

**Untersuchung des immunogenen Potentials von *Dense Bodies* des Humanen Cytomegalovirus (HCMV) als Grundlage für die Entwicklung einer neuartigen HCMV-Vakzine**

**D i s s e r t a t i o n**

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität  
Mainz

**Sandra Pepperl**  
geboren in München

Mainz, 2000

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 2000

„In den Wissenschaften ist viel Gewisses,  
sobald man sich von den Ausnahmen  
nicht irre machen läßt  
und die Probleme zu ehren weiß“

Johann Wolfgang von Goethe, 1749-1855.

## Zusammenfassung

Das Humane Cytomegalovirus (HCMV) ist ein Erreger von erheblicher klinischer Bedeutung, der insbesondere bei Neugeborenen und bei Patienten unter Immunsuppression schwere Erkrankungen auslösen kann. Eine HCMV-Vakzine ist bislang nicht verfügbar. Immunität ist nur durch eine Kombination effizienter humoraler und zellulärer Effektormechanismen zu vermitteln. Inhalt der vorgestellten Arbeit war es zu untersuchen, ob *Dense Bodies* (DB) eine derartige Immunantwort gegen HCMV induzieren und damit als Grundlage für die Entwicklung einer HCMV-Vakzine dienen können. DB sind nicht-infektiöse, umhüllte Partikel, die analog zu Virionen aus der infizierten Zelle freigesetzt werden. Die beiden Hauptbestandteile von DB wurden als die immundominanten Antigene zur Induktion der humoralen (Glykoprotein B) und zellulären (Tegumentprotein pp65) Immunantwort gegen HCMV identifiziert.

In der vorliegenden Arbeit konnte am Mausmodell gezeigt werden, dass die Immunisierung mit DB die Bildung HCMV-neutralisierender Antikörper induzierte, die über ein Jahr hinweg im Serum der Tiere nachweisbar blieben. Die Spiegel an neutralisierenden Antikörpern waren mit Titern vergleichbar, die nach einer durchlaufenen, natürlichen HCMV-Infektion in menschlichen Seren gemessen wurden. Darüber hinaus stimulierten DB, obwohl sie ein Totantigen darstellen und keine *de novo*-Synthese von viralen Proteinen vermitteln, eine deutliche HCMV-spezifische, zytotoxische T-Zell-Antwort (CTL-Antwort). Die zytolytische Gesamtaktivität war nahezu so hoch, wie nach einer Infektion der Tiere mit dem replikationskompetenten murinen CMV. Die Analyse der T-Helferzell-Antwort ergab, dass die Applikation von DB eine Th1-artige Immunantwort auslöste, die die Kontrolle einer Virusinfektion unterstützt. DB des HCMV sind folglich geeignet, sowohl humorale als auch zelluläre Immun-effektormechanismen effizient zu induzieren. Sie erwiesen sich als ein wirksames Antigen-transportsystem, das als vielversprechende Grundlage für die Entwicklung einer rekombinanten HCMV-Vakzine dienen kann. Eine Reihe von Experimenten machte deutlich, dass die Eigenschaft der DB, in eine Vielzahl von Zelltypen aufgenommen zu werden, die Immunogenität der Partikel signifikant verstärkte.

Um die Immunogenität der DB für die Anwendung am Menschen weiter zu optimieren, müssen sie um zusätzliche antigene Determinanten ergänzt werden. Derartige rekombinante DB können nur durch Konstruktion mutanter HCMV-Genome generiert werden. Dies ist aufgrund der Größenlimitation des HCMV-Genoms jedoch schwierig. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei Genombereiche des HCMV dahingehend charakterisiert, ob sie zur Insertion von Fremdsequenzen geeignet sind. Mit Hilfe von viralen Deletionsmutanten wurde untersucht, ob die entsprechenden Genomregionen für die Virusreplikation sowie für die Ausbildung und Freisetzung von DB entbehrlich sind. Der Leserahmen UL32, der für das Phosphoprotein pp150 kodiert, erwies sich als essentiell. Mit der IE4-Region hingegen konnte ein 5 kB langes Genomfragment identifiziert werden, das aus dem Genom deletiert und gegen zusätzliche antigene Determinanten ausgetauscht werden kann, die zur Generierung stärker immunogener, rekombinanter DB benötigt werden.

Zusammenfassend eröffnen die vorgestellten Ergebnisse neue Möglichkeiten zur Entwicklung eines wirksamen Impfstoffes gegen HCMV.

---

**Inhaltsverzeichnis**

<b>Zusammenfassung</b>	<b>I</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>II</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>VI</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. <i>Das Humane Cytomegalovirus (HCMV)</i>	1
1.1.1. Morphologie	1
1.1.2. Genom	2
1.1.3. Replikation	3
1.1.4. Latenz und Reaktivierung	5
1.1.5. Epidemiologie und Transmission	5
1.1.6. Pathologie und Pathogenese	6
1.2. <i>Immunologische Überwachung einer HCMV-Infektion</i>	9
1.3. <i>Diagnose, Therapie und Prophylaxe einer HCMV-Infektion</i>	11
1.4. <i>Bisherige Ansätze zur Entwicklung eines Impfstoffes gegen HCMV</i>	13
1.5. <i>Zielsetzung der Arbeit</i>	15
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>18</b>
2.1. <i>Bakterien und ihre Kultivierung</i>	18
2.1.1. Bakterienstämme	18
2.1.2. Medien und Lösungen für die Bakterienkultivierung	18
2.1.3. Kultivierung und Kryokonservierung von Bakterien	19
2.1.4. Kompetenzinduktion	19
2.1.5. Transformation kompetenter E. coli	20
2.2. <i>Viren</i>	20
2.3. <i>Säugerzellen und ihre Kultivierung</i>	21
2.3.1. Adhärente Zellen	21
2.3.2. Suspensionszellen	22
2.3.3. Kulturmedien, Puffer und Lösungen für die Zellkultur	23
2.4. <i>Zellkulturverfahren</i>	24
2.4.1. Kultivierung von Suspensionszellen und adhärent wachsenden Zellen	24
2.4.2. Kryokonservierung und Reaktivierung von Zellen	25

---

2.4.3.	Bestimmung von Zellzahl und Zellvitalität	25
2.4.4.	Transfektion eukaryonter Zellen	26
2.4.5.	Infektion permissiver Zellen mit HCMV	27
2.4.6.	Virus- und Dense Body-Reinigung aus Zellkulturüberstand	27
2.4.7.	Plaquereinigung von Viren	28
2.4.8.	FACS-Sortierung GFP-exprimierender Zellen	28
2.4.9.	TCID50-Bestimmung	29
2.4.10.	Mykoplasmentest	30
2.5.	<i>Immunologische Methoden</i>	31
2.5.1.	Antikörper und Antiseren	31
2.5.2.	Versuchstiere	32
2.5.3.	Gewinnung von Lymphozyten	32
2.5.4.	Etablierung zytotoxischer T-Lymphozyten	32
2.5.5.	Zytolysetest (Chromfreisetzungstest)	33
2.5.5.1.	Peptide	33
2.5.5.2.	Prinzip	33
2.5.5.3.	Durchführung	34
2.5.6.	Gewinnung von Serum	35
2.5.7.	Neutralisationstest	35
2.5.8.	Indirekte Immunfluoreszenzanalyse und Immunhistochemie	36
2.5.9.	<i>Western Blot</i> -Analyse	37
2.5.10.	ELISA ( <i>enzyme linked immunosorbent assay</i> )	38
2.6.	<i>Präparation, Analyse und Manipulation von Nukleinsäure</i>	38
2.6.1.	Verwendete Plasmide	38
2.6.2.	Oligonukleotide	39
2.6.3.	Isolierung von Nukleinsäure	40
2.6.4.	Photometrische Konzentrationsbestimmung	40
2.6.5.	Enzymatische Reaktionen mit Nukleinsäure	40
2.6.6.	Herstellung von <i>blunt-ends</i> nach Restriktionsenzymverdau	40
2.6.7.	Agarose-Gelelektrophorese	41
2.6.8.	Elution von DNA aus Agarose-Gelen	41
2.6.9.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	41
2.6.10.	Herstellung von Zellysaten als PCR-Matrize	43
2.6.11.	DNA-Isolierung aus virushaltigem Zellkulturüberstand	43
2.6.12.	<i>Southern Blot</i> -Hybridisierung	44
2.6.13.	Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden	45
2.6.14.	<i>Northern Blot</i> -Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten DNA-Sonden	45
2.7.	<i>Analyse von Proteinen</i>	46
2.7.1.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	46

2.7.2.	Färbung von Proteinen mit Coomassie Brillant Blau	47
2.7.3.	Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation	47
2.7.4.	Neomycin-Phosphotransferase-Nachweis (Neotest)	48
2.7.5.	Luciferase-Test	49
2.7.6.	<i>In vitro</i> Transkription und Translation	49
2.8.	<i>Elektronenmikroskopie</i>	49
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>50</b>
3.1.	<i>Untersuchung des immunogenen Potentials von HCMV Dense Bodies (DB) im Mausmodell</i>	50
3.1.1.	Gradientenreinigung und Quantifizierung von HCMV-DB	50
3.1.2.	Aufnahme von DB in eine Vielzahl von Zelltypen	51
3.1.3.	Verhinderung der Aufnahme von DB in die Zelle durch mechanische Behandlung der Partikel (sfDB)	52
3.1.4.	Verlust der Infektiosität von Virionen durch mechanische Behandlung	55
3.1.5.	Untersuchung der Reinheit der DB-Präparationen	56
3.1.6.	Vergleichende Analyse der physikalischen Eigenschaften von DB und sfDB	58
3.1.7.	Untersuchung der neutralisierenden Antikörper-Antwort in der Maus nach Immunisierung mit DB	62
3.1.8.	Analyse der Zielproteine der humoralen Immunantwort gegen HCMV	65
3.1.9.	Untersuchung der pp65-spezifischen zytotoxischen T-Zell-Antwort nach Immunisierung mit DB	68
3.1.10.	Vergleich der zytolytischen Aktivität nach Immunisierung mit DB mit einer mCMV-Infektion	72
3.1.11.	Abhängigkeit der Stärke der Zytotoxizität von der Antigen dosis	74
3.1.12.	Analyse der T-Helferzell-Antwort nach Immunisierung mit DB	76
3.2.	<i>Herstellung von HCMV-Deletionsmutanten als Grundlage für Arbeiten zur Generierung rekombinanter Dense Bodies</i>	81
3.2.1.	Versuche zur Herstellung einer pp150-Deletionsmutante	82
3.2.1.1.	Klonierung der Rekombinationsplasmide pBglJd150-Neo und pBglJd150-GFP-Neo	82
3.2.1.2.	Versuche zur Generierung einer pp150-Deletionsmutante mit dem Rekombinationsplasmid pBglJd150-Neo	84
3.2.1.3.	Versuche zur Generierung einer pp150-Deletionsmutante mit dem Rekombinationsplasmid pBglJd150-GFPNeo	85

---

3.2.1.3.1.	Homologe Rekombination und Anreicherung der rekombinanten Viren	85
3.2.1.3.2.	<i>Southern Blot</i> -Analyse der rekombinanten viralen DNA	87
3.2.1.3.3.	Versuche zur Komplementierung der pp150-Deletion <i>in trans</i>	89
3.2.2.	Herstellung einer IE4-Deletionsmutante	90
3.2.2.1.	Klonierung des Rekombinationsplasmides pGHS6-neo	91
3.2.2.2.	Generierung der IE4-Deletionsmutante RVAdIE4	92
3.2.2.3.	Restriktionsverdau-Analyse von RVAdIE4	93
3.2.2.4.	<i>Southern Blot</i> -Analyse von RVAdIE4	94
3.2.2.5.	Vergleich des Replikationsverhaltens von RVAdIE4 und Ad1697 <i>in vitro</i>	96
3.2.2.6.	Einfluß der Deletion von IE4 auf die Aktivierung früher viraler Promotoren	98
3.2.2.7.	Kontrolle der Expression der UL112/113-Region	99
3.2.2.8.	Kodiert das IE4-Transkript doch für ein Protein?	101
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>103</b>
4.1.	<i>Immunogenes Potential von Dense Bodies des HCMV</i>	103
4.2.	<i>HCMV-Deletionsmutanten als Grundlage für die Generierung rekombinanter Dense Bodies</i>	115
4.2.1.	Essentielle Funktion des pp150-Proteins (pUL32) im Rahmen der Virusreplikation	116
4.2.2.	Verzichtbarkeit des IE4-Transkriptes für die Virusvermehrung	119
<b>5.</b>	<b>Ausblick</b>	<b>123</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>124</b>
<b>7.</b>	<b>Veröffentlichungen</b>	<b>143</b>
<b>8.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>145</b>



## Verzeichnis der im Text verwendeten Abkürzungen

A	Absorption
Abb.	Abbildung
AIDS	erworbenes Immundefizienz-Syndrom ( <i>acquired immunodeficiency syndrome</i> )
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
AS	Aminosäure
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> , Rockville, MD., USA.
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum-Albumin ( <i>bovine serum albumine</i> )
°C	Grad Celsius
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
Ci	Curie
CMV	Cytomegalovirus
CPE	Zytopathogener Effekt
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten ( <i>cytotoxic T-lymphocytes</i> )
D	Dalton
DB	<i>Dense Bodies</i>
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleotidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure (Titriplex III)
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EM	Elektronenmikroskop
E/Z	Effektor/Zielzell-Verhältnis
et al.	und andere
FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i>
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
FKS	fötale Kälberserum
g	Gramm
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
gp	Glykoprotein
HCMV	Humanes Cytomegalovirus
HFF	Humane Vorhautfibroblasten ( <i>human foreskin fibroblasts</i> )
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>	zweifach destilliertes Wasser aus einer Millipore-Anlage
HRP	Meerrettich-Peroxidase ( <i>horse-radish peroxidase</i> )
HSV	Herpes Simplex Virus
IE	der sehr frühen Replikationsphase zugehörig ( <i>immediate early</i> )
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
k	kilo
kBp	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
KMT	Knochenmarkstransplantation
l	Liter
LCL	Lymphoblastoide Zelllinie
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
M	Molar (Mol pro Liter)
m	milli
mA	Milliampere
mAk	monoklonaler Antikörper

MCP	Hauptkapsidprotein ( <i>major capsid protein</i> )
MEF	murine embryofetale Fibroblasten
MEM	<i>minimal essential medium</i>
MHC	Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex ( <i>major histocompatibility complex</i> )
Min.	Minute
ml	Milliliter
m.o.i.	Infektionstiter ( <i>Multiplicity of Infection</i> )
mRNA	Boten-RNA ( <i>messenger RNA</i> )
MW	Molekulargewicht
N	Normal
Neo	Neomycin-Phosphotransferase
NIEPs	Nicht-infektiöse HCMV-Partikel ( <i>non infectious enveloped particles</i> )
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
pfu	Plaque bildende Einheiten ( <i>plaque forming units</i> )
pH	Konzentration der H <sup>+</sup> -Ionen in einer Lösung
p.i.	nach Infektion ( <i>post infection</i> )
pmol	picomol
pp	Phosphoprotein
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuclease
RVAdIE4	IE4-Deletionsmutante des HCMV-Laborstammes Ad169
RVAd65	pp65-Deletionsmutante des HCMV-Laborstammes Ad169
RVAd150	pp150-Deletionsmutante des HCMV-Laborstammes Ad169
SDS	Natrium Dodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
Sek.	Sekunde
sfDB	<i>Dense Body</i> -Präparation nach Ultraschallbehandlung und zehnmalem Einfrieren in flüssigem Stickstoff ( <i>sonified, frozen DB</i> )
Std.	Stunde(n)
Tab.	Tabelle
Taq	DNA-abhängige DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris/Borat/EDTA-Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Th	T-Helferzelle
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
ÜN	über Nacht
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V	Volt
VLP	Virus-ähnlicher Partikel ( <i>virus-like particle</i> )
Vol.	Volumen
vol/vol oder v/v	Volumeneinheit pro Volumeneinheit
VZV	Varizella-Zoster Virus
W	Watt
WHO	Weltgesundheitsorganisation ( <i>world health organisation</i> )
Wt	Wildtyp
wt/vol oder w/v	Gewichtseinheit pro Volumeneinheit ( <i>weight per volume</i> )
x g	x-fache Erdbeschleunigung
z.B.	zum Beispiel

Anmerkung: International übliche Terminologie auf Englisch wurde beibehalten und zur Kennzeichnung *kursiv* gesetzt.

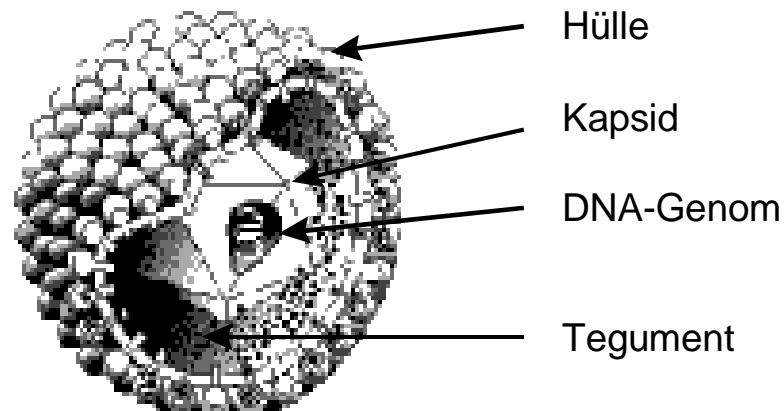
## 1. Einleitung

### 1.1. Das Humane Cytomegalovirus (HCMV)

Das Humane Cytomegalovirus (HCMV) gehört zur Familie der *Herpesviridae*. Diese Virusfamilie ist ubiquitär verbreitet. Bislang sind acht humanpathogene Vertreter, darunter das Herpes Simplex Virus, das Varizella Zoster Virus und das Epstein-Barr Virus, sowie über 100 tierpathogene Vertreter bekannt. Die acht humanpathogenen Vertreter werden aufgrund ihrer biologischen Eigenschaften in drei Unterfamilien eingeteilt, die *alpha* ( $\alpha$ )-, *beta* ( $\beta$ )- und *gamma* ( $\gamma$ )-*Herpesviridae* (Stinski et al., 1983). Basierend auf einer ausgeprägten Wirtsspezifität, einem vergleichsweise langsamen Replikationszyklus und der charakteristischen Vergrößerung der infizierten Zelle (Cytomegalie) wurde das HCMV in die Unterfamilie der  $\beta$ -Herpesviren eingegliedert. Das HCMV wird auch als Humanes Herpesvirus 5 (HHV5) bezeichnet.

#### 1.1.1. Morphologie

Alle Herpesviren besitzen eine ähnliche Morphologie und können daher unter dem Elektronenmikroskop nicht voneinander unterschieden werden. Ihr Durchmesser beträgt 150 - 200 nm. Im Inneren des Viruspartikels befindet sich der sogenannte *Viruscore*, eine fibrinöse Proteinmatrix, die mit der doppelsträngigen, linearen DNA des Virusgenoms assoziiert ist. Der *Core* wird von einem ikosahedrischen Kapsid, das sich aus 162 Kapsomeren (150 Hexameren und 12 Pentameren) zusammensetzt, umgeben. Der Durchmesser des Kapsids beträgt ca. 100 nm. Nach außen hin ist das Virus durch eine Lipidmembran abgegrenzt, die sich höchstwahrscheinlich aus der Zellmembran ableitet und in die verschiedene viruskodierte Glykoproteine inseriert sind. Die Anzahl dieser HCMV Hüllproteine ist nicht genau bekannt. Sie spielen eine wesentliche Rolle bei der Virus-Zell-Interaktion während der Adoptions- und Penetrationsphase des viralen Replikationszyklusses. Zwischen der Hülle und dem Kapsid befindet sich eine Struktur, die als Matrix oder Tegument bezeichnet wird. Sie enthält eine Reihe von Proteinen, die wichtige regulatorische Funktionen im Rahmen der viralen Replikation ausüben. Als Hauptstrukturkomponenten des Teguments werden drei Phosphoproteine (pp) angesehen, die gemeinsam etwa 40% der Virion-Proteinmasse ausmachen: das pp65 (pUL83), das pp71 (pUL82) und das pp150 (pUL32). Ungefähr 30-45 Strukturproteine sind an der Formation des Viruspartikles beteiligt. Der genaue Ablauf des Zusammenbaus (*assembly*) ist jedoch noch unklar (zusammengefaßt in Mocarski, 1996).



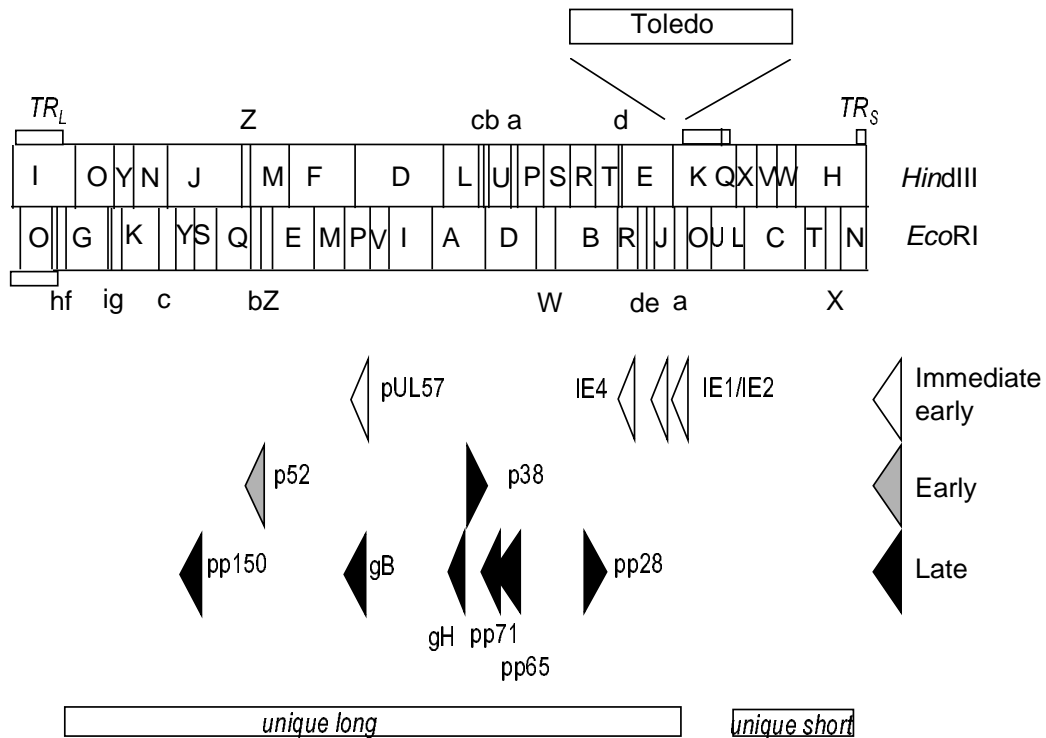
**Abb. 1.1.:** Schematischer Aufbau des HCMV (Quelle: Dr. Marko Reschke, Marburg). Die Pfeile geben die Lokalisation der verschiedenen Virionbestandteile an. Das DNA-Genom wird vom Kapsid eingeschlossen. Darüber befindet sich eine Proteinschicht, die als Tegument oder Matrix bezeichnet wird. Nach außen hin wird der Viruspartikel von einer Lipidhülle abgegrenzt, in die die viralen Glykoproteine eingelagert sind.

### 1.1.2. Genom

Das HCMV besitzt das am komplexesten organisierte Genom aller bisher bekannten humanpathogenen Viren. Die Nukleotidsequenz des Laborstammes Ad169 wurde 1990 von Chee und Kollegen bestimmt und umfaßt 229.354 Basenpaare. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass klinische Isolate zusätzliche DNA-Sequenzen im Bereich von 15.000 Basenpaaren aufweisen, so dass die Gesamtgenomlänge bis an die 250.000 Basenpaare betragen kann (Cha et al., 1996). Das HCMV-Genom kodiert für etwa 200 Genprodukte. Die Homologie zwischen verschiedenen HCMV-Isolaten beträgt >90%; dennoch lassen sich mit der relativ insensitiven Methode der Restriktions-enzymanalyse keine zwei Isolate finden, die ein identisches Restriktionsmuster aufweisen (Chandler & McDougall, 1986). Einige Untersuchungen deuten darauf hin, dass es einen Zusammenhang zwischen dem Genom eines Virusisolates und dem klinischen Verlauf der Infektion gibt (Fries et al., 1994; Grefte et al., 1995; Torok-Storb et al., 1997).

Das HCMV-Genom besteht aus einzigartigen (*unique*) und repetitiven (*repeats*) Sequenzen (Abb.1.2.). Die terminalen repetitiven Sequenzen (*terminal repeats*; *TR*), die sich an den Genomenden und der Verbindungsstelle zwischen der *unique long*- ( $U_L$ ) und der *unique short*- ( $U_S$ ) Region befinden, dienen dem äußerst komplex regulierten Vorgang der viralen Replikation. Darüber hinaus ist das HCMV-Genom reicher an direkt und invertiert repetitiven Sequenzen als andere Vertreter der Herpesviren (Masse et al., 1992). Drei Genomregionen weisen einen besonders hohen Anteil an Repetitionen auf: der

Ausgangspunkt der DNA-Replikation, *oriLyt*, und zwei die Transkription verstärkende Elemente (*enhancer*). Der G+C-Gehalt des HCMV-Genoms beträgt 55%.



**Abb.1.2.:** Genomorganisation des HCMV-Laborstammes Ad169 (modifiziert nach Chee et al., 1990). Die DNA wurde mit den Restriktionsenzymen HindIII und EcoRI gespalten und die resultierenden Fragmente gemäß ihrer Größe alphabetisch sortiert. Die untere Bildhälfte ordnet einige Proteine, die im Replikationszyklus von HCMV eine zentrale Rolle spielen, den drei Phasen der viralen Genexpression zu. Die Pfeilspitze deutet die Transkriptionsrichtung an. Der Stamm Toledo enthält zusätzliche Sequenzen von ca. 13 kB.

### 1.1.3. Replikation

Der erste Kontakt zwischen HCMV und seiner Zielzelle wird durch eine Interaktion der viralen Hüllproteine mit Heparansulfatstrukturen auf der Zelloberfläche vermittelt. Auf viraler Seite spielen dabei das Glykoprotein B (gB) sowie der Glykoproteinkomplex gCII eine herausragende Rolle (Compton, et al., 1993; Kari et al., 1992). Danach erfolgt die Adsorption an die Zelloberfläche, die durch spezifische, jedoch bisher noch unbekannte Rezeptoren vermittelt wird. Die virale Hülle fusioniert mit der Zellmembran. Bei diesem Vorgang scheint der Glykoproteinkomplex gCIII eine Rolle zu spielen (Huber & Compton, 1999). Dadurch gelangt das Kapsid mit dem Tegument ins Zytoplasma der Zelle, akkumuliert an den Mikrotubuli und wird entlang dieser zu den Kernporen transportiert.

Das Genom und bestimmte Proteine, die für den Kerntransport relevant sind, werden in den Zellkern eingeschleust. Dort zirkularisiert das lineare HCMV-Genom zu einem Episom. Eine Integration des viralen Genoms in das der Wirtszelle wurde bisher nicht beobachtet. Die Replikation des viralen Genoms erfolgt nach dem Prinzip des *rolling circle*. Dabei werden Konkatemere gebildet, die bei der Verpackung der DNA an den Genomenden gespalten und in Einzelgenome überführt werden (Marks & Spector, 1988; Anders et al., 1992).

Die virale Genexpression des HCMV nimmt, wie bei allen Herpesviren, einen dreistufigen, kaskadenartigen Verlauf bis hin zur Lyse der infizierten Zelle. Zunächst werden die *immediate-early* (IE)-Gene transkribiert. Dazu gehören alle Genprodukte, die auch in Gegenwart von Inhibitoren der viralen Proteinbiosynthese entstehen. Zur sogenannten *early* (E)-Phase zählen diejenigen Gene, die auch in Gegenwart von Hemmstoffen der viralen Replikation gebildet werden. Alle Gene, die nach Abschluß der DNA-Synthese exprimiert werden, gehören der *late* (L)-Phase des viralen Replikationszyklusses an. Die Proteine, die in einer bestimmten Phase exprimiert werden, nehmen jeweils unterschiedliche Aufgaben im Rahmen der Replikation wahr. So sind IE-Proteine hauptsächlich regulatorische Moleküle, die wiederum die frühe Genexpression (E-Phase) treiben. E-Proteine sind für die Replikation der viralen DNA verantwortlich, während L-Proteine in erster Linie Strukturkomponenten des Virus darstellen (zusammengefaßt in Mocarski, 1996).

Im Zuge der Replikation von HCMV werden drei Sorten von Partikeln gebildet. Irmieri und Gibson beschrieben 1983, dass neben den infektiösen Virionen von HCMV-infizierten Fibroblasten in Zellkultur zusätzlich zwei Typen von defekten Partikeln freigesetzt werden. Die eine Form wird als nicht-infektiöse, umhüllte Partikel (*non infectious enveloped particles*, NIEPs) bezeichnet und ähnelt in Struktur und Proteinkomposition den Virionen. Die einzigen Unterschiede zu Virionen sind das Vorhandensein eines zusätzlichen Polypeptids, das als *assembly protein* bekannt ist und das Fehlen von DNA. Die zweite Form dieser defekten Partikel wird als "*Dense Bodies*" (DB) bezeichnet. DB sind umhüllte, sphärische Strukturen, die weder das virale Kapsid noch DNA enthalten (Irmieri & Gibson, 1983; Craighead, 1972; Sarov & Abady, 1975). Sie bestehen vorwiegend aus viralen Tegumentproteinen, die von einer Lipidmembran umhüllt sind, in die die viralen Glykoproteine eingelagert sind (Fiala et al., 1976). Das relative Verhältnis der drei Partikelformen zueinander scheint bei verschiedenen Virusstämmen unterschiedlich zu sein.

#### 1.1.4. Latenz und Reaktivierung

Als Folge der Primärinfektion persistiert HCMV lebenslang in dem befallenen Organismus. Dies ist ein wesentliches Charakteristikum aller Herpesviren. Während dieser Zeit bleibt das Virus in der Regel im Stadium der Latenz, d.h. es kann keine Virusproduktion nachgewiesen werden. Als Reaktion auf physiologischen Streß kann das Virus aus der Latenz reaktiviert werden. Neuere Studien deuten darauf hin, dass eine Reaktivierung in gesunden Personen ein häufiges Ereignis darstellt, das Streß-vermittelt auftritt und höchstwahrscheinlich durch den Tumor-Nekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ausgelöst wird (Toro & Ossa, 1996; Docke et al., 1994). Es sind auch Reinfektionen mit anderen HCMV-Stämmen möglich. Die Zellen, in denen das Virus persistiert, sind noch nicht ausreichend definiert, jedoch weisen eine Reihe von neuesten Untersuchungen darauf hin, dass Zellen des hämatopoetischen Systems, vor allem Vorläufer von dendritischen und myeloiden Zellen, eine zentrale Rolle als Latenzort spielen (Slobedman & Mocarski, 1999; Maciejewski & St.Jeor, 1999; Hahn et al., 1998). Auch Monozyten/Makrophagen fungieren als Latenzreservoir und dienen der Dissemination im Organismus. Darüber hinaus gilt eine Persistenz des Virus in Organen als gesichert (Bruggeman, 1993).

### **1.1.5. Epidemiologie und Transmission**

Die Epidemiologie des HCMV kann in zwei Gruppen untergliedert werden: die klassische Epidemiologie in der Normalbevölkerung und die spezifische Epidemiologie in Hochrisikogruppen (zusammengefaßt in Ho, 1991; Onorato et al., 1985). In der Normalbevölkerung treten HCMV-Infektionen in zwei Lebensabschnitten besonders häufig auf: in der frühen Kindheit bis zum sechsten Lebensjahr, wo die Transmission in der Regel von der Mutter auf das Kind erfolgt (prä-, peri- oder postnatal) und im frühen Erwachsenenalter (16-30 Jahre). Hier erfolgt die Transmission durch sexuelle Aktivität. Die endemischen Infektionsraten weisen ein geographisches Verteilungsmuster auf. Während z.B. die endemische Infektionsrate in Nordamerika und Europa im Durchschnitt bei 50% liegt, nähert sie sich in Japan und Teilen Südamerikas der Grenze von 100%. Die Mechanismen, die für diese Unterschiede verantwortlich sind, sind vielfältig, wobei enge soziale Kontakte eine große Rolle spielen. Darauf weist die Tatsache hin, dass innerhalb einer bestimmten geographischen Region große Unterschiede in der Durchseuchungsrate zwischen Angehörigen privilegierter sozialer Schichten und Angehörigen mit niedrigem sozioökonomischen Status bestehen.

Zu den Hochrisikogruppen für eine HCMV-Infektion zählen seronegative Schwangere, bei denen sich die Infektion bei den Neugeborenen manifestiert, Transplantatempfänger,

AIDS-Patienten, Personen mit angeborener Immundefizienz, Patienten, die unter immunsuppressiver Therapie stehen sowie Empfänger von kontaminierten Blutprodukten.

### **1.1.6. Pathologie und Pathogenese**

Die primäre Infektion mit HCMV verläuft bei älteren Kindern und Erwachsenen in der Regel entweder asymptomatisch oder unter dem Krankheitsbild der Mononukleose mit Fieber, Muskelschmerzen, Leberfunktionsstörungen und Lymphozytose. Der klinische Verlauf ist mild, nur in seltenen Fällen kommt es zu einer schwerwiegenden Erkrankung (Alford & Britt, 1990). Bei jüngeren Kindern kann es zu einer anikterischen Hepatitis mit Leber- und Milzvergrößerung kommen. In Ausnahmefällen tritt bei Kindern eine Beteiligung der Atemwege mit Bronchitis und Pneumonie auf; noch seltener sind aseptische Meningitis und immunologische Veränderungen. Neuere Studien verschiedener Arbeitsgruppen deuten darauf hin, dass HCMV zudem auch am Entstehen von entzündlich-proliferativen Gefäßerkrankungen beteiligt ist. (Hendrix et al., 1990; Melnick et al., 1994).

Während es bei immunkompetenten Personen in der Regel nicht zu gravierenden Symptomen kommt, stellt die Infektion mit HCMV bei Patienten mit geschwächtem Immunsystem eine bedeutsame Komplikation dar. Fast jedes Organ kann durch die Infektion beeinträchtigt werden. Die am häufigsten geschädigten Organsysteme sind Nieren, Leber, Atemwegsorgane, das Zentrale Nervensystem (ZNS) sowie der gastrointestinale Trakt (Ho, 1991). Die wichtigsten Hochrisikogruppen sollen im folgenden näher beleuchtet werden.

#### **Neugeborene**

Die Infektion mit HCMV gilt als die häufigste virale Infektion bei Neugeborenen. Die Inzidenz einer HCMV-Infektion während der Schwangerschaft liegt bei durchschnittlich 2% (Griffiths & Baboonian, 1984; Oronat et al., 1985; Boppana et al., 1999). Je niedriger der soziale Status, desto höher ist die Infektionsrate. Hauptüberträger sind infizierte Kinder mit subklinischem Krankheitsverlauf; Hauptrisikoorde sind Kindergärten und ähnliche Einrichtungen, in denen schwangere Frauen in engen Kontakt zu Kindern kommen.

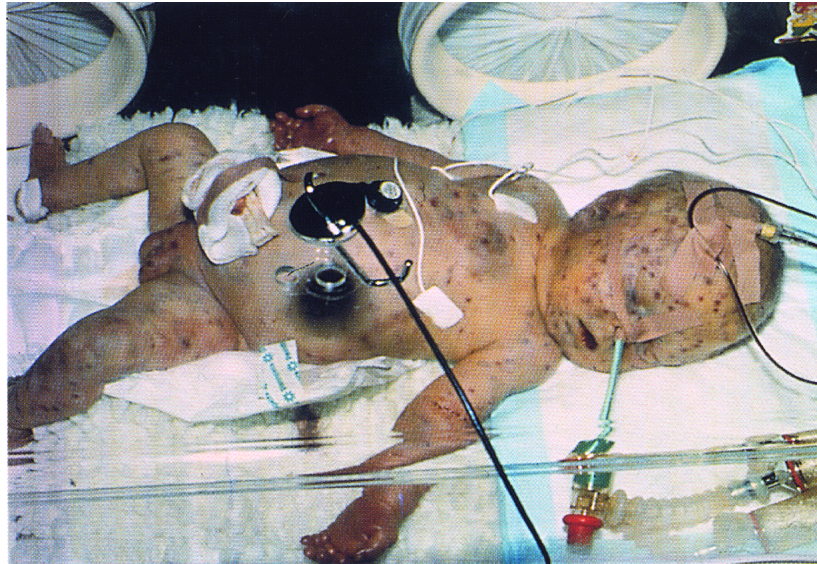
Obwohl in der Bevölkerung wenig über HCMV-Infektionen bekannt ist, sind sie genau so häufig die Ursache mentaler Retardierung wie beispielsweise Trisomie 21. Dies wird durch eine Studie aus Alabama belegt, aus der hervorgeht, dass jährlich bei über 9000 Kindern in Europa und über 8000 Kindern in den USA (das entspricht etwa 0,2 % der Geburten) die intrauterine CMV-Infektion Schäden hinterläßt. Dazu zählen sensorineuraler Hörverlust, geistige Retardierung, motorische Defizienzen und Chorioretinitis. Nur etwa 10% dieser Fälle sind bereits bei der Geburt augenscheinlich (Plotkin, 1999). Viele Schädigungen



treten erst mit zunehmendem Lebensalter auf. So entstehen z.B. bei 5-15% der infizierten Kinder erst nach mehreren Jahren Gehörschäden unterschiedlichen Grades (Fowler et al., 1999).

Bei der Infektion von Neugeborenen müssen grundsätzlich drei Zeitpunkte unterschieden werden: die intrauterine Infektion (pränatal), die Infektion während der Geburt (perinatal) und die Infektion nach der Geburt (postnatal). Je früher die Infektion erfolgt, umso höher scheint das Risiko einer Erkrankung zu sein. Bei prä- und perinatalen Infektionen hängen die klinischen Folgeerscheinungen in erster Linie von der Art der Infektion der Mutter ab. Bei einer Primärinfektion wird das Virus in 35-50% der Fälle auf den Fötus übertragen (Griffiths et al., 1984). Im Gegensatz dazu wurde die Übertragungsrate bei Sekundärinfektionen (Reaktivierung, Reinfektion) bisher mit 0,2-2,0% angegeben (Stagno et al., 1982). Neueste Untersuchungen zeigen allerdings, dass bei bestätigter Nicht-Primärinfektion der Mutter sogar 17% der untersuchten Kinder Symptome entwickelten (Boppana et al., 1999). Diese Werte liegen deutlich höher als bisher angenommen und werden von den Urhebern dieser Studie zum einen auf eine verbesserte Frühdiagnose, zum anderen auf Variationen der Virusisolate und Stamm-spezifische Unterschiede in der Immunantwort zurückgeführt.

Der Immunstatus der Mutter scheint also ein, wenn auch wichtiges, so nicht das einzige Kriterium für den Ausgang einer kongenitalen HCMV-Infektion zu sein. Welcher Mechanismus genau Protektion vermittelt, ist Gegenstand vieler aktueller Studien. Der Antikörpertiter der Mutter, die Virulenz des jeweiligen Virusstammes sowie die Viruslast der Infektion dürften aber von großer Bedeutung sein. Von den Fällen, in denen es zu einer HCMV-Infektion des Fötus kommt, entwickeln 8-10% der Babies eine klinische Symptomatik. Diese klassische "Cytomegalie" verläuft mit Hepatosplenomegalie, Ikterus, thrombozytopenischer Purpura, Mikrozephalie und zentralnervösen Störungen. Selten treten schwere generalisierte Krankheitsverläufe mit Mortalitätsraten von 11-20% auf (Boppana et al., 1992). Eine Studie an Frühgeborenen machte deutlich, dass der passive Transfer von HCMV-neutralisierenden Antikörpern eine Erkrankung verhindern kann (Snydman et al., 1995).



**Abb. 1.3.:** Kongenitale HCMV-Infektion eines Neugeborenen mit Hepatosplenomegalie und petechialen Blutungen (Quelle: Prof. G. Jahn, Tübingen).

### Transplantationspatienten

Die zweite Patientengruppe, die durch HCMV-Infektionen besonders gefährdet ist, sind Empfänger von soliden Organen und Knochenmark. Hier gilt generell, dass insbesondere Primärinfektionen zu schweren Erkrankungen führen. Reaktivierungen oder Reinfektionen sind ebenfalls von erheblicher klinischer Bedeutung. Die HCMV-Infektion wird häufig durch das Transplantat eines HCMV-seropositiven Spenders übertragen; gelegentlich kommt es auch im Rahmen der für die Behandlung notwendigen Transfusionen von Blut und Blutprodukten, wie beispielsweise Granulozytenkonzentraten, zur Primär- oder Reinfektion des Empfängers. Die Inzidenz einer symptomatischen HCMV-Infektion korreliert bei Transplantationspatienten stark mit dem Ausmaß der Immunsuppression (Rubin, 1990). Wie bei schwangeren Frauen moduliert auch bei den Transplantationspatienten eine bereits bestehende Immunität den Ausgang der Infektion.

Die Symptomatik umfaßt bei den Empfängern von soliden Organen ein breites Spektrum von Symptomen, wie Fieber, Leukopenie, Thrombozytopenie und Hepatitis. Fast jedes Organsystem kann von der Infektion betroffen sein. Lebensbedrohliche Zustände sind die Folge von schweren Infektionen des Magen-Darm-Traktes und der Atemwege (Interstitielle Pneumonie, Colitis, Gastritis). Darüber hinaus erhöht sich aufgrund der immunsupprimierenden Wirkung einer HCMV-Infektion das Auftreten von Superinfektionen mit Pilzen, Protozoen oder Bakterien. Neben akuten Infektionen, die bis Tag 100 nach Transplantation auftreten, wird HCMV in zunehmenden Maße mit chronischen Gefäßveränderungen assoziiert (Grattan et al., 1989).

Bei der allogenen Knochenmarkstransplantation (KMT) ist die durch HCMV ausgelöste interstitielle Pneumonie die schwerste Komplikation. Sie tritt 30-80 Tage nach

Transplantation auf und verläuft trotz Chemotherapie in 80-90% der Fälle tödlich (Bowden, 1991). In diesem Zusammenhang erscheint es interessant, dass die interstitielle Pneumonie häufig im Rahmen einer akuten Abstoßungsreaktion (*Graft versus Host* Erkrankung) auftritt. Inwieweit die HCMV-Infektion dabei selbst zur Transplantat-Abstoßung beiträgt, ist unklar. Darüber hinaus finden sich bei KMT-Patienten auch alle Symptome, wie sie bei den Empfängern von soliden Organen beschrieben wurden.

### **AIDS-Patienten**

Infektionen mit HCMV sind bei AIDS-Patienten sehr häufig. Bei fast allen ist im fortgeschrittenen Krankheitsstadium oder in Autopsiematerial HCMV nachweisbar. Es findet sich vor allem im Drüsengewebe, dem Gastrointestinaltrakt, im ZNS und im Auge (Klatt & Shibata, 1988). Retinitis ist die häufigste klinische Manifestation. Die weitgehende Immundefizienz dieser Patienten verursacht häufig die generalisierte Form der HCMV-Infektion. Aufgrund von Superinfektionen mit opportunistischen Erregern ist die pathogenetische Verknüpfung einer bestimmten Organmanifestation mit der HCMV-Infektion jedoch in der Regel schwierig. Es gibt Hinweise darauf, dass Infektionen mit HCMV das Fortschreiten von AIDS beschleunigen (Webster et al., 1989).

### **1.2. Immunologische Überwachung einer HCMV-Infektion**

Eine entscheidende Rolle für den Ausgang einer HCMV-Infektion spielt das Vorhandensein von Abwehrfunktionen. Dies kann durch verschiedene Beispiele belegt werden. So verringert z.B. der Ablauf einer natürlichen HCMV-Infektion in der Mutter vor der Empfängnis die Häufigkeit der Virustransmission auf den Fötus und, noch wichtiger, das Risiko für das Auftreten von Schädigungen beim Neugeborenen (Fowler et al., 1992; Stagno et al., 1986; Adler et al., 1995; Tanaka et al., 1991). Bei den Empfängern solider Organe korreliert die Abwesenheit HCMV-spezifischer Immunität in dramatischer Weise mit dem verstärkten Ausmaß klinischer Manifestationen. Ebenso erhöht sich die Mortalitätsrate nach Transplantation eines Organs von einem seropositiven Spender drastisch (Falagas et al., 1997; Falagas et al., 1998; Smyth et al., 1991; Rubin, 1990). Auch in der Post-Transplantationsphase ist eine HCMV-spezifische Immunantwort von großer Bedeutung. So konnte an Studien mit Patienten nach KMT gezeigt werden, dass die Rekonstitution einer MHC-Klasse I restringierten, HCMV-spezifischen zytotoxischen T-Zell-Antwort (CTL-Antwort) invers mit der Schwere der klinischen Manifestationen korreliert (Quinnan et al., 1982; Reusser et al., 1991; Reusser et al., 1999). Desgleichen bewirkt der adoptive

Transfer HCMV-spezifischer CTL bei KMT-Patienten einen deutlich verbesserten Schutz vor den Risiken einer Infektion (Riddell et al., 1992; Walter et al., 1995).

Erstaunlicherweise fungieren nur sehr wenige der über 200 HCMV-kodierten Proteine als Zielstrukturen für CTL. Nach bisherigem Erkenntnisstand werden MHC-Klasse I restringierte CTL-Epitope lediglich auf dem IE1-Protein, sowie auf den Genprodukten pp65, pp150 und gB erkannt. Bei den meisten Personen scheint das Tegumentprotein pp65 die Hauptzielstruktur HCMV-spezifischer CTL zu sein, es gibt aber auch Konstellationen, wo bevorzugt IE1 erkannt wird (Kern et al., 1999; Kern et al., 1998; Boppana & Britt, 1996; Wills et al., 1996; Weekes et al., 1999; Gavin et al., 1993; Riddell et al., 1991; McLaughlin-Taylor et al., 1994; Borysiewicz et al., 1988; Hopkins et al., 1996; Diamond et al., 1997; Alp et al., 1991). Von Riddell und Kollegen konnte gezeigt werden, dass die Tegumentproteine pp65 und pp150 als Virionbestandteile bereits unmittelbar nach Infektion prozessiert und auf der Zelloberfläche präsentiert werden. In der Folge werden diese Zellen unmittelbar nach Infektion und somit ohne *de novo*-Proteinsynthese von CTL lysiert (Riddell et al., 1991). Man bezeichnet dieses Phänomen, das auch für das murine Cytomegalovirus beschrieben wurde (Koszinowski et al., 1990), als "exogene Beladung" des MHC-Klasse I Präsentationsweges. Als weitere Besonderheit von pp65 wird diskutiert, dass dieses Protein selektiv die Antigenprozessierung und –präsentation des IE1-Genproduktes unterdrückt (Gilbert et al., 1996). Diese Strategie könnte dem Virus dazu dienen, der Immunkontrolle zu entkommen. Zudem wurde in einigen Studien eine Reduktion der Oberflächenexpression von MHC-Molekülen, die durch HCMV-Proteine ausgelöst wird, als weitere Immunevasionstrategie des HCMV beschrieben (Hengel et al., 1998; Tomazin et al., 1999; zusammengefaßt in Plachter, 1999). In Anbetracht der Tatsache, dass HCMV-Infektionen in immunkompetenten Personen in aller Regel asymptomatisch verlaufen, ist die Relevanz dieser Studien für die Situation *in vivo* jedoch umstritten; vielmehr scheint es sich um zelltypspezifische Sonderfälle zu handeln.

Eine effiziente Erkennung infizierter Zellen durch CD8+ CTL benötigt die Unterstützung durch CD4+ T-Helferzellen. Ein Zusammenspiel beider Arme des T-zellulären Immunsystems verbessert die Kontrolle einer HCMV-Infektion (Reusser et al., 1991; Walter et al., 1995). Als Induktoren einer T-Helferzellantwort gegen HCMV wurden die Proteine pp65, gB, gH, IE1, IE2 und pUL69 charakterisiert, wobei pp65 in allen untersuchten Spendern das dominante Antigen war (Beninga et al., 1995). Zudem konnte gezeigt werden, dass HCMV-infizierte Zellen bereits unmittelbar nach Infektion auch von Natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen) bekämpft werden (Borysiewicz et al., 1985). Die zentrale Bedeutung der zell-vermittelten Immunität für die Kontrolle einer HCMV-Infektion wird durch die Beobachtung bestärkt, dass Individuen mit Defizienzen der zellulären Immunabwehr das größte Risiko für eine symptomatische CMV-Erkrankung tragen.

