbach, Anna; Waterboer, Tim; Brenner, Nicole; Pawlita, Michael; Michel, Angelika; Thamm, Michael; Poethko-Müller, Christina; Wichmann, Ole und Wiese-Posselt, Miriam (2018). „Cytomegalovirus (CMV) Seroprevalence in the Adult Population of Germany“. en. In: *PLOS ONE* 13.7 (Juli 2018), e0200267. DOI: 10.1371/journal.pone.0200267.
- LaPierre, Lorie A. und Biegalko, Bonita J. (2001). „Identification of a Novel Transcriptional Repressor Encoded by Human Cytomegalovirus“. In: *Journal of Virology* 75.13 (Juli 2001), S. 6062–6069. DOI: 10.1128/JVI.75.13.6062-6069.2001.
- Le, Vu Thuy Khanh; Trilling, Mirko; Wilborn, Manuel; Hengel, Hartmut und Zimmermann, Albert (2008a). „Human Cytomegalovirus Interferes with Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) 2 Protein Stability and Tyrosine Phosphorylation“. In: *Journal of General Virology* 89.10 (2008), S. 2416–2426. DOI: 10.1099/vir.0.2008/001669-0.
- Le, Vu Thuy Khanh; Trilling, Mirko; Zimmermann, Albert und Hengel, Hartmut (2008b). „Mouse Cytomegalovirus Inhibits Beta Interferon (IFN- β) Gene Expression and Controls Activation Pathways of the IFN- β Enhanceosome“. en. In: *Journal of General Virology* 89.5 (Mai 2008), S. 1131–1141. DOI: 10.1099/vir.0.83538-0.
- Lee, Heehyoung; Herrmann, Andreas; Deng, JieHui; Kujawski, Maciej; Niu, Guilian; Li, Zhiwei; Forman, Steve; Jove, Richard; Pardoll, Drew und Yu, Hua (2009). „Persistently-Activated Stat3 Maintains Constitutive NF- κ B Activity in Tumors“. In: *Cancer cell* 15.4 (Apr. 2009), S. 283–293. DOI: 10.1016/j.ccr.2009.02.015.
- Lefkowitz, Elliot J; Dempsey, Donald M; Hendrickson, Robert Curtis; Orton, Richard J; Siddell, Stuart G und Smith, Donald B (2018). „Virus Taxonomy: The Database of the International

- Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)“. In: *Nucleic Acids Research* 46.Database issue (Jan. 2018), S. D708–D717. DOI: 10.1093/nar/gkx932.
- Lester, Erin; Rana, Rico; Liu, Ziqi und Biegelke, Bonita J. (2006). „Identification of the Functional Domains of the Essential Human Cytomegalovirus UL34 Proteins“. In: *Virology* 353.1 (Sep. 2006), S. 27–34. DOI: 10.1016/j.virol.2006.05.019.
- Levy, D. E.; Kessler, D. S.; Pine, R. und Darnell, J. E. (1989). „Cytoplasmic Activation of ISGF3, the Positive Regulator of Interferon-Alpha-Stimulated Transcription, Reconstituted in Vitro“. ENG. In: *Genes & Development* 3.9 (Sep. 1989), S. 1362–1371.
- Levy, D. E.; Kessler, D. S.; Pine, R.; Reich, N. und Darnell, J. E. (1988). „Interferon-Induced Nuclear Factors That Bind a Shared Promoter Element Correlate with Positive and Negative Transcriptional Control.“ en. In: *Genes & Development* 2.4 (Jan. 1988), S. 383–393. DOI: 10.1101/gad.2.4.383.
- Levy, David E.; Marié, Isabelle J. und Durbin, Joan E. (2011). „Induction and Function of Type I and III Interferon in Response to Viral Infection“. In: *Current opinion in virology* 1.6 (Dez. 2011), S. 476–486. DOI: 10.1016/j.coviro.2011.11.001.
- Li, Tuo; Chen, Jin und Cristea, Ileana M. (2013). „Human Cytomegalovirus Tegument Protein pUL83 Inhibits IFI16-Mediated DNA Sensing for Immune Evasion“. In: *Cell host & microbe* 14.5 (Nov. 2013). DOI: 10.1016/j.chom.2013.10.007.
- Lighvani, Andre A.; Frucht, David M.; Jankovic, Dragana; Yamane, Hidehiro; Aliberti, Julio; Hissong, Bruce D.; Nguyen, Bai V.; Gadina, Massimo; Sher, Alan; Paul, William E. und O’Shea, John J. (2001). „T-Bet Is Rapidly Induced by Interferon- γ in Lymphoid and Myeloid Cells“. en. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98.26 (Dez. 2001), S. 15137–15142. DOI: 10.1073/pnas.261570598.
- Lion, Thomas (2014). „Adenovirus Infections in Immunocompetent and Immunocompromised Patients“. en. In: *Clinical Microbiology Reviews* 27.3 (Juli 2014), S. 441–462. DOI: 10.1128/CMR.00116-13.
- Lion, Thomas (2019). „Adenovirus Persistence, Reactivation, and Clinical Management“. en. In: *FEBS Letters* 593.24 (2019), S. 3571–3582. DOI: 10.1002/1873-3468.13576.
- Liu, Ziqi und Biegelke, Bonita J. (2013). „Human Cytomegalovirus UL34 Binds to Multiple Sites within the Viral Genome“. In: *Journal of Virology* 87.6 (März 2013), S. 3587–3591. DOI: 10.1128/JVI.03309-12.
- Look, Dwight C.; Roswit, William T.; Frick, Annette G.; Gris-Alevy, Yael; Dickhaus, Dellice M.; Walter, Michael J. und Holtzman, Michael J. (1998). „Direct Suppression of Stat1 Function during Adenoviral Infection“. English. In: *Immunity* 9.6 (Dez. 1998), S. 871–880. DOI: 10.1016/S1074-7613(00)80652-4.

- Lopušná, K.; Režuchová, I.; Kabát, P. und Kúdelová, M. (2014). „Interferon Lambda Induces Antiviral Response to Herpes Simplex Virus 1 Infection“. eng. In: *Acta Virologica* 58.4 (2014), S. 325–332. DOI: 10.4149/av_2014_03_325.
- Lurain, Nell S. und Chou, Sunwen (2010). „Antiviral Drug Resistance of Human Cytomegalovirus“. In: *Clinical Microbiology Reviews* 23.4 (Okt. 2010), S. 689–712. DOI: 10.1128/CMR.00009-10.
- Ma, Weilie; Lehner, Paul J.; Cresswell, Peter; Pober, Jordan S. und Johnson, David R. (1997). „Interferon- γ Rapidly Increases Peptide Transporter (TAP) Subunit Expression and Peptide Transport Capacity in Endothelial Cells“. en. In: *Journal of Biological Chemistry* 272.26 (Juni 1997), S. 16585–16590. DOI: 10.1074/jbc.272.26.16585.
- Malakhova, Oxana A; Kim, Keun I I; Luo, Jiann-Kae; Zou, Weiguo; Kumar, K G Suresh; Fuchs, Serge Y; Shuai, Ke und Zhang, Dong-Er (2006). „UBP43 Is a Novel Regulator of Interferon Signaling Independent of Its ISG15 Isopeptidase Activity“. In: *The EMBO Journal* 25.11 (Juni 2006), S. 2358–2367. DOI: 10.1038/sj.emboj.7601149.
- Marchini, Andrew; Liu, Haiqing und Zhu, Hua (2001). „Human Cytomegalovirus with IE-2 (UL122) Deleted Fails To Express Early Lytic Genes“. In: *Journal of Virology* 75.4 (Feb. 2001), S. 1870–1878. DOI: 10.1128/JVI.75.4.1870-1878.2001.
- Margulies, Barry J.; Browne, Helena und Gibson, Wade (1996). „Identification of the Human Cytomegalovirus G Protein-Coupled Receptor Homologue Encoded by UL33 in Infected Cells and Enveloped Virus Particles“. In: *Virology* 225.1 (Nov. 1996), S. 111–125. DOI: 10.1006/viro.1996.0579.
- Marsico, Concetta und Kimberlin, David W. (2017). „Congenital Cytomegalovirus Infection: Advances and Challenges in Diagnosis, Prevention and Treatment“. In: *Italian Journal of Pediatrics* 43 (Apr. 2017). DOI: 10.1186/s13052-017-0358-8.
- Martinez-Martin, Nadia; Marcandalli, Jessica; Huang, Christine S.; Arthur, Christopher P.; Perotti, Michela; Foglierini, Mathilde; Ho, Hoangdung; Dosey, Annie M.; Shriver, Stephanie; Payandeh, Jian; Leitner, Alexander; Lanzavecchia, Antonio; Perez, Laurent und Ciferri, Claudio (2018). „An Unbiased Screen for Human Cytomegalovirus Identifies Neuropilin-2 as a Central Viral Receptor“. en. In: *Cell* 174.5 (Aug. 2018), 1158–1171.e19. DOI: 10.1016/j.cell.2018.06.028.
- Marzi, Andrea; Murphy, Aisling A.; Feldmann, Friederike; Parkins, Christopher J.; Haddock, Elaine; Hanley, Patrick W.; Emery, Matthew J.; Engelmann, Flora; Messaoudi, Ilhem; Feldmann, Heinz und Jarvis, Michael A. (2016). „Cytomegalovirus-Based Vaccine Expressing Ebola Virus Glycoprotein Protects Nonhuman Primates from Ebola Virus Infection“. en. In: *Scientific Reports* 6.1 (Feb. 2016), S. 21674. DOI: 10.1038/srep21674.
- Masse, M. J.; Messerle, M. und Mocarski, E. S. (1997). „The Location and Sequence Composition of the Murine Cytomegalovirus Replicator (oriLyt)“. eng. In: *Virology* 230.2 (Apr. 1997), S. 350–360. DOI: 10.1006/viro.1997.8473.