Das humorale Immunsystem stellt eine zweite Ebene zum Schutz vor HCMV dar. Während die zelluläre Immunabwehr offensichtlich für die Genesung von einer HCMV-Infektion verantwortlich ist, scheint das humorale Immunsystem eine wichtige Rolle bei Sekundärinfektionen sowie bei der Begrenzung der Schwere der Erkrankung zu spielen. Darüber hinaus konnte im verwandten murinen Cytomegalovirus-Modell gezeigt werden, dass Antikörper die Virusausbreitung begrenzen und Schutz vor einer tödlichen Infektionsdosis vermitteln (Jonjic et al., 1994; Reddehase et al., 1994; Rapp et al., 1993). Die Zielantigene der humoralen Immunantwort sind Gegenstand zahlreicher Untersuchungen und scheinen eine ganze Reihe von Struktur- und Nichtstrukturproteinen zu umfassen (Landini et al., 1985). Die Phosphoproteine, insbesondere das basische Phosphoprotein pp150, wurden als die stärksten Immunogene für die humorale Immunantwort gegen HCMV identifiziert (Vornhagen et al., 1994; Landini et al., 1991; vanZanten et al., Kropff et al., 1993; 1995; Jahn et al., 1987). Antikörper gegen diese Polypeptide sind jedoch nicht neutralisierend und dürften somit nur wenig zur Begrenzung der Virusdissemination beitragen (Spaete et al., 1994). Als Zielstrukturen für neutralisierende Antikörper konnten die viralen Glykoproteine gB und gH charakterisiert werden (Britt & Mach, 1996; Liu et al., 1991; Meyer et al., 1990; Urban et al., 1996). Verschiedene Untersuchungen konnten zeigen, dass der größte Teil der neutralisierenden Aktivität gegen das Glykoprotein B (gB) gerichtet ist (Britt et al., 1990; Marshall et al., 1992; Gonczol et al., 1991). Auf diesem Protein konnten sowohl lineare als auch konformationsabhängige, stamm-spezifische sowie kreuzreaktive Epitope identifiziert werden (Speckner et al., 1999; Qadri et al., 1992).

Die Bedeutung neutralisierender Antikörper konnte in einer Studie an pädiatrischen Populationen gezeigt werden. Sie machte deutlich, dass ihr Vorhandensein mit dem Fehlen schwerer HCMV-bedingter Manifestationen korrelierte (Yaeger et al., 1981). Der passive Transfer neutralisierender Antikörper konnte das Erkrankungsrisiko bei frühreifen Neugeborenen und bei Empfängern solider Organe deutlich reduzieren (Falagas et al., 1997; Snyderman et al., 1995; Werner et al., 1993). Weiterhin schützt das Vorhandensein HCMV-spezifischer neutralisierender Antikörper vor dem Zeitpunkt der Empfängnis vor Virustransmission und dem Ausbruch schwerer HCMV-assoziiierter Krankheitsbilder (Fowler et al., 1992). Eine neuere Studie an KMT-Patienten bekräftigte, dass neutralisierende Antikörper auch in diesem Patientenkollektiv vor schweren Krankheitsbildern schützen (Schoppel et al., 1998).

In der Zusammenschau weisen die genannten Studien darauf hin, dass beide Arme des Immunsystems, also sowohl humorale als auch zelluläre Effektormechanismen, an einer effizienten Kontrolle einer HCMV-Infektion beteiligt sind.

### 1.3. Diagnose, Prophylaxe und Therapie einer HCMV-Infektion

Aufgrund der mannigfaltigen Manifestationen einer HCMV-Infektion ist eine Diagnose, die auf dem klinischen Erscheinungsbild basiert, in der Regel unmöglich. Darüber hinaus ergibt sich insbesondere bei akuter Infektion nach Organtransplantation und bei AIDS-Patienten eine signifikant bessere Prognose, wenn die antivirale Therapie bereits vor Auftreten der klinischen Symptomatik begonnen wird (Ljungman et al., 1992). Die Labordiagnostik für HCMV stützt sich zum einen auf den Nachweis von infektiösem Virus bzw. von viralen Antigenen oder viraler Nukleinsäure in Patientenmaterial, zum anderen auf die Untersuchung der spezifischen Antikörper-Antwort. Für den Nachweis HCMV-spezifischer Antikörper finden neben der konventionellen Komplement-Bindungsreaktion (KBR) und der indirekten Immunfluoreszenz (IF) vor allem Enzym-Immuno-Teste (ELISA) breite Anwendung (Plachter & Jahn, 1990). Die Standardmethode zum Virusnachweis ist nach wie vor die Isolierung von Virus aus Blut oder Urin in Fibroblasten-Zellkultur. In histologischen Präparaten ist die Infektion eines Organs mit HCMV an charakteristisch veränderten Zellen, sog. Eulenaugen-Zellen, zu erkennen. Zum Antigennachweis in peripheren Leukozyten werden HCMV-spezifische Antikörper verwendet. Mit diesem als Antigenämie-Test bezeichneten Verfahren (Grefte et al., 1992) läßt sich eine akute HCMV-Infektion wesentlich schneller als beispielsweise durch Virusanzucht nachweisen. Wesentliche Steigerungen in der Sensitivität des Nachweises erbringen neuere Verfahren wie die *in situ*-Hybridisierung und die Polymerase-Kettenreaktion (PCR).

Die HCMV-Infektion galt lange Zeit als Therapie-resistent, weil die verfügbaren Therapeutika zum Großteil ineffektiv waren. Die Einführung neuer Chemotherapeutika hat diese Situation entscheidend verbessert. Zur Zeit stehen Ganciclovir (GCV) und Foscarnet als etablierte Medikamente zur Verfügung; daneben gibt es auch neuere Entwicklungen wie Cidovofir. GCV (9-(1,3-Dihydroxy-2-Propoxymethyl)Guanin) ist ein Nukleosidanalogen. Es wird in der infizierten Zelle durch das virale Genprodukt UL97 in GCV-Monophosphat und von zellulären Kinasen in GCV-Triphosphat umgewandelt. Das GCV-Triphosphat wird in den wachsenden DNA-Strang eingebaut und führt somit zum Abbruch der DNA-Synthese. Foscarnet (Phosphonoformiat) ist ein nicht-kompetitiver Inhibitor der viralen DNA-Polymerase. Um ausreichend hohe Mengen im Plasma zu erreichen, müssen beide Präparate intravenös verabreicht werden. Zur Zeit werden Studien mit oral verabreichtem GCV, das erst kürzlich lizenziert wurde, durchgeführt (Noble & Faulds, 1998; Brown et al., 1999).

Aufgrund des Wirkungsmechanismus der beiden Therapeutika ist klar, dass nur replizierende Viren erfaßt werden. Latent persistierende Viren, die keine DNA-Synthese betreiben, werden nicht beeinträchtigt. Konsequenterweise kann das Virus durch diese

Präparate nicht aus dem Organismus eliminiert werden, so dass Reaktivierungsereignisse auch nach einer erfolgreichen Therapie möglich bleiben. Darüber hinaus sollte auch die Toxizität der Chemotherapeutika berücksichtigt werden. Jedoch scheint GCV nicht teratogen zu wirken (Pescovitz, 1999). Zu beachten ist, dass mit wachsender Behandlungsdauer das Auftreten von resistenten Virusstämmen steigt. Diese Varianten weisen Mutationen in den Genen für die DNA-Polymerase und/oder dem UL97 Protein auf (Smith et al., 1997; Faizi Khan et al., 1998; Zhou et al., 1999).

Neben der Therapie einer akuten Infektion wurde GCV auch prophylaktisch bei Transplantationspatienten eingesetzt (Goodrich et al., 1993; Stocchi et al., 1999). Obwohl das Auftreten HCMV-bedingter Komplikationen während der frühen Phase nach Transplantation deutlich gesenkt werden konnte, verbesserte sich die Lebenserwartung nicht signifikant. Alternative Prophylaxeansätze beinhalten die Verringerung des Infektionsrisikos, z.B. durch Verwendung von Leukozyten-depletierten Blutprodukten (Bowden et al., 1991) und den passiven Transfer von Immunglobulinen oder Hyperimmunglobulinen. Beide Behandlungsmethoden sind heutzutage Standard in allen Transplantationszentren. Eine aktive Immunprophylaxe gegen HCMV gibt es bislang nicht.

#### **1.4. Bisherige Ansätze zur Entwicklung eines Impfstoffes gegen HCMV**

Im Hinblick auf die Schwere der Erkrankung, die aus einer HCMV-Infektion in immunsupprimierten Personen (während der Schwangerschaft, Transplantationspatienten, AIDS-Patienten, Personen mit angeborener Immunschwäche etc.) hervorgehen kann, ist die Entwicklung einer wirksamen Vakzinierungsstrategie wünschenswert. Man schätzt, dass sich durch eine Vakzine-induzierte Immunität die Inzidenz der intrauterinen Transmission um den Faktor 40, das Auftreten von zentralnervösen Schädigungen um den Faktor 25-30 verringern würde (Britt, 1996).

Doch obwohl in den letzten Jahren erhebliche wissenschaftliche und wirtschaftliche Anstrengungen zur Entwicklung von Impfstoffen gegen Herpesviren unternommen wurden, konnte bisher nur eine einzige Herpesvirus-Vakzine, ein lebend-attenuierter Varizella-Impfstoff zur Anwendung in Risikokollektiven, lizenziert werden (Watson & Rothstein, 1999). Diese Impfstrategie analog gegen HCMV einzusetzen, nämlich lebend-attenuierte Cytomegaloviren als Impfstoff zu verwenden, wird seit den siebziger Jahren verfolgt. Elek und Stern verwendeten den Laborstamm Ad169 und immunisierten freiwillige Erwachsene (Elek & Stern, 1974). Die Impflinge entwickelten Antikörper und zeigten Lymphoproliferation. Die Persistenz der induzierten Immunität sowie die Wirksamkeit zur

Verhinderung einer Infektion wurde jedoch nie untersucht. Plotkin und Kollegen isolierten den Stamm *Towne* aus einem kongenital infizierten Kind, passagierten ihn auf humanen embryonalen Fibroblasten bis zur 125. Passage und testeten ihn an freiwilligen gesunden Erwachsenen (Plotkin et al., 1975; Plotkin & Huygelen, 1977; Plotkin et al., 1976; Just et al., 1975). Die *Towne*-Vakzine erwies sich als immunogen und gutverträglich. Sie führte zur Induktion neutralisierender Antikörper, zu einer anhaltenden lymphoproliferativen Antwort und zu HLA-restringierter Zytotoxizität ähnlich einer natürlichen Infektion. Die Stärke der Immunantwort war jedoch gegenüber der natürlichen Infektion reduziert (Starr et al., 1981).

Da insbesondere Nierentransplantat-Empfänger durch schwerwiegende HCMV-bedingte Komplikationen gefährdet sind, wurde getestet, ob die *Towne*-Vakzine in diesem Kollektiv eine Erkrankung verhindern kann. Zudem sollte die Sicherheit dieses Impfstammes bei immunkompromittierten Personen untersucht werden (Plotkin et al., 1984; Plotkin et al., 1990). Nach drei randomisierten, kontrollierten Doppelt-Blind-Studien ergab sich, dass die Impfung mit *Towne* eine HCMV-Infektion der Patienten nicht verhindern konnte, jedoch die Schwere der Erkrankung deutlich verringerte (Plotkin et al., 1991; Plotkin et al., 1994). Um zu überprüfen, ob die *Towne*-Vakzine zur Prävention einer kongenitalen HCMV-Infektion bei gesunden schwangeren Frauen eingesetzt werden kann, wurden gesunde Freiwillige, in diesem Falle Ordenspriester, geimpft. Als Belastungstest wurde ein Teil der Impflinge anschließend mit einem Wildisolat namens Toledo infiziert. Die *Towne*-Impfung konnte vor geringen Dosen des Belastungsvirus schützen. Nach Infektion mit höheren Dosen erkrankten die Impflinge jedoch ernsthaft. In einer zweiten, erst kürzlich durchgeführten Studie an jungen Müttern zeigte sich ebenfalls, dass sich die Infektionsrate geimpfter von nicht-geimpften Müttern nicht signifikant unterschied. Zusammengefasst zeigten diese Versuche, dass die *Towne*-Vakzine zu einer immunogenen, milden Infektion führte, aber die induzierte Immunität nicht den gleichen Schutz wie natürlich erworbene Immunität vermitteln konnte (Plotkin, 1999). Zudem ist die molekulare Grundlage der Virussattenuierung bislang unverstanden. Die Administration eines lebend-HCMV-Impfstoffes, z.B. an Frauen im gebärfähigen Alter, ist daher mit nicht abschätzbaren Risiken behaftet, weshalb die *Towne*-Vakzine bisher nicht lizenziert wurde.

Die Firma Aviron (Mountain View, USA) setzt auf einen genetischen Ansatz zur Entwicklung einer HCMV-Vakzine. Sie fand heraus, dass der Impfstamm *Towne* gegenüber dem Wildisolat Toledo eine Deletion von 13 kB aufweist. Diese Region kodiert für 19 Proteine. Hybride aus *Towne* und der 13 kB-Region sollen nun dahingehend untersucht werden, ob sie sich in Virulenz und Immunogenität von den Ausgangsstämmen unterscheiden (Mocarski & Kemble, 1996). Klinische Studien müssen zeigen, ob ein geeignetes Gleichgewicht zwischen Immunogenität und Sicherheit erreicht werden kann.



Neben diesen Ansätzen, die auf lebend-attenuierten Viren beruhen, wurden auch eine Reihe von Spaltvakzinen gegen HCMV getestet. Im Vordergrund steht dabei das Glykoprotein B (gB), gegen das mindestens 50% der neutralisierenden Antikörper im Serum natürlich infizierter Personen gerichtet sind. Wissenschaftler der Firma Chiron (Emeryville, CA, USA) inserierten gB stabil in Hamsterzellen (CHO), wobei die Transmembrandomäne sowie die proteolytische Schnittstelle am 3'Ende von gB deletiert wurden, um eine verstärkte Sekretion des Proteins in den Überstand zu gewährleisten. Aufgereinigtes gB wurde zusammen mit dem Öl-in-Wasser Adjuvans MF-59 intramuskulär an Freiwillige verabreicht. Nach drei Dosen á 30 µg zeigten die Impflinge hohe Titer an Antikörpern, die alle getesteten HCMV-Primärisolate neutralisieren konnten. Sechs Monate nach der letzten Dosis fielen die Antikörpertiter jedoch rapide ab (Pass et al., 1999). Von einem Kanarienvogel-Pockenvirus-Vektor exprimiertes gB (canarypox-gB) als Alternative induzierte nur geringe Antikörper-Titer. Deshalb wurde in einer weiteren Studie canarypox-gB als "Prime" verabreicht, gefolgt von der attenuierten *Towne*-Vakzine als "Boost" (Adler et al., 1999). Die Impflinge entwickelten relativ schnell hohe Titer an neutralisierenden Antikörpern, die länger nachweisbar blieben, als nach einer Impfung mit gB alleine. Jedoch konnte keine lymphoproliferative Antwort auf die *Towne*-Vakzine durch das *Priming* mit gB induziert werden. Da seit kurzem bekannt ist, dass canarypox-Rekombinanten auch zelluläre Immunität induzieren können (Wills et al., 1996), wurde ein canarypox-pp65 Konstrukt hergestellt. Das Phosphoprotein pp65 ist neben IE1 die Hauptzielstruktur HCMV-spezifischer CTL. Alle Impflinge, die das canarypox-pp65 Konstrukt erhielten, entwickelten eine starke CTL-Antwort gegen pp65, bildeten jedoch keine neutralisierenden Antikörper (Gyulai et al., 1999).

Ziel der HCMV-Impfstoff-Entwicklung ist es nun, die genannten Immunogene in einer Weise zu kombinieren, die bewirkt, dass sowohl das humorale als auch das zelluläre Immunsystem hinreichend stimuliert werden. Ob dies mit Hilfe einer DNA-Vakzine, die im Maussystem Protektion vermitteln konnte (Endresz et al., 1999; Pande et al., 1998), einem attenuierten Virus, einem virus-ähnlichem Partikel oder einer Spaltvakzine, eventuell im Sinne eines *Prime-Boost*-Verfahrens, gelingen wird, bleibt abzuwarten.

## 1.5. Zielsetzung der Arbeit

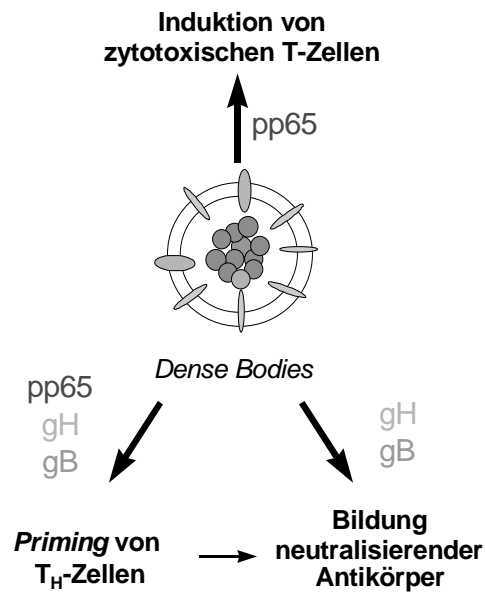
Bei allen bisher unternommenen Bestrebungen zur Entwicklung eines Impfstoffes gegen HCMV konnte protektive Immunität nicht in ausreichendem Maße induziert werden. Das Hauptproblem war, dass entweder nur der zelluläre oder nur der humorale Arm des

Immunsystems stimuliert werden konnte. Darüber hinaus hatten die Immuneffektorfunktionen nur über einen kurzen Zeitraum Bestand.

Die Verwendung von lebend-attenuierten Viren sowie von DNA-Vakzinen ist potentiell mit erheblichen Risiken behaftet. Dazu zählen die lebenslange Persistenz im befallenen Organismus, die Etablierung von Latenz, die Möglichkeit zur Reaktivierung aus diesem Stadium und das Auftreten von Insertionsmutagenesen. Diese Risiken müssen insbesondere bei den für eine HCMV-Impfung im Vordergrund stehenden Patientenkollektiven (junge Frauen, Transplantatempfänger, Patienten, die unter Immunsuppression stehen) stark berücksichtigt werden. Daher war es Inhalt dieser Doktorarbeit, ein mögliches Totantigen zur wirksamen Induktion HCMV-spezifischer Immunität zu identifizieren.

Zur Gewinnung dieses Totantigens sollte die Tatsache ausgenutzt werden, dass HCMV-infizierte Fibroblasten neben den infektiösen Virionen und den NIEPs eine weitere Form von nicht-infektiösen Partikeln freisetzen, die *Dense Bodies* (DB) (siehe 1.1.3.). Erstaunlicherweise sind die wenigen der über 200 HCMV-Proteine, die bislang als dominante Antigene zur Induktion von Immunität gegen HCMV charakterisiert wurden, abundante Bestandteile der DB. Dazu gehören die Glykoproteine gB und gH, auf denen wichtige Domänen zur Induktion neutralisierender Antikörper liegen, und das Tegumentprotein pp65, das als wichtigster Induktor der zytotoxischen und der Helfer-T-Zell-Antwort gilt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob die Kombination von humoralen und zellulären Antigenen in einem virusähnlichem Partikel (VLP), dem *Dense Body*, ein effektives Totantigen zur Induktion beider Arme des Immunsystems darstellt.

DB werden von humanen Fibroblasten genauso effizient aufgenommen wie Virionen (Schmolke et al., 1995 a). Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es daher zu prüfen, ob diese Eigenschaft auch für andere Zelltypen zutrifft und ob die zelluläre Aufnahme des Antigens gegebenenfalls die Ausprägung der resultierenden Immunantwort beeinflusst. Um den Einfluß der zellulären Aufnahme auf die Immunogenität der Partikel analysieren zu können, sollte eine DB-Fraktion in einer Weise behandelt werden, die keine Aufnahme in die Zelle mehr erlaubt. Beide Präparationen sollten dann vergleichend in einem Kleintiermodell auf ihr immunogenes Potential hin untersucht werden. Dabei sollte sowohl die Induktion von zellulären als auch von humoralen Immuneffektormechanismen detailliert betrachtet werden.



**Abb. 1.4.:** Konzeptionelle Überlegungen zur Immunogenität von *Dense Bodies* (DB). Die Abbildung zeigt die Lokalisation der dominanten Antigene zur Induktion der jeweiligen Arme des Immunsystems im *Dense Body*-Partikel. Durch Immunisierung mit DB sollte demnach sowohl die Bildung von HCMV-neutralisierenden Antikörpern stimuliert, als auch eine Aktivierung von HCMV-spezifischen T-Helfer- und zytotoxischen T-Zellen induziert werden. Die Überprüfung dieser Hypothese war Inhalt der vorliegenden Arbeit.

In einem zweiten Teil der Arbeit sollten Genomregionen des HCMV dahingehend analysiert werden, ob sie für die Replikation entbehrlich sind und somit als Insertionsstelle für Fremdsequenzen dienen können. Ausgangspunkt dieser Überlegungen war die Hypothese, dass die natürlicherweise entstehenden DB eventuell rekombinant verändert werden müssen, um ihre Immunogenität zu verbessern. Da rekombinante DB nur durch Herstellung rekombinanter Viren generiert werden können und aufgrund der Tatsache, dass das HCMV-Genom nur in sehr geringem Umfang Änderungen der Genomgröße toleriert, ist es wichtig, Genombereiche zu identifizieren, die deletiert werden können, um Platz für die Insertion von Fremdanteilen zu schaffen. Es wurden zwei Genombereiche ausgewählt, die dahingehend charakterisiert werden sollten, ob sie für die Replikation des Virus sowie für die Ausbildung und Freisetzung von DB entbehrlich sind: Der Leserahmen UL32, der für das pp150-Protein kodiert, sowie die sog. 5kB-Region, die für das IE4-Transkript kodiert.

## 2. Material und Methoden

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Routinemethoden wurden Standardprotokollen entnommen. So stammen molekularbiologische Methoden aus "Molecular Cloning - A Laboratory Manual" (Sambrook et al., 1989) und immunologische Methoden aus "Current Protocols in Immunology" (Coligan et al., 1994). Zentrifugationsschritte ohne Rotorangabe beziehen sich bei molekularbiologischen Arbeiten auf eine Tischzentrifuge 5417 (Eppendorf, Hamburg), bei zellbiologischen Methoden auf eine Megafuge 2.0 (Heraeus, Hanau). Alle verwendeten Rotoren von Hochgeschwindigkeits- und Ultrazentrifugen stammen von der Firma Sorvall, Bad Homburg. Soweit keine Reaktionstemperatur spezifiziert wurde, handelte es sich um Arbeiten bei Raumtemperatur.

### 2.1. Bakterien und ihre Kultivierung

#### 2.1.1. Bakterienstämme

***E. coli* DH5  $\alpha$ :** F<sup>'</sup>endA1 hsdR17A( $r_k^- m_k^+$ ) supE44 thi-1 recA1 gyrA (Nal)<sup>r</sup> relA1  $\Delta$ (lacZYA-argF)U169 deoR ( $\Delta$ 80dlac $\Delta$ (lacZ)M15); (Gibco BRL; Eggenstein).

***E. coli* TG1:** F<sup>'</sup>traD36  $\Delta$ (lacZ)M15 pro A+B+ / supE  $\Delta$ (hsdM-mcrB)5(rk-mk-MdrB<sup>-</sup>) thi  $\Delta$ (lac - proAB).

#### 2.1.2. Medien und Lösungen für die Bakterienkultivierung

**LB-Medium:** für 1L: 10g Bacto-Trypton; 5g Hefe-Extrakt; 5g NaCl; pH-Wert auf 7,5 einstellen und autoklavieren.

**LB-Selektionsmedium:** LB-Medium mit 75 $\mu$ g/ml Ampicillin, bzw. 34 $\mu$ g/ml Chloramphenicol.

**LB-Agarplatten:** LB-Medium mit 1,5% (w/v) Agar, 100 $\mu$ g/ml Ampicillin, bzw. 34 $\mu$ g/ml Chloramphenicol.

**Ampicillin:** 1000x Stammlösung: 75mg/ml sterilfiltriert, Lagerung bei -20°C. Die Zugabe des Ampicillins erfolgt erst nach dem Autoklavieren des Mediums.

**Chloramphenicol:** 1000x Stammlösung: 34mg/ml Ethanol sterilfiltriert, Lagerung bei -20°C. Die Zugabe des Chloramphenicols erfolgt erst nach dem Autoklavieren des Mediums.

**Einfriermedium:** LB-Medium mit 30% Glycerin.

### 2.1.3. Kultivierung und Kryokonservierung von Bakterien

#### Flüssigkulturen

Steriles LB-Medium wurde mit einer Einzelkolonie angeimpft und gegebenenfalls in Gegenwart eines entsprechenden Antibiotikums über Nacht bei 37 °C in einem Inkubationsschüttler bei 180 upm inkubiert. Die Bestimmung der Bakterien-Konzentration erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm gegen das Kulturmedium ( $1 \text{ OD}_{600} = 8 \times 10^8 \text{ Bakterien/ml}$ ).

#### Plattenkulturen

Mit einer sterilen Impföse wurden von einer einzelnen Bakterienkolonie, aus einer Flüssigkultur oder einer Glycerinkultur Bakterien aufgenommen und auf einer LB-Agarplatte so ausgestrichen, dass nach Inkubation bei 37°C über Nacht Einzelkolonien isoliert werden konnten. Dem LB-Medium wurde je nach Bakterienstamm und transformiertem Vektor nach Autoklavieren und Abkühlen auf etwa 55 °C eine sterilfiltrierte Lösung des entsprechenden Antibiotikums zugesetzt.

#### Glycerinkulturen

Die Bakterien einer LB-Flüssigkultur wurden kurz vor Erreichen der stationären Phase mit 30 % sterilem Glycerin versetzt und gut gemischt. Die so erhaltenen Kulturen sind bei -80 °C nahezu unbegrenzt haltbar.

### 2.1.4. Kompetenzinduktion

Reagenzien:

Puffer A: 30 mM KAc, 50 mM  $\text{MnCl}_2$ , 100 mM KCl, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 15 % Glycerin.

Puffer B: 10 mM MOPS pH 7,0, 75 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM KCl, 15 % Glycerin.

Zur Herstellung transformationskompetenter Bakterien wurde die Calciumchlorid-Methode verwendet. Dazu wurden 20 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie des gewünschten Bakterienstammes angeimpft und bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte ( $\text{OD}_{600}$ ) von 0,5 kultiviert. Danach wurde die Bakterienkultur durch Zugabe von vorgewärmtem LB-Medium auf 100 ml verdünnt und unter Schütteln bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,7 inkubiert. Nach einem weiteren Verdünnungsschritt auf ein Endvolumen von insgesamt 500 ml wurden die Bakterien weiter kultiviert und bei Erreichen einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,4 durch eine 15-minütige Zentrifugation bei 4.000 upm und 4 °C geerntet. Im Folgenden wurde stets zügig und auf Eis gearbeitet. Die Bakterien wurden in insgesamt 100 ml Puffer A resuspendiert und danach 8 Min. bei 4.000 upm und 4 °C abzentrifugiert. Schließlich wurden sie in insgesamt 20 ml eiskaltem Puffer B aufgenommen. Die nunmehr kompetenten Bakterien wurden in

200 µl Portionen in Eppendorf Reaktionsgefäße abgefüllt, durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C aufbewahrt.

### 2.1.5. Transformation kompetenter *E. coli*

Die Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli* erfolgte nach der "Hitzeschock-Methode". Dazu wurden ca. 10 ng des zu transformierenden Plasmids bzw. etwa die Hälfte eines Ligationsansatzes in einem Reaktionsgefäß vorgelegt und mit 200 µl der auf Eis aufgetauten kompetenten Bakterien vermischt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte der sogenannte Hitzeschock für 2 Min. bei 42 °C im Heizblock. Danach wurden die Bakterien 5 Min. auf Eis abgekühlt und anschließend mit ca. 800 µl LB-Medium versetzt und 1,5 Std. bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. In dieser Zeit wird die Antibiotikaresistenz des transformierten Plasmids exprimiert. Schließlich wurden unterschiedliche Mengen der Bakteriensuspension auf geeignete Selektionsplatten ausplattiert. Diese wurden über Nacht bei 37 °C bebrütet.

## 2.2. Viren

**Ad169:** Soweit nicht anders beschrieben, wurde für alle Zellkulturarbeiten, insbesondere zur Präparation von *Dense Bodies*, der HCMV-Laborstamm Ad169 (ATCC VR-538) verwendet, der ursprünglich 1956 von Rowe isoliert wurde. Ausgehend von diesem Virusstamm wurde das gesamte HCMV-Genom sequenziert (Chee et al., 1990).

**RVAd65:** pp65-Deletionsmutante des HCMV Stammes Ad169 (Schmolke et al., 1995 b).

**RVAdIE4:** Im Zuge dieser Arbeit hergestellte IE4-Deletionsmutante des HCMV Stammes Ad169.

**RVAd150:** Im Zuge dieser Arbeit hergestellte pp150-Deletionsmutante des HCMV Stammes Ad169, die jedoch nicht wildtyp-frei isoliert werden konnte.

**MCMV:** Für Infektionsexperimente mit mCMV wurde der Laborstamm Smith (ATCC VR-194) verwendet.

## 2.3. Säugorzellen und ihre Kultivierung

### 2.3.1. Adhärenente Zellen

**HFF:** Primäre humane Vorhautfibroblasten

Zur Gewinnung der HFF wurden die nach operativen Eingriffen zur Verfügung gestellten Vorhäute von Neugeborenen oder Kleinkindern mechanisch zerkleinert. Die Zellen wurden aus dem Gewebeverband gelöst, indem sie 30 Min. bei 37°C in einem sterilen Gefäß mit 50 ml 0,5% Trypsin/0,2% EDTA und Glasperlen gerührt wurden. Anschließend wurden sie durch steriles Mull filtriert, mehrmals gewaschen und in MEM-5 in Zellkulturflaschen ausgesät. Die Zellen wurden zwischen Passage 6 und 16 für Experimente verwendet.

Kulturmedium: MEM-5 (MEM supplementiert mit 5% (v/v) FKS, 100mg/l L-Glutamin, 50 mg/l Gentamycin).

#### **HFF-pp150**

HFF-pp150 sind im Zuge dieser Arbeit hergestellte Abkömmlinge von HFF, in die das pp150-Gen (UL32) des HCMV stabil integriert wurde. Dazu wurden die Plasmide pp150-RSV bzw. pcDNA6-pp150 zusammen mit pRG273 kotransfiziert und mit Hilfe des Antibiotikums Puromycin auf Transfektanten selektioniert.

Kulturmedium: MEM-5 (MEM supplementiert mit 5% (v/v) FKS, 100mg/l L-Glutamin, 50 mg/l Gentamycin).

**U373-MG:** Humane Glioblastom-Zelllinie (ATCC HTB 17)

U373-MG ist eine immortalisierte Zellkulturlinie, die für HCMV permissiv ist. Die Replikation von HCMV ist in diesen Zellen im Vergleich zu HFF deutlich erniedrigt; der Replikationszyklus dauert länger. Die Morphologie der Zellen ist vielfältig.

Kulturmedium: DMEM-10 (DMEM supplementiert mit 10% (v/v) FKS, 100mg/l L-Glutamin, 50 mg/l Gentamycin).

#### **U373-MIEP, U373-UL112/113, U373-UL97:**

Stabile Transfektanten von U373-MG, in die stabil das Luciferase-Reporter gen integriert wurde, welches unter der Kontrolle des MIE-, des UL112/113- oder des UL97-Promotors steht.

Kulturmedium: DMEM-10 (DMEM supplementiert mit 10% (v/v) FKS, 100mg/l L-Glutamin, 50 mg/l Gentamycin).

**Balb/c-3T3:** Murine embryonale Fibroblastenlinie (ATCC CCL-163)

Balb/c-3T3 sind durch Transformation mit SV40 immortalisierte murine Fibroblasten mit ausgeprägter Kontaktinhibition.

Kulturmedium: DMEM-5 (DMEM supplementiert mit 5% (v/v) FKS, 100mg/l L-Glutamin, 50 mg/l Gentamycin).

**MEF:** Murine embryofetale Fibroblasten

Zur Präparation von MEF wurden die Föten einer Balb/c Maus am Tag 17 der Tragezeit entnommen und nach Entfernen der inneren Organe und der Augenanlagen mit einem Skalpell fein zerkleinert. Nach mehreren Waschschritten in PBS zur Entfernung der Erythrozyten wurde der Gewebepulver 30 Min. bei 37°C in einer Lösung aus 0,5% Trypsin/0,2% EDTA und Glasperlen gerührt, um die Zellen aus dem Gewebeverband zu lösen. Anschließend wurden die Zellen durch steriles Mull filtriert, mehrmals gewaschen und in MEM-10 in Zellkulturflaschen ausgesät. Am folgenden Tag wurde das Medium gewechselt, um noch verbliebene Erythrozyten zu entfernen. Nach 2-4 Tagen wurden die Zellen entweder eingefroren oder durch Teilen (1:4) in die 2. Passage überführt. Die Zellen wurden nur in der 2. oder 3. Passage verwendet, um vergleichbare Bedingungen für Infektions- und Inkubationsexperimente zu gewährleisten.

Kulturmedium: MEM-5 (MEM supplementiert mit 5% (v/v) FKS, 100mg/l L-Glutamin, 50 mg/l Gentamycin).

**2.3.2. Suspensionszellen****P815:** Murine Mastozytom-Zelllinie (ATCC TIB-64)

Diese NK-Zell-resistente Zelllinie stammt aus einem DBA/2-Tumor und wurde als Zielzelle im Zytolysetest eingesetzt. P815-Zellen exprimieren den Fc-Rezeptor und können daher mit Antikörpern beladen werden. Die durch P815 erfaßbare Lyse ist Perforin-vermittelt. P815-Zellen besitzen den Haplotyp H-2<sup>d</sup> und sind MHC-Klasse-II-negativ.

Kulturmedium: RPMI-5: (RPMI 1640 supplementiert mit 5% (v/v) FKS, 2 mM L-Glutamin, 100U/ml Penicillin, 0,1mg/ml Streptomycin, 5x10<sup>-5</sup> M 2-Mercaptoethanol, 10mM HEPES).

**T2-A2.kB:** Transfektante der Zelllinie T2 (ATCC CRL-1992)

T2-A2.kB sind Abkömmlinge der Zelllinie T2, in die das Gen für das chimäre MHC-Molekül A2.kB stabil integriert wurde. T2-Zellen sind Hybride aus humanen B- und T-Lymphoblasten und sind HLA-A2 positiv.



Kulturmedium: RPMI-10-G: (RPMI 1640 supplementiert mit 10% (v/v) FKS, 2 mM L-Glutamin, 50 mg/l Gentamycin,  $5 \times 10^{-5}$  M 2-Mercaptoethanol, 10mM Hepes, 280 µg/ml G418).

**JA2.kB**: Transfektante der Zelllinie Jurkat (ATCC TIB-152)

JA2.kB sind Abkömmlinge der Zelllinie Jurkat, in die das Gen für das chimäre MHC-Molekül A2.kB stabil integriert wurde. Jurkat-Zellen sind humane T-Lymphozyten.

Kulturmedium: RPMI-10-G: (RPMI 1640 supplementiert mit 10% (v/v) FKS, 2 mM L-Glutamin, 50 mg/l Gentamycin,  $5 \times 10^{-5}$  M 2-Mercaptoethanol, 10mM Hepes, 280 µg/ml G418).

### 2.3.3. Kulturmedien, Puffer und Lösungen für die Zellkultur

Alle Zellkulturmedien und Seren wurden von der Firma Gibco BRL (Eggenstein) bezogen, alle Medienzusätze, soweit nicht anders angegeben, von der Firma Sigma (Deisenhofen).

#### Medien:

DMEM-5/10 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) no. 41965-039, 2mM L-Glutamin, 100U/ml Penicillin, 0,1mg/ml Streptomycin, 5% (v/v) bzw. 10% (v/v) FCS.

MEM-5/10 (*Minimum Essential Medium*) no. 21090-022, 2mM L-Glutamin, 100U/ml Penicillin, 0,1mg/ml Streptomycin, 5% (v/v) bzw. 10% (v/v) FCS.

MEM 10x (*Minimum Essential Medium*) no. 21435-029.

MEM-α (*Minimum Essential Alpha Medium*) no. 22561-021, 2mM L-Glutamin, 100U/ml Penicillin, 0,1mg/ml Streptomycin, 10% (v/v) FCS,  $5 \times 10^{-5}$  M 2-Mercaptoethanol, 10mM Hepes.

RPMI (RPMI 1640 Medium) no. 31870-025, 2mM L-Glutamin, 100U/ml Penicillin, 0,1mg/ml Streptomycin, 5% (v/v) FCS,  $5 \times 10^{-5}$  M 2-Mercaptoethanol, 10mM Hepes.

Einfriermedium: 90% (v/v) FCS, 10% (v/v) DMSO (Dimethylsulfoxid).

#### Puffer und Lösungen:

PBS-Puffer Dulbecco (*Phosphate Buffered Saline*):

136mM NaCl, 26mM KCl, 8mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ , 1,5mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

Trypanblau: 0,4% in 85%iger Kochsalzlösung

Trypsin: 2,5 g/l (1:250)

Trypsin/EDTA: 0,5 g/l Trypsin, 0,2 g/l EDTA

**Antibiotika:**

Antibiotikum	Antibiotisches Spektrum	Stammlösung	Endkonzentration	Stabilität bei 37°C
Amphotericin B	Pilze, Mykoplasmen	1,4 mg/ml in H <sub>2</sub> O (100x)	1,4 µg/ml	4 Tage
BM Cyclin (Roche, Mannheim)	Bakterien, insbesondere Mykoplasmen	Je 250x	10 µg/ml Cyclin 1 (Pleuromutilin- Derivat) 5 µg/ml Cyclin 2 (Tetrazyklin-Derivat)	7 Tage
Geneticin (G418)	Bakterien, Hefen, Pflanzen, Protozoen, Helminthen, Säugerzellen	50 mg/ml	50 – 250 µg/ml	7 Tage
Gentamycin	Bakterien	50 mg/ml	0,5 – 50 µg/ml	stabil
Puromycin	Säugerzellen	50 mg/ml in H <sub>2</sub> O	1-2 µg/ml	unbekannt

**2.4. Zellkulturverfahren****2.4.1. Kultivierung von Suspensionszellen und adhärent wachsenden Zellen**

Die Kultivierung aller Zellen erfolgte in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator (Forma) bei 37°C, einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5% und 95% relativer Luftfeuchtigkeit. Diese Bedingungen gewährleisteten die Aufrechterhaltung des physiologischen pH-Wertes der CO<sub>2</sub>/Bicarbonat-gepufferten Medien.

Zentrifugationsschritte wurden für alle Zellen je nach Anwendung 5-10 Min. bei 200-250 x g (entspricht 1000-1200 upm in einer Heraeus Laborzentrifuge mit Ausschwingrotor) durchgeführt. Dazu wurden die üblichen 15ml- oder 50 ml *Falcon*-Röhrchen (*Falcon*) verwendet.

Alle Zellen wurden in dem für sie optimalen Kulturmedium kultiviert (siehe 2.2.).

Adhärent wachsende Zellen wurden gesplittet, sobald ein konfluenter Zellrasen vorlag. Dazu wurden sie mit PBS gewaschen, mit Trypsin-EDTA-Lösung bzw. Trypsin von der

Unterlage abgelöst und in Verhältnissen von 1:2 bis 1:4 (HFF, MEF, 3T3) bzw 1:3 bis 1:10 (U373-MG) auf neue Kulturflaschen ausgesät.

Suspensionszellen wurden je nach Zellteilungsrate, die am Farbumschlag des Mediums von rot nach gelb zu erkennen war, gesplittet und in Verhältnissen von 1:5 bis 1:12 (P815), 1:20 bis 1:40 (JA2.kB) bzw 1:30 bis 1:60 (T2-A2.kB) auf neue Kulturflaschen ausgesät.

#### **2.4.2. Kryokonservierung und Reaktivierung von Zellen**

Zum Einfrieren wurden sich logarithmisch teilende Zellen gründlich resuspendiert, 10 Min. bei 200 x g abzentrifugiert und je einmal in dem entsprechenden Kulturmedium gewaschen. Danach wurden je  $1-5 \times 10^6$  Zellen in vorgekühltem Einfriermedium resuspendiert. Die Zellen wurden in 1,8 ml Portionen aliquotiert und sofort für mindestens fünf Stunden in einem Styropor-Gefäß auf  $-70 \text{ }^\circ\text{C}$  gekühlt. Dies stellt eine optimale Einfrierrate von  $1-2 \text{ }^\circ\text{C}/\text{Min.}$  sicher. Danach wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Die gelagerten Zellkulturen wurden zur Reaktivierung zügig bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  im Wasserbad aufgetaut, mit vorgewärmtem Medium versetzt, kurz abzentrifugiert und vorsichtig in Kulturmedium resuspendiert. Ein rasches Auftauen verhinderte die zytotoxische Wirkung von DMSO, das dem Einfriermedium zugesetzt worden war. Die erhaltene Zellsuspension wurde anschließend in  $25 \text{ cm}^2$  Flaschen ausgesät und bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Bei adhärent wachsenden Zelllinien setzen sich die noch lebensfähigen Zellen nach 2 bis 4-stündiger Inkubation auf dem Boden der Kulturflasche ab. Danach wurde das Kulturmedium vollständig abgenommen und durch frisches, vorgewärmtes Medium ersetzt.

#### **2.4.3. Bestimmung von Zellzahl und Zellvitalität**

Der Vitalfarbstoff Trypanblau ermöglicht es, tote Zellen, die durch sofortiges Eindringen des Farbstoffes durch die Zellmembran blau gefärbt sind, leicht von noch lebenden, transparenten Zellen zu unterscheiden. Zur Bestimmung der Zellzahl vitaler Zellen wurden  $100 \text{ }\mu\text{l}$  einer gründlich resuspendierten Zellkultur mit der gleichen Menge einer 0,4 %-igen Trypanblau-Lösung vermischt und in eine Neubauer-Zählkammer überführt. Zur Minimierung des Zählfehlers sollten mindestens zwei Großquadrate ausgezählt werden. Die Berechnung der Zellzahl/ml ergab sich nach der Formel:  $N/n \times V \times 10^4$  (mit N= Zahl der gezählten Zellen; n= Zahl der ausgezählten Großquadrate; V= Verdünnungsfaktor;  $10^4$  Kammerfaktor).

#### 2.4.4. Transfektion eukaryonter Zellen

##### Calcium-Phosphat-Methode

Reagenzien:

2xBBS (2xBES-gepufferte Lösung (2x *BES-Buffered Solution*)):

50mM *N,N*-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure, 280mM NaCl,  
1,5mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 6,95; sterilfiltriert.

2,5 M CaCl<sub>2</sub>-Stocklösung; sterilfiltriert.

Mit Hilfe der Calcium-Phosphat-Transfektion kann sowohl virale als auch Plasmid-DNA in adhärent wachsende Zellen eingebracht werden. DNA bildet mit Calciumphosphat ein Präzipitat, das an die Zelloberfläche bindet und in der Folge von der Zelle aufgenommen wird. Die DNA kann linear oder zirkulär vorliegen. Die Methode eignet sich sowohl für transiente Transfektionen als auch zur Herstellung stabiler Transfektanten. Dazu wurden die Zellen am Vortag auf 10 cm Schalen gesplittet (ca.  $5 \times 10^5$  Zellen), um ihre Oberfläche zu vergrößern und die S-Phase des Zellzyklus zu induzieren. Zwei bis vier Stunden vor der Transfektion wurden die Zellen mit 9 ml frischem Medium versorgt. Zur Ausbildung des Präzipitates wurden 500 µl 0,25M CaCl<sub>2</sub> mit 20-30 µg DNA, sowie 500 µl 2xBBS vorsichtig gemischt und 10 bis 20 min bei RT inkubiert. Danach wurde das Präzipitat tropfenweise auf die Zellen gegeben und die Platte für 15-24 Std. in einer Atmosphäre von 3% CO<sub>2</sub> und 35°C inkubiert, um einen pH-Wert von 7,2 bis 7,4 zu gewährleisten. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, mit 10 ml Komplettmedium versorgt und unter normalen Inkubationsbedingungen weiterkultiviert. Die Analyse transienter Transfektionsansätze erfolgte 24-72 Std. nach Transfektion; zur Generierung stabiler Transfektanten wurden die Zellen nach Erreichen von Konfluenz in das entsprechende Selektionsmedium ausgesät und auswachsende Kolonien auf die Expression des Fremdgens hin überprüft.

##### Fugene-Methode

Das nicht-liposomale Transfektionsreagenz Fugene<sup>TM</sup>6 (Roche, Mannheim) ermöglicht sehr hohe Transfektionsraten von HFF bei gleichzeitig sehr niedriger Zytotoxizität. Das verwendete Protokoll entspricht weitgehend den Herstellerangaben. 3-6 µl Fugene wurden mit serumfreiem Medium auf 100 µl gebracht und 5 Min. bei RT inkubiert (Fugene darf nicht mit der Wand eines Eppendorf-Gefäßes in Berührung kommen, da die enthaltenen Lösungsmittel Weichmacher aus dem Plastik lösen, die die Transfektion hemmen). In einem zweiten Gefäß wurden 2-4 µg DNA (Konzentration: 0,5 - 1µg/µl) vorgelegt und mit serumfreiem Medium auf 10 µl aufgefüllt. Die Fugene-Lösung wurde zugegeben und das Gemisch weitere 15 Min. bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die am Vortag in

einer Dichte von  $1 \times 10^5$  Zellen/ 3cm Schale ausgesäten Zellen mit 0,9 ml serumhaltigem Medium versorgt und schließlich die DNA-Komplexe vorsichtig zugetropft. Nach 3-8 stündiger Inkubation im Brutschrank wurde das Medium gewechselt; das weitere Vorgehen entsprach der Calcium-Phosphat-Methode.

#### **2.4.5. Infektion eukaryonter Zellen mit HCMV**

Zur Infektion mit HCMV wurde von subkonfluent wachsenden HFF das Medium abgezogen und virushaltiger Überstand oder gereinigtes Virus in kleinem Volumen zugegeben (*m.o.i.*=1 bis 10). Nach einstündiger Inkubation bei 37°C zur Virus-Zell-Adsorption wurde ausreichend Wachstumsmedium zugegeben. Nach 1 bis 2 Tagen war ein beginnender zytopathogener Effekt zu beobachten, nach 7 bis 8 Tagen waren die Zellen komplett lysiert.

#### **2.4.6. Virus- und *Dense Body*-Reinigung aus Zellkultur-Überstand**

Reagenzien:

- 0,04M Na-Phosphatpuffer: 1,1g Na-Dihydrogenphosphat-Monohydrat  
5,7 g Na-Hydrogenphosphat-Dihydrat auf 1 l H<sub>2</sub>O, pH 7,4.
- 35% Na-Tartrat: 207,5g Na-Tartrat in 325 ml 0,04M Na-Phosphatpuffer;  
autoklaviert.
- 15% Na-Tartrat/30% Glycerin: 88,9 g Na-Tartrat, 150 ml Glycerin, 275 ml 0,04M Na-  
Phosphatpuffer; autoklaviert.

Die verschiedenen, in Zellkultur gebildeten HCMV-Partikel (Virionen, *Dense Bodies* und NIEPs) wurden aus dem Zellkulturüberstand unter Verwendung eines positiven Dichte-/negativen Viskositäts-Gradienten-Systems aufgereinigt (Talbot & Almeida, 1977; Irmieri & Gibson, 1983). Dazu wurde der Überstand infizierter HFF nach Erreichen eines CPE von 90-100% zunächst 10 Min. bei 300x g abzentrifugiert, um Zellen und Zelltrümmer abzutrennen. Der klare Überstand wurde im SW28 Rotor 70 Min. bei 23000 upm und 4°C pelletiert und das Viruspellet jedes Röhrchens in 1 ml 0,04M Na-Phosphatpuffer (pH 7,4) resuspendiert. Je 2ml dieser Suspension wurden auf einen Gradienten, der aus 4 ml 35% Na-Tartrat und 5ml 15% Na-Tartrat/30% Glycerin aufgebaut wurde, geschichtet. Die Auftrennung der verschiedenen Partikel entsprechend ihrer Dichte erfolgte durch Ultrazentrifugation für 60 Min. bei 23000 upm und 10°C ohne Bremse. Nach diesem Zentrifugationsschritt war im Durchlicht ein distinktes Bandenmuster zu erkennen: eine breite Bande von *Dense Bodies*, darüber eine dünne, scharfe Bande von Virionen und

darüber nochmals eine dünne Bande von NIEPs. Diese Banden wurden unter Durchlicht mit Kanülen abgezogen und wie oben beschrieben abzentrifugiert. Die Pellets wurden in PBS gelöst und bei -70°C gelagert.

#### **2.4.7. Plaquereinigung von Viren**

Überschichtungsmedium:

160 ml einer 0,8%igen Agaroselösung wurden aufgekocht, auf 42°C abgekühlt und mit 160 ml 2xMEM (125 ml MEM-5, 7,5 ml FCS, 27,5 ml 10xMEM) unter Rühren gemischt. Dieses Medium wurde auf 37°C abgekühlt und sofort verwendet.

Zur Identifikation von Virus-Mutanten aus einem Gemisch mit Wildtyp-Virus, bzw. allgemeiner zur Herstellung genetisch homogener Viruspopulationen, wurden Viren aus Einzelplaques isoliert. Dazu wurden HFF in 10 cm Schalen subkonfluent ausgesät und mit seriellen Verdünnungen (unverdünnt bis  $10^{-6}$ ) einer Virussuspension infiziert. Nach einstündiger Adsorption bei 37°C wurde das Medium abgesaugt und durch Überschichtungsmedium ersetzt. Dadurch wurden eine Virusausbreitung durch das Medium und damit verbundene Reinfektionen unterbunden. Nach 7-12 Tagen wurde unter dem Mikroskop mit Hilfe von Pasteurpipetten infektiöses Material aus klar abgegrenzten Einzelplaques entnommen, mit frischem Medium vermischt und zur Infektion von neuen HFF-Kulturen verwendet. Nach der Entwicklung eines vollständigen CPE wurde der Überstand dieser Kulturen geerntet und bei -80°C gelagert.

#### **2.4.8. FACS-Sortierung GFP-exprimierender Zellen**

Reagenzien:

SM-Puffer (staining medium): PBS mit 10 mM HEPES und 4% (v/v) FKS

Das Prinzip der Durchflußzytometrie ist die simultane Messung verschiedener physikalischer und chemischer Eigenschaften einzelner Zellen oder Partikel, die in einem Flüssigkeitsstrom durch einen Laserstrahl geführt werden. Die Verwendung eines 488nm Argonlasers in Verbindung mit 5 spezifischen Detektoren erlaubt es, 5 optische Parameter gleichzeitig zu erfassen: Vorwärtsstreulicht, Seitwärtsstreulicht und drei Fluoreszenzspektralbereiche. Das Vorwärtsstreulicht, ist ein Maß für die Größe einer Zelle; das Seitwärtsstreulicht gibt den Grad der Granulierung einer Zelle an. Fluoreszierende Zellen, wie z.B. Zellen, die GFP (*green fluorescent protein*) exprimieren, können im FACS analysiert und aus einer Zellsuspension präparativ sortiert werden.

Dazu wurden HFF mit einem GFP-exprimierenden Virusgemisch infiziert, am Tag 3 nach Infektion abtrypsiniert und pelletiert. Das Pellet wurde in 5 ml SM-Puffer vorsichtig resuspendiert. Da für das Arbeiten mit dem FACS die Zellen in einer Einzelzellsuspension vorliegen müssen, wurde die Zellsuspension über ein steriles Nylonsieb filtriert, um Zellaggregate zu entfernen.

Die Datenaufnahme und Datenauswertung erfolgte mit dem Computerprogramm Cellquest (Cellquest Version 1.2, Becton Dickinson, Heidelberg). Durch Setzen eines elektronischen Fensters können einzelne Zellpopulationen für die weitere Analyse ausgewählt werden. Das elektronische Fenster wurde auf lebende Zellen mit hoher GFP-Fluoreszenz gesetzt, womit tote Zellen, GFP-negative Zellen und Zellen mit niedriger GFP-Expression von der Sortierung ausgeschlossen wurden. Die Sortierung erfolgte mit einer Durchflußrate von ca. 2000 Zellen pro Min. Die sortierten Zellen wurden mit frischen HFF kokultiviert. Der infektiöse Überstand dieser Kultur wurde für weitere Experimente verwendet.

#### **2.4.9. TCID50-Bestimmung**

Reagenzien:

AEC-Stammlösung: 400 mg AEC (Aminoethylcarbazol) in 100 ml DMF (Dimethylformamid).

Acetat-Puffer: 6,8 g Na-Acetat in 2,88 ml Eisessig, pH 4,7.

Die TCID50-Methode dient zur Bestimmung des Virustiters, der als "*tissue culture infective dose 50*" gemessen wird (Leland & French, 1988). Dazu wurden am Vortag  $2 \times 10^4$  HFF pro Vertiefung in eine 96-Well-Platte ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit seriellen Verdünnungen des zu testenden Virusüberstandes im Vierfachansatz infiziert und nach 24 bis 48-stündiger Inkubation 10 Min. mit 96% Ethanol fixiert. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden zur Detektion von IE1-exprimierenden Zellen (entspricht infizierten Zellen) 50 µl Hybridomüberstand des IE1-spezifischen monoklonalen Antikörpers p63-27 pro Vertiefung zugegeben und 45 Min. bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach 2 Waschschriften in PBS erfolgte die Detektion des gebundenen Primärantikörpers mit Hilfe eines HRP-gekoppelten anti-Maus IgG, das den F<sub>c</sub>-Teil von murinen Antikörpern erkennt. Derart markierte Zellen wurden durch eine AEC-Färbung sichtbar gemacht. Dazu wurde die AEC-Stammlösung 1:20 in Acetatpuffer verdünnt, zweimal filtriert und mit 1:1000 Volumen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) versetzt. Von diesem AEC-Substrat wurden 100 µl pro Vertiefung zugegeben und 10 Min. bis 1 Std im Dunkeln inkubiert, bis eine deutliche Braunfärbung der infizierten Zellkerne zu sehen war. Zum Abstoppen der Reaktion wurde mit PBS gewaschen. Danach wurde unter dem Mikroskop die Anzahl der

positiven Zellkerne in jeder Vertiefung ermittelt und der TCID50-Wert des zu testenden Virusüberstandes mit der Methode nach Spearman und Kaerber errechnet (Kaerber, 1931). Die Berechnung wurde folgendermaßen durchgeführt:

$$\log_{10} \text{TCID50} = - (x_0 - d/2 - d \sum r/n), \text{ wobei}$$

- $x_0$  der  $\log_{10}$  des reziproken Wertes der höchsten Verdünnung ist, bei der alle Vertiefungen des Vierfachansatzes keine IE-positiven Zellkerne aufwiesen;
- $d$  dem  $\log_{10}$  des Verdünnungsfaktors entspricht (z.B.  $d=0,3$  bei Verdünnungsfaktor 1:2);
- $n$  der Zahl der Mehrfachansätze entspricht, die für jede Verdünnung angelegt wurden (nach Abzug nicht auswertbarer Werte; in der Regel also 4);
- $r$  der Zahl der positiven Vertiefungen pro Vierfachansatz entspricht.

Für die untersuchten, virushaltigen Zellkulturüberstände ergab sich in der Regel ein Virustiter, der einem TCID50-Wert von  $10^5$  bis  $10^7$  pro ml entsprach.

Für Experimente, für die die mit Hilfe der TCID50-Bestimmung ermittelten Titer zu ungenau waren, wurde der zu testende Überstand im Bereich zwischen  $10^{-4}$  und  $10^{-8}$  in Zweierstufen verdünnt und die oben beschriebene Anfärbung wiederholt.

#### **2.4.10. Mykoplasmentest**

Alle Zellkulturen wurden in regelmäßigen Abständen auf das Vorhandensein von Mykoplasmen untersucht. Dazu wurden die Zelllinien ca. 8 Tage ohne Antibiotikumzusatz im Medium kultiviert. Anschließend wurden 1,5 ml des Zellkulturüberstandes abzentrifugiert, das Pellet lysiert und eine PCR-Reaktion mit den Reagenzien des PCR-ELISA-Kits der Firma Roche, Mannheim, nach Herstellerangaben durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden agarosegelelektrophoretisch analysiert. In Fällen, wo eine Steigerung der Sensitivität des Nachweises wünschenswert war, wurde der PCR-ELISA angeschlossen. Bei positivem Testergebnis wurden die befallenen Zellen mit dem Antibiotikum BM Cyclin (Roche, Mannheim) nach Herstellerangaben behandelt.



## 2.5. Immunologische Methoden

### 2.5.1. Antikörper und Antiseren

**Tabelle 2.1: Monoklonale Antikörper**

Bezeichnung	Spezifität	Spezies	Quelle	Referenz
BS500	IE1	Maus	Biotest, Dreieich	
p63-27	IE1 /Exon 4	Maus	W. Britt, USA	Andreoni et al., 1989.
p65-33	pp65	Maus	W. Britt, USA	
28-4	MCP	Maus	W. Britt, USA	Chee et al., 1989.
XP1	pp150	Maus	Behring AG	Jahn et al., 1990.
M23	UL112/113	Maus	K. Radsak, Marburg	Yamamoto et al., 1998.
27-287	gB	Maus	W. Britt, USA	Britt et al., 1988.
41-18	Pp28	Maus	W. Britt, USA	Meyer et al., 1988.
SA4	gH	Maus	W. Britt, USA	Urban et al., 1992.
SMX	IE2	Maus	Biotest, Dreieich	Plachter et al., 1993.
Clonab	pp65	Maus	Biotest, Dreieich	
anti-CD3; Klon 145-2C11	CD3 $\epsilon$	Hamster	Southern Bio-technologies, USA	Portoles et al., 1989
Anti-IgG1	IgG1 (Klon A85-1)	Ratte	Pharmingen, USA	
Anti-IgG2a	IgG2a (Klon R19-15)	Ratte	Pharmingen, USA	

#### Anti-Seren

Anti-Maus IgG, Fluoreszein-gekoppelt (Dako, Hamburg).

Anti-Maus IgG, HRP-gekoppelt (Dako, Hamburg).

### 2.5.2. Versuchstiere

Balb/c-Mäuse (Haplotyp H-2<sup>d</sup>) wurden aus der institutseigenen Zucht, die unter SPF- (*specified pathogen free*) Bedingungen geführt wird, bezogen.

C57/B6-HLA-A2.kB-Mäuse wurden freundlicherweise von Dr. L. Sherman, San Diego, über Dr. M. Theobald, Mainz, zur Verfügung gestellt und wurden ebenfalls unter SPF-Bedingungen weitergezüchtet. Diese Tiere besitzen den Haplotyp H-2<sup>b</sup> und tragen zusätzlich ein Transgen für das chimäre HLA-Molekül HLA-A2.kB (Siehe Abb. 3.10.).

### **2.5.3. Immunisierung von Mäusen**

Für alle Immunisierungsstudien wurden 8 bis 12 Wochen alte Mäuse verwendet. Bei intraplantarer Immunisierung wurde das Antigen in PBS resuspendiert und in einem Volumen von 25 µl subkutan in die linke Hinterpfote verabreicht. Bei intraperitonealer Immunisierung wurde das Antigen in einem Volumen von 200-500 µl in PBS gelöst und in die Bauchhöhle gespritzt. Alle Immunisierungen erfolgten ohne Narkose; die Antigene wurden ohne die Zugabe von Adjuvantien verabreicht.

### **2.5.4. Gewinnung von Lymphozyten**

Die poplitealen Lymphknoten intraplantar immunisierter Mäuse wurden 8 Tage p.i. steril entnommen und in ein mit RPMI-Medium gefülltes Röhrchen überführt. Anschließend wurden die Lymphknoten auf einem Metallsieb zerrieben und die aufgefangene Zellsuspension 2 mal mit Medium gewaschen. Danach wurde die Zellzahl bestimmt und die Lymphozyten entsprechend ausgesät.

### **2.5.5. Etablierung zytotoxischer T-Lymphozyten**

Zur Generierung zytotoxischer Effektorzellen wurden die gewonnenen Lymphozyten in T-Zell-Medium (MEM- $\alpha$  supplementiert mit 10% FKS, 10 ml L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 0,1mg/ml Streptomycin, 10 mM HEPES,  $5 \times 10^{-5}$ M 2-Mercaptoethanol), das mit 100 U/ml rekombinantem humanem Interleukin-2 (rhIL-2) angereichert wurde, propagiert. RhIL-2 ist ein T-Zell-Wachstumsfaktor, der für die Proliferation von aktivierten T-Zellen verantwortlich ist (Smith, 1988). Nach 8 Tagen wurde die Aktivität der Lymphozyten in einem Zytolysetest untersucht. Es erfolgte neben der IL-2-Gabe keine weitere Restimulation, um eine Bevorzugung bestimmter T-Zell-Spezifitäten möglichst gering zu halten.

## 2.5.6. Zytolysetest (Chromfreisetzungstest)

### 2.5.6.1. Peptide

Die verwendeten Peptide wurden von der Firma Jerini, Berlin, mit einer Reinheit von >75% synthetisiert. Sie tragen am C-Terminus eine Carboxy-Gruppe.

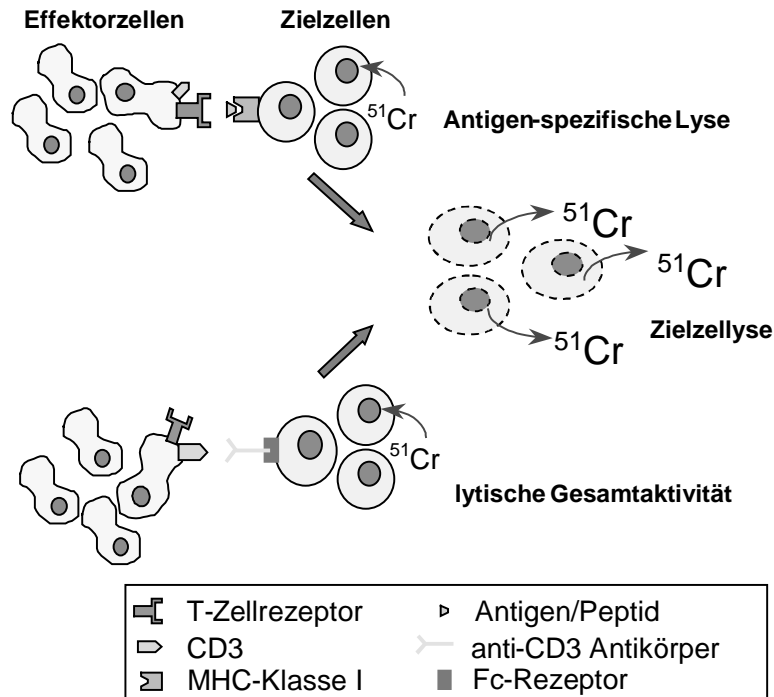
Protein	Aminosäureposition	Aminosäuresequenz
Pp65	495-503	NLVPMVATV
P53	149-157	STPPPGTRV

### 2.5.6.2. Prinzip

Im Chromfreisetzungstest wird das Vorhandensein und die Spezifität von zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) getestet. Dazu werden Zielzellen mit radioaktivem Chrom ( $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ ) markiert und mit den Effektorzellen kokultiviert. Vitale Zellen nehmen  $^{51}\text{Cr}^{3+}$  auf und reduzieren es zu  $^{51}\text{Cr}^{2+}$ , für das die Membran vitaler Zellen impermeabel ist (Holden et al., 1973; Zawydiwski & Duncan 1978). Die Chromaktivität, die in den Überstand freigesetzt wird, ist proportional zur Anzahl der lysierten Zellen und somit ein Maß für die Aktivität der CTL.

Bei der sog. „**peptid-spezifischen Lyse**“ werden die MHC-Moleküle der Zielzellen mit einem synthetischen Peptid beladen. Man mißt die Aktivität der Effektorzellen, die gegen dieses Peptid gerichtet sind. Die spezifische Lyse ergibt sich nach Abzug einer Negativkontrolle (Zielzellen, die mit einem irrelevanten Peptid beladen wurden).

Die Methode der sog. „**redirigierten Lyse**“ (Kranz et al., 1984) dient zur Messung der gesamten lytischen Aktivität einer Effektorpopulation. Der Kontakt zwischen Effektor- und Zielzelle wird hier nicht über das MHC-Molekül und den T-Zell-Rezeptor, sondern über die Zugabe von anti-CD3 $\epsilon$ -Antikörper vermittelt. Der anti-CD3 $\epsilon$ -Antikörper bindet mit seinem Fc-Teil an den Fc-Rezeptor der Zielzelle, z.B. einer P815-Mastozytomzelle als klassische Antigen-präsentierende Zelle im Maussystem. Mit dem Fab-Teil erkennt er das dem T-Zell-Rezeptor benachbarte CD3 $\epsilon$ -Molekül. Falls es sich bei der T-Zelle um eine aktivierte Effektorzelle handelt, die nur mehr einen Stimulus braucht, führt dies zur Lyse der Zielzelle und zur Freisetzung von  $^{51}\text{Cr}$ . Als Negativkontrolle dienen unbeladene Zielzellen. Diese Methode dient der Erfassung aller aktivierten CTL, unabhängig von ihrer Spezifität.



**Abb. 2.1.:** Schematische Übersicht der verwendeten Zytolysetestprinzipien. Bei der Antigen- oder Peptid-spezifischen Lyse (obere Bildhälfte) wird der Kontakt zwischen Effektor- und Zielzelle, ähnlich der Situation *in vivo*, über eine Interaktion zwischen dem T-Zellrezeptor und dem MHC-Klasse I-Molekül vermittelt. Die gemessene Zielzellyse ist spezifisch für das verwendete Antigen. Bei der „redirigierten Lyse“ (untere Bildhälfte) wird die lytische Gesamtaktivität einer Effektorpopulation, unabhängig von ihrer Spezifität, gemessen. Der Kontakt zwischen Effektor- und Zielzelle wird durch den zugegebenen anti-CD3ε-Antikörper vermittelt, der mit seinem Fc-Teil an den Fc-Rezeptor der Zielzelle bindet und mit seinem Fab-Teil das CD3ε-Molekül auf der Oberfläche von Effektor-T-Zellen erkennt. Bei bereits aktivierten Effektoren reicht dieser Stimulus aus, um die Lyse der Zielzelle auszulösen. Nicht aktivierte T-Zellen benötigen zusätzliche Kostimuli, und werden daher nicht erfaßt.

### 2.5.6.3. Durchführung

Die Zielzellen wurden geerntet, gewaschen, gezählt und in einem Volumen von 50 µl mit  $^{51}\text{Cr}$  markiert. Für  $1 \times 10^6$  Zellen wurden 100 µCi des Radionuklids verwendet. Nach einer Inkubationszeit von 60-90 Min. bei 37°C wurde das überschüssige Chrom dreimal herausgewaschen. Im Falle einer Beladung mit anti-CD3ε-Antikörper (Hamster-IgG1 Klon 145-2C11, Southern Biotechnology Associates, Inc., USA) wurden die Zielzellen 15-30 Min. mit 5 µl Antikörper bei RT inkubiert; im Falle einer Peptidbeladung wurden die Zielzellen 1 Std. bei 37°C mit  $10^{-6}$  bis  $10^{-10}\text{M}$  Peptid gelöst in PBS inkubiert. Danach wurden die Zielzellen 2 mal gewaschen, erneut gezählt und je 1000 Zellen in 100 µl Medium pro Well einer 96-Well-Platte ausgesät.

Die Effektorzellen wurden ebenfalls geerntet, gewaschen und deren Zellzahl bestimmt. Je nach Effektor- zu Zielzellverhältnis (E:Z-Verhältnis) wurde die Zellzahl eingestellt, z.B.

$2 \times 10^6$  Zellen pro ml für ein E:Z-Verhältnis von 100:1. Danach wurden 200  $\mu$ l dieser Zellsuspension in Triplikaten in die erste Reihe einer 96-Well-Platte ausgesät und in 7 Schritten seriell 1:2 verdünnt, so dass in jeder Vertiefung 100  $\mu$ l Effektorzellen vorlagen. Nach Zugabe der Zielzellen wurden die Platten 4 Min. bei 700 upm anzentrifugiert, um den Kontakt zwischen Ziel- und Effektorzellen sicherzustellen, und 4 Std. bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen bei 1200 upm abzentrifugiert und je 100  $\mu$ l Überstand mit Hilfe einer Mehrkanalpipette in Szintillationsröhrchen überführt. Die  $^{51}\text{Cr}$ -Aktivität wurde in einem  $\gamma$ -Counter (Canberra-Packard) gemessen.

Als Kontrollen wurden zusätzlich je 9 Proben zur Bestimmung der Spontan- und der Maximallyse mitgeführt. In beiden Fällen wurden je 1000 markierte Zielzellen in 200  $\mu$ l Medium pro Vertiefung angelegt. Als Wert für die Maximallyse wurde die  $^{51}\text{Cr}$ -Aktivität von 100  $\mu$ l Zellsuspension direkt bzw. von 100  $\mu$ l Überstand nach Lyse der Zellen mit 1% SDS (w/v) gemessen; als Wert für die Spontanlyse wurde die  $^{51}\text{Cr}$ -Aktivität des Überstand von Zielzellen ohne Zugabe von Effektoren bestimmt.

Die Berechnung der spezifischen Lyse in Prozent erfolgte nach der Formel :

$$\frac{(\text{gemessene } ^{51}\text{Cr-Freisetzung} - \text{Spontanfreisetzung}) \times 100}{(\text{Maximalfreisetzung} - \text{Spontanfreisetzung})} = \text{spezifische Lyse in \%}.$$

### 2.5.7. Gewinnung von Serum

Zur Gewinnung von murinem Serum wurden die Mäuse mit Ether anästhesiert, eröffnet und das Vollblut durch Punktion des Herzmuskels entnommen. Danach wurde das Blut zur Agglutination 2 Std bei 37°C inkubiert und anschließend über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Am nächsten Tag wurden die Blutproben 10 Min. bei 8000 x g und 4°C abzentrifugiert und der klare Überstand, das Serum, in frische, sterile Eppendorf-Hütchen transferiert. Die Lagerung der Seren erfolgte in kleinen Aliquots bei -20°C.

### 2.5.8. Neutralisationstest

Reagenzien:

AEC-Stammlösung: 400 mg AEC (Aminoethylcarbazol) in 100 ml DMF  
(Dimethylformamid).

Acetat-Puffer: 6,8 g Na-Acetat, 2,88 ml Eisessig, pH 4,7.

Der Neutralisationstest dient zur Quantifizierung der Menge an HCMV-neutralisierenden Antikörpern in einem Serum und wurde in Anlehnung an die von Andreoni und Kollegen

publizierte Methode (Andreoni et al., 1989) entwickelt. Alle zu testenden Seren wurden zunächst 1:3 in PBS vorverdünnt und in zehn seriellen 1:2 Verdünnungen weiterverdünnt. Es lagen von jeder Verdünnung 250 µl vor. Der zwölfte Ansatz bestand aus 250 µl Medium ohne Serum und diente als Positivkontrolle für die Virusinfektion sowie als Referenz für die Berechnung des Neutralisationstiters. Um den Spiegel an neutralisierenden Antikörpern gegen den HCMV-Laborstamm Ad169 zu bestimmen, wurde anschließend zu jedem Ansatz ein gleiches Volumen (250 µl) einer Ad169-Virusverdünnung hinzu pipettiert. Dazu wurde ein Ad169-Überstand, für den ein TCID<sub>50</sub>/ml-Wert von 6,5 ermittelt worden war, zunächst 20 sec gevortext und dann 1:200 in MEM-Medium verdünnt. Virus- und Serumverdünnungen wurden gut gemischt und vier Std. lang bei 37°C im Brutschrank inkubiert. In der Zwischenzeit wurden je  $1,5 \times 10^4$  HFF in 25 µl Medium pro Vertiefung einer 96-Well-Platte ausgesät. Nach vier Std. Inkubationszeit wurden je 100 µl des Serum-Virus-Gemisches in Vierfachansätzen zu den Zellen gegeben und 24 Std. bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen in 96% Ethanol 15 Min. lang bei -20°C fixiert, zweimal in PBS gewaschen und 1 Std. mit einem gegen IE1 gerichteten Antikörper (p63-27) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut gewaschen und die IE1-Expression mit Hilfe eines 1:500 verdünnten HRP-konjugierten anti-Maus IgG-Sekundärantikörpers (Dako, Hamburg) für 45 Min. bei 37°C detektiert. Die IE1-positiven Zellkerne wurden mittels AEC-Färbung sichtbar gemacht. Dazu wurde die AEC-Stammlösung 1:20 in AEC-Puffer verdünnt. Diese Lösung wurde zweimal filtriert und mit 1/1000 Volumen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) versetzt. Von diesem Substrat wurden 100 µl pro Vertiefung zugegeben und 10 bis 30 Min. bei 37°C inkubiert, bis sich die Zellkerne in der Positivkontrolle (ohne Serum) deutlich rotbraun färbten. Danach wurden die Zellen in PBS gewaschen, um die Färbereaktion zu stoppen. Die Anzahl der IE1-positiven Zellkerne pro Vertiefung wurde unter dem Mikroskop ausgezählt. Der Wert für die Neutralisation in % wurde bestimmt, indem die durchschnittliche Anzahl der IE1-positiven Zellkerne bei einer gegebenen Serumverdünnung mit der Anzahl der IE1-positiven Zellkerne in der Positivkontrolle in Bezug gesetzt wurde. Es wurden diejenigen Serumverdünnungen, die eine vollständige ( $V/V_0=1$ ) bzw. 50%-ige ( $V/V_0=0,5$ ; 50%-Wert) Reduktion der eingesetzten Infektiosität bewirkten, ermittelt.

### **2.5.9. Indirekte Immunfluoreszenzanalyse und Immunhistochemie**

Die indirekte Immunfluoreszenzanalyse dient zum Nachweis der Expression von Proteinen in Zellen. Dazu wurden adhärenente Zellen auf Deckgläschen angezogen und je nach Experiment am nächsten Tag mit *Dense Bodies* inkubiert, infiziert oder transfiziert. Von nicht-adhärenent wachsenden Zellen wurden Zytopspinpräparate angefertigt. Dazu wurden die

Zellen durch 3-minütige Zentrifugation bei 800 upm auf Objektträger aufgebracht. Nach Fixierung in 90%igem Aceton wurden alle Zellen 45 Min. bei 37°C in einer feuchten Kammer mit dem entsprechenden murinen Primärantikörper inkubiert. Anschließend wurden die Präparate dreimal mit PBS gewaschen und die adhären Zellen mit Fluoreszein-gekoppelten, polyspezifischen Seren gegen murines Immunglobulin (1:50 verdünnt; Dako, Hamburg) und *Evans* Blau zur Gegenfärbung (1:50 verdünnt, Sigma, Deisenhofen) für weitere 30 Min. bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Deckgläser mit Fluoprep (bioMerieux, Marcy l'Etoile, Frankreich) eingedeckt und mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes ausgewertet. Die Zytospinpräparate von Zellen hämatopoetischen Ursprungs wurden ebenfalls in einer feuchten Kammer 30 Min. mit dem Primärantikörper inkubiert. Die Bindung des Primärantikörpers wurde anschließend mit Hilfe des kommerziell verfügbaren APAAP-Färbesystems (Biotest, Dreieich) detektiert, um Probleme durch endogene Peroxidase-Aktivität und unspezifische Fluoreszenz zu umgehen.

#### **2.5.10. Western Blot-Analyse**

Reagenzien:

Transferpuffer: 25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 20% Methanol.

PBS-T: PBS mit 0,1% Tween 20

Die *Western Blot*-Analyse von Proteinen erfolgte nach der Methode von Burnette (Burnette, 1981). Dazu wurden die Proteine unmittelbar nach der Elektrophorese in einer halbtrockenen Elektrotransferapparatur aus dem Gel auf eine gewässerte Nitrozellulosemembran (Schleicher und Schuell) transferiert. Der Transfer erfolgte in Transferpuffer bei einem Stromfluß von 1 mA/cm<sup>2</sup> Membranfläche für 60-80 Min. Anschließend wurde die Übertragung mit Ponceau-Rot (Roth) kontrolliert und die Molekulargewichtsmarker angezeichnet. Die Membran wurde mind. 2 Std. in 5% (w/v) Milchpulver in PBS geschwenkt, um freie Bindungsstellen abzusättigen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem verdünnten Primärantikörper bei 4°C üN. Am nächsten Morgen wurden die Membranen 5 mal 15 Min. in PBS-T gewaschen und anschließend 1 Std. bei RT mit einem HRP-konjugierten Sekundärantikörper (1:1000 bis 1:10000 verdünnt; Dako, Hamburg) inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten in PBS-T wurden die Filter mit dem ECL Plus-Chemilumineszenz-Detektionssystem (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) laut Herstellerangabe entwickelt.

### 2.5.11. ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*)

Reagenzien:

Verdünnungspuffer: PBS supplementiert mit 2% Tween 20 und 3% FKS.

Zur Bestimmung von Zytokinkonzentrationen in Zellkulturüberstand wurden ELISA-Kits der Firma Endogen (Woburn, USA) bezogen und nach Herstellerangaben verwendet.

Zur Analyse von IgG Isotypen wurden mit HCMV-Partikeln sowie als Kontrolle mit nicht infizierten Zellen beschichtete ELISA-Platten, die freundlicherweise von der Firma Biotest (Dreieich) zur Verfügung gestellt wurden, verwendet. Diese Platten wurden mit murinen Seren, die in Verdünnungspuffer seriell verdünnt wurden, 2 Std. bei 37°C inkubiert. Nach vier Waschschrritten wurden die gebundenen HCMV-spezifischen Antikörper mit HRP (*horse redish peroxidase*)-konjugierten IgG1 und IgG2a spezifischen Sekundärantikörpern (Pharmingen, USA) detektiert. Die Sekundärantikörper wurden dazu 1:800 (IgG1) sowie 1:2000 (IgG2a) in Verdünnungspuffer gelöst; die Inkubationszeit betrug 90 Min. bei 37°C. Nach vier weiteren Waschschrritten wurden je 100 µl einer 2mg/ml o-Phenylendiaminlösung als Substrat zugegeben und 20 Min. bei RT im Dunkeln inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl 12% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abgestoppt und die optische Dichte bei 492 nm in einem ELISA-Reader bestimmt. Als Endpunktverdünnung wurde diejenige Serumverdünnung definiert, deren Absorption mindestens doppelt so hoch war, wie die des Nullserums.

## 2.6. Präparation, Analyse und Manipulation von Nukleinsäuren

### 2.6.1. Verwendete Plasmide

pBR322: Klonierungsvektor der ersten Generation.

pBglJ: Enthält das BgIII-J-Fragment, welches den für pp150 kodierenden Leserahmen UL32 aus dem HCMV-Stamm Ad169 enthält, in pBR322 (siehe 3.2.).

pBglJd150: Entspricht pBglJ, bei dem etwa 65% der kodierenden Region von pp150 deletiert wurden (siehe 3.2.).

pBSCT-neo: Enthält die Neo-Expressionskassette aus pSVneoCS als BamHI/EcoRI-Fragment im Klonierungsvektor pbluescript (Wolff et al., 1993).

pp150-RSV: Expressionsplasmid, das das pp150-Gen unter Kontrolle des RSV-Promotors enthält.



pcDNA6-pp150:	Expressionsplasmid, das das pp150-Gen unter Kontrolle des HCMV-Promotors enthält.
PcDNA6-pp65:	Expressionsplasmid, das das pp65-Gen unter Kontrolle des HCMV-Promotors enthält.
pRG273:	Plasmid, das die transformierenden Gene E6 und E7 aus Humanem Papillomvirus Typ 16 zusammen mit dem Puromycin-Selektionsgen trägt (Halbert et al., 1991).
pGSH6:	Enthält die kodierende Region für IE4 (5kB-Region).
pGSH6-neo:	Enthält anstelle der kodierende Region für IE4 (5kB-Region) die Neo-Resistenzkassette unter Kontrolle des SV40-Promotors. Dieses Rekombinationsplasmid diente zur Herstellung eines rekombinanten HCMV, in dem der Leserahmen für IE4 deletiert wurde.
PQBI-PGK:	Enthält die GFP-Neo-Selektionskassette unter Kontrolle des PGK-Promotors, der <i>Adeno-Tripartite-Leader</i> -Sequenz und des BGH-polyA (Quantum Biotechnologies, Kanada).
PBglJd150-neo:	Enthält das BglII-J-Fragment von Ad169, in dem der Leserahmen von pp150 zwischen XhoI und SpeI deletiert und durch die Neo-Kassette ersetzt wurde (siehe 3.2.1.).
PBglJd150-GFP-neo:	Enthält das BglII-J-Fragment von Ad169, in dem der Leserahmen von pp150 zwischen XhoI und SpeI deletiert und durch die GFP-Neo-Kassette aus pQBI-PGK ersetzt wurde(siehe 3.2.1.).
pIE4-B3:	Exprimiert die kodierende Region des IE4-Gens unter der Kontrolle des T7-Promotors (Klon B3).
pIE4-C5:	Entspricht IE4-B3; Klon C5.

### 2.6.2. Oligonukleotide

Die nachfolgend aufgeführten Oligonukleotide wurden als Startermoleküle für die Amplifikation subgenomischer Fragmente durch PCR oder für Sequenzierungsreaktionen verwendet. Sie wurden bei den Firmen MWG Biotech (Ebersberg) und Eurogentec (Belgien) bezogen.

Neo3:	5'-GCCGAGAAAGTATCCATCATGGC-3'
NEO4:	5'-GTTACGCGCAGCGTGACCGC-3'
GFP4:	5'-CAGCGGGGCTGCTAAAGCGC-3'
IE4-for:	5'-CCTCGATATACGCCTATCGATAGG-3'

IE4-rev: 5'-CGTGCGGTCGGTCATCATTCTGC-3'  
PP150-S: 5'-GCGCGCTCGTAAGCGCGGTC-3'  
SP9-pp150: 5'-GCCACCTGGATATCACTAGTATAACTTCGTATAGCATAACATTATAC-  
GAAGTTATCGAATTCTACCGGGTAGGGG-3'  
SP10-pp150: 5'-ACAAGTTGATGCATCTCGAGATAACTTCGTATAATGTATGCTATACG  
AAGTTATTCCAGCCGCGAACGTGGCG-3'

### 2.6.3. Isolierung von Nukleinsäure

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien erfolgte mit Hilfe von Produkten der Firma Qiagen (Dortmund; Miniprep, Maxiprep) und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt; ebenso die Isolierung von Gesamt-RNA aus virusinfizierten Zellen.

### 2.6.4. Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von Nukleinsäuren lässt sich durch die Messung der optische Dichte (OD) bei 260 nm ermitteln. Eine  $OD_{260}$  von 1,0 entspricht einer Konzentration von 50 $\mu$ g/ml doppelsträngiger DNA bzw. 30 $\mu$ g/ml einzelsträngiger DNA (Oligonukleotide) oder einer RNA-Konzentration von 40 $\mu$ g/ml. Der Quotient aus der Absorption bei 260 nm und der Absorption bei 280 nm lässt eine Aussage über die Reinheit der Nukleinsäure zu. Der Quotient sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

### 2.6.5. Enzymatische Reaktionen mit Nukleinsäure

Alle gängigen Manipulationen von Nukleinsäure wie Spaltungen mit Restriktionsendonukleasen, Phosphorylierungs- und Kinasierungsreaktionen sowie Ligationen wurden nach Standardprotokollen (Sambrook et al., 1989) oder nach den Angaben des Herstellers der benötigten Enzyme (Gibco BRL, Eggenstein) durchgeführt.

### 2.6.6. Herstellung von *blunt-ends* nach Restriktionsenzymverdau

Zur Herstellung von *blunt-ends*, ausgehend von 3'- und 5'-Überhängen, wurde die DNA nach dem Restriktionsenzymverdau in 2,5 Vol. 100% (v/v) Ethanol und 1/10 Vol. 3M Na-Acetat für 20 Min. bei  $-20^{\circ}\text{C}$  präzipitiert und 15 Min. bei 14000 upm abzentrifugiert. Das Präzipitat wurde mit 70% Ethanol gewaschen und getrocknet. Anschließend wurde eine

Polymerase-Reaktion mit 1U *vent*-Polymerase (NEB, Schwalbach), 200 µM dNTPs in 1x Thermopol-Puffer (NEB, Schwalbach) durchgeführt. Die Reaktion erfolgte 20 Min. bei 72°C. Es können sowohl 5`Überhänge mit Hilfe der Polymerase-Aktivität von *vent* aufgefüllt, als auch 3`Überhänge mit Hilfe der 3`-5`Exonuklease-Aktivität dieser Polymerase abgedaut werden.

### 2.6.7. Agarose-Gelelektrophorese

Reagenzien:

TBE: 45 mM Tris-Borat, 1 mM EDTA.

DNA-Auftragspuffer: 50 mg Bromphenolblau, Natriumsalz; 100 mg Xylencyanol, 1 mM EDTA, 25 g Saccharose, mit H<sub>2</sub>O auf 50 ml.

Zu charakterisierende DNA-Präparationen wurden in horizontalen Elektrophoresekammern (Keutz) über Agarosegele aufgetrennt. Je nach der errechneten Größe der DNA-Fragmente wurden Agarosekonzentration von 0,7% bis 2,5% eingesetzt. Als Puffersystem wurde TBE verwendet. Zum Nachweis der aufgetrennten DNA unter UV-Licht wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 50 ng/ml zugesetzt. Vor dem Auftragen der DNA auf das Gel wurde die Probe mit 1/10 Vol. DNA-Auftragspuffer gemischt. Die Auftrennung der DNA erfolgte, je nach Größe der verwendeten Gelkammer, bei Spannungen zwischen 50 und 180 Volt und konstanter Stromstärke. Als Molekulargewichtsmarker wurde „1kB plus“ (Gibco BRL) verwendet. Die aufgetrennte DNA wurde auf einem UV-Durchlichtschirm bei 312 nm im Gel sichtbar gemacht und fotografiert.

### 2.6.8. Elution von DNA aus Agarosegelen

Die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde nach Herstellerangaben durchgeführt (Qiagen, Hilden). Für Fragmente <100 bp und >10 kbp wurde der *Qiaex-Kit*, der auf der Bindung der DNA an Glasperlen basiert, verwendet; für Fragmente >300 bp und <10 kbp wurden *Qiaquick*- Säulen verwendet.

### 2.6.9. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein Verfahren zur exponentiellen Vermehrung (Amplifikation) definierter Nukleinsäuresequenzen *in vitro* (Saiki *et al.* 1988). Der Vorteil dieser Methode besteht in der gezielten 10<sup>2</sup> bis 10<sup>7</sup>-fachen Vervielfältigung eines

definierten DNA-Fragments (*Template*) und der Möglichkeit, über die verwendeten Oligonukleotide (*Primer*) geeignete Restriktionsschnittstellen für die Klonierung einzufügen.

Ein Standardansatz für eine PCR zum Nachweis von DNA-Fragmenten in rekombinanten Viren oder stabilen Zelllinien wurde in einem Volumen von 100 µl mit folgenden Komponenten durchgeführt: 10 µl 10 x PCR Puffer (Gibco BRL), 8 µl 2 mM dNTPs (Gibco BRL), 50 pmol 5' Oligonukleotid, 50 pmol 3' Oligonukleotid, 10-50 ng *Template*-DNA (z.B. 10-50 ng Plasmid-DNA, 1-10 µl Zellysat, 1-10 µl isolierte Virus-DNA), 1 µl Taq-Polymerase 5 U (Gibco BRL), auf 100 µl mit H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub>.

Die PCR-Amplifikationen wurden nach Überschichtung der Proben mit 50 µl Mineralöl in einem *Biometra-Cycler* (Biometra) durchgeführt. Die hierbei verwendeten Oligonukleotide sind unter Abschnitt 2.6.2. aufgeführt. Folgendes Standardprogramm wurde zur Inkubation der Reaktionsansätze verwendet:

Einleitender Denaturierungsschritt:
94 °C, 2 Min.
3-Stufen-PCR (30-35 Zyklen):
94 °C, 30 Sek. (Denaturierung)
55 °C, 1 Min. (Hybridisierung des Oligonukleotids)
72 °C, 2-4 Min. (Elongation)
Abschließender Polymerisationsschritt:
72 °C, 10 Min.
Dauerkühlung: 4 °C

Für die Hybridisierungstemperatur wurde ein Richtwert von 5 ° C unter dem Schmelzpunkt des Oligonukleotids gewählt, als Polymerisationszeit wurden 60 Sek. pro 1000 Bp angenommen. Zur Bestimmung der Ausbeute und Größe der produzierten PCR-Produkte wurden jeweils 5 µl der Probe auf ein Agarosegel aufgetragen und durch Gelelektrophorese zusammen mit einer definierten Menge eines Molekulargewichtsstandards analysiert.

Bei der PCR für Klonierungszwecke wurde grundsätzlich die *Vent*<sup>TM</sup>-DNA-Polymerase (NEB, Schwalbach) verwendet, da diese im Gegensatz zur Taq-DNA-Polymerase eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität besitzt. Diese reduziert die Fehlerrate beim Nukleotideinbau deutlich und generiert im Gegensatz zur Taq-Polymerase *blunt-ends* und keine Überhänge an den Amplifikatenden. Zudem wurden Oligonukleotide als *Primer* verwendet, deren 5'-Ende phosphoryliert war, um die Amplifikate direkt in glatt geschnittene, dephosphorylierte Vektoren ligieren zu können. Das PCR-Produkt wurde anschließend über ein präparatives Agarosegel gereinigt und je nach Anwendung weiter bearbeitet. Ein Standardansatz zur Amplifikation eines zu klonierenden DNA-Fragmentes enthielt folgende Komponenten, wobei die *Vent*<sup>TM</sup>-DNA-Polymerase erst nach dem ersten Denaturierungsschritt zugegeben

wurde (*hot start*): 10 µl 10 x Thermopol-Puffer (NEB), 5 µl 4 mM dNTPs (Gibco BRL), 0,4 µM 5' Oligonukleotid (5'-Phosphat), 0,4 µM 3' Oligonukleotid (5'-Phosphat), 10-50 ng *Template*-DNA, 1 U Vent<sup>TM</sup>-DNA-Polymerase, auf 100 µl mit H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub>. Das Temperaturprofil wurde wie folgt programmiert:

Einleitender Denaturierungsschritt:
95 °C, 5 Min.; danach Polymerasezugabe
1. Zyklus
45 °C, 5 Min.
72 °C, 5 Min.
3-Stufen-PCR (15-30 Zyklen):
95 °C, 30 Sek.
50 °C, 1 Min.
72 °C, 2-4 Min.
Abschließender Polymerisationsschritt:
72 °C, 10 Min.
Dauerkühlung: 4 °C

Die nichtradioaktive Sequenzierung doppelsträngiger DNA wurde mit dem "Thermo-Sequenase Fluorescent Labelled Primer Cycle Sequencing (7-deaza-dGPT)-Kit" der Firma Amersham Life Sciences nach Herstellerangaben durchgeführt. Dazu wurden IRD800-markierte *Primer* verwendet.

#### 2.6.10. Herstellung von Zelllysaten als PCR-Matrize

Reagenzien:

Lysepuffer: 100mM KCl, 20mM Tris-Cl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mg Gelatine, 1 ml Tween 20; ad 10ml mit H<sub>2</sub>O.

Zur Untersuchung der Fragestellung, ob Zelllinien ein Zielgen stabil ins Genom integriert haben, wurde mittels PCR und sequenzspezifischen Oligonukleotid-*Primern* ein Bereich des Zielgens amplifiziert. Dazu wurden die Zellen einer 10cm Schale abtrypsiniert und pelletiert. Das Zellpellet wurde in 400 µl Lysepuffer resuspendiert, mit 10 µl Proteinase K (1mg/ml) versetzt und 1-2 Std bei 56 °C inkubiert. Von dem resultierenden klaren Lysat wurden 1-10 µl als Matrize in eine PCR-Reaktion eingesetzt.

### 2.6.11. DNA-Isolierung aus virushaltigem Zellkulturüberstand

Reagenzien:

2x STE: 0,2 M NaCl, 20 mM Tris-Cl, 2 mM EDTA, pH 8,0.

Zur Charakterisierung des Genoms rekombinanter HCMV mittels PCR oder Restriktionsverdau wurde die Virus-DNA aus dem virushaltigen Zellkulturüberstand infizierter Zellen isoliert. Dazu wurde der Zellkulturüberstand aus drei 175cm<sup>2</sup>-Flaschen bei einem CPE von 80-90% zunächst 10 Min. bei 3000 upm abzentrifugiert, um Zelltrümmer abzutrennen, und anschließend 70 Min. bei 23.000 upm pelletiert. Das Pellet wurde in 120 µl H<sub>2</sub>O gelöst und mit 120 µl 2x STE gemischt. Danach wurde Proteinase K in einer Endkonzentration von 50 µg/ml zugegeben und 30 Min. bei 37 °C inkubiert. Zur Extraktion der DNA wurden anschließend 25 µl 4M LiCl und 250 µl Phenol/Chloroform zugegeben, vorsichtig gemischt und 5 Min. bei 13.000 upm abzentrifugiert. Nach Ausschütteln in 250 µl Chloroform/Isoamylalkohol wurde die DNA durch Zugabe von 2,5 Vol. 100% Ethanol und 1/10 Vol. 3M Na-Acetat mindestens 1 Std. bei -80 °C gefällt, pelletiert und getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 50 µl H<sub>2</sub>O über Nacht bei 4 °C gelöst; Scherkräfte durch Resuspendieren mit einer Pipette wurden somit vermieden. Die Konzentration der auf diese Weise isolierten Virus-DNA lag zwischen 0,2-1 µg/µl.

### 2.6.12. Southern Blot-Hybridisierung

Reagenzien:

Depurinierungslösung: 0,25N HCl.

Denaturierungslösung: 1,5M NaCl, 1 M NaOH.

Neutralisierungslösung: 0,5M Tris-HCl (pH 8,0), 3M NaCl.

20x SSC-Puffer: 3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat; pH 7,0.

Hybridisierungslösung: 5x SSPE, 1x Denhardt's, 0,1% SDS, 10 µg/ml E.coli DNA.

Die von Southern 1975 erstmals beschriebene Methode dient dazu, gelelektrophoretisch aufgetrennte DNA-Fragmente mittels Kapillar-Blot auf eine Nylonmembran (Gene Screen Plus, Amersham) zu transferieren. Bestimmte DNA-Sequenzen können anschließend durch Hybridisierung mit einer spezifischen Sonde nachgewiesen werden. Um einen gleichmäßigen Transfer der DNA zu gewährleisten, wurde das Gel zunächst 2x20 Min. depuriniert, 2x15 Min. denaturiert und anschließend 2x30 Min. neutralisiert, bis der pH-Wert unter 10 abgesunken war. Der Transfer der DNA auf die Membran wurde folgendermaßen durchgeführt: In eine Wanne mit 20 x SSC Puffer wurde eine Plattform in

der Art aufgestellt, dass ein darüberliegender Whatman-Filter (3MM) auf allen Seiten in das Laufmittel eintauchte. Darauf wurde in Lagen zuerst das Agarosegel, dann die Nylonmembran, darüber 2 Schichten Whatman-Filter (3MM) und zuletzt ein Paket Papiertücher mit Beschwerung aufgebaut. Nach dem Kapillartransfer der DNA (über Nacht) wurde diese durch Bestrahlung mit 0.12 Joules/cm UV-Licht mit der Membran quervernetzt. Anschließend wurde der *Blot* eine Std. bei 68 °C in einer Hybridisierungslösung prähybridisiert. Zur Hybridisierung wurden 2,5 µl einer <sup>32</sup>P-markierten Oligonukleotid-Sonde (siehe 2.6.14.) in etwa 10 ml derselben Lösung zugegeben und über Nacht bei 68 °C inkubiert. Danach wurde die Membran zweimal 10 Min. bei Raumtemperatur mit 2 x SSC/0,1 % SDS und zweimal für 10 Min. bei 68 °C in 0,1 x SSC/0,1 % SDS gewaschen. Die leicht angetrockneten und in eine dünne Plastikfolie verpackten Filter wurden mit einem Kodak X-omat S Film bei -70 °C exponiert oder mit Hilfe des *Phosphoimagers* (Fuji/Raytest) analysiert.

### **2.6.13. Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden**

Zur radioaktiven Markierung von Oligonukleotid-Sonden für die Hybridisierung von DNA auf Filtern wurde eine Kinasierungsreaktion mit folgenden Komponenten durchgeführt: 3 µl  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP, 1 µl PNK (Polynukleotidkinase), 2 µl 10x PNK-Puffer, 2 µl Oligonukleotid (80-100 pmol), 12 µl H<sub>2</sub>O. Nach 30 minütiger Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 µl 0,5M EDTA abgestoppt und die überschüssigen radioaktiven Nukleotide über eine NAP<sup>TM</sup>-Säule abgetrennt.