- Matsumoto, M.; Tanaka, N.; Harada, H.; Kimura, T.; Yokochi, T.; Kitagawa, M.; Schindler, C. und Taniguchi, T. (1999). „Activation of the Transcription Factor ISGF3 by Interferon-Gamma“. eng. In: *Biological Chemistry* 380.6 (Juni 1999), S. 699–703. DOI: 10.1515/BC.1999.087.
- Maussang, David; Langemeijer, Ellen; Fitzsimons, Carlos P.; Walsum, Marijke Stigter-van; Dijkman, Remco; Borg, Martin K.; Slinger, Erik; Schreiber, Andreas; Michel, Detlef; Tensen, Cornelis P.; Dongen, Guus A. M. S. van; Leurs, Rob und Smit, Martine J. (2009). „The Human Cytomegalovirus–Encoded Chemokine Receptor US28 Promotes Angiogenesis and Tumor Formation via Cyclooxygenase-2“. en. In: *Cancer Research* 69.7 (Apr. 2009), S. 2861–2869. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2487.
- Maussang, David; Verzijl, Dennis; Walsum, Marijke van; Leurs, Rob; Holl, Jens; Pleskoff, Olivier; Michel, Detlef; Dongen, Guus A. M. S. van und Smit, Martine J. (2006). „Human Cytomegalovirus-Encoded Chemokine Receptor US28 Promotes Tumorigenesis“. en. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103.35 (Aug. 2006), S. 13068–13073. DOI: 10.1073/pnas.0604433103.
- McCudden, C. R.; Hains, M. D.; Kimple, R. J.; Siderovski, D. P. und Willard, F. S. (2005). „G-Protein Signaling: Back to the Future“. In: *Cellular and Molecular Life Sciences* 62.5 (März 2005), S. 551–577. DOI: 10.1007/s00018-004-4462-3.
- McLean, Katherine A; Holst, Peter J; Martini, Lene; Schwartz, Thue W und Rosenkilde, Mette M (2004). „Similar Activation of Signal Transduction Pathways by the Herpesvirus-Encoded Chemokine Receptors US28 and ORF74“. en. In: *Virology* 325.2 (Aug. 2004), S. 241–251. DOI: 10.1016/j.virol.2004.04.027.
- McVoy, M. A. und Adler, S. P. (1994). „Human Cytomegalovirus DNA Replicates after Early Circularization by Concatemer Formation, and Inversion Occurs within the Concatemer“. ENG. In: *Journal of Virology* 68.2 (Feb. 1994), S. 1040–1051.
- Megger, Dominik A.; Philipp, Jos; Le-Trilling, Vu Thuy Khanh; Sitek, Barbara und Trilling, Mirko (2017). „Deciphering of the Human Interferon-Regulated Proteome by Mass Spectrometry-Based Quantitative Analysis Reveals Extent and Dynamics of Protein Induction and Repression“. In: *Frontiers in Immunology* 8 (Sep. 2017). DOI: 10.3389/fimmu.2017.01139.
- Melnychuk, Ryan M.; Smith, Patsy; Kreklywich, Craig N.; Ruchti, Franziska; Vomaske, Jennifer; Hall, Laurel; Loh, Lambert; Nelson, Jay A.; Orloff, Susan L. und Streblow, Daniel N. (2005). „Mouse Cytomegalovirus M33 Is Necessary and Sufficient in Virus-Induced Vascular Smooth Muscle Cell Migration“. In: *Journal of Virology* 79.16 (Aug. 2005), S. 10788–10795. DOI: 10.1128/JVI.79.16.10788-10795.2005.
- Mertens, Claudia; Zhong, Minghao; Krishnaraj, Ravi; Zou, Wenxin; Chen, Xiaomin und Darnell, James E. (2006). „Dephosphorylation of Phosphotyrosine on STAT1 Dimers Requires Extensive Spatial Reorientation of the Monomers Facilitated by the N-Terminal Domain“. en. In: *Genes & Development* 20.24 (Dez. 2006), S. 3372–3381. DOI: 10.1101/gad.1485406.
- Messerle, M.; Crnkovic, I.; Hammerschmidt, W.; Ziegler, H. und Koszinowski, U. H. (1997). „Cloning and Mutagenesis of a Herpesvirus Genome as an Infectious Bacterial Artificial

- Chromosome“. ENG. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94.26 (Dez. 1997), S. 14759–14763.
- Miller, Daniel M.; Rahill, Brian M.; Boss, Jeremy M.; Lairmore, Michael D.; Durbin, Joan E.; Waldman, James W. und Sedmak, Daniel D. (1998). „Human Cytomegalovirus Inhibits Major Histocompatibility Complex Class II Expression By Disruption of the Jak/Stat Pathway“. In: *The Journal of Experimental Medicine* 187.5 (März 1998), S. 675–683.
- Miller, Daniel M.; Zhang, Yingxue; Rahill, Brian M.; Waldman, W. James und Sedmak, Daniel D. (1999). „Human Cytomegalovirus Inhibits IFN- α -Stimulated Antiviral and Immunoregulatory Responses by Blocking Multiple Levels of IFN- α Signal Transduction“. en. In: *The Journal of Immunology* 162.10 (Mai 1999), S. 6107–6113.
- Miller, William E.; Houtz, Daniel A.; Nelson, Christopher D.; Kolattukudy, P. E. und Lefkowitz, Robert J. (2003). „G-Protein-Coupled Receptor (GPCR) Kinase Phosphorylation and β -Arrestin Recruitment Regulate the Constitutive Signaling Activity of the Human Cytomegalovirus US28 GPCR“. en. In: *Journal of Biological Chemistry* 278.24 (Juni 2003), S. 21663–21671. DOI: 10.1074/jbc.M303219200.
- Mocarski, E S; Kemble, G W; Lyle, J M und Greaves, R F (1996). „A Deletion Mutant in the Human Cytomegalovirus Gene Encoding IE1(491aa) Is Replication Defective Due to a Failure in Autoregulation.“ In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93.21 (Okt. 1996), S. 11321–11326.
- Morris, John C. und Wildner, Oliver (2000). „Therapy of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma with an Oncolytic Adenovirus Expressing HSV-Tk“. English. In: *Molecular Therapy* 1.1 (Jan. 2000), S. 56–62. DOI: 10.1006/mthe.1999.0014.
- Müller, Mathias; Briscoe, James; Laxton, Carl; Guschin, Dmitry; Ziemiecki, Andrew; Silvenoinen, Olli; Harpur, Ailsa G.; Barbieri, Giovanna; Witthuhn, Bruce A.; Schindler, Chris; Pellegrini, Sandra; Wilks, Andrew F.; Ihle, James N.; Stark, George R. und Kerr, Ian M. (1993). „The Protein Tyrosine Kinase JAK1 Complements Defects in Interferon- α/β and - γ Signal Transduction“. En. In: *Nature* 366.6451 (Nov. 1993), S. 129. DOI: 10.1038/366129a0.
- Naucmér, Cecilia Söderberg; Geisler, Jürgen und Vetvik, Katja (2019). „The Emerging Role of Human Cytomegalovirus Infection in Human Carcinogenesis: A Review of Current Evidence and Potential Therapeutic Implications“. In: *Oncotarget* 10.42 (Juli 2019), S. 4333–4347. DOI: 10.18632/oncotarget.27016.
- Neote, K.; DiGregorio, D.; Mak, J. Y.; Horuk, R. und Schall, T. J. (1993). „Molecular Cloning, Functional Expression, and Signaling Characteristics of a C-C Chemokine Receptor“. eng. In: *Cell* 72.3 (Feb. 1993), S. 415–425. DOI: 10.1016/0092-8674(93)90118-a.
- Netterwald, James; Yang, Shaojun; Wang, Weijia; Ghanny, Salena; Cody, Michael; Soteropoulos, Patricia; Tian, Bin; Dunn, Walter; Liu, Fenyong und Zhu, Hua (2005). „Two Gamma Interferon-Activated Site-Like Elements in the Human Cytomegalovirus Major Immediate-Early Promoter/Enhancer Are Important for Viral Replication“. en. In: *Journal of Virology* 79.8 (Apr. 2005), S. 5035–5046. DOI: 10.1128/JVI.79.8.5035-5046.2005.