### **2.6.14. Northern Blot-Hybridisierung mit Digoxygenin-markierten DNA-Sonden**

Reagenzien:

10 x Formaldehyd-Agarosegel-Puffer (FA-Puffer):

200 mM 3-N-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS), 50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA

RNA-Auftragspuffer: 16 µl gesättigtes Bromphenolblau, 80 µl 500 mM EDTA, pH 8.0, 720 µl 37% (=12,3M) Formaldehyd, 2 ml Glycerin, 3084 µl Formamid, 4 ml 10x FA-Gelpuffer, mit RNase-freiem Wasser auf 10 ml (bei 4°C ungefähr 3 Monate haltbar).

1% FA-Gel: 4 g Agarose, 40 ml 10x FA-Gelpuffer, 1,8 ml 37% Formaldehyd, 4 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) auf 400ml mit H<sub>2</sub>O.

1x FA-Laufpuffer: 100 ml 10x FA-Gelpuffer, 20 ml 37% Formaldehyd, 880 ml H<sub>2</sub>O.

10x SSC: 1,5 M NaCl, 0,15 M Na-Citrat; pH 7,0.

Alle für RNA-Analysen benötigten Reagenzien und Geräte müssen RNase-frei sein.

Die zu untersuchende RNA wurde in einem 1% FA-Gel aufgetrennt, das vor dem Lauf mind. 30 Min. in 1x FA-Laufpuffer äquilibriert wurde. Es wurden je 15 µg RNA in 10 µl RNA-Auftragspuffer 10 Min. bei 65°C denaturiert, auf Eis abgeschreckt und auf das Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde bei 5V/cm und 4°C ÜN durchgeführt. Danach wurde die RNA aus dem Gel in 10x SSC Transferpuffer ca. 24 Std. lang auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche, Mannheim) transferiert (siehe 2.5.12.). Anschließend wurde die Membran in 6xSSC gewaschen und 2 Std. bei 80°C gebacken, um die Formaldehyd-Reaktion umzukehren.

Zur Detektion der gewünschten RNA wurden Digoxigenin-markierte DNA-Fragmente verwendet, die mit Hilfe des *PCR DIG Probe Synthesis Kit* (Roche, Mannheim) in einer PCR-Reaktion hergestellt wurden. Der Nachweis der gebundenen DIG-markierten Fragmente erfolgte mit einem anti-Digoxigenin-Antikörper, der mit alkalischer Phosphatase konjugiert war (*Anti-Dig-AP, Fab-Fragmente*, Roche,). Dieser wurde wiederum mittels des Chemilumineszenzsubstrats CSPD (3-(4-methoxyspiro(1,2-dioxetan-3,3-(5'-chloro)tricyclo-(3.3.1.1)decan)-4-yl)Phenylphosphat; Roche) nachgewiesen. Alle genannten Reagenzien wurden nach Angaben der Firma Roche, Mannheim, eingesetzt.

## 2.7. Analyse von Proteinen

### 2.7.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Reagenzien:

SDS-Probenpuffer: 125 mM Tris, 2 % 2-Mercaptoethanol, 10 % Glycerin, 1 mM EDTA  
pH 6,8, 0,005 % Bromphenolblau.

SDS-Laufpuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% SDS.

10% Trenngel: 9,7 ml Gel A (Roth, Karlsruhe), 4,0 ml Gel B (Roth), 7,5 ml 1,5M Tris-HCl (pH 8,8), 0,3 ml 10% SDS, 0,3 ml 10% APS, 8,1 ml H<sub>2</sub>O, 15 µl TEMED.

8,5% „High-Bis“-Gel: 6,2 ml Gel A (Roth), 4,3 ml Gel B (Roth), 5,3 ml 1,5M Tris-HCl (pH 8,8), 0,3 ml 10% SDS, 0,3 ml 10% APS, 5,7 ml H<sub>2</sub>O, 15 µl TEMED.

5% Sammelgel: 1,6 ml Gel A (Roth), 0,7 ml Gel B (Roth), 1,2 ml 1,0M Tris-HCl (pH 6,8), 0,1 ml 10% SDS, 0,1 ml 10% APS, 6,2 ml H<sub>2</sub>O, 15 µl TEMED.



Bei der SDS-PAGE werden Proteine in Gegenwart eines hohen SDS-Überschusses elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Dabei lagert sich das negativ geladene SDS in konstanten Gewichtsverhältnissen an die Proteine an und kompensiert deren positive Ladungen in einer Weise, dass alle Proteine entsprechend ihrer Größe zur Anode wandern. Nach Laemmli (Laemmli, 1970) werden die Probenproteine unter Verwendung eines diskontinuierlichen Puffersystems zunächst in einem niederprozentigen Sammelgel konzentriert und wandern von dort gemeinsam in das eigentliche Trenngel ein. Die Proteinproben wurden vor dem Aufbringen auf das Gel mit mindestens dem gleichen Volumen eines 2-fach konzentrierten SDS-Probenpuffers versetzt und 5 bis 10 Min. im Heizblock bei 100 °C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte in SDS-Laufpuffer bei 25-50 mA bis die Bromphenolblau-Bande gerade ausgelaufen war. Nach der SDS-PAGE wurden die aufgetrennten Proteine über eine Anfärbung des Gels mit Coomassie Brilliant Blau (2.7.2) direkt nachgewiesen bzw. nach Transfer auf eine Nylonmembran immunologisch detektiert (siehe 2.5.10).

### **2.7.2. Färbung mit Coomassie Brillant Blau**

Reagenzien:

Färbelösung: 45 % Methanol, 10 % Essigsäure, 0,25 % Coomassie Brilliant Blau R250.

Entfärbelösung: 45 % Methanol, 10 % Essigsäure.

Für die Anfärbung von aufgetrennten Proteinen mit Coomassie Brilliant Blau wurden die Proteingele nach der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mindestens 30 min lang bei 60°C in einer Färbelösung inkubiert. Anschließend wurden die gefärbten Gele bei 60°C oder RT in einer Entfärbelösung solange leicht geschüttelt, bis der Hintergrund klar und nur noch die Proteinbanden blau waren. Zur Konservierung wurden die Gele anschließend auf Whatman 3MM-Papier im Vakuum bei 70 °C für 2 Std. getrocknet.

### **2.7.3. Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation**

Partikuläre Antigene, die aus dem Überstand infizierter Zellen angereichert wurden, konnten über eine Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation physikalisch charakterisiert werden. Dazu wurden schrittweise Saccharosekissen (10-66 % (w/w) Saccharose) in einem Zentrifugenröhrchen unterschichtet und der Testüberstand in einem Volumen von 2 ml auf den Gradienten aufgetragen. Der Gradient wurde nach 2,5-stündiger Ultrazentrifugation in einem TH 641 Rotor (20 °C, 29.000 upm) in 600 µl Aliquots von oben

abgezogen. Diese Aliquots wurden anschließend immunologisch mittels konventioneller *Western Blot*-Analyse (2.5.10.) ausgewertet. Dazu wurden die enthaltenen Proteine mit 5% TCA (Trichloressigsäure) 2,5 Stunden auf Eis gefällt, die erhaltenen Präzipitate in SDS-Probenpuffer resuspendiert und auf einem 10%igem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (siehe 2.7.1.). Die Dichte der Saccharoselösung in den Fraktionen wurde über den Brechungsindex mit dem Refraktometer bestimmt.

#### 2.7.4. Neomycin-Phosphotransferase-Nachweis (Neotest)

Reagenzien:

Extraktionspuffer: 0,5M Saccharose, 0,1M Tris-HCl, 0,1% Ascorbinsäure, 0,1% Cystein-HCl, pH 7,5.

Reaktionspuffer: 67mM Tris, 42mM MgCl<sub>2</sub>, 400mM NH<sub>4</sub>Cl, und 1,67mM DTT; pH-Wert mit Maleinsäure auf 7,1 einstellen.

Laufpuffer: 50mM Natrium-Format, pH5,4.

Das Gen für Neomycin-Phosphotransferase (Neo) wird häufig als Selektionsmarker zur Herstellung von stabilen Zelllinien oder Virusmutanten benutzt. Zur Identifikation rekombinanter Viren, die das Neo-Resistenzgen exprimieren, kann anschließend der Neotest dienen. Dabei wird Kanamycin als Substrat für eine durch Neo katalysierte *in vitro*-Phosphorylierungsreaktion mit  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP eingesetzt. Das entstehende Kanamycin-Phosphat wird mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt (modifiziert nach Canabes-Bastos et al., 1989).

Subkonfluente HFF wurden mit rekombinanten Viren infiziert und ca. vier Tage p.i. abtrypsiniert. Das Zellpellet wurde in Extraktionspuffer resuspendiert und durch mehrmaliges Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff lysiert. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert und das klare Lysat in die Phosphorylierungsreaktion eingesetzt, die sich wie folgt zusammensetzt: 10  $\mu$ l Reaktionspuffer, 10  $\mu$ l Zellysat, 2  $\mu$ l Kanamycin (1mg/ml), 3  $\mu$ l ATP (200 $\mu$ M), 7,5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O und 0,6  $\mu$ l  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP (10 mCi/ml).

Nach 2-3 stündiger Inkubation bei 37°C wurden sukzessive drei 2 $\mu$ l-Aliquots des Reaktionsgemisches auf 20 x 20cm große Polyethylenimin-Dünnschichtchromatographie-Platten (Sigma, Deisenhofen) aufgetragen. Die Platten wurden zuvor in 5M NaCl entwickelt und anschließend mehrmals in H<sub>2</sub>O gewaschen, um überschüssiges NaCl zu entfernen. Nachdem die punktförmig aufgetragenen Reaktionsansätze angetrocknet waren, wurde die Platte in Laufpuffer entwickelt, bis die Lauffront ca. 15cm vom Auftragspunkt entfernt war. Danach wurde die Platte luftgetrocknet und die Phosphorylierung von Kanamycin mittels Autoradiographie ausgewertet.

### 2.7.5. Luciferase-Test

Der Luciferase-Test (Roche, Mannheim) dient zur quantitativen Messung der Expression von Luciferase aus dem Glühwürmchen *Photinus pyralis*. Um die Aktivierbarkeit viraler Promotoren messen zu können, wurde das Luciferase-Reportergen unter der Kontrolle dieser Promotoren in stabilen Zelllinien (siehe 2.3.1.) exprimiert. Zur Durchführung des Tests wurden die zu untersuchenden Zellen abtrypsiniert, mit PBS gewaschen, in PBS resuspendiert und gezählt.  $2,5 \times 10^4$  Zellen wurden in 50  $\mu$ l Lysepuffer resuspendiert und 15 Min. bei RT lysiert. Durch kurze Zentrifugation wurde der Zellschrott entfernt und je zwei Aliquots á 50  $\mu$ l in Luminometerröhrchen überführt, die bis zur Messung auf Eis gehalten wurden. Zu jedem Röhrchen wurden 100  $\mu$ l Luciferase-Reagenz (Roche, Mannheim) zupipettiert und die Lichtemission mit Hilfe eines Luminometers (Berthold) gemessen. Die Messung erfolgte über fünf Sekunden. Die gemessene Lichtemission ist ein Maß für die Luciferase-Aktivität und ist direkt proportional zur Promotoraktivierung.

### 2.7.6. *In vitro* Transkription und Translation

Die *in vitro* Transkription und Translation von Proteinen ausgehend von in T7-Vektoren klonierten Genen wurde mit Hilfe des kommerziell verfügbaren „TNT-Kits“ nach Herstellerangaben durchgeführt (Promega). Es wurden sog. „run-off“-Transkripte hergestellt, d.h. das Ende des Transkriptes entsprach der Stelle, an der die Ausgangs-DNA durch einen Restriktionsschnitt linearisiert wurde. Die Translation wurde mit Hilfe von Retikulozytenlysats durchgeführt.

## 2.8. Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden mit freundlicher Unterstützung von Dr. Robert Harris, Mainz, im Negativ-Färbe-Verfahren erstellt. Dazu wurden intakte und beschallte *Dense Bodies* in PBS zu einer Endkonzentration von 1  $\mu$ g/ $\mu$ l bis 200 ng/ $\mu$ l verdünnt. Die Negativfärbung wurde nach der Einzeltropfenmethode durchgeführt (Harris, 1997; Harris and Horne, 1991). Dazu wurden zunächst Kohlegitter durch 20 sekündiges Glühen entladen und anschließend die Probe aufgetropft. Nach einer Adsorptionsphase von 1 Min. wurden die Gitter fünf mal in destilliertem Wasser gewaschen und die Negativ-Färbelösung bestehend aus 5% (w/v) Ammonium-Heptamolybdat (pH 7.0) und 1% (wt/vol) Trehalose zugegeben. Die Transmissions-Elektronenmikroskopie wurde an einem Zeiss EM 900 bei 80 kV durchgeführt und auf Kodak EM Filmen, Typ 4489, dokumentiert. Die verwendeten Vergrößerungen waren 12.000-fach bis 50.000-fach.

### 3. Ergebnisse

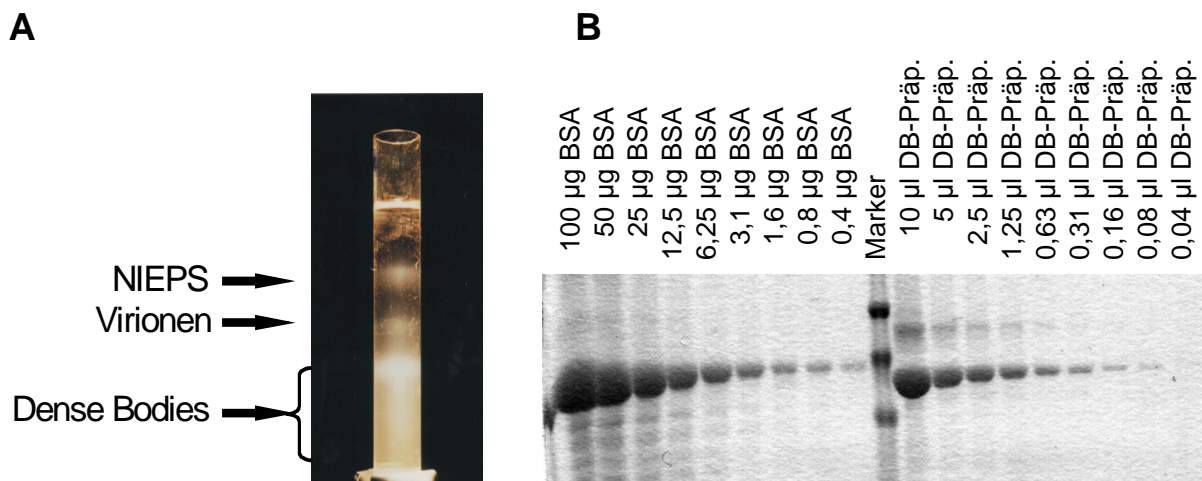
#### 3.1. Untersuchung des immunogenen Potentials von HCMV-Dense Bodies im Mausmodell

##### 3.1.1. Gradientenreinigung und Quantifizierung von Dense Bodies

Bereits seit den siebzigerer Jahren ist bekannt, dass HCMV-infizierte humane Fibroblasten (HFF) in Zellkultur mehrere Arten von Partikeln ausbilden (Craighead et al., 1972; Kanich & Craighead, 1972; Sarov & Abady, 1975; Fiala et al., 1976; ). Neben den intakten Virionen entstehen zusätzlich zwei Typen von defekten Partikeln, die als „Dense Bodies“ und als „NIEPS“ bezeichnet werden (siehe 1.1.5.). *Dense Bodies* (DB) sind umhüllte, sphärische Strukturen, die weder das virale Kapsid noch DNA enthalten (Craighead, 1972; Irmieri & Gibson, 1983). Sie wurden erstmals in elektronenmikroskopischen Aufnahmen HCMV-infizierter Zellen gesehen und aufgrund ihres Erscheinungsbildes als „dichte Körper“ bezeichnet. Sie setzen sich aus den viralen Tegumentproteinen zusammen, von denen das immundominante Phosphoprotein pp65 ca. 95% der Proteinmasse ausmacht. Diese innere Struktur wird von einer Lipidmembran umhüllt, in die die viralen Glykoproteine, darunter gB und gH, eingelagert sind. DB werden wie Virionen von der infizierten Zelle freigesetzt und können somit aus dem Überstand infizierter permissiver Zellen aufgereinigt werden. Zur Untersuchung der Immunogenität von DB im Versuchstier wurden die gebildeten Viruspartikel durch Ultrazentrifugation aus dem Zellkulturüberstand abgetrennt und auf einen Glycerin-Natriumtartrat-Gradienten aufgeschichtet (Talbot & Almeida, 1977; Irmieri & Gibson, 1983). Nach 2-stündiger Zentrifugation bei 23.000 upm in einem TH641-Rotor trennte sich das Partikelgemisch in drei Banden auf (Abb.3.1. A). Die NIEPS und die Virionen sedimentierten als scharfe Zonen im oberen Bereich des Gradienten, während die DB aufgrund ihrer heterogenen Größe in einer breiten Bande im unteren Bereich zu finden waren. Aus dieser Bande wurden die DB abgezogen, abzentrifugiert, in PBS resuspendiert und bei -70°C gelagert.

Für alle nachfolgenden Experimente war es unerlässlich, die DB-Präparationen zu quantifizieren. Die gängigen Methoden zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry und Bradford eigneten sich zur Quantifizierung nicht, da es nicht möglich war, DB in den zur Durchführung der Teste notwendigen Konzentrationsbereichen und mit den tolerierten Mengen an Detergens zu lösen. Daher wurde ein Normierungsverfahren entwickelt. Da pp65 >95% der DB-Masse ausmacht, wurde der Proteingehalt der DB-Präparationen auf ihren pp65-Gehalt normiert. Dazu wurden serielle Verdünnungen einer DB-Präparation neben seriellen Verdünnungen von bovinem Serumalbumin (BSA) auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (Abb. 3.1. B). Nach Anfärbung mit Coomassie-

Brilliant-Blau wurde der pp65-Gehalt pro  $\mu\text{l}$  DB-Präparation durch Vergleich der Bandenstärke von pp65 (65 kD) und BSA (68 kD) mit Hilfe der TINA Software (Raytest) errechnet. Mit diesem Verfahren konnten DB-Präparationen durch Standardisierung auf ihren pp65-Gehalt quantifiziert werden. Alle untersuchten DB-Präparationen lagen im Bereich von 1-5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .



**Abb. 3.1.:** **A:** Gradientenreinigung von HCMV-Partikeln aus dem Zellkulturüberstand infizierter Fibroblasten. Die NIEPS und Virionen bandierten scharf, während sich die DB aufgrund ihrer heterogenen Größe in einem breiten, lichtbrechenden Bereich anordneten.

**B:** Coomassie-Brilliant-Blau gefärbtes SDS-Gel zur Quantifizierung von DB im Vergleich zu BSA. Es wurden serielle Verdünnungen von DB und BSA als Standard aufgetragen, um die DB-Präparationen auf ihren pp65-Gehalt zu normieren. Für die gezeigte Präparation wurde eine DB-Konzentration von 2,4  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  ermittelt.

### 3.1.2. Aufnahme von *Dense Bodies* in eine Vielzahl von Zelltypen

Aus Arbeiten von Schmolke et al. war bekannt, dass DB des HCMV in humane Fibroblasten (HFF) genauso effizient aufgenommen werden wie Virionen (Schmolke et al., 1995 a). Diese Aufnahme wird durch die Hülle, mit der die Partikel umgeben sind, vermittelt (Topilko & Michelson, 1994). Bevor die Eignung von DB als Antigen zur Herstellung einer HCMV-Vakzine im Tiermodell näher analysiert wurde, sollte geprüft werden, ob die zelluläre Aufnahme von DB eine spezifische Eigenschaft von humanen Fibroblasten ist, oder auch auf professionell antigenpräsentierende Zellen (APZ) zutrifft. Zudem sollte geklärt werden, ob der Proteintransfer speziesspezifisch für humane Zellen ist oder analog auf das Mausmodell übertragen werden kann. Neben HFF wurden stellvertretend humane lymphoblastoide Zellen (LCL) als klassische APZ des humanen Systems, primäre (MEF) und immortalisierte (Balb/c-3T3) Mausfibroblasten sowie P815-Mastozytom-Zellen als professionelle APZ des murinen Systems untersucht. Dazu wurden adhärent wachsende

Zellen (HFF, MEF, 3T3) auf Deckgläschen ausgesät und über Nacht mit ca. 0,1-1 µg DB pro  $1 \times 10^4$  Zellen inkubiert. Die Suspensionszellen (LCL, P815) wurden mit 5-20 µg DB pro  $5 \times 10^5$  Zellen über Nacht inkubiert und am nächsten Tag auf Objektträger aufzentrifugiert. Alle Zellen wurden mit 90% Aceton fixiert. Die Lokalisation des Tegumentproteins pp65, des Hauptbestandteils der DB, wurde in einer Immunfärbung analysiert. In den adhären wachsenden Zellen wurde pp65 mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers (mAK) p65-33 durch indirekte Immunfluoreszenz mit einem FITC-konjugierten Sekundärantikörper nachgewiesen. In den Suspensionszellen wurde pp65 mit Hilfe des Clonab-CMV-Systems (Biotest, Dreieich) detektiert, um die Spezifität des Signals zu erhöhen. Dieser Test wurde analog zum Nachweis von pp65 in Granulozyten HCMV-infizierter Patienten durchgeführt (Antigenämie-Test; Grefte et al., 1992).

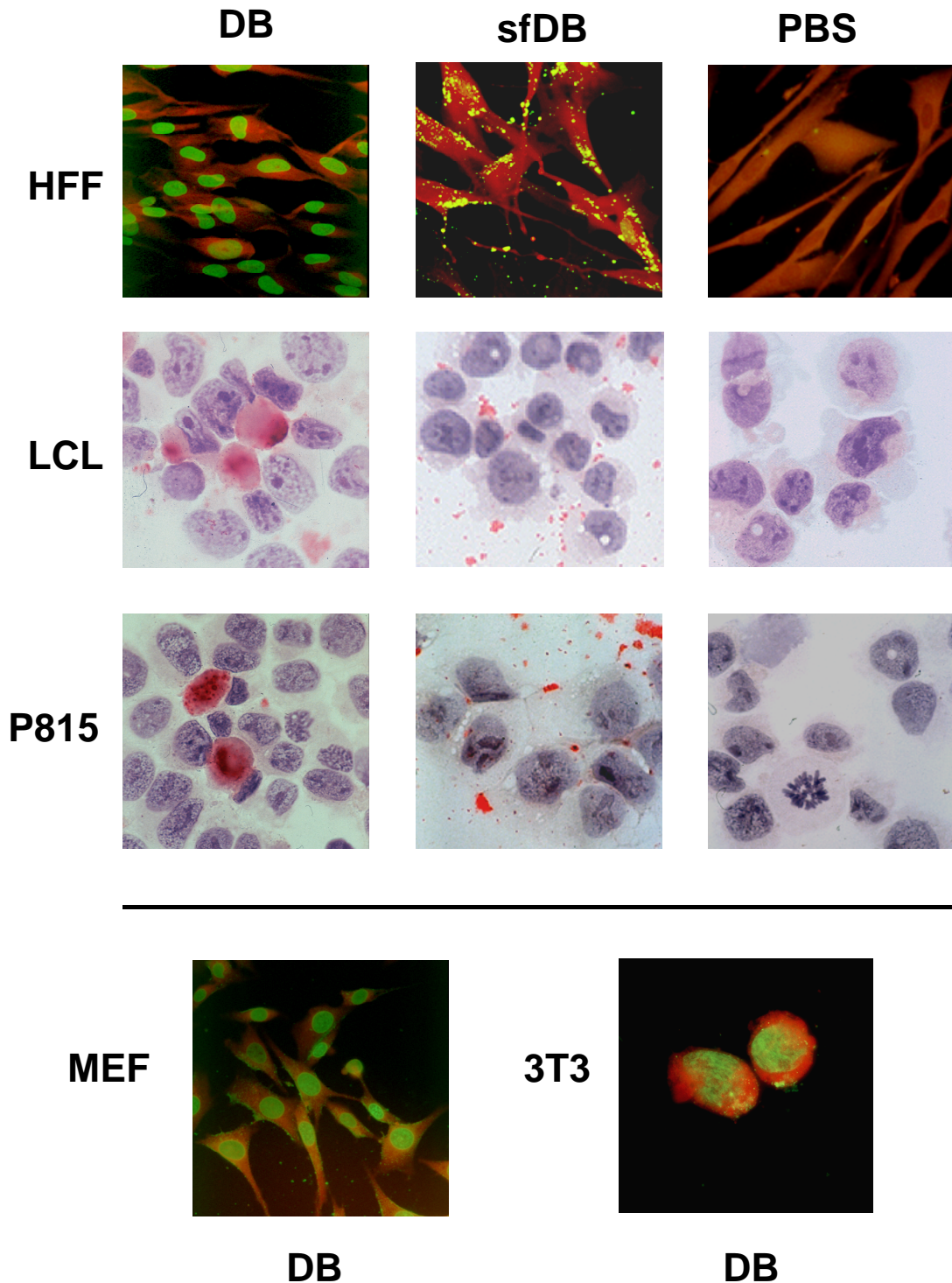
Bei allen untersuchten Zelltypen zeigte sich nach der jeweiligen Immunfärbung mit dem gegen pp65 gerichteten mAK ein deutliches Kernsignal (Abb. 3.2.; erste Spalte + untere Bildhälfte). Der Nachweis von pp65 im Zellkern von Mausfibroblasten bewies, dass die Aufnahme von DB in die Zelle kein speziesspezifischer Prozess ist. Darüber hinaus drangen DB auch in professionelle APZ beider Spezies ein. Obwohl der Großteil an pp65 im Nukleus detektiert wurde, schien in diesen Zellen auch über dem Zytoplasma ein spezifisches Signal nachweisbar zu sein. Dies deutete darauf hin, dass ein Teil von pp65 zytoplasmatisch verblieb. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass DB effizient in eine Vielzahl von Zelltypen hämatopoetischen und nicht hämatopoetischen Ursprungs sowohl humaner als auch muriner Herkunft aufgenommen wurden.

### **3.1.3. Verhinderung der Aufnahme von DB in die Zelle durch mechanische Behandlung der Partikel (sfDB)**

Eine Ausgangshypothese dieser Arbeit war, dass die zelluläre Aufnahme die Immunogenität von DB verstärkt und diese Partikel daher ein vielversprechendes Antigen-transportsystem zur Entwicklung einer rekombinanten Vakzine gegen HCMV darstellen könnten. Um den Einfluß der zellulären Aufnahme auf die Immunogenität der Partikel testen zu können, sollten Bedingungen definiert werden, die die zelluläre Aufnahme der DB unterbinden, ohne gleichzeitig ihre partikuläre Struktur zu beeinträchtigen. Dies sollte durch Zerstörung der Lipidhülle möglich sein. Es wurden sowohl Detergentien wie 1% NP40 und 1% SDS, als auch mechanische Aufschlußverfahren getestet. Eine 5 minütige Intervall-Ultraschallbehandlung mit einer Stabsonde in einem *Branson Sonifier (output control 2,5; duty cycle 30%)* gefolgt von zehnmaligem Kälteschock in flüssigem Stickstoff erwies sich als die geeignetste Methode.

Diese physikalische Behandlung wurde gewählt, um mögliche toxische Effekte des Antigens nach Immunisierung von Versuchstieren durch Reste an Detergens zu vermeiden. Derart behandelte DB wurden im folgenden mit sfDB (*sonified and freeze/thawed* DB) bezeichnet. Vor jedem der nachfolgenden Experimente, in denen sfDB verwendet wurden, wurde überprüft, ob die Partikel noch in der Lage waren, in Zellen einzudringen. Dazu wurden in Analogie zu dem unter 3.1.2. beschriebenen Experiment verschiedene humane und murine Zelltypen mit sfDB inkubiert und die Lokalisation des Hauptbestandteils der DB, des Tegumentproteins pp65, in den Zellen untersucht. Während nach Inkubation mit intakten DB ein deutliches Kernsignal von pp65 zu sehen war, konnte nach Inkubation mit sfDB keine Kernfärbung detektiert werden (Abb. 3.2.; zweite Spalte). Vielmehr schien sich bei den Fibroblastenpräparaten ein spezifisches, granuläres Signal in enger Nachbarschaft der Zytoplasmamembran zu befinden. Bei den Zytospinpräparaten wurden ähnliche Strukturen, die losgelöst von der Membran zwischen den Zellen lagen, angefärbt. Obwohl aufgrund der begrenzten Sensitivität dieser Färbungen nicht gänzlich ausgeschlossen werden konnte, dass eine Teilmenge der sfDB auch nach der Ultraschallbehandlung noch in die Zellen aufgenommen wurde, zeigten diese Ergebnisse, dass die gewählte Behandlung in der Tat dazu führte, dass nach Inkubation von Zellen mit sfDB der Proteintransport in die Zelle drastisch reduziert war. Ursache dafür war höchstwahrscheinlich eine Beschädigung der glykoproteinhaltigen Lipidmembran der Partikel.

Es konnten somit zwei Antigenpräparationen dargestellt werden, die sich in Bezug auf ihre zelluläre Aufnahme deutlich voneinander unterschieden. Dieser Unterschied wurde bei allen untersuchten Zelltypen in analoger Weise beobachtet (Abb. 3.2.).



**Abb. 3.2.:** Lokalisation des pp65-Proteins nach Inkubation verschiedener humaner und muriner Zelltypen mit DB und sfDB. Die adhärenenten Zelltypen HFF, Balb/c-3T3 (3T3) und MEF wurden auf Deckgläschen ausgesät und mit DB, sfDB oder PBS über Nacht inkubiert. Nach der Fixierung der Zellen wurde die Lokalisation von pp65 (UL83) mit Hilfe des murinen mAKs p65-33 und einem FITC-gekoppelten Zweitantikörper detektiert. Die Suspensionszellen P815 und LCL wurden ebenfalls über Nacht mit DB, sfDB oder PBS inkubiert. Von diesen Zellen wurden Zytospinpräparate angefertigt und der Verbleib des Hauptbestandteils der DB (pp65) durch Inkubation mit dem Clonab-anti-pp65 Antikörper und anschließender APAAP-Färbung sowie dem Chromogen Neofuchsin (Biotest, Dreieich) nachgewiesen.



### 3.1.4. Verlust der Infektiosität von Virionen durch mechanische Behandlung

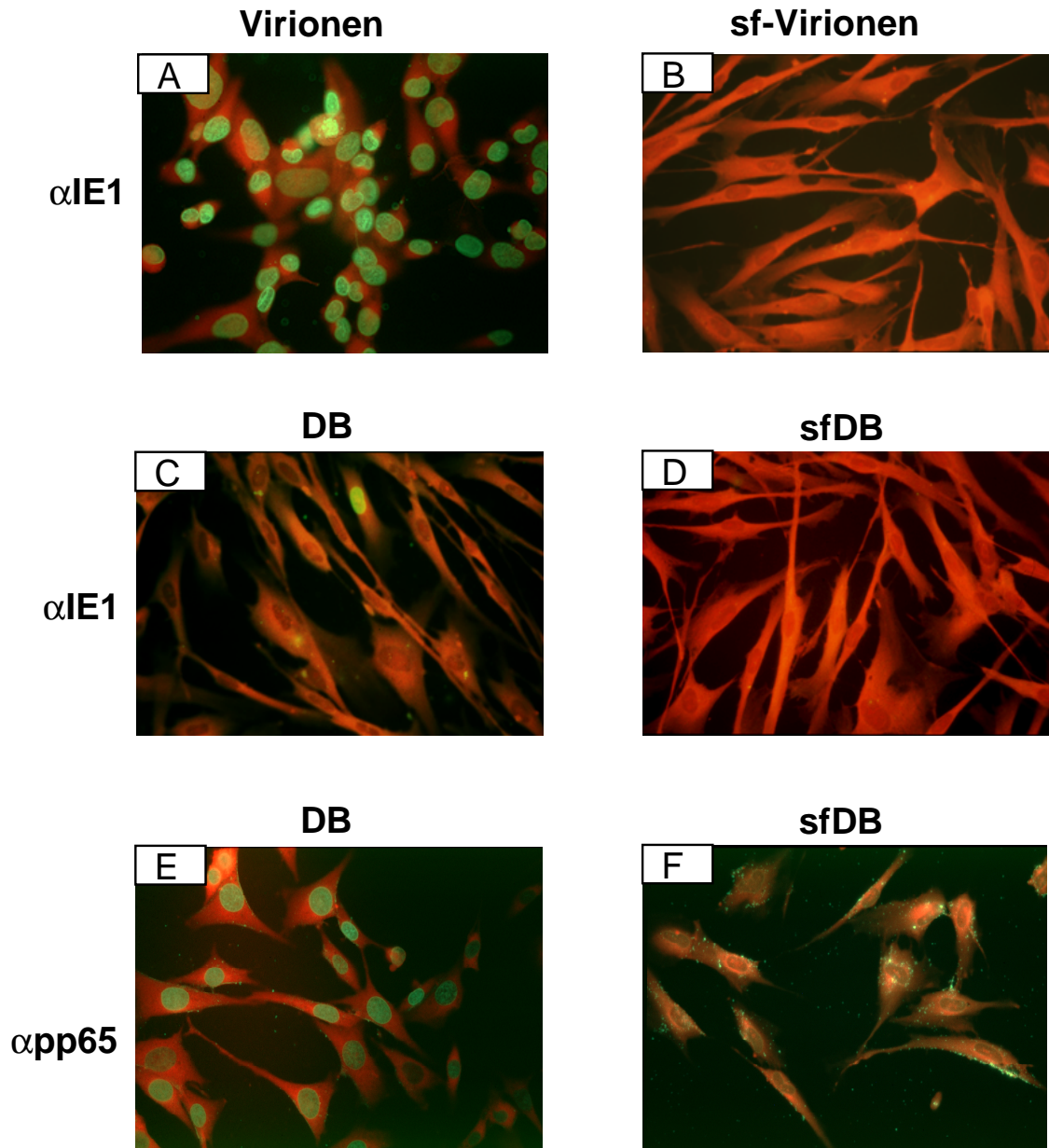
Der Nachweis passiv aufgenommenen Proteins ist insensitiv. Aufgrund der hohen Aktivität des *major immediate early*-Promotors (MIEP) von HCMV ist der Nachweis des neusynthetisierten IE1-Proteins deutlich sensitiver. Das IE1-Protein ist ein sehr früh exprimiertes Nicht-Strukturprotein mit transaktivierenden Eigenschaften. Es ist weder im Virion-Partikel noch im *Dense Body*-Partikel enthalten, sondern es wird im Zuge einer aktiven Virusreplikation in infizierten Zellen bereits unmittelbar nach Infektion synthetisiert. Da angenommen wird, dass DB und Virionen auf die gleiche Weise in Zellen eindringen (Topilko & Michelson, 1994), wurde die Effizienz der mechanischen Behandlung von HCMV-Partikeln stellvertretend an der Reduktion der IE1-Expression mechanisch behandelte Virionen analysiert.

Die Hälfte einer Präparation gradientengereinigter Virionen wurde, wie bereits unter 3.1.3. für DB beschrieben, mit Ultraschall behandelt und zehnmal in flüssigem Stickstoff eingefroren (sfV). Je  $10^4$  HFF wurden auf Deckgläschen ausgesät und am folgenden Tag mit etwa 100 pfu/Zelle von beiden Virionpräparationen infiziert. 16 Stunden nach Infektion wurden die Zellen mit 90% Aceton fixiert und auf die Expression von IE1 hin untersucht. Dazu wurde eine indirekte Immunfluoreszenzanalyse mit dem IE1-spezifischen monoklonalen Antikörper p63-27 durchgeführt. Es zeigte sich, dass 16 Stunden nach Infektion bereits eine Vielzahl der Zellen, die mit unbehandelten Virionen (V) infiziert worden waren, große Mengen des IE1-Proteins im Zellkern exprimierten (Abb. 3.3. A). Im Gegensatz dazu wiesen Zellen, die mit den mechanisch behandelten Virionen (sfV) infiziert worden waren, keine IE1-Expression mehr auf (Abb. 3.3. B). Dieser dramatische Unterschied in der IE1-Expression war ein deutlicher Hinweis darauf, dass die Virionen nach mechanischer Behandlung ihr virales DNA-Genom nicht mehr in die Zelle einschleusen konnten und somit keine Infektion in den Zellen gesetzt werden konnte. Es konnte somit gezeigt werden, dass nach mechanischer Behandlung von Virionen und DB die Translokation von viraler DNA und viralen Proteinen in eukaryote Zellen aufgehoben war.

### 3.1.5. Untersuchung der Reinheit der *Dense Body*-Präparationen

Es ist bekannt, dass Zellen muriner Herkunft für eine Infektion mit dem humanen Cytomegalovirus nicht permissiv sind. Daher hätten allenfalls massive Kontaminationen der DB-Präparationen mit Virionen, die im Vergleich zu DB eine andere Proteinzusammensetzung aufweisen, einen Einfluß auf den Ausgang der

Immunisierungsexperimente haben können. Um diese theoretische Möglichkeit formal auszuschließen, wurde die Reinheit der DB-Präparationen untersucht. Dazu wurden wiederum je  $10^4$  HFF auf Deckgläschen ausgesät und am folgenden Tag mit je 2  $\mu\text{g}$  DB und 2  $\mu\text{g}$  sfDB inkubiert. Als Nachweis für eine Kontamination mit Virionen diente die Expression des IE1-Proteins. Bei einer Immunfluoreszenzanalyse mit dem IE1-spezifischen Antikörper p63-27 zeigten sich 16 Stunden nach Inkubation erstaunlicherweise nur auf zwei von zehn Deckgläschen je 1-2 IE1-positive Zellen (Abb. 3.3. C). Nach Beschallung und Einfrieren der DB-Präparation war in den zehn untersuchten Parallelansätzen keine einzige IE1-positive Zelle mehr zu finden (Abb. 3.3. D). Da dieser IE1-Nachweis sehr sensitiv ist, wies der Befund auf eine extrem niedrige Kontamination der DB-Präparationen mit Virionen hin. Diese minimale Kontamination konnte für die folgenden Immunisierungsstudien vernachlässigt werden, insbesondere in Anbetracht der Tatsache, dass nach Applikation von Virionen in der Maus keine Virusvermehrung stattfindet und somit durch kontaminierende Virionen lediglich annähernd die gleichen Strukturproteine eingebracht werden, die auch in DB enthalten sind. Zur Kontrolle der eingesetzten DB-Menge wurde in Parallelansätzen das Strukturprotein pp65 nachgewiesen. Wie in Abb. 3.3. E zu sehen ist, wiesen nahezu alle Zellkerne nach Inkubation mit DB ein starkes nukleäres pp65-Signal auf. Dies bestätigte, dass die Zellen mit ausreichenden Mengen an DB inkubiert worden waren, um die Reinheit der sfDB-Präparation beurteilen zu können.



**Abb. 3.3.:** **A+B:** Reduktion der Infektiosität von Virion-Präparationen durch mechanische Behandlung (Sonifizierung und anschließendes mehrfaches Einfrieren in flüssigem Stickstoff; sf). HFF wurden auf Deckgläschen ausgesät und mit Virionen (A) und sf-Virionen (B) über Nacht inkubiert. Nach Fixierung der Zellen wurde die Expression des IE1-Proteins mit Hilfe des murinen mAKs p63-27 und einem FITC-konjugiertem Sekundärantikörper nachgewiesen.

**C-F:** Analyse der Virionkontamination von *Dense Body*-Präparationen. HFF wurden auf Deckgläschen ausgesät und über Nacht mit DB und sfDB inkubiert. Gezeigt sind analoge Immunfluoreszenzanalysen mit dem IE1-spezifischen mAK p63-27 (C+D) als Maß für die Virionkontamination und dem pp65-spezifischen mAK p65-33 als Kontrolle der eingesetzten DB-Menge (E+F).

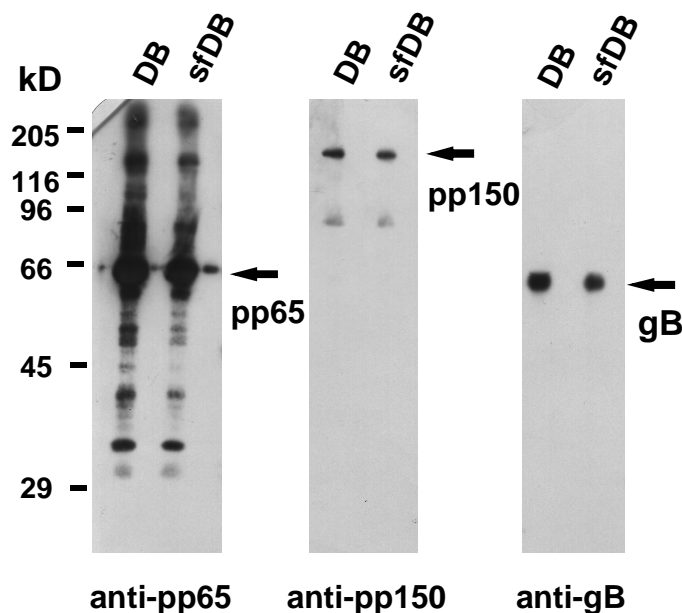
### 3.1.6. Vergleichende Analyse der physikalischen Eigenschaften von DB und sfDB

Eines der wichtigsten Ziele dieser Arbeit war es, das Potential von DB zur Stimulation der humoralen und zellulären Immunantwort in einem Kleintiermodell abzuklären. Dabei sollte insbesondere die Frage beantwortet werden, ob die zelluläre Aufnahme der DB ihre Immunogenität erhöht. Nachdem gezeigt werden konnte, dass die mechanische Behandlung die Struktur der DB in einer Weise veränderte, die keine zelluläre Aufnahme mehr erlaubte, sollte überprüft werden, ob die partikuläre Struktur oder die Proteinzusammensetzung der Partikel in irgendeiner Form beeinträchtigt worden war. Idealerweise sollten sich die DB von den sfDB nur in einer einzigen Eigenschaft, nämlich der Fähigkeit, in Zellen einzudringen, voneinander unterscheiden. Eventuelle Unterschiede in der Immunogenität beider Antigene können somit auf diese Eigenschaft zurückgeführt werden.

Zunächst wurde untersucht, ob die mechanische Behandlung zu einer signifikanten Degradation einzelner Proteinkomponenten geführt hatte. Dazu wurden DB und sfDB einer vergleichenden *Western Blot*-Analyse unterzogen. Als representative Bestandteile von DB wurden die Tegumentproteine pp65 und pp150 sowie das Glykoprotein B mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern nachgewiesen (Abb. 3.4.). Es zeigten sich keine Anzeichen von Proteindegredation. Die untersuchten Polypeptide pp65, pp150 und gB waren in DB und in sfDB in vergleichbaren Mengen vorhanden. Mit dem pp65-spezifischen mAK wurden neben der 65-kD-Bande noch zusätzliche Banden sichtbar, deren Herkunft nicht geklärt werden konnte. Da diese Banden jedoch sowohl in der DB-, als auch in der sfDB-Präparation auftraten, lag nahe, dass sie aus der Überladung der Spuren mit Protein resultierten und nicht das Ergebnis einer Degradation von pp65 waren. Während das Tegumentprotein pp65, der Hauptbestandteil der DB, in großen Mengen nachweisbar war, waren das Tegumentprotein pp150 und das Glykoprotein B weniger abundant vorhanden. Dennoch sollte darauf hingewiesen werden, dass das Phosphoprotein pp150, wenn auch als minorer Bestandteil, stets in DB-Präparationen nachgewiesen werden konnte. Die Literaturdaten, ob pp150 in DB inkorporiert wird, sind noch inkonsistent (Irmiere und Gibson, 1983; Baldick & Shenk, 1996).

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Proteinbestandteile nach mechanischer Behandlung unverändert vorlagen, wurde die Feinstruktur der Partikel näher untersucht. Es ist bekannt, dass partikuläre Antigene in der Regel immunogener sind als lösliche Proteine (Speidel et al., 1997; Kovacsovics et al., 1993; Pfeifer et al., 1993). Dieser Effekt beruht darauf, dass partikuläre Antigene leichter als lösliche Proteine zu einer Vernetzung von Oberflächenmolekülen auf Zellen des Immunsystems führen und die nachgeschalteten

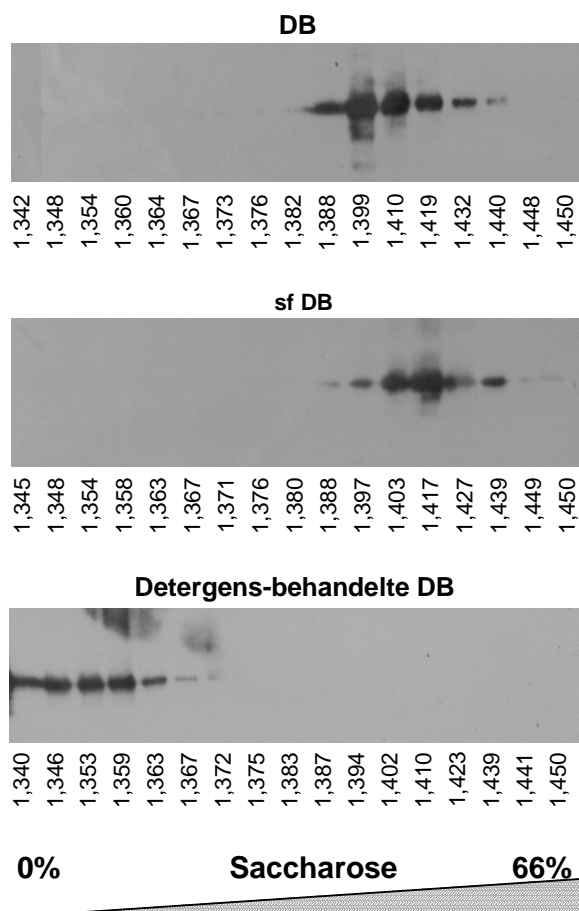
Signaltransduktionswege daher stärker aktiviert werden. Darüber hinaus werden partikuläre Antigene auch besser phagozytiert als lösliche Proteine und somit auf effizientere Weise in den MHC Klasse II-Präsentationsweg eingeschleust.



**Abb. 3.4.:** Vergleichende *Western Blot*-Analyse von DB und sfDB. DB und sfDB wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Die Filtertriplikate wurden zum Nachweis der viralen Reporterproteine pp65, pp150 und gB mit den murinen mAK p65-33, XP1 und 27-287 inkubiert. Die Bindung dieser Primärantikörper wurde mit einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper detektiert und mittels ECL-Chemilumineszenz sichtbar gemacht. Die Pfeile geben die Lage der untersuchten Proteine an.

Zur Klärung der Frage, ob die Aufnahme von DB in die Zelle deren Immunogenität erhöht, schien es daher wichtig zu zeigen, dass die partikuläre Struktur bei den sfDB nicht beeinträchtigt worden war. Diese Frage wurde zunächst mit Hilfe einer Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation untersucht. Mit dieser Methode lassen sich lösliche Proteine, die nicht in den Gradienten einwandern, von partikulären Strukturen, die gemäß ihrer Dichte im Gradienten sedimentieren, unterscheiden. DB, sfDB und als Kontrolle Detergens-behandelte DB (2% SDS/ 2%  $\beta$ -Mercaptoethanol) wurden auf einen 0 bis 66-prozentigen (wt/wt) Saccharosegradienten aufgeschichtet. Nach einer 2,5-stündigen Ultrazentrifugation bei 29.000 upm in einem TH641-Rotor wurden die Gradienten fraktioniert, die Proteine aus den verschiedenen Fraktionen mit TCA präzipitiert und einer *Western Blot*-Analyse mit dem pp65-spezifischen Antikörper p65-33 unterzogen (Abb.3.5.). Wie erwartet, führte die stringente Detergens-Behandlung mit SDS und  $\beta$ -ME dazu, dass die DB-Proteine denaturierten und somit die Partikel in ihre einzelnen Proteinbestandteile dissoziierten. Diese flottierten auf dem Gradienten. Im Gegensatz dazu bandierten DB und sfDB bei vergleichbaren Dichten. Dies wies darauf hin, dass beide Präparationen

partikulärer Natur waren und vergleichbare physikalische Eigenschaften besaßen. Jedoch fiel wiederholt auf, dass die Hauptbande der sfDB bei einem Saccharosegehalt von 48% (Brechungsindex 1.417), die Hauptbande der intakten DB bei 40% Saccharose (Brechungsindex 1.399) nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.5.).