- Nicholas, J (1996). „Determination and Analysis of the Complete Nucleotide Sequence of Human Herpesvirus 7“. In: *Journal of Virology* 70.9 (Sep. 1996), S. 5975–5989.
- Nogalski, Maciej T.; Chan, Gary C. T.; Stevenson, Emily V.; Collins-McMillen, Donna K. und Yurochko, Andrew D. (2013). „The HCMV gH/gL/UL128-131 Complex Triggers the Specific Cellular Activation Required for Efficient Viral Internalization into Target Monocytes“. eng. In: *PLoS pathogens* 9.7 (2013), e1003463. doi: 10.1371/journal.ppat.1003463.
- Ogawa-Goto, K.; Tanaka, K.; Gibson, W.; Moriishi, E.; Miura, Y.; Kurata, T.; Irie, S. und Sata, T. (2003). „Microtubule Network Facilitates Nuclear Targeting of Human Cytomegalovirus Capsid“. In: *Journal of Virology* 77.15 (Aug. 2003), S. 8541–8547. doi: 10.1128/JVI.77.15.8541-8547.2003.
- Oldham, William M. und Hamm, Heidi E. (2007). „How Do Receptors Activate G Proteins?“ eng. In: *Advances in Protein Chemistry* 74 (2007), S. 67–93. doi: 10.1016/S0065-3233(07)74002-0.
- Oldham, William M. und Hamm, Heidi E. (2008). „Heterotrimeric G Protein Activation by G-Protein-Coupled Receptors“. en. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9.1 (Jan. 2008), S. 60–71. doi: 10.1038/nrm2299.
- Oram, J. D.; Downing, R. G.; Akrigg, A.; Dollery, A. A.; Duggleby, C. J.; Wilkinson, G. W. und Greenaway, P. J. (1982). „Use of Recombinant Plasmids to Investigate the Structure of the Human Cytomegalovirus Genome“. ENG. In: *The Journal of General Virology* 59.Pt 1 (März 1982), S. 111–129. doi: 10.1099/0022-1317-59-1-111.
- Osborn, J. E. und Walker, D. L. (1968). „Enhancement of Infectivity of Murine Cytomegalovirus in Vitro by Centrifugal Inoculation“. In: *Journal of Virology* 2.9 (Sep. 1968), S. 853–858.
- Paulus, Christina; Krauss, Steffen und Nevels, Michael (2006). „A Human Cytomegalovirus Antagonist of Type I IFN-Dependent Signal Transducer and Activator of Transcription Signaling“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103.10 (März 2006), S. 3840–3845. doi: 10.1073/pnas.0600007103.
- Pellicci, Daniel G.; Koay, Hui-Fern und Berzins, Stuart P. (2020). „Thymic Development of Unconventional T Cells: How NKT Cells, MAIT Cells and $\Gamma\delta$ T Cells Emerge“. en. In: *Nature Reviews Immunology* (Juni 2020), S. 1–15. doi: 10.1038/s41577-020-0345-y.
- Perdiguero, Beatriz und Esteban, Mariano (2009). „The Interferon System and Vaccinia Virus Evasion Mechanisms“. eng. In: *Journal of Interferon & Cytokine Research: The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 29.9 (Sep. 2009), S. 581–598. doi: 10.1089/jir.2009.0073.
- Pestka, Sidney (2007). „The Interferons: 50 Years after Their Discovery, There Is Much More to Learn“. en. In: *Journal of Biological Chemistry* 282.28 (Juli 2007), S. 20047–20051. doi: 10.1074/jbc.R700004200.
- Peter, I.; Mezzacasa, A.; LeDonne, P.; Dummer, R. und Hemmi, S. (2001). „Comparative Analysis of Immunocritical Melanoma Markers in the Mouse Melanoma Cell Lines B16, K1735 and

- S91-M3:“ en. In: *Melanoma Research* 11.1 (Feb. 2001), S. 21–30. DOI: 10.1097/00008390-200102000-00003.
- Pfeifhofer, Christa; Kofler, Kurt; Gruber, Thomas; Ghaffari Tabrizi, Nassim; Lutz, Christina; Maly, Karl; Leitges, Michael und Baier, Gottfried (2003). „Protein Kinase C δ Affects Ca²⁺ Mobilization and NFAT Activation in Primary Mouse T Cells“. In: *The Journal of Experimental Medicine* 197.11 (Juni 2003), S. 1525–1535. DOI: 10.1084/jem.20020234.
- Plotkin, Stanley A. und Boppana, Suresh B. (2019). „Vaccination against the Human Cytomegalovirus“. In: *Vaccine* 37.50 (Nov. 2019), S. 7437–7442. DOI: 10.1016/j.vaccine.2018.02.089.
- Poizat, Coralie; Puri, Pier Lorenzo; Bai, Yan und Kedes, Larry (2005). „Phosphorylation-Dependent Degradation of P300 by Doxorubicin-Activated P38 Mitogen-Activated Protein Kinase in Cardiac Cells“. en. In: *Molecular and Cellular Biology* 25.7 (Apr. 2005), S. 2673–2687. DOI: 10.1128/MCB.25.7.2673-2687.2005.
- Poole, Emma; Juss, Jatinder K.; Krishna, Benjamin; Herre, Jurgen; Chilvers, Edwin R. und Sinclair, John (2015). „Alveolar Macrophages Isolated Directly From Human Cytomegalovirus (HCMV)–Seropositive Individuals Are Sites of HCMV Reactivation In Vivo“. In: *The Journal of Infectious Diseases* 211.12 (Juni 2015), S. 1936–1942. DOI: 10.1093/infdis/jiu837.
- Popkin, Daniel L.; Watson, Mark A.; Karaskov, Elizabeth; Dunn, Gavin P.; Bremner, Rod und Virgin, Herbert W. (2003). „Murine Cytomegalovirus Paralyzes Macrophages by Blocking IFN γ -Induced Promoter Assembly“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100.24 (Nov. 2003), S. 14309–14314. DOI: 10.1073/pnas.1835673100.
- Pott, Johanna; Mahlaköiv, Tanel; Mordstein, Markus; Duerr, Claudia U.; Michiels, Thomas; Stockinger, Silvia; Staeheli, Peter und Hornef, Mathias W. (2011). „IFN-Lambda Determines the Intestinal Epithelial Antiviral Host Defense“. eng. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108.19 (Mai 2011), S. 7944–7949. DOI: 10.1073/pnas.1100552108.
- Rafailidis, Petros I.; Mourtzoukou, Eleni G.; Varbobitis, Ioannis C. und Falagas, Matthew E. (2008). „Severe Cytomegalovirus Infection in Apparently Immunocompetent Patients: A Systematic Review“. eng. In: *Virology Journal* 5 (März 2008), S. 47. DOI: 10.1186/1743-422X-5-47.
- Rana, Rico und Biegelke, Bonita J. (2014). „Human Cytomegalovirus UL34 Early and Late Proteins Are Essential for Viral Replication“. In: *Viruses* 6.2 (Jan. 2014), S. 476–488. DOI: 10.3390/v6020476.
- Raoult, Didier und Forterre, Patrick (2008). „Redefining Viruses: Lessons from Mimivirus“. en. In: *Nature Reviews Microbiology* 6.4 (Apr. 2008), S. 315–319. DOI: 10.1038/nrmicro1858.
- Rasmussen, S. G.; Jensen, A. D.; Liapakis, G.; Ghanouni, P.; Javitch, J. A. und Gether, U. (1999). „Mutation of a Highly Conserved Aspartic Acid in the Beta2 Adrenergic Receptor: Constitutive Activation, Structural Instability, and Conformational Rearrangement of Transmembrane Segment 6“. eng. In: *Molecular Pharmacology* 56.1 (Juli 1999), S. 175–184. DOI: 10.1124/mol.56.1.175.