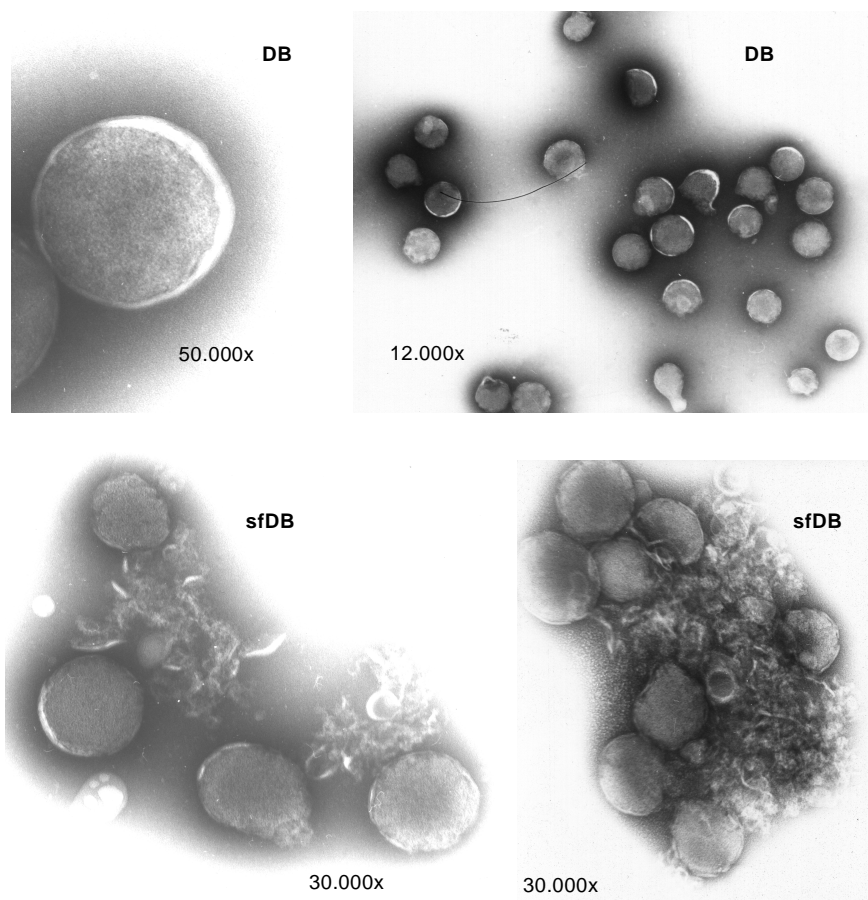


**Abb. 3.5.:** Analyse des Sedimentationsverhaltens von DB, sfDB und Detergens-behandelten DB in einem 0-66% (wt/wt) Saccharose-Dichtegradienten. DB, sfDB und Detergens-behandelte DB wurden in PBS resuspendiert und auf den Saccharosegradienten geschichtet. Die Zentrifugation erfolgte wie unter 2.7.3. beschrieben. Die Fraktionen wurden von oben entnommen, mit TCA präzipitiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Zur Visualisierung der DB-Fraktionen wurde eine *Western Blot*-Analyse mit dem pp65-spezifischen mAK p65-33 durchgeführt. Die Zahlen unter den Filtern geben den Brechungsindex jeder Fraktion als Maß für die Saccharose-konzentration an.

Um einen Hinweis auf das leicht veränderte Sedimentationsverhalten zu erhalten, wurden die verschiedenen Partikelpräparationen elektronenmikroskopisch betrachtet. Es wurde ein Negativ-Färbeverfahren mit Ammoniumheptamolybdat und Trehalose als Kontrastmittel verwendet. In der DB-Präparation fanden sich die typischen sphärischen, elektronendichten Strukturen, die von einer Lipidmembran umhüllt waren. Die Partikel lagen alle

einzelnen vor. In der sfDB-Präparation waren ebenfalls elektronendichte Partikel, ähnlich der internen Struktur von DB, zu sehen. Jedoch war keine regelmäßige Lipidmembran um die spärlichen Strukturen herum zu erkennen. Stattdessen schienen die Partikel aneinander zu kleben. Abgelöste Membranfragmente lagen aggregiert in den Zwischenräumen (Abb. 3.6.). Diese elektronenmikroskopischen Aufnahmen legten zusammen mit der Dichte-Gradienten-Zentrifugation die Vermutung nahe, dass Beschallung und Kälteschock-Behandlung die Lipidmembran, die die DB umhüllt, aufgerissen hatte. Durch Kontakt zwischen den Tegumentproteinen kam es offensichtlich zu Adhäsion und Aggregation der Partikel. Diese Aggregation störte vermutlich die Fusion zwischen DB-Membran und Zellmembran, so dass sfDB nicht mehr in der Lage waren, in das Innere der Zelle transloziert zu werden.

Die beiden Antigenpräparationen unterschieden sich also weder in ihrer Proteinzusammensetzung noch bezüglich ihrer partikulären Struktur. Der einzige Unterschied bestand in der veränderten Translokation von Proteinbestandteilen in humane und murine Zellen.



**Abb. 3.6.:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen der DB und sfDB-Präparationen. Für das Negativfärbeverfahren wurde eine Färbelösung mit 5% (wt/vol) Ammoniumheptamolybdat und 1% (wt/wt) Trehalose verwendet. Die für die Fotodokumentation verwendeten Vergrößerungen sind angegeben.

### 3.1.7.            **Untersuchung der neutralisierenden Antikörper-Antwort in der Maus nach Immunisierung mit DB**

Die neutralisierende Antikörper-Antwort, die im Zuge einer natürlichen HCMV-Infektion induziert wird, beeinflusst den Verlauf einer nachfolgenden HCMV-Infektion positiv. Neutralisierende Antikörper scheinen die immunologischen Effektoren zu sein, die fetale Mißbildungen durch eine maternale HCMV-Infektion während der Schwangerschaft verhindern können (Yaeger et al., 1981; Werner et al., 1993; Adler et al., 1995; Boppana et al., 1995; Snyderman et al., 1995; Falagas et al., 1997). Darüber hinaus korrelieren derartige Antikörper mit dem Ausgang einer HCMV-Infektion bei Transplantat-Empfängern (Schoppel et al., 1998).

Da HCMV-neutralisierende Antikörper sowohl für den Ausgang einer Primärinfektion, einer Reinfektion als auch im Falle von Rekurrenz des Virus aus dem Stadium der Latenz eine entscheidende Rolle spielen, sollte in einer ersten Serie von Experimenten geprüft werden, ob eine Immunisierung mit DB zur Induktion von signifikanten Spiegeln an neutralisierenden Antikörpern führt. Darüber hinaus sollte geklärt werden, ob die Aufnahme von DB in die Zelle einen Einfluß auf die resultierenden Antikörpertiter hat. Dazu wurden Balb/c-Mäuse mit verschiedenen Konzentrationen an DB und sfDB einmalig intraplantar in die linke Hinterpfote ohne Zugabe von Adjuvans immunisiert. Nach 55 Tagen wurde den Tieren unter Ether-Narkose Vollblut durch Herzpunktion entnommen und abesert. Anschließend wurden die gewonnenen Seren in Neutralisationstesten auf ihren Gehalt an HCMV-neutralisierenden Antikörpern hin untersucht (modifiziert nach Andreoni et al., 1989). Zum Teil wurden die Seren von Tieren einer Gruppe vereinigt. Es wurden diejenigen Serumverdünnungen bestimmt, die zu vollständiger ( $V/V_0=1$ ) bzw. 50%iger ( $V/V_0=0,5$ ) Reduktion der eingesetzten Infektiosität (=Neutralisation) führten (siehe 2.5.8.). Tabelle 3.1. gibt einen Überblick über die erhaltenen Ergebnisse.

Mäuse, die 2 µg bzw. 20 µg DB als Antigen erhalten hatten, wiesen einen 50%-Neutralisationstiter im Bereich von 1:384 bis 1:768 auf (Tabelle 3.1.). Zwischen der Gabe von 2 µg oder 20 µg DB zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Überraschenderweise waren also bereits 2 µg dieses Totantigens, das in einer einzigen intraplantaren Dosis ohne Adjuvans verabreicht worden war, ausreichend, um eine deutliche neutralisierende Antikörper-Antwort hervorzurufen. Dies deutet auf ein hohes immunogenes Potential der Partikel hin. Da selbst die zehnfache Antigendosis nicht zu höheren Neutralisationstitern führte, wurde offensichtlich ein Plateau der Immunantwort erreicht. Selbst sehr geringe Antigenmengen wie 0,2 und 0,02 µg DB führten zur Induktion neutralisierender Antikörper (50%-Werte von 1:96 bis 1:192).



**Tabelle 3.1.:** Reduktion der eingesetzten Infektiosität ( $V/V_0$ ) durch Inkubation mit murinen Seren, die 55 Tage nach subkutaner Immunisierung mit DB und sfDB gewonnen wurden.

Antigen <sup>a</sup>	Maus #	$V/V_0 = 1^b$	$V/V_0 = 0.5^c$	Antigen	Maus #	$V/V_0 = 1$	$V/V_0 = 0.5$
<b>20µg DB</b>	1-3 (v) <sup>d</sup>	1:96	1:768	<b>20µg sfDB</b>	1-3 (v)	1:24	1:192
	4	1:48	1:384		4	1:12	1:192
	5	1:48	1:384		5	1:24	1:192
	6	1:48	1:384		6	1:24	1:192
<b>2µg DB</b>	1-3 (v)	1:96	1:768	<b>2µg sfDB</b>	1	1:6	1:96
	4	1:48	1:384		2	1:6	1:96
	5	1:48	1:384		3	0	1:24
	6	1:48	1:384				
<b>0,2µg DB</b>	1	1:24	1:192	<b>0,2µg sfDB</b>	1	0	1:24
	2	1:12	1:192		2	0	1:12
	3	1:12	1:192		3	0	1:6
<b>0,02µg DB</b>	1	0	1:96	<b>0,02µg sfDB</b>	1	1:6	1:24
	2	1:12	1:96		2	0	1:6
	3	1:12	1:96		3	0	0
	Präimmunsrum	0	0				

<sup>a</sup> Antigen, das für die einmalige subkutane (intraplantare) Immunisierung verwendet wurde; das jeweilige Antigen wurde in PBS resuspendiert und ohne Adjuvans verabreicht.

<sup>b</sup>  $V/V_0 = 1$ ; letzte Serumverdünnung die zu vollständiger Reduktion der eingesetzten Infektiosität führte.

<sup>c</sup>  $V/V_0 = 0,5$ ; letzte Serumverdünnung die zu einer 50%-igen Reduktion der eingesetzten Infektiosität führte.

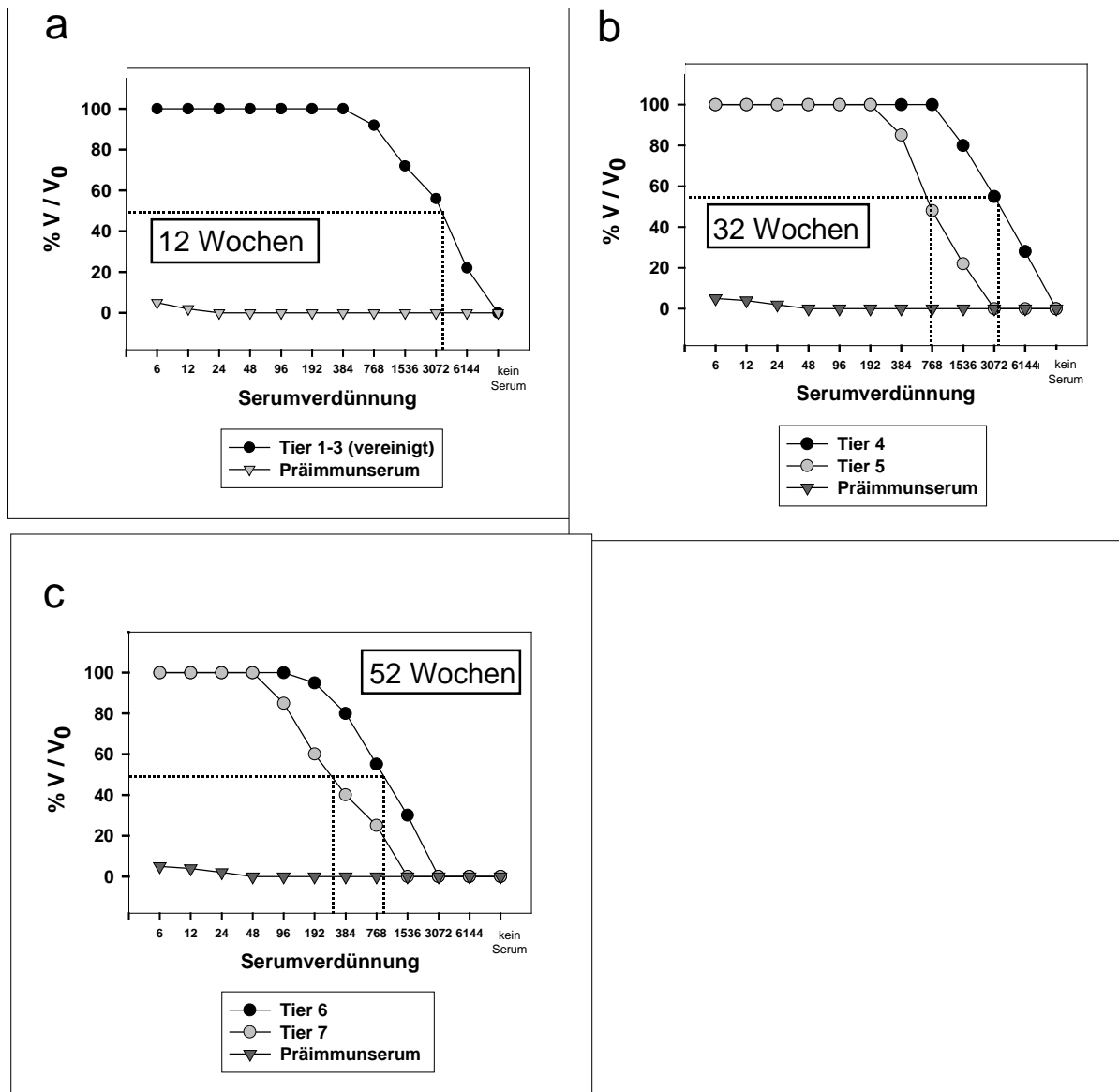
<sup>d</sup> Die Seren dieser drei Tiere wurden vor der Analyse vereinigt (v).

Die Immunisierung mit sfDB führte ebenfalls zur Ausbildung neutralisierender Antikörper im Serum der untersuchten Tiere. Die Titer waren jedoch deutlich geringer als nach der Applikation unbehandelter Partikel (Tabelle 3.1.).

Zusammengefaßt zeigten diese Experimente, dass die Immunisierung mit DB geeignet war, in Balb/c Mäusen die Bildung von HCMV-neutralisierenden Antikörpern zu induzieren. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass die Stärke der neutralisierenden Antikörper-Antwort von der Aufnahme der DB in die Zelle abhing, da die intraplantare Immunisierung mit 20 µg sfDB deutlich geringere Spiegel an neutralisierenden Antikörpern induzierte als die zehnfach geringere Menge von 2 µg DB. Erstaunlich war zudem, dass der intraplantare (subkutane) Applikationsweg bereits nach nur einer Antigengabe und ohne zusätzliche Verabreichung von Adjuvantien zur Bildung beachtlicher Neutralisationstiter im Serum der Tiere geführt hatte.

In einer zweiten Serie von Immunisierungsexperimenten wurde untersucht, wie lange die neutralisierende Antikörper-Antwort nach Immunisierung mit DB anhält. Dazu wurde eine andere Form der Antigenapplikation gewählt, die als Standard zur Induktion einer Antikörperantwort in der Maus gilt. 20 µg DB, gelöst in PBS, wurden intraperitoneal an Balb/c-Mäuse verabreicht. Daraufhin wurde zweimal im Abstand von je 4 Wochen mit der gleichen Antigenosis intraperitoneal aufgefrischt. Zwölf, 32 und 52 Wochen nach der ersten Injektion wurde jeweils zwei bis drei Tieren Vollblut entnommen und abesert. Der Spiegel an HCMV-neutralisierenden Antikörpern dieser Seren wurde im Neutralisationstest gemessen. Die dreimalige intraperitoneale Immunisierung mit 20 µg DB führte zur Induktion hoher Titer an neutralisierenden Antikörpern (Abb. 3.8.). Zwölf Wochen nach der ersten Applikation ergab sich mit den vereinigten Seren der Tiere 1-3 eine 50%ige Reduktion der eingesetzten Infektiosität bei einer Serumverdünnung von 1:3072. Zwanzig Wochen später lag der 50%-Wert im Bereich von 1:768 bis 1:3072 (Tiere 4 und 5). Sogar ein Jahr nach der initialen Immunisierung konnten noch neutralisierende Antikörper detektiert werden. Die 50%-Neutralisationswerte gingen jedoch auf Werte von 1:192 bis 1:768 zurück (Tiere 6 und 7). Dieses Ergebnis war, insbesondere in Anbetracht der Tatsache, dass der Rückgang der neutralisierenden Antikörper-Antwort ein Jahr nach Immunisierung zumindest teilweise auf das Altern der Mäuse zurückzuführen sein dürfte, bemerkenswert.

Auch wenn die Anzahl der Tiere, die für diese Langzeitstudien verwendet wurden, beschränkt und für eine statistische Auswertung unzureichend war, so konnte doch deutlich gezeigt werden, dass eine intraperitoneale Immunisierung mit DB beachtliche Spiegel an neutralisierenden Antikörpern induzieren konnte, die über ein Jahr lang im Serum der Tiere nachweisbar blieben.

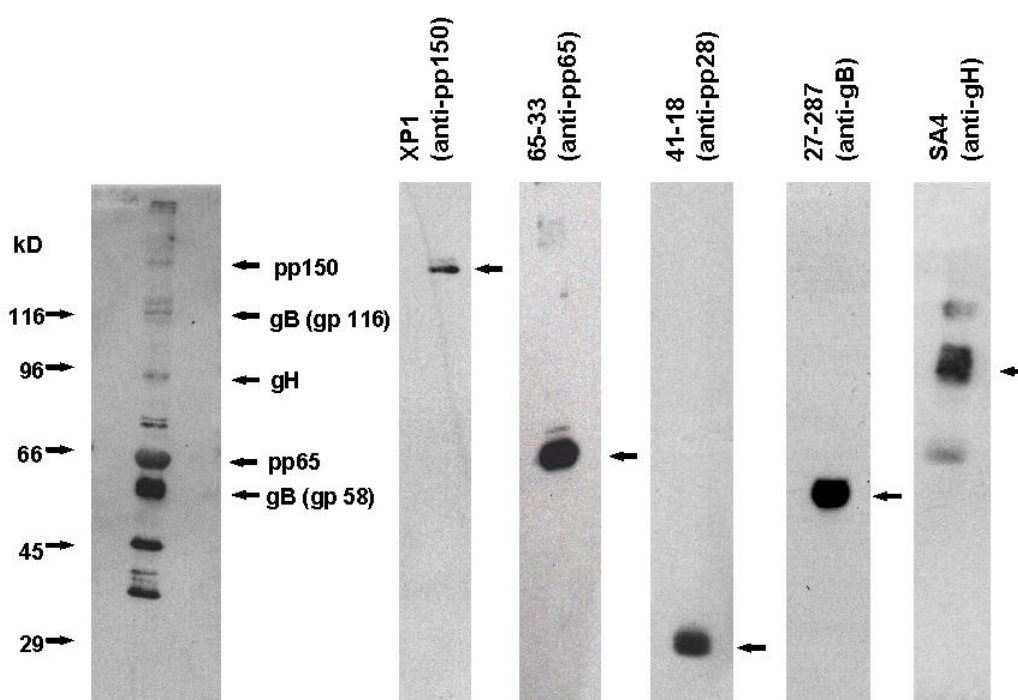


**Abb. 3.7.:** Untersuchung der Neutralisationskapazität muriner Seren im zeitlichen Verlauf. Balb/c - Mäuse wurden dreimal im Abstand von je vier Wochen intraperitoneal mit 20 µg DB immunisiert. Die Seren wurden zwölf (a), 32 (b) und 52 (c) Wochen nach initialer Immunisierung gewonnen und in Mikroneutralisationstesten analysiert (siehe 2.5.8.). Die Neutralisationskapazität des Serums wurde als Prozentsatz der eingesetzten Infektiosität ( $V/V_0$ ) ausgedrückt und als Funktion der Serumverdünnung aufgetragen. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert aus vier Versuchen. Die gepunkteten Linien geben den 50%-Neutralisationswert ( $V/V_0=0,5$ ) an.

### 3.1.8. Analyse der Zielproteine der gebildeten Antikörper

Zur Analyse der Spezifität der durch Immunisierung mit DB induzierten Antikörper wurden *Western Blot*-Analysen durchgeführt. Gradienten-gereinigte Virionen wurden mittels Gelelektrophorese in einem 10%-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Diese Membran wurde in Streifen geschnitten und mit einer 1:2000 Verdünnung der unter 3.1.7. beschriebenen Seren, sowie mit verschiedenen monoklonalen Antikörpern, die gegen Strukturproteine von HCMV gerichtet sind, inkubiert. Ein Vergleich der erhaltenen Bandenmuster zeigte, dass die durch Immunisierung mit

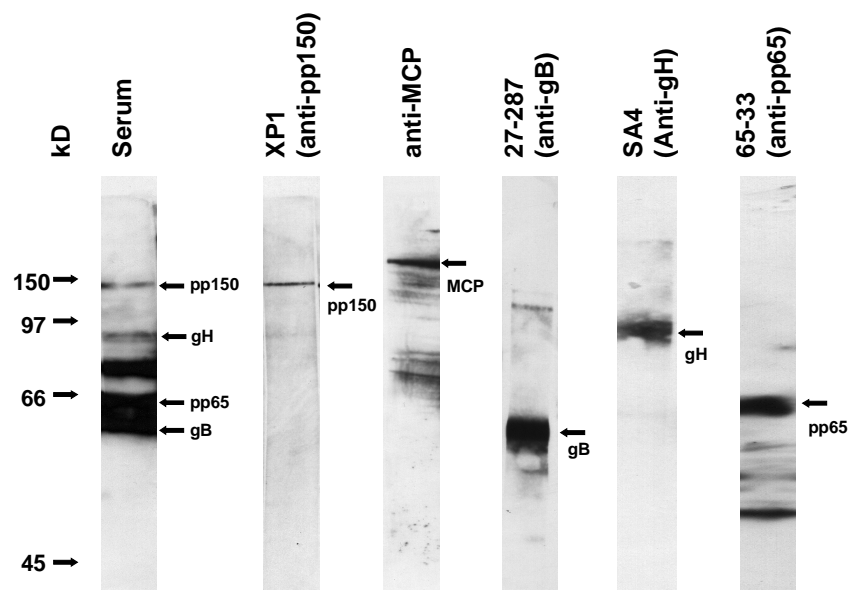
*Dense Bodies* gebildeten Antikörper vor allem gegen das Tegumentprotein pp65 und das Glykoprotein gB gerichtet waren (Abb. 3.8.). In einem geringeren Umfang wurden auch gH-spezifische Antikörper detektiert. Die Abbildung 3.8. zeigt einen repräsentativen *Western Blot*, der mit dem Serum einer Maus inkubiert wurde, der 2 µg DB intraplantar verabreicht wurden. Diese Ergebnisse bestätigten und erweiterten frühere Befunde, die zeigten, dass Kaninchen nach Immunisierung mit gereinigten DB verschiedene Antikörper-Spezifitäten ausbildeten (Jahn et al., 1987). Das murine Serum reagierte auch mit Proteinen einer molekularen Masse von ca. 40 kD, 45 kD und 80 kD (siehe Abb. 3.8.). Um welche viralen Proteine es sich dabei handelte, konnte mit den zur Verfügung stehenden Reagenzien nicht geklärt werden.



**Abb. 3.8.:** Analyse der Zielproteine der HCMV-spezifischen Antikörper im Serum einer Balb/c-Maus, die einmal intraplantar mit 2 µg DB immunisiert worden war. Das Serum wurde am Tag 55 nach Immunisierung entnommen. Gereinigte Virionen wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Die Filter wurden mit einer 1:2000-Verdünnung des murinen Serums, einer 1:100-Verdünnung der Hybridomenüberstände der mAK p65-33 (pp65), 41-18 (pp28), 27-287 (gB) und SA4 (gH), bzw. mit einer 1:5000-Verdünnung des gereinigten mAK XP1 (pp150) inkubiert. Die gebundenen Primärantikörper wurden mit einem HRP-konjugierten Sekundärantikörper detektiert und mittels ECL-Chemilumineszenz sichtbar gemacht. Die Zielproteine der HCMV-spezifischen Antikörper sind mit Pfeilen gekennzeichnet; auf der linken Seite ist der Molekulargewichtsstandard eingezeichnet.

Da in der in Abb. 3.8. dargestellten *Western Blot*-Analyse das murine Serum auch mit einem Protein von ca. 140 kD reagierte, wurde untersucht, ob es sich dabei um das Tegumentprotein pp150 oder um das Hauptkapsidprotein MCP (*major capsid protein*) von

HCMV handelte. Dazu wurden in einem analogen Experiment Gradienten-gereinigte Virionen vor der *Western Blot*-Analyse einer sog. „*High-Bis*-Gelelektrophorese“ unterzogen. Hierzu werden Polyacrylamidgele verwendet, denen ein besonders hoher Anteil Bisacrylamid zugesetzt wird (siehe 2.7.1.). Die Auftrennung, besonders höher molekularer Proteine, ist in diesen „*High-Bis*“-Gelen gegenüber den Standard-Polyacrylamid-Gelen verändert. So ist es z.B. nur in „*High-Bis*“-Gelen möglich, das Hauptkapsidprotein und das Phosphoprotein pp150 voneinander zu trennen und somit zu unterscheiden (Irmiere & Gibson, 1983); in Standard-Polyacrylamidgelen komigrieren diese beiden Proteine. Die Membranen wurden einer 1:2000-Verdünnung eines Serums, das 32 Wochen nach dreimaliger intraperitonealer Immunisierung mit *Dense Bodies* gewonnen wurde, sowie mit Verdünnungen HCMV-spezifischer monoklonaler Antikörper inkubiert. Es zeigte sich eindeutig, dass in diesem Serum Antikörper gegen pp150 aber nicht gegen MCP enthalten waren (Abb. 3.9.). Da das Phosphoprotein pp150 in unseren Untersuchungen stets Bestandteil von *Dense Bodies*, das MCP hingegen nur in Virionen nachweisbar war, war dieser Befund ein weiterer Beweis für die Reinheit der für die Immunisierung verwendeten DB-Präparationen (siehe dazu auch 3.1.5.). Darüber hinaus zeigte sich in diesem Experiment, dass, ebenso wie das nach intraplantarer Immunisierung mit 2 µg DB gewonnene Serum (Abb. 3.8.), auch das nach dreimaliger intraperitonealer Immunisierung mit 20 µg DB gewonnene Serum in erster Linie pp65-spezifische Antikörper enthielt. GB-spezifische Antikörper waren ebenfalls in großer Menge vorhanden. In geringerem Umfang wurden gH-spezifische und pp150-spezifische Antikörper detektiert (Abb. 3.9.).



**Abb. 3.9.:** Analyse der Antikörperantwort gegen die Strukturproteine pp150 und MCP des HCMV nach Immunisierung mit DB. Gereinigte Virionen wurden mittels „*High-Bis*“-SDS-Polyacrylamid-

Gelelektrophorese aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. „High-Bis“-Gele dienen insbesondere der Unterscheidung zwischen dem Tegumentprotein pp150 und dem Hauptkapsidprotein MCP, die in Standard-Polyacrylamidgelen komigrieren. Die Filter wurden mit einer 1:2000-Verdünnung eines murinen Serums, das 32 Wochen nach dreimaliger intraperitonealer Immunisierung mit 20 µg DB gewonnen worden war, einer 1:100-Verdünnung der Hybridomüberstände der mAK 28-4 (MCP), 27-287 (gB), SA4 (gH) und p65-33 (pp65) sowie mit einer 1:5000-Verdünnung des gereinigten mAK XP1 (pp150), inkubiert. Die gebundenen Antikörper wurden mittels eines HRP-konjugierten Sekundärantikörpers und anschließender ECL-Chemilumineszenz detektiert.

### **3.1.9. Untersuchung der pp65-spezifischen zytotoxischen T-Zell-Antwort nach Immunisierung mit DB**

Verschiedene Untersuchungen an HCMV-infizierten, immunsupprimierten Personen sowie am Modellsystem der murinen CMV-Infektion haben gezeigt, dass die Kontrolle einer CMV-Infektion in entscheidender Weise vom Vorhandensein CMV-spezifischer MHC-Klasse I-restringierter zytotoxischer T-Zellen (CTL) abhängt. Eine wirksame HCMV-Vakzine sollte daher nicht nur in der Lage sein, neutralisierende humorale, sondern auch zytolytische Effektorfunktionen in ausreichendem Maß zu induzieren.

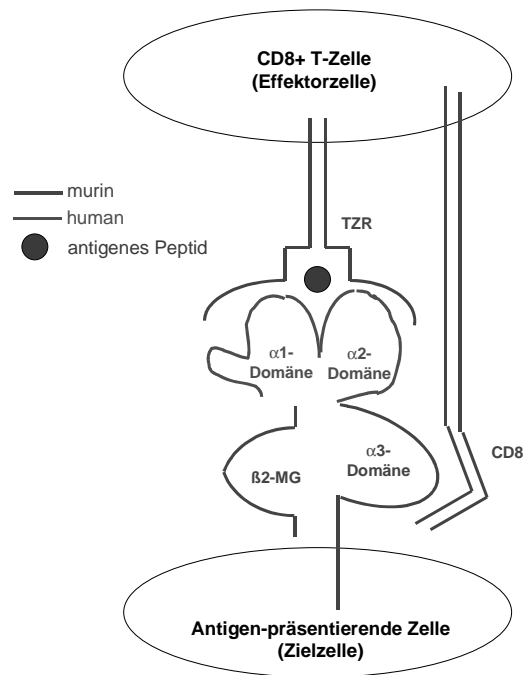
Im klassischen Sinne können CTL nur nach endogener Proteinbiosynthese in der antigenpräsentierenden Zelle stimuliert werden (Monaco, 1992). Dies würde einen Lebendimpfstoff voraussetzen, der jedoch insbesondere bei Herpesviren mit der Etablierung von Latenz, verbunden mit den Risiken der Reaktivierung zu einem späteren Zeitpunkt verbunden wäre. Darüber hinaus gibt es Berichte, dass HCMV mit der Entstehung von Tumoren assoziiert sein könnte (Cinatl et al., 1996; Shen et al., 1997). Für HCMV, ebenso wie für das murine CMV, wurde jedoch die exogene Einschleusung von Antigenen in den MHC Klasse I-Weg beschrieben, der in der Folge zur Induktion von CTL ohne *de novo*-Expression von viralen Proteinen führte (Reddehase et al., 1984; Ridell et al., 1991). Strukturproteine des Viruspartikels, die im Zuge der Virusinfektion in die Zelle eingebracht werden, reichen dabei bereits aus, eine CTL-Antwort auszulösen. Es sollte daher die Frage untersucht werden, ob die Induktion von CTL durch Immunisierung mit DB über eine exogene Beladung des MHC-Klasse I-Weges möglich ist. Die Beantwortung dieser Frage war wichtig, da nur im positiven Fall DB ein attraktives Verpackungs- und Transfersystem für die Entwicklung von rekombinanten Vakzine darstellen.

Um dies zu klären und um weiterhin die Hypothese zu testen, dass die Immunogenität von DB durch Aufnahme in die Zelle erhöht wird, wurde die HCMV-spezifische CTL-Antwort nach Immunisierung mit DB in einem transgenen Tiermodell untersucht.

HLA-A2.Kb-transgene Mäuse des Stammes C57/BL6 (C56/BL6-A2.Kb) wurden

freundlicherweise von L. Sherman (La Jolla, USA) und M. Theobald (Mainz) zur Verfügung gestellt. Diese Mäuse exprimieren ein chimäres MHC-Klasse I-Molekül, das sich aus den  $\alpha 1$ - und  $\alpha 2$ -Domänen des humanen HLA-A2-Proteins sowie der  $\alpha 3$ -Domäne des murinen Kb-Proteins zusammensetzt (Sherman et al., 1992; siehe Abb. 3.11.). Dieses Hybridmolekül ist in der Lage, mit den  $\alpha 1$ - und  $\alpha 2$ -Domänen Peptidepitope zu präsentieren, die an das humane HLA-A2-Allel binden. Die  $\alpha 3$ -Domäne des murinen Kb-Allels stellt zudem die effiziente Erkennung derartiger MHC-Klasse I-Peptid-Komplexe durch murine CD8-positive T-Zellen sicher (Vitiello et al., 1991; LaFace et al., 1995). Um die Aktivität von zytolytischen T-Zellen (CTL) dieser HLA-A2-transgenen Mäuse in Zytolysetests untersuchen zu können, mußte demnach auf transgene Zielzellen zurückgegriffen werden, die ebenfalls ein chimäres MHC Klasse I-Molekül bestehend aus den  $\alpha 1$ - und  $\alpha 2$ -Domänen des humanen HLA-A2-Proteins sowie der  $\alpha 3$ -Domäne des murinen Kb-Proteins exprimieren. Derartige Zielzellen standen in Form von T2-A2.Kb und J-A2.Kb zur Verfügung.

Dieses humanisierte Tiermodell wurde gewählt, um die Präsentation von Epitopen des immundominanten T-Zellantigens pp65 nach Immunisierung mit DB *in vivo* demonstrieren zu können und somit sicherzustellen, dass die induzierte zytotoxische Aktivität in der Tat gegen HCMV-spezifische Epitope, die für die Kontrolle der Infektion beim Menschen relevant sind, gerichtet ist. Aus der Literatur war bekannt, dass ein immundominantes Epitop des pp65 (NLVPMVATV, AS 495-503) von HLA-A2 präsentiert wird (Wills et al., 1996; Diamond et al., 1997). Das HLA-A2-Allel ist das in der menschlichen Bevölkerung am weitesten verbreitete HLA-Allel (Imanishi et al., 1992), und daher im Hinblick auf die Entwicklung von Vakzinen von besonderer Bedeutung. Diamond und Kollegen konnten zeigen, dass dieses Epitop auch in HLA-A2-transgenen Mäusen prozessiert und präsentiert wird. Um nun zu überprüfen, ob die Immunisierung mit DB in der Tat eine HCMV-spezifische CTL-Antwort induziert, haben wir uns dieses HLA-A2-restringierten immundominanten Peptids NLVPMVATV als Reporterepitop bedient. Dazu wurden die humanisierten Mäuse des Stammes C57/BL6-A2.Kb subkutan in die linke Hinterpfote (intraplantar) mit DB und sfDB, gelöst in PBS, immunisiert. Die verabreichten Antigenmengen betragen 2  $\mu\text{g}$  und 20  $\mu\text{g}$  DB sowie 20  $\mu\text{g}$  sfDB. Es wurden jeweils acht Tiere pro Gruppe immunisiert. Einer Kontrollgruppe wurden 50  $\mu\text{l}$  PBS intraplantar verabreicht.



**Abb. 3.10.** Schematische Darstellung der Effektor-/Zielzell-Erkennung in der HLA-A2.Kb-transgenen Maus (C56/BL6-A2.Kb). Diese Mäuse exprimieren ein chimäres MHC-Klasse I-Molekül, das sich aus den  $\alpha 1$ - und  $\alpha 2$ -Domänen des humanen HLA-A2-Proteins sowie der  $\alpha 3$ -Domäne des murinen Kb-Proteins zusammensetzt. Dieses Hybridmolekül ist in der Lage, mit den  $\alpha 1$ - und  $\alpha 2$ -Domänen Peptidpitope zu präsentieren, die an das humane HLA-A2-Allel binden. Dieses antigene Peptid wird vom T-Zell-Rezeptor (TZR) der murinen Effektorzelle im Kontext von HLA-A2.Kb erkannt. Die  $\alpha 3$ -Domäne des murinen Kb-Allels verstärkt die effiziente Erkennung derartiger MHC-Klasse I-Peptid-Komplexe durch murine CD8-positive Effektor-T-Zellen über eine Interaktion mit dem CD8-Molekül kostimulatorisch.  $\beta 2$ -MG =  $\beta 2$ -Mikroglobulin.

Nach acht Tagen wurden die Lymphknoten präpariert, die Lymphozyten isoliert, pro Gruppe vereinigt und weitere acht Tage in IL-2-haltigem Proliferationsmedium kultiviert. Interleukin-2 wurde als T-Zell-Wachstumsfaktor zugegeben (Smith, 1988). Eine weitere Antigenstimulation der Kulturen erfolgte nicht, um eine präferentielle Proliferation bestimmter T-Zell-Spezifitäten zu vermeiden. Anschließend wurden diese Zellen als Effektoren in einen Zytolysetest eingesetzt. Als Zielzellen dienten HLA-A2.Kb-transgene T2- und Jurkat-Zellen. Diese antigenpräsentierenden Zellen wurden eine Stunde lang mit verschiedenen Konzentrationen HLA-A2-bindender synthetischer Peptide beladen. Danach wurde überschüssiges, nicht-gebundenes Peptid ausgewaschen. Eines der synthetischen Nonamere entsprach dem immundominanten Peptidepitop pp65 (495-503) und sollte zum Nachweis HCMV-spezifischer CTL dienen. Zur Kontrolle unspezifischer CTL-Aktivität wurde ein Nonapeptid aus dem Leserahmen des Tumorsuppressorproteins p53 (Aminosäuren 149-157) eingesetzt. Den transgenen T2-Zellen fehlt im Gegensatz zu den Jurkat-Zellen das Gen für TAP, den „*transporter associated with antigen processing*“ (Salter et al., 1985). Infolgedessen sind diese Zellen nicht in der Lage, durch das

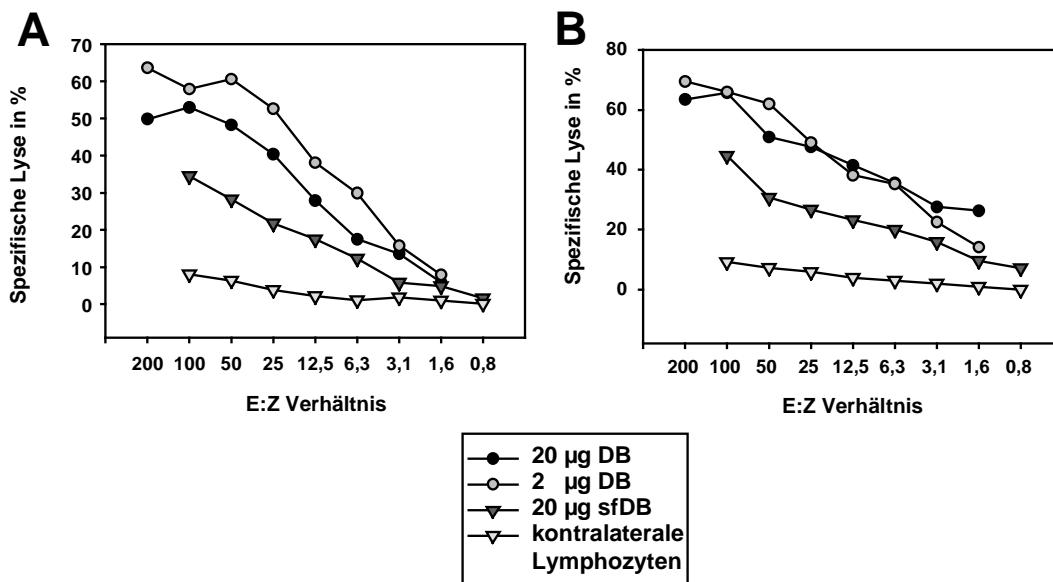


Proteasom prozessierte Peptide in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums zu translozieren, wo in der Folge naszierende MHC Klasse I-Moleküle beladen werden. Die unbeladenen MHC-Moleküle zeigen nur eine geringe Halbwertszeit auf der Zelloberfläche und werden rasch internalisiert und degradiert. Die exogene Zugabe synthetischer Peptide führt jedoch zur Stabilisierung des trinären MHC-Peptid-Komplexes auf der Zelloberfläche. Da diese Zellen nach Peptidbeladung nur das exogen zugegebene synthetische Peptid präsentieren, eignen sie sich besonders gut als Zielzellen zur Analyse peptidspezifischer CTL-Antworten. Für beide Zelllinien wurde die Peptidkonzentration zur Beladung von Zielzellen zwischen  $10^{-6}$  M bis  $10^{-10}$  M variiert. Für T2-A2.Kb erwies sich eine Konzentration von  $10^{-8}$  M als optimal, für J-A2.Kb eine Konzentration von  $10^{-6}$  M. Dass die TAP-defizienten T2-Zellen weniger Peptid benötigten, entsprach sowohl der Theorie, als auch den von Diamond und Kollegen für das pp65(495-503)-Epitop publizierten Werten (Diamond et al., 1997).

Der Chromfreisetzungstest zum Nachweis der gegen das Reporterpeptid pp65(495-503) gerichteten zytotoxischen T-Zellen wurde bei verschiedenen Effektor-/Zielzellverhältnissen durchgeführt. Wiederholte Experimente, von denen Abbildung 3.11. ein repräsentatives Beispiel wiedergibt, zeigten, dass sowohl 2  $\mu$ g als auch 20  $\mu$ g DB eine signifikante CTL-Antwort, die gegen das pp65-Epitop gerichtet war, induzierten. Die Lysewerte von Zellen, die mit dem irrelevanten p53-Kontrollpeptid beladen waren, wurden für jedes E/Z-Verhältnis von den Lysewerten von pp65-beladenen Zielzellen abgezogen. Sie lagen stets unter 5% (nicht gezeigt). Die Erkennung des pp65-Epitops war unabhängig von der Anwesenheit von TAP in den Zellen, wenn optimale Peptidkonzentrationen für die jeweilige Zielzelllinie eingesetzt wurden. Die pp65-Peptid-beladenen TAP-defizienten T2-A2.Kb-Zellen wurden wiederholt am besten von Lymphozyten aus Tieren, die mit 2  $\mu$ g DB immunisiert worden waren, erkannt (Abb. 3.11. A). Lymphozyten aus Tieren, die 20  $\mu$ g DB erhalten hatten, lysierten diese Zellen geringfügig schlechter. Dieses Ergebnis wies darauf hin, dass wie bei der Induktion neutralisierender Antikörper bereits durch Immunisierung mit 2  $\mu$ g DB ein Plateau in der Stärke der Immunantwort erreicht worden war. Lymphozyten aus Mäusen, denen 20  $\mu$ g sfDB verabreicht worden waren, erkannten T2-A2.Kb-Zellen, die mit pp65(495-503) beladen waren, signifikant weniger effizient. Als Beispiel sei angeführt, dass zur Erzielung von 30% spezifischer Lyse ein E/Z-Verhältnis von 6:1 ausreichend war, wenn die Effektorzellen aus Tieren stammten, die mit 2  $\mu$ g DB immunisiert worden waren. Hatten die Tiere 20  $\mu$ g DB erhalten, waren doppelt so viele Effektorzellen notwendig. Ein wesentlich höheres E/Z-Verhältnis von 70:1 war erforderlich, wenn Lymphozyten aus Tieren, die mit 20  $\mu$ g sfDB immunisiert worden waren, eingesetzt wurden. Diese Werte bestätigten die deutlich höhere Immunogenität von DB im Vergleich zu sfDB. Die Aufnahme des Antigens in die Zelle hatte also offenbar einen wichtigen Einfluß auf die Stärke der induzierten CTL-Antwort.

Mit pp65(495-503)-beladenen Jurkat-A2.Kb-Zellen als Zielzellen ergaben sich im Prinzip ähnliche Ergebnisse (Abb. 3.11.B). Diese Zellen wurden in vergleichbarer Weise von Lymphozyten erkannt, die aus mit 2 µg oder 20 µg DB immunisierten Mäusen isoliert wurden. Lymphozyten aus Tieren, die 20 µg sfDB erhalten hatten, lysierten diese Zielzellen signifikant schlechter.

Zusammengefaßt zeigten diese Ergebnisse, dass DB, obwohl sie ein Totantigen darstellen und keine *de novo*-Synthese viraler Proteine induzieren, ein virales Antigen in einer Weise in die Zelle einschleusen können, die zur effizienten Prozessierung und Präsentation im Kontext von MHC Klasse I-Molekülen führt. Dies resultierte in der Folge in der Induktion einer erstaunlich starken Stimulation HCMV-spezifischer CTL.



**Abb. 3.11.:** Analyse der pp65-spezifischen zytotoxischen Aktivität in Zellen, die acht Tage nach Immunisierung mit DB und sfDB aus den drainierenden Lymphknoten isoliert wurden. Gezeigt ist ein Chromfreisetzungstest mit peptidbeladenen T2-A2.Kb (A) und JA2.Kb (B) als Zielzellen. Die T2-A2.Kb-Zellen wurden mit  $10^{-8}$ M pp65(495-503) Peptid, die JA2.Kb-Zellen mit  $10^{-6}$ M pp65(495-503) Peptid eine Std. lang bei 37°C beladen. Als Effektorzellen wurden Lymphozyten aus intraplantar mit den angegebenen Antigenen immunisierten Balb/c-Mäusen eingesetzt, die acht Tage nach Immunisierung isoliert und weitere acht Tage in IL-2-haltigem Medium stimuliert worden waren. Es fand keine weitere Restimulation statt. Die angegebenen Werte der Lyse ergaben sich nach Abzug der Lyse der jeweiligen Zellen, die mit dem Kontrollpeptid p53(149-157) beladen waren.

### 3.1.10. Vergleich der zytolytischen Aktivität nach Immunisierung mit DB mit einer mCMV-Infektion

Nachdem eindrucksvoll gezeigt werden konnte, dass DB, obwohl sie ein Totantigen darstellen, in der Lage waren, eine pp65-spezifische zytotoxische Aktivität in den

Lymphozyten des drainierenden Lymphknotens zu generieren, sollte die Stärke der induzierten Zytotoxizität nach Immunisierung mit DB mit der durch ein replikationsfähiges Virus ausgelösten Zytotoxizität verglichen werden. Da HCMV selbst in Mäusen nicht repliziert, wurde das murine CMV zur Infektion der Tiere verwendet. Die mCMV-Infektion in der Maus und ihre Kontrolle durch zytotoxische T-Zellen wurde in der Vergangenheit intensiv untersucht. Daher konnte auf Standardmethoden zur Induktion CMV-spezifischer CTL zurückgegriffen werden (Reddehase et al., 1984; Reddehase & Koszinowski, 1984). Demzufolge wurde eine Gruppe bestehend aus sechs Balb/c-Mäusen subkutan mit einer Dosis von  $2 \times 10^5$  pfu gereinigtem mCMV in die linke hintere Pfote infiziert. Vier weitere Gruppen von Mäusen wurden auf die gleiche Weise mit 20 µg DB, 2 µg DB, 20 µg sfDB und PBS als Kontrolle immunisiert. Acht Tage später wurden die drainierenden, poplitealen Lymphknoten entnommen, die Lymphozyten isoliert und weitere acht Tage in Medium mit Interleukin-2 (IL-2) kultiviert. Danach wurden diese Zellen auf ihre zytolytische Aktivität getestet. Als Zielzellen für den Zytolysetest wurden P815-Mastozytomzellen, die den Fc-Rezeptor exprimieren, mit anti-CD3 $\epsilon$  Antikörpern beladen. Mit diesem Testsystem, das als „redirigierte Lyse“ bezeichnet wird, werden nur aktivierte Lymphozyten nachgewiesen, die bereits durch einen einzigen Stimulus, die CD3/anti-CD3-Interaktion, aktiviert werden können (Kranz et al., 1984; Holtappels et al., 1998). Die Vernetzung von Effektor- und Zielzelle erfolgt unspezifisch über die Bindung des CD3 $\epsilon$ -Moleküls und den anti-CD3 $\epsilon$ -Antikörper, anstelle der spezifischen MHC Klasse I-Peptid-T-Zell-Rezeptor-Wechselwirkung, so dass mit diesem Test die gesamte lytische Aktivität einer T-Zell-Population unabhängig von ihrer Antigenpezifität nachgewiesen werden kann (siehe auch 2.5.6.2., Abb. 2.1.). Die gesamte zytolytische Aktivität der verschiedenen Lymphozytenpopulationen wurde im Chromfreisetzungstest bei verschiedenen Effektor-Zielzell-Verhältnissen bestimmt (Abb. 3.12. A). Die in Abbildung 3.12. angegebenen Werte der Gesamtlyse wurden aus der Differenz der Lyse anti-CD3 $\epsilon$ -beladener P815-Zellen und unbehandelter P815-Zellen als Kontrolle errechnet. Mit anti-CD3 $\epsilon$ -Antikörper beladene Zielzellen wurden von den Effektorzellen gut erkannt, während die unbeladenen Kontrollzellen nicht lysiert wurden. Um sicherzustellen, dass die gemessene Gesamtaktivität in der Tat das Ergebnis der Immunisierung/Infektion war und nicht durch unspezifische inflammatorische Prozesse an der Einstichstelle hervorgerufen wurde, wurde einer Kontrollgruppe PBS verabreicht. Die aus diesen Tieren präparierten Lymphozyten wurden ebenfalls auf ihre zytolytische Aktivität hin untersucht. Die Lysewerte waren stets <5% (Abb. 3.13. A). Um auszuschließen, dass die zytotoxische Aktivität durch eine unspezifische immunologische Reaktion der Tiere hervorgerufen wurde, wurden von jeder Maus zusätzlich die kontralateralen poplitealen Lymphknoten entnommen. Sie zeigten keine zytotoxische Aktivität (Daten nicht gezeigt).

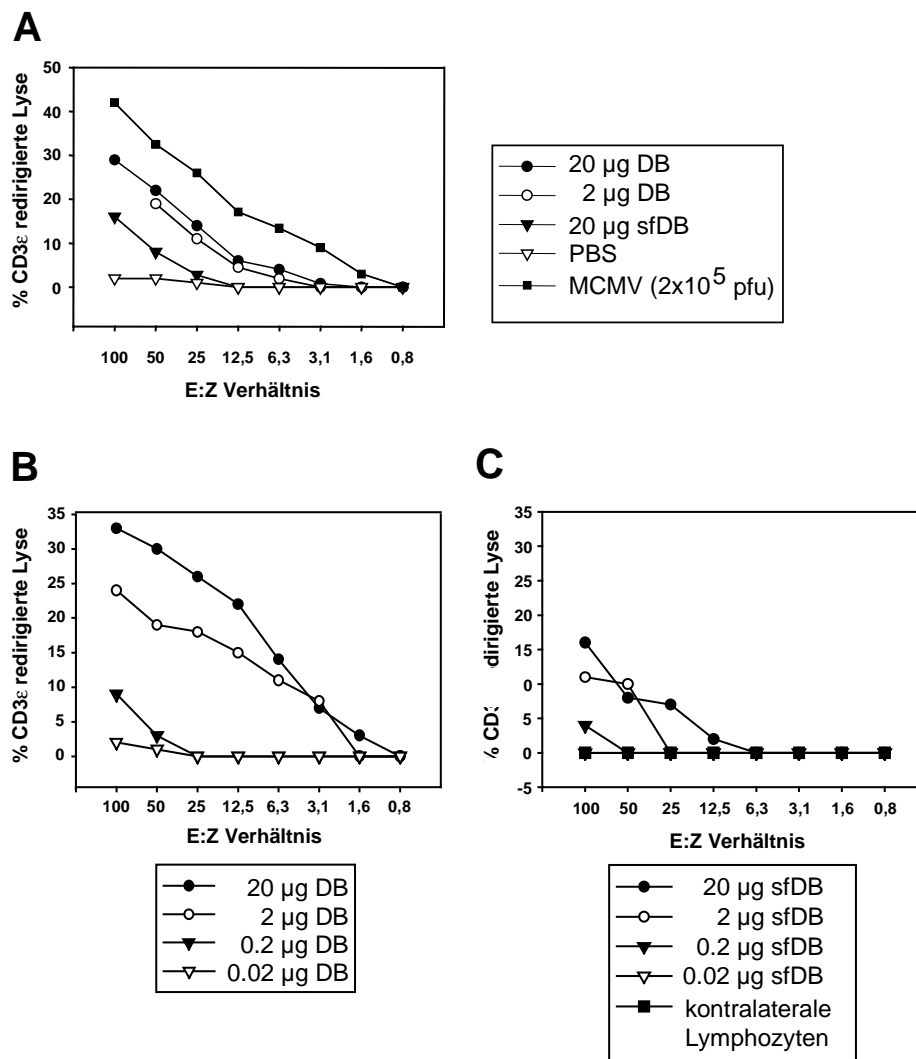
Die mCMV-Infektion führte erwartungsgemäß zur Induktion von zytolytischer Aktivität im drainierenden Lymphknoten. Die erhaltenen Werte für die anti-CD3 $\epsilon$ -vermittelte Lyse der untersuchten Lymphozyten waren mit Werten vergleichbar, die mit pulmonären CTL nach mCMV-Infektion erhalten worden waren (Holtappels et al., 1998). Die Immunisierung mit 2  $\mu$ g und 20  $\mu$ g der nicht-replikationskompetenten DB führte ebenfalls zur Induktion von zytolytischer Aktivität. Im Vergleich zur mCMV-Infektion war etwa die doppelte Menge an Effektorzellen erforderlich, um eine vergleichbare Lyse der anti-CD3 $\epsilon$ -beladenen Zielzellen zu erreichen (Abb. 3.13. A). Auch 20  $\mu$ g sfDB waren zur Induktion von Zytotoxizität in den drainierenden Lymphknoten geeignet. Die Stärke der Immunantwort war jedoch deutlich reduziert.

Zusammengefaßt zeigten diese Experimente, dass DB, obwohl sie ein Totantigen darstellen und nicht replikationskompetent sind, eine signifikante zytotoxische Aktivität in den drainierenden Lymphknoten induzieren konnten, die mit der Immunantwort auf eine akute mCMV-Infektion annähernd vergleichbar war.

### **3.1.11. Abhängigkeit der Stärke der Zytotoxizität von der Antigenosis**

Im folgenden Experiment wurde untersucht, inwieweit die Stärke der induzierten zytotoxischen Aktivität von der verabreichten Antigenosis abhing. Dazu wurden je sechs Balb/c-Mäuse pro Gruppe mit seriellen Zehnfachverdünnungen von DB (20, 2, 0,2 und 0,02  $\mu$ g DB) immunisiert. Zur Analyse des Einflusses der zellulären Aufnahme auf die Immunogenität wurden ebenfalls sechs Tiere pro Gruppe mit den gleichen Mengen an sfDB (20, 2, 0,2 und 0,02  $\mu$ g sfDB) intraplantar immunisiert. Nach acht Tagen wurden die poplitealen Lymphknoten entnommen, die Lymphozyten isoliert und, wie unter 3.1.11. beschrieben, weitere acht Tage in IL-2-haltigem T-Zell-Medium zwischenkultiviert. Die Lymphozyten wurden wiederum mit Hilfe der Methode der anti-CD3 $\epsilon$ -redirigierten Lyse auf ihre Gesamt-Zytotoxizität hin untersucht (siehe 3.1.11.). Die anti-CD3 $\epsilon$ -markierten P815-Zellen wurden sowohl von Lymphozyten aus Mäusen, die mit DB als auch von Lymphozyten aus Tieren, die mit sfDB immunisiert worden waren, erkannt. Effektorzellen aus Tieren, die DB erhalten hatten, lysierten die Zielzellen jedoch deutlich effizienter. Dies galt für jedes untersuchte E/Z-Verhältnis. Als Beispiel sei angeführt, dass 15% Zielzellyse bei Immunisierung mit 20  $\mu$ g DB bereits mit einem E/Z-Verhältnis von 6:1 erreicht werden konnte. Nach Immunisierung mit 2  $\mu$ g DB war ein E/Z-Verhältnis von 12:1 notwendig. Ein signifikant höheres E/Z-Verhältnis von 100:1 wurde erforderlich, wenn die Effektoren aus Tieren stammten, die 20  $\mu$ g sfDB erhalten hatten (Abb. 3.12. B+C). Lymphozyten aus Tieren, die mit geringeren Dosen an sfDB immunisiert worden waren, waren in keinem der Ansätze in der Lage, 15% Zielzellyse zu bewirken. Wie bei dem unter 3.1.10.

beschriebenen Experiment konnte auch hier weder nach Applikation mit PBS noch in den kontralateralen Lymphozyten zytolytische Aktivität gemessen werden. Diese Befunde wiesen darauf hin, dass die gemessene Zytotoxizität in der Tat die Folge der Immunisierung mit DB und sfDB war. Diejenigen Antigenpräparationen, die von der Zelle aufgenommen werden konnten, waren im Hinblick auf die Fähigkeit zur Induktion zytotoxischer T-Zellen deutlich überlegen. In beiden Fällen korrelierte die Stärke der induzierten Zytotoxizität stark mit der verabreichten Antigenendosis.

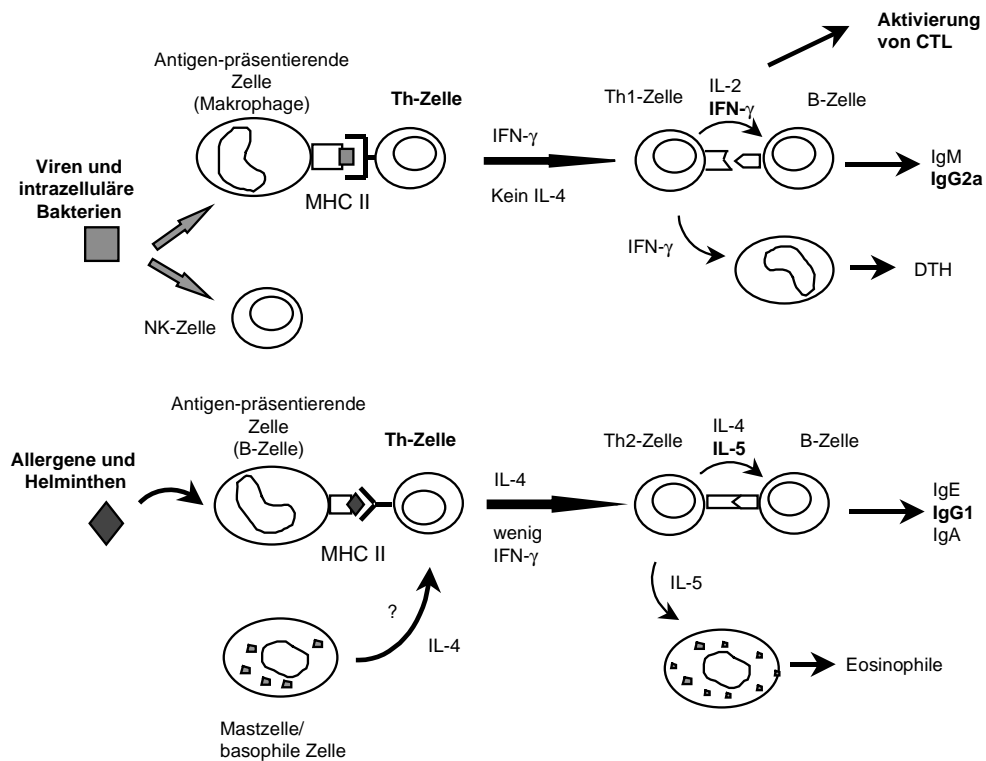


**Abb. 3.12.:** Analyse der zytolytischen Gesamtaktivität in Zellen der drainierenden Lymphknoten acht Tage nach Immunisierung mit verschiedenen Mengen an DB (**B**) oder sfDB (**C**) bzw. im Vergleich zu einer Infektion mit mCMV (**A**). Es wurde ein Chromfreisetzungstest mit anti-CD3 $\epsilon$ -beladenen P815-Mastozytomzellen als Zielzellen durchgeführt. Als Effektorzellen wurden Lymphozyten der drainierenden Lymphknoten aus intraplantar mit den angegebenen Antigenen immunisierten Balb/c-Mäusen eingesetzt. Sie wurden acht Tage nach Immunisierung isoliert und weitere acht Tage in IL-2-haltigem Medium kultiviert. Um eine evtl. vorliegende systemische Aktivierung dieser Tiere auszuschließen, wurden die Lymphozyten der kontralateralen poplitealen Lymphknoten dieser Tiere vereinigt und auf Zytotoxizität getestet. Die angegebenen Werte der Lyse ergaben sich nach Abzug der Lyse unbeladener P815-Kontrollzellen.

### 3.1.12. Analyse der T-Helferzell-Antwort nach Immunisierung mit DB

Aus Studien an Knochenmarks-Transplantationspatienten, denen HCMV-spezifische CTL adoptiv transferiert wurden, wurde deutlich, dass signifikante Spiegel von HCMV-spezifischen CTL nur dann über einen längeren Zeitraum erhalten bleiben, wenn CD4-positive T-Helferzellen vorhanden sind, die die zelluläre Immunantwort unterstützen (Walter et al., 1995; Reusser et al., 1991). Da pp65 auch in Bezug auf die Induktion einer T-Helferzell-Antwort als eines der immundominanten HCMV-Antigene identifiziert worden war (Beninga et al., 1995), stellten wir die Frage, ob eine Immunisierung von Mäusen mit DB zusätzlich zur zytotoxischen T-Zell-Antwort auch in der Lage ist, eine HCMV-spezifische T-Helferzell-Antwort zu aktivieren.

Man unterscheidet zwei funktionell verschiedene Subpopulationen von CD4-positiven T-Helferzellen, die als Th1- und Th2-Zellen bezeichnet werden. Die Abbildung 3.13. faßt die wichtigsten Schritte bei der Differenzierung von T-Helferzellen in Th1- bzw. Th2-Zellen zusammen. Diese Subpopulationen werden anhand des von ihnen produzierten Zytokinprofiles und dem davon abhängigen Wechsel der Antikörper-Isotypen charakterisiert. T-Helferzellen vom Typ1 (Th1) produzieren die Zytokine Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ), Tumornekrose-Faktor- $\beta$  (TNF- $\beta$ ) und Interleukin-2 (IL-2). Sie begünstigen die Aktivierung von Makrophagen, der Antikörper-abhängigen zellulären Zytotoxizität (ADCC; *antibody dependent cellular cytotoxicity*), der verzögerten Hypersensitivität (DTH; *delayed type hypersensitivity*), sowie die Produktion von Antikörpern des Isotyps IgG2a. Das Verhältnis von IgG1/IgG2a-Antikörpern beträgt bei einer Th1-Antwort Werte kleiner oder gleich eins. Th2-Zellen hingegen produzieren die Zytokine IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 und IL-13 und stimulieren sowohl die humorale Immunantwort als auch die mukosale Immunität. Es werden Antikörper der Isotypen IgE und IgG1 gebildet, sowie die IgA-Synthese erleichtert. Das Verhältnis von IgG1/IgG2a-Isotypen verschiebt sich stark zugunsten von IgG1, so dass sich Quotienten von größer eins ergeben (zusammengefasst aus DelPrete, 1998; Romagnani 1992; Constant & Bottomly, 1997).



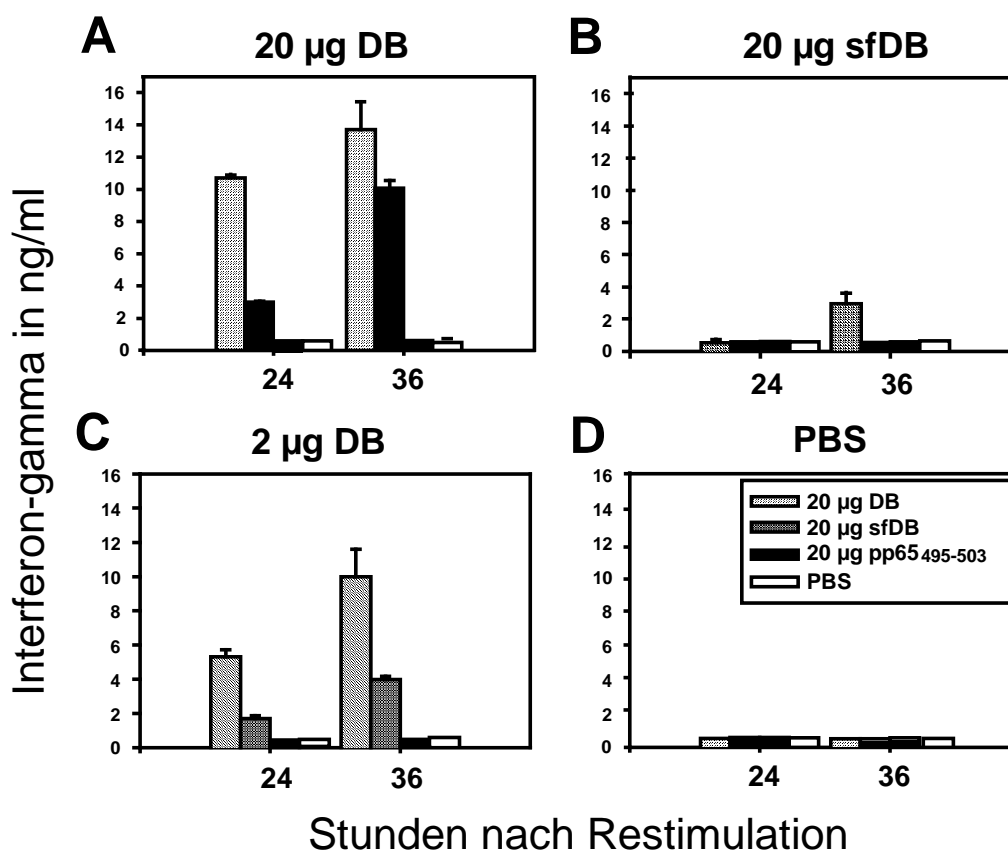
**Abb. 3.13.:** Schematische Differenzierung der T-Helfer-Zellen in die Th1- und Th2-Subpopulationen (modifiziert nach Romagnani, 1992). Einige der postulierten regulatorischen Wechselwirkungen zwischen der Antigen-präsentierenden Zelle, den Th1/Th2-Zellen, B-Lymphozyten und CTL sind skizziert (ohne Anspruch auf Vollständigkeit). Die fettgedruckten Parameter wurden in der vorliegenden Arbeit analysiert.

Da bekannt ist, dass eine Th1-dominierte Immunantwort bei der Bekämpfung intrazellulärer Erreger wie Viren besonders wirksam ist, wurde analysiert, welche Art von T-Helferzell-Antwort durch eine Immunisierung von Mäusen mit *Dense Bodies* ausgelöst wird. Es wurden zwei verschiedene Ansätze zur Klärung dieser Frage gewählt. In einer ersten Reihe von Experimenten wurde die Produktion der beiden Schlüsselzytokine IFN- $\gamma$  (Typ Th1) und IL-5 (Typ Th2) durch Lymphozyten nach Immunisierung mit DB untersucht. Dazu wurden je sechs Balb/c-Mäuse mit 2  $\mu\text{g}$  oder 20  $\mu\text{g}$  DB, 20  $\mu\text{g}$  sfDB oder 50  $\mu\text{l}$  PBS intraplantar immunisiert. Acht Tage später wurden die poplitealen Lymphknoten präpariert und die Lymphozyten daraus isoliert. Nach zwei Waschschrritten wurden die Lymphozyten einer Gruppe in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml in RPMI-Medium ausgesät. Sofort nach Inkulturnahme wurden die Lymphozyten restimuliert. Die Restimulation erfolgte durch Zugabe von entweder 20  $\mu\text{g}$  DB, 20  $\mu\text{g}$  sfDB, 20  $\mu\text{g}$  des synthetischen Peptids pp65 (495-503) (entspricht  $2 \times 10^{-5}$  M) oder durch Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  PBS. Zu zwei verschiedenen Zeitpunkten, 24 und 36 Stunden nach Beginn der Restimulation, wurden die Zellkulturüberstände geerntet und die enthaltenen Konzentrationen von IFN- $\gamma$  und IL-5 mit

Hilfe kommerziell verfügbarer ELISA bestimmt. Wie in Abbildung 3.14. dargestellt, sezernierten die Lymphozyten aus Mäusen, die mit 20 µg DB immunisiert worden waren, sehr hohe Spiegel an IFN-γ von bis zu 15 ng/ml nach Restimulation mit DB. Geringfügig weniger IFN-γ wurde nach Restimulation mit sfDB sezerniert (Abb. 3.14. A). Lymphknotenzellen aus Tieren, denen 2 µg DB verabreicht worden waren, setzten ebenfalls hohe Mengen an IFN-γ frei. 36 Stunden nach Restimulation mit DB wurden Werte von 10 ng IFN-γ/ml Zellkulturüberstand gemessen. Etwa halb soviel IFN-γ wurde nach Restimulation mit sfDB freigesetzt (Abb. 3.14. B). Lymphozyten aus Mäusen, die mit 20 µg sfDB immunisiert worden waren, produzierten deutlich geringere Mengen an IFN-γ. Zudem war die Freisetzung zeitlich verzögert. Das Maximum lag 36 Stunden nach Restimulation mit DB bei ca. 3 ng/ml (Abb. 3.14. C). Lymphozyten aus Tieren, denen nur PBS gespritzt worden war, konnten durch keine Form der Restimulation zur Freisetzung von IFN-γ angeregt werden (Abb. 3.14. D). Insgesamt machte dieses Experiment deutlich, dass DB neben der Immunisierung auch in Bezug auf die Restimulation den effizientesten Induktor der IFN-γ-Sekretion darstellten. Die Restimulation mit sfDB war deutlich weniger wirksam. Eine Restimulation mit dem synthetischen Peptid pp65(495-503), das ein CTL-Epitop aus dem pp65-Leserahmen darstellte, war erwartungsgemäß nicht geeignet, die Produktion von IFN-γ anzuregen. Das gleiche galt für die PBS-Kontrolle. Das zweite Reporterzytokin, IL-5, konnte in keiner der vier Lymphozytenkulturen nach keiner Art der Restimulation in einem Zeitraum von 36 Stunden in signifikanten Mengen nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

In der Zusammenschau deuteten diese Ergebnisse eindeutig darauf hin, dass die Immunisierung von Mäusen mit *Dense Bodies* im Hinblick auf die Zytokinfreisetzung restimulierter Lymphknotenzellen eine Th1-artige Immunantwort induzierte. Darüber hinaus bestätigten diese Experimente erneut die Ausgangshypothese, dass die Aufnahme eines Antigens in die Zelle dessen Immunogenität erhöht. Die IFN-γ Sekretion war in den Tieren am höchsten und am frühesten nachweisbar, denen 20 µg DB appliziert worden waren. Nach Gabe der gleichen Menge des beschallten Antigens (sfDB) konnten die Lymphozyten erst nach längeren Restimulationsphasen zur IFN-γ Freisetzung angeregt werden, die jedoch deutlich geringer ausfiel als nach Immunisierung mit DB.





**Abb. 3.14.:** Quantitativer ELISA zur Bestimmung des Gehaltes an murinem IFN- $\gamma$  in Zellkulturüberständen von  $10^6$  Lymphozyten/ml, die acht Tage nach intraplantarer Immunisierung mit den Antigenen, die über jedem Diagramm angegeben sind, isoliert wurden. Die Lymphozyten wurden mit den Antigenen, die im Kasten genannt sind, restimuliert. 24 und 36 Stunden nach Restimulation wurden die Zellkulturüberstände geerntet und die Konzentration an IFN- $\gamma$  in ng/ml bestimmt. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte vier voneinander unabhängig durchgeführter Experimente.

Um mit einer zweiten, unabhängigen Methode zu bestätigen, dass die DB-Immunisierung in der Tat eine Th1-artige Immunantwort auslöst, wurden die Profile der induzierten Immunglobulin G-Isotypen analysiert. Dazu wurden Balb/c-Mäuse dreimal im Abstand von je vier Wochen intraperitoneal mit 20  $\mu$ g DB immunisiert. Zwölf bzw. 32 Wochen nach der initialen Gabe wurde den Tieren Vollblut entnommen, abgesert und die im Serum vorhandenen HCMV-spezifischen Antikörper bezüglich ihres IgG-Isotyps untersucht. Dazu wurden mit HCMV-Partikeln beschichtete ELISA-Platten (Biotest, Dreieich) mit den Mäuseseren inkubiert. Anschließend wurden die Immunglobulin G-Isotypen der an die Platten gebundenen, und somit HCMV-spezifischen Antikörper mit Hilfe kommerziell verfügbarer Sekundärantikörper gegen die Isotypen IgG1 und IgG2a (beide Pharmingen, USA) detektiert. Drei intraperitoneale Injektionen von DB führten zu einem Verhältnis von IgG1/IgG2a von kleiner eins (0,21, 0,17 und 0,26; Tabelle 3.2.). Diese Werte deuteten auf eine verstärkte Produktion von Antikörpern vom Isotyp IgG2a hin, wie sie für eine Th1-

artige Immunantwort typisch ist. Das Verhältnis der beiden Isotypen war zwölf und 32 Wochen nach Immunisierung im gleichen Bereich. Dies zeigte, dass im zeitlichen Verlauf keine Änderung des Typs der Helfer-T-Zell-Antwort eintrat (Tabelle 3.2.). Ebenso hatte die intraplantare Applikationsroute keinen Einfluß auf das Antikörperisotyp-Profil. Die Seren von Mäusen, denen DB subkutan in die Hinterpfote verabreicht worden waren, wiesen ebenfalls ein IgG1/IgG2a-Verhältnis von kleiner eins auf (nicht gezeigt). Diese Ergebnisse bestätigten, dass die Immunisierung von Mäusen mit *Dense Bodies* des HCMV eine Th1-artige T-Helferzell-Antwort stimulierte.

**Tabelle 3.2.:** Anti-HCMV-spezifische IgG-Antikörper-Isotypenprofile der Seren von Mäusen, die dreimal im Abstand von vier Wochen intraperitoneal mit 20 µg DB<sup>a</sup> immunisiert wurden.

Maus #	Zeitspanne nach initialer Immunisierung	Anti-HCMV Ab IgG1 <sup>b</sup>	Anti-HCMV Ab IgG2a <sup>c</sup>	Verhältnis IgG1/IgG2a
1-3 (v) <sup>d</sup>	12 Wochen	352 (+/- 48)	1639 (+/- 210)	0,21
4	32 Wochen	223 (+/- 77)	1277 (+/- 123)	0,17
5	32 Wochen	362 (+/- 38)	1365 (+/- 150)	0,26

<sup>a</sup> DB wurden in PBS resuspendiert.

<sup>b</sup> Endpunktverdünnung des Serums, die zu mindestens der doppelten Absorption des Nullserums für IgG1-spezifische anti-HCMV-Antikörper führte.

<sup>c</sup> Endpunktverdünnung des Serums, die zu mindestens der doppelten Absorption des Nullserums für IgG2a-spezifische anti-HCMV-Antikörper führte.

<sup>d</sup> Die Seren dieser Tiere wurden vor der Analyse vereinigt.

### 3.2. Herstellung von HCMV-Deletionsmutanten als Grundlage für die Generierung rekombinanter *Dense Bodies*

Wie unter 3.1. ausführlich beschrieben wurde, erwiesen sich die nicht-infektiösen *Dense Bodies* (DB) im Mausmodell als gutes Immunogen. Sie konnten sowohl humorale als auch zelluläre Immuneffektormechanismen sehr effizient induzieren. Um jedoch für die Anwendung am Menschen eine möglichst breit wirksame Vakzine bereitstellen zu können, wird es nötig sein, DB mit Hilfe der Rekombinantentechnologie zu optimieren. Da bislang die genaue Zusammensetzung von DB unklar und daher eine *in vitro*-Rekonstitution der Partikel schwierig ist, ist die Herstellung rekombinanter Cytomegaloviren die einzige Möglichkeit zur Generierung rekombinanter DB. Ausgehend von rekombinanten Viren, die beispielsweise Fusionsgene aus DB-Bestandteilen und weiteren immundominanten antigenen Determinanten enthalten, könnten im Rahmen der Virusreplikation rekombinante DB ausgebildet werden, in die diese antigenen Fusionsproteine verpackt werden.

Die Herstellung rekombinanter Cytomegaloviren kann klassischerweise mittels homologer Rekombination und selektierbaren Markergenen in permissiven eukaryonten Zellen erfolgen (Wolff et al., 1993). Alternativ wurde kürzlich ein auf der BAC-Technologie basierendes Verfahren entwickelt (Messerle et al., 1997; Borst et al., 1999; Brune et al., 1999). Bei dieser Methode wird das Virusgenom in sog. BACs (*bacterial artificial chromosomes*) kloniert und die Mutagenese in Bakterien durchgeführt. Ein limitierender Faktor bei beiden Varianten ist jedoch die Genomgröße, die noch in Kapside verpackt werden kann. Cytomegaloviren tolerieren hier trotz ihres Genoms von ca. 230 kB nur sehr geringe Abweichungen im Bereich von maximal 3-4 kB. Wird diese Länge über- oder unterschritten, kann die DNA nicht mehr in das Kapsid der Viruspartikel verpackt werden. Es kommt nicht zur Freisetzung von infektiösen Nachkommenvirionen (Grzimek, 1999). Das Konzept zur Herstellung von stärker immunogenen rekombinanten DB sieht die Fusion von antigenen Determinanten an das Tegumentprotein pp65, den Hauptbestandteil von DB vor. Hierbei ist sowohl an zusätzliche CTL-Epitope und T-Helferzellepitope, als auch an Domänen zur Induktion HCMV-neutralisierender Antikörper gedacht. Darüber hinaus muß ein gegebenenfalls wieder deletierbares Markergen zur Selektion und Anreicherung der entstandenen rekombinanten Viren in das Genom integriert werden. Um derartige Insertionen vornehmen zu können, ist es daher unerlässlich, Genombereiche zu identifizieren, die für die Replikation des Virus und für die Ausbildung von DB entbehrlich sind. Diese Regionen könnten in mutanten HCMV-Genomen zur Herstellung rekombinanter *Dense Bodies* deletiert werden, um Probleme durch die Größenlimitation des Genoms zu umgehen. Es wurden zwei Gene ausgewählt, die dahingehend charakterisiert werden sollten, ob sie für die Virusreplikation sowie die Ausbildung und

Freisetzung von DB verzichtbar sind: das Gen für das Phosphoprotein pp150 (UL32) und das IE4-Gen, dessen Transkript nach bisherigem Kenntnisstand nicht für ein Protein kodiert.

### **3.2.1. Versuche zur Herstellung einer pp150-Deletionsmutante**

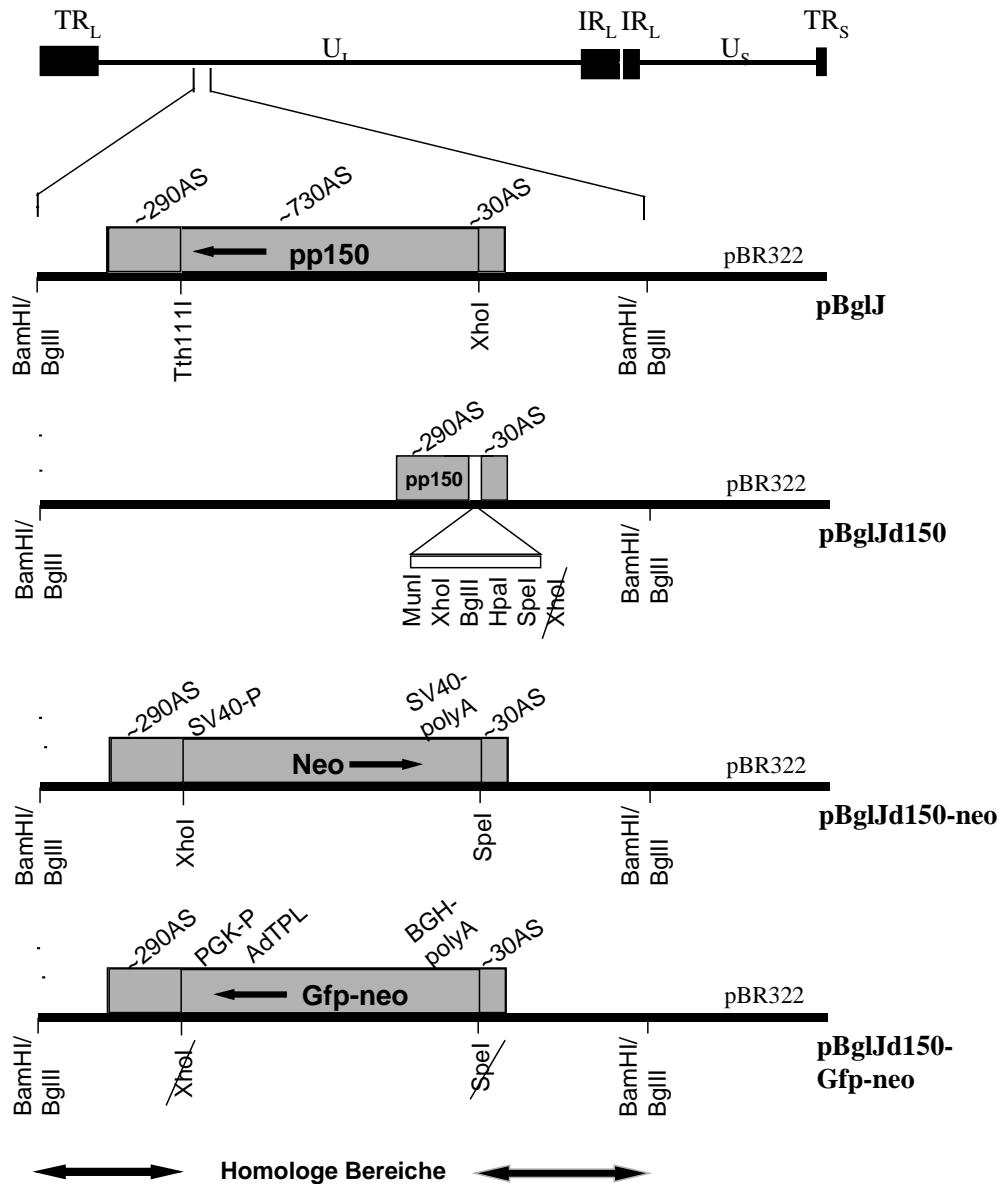
Das Phosphoprotein pp150 (pUL32) ist ein struktureller Bestandteil von DB und Virionen. Es sollte untersucht werden, ob dieses Protein für die Morphogenese und Freisetzung der Partikel essentiell ist, oder ob eine pp150-Deletionsmutante ebenfalls replikationskompetent ist und Virionen und DB produziert. Wäre dies der Fall, könnte der UL32-Leserahmen in Viruskonstrukten zur Herstellung rekombinanter DB deletiert werden. Der dadurch gewonnene Spielraum stünde dann zur Insertion zusätzlicher antigener Determinanten zur Verfügung.

#### **3.2.1.1. Klonierung der Rekombinationsplasmide pBglJd150-Neo und pBglJd150-Gfp-neo**

Voraussetzung für die Herstellung von Virusmutanten mittels homologer Rekombination ist die Klonierung von Rekombinationsplasmiden, die ein selektierbares Markergen, flankiert von den an das zu deletierende Gen angrenzenden HCMV-Sequenzen, enthalten. Die homologe Rekombination erfolgt umso effizienter, je länger die homologen Genabschnitte sind; eine Länge von ca. 1 kB hat sich jedoch als ausreichend erwiesen (Wolff et al., 1993; Schmolke et al., 1995 b).

Zur Generierung einer pp150-Deletionsmutante wurden die beiden Rekombinationsplasmide pBglJd150-Neo und pBglJd150-Gfp-neo kloniert. In diesen Plasmiden wurde ein Großteil (65%) der für pp150 kodierenden Sequenz durch das Gen für die bakterielle Neomycin-Phosphotransferase (Neo) bzw. durch ein Fusionsgen ersetzt, das für die chromophore Gruppe des *green fluorescent protein* (GFP) kodiert, an dessen C-Terminus das Neo-Gen fusioniert ist (Gfp-neo). Die Verwendung dieser neuartigen dualen Markergenkassette Gfp-neo sollte eine noch effektivere Anreicherung der gewünschten pp150-Deletionsmutante gewährleisten als die alleinige Expression von Neo. Sie ermöglicht nicht nur die Negativselektion durch das Antibiotikum G418, sondern auch eine Positivselektion durch FACS-Sortierung (*fluorescence activated cell sorting*). Die kodierende Sequenz für Gfp-neo wurde mittels PCR aus dem Plasmid pQBI-PGK amplifiziert. Die PCR wurde mit Hilfe der *vent*-Polymerase durchgeführt, die eine geringe Fehlerrate aufweist und glatte Amplifikatenden erzeugt (verwendete Primer: SP9-pp150 und SP10-pp150). In die zur Amplifikation verwendeten Primer wurden loxP-Stellen

integriert, die es erlauben, die dazwischenliegende Gfp-neo-Kassette mit Hilfe der cre-Rekombinase des Phagen P1 wieder aus dem Genom zu entfernen (Abremski et al., 1983; Sauer, 1994). Die Klonierungsstrategie zur Herstellung der beiden Rekombinationsplasmide ist in Abb. 3.15. skizziert.



**Abb. 3.15.:** Schematische Darstellung der Rekombinationsplasmide **pBglJd150-neo** und **pBglJd150-Gfp-neo** zur Konstruktion einer **pp150**-Deletionsmutante. Das Ausgangsplasmid **pBglJ** enthält das BglIII-J-Fragment des HCMV-Stammes Ad169, welches das **pp150**-Gen und flankierende Genombereiche enthält. Die Restriktionsschnittstellen, die für die Klonierung verwendet wurden, sind angegeben. Die Transkriptionsrichtungen des **pp150**-Gens, des **Neo**-Gens und des **Gfp-neo**-Gens sind durch Pfeile angedeutet. Die **Neo**-Kassette in **pBglJd150-neo** stand unter der Kontrolle des **SV40 early**-Promotors und wurde durch das polyA-Signal des **SV40**-Virus terminiert. Die **Gfp-neo**-Kassette in **pBglJd150-Gfp-neo** stand unter der Kontrolle des murinen Polyglycerinkinase (**PGK**)-Promotors verbunden mit der dreiteiligen *leader*-Sequenz aus Adenovirus (**AdTPL**; *Adenovirus tripartite leader sequence*). Sie wurde durch das polyA-Signal des bovines

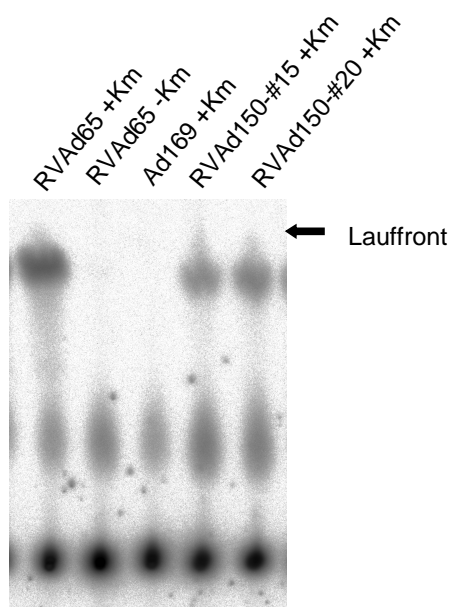
Wachstumshormons (BGH; *bovine growth hormone*) terminiert. Darüber ist die Struktur des HCMV-Genoms mit nicht-repetitiven (U, unique) und repetitiven (R) Regionen skizziert.

### **3.2.1.2. Versuche zur Generierung einer pp150-Deletionsmutante mit dem Rekombinationsplasmid pBgIjd150-neo**

Zur Generierung einer pp150-Deletionsmutante wurden zunächst je 20-40 µg linearisierte Plasmid-DNA von pBgIjd150-neo mit Hilfe der Calcium-Phosphat-Methode in humane Vorhautfibroblasten (HFF) transfiziert. Sechs Stunden nach Transfektion wurden die Zellen mit dem HCMV-Stamm Ad169 überinfiziert. Zusätzlich wurde das Antibiotikum G418 in einer Endkonzentration von 200 µg/ml dem Medium zugesetzt, um durch homologe Rekombination zwischen dem transfizierten Plasmid und dem Ad169-Genom entstandene, G418-resistente, rekombinante Viren anzureichern. Sobald sich in der Zellkultur ein zytopathischer Effekt (CPE) von 80-90% ausgebildet, wurde der infektiöse Zellkulturüberstand auf frische HFF passagiert. Nach 20 Passagen, die stets unter dem Selektionsdruck von 200 µg/ml G418 durchgeführt wurden, waren offensichtlich bereits ausreichende Mengen des rekombinanten Virus angereichert worden. Die Mehrzahl der infizierten Zellen starb nach Zugabe von G418 nicht mehr ab, sondern war resistent geworden. Zu diesem Zeitpunkt wurde der Überstand auf das Vorhandensein von rekombinanten Viren hin untersucht. Zunächst wurde ein sog. Neo-Test durchgeführt. Diese Methode ist dazu geeignet, Neomycin-Phosphotransferase-Aktivität (Neo) in einer Zellkultur nachzuweisen. Sie basiert auf der durch Neo katalysierten Phosphorylierung von Kanamycin (Km) mit [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP. Das dadurch entstandene Km-Phosphat wird anschließend mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt (Canabes-Bastos et al., 1989). Die Abb. 3.16. zeigt die dünnschichtchromatographische Auftrennung der Reaktionsansätze. Extrakte aus Zellen, die mit dem bereits beschriebenen rekombinanten Virus RvAd65 infiziert worden waren (Schmolke et al., 1995 b), das ebenfalls Neo exprimiert, wurden als Positivkontrolle verwendet (Spur 1). Der gleiche Extrakt ohne Zugabe von Km (Spur 2) sowie ein Extrakt aus Ad169-infizierten Zellen (Spur 3) dienten als Negativkontrollen. Extrakte aus Zellen, die mit dem Überstand des Rekombinationsansatzes aus der 15. Passage (Spur 4) und aus der 20. Passage (Spur 5) infiziert worden waren, zeigten wie die Positivkontrolle Neo-Aktivität (Abb. 3.16). Dies war ein deutlicher Hinweis darauf, dass die Neo-Kassette in das Virusgenom integriert worden war; nur durch Integration von Neo in das Virusgenom konnte die Neo-Aktivität durch Passagieren des infektiösen Zellkulturüberstandes auf neue HFF übertragen werden.

Da durch den Selektionsdruck von G418 offensichtlich ein Rekombinationsereignis zwischen dem Wildtypgenom und dem Rekombinationsplasmid stattgefunden hatte, wurden als nächstes Plaquereinigungen durchgeführt. Dies dient zur Isolierung von Virus-

Mutanten aus einem Gemisch mit Wildtyp-Virus, bzw. allgemeiner zur Herstellung genetisch homogener Viruspopulationen. Aus dem Überstand der 40. Passage des Rekombinationsansatzes wurden insgesamt 100 Einzelplaques isoliert und auf humanen Vorhautfibroblasten (HFF) amplifiziert. Mit den gewonnenen Überständen wurden HFF infiziert und sechs Tage nach Infektion einer Immunfluoreszenzanalyse unterzogen. Mit Hilfe des pp150-spezifischen monoklonalen Antikörpers XP1 wurde die Expression von pp150 untersucht. Keines der untersuchten Virusisolate war jedoch pp150-negativ, denn alle exprimierten das pp150-Protein und zeigten in der Immunfluoreszenzanalyse ein starkes zytoplasmatisches Signal (nicht gezeigt). Dies wies darauf hin, dass 40 Passagen unter dem starken Selektionsdruck von G418 bislang nicht ausgereicht hatten, das Wildtyp-Virus so weit abzureichern, daß eine wildtyp-freie Deletionsmutante aus dem Virusgemisch isoliert werden konnte.



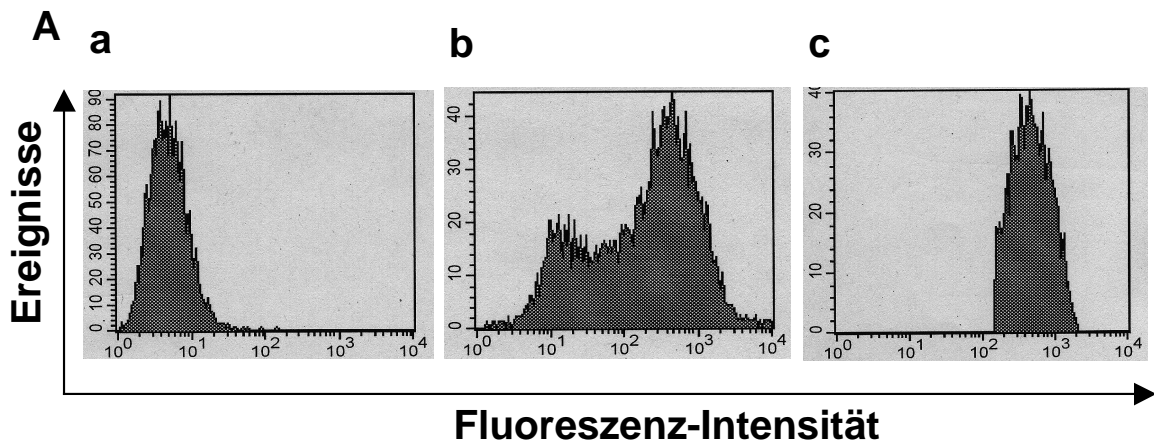
**Abb. 3.16.:** Analyse der Neo-Aktivität in Extrakten aus infizierten Zellen mit Hilfe der radioaktiven *in vitro*-Phosphorylierung von Kanamycin (Km) und anschließender Dünnschichtchromatographie. In den Ansatz von Spur 2 wurde kein Km zugegeben. Der Pfeil zeigt die Lage der Lauffront an.

### 3.2.1.3. Versuche zur Generierung einer pp150-Deletionsmutante mit dem Rekombinationsplasmid pBglJd150-Gfp-neo

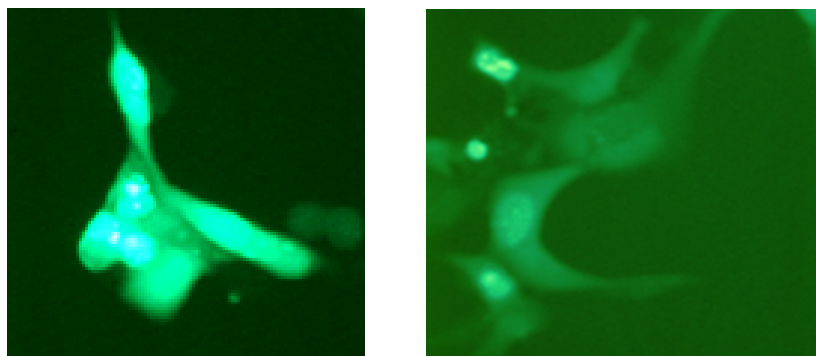
#### 3.2.1.3.1. Homologe Rekombination und Anreicherung der rekombinanten Viren

Da sich RVAd150 durch Selektion mit Neo nicht wildtyp-frei isolieren ließ, wurde ein neues Rekombinationsplasmid, pBglJd150-Gfp-neo, kloniert. Dieses Plasmid trägt die unter 3.2.1.1. beschriebene duale Markergen-kassette Gfp-neo, die eine effizientere Anreicherung der rekombinanten Viren gewährleisten sollte, als Neo alleine. Sie ermöglicht eine gleichzeitige Positiv- und Negativselektion der Mutante.

Zur Generierung der pp150-Deletionsmutante RVAd150 wurden diesmal je Ansatz 2 µg zirkuläre Plasmid-DNA von pBglJd150-Gfp-neo mit Hilfe der gegenüber der Calcium-Phosphat-Methode deutlich effizienteren Fugene-Methode in humane Vorhautfibroblasten (HFF) transfiziert. Sechs Stunden nach Transfektion wurden die Zellen mit dem HCMV-Stamm Ad169 überinfiziert und in Selektionsmedium mit 200 µg/ml G418 überführt. Der Vorteil dieser Methode war, dass entstandene rekombinante Viren schon nach wenigen Passagen des infektiösen Zellkulturüberstandes aufgrund des grün-fluoreszierenden Phänotyps im Fluoreszenzmikroskop unter Anregung von Licht der Wellenlänge 450-490 nm sichtbar wurden. Die Grünfluoreszenz trat zunächst in definierten Substrukturen des Zellkerns infizierter Zellen auf. Zu späteren Zeitpunkten des Replikationszyklusses erstreckte sie sich über den gesamten Zellkern und schließlich auch auf das Zytoplasma der Zelle. Die rekombinanten Viren konnten durch Zugabe von 200 µg/ml G418 sehr effizient angereichert werden, so dass nach 10 Passagen des infektiösen Zellkulturüberstandes alle infizierten Fibroblasten sowohl G418-resistent erschienen, als auch stark grün fluoreszierten. Zudem wiesen die infizierten Zellen Neo-Aktivität auf, die in einem Neo-Test durch die Phosphorylierung von Kanamycin nachgewiesen werden konnte (nicht gezeigt). Zu diesem Zeitpunkt wurden HFF mit dem Zellkulturüberstand aus Passage 10 infiziert und am Tag 3 nach Infektion einer FACS-Sortierung unterzogen. 60-70% der untersuchten Zellen exprimierten GFP stark und wurden von den restlichen Zellen abgetrennt (Abb. 3.17.).



**B**





**Abb. 3.17.:** **A:** FACS-Sortierung von infizierten HFF, die mit dem Rekombinationsansatz von RVAd150 aus der 10. Passage infiziert waren. Gezeigt sind nicht-infizierte HFF (**a**; Negativkontrolle), mit dem Rekombinationsansatz von RVAd150 infizierte HFF vor (**b**) und nach (**c**) der Sortierung. **B:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von HFF, die mit dem Rekombinationsansatz von RVAd150 infiziert worden waren.