- Rattay, Stephanie; Trilling, Mirko; Megger, Dominik A.; Sitek, Barbara; Meyer, Helmut E.; Hengel, Hartmut und Le-Trilling, Vu Thuy Khanh (2015). „The Canonical Immediate Early 3 Gene Product pIE611 of Mouse Cytomegalovirus Is Dispensable for Viral Replication but Mediates Transcriptional and Posttranscriptional Regulation of Viral Gene Products“. In: *Journal of Virology* 89.16 (Juni 2015), S. 8590–8598. doi: 10.1128/JVI.01234-15.
- Rawlinson, W. D.; Farrell, H. E. und Barrell, B. G. (1996). „Analysis of the Complete DNA Sequence of Murine Cytomegalovirus“. eng. In: *Journal of Virology* 70.12 (Dez. 1996), S. 8833–8849.
- Rawlinson, W. D.; Hall, B.; Jones, C. A.; Jeffery, H. E.; Arbuckle, S. M.; Graf, N.; Howard, J. und Morris, J. M. (2008). „Viruses and Other Infections in Stillbirth: What Is the Evidence and What Should We Be Doing?“ ENG. In: *Pathology* 40.2 (Feb. 2008), S. 149–160. doi: 10.1080/00313020701813792.
- Reeves, Matthew B. (2011). „Chromatin-Mediated Regulation of Cytomegalovirus Gene Expression“. In: *Virus research* 157.2 (Mai 2011), S. 134–143. doi: 10.1016/j.virusres.2010.09.019.
- Reeves, Matthew B. und Sinclair, John H. (2013). „Circulating Dendritic Cells Isolated from Healthy Seropositive Donors Are Sites of Human Cytomegalovirus Reactivation In Vivo“. en. In: *Journal of Virology* 87.19 (Okt. 2013), S. 10660–10667. doi: 10.1128/JVI.01539-13.
- Reusch, Uwe; Muranyi, Walter; Lucin, Pero; Burgert, Hans-Gerhard; Hengel, Hartmut und Koszinowski, Ulrich H. (1999). „A Cytomegalovirus Glycoprotein Re-Routes MHC Class I Complexes to Lysosomes for Degradation“. In: *The EMBO Journal* 18.4 (Feb. 1999), S. 1081–1091. doi: 10.1093/emboj/18.4.1081.
- Ricobaraza, Ana; Gonzalez-Aparicio, Manuela; Mora-Jimenez, Lucia; Lumbreras, Sara und Hernandez-Alcoceba, Ruben (2020). „High-Capacity Adenoviral Vectors: Expanding the Scope of Gene Therapy“. en. In: *International Journal of Molecular Sciences* 21.10 (Jan. 2020), S. 3643. doi: 10.3390/ijms21103643.
- Routes, J. M.; Li, H.; Bayley, S. T.; Ryan, S. und Klemm, D. J. (1996). „Inhibition of IFN- γ -Stimulated Gene Expression and IFN Induction of Cytolytic Resistance to Natural Killer Cell Lysis Correlate with E1A-P300 Binding.“ en. In: *The Journal of Immunology* 156.3 (Feb. 1996), S. 1055–1061.
- Ryckman, Brent J.; Rainish, Barb L.; Chase, Marie C.; Borton, Jamie A.; Nelson, Jay A.; Jarvis, Michael A. und Johnson, David C. (2008). „Characterization of the Human Cytomegalovirus gH/gL/UL128-131 Complex That Mediates Entry into Epithelial and Endothelial Cells“. In: *Journal of Virology* 82.1 (Jan. 2008), S. 60–70. doi: 10.1128/JVI.01910-07.
- Saha, Ramendra N.; Jana, Malabendu und Pahan, Kalipada (2007). „MAPK P38 Regulates Transcriptional Activity of NF- κ B in Primary Human Astrocytes via Acetylation of P65“. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 179.10 (Nov. 2007), S. 7101–7109.
- Sakatsume, M.; Igarashi, K.; Winestock, K. D.; Garotta, G.; Larner, A. C. und Finbloom, D. S. (1995). „The Jak Kinases Differentially Associate with the Alpha and Beta (Accessory Factor)

- Chains of the Interferon Gamma Receptor to Form a Functional Receptor Unit Capable of Activating STAT Transcription Factors“. ENG. In: *The Journal of Biological Chemistry* 270.29 (Juli 1995), S. 17528–17534.
- Samreen, Baila; Tao, Sha; Tischer, Karsten; Adler, Heiko und Drexler, Ingo (2019). „ORF6 and ORF61 Expressing MVA Vaccines Impair Early but Not Late Latency in Murine Gammaherpesvirus MHV-68 Infection“. English. In: *Frontiers in Immunology* 10 (2019). DOI: 10.3389/fimmu.2019.02984.
- San Martín, Carmen (2012). „Latest Insights on Adenovirus Structure and Assembly“. en. In: *Viruses* 4.5 (Mai 2012), S. 847–877. DOI: 10.3390/v4050847.
- San-Antonio, Belén; Íñiguez, Miguel A. und Fresno, Manuel (2002). „Protein Kinase C ζ Phosphorylates Nuclear Factor of Activated T Cells and Regulates Its Transactivating Activity“. en. In: *Journal of Biological Chemistry* 277.30 (Juli 2002), S. 27073–27080. DOI: 10.1074/jbc.M106983200.
- Scheffczik, Hanno; Savva, Christos G. W.; Holzenburg, Andreas; Kolesnikova, Larissa und Bogner, Elke (2002). „The Terminase Subunits pUL56 and pUL89 of Human Cytomegalovirus Are DNA-Metabolizing Proteins with Toroidal Structure“. In: *Nucleic Acids Research* 30.7 (Apr. 2002), S. 1695–1703.
- Seifert, M. und Küppers, R. (2016). „Human Memory B Cells“. en. In: *Leukemia* 30.12 (Dez. 2016), S. 2283–2292. DOI: 10.1038/leu.2016.226.
- Sheppard, Paul; Kindsvogel, Wayne; Xu, Wenfeng; Henderson, Katherine; Schlutsmeyer, Stacy; Whitmore, Theodore E.; Kuestner, Rolf; Garrigues, Ursula; Birks, Carl; Roraback, Jenny; Ostrander, Craig; Dong, Dennis; Shin, Jinu; Presnell, Scott; Fox, Brian; Haldeman, Betty; Cooper, Emily; Taft, David; Gilbert, Teresa; Grant, Francis J.; Tackett, Monica; Krivan, William; McKnight, Gary; Clegg, Chris; Foster, Don und Klucher, Kevin M. (2003). „IL-28, IL-29 and Their Class II Cytokine Receptor IL-28R“. ENG. In: *Nature Immunology* 4.1 (Jan. 2003), S. 63–68. DOI: 10.1038/ni873.
- Sherrill, Joseph D. und Miller, William E. (2006). „G Protein-Coupled Receptor (GPCR) Kinase 2 Regulates Agonist-Independent Gq/11 Signaling from the Mouse Cytomegalovirus GPCR M33“. In: *The Journal of biological chemistry* 281.52 (Dez. 2006), S. 39796–39805. DOI: 10.1074/jbc.M610026200.
- Sherrill, Joseph D.; Stropes, Melissa P.; Schneider, Olivia D.; Koch, Diana E.; Bittencourt, Fabiola M.; Miller, Jeanette L. C. und Miller, William E. (2009). „Activation of Intracellular Signaling Pathways by the Murine Cytomegalovirus G Protein-Coupled Receptor M33 Occurs via PLC- β /PKC-Dependent and -Independent Mechanisms“. In: *Journal of Virology* 83.16 (Aug. 2009), S. 8141–8152. DOI: 10.1128/JVI.02116-08.
- Shuai, K. (2000). „Modulation of STAT Signaling by STAT-Interacting Proteins“. en. In: *Oncogene* 19.21 (Mai 2000), S. 2638–2644. DOI: 10.1038/sj.onc.1203522.

- Shuai, K.; Schindler, C.; Prezioso, V. R. und Darnell, J. E. (1992). „Activation of Transcription by IFN-Gamma: Tyrosine Phosphorylation of a 91-kD DNA Binding Protein“. ENG. In: *Science (New York, N.Y.)* 258.5089 (Dez. 1992), S. 1808–1812.
- Siegel, J. P. (1988). „Effects of Interferon-Gamma on the Activation of Human T Lymphocytes“. eng. In: *Cellular Immunology* 111.2 (Feb. 1988), S. 461–472. DOI: 10.1016/0008-8749(88)90109-8.
- Sijmons, Steven; Van Ranst, Marc und Maes, Piet (2014). „Genomic and Functional Characteristics of Human Cytomegalovirus Revealed by Next-Generation Sequencing“. In: *Viruses* 6.3 (März 2014), S. 1049–1072. DOI: 10.3390/v6031049.
- Silvennoinen, O.; Ihle, J. N.; Schlessinger, J. und Levy, D. E. (1993). „Interferon-Induced Nuclear Signalling by Jak Protein Tyrosine Kinases“. ENG. In: *Nature* 366.6455 (Dez. 1993), S. 583–585. DOI: 10.1038/366583a0.
- Slayton, Mark; Hossain, Tanvir und Biegalka, Bonita J. (2018). „pUL34 Binding near the Human Cytomegalovirus Origin of Lytic Replication Enhances DNA Replication and Viral Growth“. In: *Virology* 518 (Mai 2018), S. 414–422. DOI: 10.1016/j.virol.2018.03.017.
- Smith, Margaret G. (1954). „Propagation of Salivary Gland Virus of the Mouse in Tissue Cultures.“ en-us. In: *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 86.3 (Juli 1954), S. 435–440. DOI: 10.3181/00379727-86-21123.
- Smith, Margaret G. (1956). „Propagation in Tissue Cultures of a Cytopathogenic Virus from Human Salivary Gland Virus (SGV) Disease.“ en. In: *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 92.2 (Juni 1956), S. 424–430. DOI: 10.3181/00379727-92-22498.
- Sommereyns, Caroline; Paul, Sophie; Staeheli, Peter und Michiels, Thomas (2008). „IFN-Lambda (IFN- λ) Is Expressed in a Tissue-Dependent Fashion and Primarily Acts on Epithelial Cells In Vivo“. en. In: *PLOS Pathogens* 4.3 (März 2008), e1000017. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000017.
- Song, Jaewon; Lee, Sanghyun; Cho, Dong-Yeon; Lee, Sungwon; Kim, Hyewon; Yu, Namhee; Lee, Sanghyuk und Ahn, Kwangseog (2019). „Human Cytomegalovirus Induces and Exploits Roquin to Counteract the IRF1-Mediated Antiviral State“. en. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* (Aug. 2019), S. 201909314. DOI: 10.1073/pnas.1909314116.
- Steimle, V.; Siegrist, C. A.; Mottet, A.; Lisowska-Grospierre, B. und Mach, B. (1994). „Regulation of MHC Class II Expression by Interferon-Gamma Mediated by the Transactivator Gene CIITA“. en. In: *Science* 265.5168 (Juli 1994), S. 106–109. DOI: 10.1126/science.8016643.
- Stern-Ginossar, Noam; Weisburd, Ben; Michalski, Annette; Khanh Le, Vu Thuy; Hein, Marco Y.; Huang, Sheng-Xiong; Ma, Ming; Shen, Ben; Qian, Shu-Bing; Hengel, Hartmut; Mann, Matthias; Ingolia, Nicholas T. und Weissman, Jonathan S. (2012). „Decoding Human Cytomegalovirus“. In: *Science (New York, N.Y.)* 338.6110 (Nov. 2012). DOI: 10.1126/science.1227919.
- Sugarman, Barry; Hutchins, Beth; McAllister, Diane; Lu, Fei und Thomas, Kenneth (2003). „The Complete Nucleic Acid Sequence of the Adenovirus Type 5 Reference Material (ARM)

- Genome“. en. In: *BioProcessing Journal* 2.5 (Okt. 2003), S. 27–33. DOI: 10.12665/J25. Sugarman.
- Symons, Julian A.; Tschärke, David C.; Price, Nicola und Smith, Geoffrey L. (2002). „A Study of the Vaccinia Virus Interferon- γ Receptor and Its Contribution to Virus Virulence“. en. In: *Journal of General Virology* 83.8 (Aug. 2002), S. 1953–1964. DOI: 10.1099/0022-1317-83-8-1953.
- Tadagaki, Kenjiro; Tudor, Daniela; Gbahou, Florence; Tschische, Pia; Waldhoer, Maria; Bomsel, Morgane; Jockers, Ralf und Kamal, Maud (2012). „Human Cytomegalovirus-Encoded UL33 and UL78 Heteromerize with Host CCR5 and CXCR4 Impairing Their HIV Coreceptor Activity“. en. In: *Blood* 119.21 (Mai 2012), S. 4908–4918. DOI: 10.1182/blood-2011-08-372516.
- Tamashiro, J. C.; Filpula, D.; Friedmann, T. und Spector, D. H. (1984). „Structure of the Heterogeneous L-S Junction Region of Human Cytomegalovirus Strain AD169 DNA“. ENG. In: *Journal of Virology* 52.2 (Nov. 1984), S. 541–548.
- Tang, Qiyi; Murphy, Eain A. und Maul, Gerd G. (2006). „Experimental Confirmation of Global Murine Cytomegalovirus Open Reading Frames by Transcriptional Detection and Partial Characterization of Newly Described Gene Products“. In: *Journal of Virology* 80.14 (Juli 2006), S. 6873–6882. DOI: 10.1128/JVI.00275-06.
- Taylor, R. Travis und Bresnahan, Wade A. (2005). „Human Cytomegalovirus Immediate-Early 2 Gene Expression Blocks Virus-Induced Beta Interferon Production“. In: *Journal of Virology* 79.6 (März 2005), S. 3873–3877. DOI: 10.1128/JVI.79.6.3873-3877.2005.
- Taylor, R. Travis und Bresnahan, Wade A. (2006a). „Human Cytomegalovirus IE86 Attenuates Virus- and Tumor Necrosis Factor Alpha-Induced NF κ B-Dependent Gene Expression“. en. In: *Journal of Virology* 80.21 (Nov. 2006), S. 10763–10771. DOI: 10.1128/JVI.01195-06.
- Taylor, R. Travis und Bresnahan, Wade A. (2006b). „Human Cytomegalovirus Immediate-Early 2 Protein IE86 Blocks Virus-Induced Chemokine Expression“. In: *Journal of Virology* 80.2 (Jan. 2006), S. 920–928. DOI: 10.1128/JVI.80.2.920-928.2006.
- Theiß, Janine; Sung, Min Woo; Holzenburg, Andreas und Bogner, Elke (2019). „Full-Length Human Cytomegalovirus Terminase pUL89 Adopts a Two-Domain Structure Specific for DNA Packaging“. In: *PLoS Pathogens* 15.12 (Dez. 2019). DOI: 10.1371/journal.ppat.1008175.
- Tischer, B. Karsten und Kaufer, Benedikt B. (2012). „Viral Bacterial Artificial Chromosomes: Generation, Mutagenesis, and Removal of Mini-F Sequences“. In: *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012 (2012). DOI: 10.1155/2012/472537.
- Tischer, B. Karsten; Smith, Gregory A. und Osterrieder, Nikolaus (2010). „En Passant Mutagenesis: A Two Step Markerless Red Recombination System“. eng. In: *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 634 (2010), S. 421–430. DOI: 10.1007/978-1-60761-652-8_30.