Die FACS-sortierten Zellen wurden ausgesät, der infektiöse Überstand geerntet und eine Plaquereinigung durchgeführt. Unter den 80 isolierten Plaques war jedoch keiner frei von Wildtyp. In einer Immunfluoreszenzanalyse mit dem pp150-spezifischen Antikörper XP1 waren alle untersuchten Isolate pp150-positiv (nicht gezeigt).

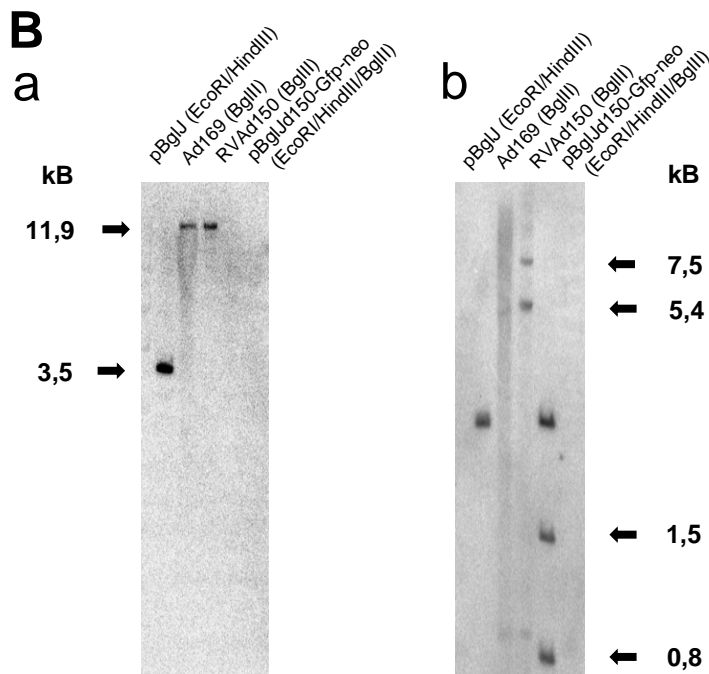
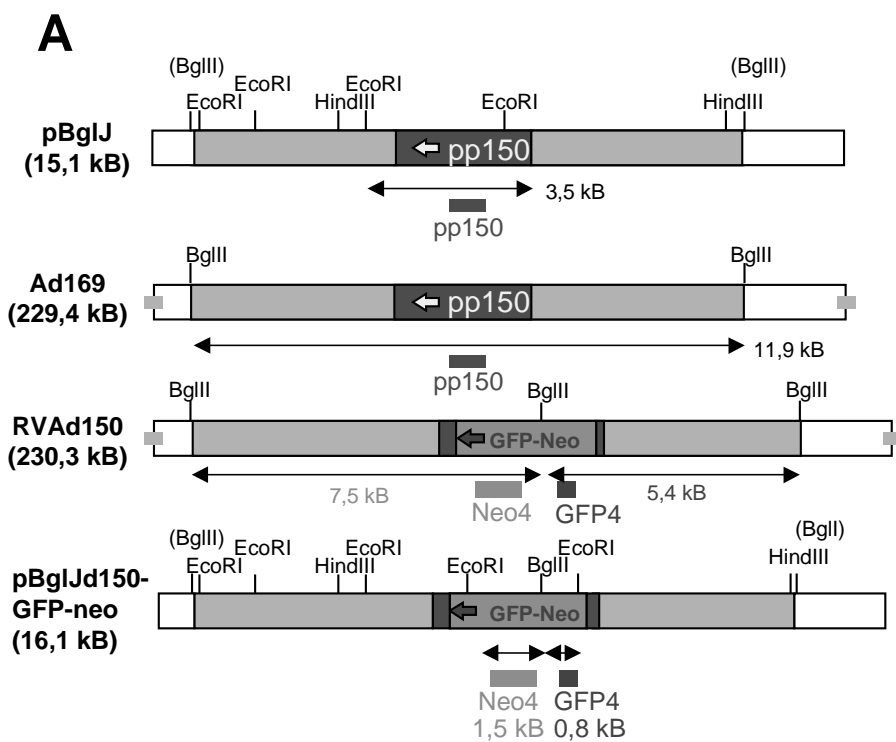
Die bis dato erhaltenen Ergebnisse ließen zwei Interpretationsmöglichkeiten zu. Entweder war das pp150-Protein für die Virusreplikation essentiell und eine pp150-Deletionsmutante somit nicht lebensfähig ist. Oder die Insertion der Gfp-neo-Kassette war auf nicht-homologe Weise in einen anderen Genombereich erfolgt, so dass die entstandenen rekombinanten Viren zusätzlich zu Gfp-neo noch immer das Gen für pp150 enthielten. Für den Fall, daß die zweite Überlegung zuträfe, wären weitere Versuche zur Isolierung einer pp150-Deletionsmutante hinfällig. Daher wurde zunächst in einer *Southern Blot*-Analyse untersucht, ob die Gfp-neo-Kassette an der gewünschten Stelle homolog in das Ad169-Genom integriert und damit ein Großteil der pp150-Leserahmens entfernt worden war.

#### **3.2.1.3.2. Southern Blot-Analyse der rekombinanten viralen DNA**

Um zu überprüfen, ob die Gfp-neo-Kassette homolog in das Virusgenom integriert worden war, wurde die virale DNA des Wildtyp-Stammes Ad169 sowie die DNA aus dem Überstand von HFF, die mit dem Rekombinationsansatz für die Deletionsmutante aus der 45. Passage (RVAd150-#45) infiziert worden waren, isoliert. Beide DNAs wurden mit dem Restriktionsenzym BglIII gespalten, gelelektrophoretisch aufgetrennt und einer *Southern Blot*-Hybridisierung unterzogen. Als Kontrolle für die spezifische Hybridisierung der verwendeten radioaktiv markierten Oligonukleotid-Sonden (pp150-S; Neo4 und GFP4) wurden zusätzlich das mit EcoRI und HindIII gespaltene Ausgangsplasmid pBglJ und das EcoRI/HindIII/BglIII-verdaute Rekombinationsplasmid pBgl $\Delta$ 150-Gfp-neo aufgetragen. Die Filter wurden als Duplikate angefertigt und mit den Oligo-Sonden pp150-S und GFP4/Neo4 inkubiert. Die Sonde pp150-S band in der Mitte des pp150-Gens, während die Sonden GFP4 und Neo4 nur in den rekombinanten Konstrukten binden konnten. Das Ergebnis dieser *Southern Blot*-Analyse ist in Abb 3.18. B dargestellt. Die Sonden GFP4 und Neo4 hybridisierten in der RVAd150-#45-DNA mit den erwarteten Banden von 7,5 kB und 5,4 kB Länge (Abb. 3.18. A und B (b)). Das bestätigte, dass die Insertion der Gfp-neo-Kassette durch homologe Rekombination in den pp150-Leserahmen stattgefunden hatte. Die

gewünschte pp150-Deletionsmutante war also gebildet und in den Überstand freigesetzt worden. Die Hybridisierung des zweiten Filters mit der pp150-S Sonde offenbarte aber, dass die aus dem Überstand von RVAd150-#45 isolierte DNA noch große Mengen an Wildtyp-DNA enthielt (Abb. 3.18. B (a)). Durch Hybridisierung der RVAd150-DNA mit pp150-S wurde ein Fragment von 11,9 kB sichtbar, das genau dem Fragment aus Ad169 entsprach.

Zusammengefasst ergaben diese Experimente, dass die gewünschte pp150-Deletionsmutante RVAd150-#45 zwar prinzipiell korrekt generiert worden war, dass sie aber trotz G418-Selektion, FACS-Sortierung und mehrfacher Plaquereinigungen nicht vom Wildtyp-Virus Ad169 abgetrennt werden konnte.



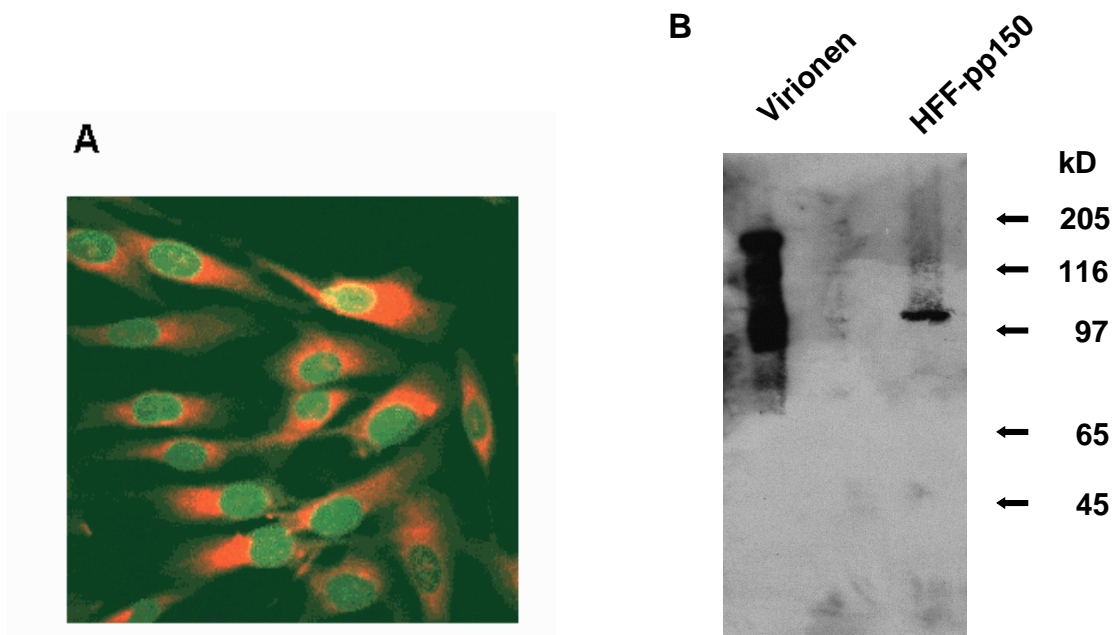
**Abb. 3.18.:** **A:** Schematische Übersicht der Lage wichtiger Restriktionsschnittstellen auf den Plasmiden pBglJ und pBglJd150-Gfp-neo, sowie auf den entsprechenden Ausschnitten der Virusgenome von Ad169 und RVAd150. Die Lokalisation der verwendeten radioaktiv markierten Oligonukleotid-Sonden ist eingezeichnet; ebenso die Größe der mit den Sonden hybridisierenden DNA-Fragmente.

**B:** *Southern Blot*-Analyse von gespaltener viraler und Plasmid-DNA zur Verifizierung der pp150-Deletionsmutante RVAd150. Die verwendeten Restriktionsenzyme sind in Klammern angegeben. Die Filterduplikate wurden mit den Sonden pp150-S (**a**) und GFP4/NEO4 (**b**) hybridisiert. Die Lage der erwarteten Banden ist durch Pfeile gekennzeichnet.

### 3.2.1.3.3.        **Versuche zur Komplementierung der pp150-Deletionsmutante *in trans***

Da die bisherigen Experimente zeigen konnten, dass in der Tat die gewünschte pp150-Deletionsmutante RVAd150 generiert worden war, sie aber nicht wildtyp-frei isoliert werden konnte, lag die Vermutung nahe, dass das pp150-Gen für die Virusreplikation essentiell ist. In den infizierten Zellkulturen fand offenbar eine Komplementation *in trans* zwischen RVAd150 und dem Wildtyp-Virus Ad169 statt, so dass nur eine Koinfektion mit beiden Viren zur Synthese von propagierbaren Nachkommenvirionen führte. Um den Selektionsdruck auf eine Koinfektion aufzuheben, wurde versucht, die pp150-Deletion *in trans* zu komplementieren. In Ermangelung einer gut für HCMV permissiven, immortalisierten Zelllinie wurden primäre humane Vorhautfibroblasten (HFF) stabil mit dem Gen für pp150 transfiziert. Durch Passagieren des Virusgemisches auf diesen Zellen sollte pp150 supplementiert und somit eine Abreicherung des Wildtyps erreicht werden. Dazu wurden HFF in der 5. Passage mit den pp150-kodierenden Plasmiden pp150-RSV bzw. pcDNA6-pp150 transfiziert. Zudem wurde das Plasmid pRG273, das die transformierenden Gene E6 und E7 von Humanem Papillomvirus Typ 16 sowie das Puromycin-Resistenzgen trägt (Halbert et al., 1991), im Verhältnis 1:50 kotransfiziert. Mit Hilfe von 1-2 µg/ml Puromycin im Medium wurde auf die Integration des Puromycingens in das Zellgenom selektiert. Die resistenten Zellen wurden dann auf Einzelzellebene auskloniert, expandiert und die Expression von pp150 in einer Immunfluoreszenzanalyse mit dem pp150-spezifischen monoklonalen Antikörper XP1 untersucht. Bei den mit pcDNA6-pp150 transfizierten HFF verminderte sich die pp150-Expression schon nach wenigen Passagen stark und ließ sich weder durch Hitzeschock, Arsenzugabe noch durch Behandlung mit Proteinsynthese-Inhibitoren (Geelen et al., 1987) reaktivieren. Mit pp150-RSV konnten Zellklone generiert werden, die pp150 stabil exprimierten (HFF-pp150; Abb. 3.19.). Das pp150-Protein war jedoch nukleär lokalisiert (Abb. 3.19. A), während es im Zuge der Virusreplikation ausschließlich im Zytoplasma der Zelle zu finden ist. Zudem ergab eine

*Western Blot*-Analyse mit dem pp150-spezifischen Antikörper XP1, dass das in den Zellen synthetisierte Protein offenbar trunziert war. Während das pp150-Protein in Ad169-infizierten Fibroblasten eine molekulare Masse von ca. 140 kD aufwies, wurde die Translation in den stabil transfizierten HFF offensichtlich bereits nach ca. 100 kD terminiert (Abb. 3.19. B). Dennoch wurde das RVAd150/Ad169-Virusgemisch dreimal auf dieser Zelllinie passagiert. Anschließend wurde eine Plaquereinigung durchgeführt. Es war jedoch nicht möglich, eine wildtyp-freie pp150-Deletionsmutante zu isolieren. Offensichtlich war die Komplementation des pp150-Proteins durch HFF-pp150 nicht ausreichend, um den Selektionsdruck auf Koinfektion mit Ad169 zu überwinden.



**Abb. 3.19.:** **A:** Lokalisation des pp150-Proteins in HFF-pp150. HFF-pp150 wurden auf Deckgläschen angezogen, mit 90% Aceton fixiert und einer Immunfluoreszenzanalyse mit dem pp150-spezifischen monoklonalen Antikörper XP1 und einem FITC-konjugierten Sekundärantikörper unterzogen.

**B:** Vergleichende *Western Blot*-Analyse von Virionen und HFF-pp150. Gereinigte Virionen und HFF-pp150 wurden mittels SDS-Page aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit dem pp150-spezifischen monoklonalen Antikörper XP1 inkubiert. Der gebundene XP1-Antikörper wurde mit einem HRP-konjugierten Sekundärantikörper detektiert und mittels ECL-Chemilumineszenz sichtbar gemacht.

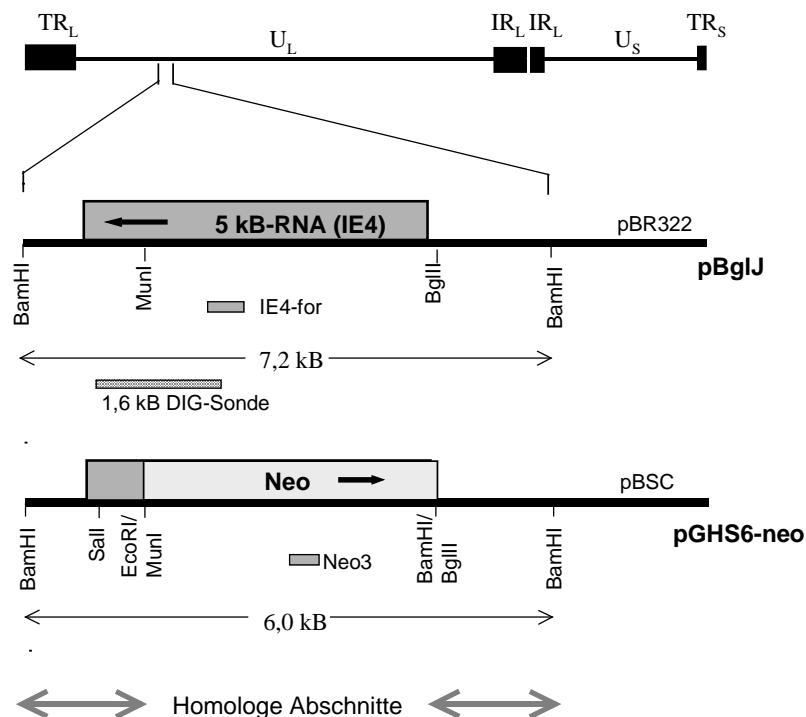
### 3.2.2. Herstellung einer IE4-Deletionsmutante

Das IE4-Gen liegt im HCMV-Genom auf dem *cluster* der *immediate-early* Gene (Greenaway et al., 1982). Von ihm wird eine mRNA von 5kb Länge transkribiert, wodurch

das Genomfragment seinen Namen „5kB-Region“ erhalten hat (Plachter et al., 1988). Da dieses Transkript nach bisherigem Kenntnisstand nicht für ein Protein kodiert, stellten wir die Frage, ob dieser relativ große Genombereich deletierbar ist, um Platz für die Insertion von Fremdsequenzen, wie sie für die Herstellung rekombinanter DB benötigt werden, zu schaffen. Um diese Frage zu beantworten, mußte zunächst geklärt werden, ob eine IE4-Deletionsmutante *in vitro* generierbar ist, ob sie replikationsfähig ist und ob die Deletion des IE4-Gens einen Einfluß auf die Ausbildung und Freisetzung von DB ausübt.

### 3.2.2.1. Klonierung des Rekombinationsplasmides pGHS6-neo

Zur Generierung einer IE4-Deletionsmutante wurde das Rekombinationsplasmid pGHS6-neo kloniert. In diesem Plasmid wurde ein Großteil der für IE4 kodierenden Sequenz durch das Gen für die bakterielle Neomycin-Phosphotransferase (Neo) ersetzt (Abb. 3.20.). Die Neo-Kassette stand in pGHS6-neo unter der Kontrolle des SV40 *early*-Promotors und wurde durch das polyA-Signal des SV40-Virus terminiert. Die Transkriptionsrichtung des Neo-Gens war der ursprünglichen Transkriptionsrichtung des IE4-Gens entgegengesetzt (Abb. 3.20.).



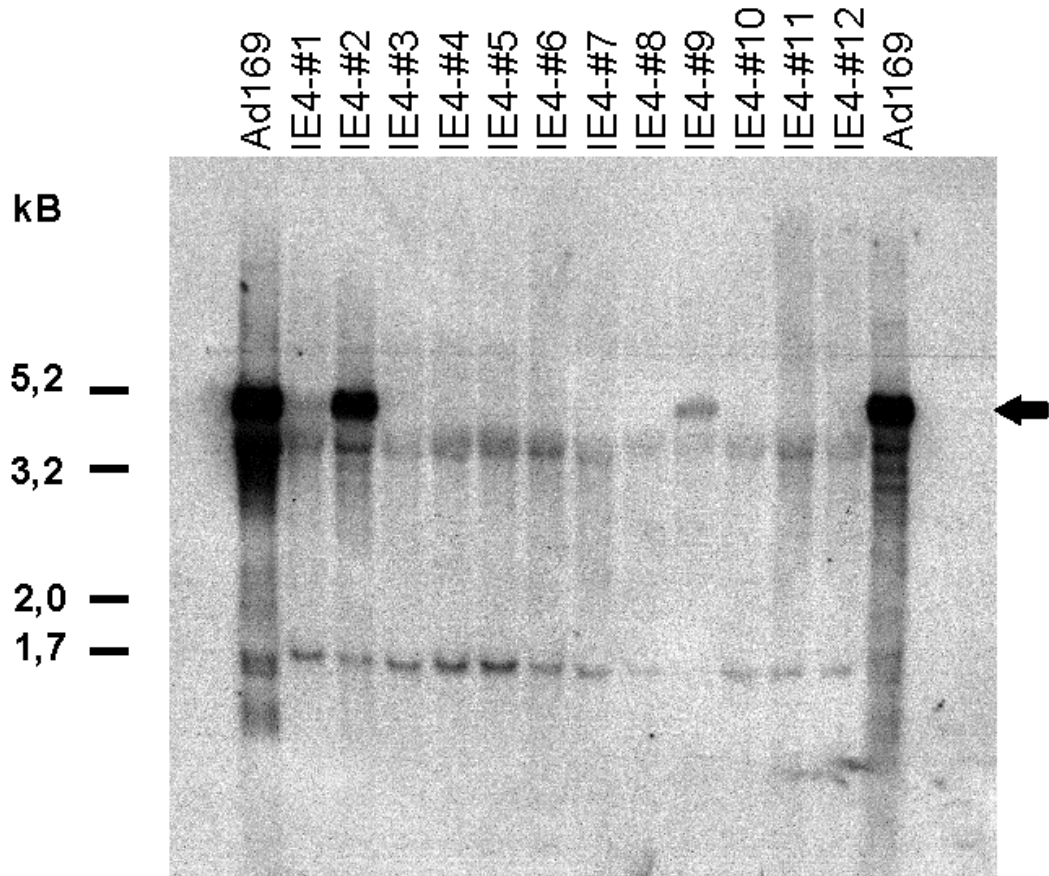
**Abb. 3.20.:** Schematische Darstellung des Rekombinationsplasmids pGHS6-neo, das zur Konstruktion der IE4-Deletionsmutante RVAdIE4 verwendet wurde. Das Ausgangsplasmid pGHS6 enthält die IE4-Region und flankierende Genombereiche des HCMV-Stammes Ad169. Die 2,7 kB große Neo-Kassette wurde durch Doppelverdau mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und BamHI aus dem Ausgangsplasmid pBSCTneo ausgeschnitten und in das Plasmid pGHS6 inseriert. PGHS6 enthielt das BamHI-Fragment des HCMV-Genoms, auf dem das IE4-Gen liegt. In pGHS6 war zuvor ein Großteil der kodierenden Region des IE4-Gens durch Doppelverdau mit MunI und

BgIII entfernt worden. Die kompatiblen DNA-Enden wurden mit Hilfe der T4-DNA-Ligase ligiert. Die Transkriptionsrichtung des IE4-Gens und des Neo-Gens, sowie die Lage der verwendeten Sonden zur genetischen Charakterisierung der IE4-Deletionsmutante sind gezeigt (IE4-for, Neo3, beides Oligonukleotidsonden; 1,6 kB-DIG-DNA-Sonde). Darüber ist die Struktur des HCMV-Genoms mit nicht-repetitiven (U, unique) und repetitiven (R) Regionen skizziert.

### 3.2.2.2. Generierung der IE4-Deletionsmutanten RVAdIE4

Zur Generierung einer IE4-Deletionsmutante wurden je 2 µg zirkularisierte Plasmid-DNA von pGHS6-neo mit Hilfe der Fugene-Methode in humane Vorhautfibroblasten (HFF) transfiziert. Sechs Stunden nach Transfektion wurden die Zellen mit dem HCMV-Stamm Ad169 überinfiziert. Zusätzlich wurde das Antibiotikum G418 in einer Endkonzentration von 200 µg/ml dem Medium zugesetzt, um eine Anreicherung der gewünschten, rekombinanten Viren zu gewährleisten. Nach 15 Passagen, die stets unter dem Selektionsdruck von 200 µg/ml G418 durchgeführt wurden, wurde der infektiöse Überstand auf das Vorhandensein von IE4-Deletionsmutanten hin untersucht. Dazu wurde eine Plaquereinigung durchgeführt und zwölf Einzelplaques isoliert. Alle zwölf Plaques wurden auf HFF amplifiziert, um größere Mengen infektiösen Überstandes für die folgenden Experimente zu gewinnen. Zur Verifizierung der Deletion der 5 kB-Region wurde eine *Northern Blot*-Analyse durchgeführt. Dazu wurden HFF mit jedem der zwölf Virusisolate infiziert. Am 5. Tag nach Infektion wurde die gesamt-zelluläre RNA aus den infizierten Zellen präpariert und auf einem Formaldehyd-Agarosegel elektrophoretisch separiert. Die gemäß ihrer Länge aufgetrennte RNA wurde auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert und mit einer 1,6 kB-langen, Digoxigenin-markierten DNA-Sonde hybridisiert. Diese wurde mittels CSPD-Detektion nachgewiesen. Die Sonde war homolog zu Sequenzen am 5'Ende des 5 kB-Transkriptes (siehe Abb. 3.20.). Sie hybridisierte auch mit dem Bereich der 5 kB-RNA, der in pGHS6-neo nicht deletiert wurde. Somit wären auch kryptische Transkripte dieser Region erfaßt worden, die eventuell trotz Deletion des 3'Anteils hätten synthetisiert werden können. Es war daher ausgeschlossen, dass Viren, deren RNA nicht mit dieser Sonde hybridisierte, eine kryptische Restaktivität des IE4-Gens exprimierten. Das Ergebnis der *Northern Blot*-Analyse ist in Abbildung 3.21. dargestellt. Als Positivkontrolle wurde RNA aus Ad169 isoliert, die in der späten Infektionsphase große Mengen der 5 kB-RNA enthält (Plachter et al., 1988). Von den zwölf untersuchten Virusisolaten waren lediglich zwei, IE4-#2 und #9, mit Wildtyp-Virus kontaminiert. Bei ihnen wurde nach Hybridisierung mit der 1,6 kB-DIG-Sonde die gleiche 5 kb-Bande wie beim Wildtyp Ad169 sichtbar. Alle anderen RNA-Präparationen hybridisierten nicht mit der Sonde und waren somit offensichtlich wildtypfreie IE4-Deletionsmutanten. Die Abbildung 3.21. zeigt das Ergebnis nach ca. 2 stündiger Exposition. Diese lange Expositionszeit wurde gewählt, um auch minore Wildtyp-Kontaminationen, wie sie beispielsweise in IE4-#9 zu sehen waren, zu erfassen. Zudem

zeigte die Kreuzreaktivität der Sonde mit zwei anderen RNAs von ca. 1,8 kB und 4,7 kB Länge, dass alle Spuren mit gleichen Mengen an gesamt-RNA beladen worden waren. Für die weitere Charakterisierung der entstandenen IE4-Deletionsmutanten wurden die Konstrukte IE4-#6 und IE4-#7 ausgewählt. Diese Viren wurden mit RVAdIE4-#6 bzw. -#7 bezeichnet.

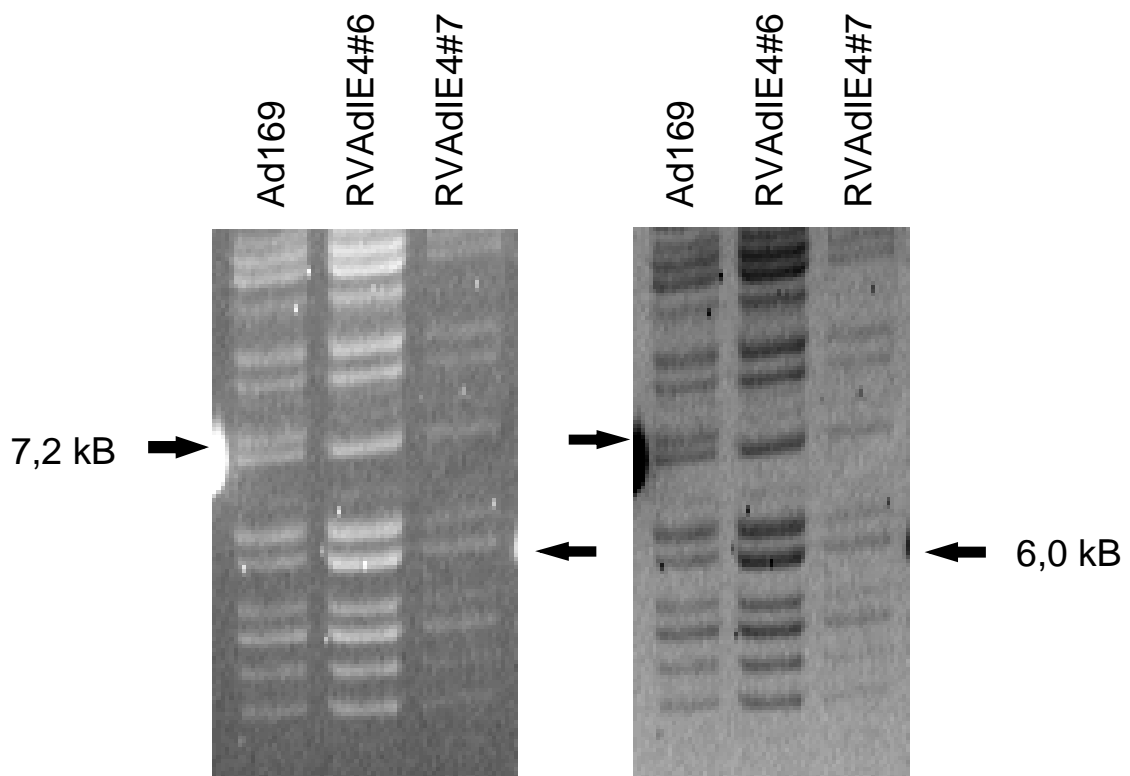


**Abb. 3.21.:** Northern Blot-Analyse von gesamt-zellulärer RNA aus HFF, die mit dem Wildtyp-Stamm Ad169 oder mit den plaquegereinigten Virusisolaten IE4-#1-IE4-#12 infiziert wurden. Die RNA wurde am Tag 5 nach Infektion isoliert. Pro Spur wurden 15 µg gesamt-RNA aufgetragen. Zur Detektion des 5 kB-Transkriptes wurde eine DIG-markierte DNA-Sonde von 1,6 kB verwendet (siehe Abb. 3.20.), die mit CSPD-Chemilumineszenz nachgewiesen wurde. Außer den Isolaten IE4-#2 und -#9 repräsentierten alle untersuchten RNA-Präparationen die gewünschte IE4-Deletionsmutante RVAdIE4.

### 3.2.2.3. Restriktionsverdau-Analyse von RVAdIE4

Zur Verifizierung der IE4-Deletionsmutante RVAdIE4 auf DNA-Ebene wurde virale DNA isoliert und mit dem Restriktionsenzym BamHI geschnitten. Im Vergleich mit der Wildtyp-DNA des Stammes Ad169 sollte sich nach BamHI-Verdau und Agarosegel-Elektrophorese der RVAdIE4-DNA ein verändertes Bandenmuster ergeben. Das 7,2 kB lange BamHI-

Fragment aus Ad169, das auch in dem Ausgangsplasmid pGHS6 enthalten war, verschwand in der Deletionsmutante vollständig. Anstelle dessen entstand ein 6,0 kB-Fragment, das die Neo-Kassette enthielt und mit einem weiteren BamHI-Fragment von 6,0 kB komigrierte (Abb. 3.22.; siehe auch Abb. 3.20.). Es konnte also auf molekularer Ebene gezeigt werden, dass die beiden Viruspopulationen RVAdIE4-#6 und -#7 in der Tat die gewünschten rekombinanten Viren repräsentierten, in denen das IE4-Gen deletiert und durch die Neo-Kassette ersetzt worden war. Die theoretische Möglichkeit, dass eine nicht-homologe Rekombination der Neo-Kassette in eine andere Genomregion zur G418-Resistenz und damit zur Anreicherung von rekombinanten Viren geführt hatte, konnte dadurch ausgeschlossen werden.



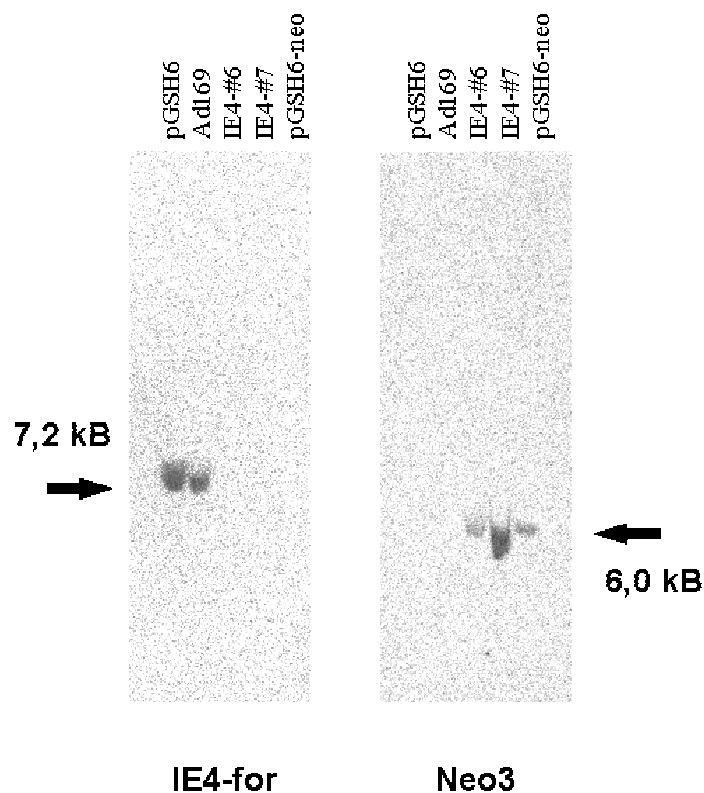
**Abb. 3.22.:** BamHI-Restriktionsverdau von viraler DNA, die aus dem Wildtypstamm Ad169 (linke Spur) und den rekombinanten Viren RVAdIE4-#6 und -#7 (rechts) isoliert wurde. Das 7,2 kB Fragment, das das IE4-Gen von Ad169 enthält, verschwand bei den Virusmutanten. Stattdessen trat hier ein zusätzliches 6,0 kB-Fragment auf (Doppelbande), das das Neo-Gen enthielt. Die linke Bildhälfte zeigt das Ethidiumbromid-gefärbte Gel unter UV-Licht, die rechte Bildhälfte gibt das computerberechnete inverse Abbild wieder.

#### 3.2.2.4. Southern-Blot-Analyse von RVAdIE4

Um die Möglichkeit auszuschließen, dass geringe Kontaminationen mit Wildtyp-DNA in der Ethidiumbromid-Anfärbung der restringierten DNA von RVAdIE4-#6 und -#7 unentdeckt



geblieben waren, wurde mit der *Southern Blot*-Analyse eine noch deutlich sensitivere Nachweismethode zur Verifizierung der rekombinanten Viren durchgeführt. Dazu wurde Plasmid-DNA der Plasmide pGHS6 und pGHS6-neo und virale DNA von Ad169 bzw. RVAdIE4-#6 und -#7 isoliert. Alle DNA-Präparationen wurden einem BamHI-Verdau unterzogen und als Duplikate auf ein Agarosegel aufgetragen. Nach elektrophoretischer Auftrennung wurden die entstandenen Fragmente auf eine Nylonmembran transferiert und mit radioaktiv markierten Oligonukleotid-Sonden hybridisiert. Die Sonde IE4-for war homolog zu einem Bereich des IE4-Gens, der in RVAdIE4 deletiert sein sollte (siehe Abb. 3.20.). Sie sollte daher nur an pGHS6- und Ad169-DNA binden. Die Sonde Neo3 war homolog zu dem Neo-Gen und sollte daher nur mit pGHS6-Neo und den beiden RVAdIE4-Viren hybridisieren (siehe Abb. 3.20.). Die Abbildung 3.23. zeigt das *Phosphoimaging*-Ergebnis beider *Southern Blots*. Die IE4-for-Sonde hybridisierte nur mit pGHS6 und Ad169 spezifisch. Sie detektierte ein 7,2 kB großes BamHI-Fragment. Die Neo3-Sonde hingegen band ausschließlich an pGHS6-neo sowie die damit generierten rekombinanten Viren RVAdIE4-#6 und -#7. Es wurde das erwartete Fragment von 6,0 kB sichtbar. Diese Ergebnisse bestätigten, dass die rekombinanten Viren RVAdIE4 in der Tat die korrekten Änderungen des Restriktionsmusters aufwiesen und wildtyp-frei vorlagen.



**Abb. 3.23.:** Vergleich der rekombinanten Viren RVAdIE4-#6 und -#7 mit dem Wildtyp-Virus Ad169 in einer *Southern Blot*-Analyse. Zur Verifizierung der Bandengrößen wurden die Plasmide pGHS6, das die 5 kB-Region von Ad169 enthält, und pGHS6-neo, das zur Konstruktion von RVAdIE4 verwendet wurde, mit aufgetragen. Alle DNA-Proben wurden vor der Elektrophorese mit BamHI

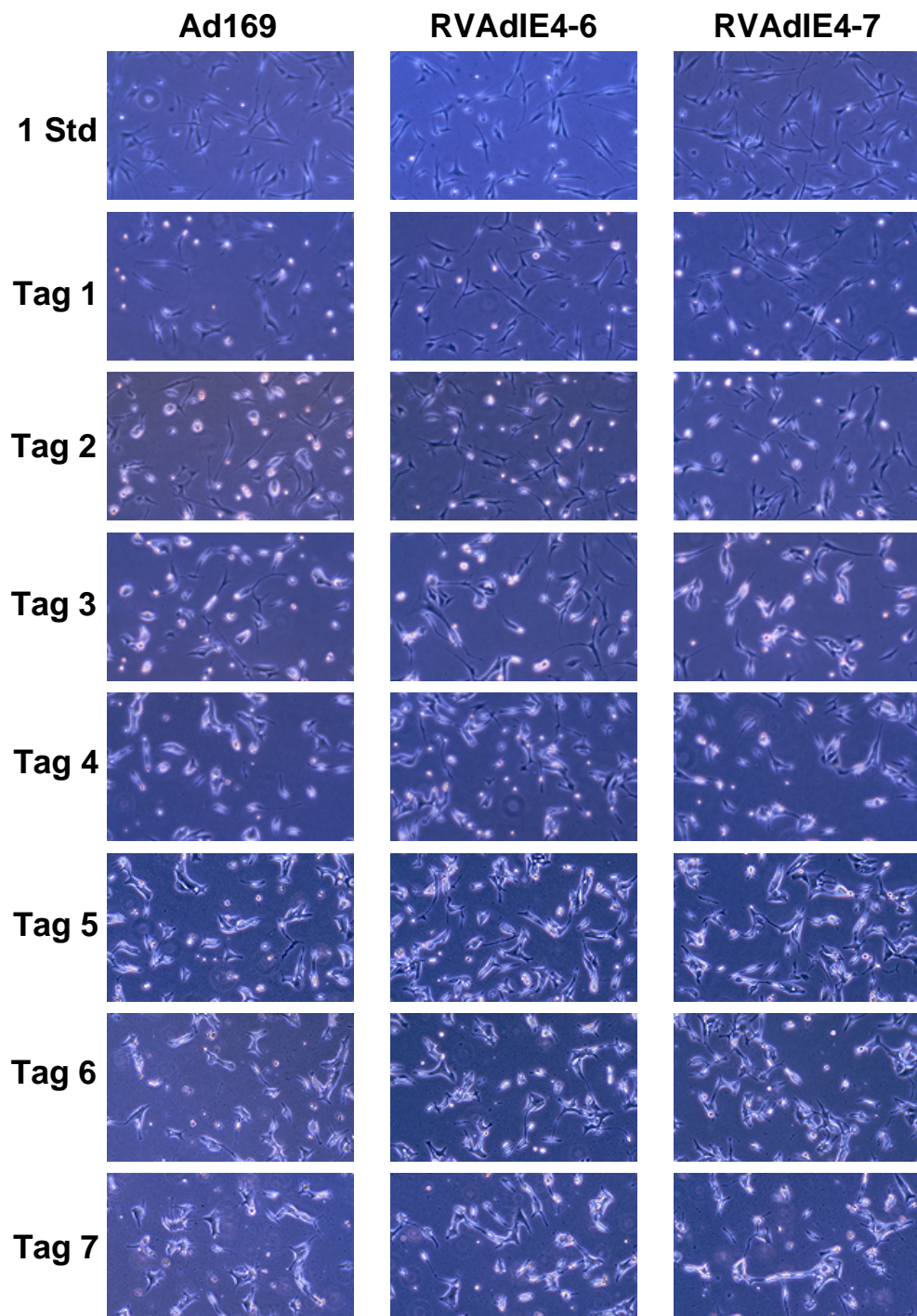
verdaut. Die zur Hybridisierung verwendeten radioaktiv markierten Oligonukleotid-Sonden IE4-for und Neo3 sind angegeben. Die Größen der detektierten Fragmente sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Die IE4-spezifische Sonde IE4-for detektierte das erwartete 7,2 kB-Fragment von pGHS6 und Ad169. Sie hybridisierte jedoch nicht mit pGHS6-neo und RVAdIE4-#6 und-#7. Die neo-spezifische Sonde hingegen hybridisierte lediglich mit pGHS6-neo und der DNA der beiden rekombinanten Viren, wobei das erwartete, durch Insertion der Neo-Kassette entstandene 6,0 kB-Fragment sichtbar wurde.

### **3.2.2.5. Vergleich des Replikationsverhaltens und der Partikelbildung von RVAdIE4 und Ad169 *in vitro***

Nachdem gezeigt worden war, dass das Genom von RVAdIE4 in der Tat die gewünschten Modifikationen enthielt, sollte geprüft werden, ob die Deletion des IE4-Gens einen Einfluß auf das Replikationsverhalten dieser Viren *in vitro* hat. Dazu wurden HFF mit jeweils einer gleichen Virusmenge von 5 m.o.i. mit dem Wildtypstamm Ad169 und den rekombinanten Viren RVAdIE4-#6 und -#7 infiziert. Anschließend wurde das Replikationsverhalten der infizierten Zellen *in vitro* anhand der Zellmorphologie verglichen und fotografisch dokumentiert (Abb. 3.24.). In dem achttägigen Beobachtungszeitraum konnten keine signifikanten Unterschiede im Wachstumsverhalten zwischen dem Ausgangsstamm Ad169 und RVAdIE4 detektiert werden. Es entwickelte sich in allen Kulturen zwischen Tag 5 und Tag 7 ein vergleichbarer zytopathischer Effekt. Geringgradige Unterschiede in der Morphologie der Zellen deuteten darauf hin, dass mit Ad169-infizierte HFF etwas früher lysiert wurden (Abb. 3.24.). Am Tag 8 nach Infektion waren sowohl Ad169- als auch RVAdIE4-infizierte Zellen komplett lysiert. Zur Passage von extrazellulärem Virus auf frische HFF konnte bei RVAdIE4 die gleiche Menge Zellkulturüberstand eingesetzt werden wie bei Ad169. Auch nach mehrmaligem Passagieren verhielten sich beide Viren vergleichbar.

Zur Klärung der Frage, welche extrazellulären Partikel von der IE4-Deletionsmutante gebildet und freigesetzt werden, wurde der Zellkulturüberstand infizierter HFF acht Tage nach Infektion geerntet und eine Gradientenreinigung angeschlossen. RVAdIE4-infizierte HFF produzierten alle drei Arten von Partikeln: infektiöse Virionen, NIEPs und *Dense Bodies*. Die relativen Mengenverhältnisse unterschieden sich nicht signifikant von den von Ad169-infizierten HFF freigesetzten Partikeln (nicht gezeigt).

Zusammengefaßt konnten diese Ergebnisse zeigen, dass die IE4-Deletionsmutante ein ähnliches Replikationsverhalten zeigte wie das Ausgangsvirus Ad169. Zudem schien die Ausbildung von *Dense Bodies* durch die Deletion von IE4 in keiner Weise beeinträchtigt zu sein. Daraus ergibt sich die Möglichkeit, den IE4-Leserahmen im Zuge von Experimenten zur Herstellung rekombinanter DB zu deletieren, um Platz für die Insertion von Fremdsequenzen in das HCMV-Genom zu gewinnen.



**Abb. 3.24.:** Phasenkontrast-mikroskopischer Vergleich des Replikationsverhaltens der IE4-Deletionsmutanten RVAdIE4-#6 und -#7 mit dem Wildtyp-Virus Ad169 *in vitro*. HFF wurden mit jeweils gleicher m.o.i. von Ad169, RVAdIE4-#6 und RVAdIE4-#7 infiziert und zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion fotografiert.

### 3.2.2.6. Einfluß der Deletion von IE4 auf die Aktivierung früher Promotoren

Da die Untersuchungen des Replikationsverhaltens und der *Dense Body*-Formation keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp-Virus Ad169 offenbarten, stellte sich die Frage nach der Funktion des 5 kB langen IE4-Transkriptes. Um potentiell mögliche Mechanismen der Wirkungsweise dieser RNA eingrenzen zu können, wurde der Einfluß der IE4-Deletion auf die Aktivierung früher viraler Promotoren untersucht. Dazu wurden für HCMV permissive Zelllinien verwendet, die das Luciferase-Gen unter der Kontrolle früher viraler Promotoren exprimierten. Alle verwendeten Zelllinien waren stabile Transfektanten der Glioblastomzelllinie U373-MG. Sie exprimierten das Luciferase-Reportergen unter der Kontrolle des *major immediate early*-Promotors von HCMV (U373-MIEP), des UL112/113-Promotors (U373-UL112/113P) bzw. des UL97-Promotors (U373-UL97P). Alle drei Zelllinien wurden mit jeweils gleicher m.o.i. von 5 mit Ad169, RVAdIE4-#6 und RVAdIE4-#7 infiziert. Zudem wurde ein nicht infizierter Kontrollansatz mitgeführt. Zu verschiedenen Zeitpunkten, zehn, 24 und 48 Stunden nach Infektion, wurden die Zellen von der Kulturschale abgelöst, gezählt und jeweils  $1 \times 10^5$  Zellen in einen Luciferase-Test eingesetzt. Anhand der Stärke der Luciferase-Expression ließ sich der Aktivierungsgrad der dem Luciferase-Gen vorgeschalteten Promotoren quantifizieren. Tabelle 3.3. gibt das Ergebnis dieses Experimentes wieder. Die in der Tabelle angegebenen Werte repräsentieren den Faktor der Steigerung der Luciferase-Aktivität gegenüber der nicht-infizierten Kontrolle, die zum gleichen Zeitpunkt geerntet wurde.