- Tischer, B. Karsten; von Einem, Jens; Kaufer, Benedikt und Osterrieder, Nikolaus (2006). „Two-Step Red-Mediated Recombination for Versatile High-Efficiency Markerless DNA Manipulation in *Escherichia Coli*“. eng. In: *BioTechniques* 40.2 (Feb. 2006), S. 191–197. doi: 10.2144/000112096.
- Trilling, Mirko (2008). „Vergleichende Charakterisierung Molekularer Mechanismen Und Biologischer Konsequenzen Viraler STAT2-Degradation Nach Infektion Mit Cytomegaloviren“. Zugl. Diss. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2008.
- Trilling, Mirko; Bellora, Nicolás; Rutkowski, Andrzej J.; de Graaf, Miranda; Dickinson, Paul; Robertson, Kevin; Prazeres da Costa, Olivia; Ghazal, Peter; Friedel, Caroline C.; Albà, M. Mar und Dölken, Lars (2013). „Deciphering the Modulation of Gene Expression by Type I and II Interferons Combining 4sU-Tagging, Translational Arrest and in Silico Promoter Analysis“. In: *Nucleic Acids Research* 41.17 (Sep. 2013), S. 8107–8125. doi: 10.1093/nar/gkt589.
- Trilling, Mirko; Le, Vu Thuy Khanh; Fiedler, Manuela; Zimmermann, Albert; Bleifuss, Elke und Hengel, Hartmut (2011). „Identification of DNA-Damage DNA-Binding Protein 1 as a Conditional Essential Factor for Cytomegalovirus Replication in Interferon- γ -Stimulated Cells“. In: *PLoS Pathogens* 7.6 (Juni 2011). doi: 10.1371/journal.ppat.1002069.
- Trilling, Mirko; Le, Vu Thuy Khanh und Hengel, Hartmut (2012). „Interplay between CMVs and Interferon Signaling: Implications for Pathogenesis and Therapeutic Intervention“. en. In: *Future Microbiology* 7.11 (Nov. 2012), S. 1269–1282. doi: 10.2217/fmb.12.109.
- Trilling, Mirko; Le, Vu Thuy Khanh; Rashidi-Alavijeh, Jassin; Katschinski, Benjamin; Scheller, Jürgen; Rose-John, Stefan; Androsiac, Gabriela Elena; Jonjić, Stipan; Poli, Valeria; Pfeffer, Klaus und Hengel, Hartmut (2014). „“Activated” STAT Proteins: A Paradoxical Consequence of Inhibited JAK-STAT Signaling in Cytomegalovirus-Infected Cells“. en. In: *The Journal of Immunology* 192.1 (Jan. 2014), S. 447–458. doi: 10.4049/jimmunol.1203516.
- Trilling, Mirko; Le, Vu Thuy Khanh; Zimmermann, Albert; Ludwig, Holger; Pfeffer, Klaus; Sutter, Gerd; Smith, Geoffrey L. und Hengel, Hartmut (2009). „Gamma Interferon-Induced Interferon Regulatory Factor 1-Dependent Antiviral Response Inhibits Vaccinia Virus Replication in Mouse but Not Human Fibroblasts“. In: *Journal of Virology* 83.8 (Apr. 2009), S. 3684–3695. doi: 10.1128/JVI.02042-08.
- Le-Trilling, Vu Thuy Khanh; Becker, Tanja; Nachshon, Aharon; Stern-Ginossar, Noam; Schöler, Lara; Voigt, Sebastian; Hengel, Hartmut und Trilling, Mirko (2020). „The Human Cytomegalovirus pUL145 Isoforms Act as Viral DDB1-Cullin-Associated Factors to Instruct Host Protein Degradation to Impede Innate Immunity“. English. In: *Cell Reports* 30.7 (Feb. 2020), 2248–2260.e5. doi: 10.1016/j.celrep.2020.01.070.
- Le-Trilling, Vu Thuy Khanh; Megger, Dominik A.; Katschinski, Benjamin; Landsberg, Christine D.; Rückborn, Meike U.; Tao, Sha; Krawczyk, Adalbert; Bayer, Wibke; Drexler, Ingo; Tenbusch, Matthias; Sitek, Barbara und Trilling, Mirko (2016). „Broad and Potent Antiviral Activity of the NAE Inhibitor MLN4924“. eng. In: *Scientific Reports* 6 (Feb. 2016), S. 19977. doi: 10.1038/srep19977.

- Le-Trilling, Vu Thuy Khanh; Wohlgemuth, Kerstin; Rückborn, Meike U.; Jagnjic, Andreja; Maaßen, Fabienne; Timmer, Lejla; Katschinski, Benjamin und Trilling, Mirko (2018). „STAT2-Dependent Immune Responses Ensure Host Survival despite the Presence of a Potent Viral Antagonist“. en. In: *Journal of Virology* (Mai 2018), JVI.00296–18. DOI: 10.1128/JVI.00296-18.
- Tschische, Pia; Tadagaki, Kenjiro; Kamal, Maud; Jockers, Ralf und Waldhoer, Maria (2011). „Heteromerization of Human Cytomegalovirus Encoded Chemokine Receptors“. In: *Biochemical Pharmacology* 82.6 (Sep. 2011), S. 610–619. DOI: 10.1016/j.bcp.2011.06.009.
- Tsuda, Yoshimi; Caposio, Patrizia; Parkins, Christopher J.; Botto, Sara; Messaoudi, Ilhem; Cicin-Sain, Luka; Feldmann, Heinz und Jarvis, Michael A. (2011). „A Replicating Cytomegalovirus-Based Vaccine Encoding a Single Ebola Virus Nucleoprotein CTL Epitope Confers Protection against Ebola Virus“. In: *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5.8 (Aug. 2011). DOI: 10.1371/journal.pntd.0001275.
- Tsuda, Yoshimi; Parkins, Christopher J.; Caposio, Patrizia; Feldmann, Friederike; Botto, Sara; Ball, Susan; Messaoudi, Ilhem; Cicin-Sain, Luka; Feldmann, Heinz und Jarvis, Michael A. (2015). „A Cytomegalovirus-Based Vaccine Provides Long-Lasting Protection against Lethal Ebola Virus Challenge after a Single Dose“. In: *Vaccine* 33.19 (Mai 2015), S. 2261–2266. DOI: 10.1016/j.vaccine.2015.03.029.
- van Senten, Jeffrey R.; Bebelman, Maarten P.; Fan, Tian Shu; Heukers, Raimond; Bergkamp, Nick D.; van Gasselt, Puck; Langemeijer, Ellen V.; Slinger, Erik; Lagerweij, Tonny; Rahbar, Afsar; Stigter-van Walsum, Marijke; Maussang, David; Leurs, Rob; Musters, René JP; van Dongen, Guus A.M.S.; Söderberg-Nauclér, Cecilia; Würdinger, Thomas; Siderius, Marco und Smit, Martine J. (2019). „The Human Cytomegalovirus-Encoded G Protein-Coupled Receptor UL33 Exhibits Oncomodulatory Properties“. en. In: *Journal of Biological Chemistry* (Sep. 2019), jbc.RA119.007796. DOI: 10.1074/jbc.RA119.007796.
- Vanarsdall, Adam L und Johnson, David C (2012). „Human Cytomegalovirus Entry into Cells“. In: *Current opinion in virology* 2.1 (Feb. 2012). DOI: 10.1016/j.coviro.2012.01.001.
- Varnum, Susan M.; Streblow, Daniel N.; Monroe, Matthew E.; Smith, Patricia; Auberry, Kenneth J.; Paša-Tolić, Ljiljana; Wang, Dai; Camp, David G.; Rodland, Karin; Wiley, Steven; Britt, William; Shenk, Thomas; Smith, Richard D. und Nelson, Jay A. (2004). „Identification of Proteins in Human Cytomegalovirus (HCMV) Particles: The HCMV Proteome“. en. In: *Journal of Virology* 78.20 (Okt. 2004), S. 10960–10966. DOI: 10.1128/JVI.78.20.10960-10966.2004.
- Veals, S. A.; Schindler, C.; Leonard, D.; Fu, X. Y.; Aebersold, R.; Darnell, J. E. und Levy, D. E. (1992). „Subunit of an Alpha-Interferon-Responsive Transcription Factor Is Related to Interferon Regulatory Factor and Myb Families of DNA-Binding Proteins“. ENG. In: *Molecular and Cellular Biology* 12.8 (Aug. 1992), S. 3315–3324.
- Velazquez, L.; Fellous, M.; Stark, G. R. und Pellegrini, S. (1992). „A Protein Tyrosine Kinase in the Interferon Alpha/Beta Signaling Pathway“. ENG. In: *Cell* 70.2 (Juli 1992), S. 313–322.

- Vivier, Eric; Ugolini, Sophie; Blaise, Didier; Chabannon, Christian und Brossay, Laurent (2012). „Targeting Natural Killer Cells and Natural Killer T Cells in Cancer“. In: *Nature reviews. Immunology* 12.4 (März 2012), S. 239–252. DOI: 10.1038/nri3174.
- Wagner, Markus; Gutermann, Anja; Podlech, Jürgen; Reddehase, Matthias J. und Koszinowski, Ulrich H. (2002). „Major Histocompatibility Complex Class I Allele-Specific Cooperative and Competitive Interactions between Immune Evasion Proteins of Cytomegalovirus“. In: *The Journal of Experimental Medicine* 196.6 (Sep. 2002), S. 805–816. DOI: 10.1084/jem.20020811.
- Wagner, Markus; Jonjić, Stipan; Koszinowski, Ulrich H. und Messerle, Martin (1999). „Systematic Excision of Vector Sequences from the BAC-Cloned Herpesvirus Genome during Virus Reconstitution“. In: *Journal of Virology* 73.8 (Aug. 1999), S. 7056–7060.
- Waldhoer, Maria; Casarosa, Paola; Rosenkilde, Mette M.; Smit, Martine J.; Leurs, Rob; Whistler, Jennifer L. und Schwartz, Thue W. (2003). „The Carboxyl Terminus of Human Cytomegalovirus-Encoded 7 Transmembrane Receptor US28 Camouflages Agonism by Mediating Constitutive Endocytosis“. en. In: *Journal of Biological Chemistry* 278.21 (Mai 2003), S. 19473–19482. DOI: 10.1074/jbc.M213179200.
- Waldhoer, Maria; Kledal, Thomas N.; Farrell, Helen und Schwartz, Thue W. (2002). „Murine Cytomegalovirus (CMV) M33 and Human CMV US28 Receptors Exhibit Similar Constitutive Signaling Activities“. In: *Journal of Virology* 76.16 (Aug. 2002), S. 8161–8168. DOI: 10.1128/JVI.76.16.8161-8168.2002.
- Wang, Dai und Shenk, Thomas (2005a). „Human Cytomegalovirus UL131 Open Reading Frame Is Required for Epithelial Cell Tropism“. In: *Journal of Virology* 79.16 (Aug. 2005), S. 10330–10338. DOI: 10.1128/JVI.79.16.10330-10338.2005.
- Wang, Dai und Shenk, Thomas (2005b). „Human Cytomegalovirus Virion Protein Complex Required for Epithelial and Endothelial Cell Tropism“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102.50 (Dez. 2005), S. 18153–18158. DOI: 10.1073/pnas.0509201102.
- Wang, Qi-En; Han, Chunhua; Zhao, Ran; Wani, Gulzar; Zhu, Qianzheng; Gong, Li; Battu, Aruna; Racoma, Ira; Sharma, Nidhi und Wani, Altaf A. (2013). „P38 MAPK- and Akt-Mediated P300 Phosphorylation Regulates Its Degradation to Facilitate Nucleotide Excision Repair“. In: *Nucleic Acids Research* 41.3 (Feb. 2013), S. 1722–1733. DOI: 10.1093/nar/gks1312.
- Wang, Rui; Cherukuri, Pratima und Luo, Jianyuan (2005). „Activation of Stat3 Sequence-Specific DNA Binding and Transcription by P300/CREB-Binding Protein-Mediated Acetylation“. en. In: *Journal of Biological Chemistry* 280.12 (März 2005), S. 11528–11534. DOI: 10.1074/jbc.M413930200.
- Wathen, M W; Thomsen, D R und Stinski, M F (1981). „Temporal Regulation of Human Cytomegalovirus Transcription at Immediate Early and Early Times after Infection.“ In: *Journal of Virology* 38.2 (Mai 1981), S. 446–459.

- Wathen, Michael W. und Stinski, Mark F. (1982). „Temporal Patterns of Human Cytomegalovirus Transcription: Mapping the Viral RNAs Synthesized at Immediate Early, Early, and Late Times After Infection“. en. In: *Journal of Virology* 41.2 (Jan. 1982), S. 462–477.
- Watling, Diane; Guschin, Dmitry; Müller, Mathias; Silvennoinen, Olli; Witthuhn, Bruce A.; Quelle, Frederick W.; Rogers, Neil C.; Schindler, Chris; Stark, George R.; Ihle, James N. und Kerr, Ian M. (1993). „Complementation by the Protein Tyrosine Kinase JAK2 of a Mutant Cell Line Defective in the Interferon- γ Signal Transduction Pathway“. en. In: *Nature* 366.6451 (Nov. 1993), S. 166–170. DOI: 10.1038/366166a0.
- Weekes, Michael P.; Tomasec, Peter; Huttlin, Edward L.; Fielding, Ceri A.; Nusinow, David; Stanton, Richard J.; Wang, Eddie C.Y.; Aicheler, Rebecca; Murrell, Isa; Wilkinson, Gavin W.G.; Lehner, Paul J. und Gygi, Steven P. (2014). „Quantitative Temporal Viromics: An Approach to Investigate Host-Pathogen Interaction“. In: *Cell* 157.6 (Juni 2014), S. 1460–1472. DOI: 10.1016/j.cell.2014.04.028.
- Welch, A R; McGregor, L M und Gibson, W (1991). „Cytomegalovirus Homologs of Cellular G Protein-Coupled Receptor Genes Are Transcribed.“ In: *Journal of Virology* 65.7 (Juli 1991), S. 3915–3918.
- Weller, Thomas H; Hanshaw, James B und Scott, D’Maris E (1960). „Serologic Differentiation of Viruses Responsible for Cytomegalic Inclusion Disease“. en. In: *Virology* 12.1 (Sep. 1960), S. 130–132. DOI: 10.1016/0042-6822(60)90156-2.
- Wenta, N.; Strauss, H.; Meyer, S. und Vinkemeier, U. (2008). „Tyrosine Phosphorylation Regulates the Partitioning of STAT1 between Different Dimer Conformations“. en. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105.27 (Juli 2008), S. 9238–9243. DOI: 10.1073/pnas.0802130105.
- Whitmire, Jason K.; Tan, Joyce T. und Whitton, J. Lindsay (2005). „Interferon- γ Acts Directly on CD8+ T Cells to Increase Their Abundance during Virus Infection“. en. In: *Journal of Experimental Medicine* 201.7 (Apr. 2005), S. 1053–1059. DOI: 10.1084/jem.20041463.
- Wienerroither, Sebastian; Shukla, Priyank; Farlik, Matthias; Majoros, Andrea; Stych, Bernadette; Vogl, Claus; Cheon, HyeonJoo; Stark, George R.; Strobl, Birgit; Müller, Mathias und Decker, Thomas (2015). „Cooperative Transcriptional Activation of Antimicrobial Genes by STAT and NF- κ B Pathways by Concerted Recruitment of the Mediator Complex“. eng. In: *Cell Reports* 12.2 (Juli 2015), S. 300–312. DOI: 10.1016/j.celrep.2015.06.021.
- Williams, Dionna W.; Askew, Lauren C.; Jones, Elonna und Clements, Janice E. (2019). „CCR2 Signaling Selectively Regulates IFN- α : Role of β -Arrestin 2 in IFNAR1 Internalization“. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 202.1 (Jan. 2019), S. 105–118. DOI: 10.4049/jimmunol.1800598.
- Wolf, Benjamin J.; Choi, Jiyoung Elizabeth und Exley, Mark A. (2018). „Novel Approaches to Exploiting Invariant NKT Cells in Cancer Immunotherapy“. English. In: *Frontiers in Immunology* 9 (2018). DOI: 10.3389/fimmu.2018.00384.

- Xiaofei, E.; Meraner, Paul; Lu, Ping; Perreira, Jill M.; Aker, Aaron M.; McDougall, William M.; Zhuge, Ronghua; Chan, Gary C.; Gerstein, Rachel M.; Caposio, Patrizia; Yurochko, Andrew D.; Brass, Abraham L. und Kowalik, Timothy F. (2019). „OR14I1 Is a Receptor for the Human Cytomegalovirus Pentameric Complex and Defines Viral Epithelial Cell Tropism“. en. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116.14 (Apr. 2019), S. 7043–7052. DOI: 10.1073/pnas.1814850116.
- Yamaoka, Kunihiro; Saharinen, Pipsa; Pesu, Marko; Holt, Vance ET; Silvennoinen, Olli und O’Shea, John J (2004). „The Janus Kinases (Jaks)“. In: *Genome Biology* 5.12 (2004), S. 253. DOI: 10.1186/gb-2004-5-12-253.
- Yoshida, Yasuhiro; Kumar, Arvind; Koyama, Yoshinobu; Peng, Haibing; Arman, Ahmet; Boch, Jason A. und Auron, Philip E. (2004). „Interleukin 1 Activates STAT3/Nuclear Factor- κ B Cross-Talk via a Unique TRAF6- and P65-Dependent Mechanism“. en. In: *Journal of Biological Chemistry* 279.3 (Jan. 2004), S. 1768–1776. DOI: 10.1074/jbc.M311498200.
- Young, Howard A. und Hardy, Kenneth J. (1990). „Interferon- γ : Producer Cells, Activation Stimuli, and Molecular Genetic Regulation“. In: *Pharmacology & Therapeutics* 45.1 (Jan. 1990), S. 137–151. DOI: 10.1016/0163-7258(90)90012-Q.
- Yu, Dong; Silva, Maria C. und Shenk, Thomas (2003). „Functional Map of Human Cytomegalovirus AD169 Defined by Global Mutational Analysis“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100.21 (Okt. 2003), S. 12396–12401. DOI: 10.1073/pnas.1635160100.
- El-Zayat, Salwa Refat; Sibaii, Hiba und Mannaa, Fathia A. (2019). „Toll-like Receptors Activation, Signaling, and Targeting: An Overview“. en. In: *Bulletin of the National Research Centre* 43.1 (Dez. 2019), S. 187. DOI: 10.1186/s42269-019-0227-2.
- Železnjak, Jelena; Lisnić, Vanda Juranić; Popović, Branka; Lisnić, Berislav; Babić, Marina; Halenius, Anne; L’Hernault, Anne; Roviš, Tihana Lenac; Hengel, Hartmut; Erhard, Florian; Redwood, Alec J.; Vidal, Silvia M.; Dölken, Lars; Krmpotić, Astrid und Jonjić, Stipan (2019). „The Complex of MCMV Proteins and MHC Class I Evades NK Cell Control and Drives the Evolution of Virus-Specific Activating Ly49 Receptors“. en. In: *Journal of Experimental Medicine* 216.8 (Aug. 2019), S. 1809–1827. DOI: 10.1084/jem.20182213.
- Zhang, Jue J.; Vinkemeier, Uwe; Gu, Wei; Chakravarti, Debabrata; Horvath, Curt M. und Darnell, James E. (1996). „Two Contact Regions between Stat1 and CBP/P300 in Interferon γ Signaling“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93.26 (1996), S. 15092–15096.
- Zhong, Minghao; Henriksen, Melissa A.; Takeuchi, Kenji; Schaefer, Olaf; Liu, Bin; Hoeve, Johanna ten; Ren, Zhiyong; Mao, Xiang; Chen, Xiaomin; Shuai, Ke und Darnell, James E. (2005). „Implications of an Antiparallel Dimeric Structure of Nonphosphorylated STAT1 for the Activation–Inactivation Cycle“. en. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102.11 (März 2005), S. 3966–3971. DOI: 10.1073/pnas.0501063102.

- Zhu, Ming-hua; John, Susan; Berg, Maria und Leonard, Warren J. (1999). „Functional Association of Nmi with Stat5 and Stat1 in IL-2- and IFN γ -Mediated Signaling“. In: *Cell* 96.1 (Jan. 1999), S. 121–130. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80965-4.
- Ziegler, Heike; Thäle, Regine; Lucin, Pero; Muranyi, Walter; Flohr, Thomas; Hengel, Hartmut; Farrell, Helen; Rawlinson, William und Koszinowski, Ulrich H. (1997). „A Mouse Cytomegalovirus Glycoprotein Retains MHC Class I Complexes in the ERGIC/Cis-Golgi Compartments“. In: *Immunity* 6.1 (1997), S. 57–66.
- Zimmermann, Albert; Trilling, Mirko; Wagner, Markus; Wilborn, Manuel; Bubic, Ivan; Jonjic, Stipan; Koszinowski, Ulrich und Hengel, Hartmut (2005). „A Cytomegaloviral Protein Reveals a Dual Role for STAT2 in IFN- γ Signaling and Antiviral Responses“. eng. In: *The Journal of Experimental Medicine* 201.10 (Mai 2005), S. 1543–1553. doi: 10.1084/jem.20041401.

Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mir diese Doktorarbeit ermöglicht und mich darin unterstützt haben.

Ich danke Prof. Dr. Mirko Trilling für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe an diesem spannenden Thema arbeiten zu dürfen, und für die Unterstützung und Förderung vom ersten Tag an bis zum Schluss.

Ich danke Dr. Khanh Le-Trilling für die Betreuung während meiner gesamten Zeit in der Arbeitsgruppe, und vor allem für das stets geduldige Beantworten meiner Fragen. Mein häufigster Satz war vermutlich „Ich wollte noch was anderes fragen, aber das habe ich jetzt wieder vergessen“.

Außerdem danke ich Dr. Tanja Becker für die vielen guten Gespräche und aufbauenden Worte zu vielen Gelegenheiten mit Kaffee oder Wein und Pizza, oder beim vertikalen Frustabbau.

Ich bedanke mich auch bei Benjamin Katschinski und Kerstin Wohlgemuth, die mir bei allen Fragen und Suchen im Labor geholfen haben, und allen aktuellen und ehemaligen Kollegen der gesamten Arbeitsgruppe für die vielen schönen Kaffee-, Kuchen- und Waffel-Pausen und die geselligen Kochabende.

Ich danke auch meinem Zweitbetreuer Prof. Ingo Drexler und Dr. Wibke Bayer für die freundliche Bereitstellung von Viren und Zellen und für die Möglichkeit, Experimente in ihren Laboren durchführen zu können, sowie allen Beteiligten des Graduiertenkollegs RTG1949 für die Finanzierung und die professionelle, aber familiäre Rahmenstruktur.

Meiner Familie danke ich für die vielen motivierenden Worte und die Geduld in den Phasen, in denen ich mal wieder vom Radar verschwunden war.

Ganz besonders danke ich meinem Mann Oliver, ohne den ich nicht auf die Idee gekommen wäre, es in der Wissenschaft zu versuchen. Alles fing mit „guck mal, eine Stellenanzeige mit Mäusen“ an. Danke, dass du alle Schritte dieses Weges so unterstützend, geduldig und verständnisvoll mit mir gegangen bist.

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Erklärungen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) d) + f) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient, bei der Abfassung der Dissertation nur die angegebenen Hilfsmittel benutzt und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den _____
Ort, Datum

Mareike Eilbrecht

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) e) + g) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät/Fachbereich abgelehnt worden ist.

Essen, den _____
Ort, Datum

Mareike Eilbrecht

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. (2) g) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema "Identifizierung und Charakterisierung neuer Cytomegalovirus-kodierter Interferon-Antagonisten" zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Mareike Eilbrecht befürworte und die Betreuung auch im Falle eines Weggangs, wenn nicht wichtige Gründe dem entgegenstehen, weiterführen werde.

Essen, den _____
Ort, Datum

Prof. Dr. Mirko Trilling