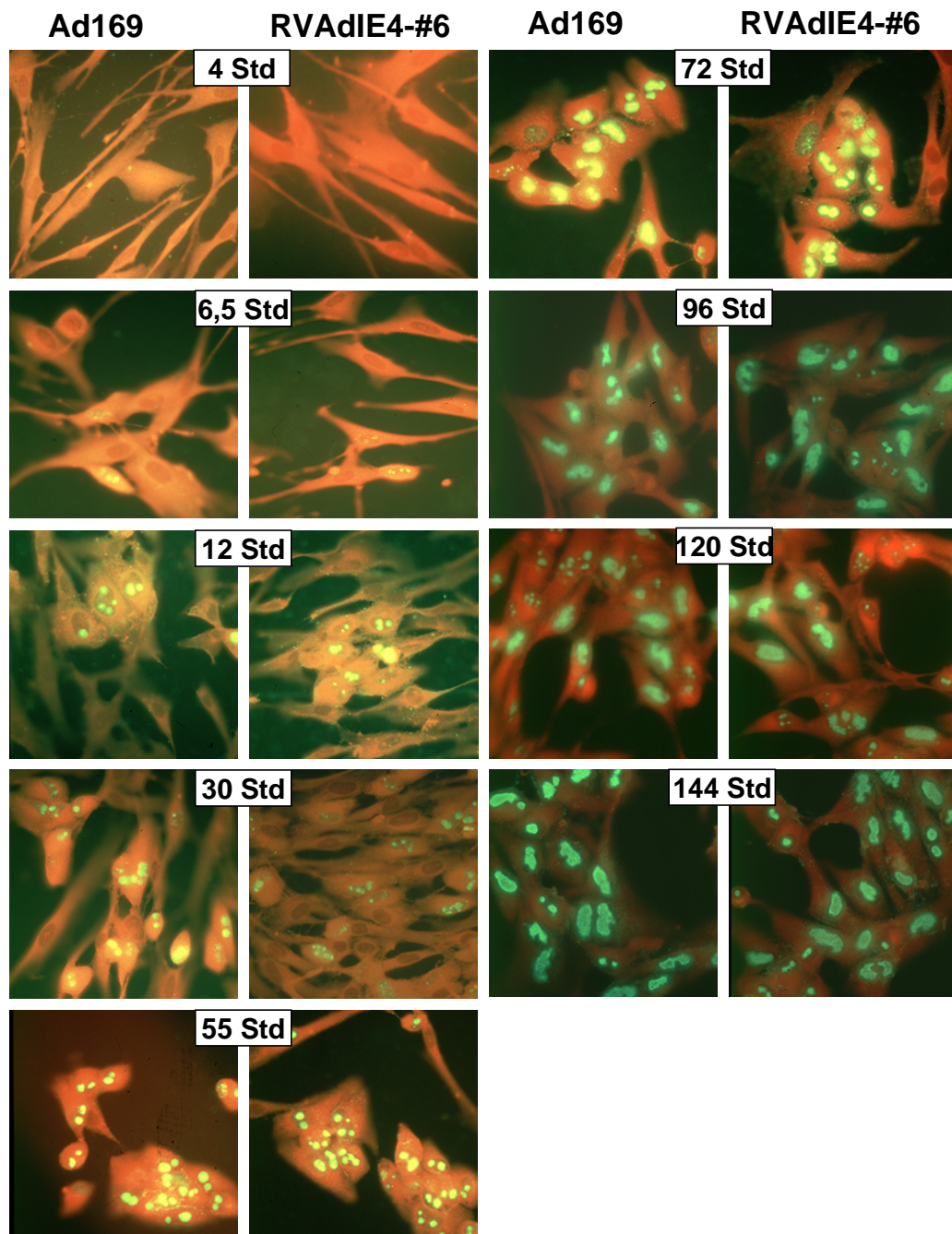
Wie aus der Tabelle 3.3. zu ersehen ist, wurde der MIE-Promotor zehn Std. nach Infektion von allen Viruskonstrukten um einen Faktor 2 und 24 Std. nach Infektion um einen Faktor 3-4 aktiviert. 48 Std. nach Infektion war die Luciferase-Aktivität in Ad169-infizierten Zellen um einen Faktor zehn und in RVAdIE4-infizierten Zellen um einen Faktor 5-6 im Vergleich zur Kontrolle erhöht. Ein ähnliches Bild ergab die Aktivierung des UL97-Promotors. Auch hier zeigte sich zehn und 24 Std. nach Infektion kein signifikanter Unterschied zwischen den Viren. 48 Std. p.i. wurde der UL97-Promotor in Ad169-infizierten Zellen zehnfach stärker, in RVAdIE4-infizierten 3 bis 4-fach stärker als die nicht infizierte Kontrolle aktiviert. Ein deutlich abweichendes Aktivierungsverhalten zeigte der UL112/113-Promotor. Zehn Std. nach Infektion wurde dieser Promotor durch Infektion mit Wildtyp-HCMV 157 mal stärker aktiviert als in dem nicht infizierten Parallelansatz. Die Mutanten RVAdIE4-#6 und -#7 hingegen führten nur zu einer 4 bis 5-fachen Erhöhung der Luciferase-Aktivität, also zu einer 30-fach schwächeren Aktivierung des UL112/113-Promotors. Zu späteren Zeitpunkten wurde der Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante geringer. Er betrug 24 Std. nach Infektion einen Faktor 5 bis 8 und 48 Std. nach Infektion lediglich noch einen Faktor von 2 bis 3.

**Tabelle 3.3.:** Steigerung der Aktivität der frühen HCMV-Promotoren MIEP, UL97P und UL112/113P durch die Infektion mit Ad169, RVAdIE4-#6 und -#7 gegenüber einer nicht-infizierten Kontrolle.

Zelllinie	Infektion mit	Faktor der Steigerung der Luciferase-Aktivität infiziert/nicht-infiziert		
		10 Std. p.i.	24 Std. p.i.	48 Std. p.i.
U373-MIEP	Ad169	2	4	10
	RVAdIE4-#6	2	3	6
	RVAdIE4-#7	2	3	5
U373-UL97P	Ad169	1	3	10
	RVAdIE4-#6	1	2	4
	RVAdIE4-#7	1	2	3
U373-UL112/113P	Ad169	157	32416	54641
	RVAdIE4-#6	5	7731	33379
	RVAdIE4-#7	4	4340	17479

### 3.2.2.7. Kontrolle der Expression der UL112/113-Region

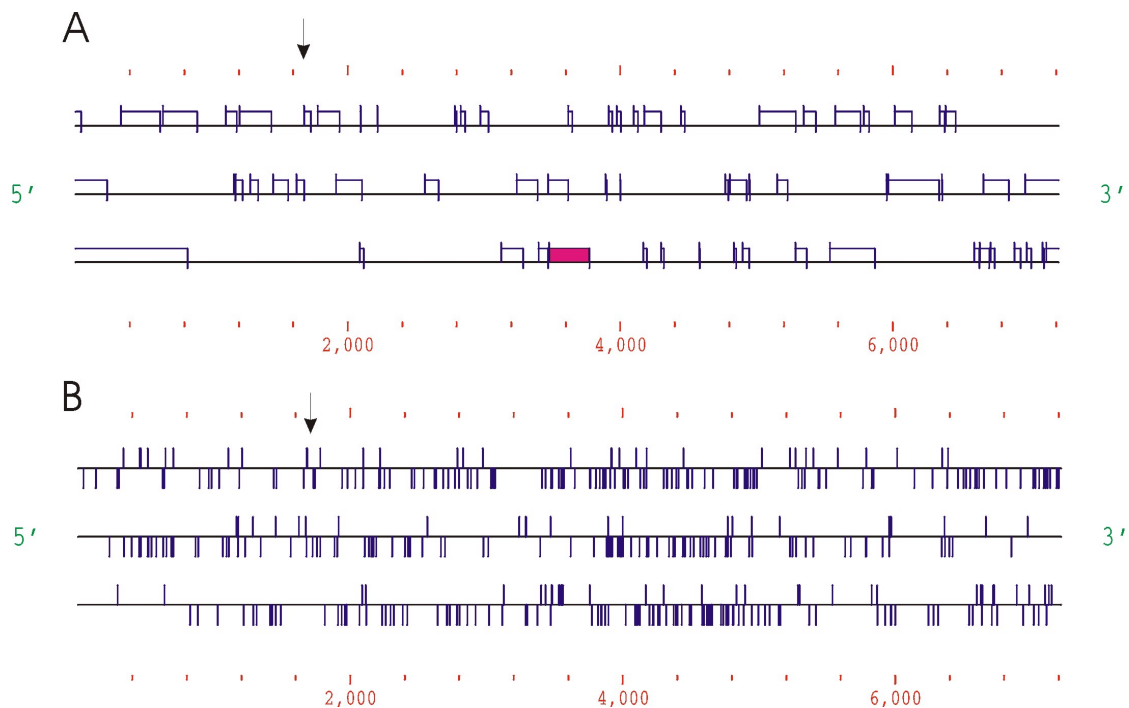
Der an das Gen für IE4 angrenzende Leserahmen UL112/113 übt wichtige Funktionen im Rahmen der Replikation von HCMV aus. Er kodiert u. a. für einen Koaktivator der Transkription (Li et al., 1999). Um sicherzustellen, dass das an das IE4-Gen angrenzende, stark transkribierte UL112/113-Gen in der Deletionsmutante nicht beeinträchtigt war, wurde die Expression der UL112/113-Genprodukte in Ad169- und RVAdIE4-infizierten Fibroblasten verglichen. Die Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion fixiert und die Expression der UL112/113-Genprodukte mit Hilfe des spezifischen Antikörpers M23 in einer Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen (Yamamoto et al., 1998). Wie aus der Abb. 3.25. hervorgeht, wurden mit dieser nicht-quantitativen Methode keine signifikanten Unterschiede in der Expression der UL112/113-Genprodukte zwischen Ad169 und RVAdIE4 detektiert. Die beobachteten Effekte auf die Aktivierung früher viraler Promotoren schienen also tatsächlich durch die Deletion des IE4-Gens und nicht durch eine Beeinträchtigung des UL112/113-Gens verursacht worden zu sein. Einschränkend muß jedoch erwähnt werden, dass die Immunfluoreszenz eine relativ insensitive Methode darstellt und daher geringgradige Unterschiede in der Expression von UL112/113 zwischen den verschiedenen Viren nicht erfaßt würden.



**Abb. 3.25.:** Immunfluoreszenzfärbung der UL112/113-Genprodukte in Ad169- und RVAdIE4-infizierten Zellen. Die HFF wurden auf Deckgläschen angezogen, mit gleicher m.o.i. beider Viren infiziert und zu den angegebenen Zeitpunkten fixiert. Der Nachweis der UL112/113-Proteine erfolgte mit dem monoklonalen Antikörper M23 (Yamamoto et al., 1998). Die Bindung von M23 wurde mit einem FITC-gekoppelten Sekundärantikörper detektiert.

### 3.2.2.8. Kodiert das IE4-Transkript doch für ein Protein?

Da unklar war, wie ein Transkript von 5 kB Länge Einfluß auf die Aktivierbarkeit früher viraler Promotoren nehmen könnte, wurde untersucht, ob dieses Transkript entgegen der Erwartung für ein Protein kodiert. Durch ein, beispielsweise DNA-bindendes, Protein wären die beobachteten Effekte leichter erklärbar als durch ein RNA-Molekül. Eine Translation des Transkriptes in ein Protein, das die beobachteten Effekte vermitteln hätte können, wurde jedoch bislang nicht beobachtet. Die kodierende Sequenz von IE4 weist zahlreiche Stop-Codons auf. Dadurch entstehen nur sehr kurze offene Leserahmen (ORF) (Plachter et al., 1988). Eine Translation der RNA in ein Protein ist daher auch unter Berücksichtigung ungewöhnlicher Mechanismen wie *Splicing*, *Editing* und *Frameshift* nach bisherigem Kenntnisstand nicht wahrscheinlich. Die Abb. 3.26. zeigt eine Computeranalyse der kodierenden Region der 5 kB RNA, die dieses Phänomen illustriert.

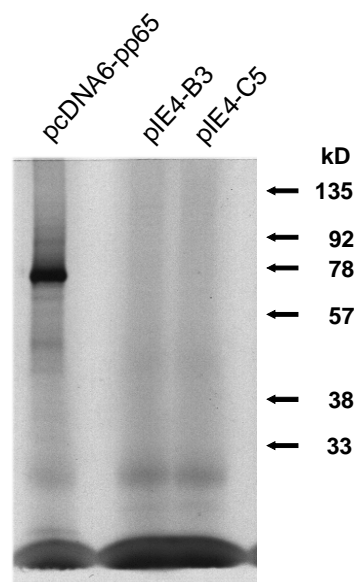


**Abb. 3.26.:** Computeranalyse der kodierenden Region der 5 kB RNA. Der Pfeil markiert den Beginn der kodierenden Region. **A:** Analyse der offenen Leserahmen (ORF). Der erste längere ORF kodiert für 53 Aminosäuren. Der längste ORF dieses Genbereichs kodiert für 99 Aminosäuren und ist in rot hervorgehoben.

**B:** Schematische Abbildung der Start- (Markierung nach oben) und Stop-Codons (Markierung nach unten) in allen drei Leserahmen der Proteinsynthese. Multiple Stop-Codons sind über den gesamten kodierenden Bereich verteilt.

Da aufgrund der Primärstruktur der DNA kein Hinweis auf einen Protein-kodierenden Bereich des IE4-Gens erhalten werden konnte, sollte durch *in vitro* Transkription und

anschließender *in vitro* Translation nach einem Polypeptid gesucht werden. Dazu wurde der kodierende Bereich des IE4-Gens in einen Vektor kloniert, der den Promotor des Bakteriophagen T7 vor der Klonierungsstelle enthielt (zwei Klone: pIE4-B3 und pIE4-C5). Mit Hilfe eines kommerziell verfügbaren *in vitro* Transkriptions- und Translationsverfahrens (Promega) können Proteine, die unter der Kontrolle des T7-Promotors stehen, radioaktiv markiert und auf einem Autoradiogramm sichtbar gemacht werden. Die Anwendung dieses Verfahrens auf das IE4-Gen führte jedoch nicht zur Synthese autoradiographisch detektierbarer Mengen eines Proteins (Abb. 3.27.). Da mit dieser Methode nur Proteine nachgewiesen werden können, die durch den Einbau von  $^{35}\text{S}$ -Methionin radioaktiv markiert wurden, konnte jedoch nicht definitiv ausgeschlossen werden, dass ein Protein mit einer ungewöhnlichen Start-Aminosäure translatiert wurde.



**Abb. 3.27.:** *In vitro* Transkription und Translation der kodierenden Region des IE4-Gens. Die in das *in vitro* Transkriptions- und Translationsverfahren (Promega) eingesetzten Plasmide sind angegeben. Während man in der Positivkontrolle pp65 ein deutliches Proteinsignal in der erwarteten Höhe von 65 kD findet, wird die IE4-RNA nicht in ein detektierbares Protein übersetzt.



#### 4. Diskussion

##### 4.1. Immunogenes Potential von *Dense Bodies* des HCMV

Seit Edward Jenner 1796 entdeckte, dass eine Infektion mit Kuhpocken Protektion vor einer Infektion mit den hochvirulenten „echten“ Pocken vermittelt, ist die Entwicklung von Vakzinen ein Traum der Menschheit. Impfstoffe haben in den letzten Jahrzehnten einen enormen Beitrag zur Bekämpfung von Infektionskrankheiten geleistet. So konnten die Pocken bereits ausgerottet werden. Die Zahl der Infektionen mit Poliovirus oder Masernvirus ging aufgrund von weltweiten Impfkampagnen der WHO drastisch zurück. Auch für zahlreiche andere virale Erreger, wie das Mumpsvirus, das Rötelnvirus, die Hepatitis A- und B-Viren oder das Tollwutvirus stehen heute wirkungsvolle Vakzinen zur Verfügung. Es gibt jedoch auch eine Reihe von Viren wie HIV, das Hepatitis C Virus sowie die humanen Herpesviren mit Ausnahme von VZV, gegen die bislang kein wirksamer Impfstoff entwickelt werden konnte. Bei einigen der genannten Viren liegt die Ursache dafür darin begründet, dass die natürliche Infektion in der Regel weder eine protektive Immunität gegen Reinfektionen und Rekurrenz hervorruft, noch zur Elimination des Erregers aus dem Organismus führt. Bei anderen stellt die hohe genetische Variabilität ein Hindernis dar.

Obwohl die Entwicklung von Impfstoffen gegen die Vertreter der humanen Herpesviren seit Anfang der siebziger Jahre auf großes wissenschaftliches, medizinisches und wirtschaftliches Interesse gestoßen ist, konnte bisher nur ein Impfstoff, der lebend-attenuierte Varizellen-Impfstoff für die Anwendung in Hochrisikopopulationen lizenziert werden. Versuche, dieses Konzept auf das Humane Cytomegalovirus zu übertragen und lebend-attenuierte Viren als Impfstoff einzusetzen, waren bislang nur begrenzt erfolgreich (Plotkin, 1999). Darüber hinaus ist die Verwendung von replikationskompetenten Herpesviren als Immunprophylaxe generell mit Risiken wie der Latenzetablierung assoziiert, die zu späteren Reaktivierungen des Virus aus dem Stadium der Latenz führen kann. Zudem ist eine Beteiligung des HCMV an der malignen Transformation von Zellen nicht abschließend geklärt. Aus diesen Gründen sind Lebendimpfstoffe, die bei der Bekämpfung von Infektionen mit Vertretern anderer Virusfamilien außerordentlich erfolgreich waren, nur in beschränktem Umfang gegen Herpesviren einsetzbar.

Aufgrund der jahrzehntelangen Erfahrung in der Impfstoffentwicklung gegen HCMV geht man heute davon aus, dass eine erfolgreiche HCMV-Vakzine eine breite Induktion beider Arme des Immunsystems gewährleisten muß. Eine mögliche Erklärung für die eingeschränkte Immunität, die durch die bereits getesteten, auf dem Glykoprotein gB basierenden, Spaltvakzinen vermittelt wurde, ist sicherlich die Tatsache, dass oft nicht humorale und zelluläre Immuneffektormechanismen gleichermaßen induziert werden konnten. So stellt z.B. das Glykoprotein B das wichtigste Antigen zur Ausbildung einer

neutralisierenden Antikörper-Antwort gegen HCMV dar. Es ist jedoch offensichtlich keine dominante Zielstruktur für HCMV-spezifische CD8-positive zytotoxische T-Zellen (CTL). Aus diesem Grunde haben einige Wissenschaftler die Notwendigkeit einer Kombination von B- und T-Zell-Antigenen in einer zukünftigen HCMV-Vakzine betont (Endresz et al., 1999).

Ziel dieser Arbeit war es, virus-ähnliche Partikel, sog. „*Dense Bodies*“ (DB), auf ihr immunogenes Potential hin zu untersuchen und zu prüfen, ob sie als Grundlage für die Entwicklung eines Impfstoffes gegen HCMV geeignet sind. Insbesondere sollte analysiert werden, ob DB in der Lage sind, humorale und zelluläre Immuneffektormechanismen gleichermaßen zu induzieren.

DB sind in der HCMV-Forschung schon seit Jahrzehnten bekannt (Luse & Smith, 1958; McGavran & Smith, 1965; Craighead et al., 1972; Iwasaki et al., 1973; Smith & deHarven 1973). Diese nicht-infektiösen Partikel werden in großen Mengen von humanen Fibroblasten freigesetzt, die mit Zellkultur-adaptierten Stämmen des HCMV infiziert sind. Sie sind den Forschern in erster Linie als Kontaminanten von Virusreinigungen aufgefallen. Inzwischen ist klar, dass im Zuge der Virusreplikation drei Arten von extrazellulären Partikeln gebildet werden: die infektiösen Virionen, die nicht-infektiösen umhüllten Partikel (NIEPs) und die DB (Irmieri & Gibson, 1983). Einen auf DB basierenden Impfstoff gegen HCMV zu entwickeln, wurde bereits kurz nach ihrer Entdeckung von mehreren Wissenschaftlern vorgeschlagen (Sarov & Abady, 1975; Stinski et al., 1979; Gibson & Irmieri, 1984). Es wurde aber bis heute in der Literatur von keiner detaillierten Analyse der immunogenen Eigenschaften von DB berichtet.

In jüngsten Studien zur immunologischen Kontrolle einer HCMV-Infektion wurde deutlich, dass nur sehr wenige der mehr als 200 Proteine des HCMV dominante Antigene für die humorale und zelluläre Immunantwort auf eine Infektion mit HCMV darstellen. Erstaunlicherweise sind fast alle dieser an der Immunkontrolle beteiligten Proteine Bestandteile von DB. Aufgrund dieser Tatsache schienen DB eine vielversprechende Grundlage für die Entwicklung eines Totimpfstoffes gegen eine Infektion mit HCMV zu sein. DB sind elektronendichte Strukturen, die von einer Lipidmembran umgeben sind. In diese Hülle sind, genau wie bei den Virionen, viruskodierte Glykoproteine, darunter gB und gH eingelagert (Fiala et al., 1976; Stinski et al., 1979; Gibson & Irmieri, 1984). Die Glykoproteine gB und gH scheinen bei der Adsorption und Penetration der viralen Partikel eine wichtige Rolle zu spielen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass diese Glykoproteine die Hauptzielstrukturen der neutralisierenden Antikörperantwort gegen HCMV darstellen (Meyer et al., 1990; Liu et al., 1991; Urban et al., 1992, 1996; Britt & Mach, 1996).

Das Vorhandensein HCMV-spezifischer Antikörper vor dem Zeitpunkt der Empfängnis schützt vor Virustransmission und dem Ausbruch schwerer HCMV-assoziiierter Krankheitsbilder (Yaeger et al., 1981; Fowler et al., 1992). Der passive Transfer dieser Antikörper konnte das Erkrankungsrisiko bei frühreifen Neugeborenen und bei Empfängern solider Organe deutlich reduzieren (Werner et al., 1993; Snyderman et al., 1995; Falagas et al., 1997). HCMV-neutralisierende Antikörper spielen bei der Bekämpfung einer HCMV-Infektion eine entscheidende Rolle. So korreliert z.B. bei einer HCMV-Infektion während der Schwangerschaft das Vorhandensein von neutralisierenden Antikörpern im Serum der Mutter mit der Protektion des Kindes (Boppana & Britt, 1995). Zudem wirken sich neutralisierende Antikörper positiv auf den Verlauf einer HCMV-Infektion nach Transplantation aus (Schoppel et al., 1998). Aufgrund dieser Befunde ist eine der Hauptbedingungen, die an eine wirksame HCMV-Vakzine gestellt werden sollte, ihre Fähigkeit zur Induktion HCMV-neutralisierender Antikörper.

Da die zelluläre Aufnahme von DB mit der von Virionen vergleichbar ist (Topilko & Michelson, 1994), ist anzunehmen, dass gB und gH in der DB-Hülle in einer ähnlichen Konformation vorliegen wie in der Virushülle. Dies erscheint für die Induktion HCMV-neutralisierender Antikörper wünschenswert, da ein Teil der wichtigen neutralisierenden Epitope auf gB und gH konformationsabhängig sind (Urban et al., 1996; Speckner et al., 1999). In Übereinstimmung mit diesen Daten konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Immunisierung von Mäusen mit DB in der Tat zur Induktion von signifikanten Spiegeln an neutralisierenden Antikörpern führte. Die Immunisierung von Mäusen mit DB, die vor ihrer Verwendung als Antigen beschallt und mehrfach in flüssigem Stickstoff eingefroren worden waren (sfDB), rief ebenfalls die Bildung neutralisierender Antikörper hervor. Dies war im Einklang mit der Beobachtung, dass die Glykoproteine der sfDB durch die Behandlung unbeeinträchtigt blieben (siehe Abb. 3.4.). Die Antikörpertiter waren jedoch deutlich erniedrigt. Die Antikörperantwort war unabhängig davon, ob die DB subkutan oder intraperitoneal verabreicht wurden. In einer von Jahn und Kollegen durchgeführten Immunisierungsstudie bei Kaninchen war bereits beobachtet worden, dass DB die Bildung von HCMV-spezifischen Antikörpern auslösten (Jahn et al., 1987). Die Neutralisationskapazität dieser Seren wurde jedoch nicht analysiert. Als Zielstrukturen der durch Immunisierung mit DB induzierten Antikörper konnten die Tegumentproteine pp65 und pp150 sowie die Glykoproteine gH und gB identifiziert werden. Obwohl die gegen die Tegumentproteine gerichteten Antikörper nicht neutralisierend wirken (Spaete et al., 1994), tragen sie zur immunologischen Überwachung einer HCMV-Infektion bei. Pp65 ist in den meisten, wenn auch nicht in allen, der untersuchten Testpersonen eine dominante Zielstruktur HCMV-spezifischer Antikörper (Plachter et al., 1990; Vornhagen et al., 1994;

Ohlin et al., 1995). Pp150-spezifische Antikörper von Isotyp IgA spielen eine Rolle bei der Etablierung mukosaler Immunität (Vornhagen et al., 1996).

Eine Besonderheit der DB ist, dass sie sehr effizient in eukaryoten Zellen aufgenommen werden. Diese zelluläre Aufnahme wird durch die Translokation ihrer Proteinbestandteile in das Zytoplasma und gegebenenfalls in den Zellkern reflektiert. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass DB ihre Antigene auch in B-Zellen, die zur Gruppe der professionell antigen-präsentierenden Zellen gehören, einbringen können. Darüber hinaus wurde die Aufnahme von DB in dendritische Zellen beobachtet (Mach, 1999). Diese Zellen präsentieren Fremdantigene im Kontext von MHC-Klasse II-Molekülen. Man kann daher die Hypothese aufstellen, dass eine verstärkte Bindung von DB an bzw. die Aufnahme von DB in derartige Zelltypen die Präsentation der viralen Antigene durch MHC Klasse II-Moleküle verstärkt und dadurch T-Helferzellen stimuliert werden, die für ein effizientes *Priming* und für die Expansion virus-spezifischer B-Zellen unbedingt erforderlich sind. Diese Hypothese würde erklären, warum DB in effizienterer Weise die Bildung neutralisierender Antikörper induziert, als sfDB, die nicht zellulär aufgenommen wurden.

Ein wichtiges Kriterium für die Wirksamkeit einer Totvakzine ist die Geschwindigkeit, mit der die Immunantwort im Zeitverlauf nachlässt. Diese Frage kann generell nicht mit ausreichender Genauigkeit von einem Tiermodell auf die Situation im Menschen übertragen werden. Jedoch erscheint es äußerst bemerkenswert, dass neutralisierende Antikörper auch nach einer Zeitspanne von einem Jahr noch im Serum der Mäuse nachweisbar waren. Die Antikörpertiter waren gegenüber den Werten, die zwölf bzw. 32 Wochen nach Applikation von DB gemessen worden waren, rückläufig (siehe Abb. 3.8.). Ein gewisser Rückgang dürfte jedoch auf das Altern der Tiere zurückzuführen sein. Ein Jahr stellt bei Mäusen, die eine Lebenserwartung von ein bis zwei Jahren haben, bereits einen beträchtlichen Lebensabschnitt dar. Ein Impfstoff, der über eine ähnliche Immunogenität wie DB verfügt, könnte daher gegenüber den bisher getesteten Spaltvakzinen einen deutlichen Vorteil mit sich bringen. Die bereits am Menschen getestete rekombinante gB-Vakzine induzierte in den Testpersonen nur transiente Antikörperspiegel (Plotkin, 1999). Ob DB im Menschen tatsächlich zu einer verbesserten, länger anhaltenden, protektiven Antikörperantwort führen als gereinigte Glykoproteine von HCMV, muß jedoch in klinischen Studien geprüft werden.

Neuere Studien lieferten zahlreiche Hinweise darauf, dass MHC Klasse I-restringierte zytotoxische T-Zellen (CTL) bei der Kontrolle der HCMV-Infektion von entscheidender Bedeutung sind. Insbesondere bei immunsupprimierten Patienten, wie AIDS-Patienten oder den Empfängern von Organtransplantaten, führt das Fehlen von virus-spezifischen CTL

häufig zum letalen Ausgang der Infektion (Li et al., 1994). Daneben konnte an Studien mit Patienten nach Knochenmarkstransplantation (KMT) gezeigt werden, dass die Rekonstitution einer MHC-Klasse I restringierten, HCMV-spezifischen, zytotoxischen T-Zell-Antwort (CTL-Antwort) invers mit der Schwere der klinischen Manifestationen korreliert (Quinnan et al., 1982; Reusser et al., 1991; Reusser et al., 1999). Desgleichen bewirkt der adoptive Transfer HCMV-spezifischer CTL in KMT-Patienten einen deutlich verbesserten Schutz vor den Risiken einer Infektion (Riddell et al., 1992; Walter et al., 1995). In der Zusammenschau implizieren diese Daten somit, dass eine zukünftige HCMV-Vakzine neben der effizienten Induktion von neutralisierenden Antikörpern auch in der Lage sein sollte, virus-spezifische CTL zu generieren.

Das HCMV-Protein, das als das immundominante Antigen für die Induktion HCMV-spezifischer CTL während der natürlichen Infektion (McLaughlin-Taylor et al., 1994; Boppana & Britt, 1996; Wills et al., 1996) sowie als stärkster Induktor einer T-Helferzell-Antwort gegen HCMV beschrieben wurde (Beninga et al., 1995), ist das Phosphoprotein pp65. Dieses Polypeptid ist der Hauptbestandteil von DB. Neben pp65 enthielten die verwendeten DB-Präparationen auch stets das große, phosphorylierte Tegumentprotein pp150. PP150 ist ebenfalls als Zielstruktur von HCMV-spezifischen CTL im Rahmen der natürlichen Infektion beschrieben worden (Li et al., 1997). Mit Hilfe einer *Western Blot*-Analyse mit dem hochspezifischen monoklonalen Antikörper XP1 konnte gezeigt werden, dass die Menge von pp150 in DB gegenüber Virionen reduziert war. Dieser Befund ist im Einklang mit früheren Berichten von Gibson und Kollegen, die nur sehr geringe Mengen an pp150 in DB nachweisen konnten (Irmieri & Gibson, 1983; Roby & Gibson, 1986). Neben pp65 und pp150 wurden auch noch weitere Tegumentproteine als Bestandteile von DB beschrieben (Baldick & Shenk, 1996; Winkler & Stamminger, 1996; Wolf et al., 1998). Ihre immunologischen Eigenschaften sind bislang jedoch nicht untersucht.

Virus-spezifische, zytotoxische T-Lymphozyten sind üblicherweise gegen Peptide gerichtet, die aus in der infizierten Zelle synthetisierten, viralen Proteinen durch das Proteasom prozessiert werden (Monaco, 1992). Für Cytomegaloviren wurde jedoch eine Alternative zu diesem klassischen Weg der Antigenprozessierung und -präsentation beschrieben, der als „exogene Beladung“ bezeichnet wird (Reddehase et al., 1984; Riddell et al., 1991). Es konnte gezeigt werden, dass neben der klassischen Antigenpräsentation von *de novo* synthetisierten Proteinen auch extrazelluläre Proteine, die während des Infektionsvorganges durch den Viruspartikel in die Zelle eingebracht werden, prozessiert und im Kontext von MHC Klasse I-Molekülen präsentiert werden können.

Aufgrund der relativen Abundanz von pp65 in DB im Vergleich zu Virionen und aufgrund der Aufnahme von DB in die Zelle, wurde die Frage gestellt, ob DB als Totantigen im Sinne eines virus-ähnlichen Partikels (VLP) in der Lage sind, auch ohne *de novo* Synthese von

Proteinen, eine HCMV-spezifische CTL-Antwort zu generieren. Die Induktion von CTL durch VLPs wurde bereits für nicht-umhüllte Viren beschrieben. So konnte z.B. in einer neueren Arbeit gezeigt werden, dass CTL durch intranasale Applikation von rekombinanten Parvovirus-ähnlichen Partikeln generiert werden konnten (Sedlik et al., 1999). Es war jedoch bislang unklar, ob der direkte Transport eines Antigens in das Zytoplasma der Zelle mittels einer umhüllten Struktur wie DB zur Induktion von CTL ausreichen würde.

Unter Zuhilfenahme der Methode der „redirigierten Lyse“ konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass zytolytische Aktivität in den drainierenden Lymphknotenzellen sowohl nach Immunisierung mit DB als auch mit sfDB generiert wurde. Da mit dieser Methode jedoch die gesamte zytolytische Aktivität einer Zellpopulation unabhängig von ihrer T-Zellrezeptor-Spezifität erfaßt wird, war nicht vollständig auszuschließen, dass die Aktivierung der T-Zellen durch unspezifische Entzündungsprozesse an der Einstichstelle hervorgerufen worden war. Einige Ergebnisse deuteten jedoch darauf hin, dass es sich nicht um unspezifische Aktivierung, sondern um eine spezifische CTL-Antwort auf das Totantigen handelte. Dazu zählten die Befunde, dass nach Applikation der PBS-Kontrolle keine zytolytische Aktivität in den Lymphknotenzellen induziert werden konnte, dass die zytolytische Aktivität der Lymphozyten mit der Menge des verabreichten Antigens korrelierte und dass unbehandelte DB bei jeder der verabreichten Konzentrationen stets eine höhere lytische Gesamtaktivität induzierten als sfDB (siehe Abb. 3.12.). Die Spezifität der CTL-Antwort konnte durch Messung der pp65-spezifischen Zytolyse bestätigt werden. Dabei galt es, zwei Probleme zu überwinden. Da die Prozessierung und Präsentation von Antigenen des HCMV in der Maus nicht untersucht ist und für die Entwicklung einer humanen HCMV-Vakzine auch wenig hilfreich wäre, stand kein bekanntes CTL-Epitop zur Verfügung, das als Reporterepitop zur Messung einer HCMV-spezifischen CTL-Antwort herangezogen werden konnte. Gleichzeitig stellte aber die Maus das einzige, handhabbare Tiermodell zur Untersuchung der Vorgänge nach Immunisierung mit DB *in vivo* dar. Diese Probleme konnten durch die Verwendung von transgenen Mäusen des Stammes C57/B6 gelöst werden. Diese Mäuse exprimieren zusätzlich zu ihren MHC Klasse I-Molekülen des Haplotyps H-2<sup>b</sup> ein humanisiertes MHC Klasse I-Molekül (Abb. 3.10.). Dieses MHC Klasse I-Molekül setzt sich aus den  $\alpha$ 1- und  $\alpha$ 2-Domänen des humanen HLA-A2-Moleküls sowie der  $\alpha$ 3-Domäne des murinen K<sup>b</sup>-Moleküls zusammen. Die peptid-bindende Rinne des Moleküls ist somit mit dem humanen HLA-A2-Molekül identisch und kann die gleichen CTL-Epitope präsentieren, die auch an das genuine HLA-A2 binden. Die murine  $\alpha$ 3-Domäne stellt den für die Aktivierung von T-Zellen unerläßlichen Kontakt zu dem murinen CD8-Molekül auf der Oberfläche von murinen T-Zellen her. Das chimäre HLA-A2.K<sup>b</sup>-Molekül stellt somit einen optimalen Hintergrund zur Untersuchung von HLA-A2-restringierten CTL-Epitopen in der Maus dar. Bei transgenen Mäusen, die das komplette HLA-A2-Molekül,

also auch die humane  $\alpha 3$ -Domäne exprimieren, ist die Interaktion mit dem murinen CD8-Molekül weniger effizient und daher das *Priming* von CTL *in vivo* deutlich schwächer. Um die verringerte Bindungsaffinität zwischen humaner  $\alpha 3$ -Domäne und murinem CD8-Molekül zu kompensieren, müssen darüber hinaus höhere Peptidkonzentrationen zur Beladung der Zielzellen verwendet werden, die sich bereits in unphysiologischen Bereichen bewegen.

Nach Immunisierung dieser HLA-A2.K<sup>b</sup>-transgenen Mäuse mit DB und sfDB konnte nun zur Analyse der HCMV-spezifischen CTL-Antwort ein aus der Literatur bekanntes HLA-A2-restringiertes CTL-Epitop als Reporterepitop verwendet werden. Dieses Peptid liegt zwischen den Aminosäurepositionen 495-503 des immundominanten Proteins pp65 (Wills et al., 1996; Diamond et al., 1997). Nahezu alle HLA-A2-positiven, HCMV-seropositiven Personen weisen sehr hohe Vorläuferfrequenzen für CTL im peripheren Blut auf, die gegen dieses Epitop gerichtet sind (Kern et al., 1999). Dieses Epitop wird daher als eines der immundominanten CTL-Epitope zur Bekämpfung einer Infektion mit HCMV angesehen. Zudem ist HLA-A2 das in der humanen Population am häufigsten vorkommende HLA-Molekül. In Deutschland beträgt die Häufigkeit 28,9%, in anderen Gebieten bis zu 50% (Imanishi et al., 1992). Daher schien ein HLA-A2-restringiertes CTL-Epitop gerade im Hinblick auf die Entwicklung einer HCMV-Vakzine zur Überprüfung der CTL-Antwort nach Immunisierung mit DB besonders geeignet zu sein. Darüber hinaus war aus Arbeiten von Diamond und Kollegen bereits bekannt, dass dieses immundominante CTL-Epitop pp65(495-503) auch in der HLA-A2.K<sup>b</sup>-transgenen Maus ausgehend von pp65 prozessiert und im Kontext des chimären MHC-Moleküls präsentiert wird (Diamond et al., 1997).

Die Analyse der pp65(495-503)-spezifischen Zytotoxizität in den drainierenden, poplitealen Lymphknotenzellen nach intraplantarer Immunisierung mit DB und sfDB ergab, dass beide Antigenpräparationen in der Lage waren, eine starke HCMV-spezifische zytolytische Aktivität zu induzieren (siehe Abb. 3.11.). Interessanterweise bestätigte sich jedoch auch in diesem experimentellen Ansatz die Beobachtung, dass unbehandelte DB eine signifikant stärkere Immunantwort auslösten als sfDB. Die Tatsache, dass durch Immunisierung mit DB eine hohe HCMV-spezifische zytolytische Aktivität induziert wurde, lässt vermuten, dass DB ein hervorragend geeignetes Vehikel zur Einbringung von pp65 in Zellen sind. Die durch DB vermittelte Aufnahme von pp65 in die Zelle stellt somit einen äußerst wirkungsvollen Mechanismus zur Induktion einer HCMV-spezifischen CTL-Antwort in der Abwesenheit von infektiösem Virus dar. Darüber hinaus zeigten diese Experimente, dass die Antigenmenge, die als Auslöser für eine bestimmte Stärke der resultierenden Immunantwort notwendig ist, reduziert werden kann, falls die Aufnahme des Antigens in die Zelle gewährleistet ist.

Für die Befunde, dass sfDB ebenfalls in der Lage waren, CTL zu induzieren, obwohl keine zelluläre Aufnahme dieser Partikel beobachtet wurde, gibt es mehrere Erklärungen. Am

augenscheinlichsten ist der Sensitivitätsunterschied zwischen der Immunfluoreszenzanalyse zur Messung der zellulären Aufnahme von pp65 und den immunologischen Methoden zur Messung der CTL-Aktivität, die auch eine *in vitro*-Stimulation der T-Lymphozyten beinhalteten. Man könnte auch argumentieren, dass pp65 nach wie vor in die Zellen aufgenommen wurde, dass dieses Protein aber aufgrund der Zerstörung anderer Strukturen in der sfDB-Präparation nicht in den Zellkern transloziert wurde. Alternative Erklärungsansätze betreffen die immunologischen Eigenschaften dieser Partikel unabhängig von der Integrität der Virushülle. Es konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass Antigenaggregate oder Antigene, die an unlösliche Trägersubstanzen gekoppelt waren, CTL induzieren konnten, während lösliche Formen dieser Antigene hierzu nicht in der Lage waren (Kovacsovics et al., 1993; Pfeifer et al., 1993; Speidel et al., 1997). Makrophagen und Dendritische Zellen können exogene Antigene auf MHC Klasse I-Molekülen präsentieren. Es wurden verschiedene Mechanismen für diesen alternativen Weg der MHC Klasse I-Beladung beschrieben. Dazu gehört der Transfer partikulärer Strukturen aus dem lysosomalen Kompartiment in das Zytoplasma der Zelle, wo sie in der Folge durch das Proteasom degradiert werden (Oh et al., 1997). Professionelle APZ, wie z.B. B-Zellen (LCL) scheinen DB jedoch deutlich effizienter aufzunehmen als sfDB. Die Fähigkeit, in die Zelle aufgenommen zu werden, korrelierte stark mit der Immunogenität der Partikel.

Unabhängig von einer Erklärung für die Restimmunogenität der sfDB-Präparation konnte eindeutig gezeigt werden, dass die physikalische Behandlung der sfDB deren Hülle in einer Weise schädigte, die nicht nur die zelluläre Aufnahme der Partikel, gemessen anhand der nukleären Translokation von pp65, unterband, sondern auch ihre Immunogenität drastisch erniedrigte. Diese Beobachtung traf in gleicher Weise auf die Produktion HCMV-neutralisierender Antikörper wie auf die Induktion virus-spezifischer zytotoxischer T-Zellen und die Stärke der Zytokinfreisetzung zu.

Da HCMV in Mäusen nicht repliziert, konnte die Intensität der CTL-Antwort nach Immunisierung mit DB nicht direkt mit der Intensität der CTL-Antwort, wie sie durch eine natürliche HCMV-Infektion ausgelöst wird, verglichen werden. Die Infektion mit mCMV, dem murinen Analogon zu HCMV, diente jedoch zur Untersuchung verschiedener Aspekte der Cytomegalovirus-Immunologie in der Balb/c-Maus (Reddehase et al., 1984; Reddehase & Koszinowski, 1984, Koszinowski et al., 1992). Daher wurde die CTL-Antwort nach einer Infektion mit einer in den genannten Arbeiten optimierten Dosis an mCMV mit der Immunisierung mit 20 µg DB verglichen. Beiden Tiergruppen wurde das Antigen jeweils subkutan in die linke Hinterpfote appliziert und die CD3ε-vermittelte Zytotoxizität in den Lymphozyten der drainierenden, poplitealen Lymphknoten gemessen. Obwohl mCMV am Injektionsort replizierte und daher eine deutlich stärkere Stimulation der Immunantwort



erwartet wurde, war die zytotoxische Aktivität nach Immunisierung mit DB überraschenderweise beinahe genauso hoch, wie nach Infektion mit mCMV. Um die gleiche Zielzellyse zu bewirken, mußten etwa doppelt so viele Effektorzellen aus Tieren, die mit DB immunisiert worden waren, eingesetzt werden wie aus Tieren, die mit mCMV infiziert worden waren. Der Vergleich der durch DB induzierten Zytotoxizität mit dem etablierten Standard der mCMV-Infektion erlaubte eine Einschätzung der Immunogenität des DB-Totantigens. Erstaunlicherweise waren DB als Totantigen für die Induktion von Zytotoxizität in der Maus beinahe genauso effizient, wie ein replikationskompetentes Cytomegalovirus. Dennoch kann das Mausmodell nur beschränkte Aussagen über das immunogene Potential dieser Partikel zur Induktion HCMV-spezifischer CTL im Menschen treffen. Es gibt bislang keine Hinweise darauf, ob die Prozessierung und Präsentation von Antigenen des HCMV in Mensch und Maus vergleichbar sind. Die Tatsache, daß in beiden Spezies ausgehend von pp65 das gleiche Nonamer pp65(495-503) prozessiert und präsentiert wurde, läßt hoffen, daß diese Prozesse konserviert sind. Detailliertere Analysen dieser Fragestellung müssen jedoch in klinischen Studien beantwortet werden.

Viren und andere intrazelluläre Mikroorganismen führen häufig zur Ausbildung einer Th1-artigen T-Helferzell-Antwort als Reaktion auf die Infektion. Die Präsenz von T-Helfer-Lymphozyten vom Typ Th1 ist ein entscheidender Faktor bei der Entwicklung von zellulärer Immunität. Da die zellgebundene Zytotoxizität, die in erster Linie durch CD8-positive CTL vermittelt wird, offensichtlich ein entscheidendes Kriterium für den Ausgang einer CMV-Infektion darstellt (Reddehase et al., 1987; Reusser et al., 1991; Reusser et al., 1999), und HCMV-spezifische CTL nur in Gegenwart ausreichender T-Zell-Hilfe erhalten bleiben (Walter et al., 1995), ist die Induktion einer Th1-artigen Immunantwort eine weitere Bedingung, die an einen wirksamen Impfstoff gegen HCMV gestellt werden muß.

Bisherige Untersuchungen haben gezeigt, dass die Differenzierung von naiven T-Helferzellen in Th1- oder Th2-Zellen durch viele verschiedene Faktoren beeinflusst wird. Die wichtigsten sind Zytokine (O'Garra & Murphy, 1994; Seder & Paul, 1994). Interleukin-12 (IL-12), sowie Zytokine, die die Wirksamkeit von IL-12 modulieren, wie z.B. IFN- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  sind Hauptregulatoren der Th1-Differenzierung (Bradley et al., 1995; Reiner & Seder, 1995), während IL-4 und IL-5 die Schlüsselzytokine zur Differenzierung in Th2-Zellen darstellen (Seder & Paul, 1994). Die Art der antigenpräsentierenden Zelle (APZ) sowie die Dosis eines verabreichten Antigens sind weitere Faktoren, die die T-Helferzell-Differenzierung beeinflussen (siehe auch Abb. 3.13.). So führte die Zugabe von Immunstimulantien wie Aluminiumhydroxid zu Vakzineformulierungen sowie die Applikation mittels *Gene Gun* häufig zu Th2-artigen Immunantworten (Feltquate et al., 1997), die für die Kontrolle einer HCMV-Infektion nicht wünschenswert wären. Andererseits gibt es auch Berichte, die zeigen, dass aus Bakterien gewonnene DNA-Vakzinen sowohl *in vivo* als auch

*in vitro* Lymphozyten, sowie isolierte B-Zellen, T-Zellen und NK-Zellen zur Produktion von Zytokinen anregen können, die eine Th1-Differenzierung zur Folge haben (Krieg et al., 1995; Klinman et al., 1996). Momentan werden eine Reihe von Studien durchgeführt, um Wege zur Modulation der T-Helferzell-Antwort zu finden, die zur Entwicklung von wirkungsvolleren Vakzinen genutzt werden können. Für die Entwicklung eines Impfstoffes gegen HCMV scheinen DB eine geeignete Form der Antigenapplikation darzustellen, weil sie bereits *per se* eine Th1-artige Immunantwort auslösten. Sie scheinen anderen Totantigenen überlegen zu sein, da sie ohne weitere Zugabe von Immunstimulantien verabreicht werden konnten und somit die Modulation der resultierenden T-Helferzell-Antwort überflüssig war. Nach intraplantarer Immunisierung mit DB sezernierten die Zellen der drainierenden Lymphknoten auf den Stimulus der Restimulation mit DB hin hohe Mengen an IFN- $\gamma$ , jedoch keine meßbaren Spiegel an IL-5. Die Immunisierung mit sfDB führte ebenfalls zur Anregung der IFN- $\gamma$  Synthese. Die Zytokinspiegel waren jedoch stark reduziert und traten zeitlich verzögert auf (siehe Abb. 3.14.). Dies war insbesondere dann der Fall, wenn sfDB sowohl für die Immunisierung als auch für die Restimulation verwendet wurden. Die Fähigkeit der DB, in Zellen einzudringen, scheint also auch im Sinne der T-Helferzell-Antwort die Ausprägung der Immunantwort zu verstärken. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass DB in professionell antigenpräsentierende Zellen (APZ) wie B-Zellen und Dendritische Zellen eindringen können (siehe Abb. 3.2.) und dadurch auf effiziente Weise in den MHC Klasse II-Präsentationsweg eingeschleust werden. Es ist jedoch bislang nur sehr wenig über die Antigenprozessierung und -präsentation in diesen Zellen bekannt, so dass dieser Befund bisher nicht weitergehend untersucht werden konnte.

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Entwicklung einer Th1- oder Th2-artigen Immunantwort in Abhängigkeit von der Applikationsform eines gegebenen Antigens variiert. Im Allgemeinen unterstützen Th1-artige Immunantworten die Produktion von Antikörpern des Isotyps IgG2a, während Th2-artige Immunantworten die Synthese von Antikörpern des Isotyps IgG1 favorisieren. Im Falle von DB schien die Art der Applikation keinen Einfluß auf die Induktion einer Th1-artigen Immunantwort auszuüben. Sowohl die intraplantare als auch die intraperitoneale Applikation von DB führte zu einem Verhältnis von IgG1/IgG2a-Isotypen von kleiner eins. Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass die Induktion einer Th1-artigen Immunantwort durch DB-Applikation in erster Linie eine Eigenschaft des Antigens selbst war, und nicht von den jeweiligen experimentellen Bedingungen abhing.

In der Vergangenheit gab es bereits verschiedenste Ansätze zur Entwicklung eines Impfstoffes gegen eine Infektion mit HCMV (zusammengefaßt in Britt, 1996, und Plotkin, 1999). Das Hauptziel dieser Bestrebungen war die Induktion von protektiver humoraler

Immunität bei Frauen im gebärfähigen Alter, um das Risiko kongenitaler HCMV-Infektionen zu verringern. Mit dem Ausbruch der AIDS-Epidemie und der zunehmenden Häufigkeit iatrogenen Immunsuppressionen, z.B. im Zuge einer Transplantation, wurde klar, dass zusätzlich zur Synthese von neutralisierenden Antikörpern auch das zelluläre Immunsystem in hinreichendem Maße stimuliert werden muß, um eine erfolgreiche prophylaktische oder therapeutische HCMV-Vakzine zur Anwendung in diesen Patientenkollektiven zu entwickeln. Erste Versuche, diesen Anforderungen zu genügen, basierten auf der Verwendung von lebend-attenuierten Stämmen des HCMV, wie Ad169 und *Towne*. In klinischen Studien konnten ermutigende Ergebnisse mit diesen Impfstämmen erzielt werden, die demonstrierten, dass es generell möglich ist, mit einer Vakzine protektive Immunität gegen eine Infektion mit HCMV zu vermitteln (Starr et al., 1981; Plotkin et al., 1989; zusammengefaßt in Plotkin, 1999). Der *Towne*-Impfstoff war gut verträglich und war in einer Studie an Nierentransplantatempfängern in der Lage, den Ausgang einer HCMV-Infektion abzumildern. Die Infektion selbst konnte jedoch nicht verhindert werden (Plotkin et al., 1991). In einer Belastungsstudie, die aufgrund der Ermangelung eines Tiermodells für HCMV nur in klinischen Studien am Menschen durchgeführt werden konnte, wurden Freiwillige mit der attenuierten *Towne*-Vakzine geimpft. Die Impfung schützte vor der Belastung mit kleineren Dosen, jedoch nicht mit höheren Dosen eines Wildisolates (Plotkin et al., 1989). Nach der Impfung junger Frauen mit dem *Towne*-Impfstoff unterschieden sich die nachfolgend festgestellten Infektionsraten mit HCMV nicht von denen der nicht-immunisierten Kontrollgruppe (Adler et al., 1995). Besonders die CTL-Antwort schien sehr schnell nachzulassen (Adler et al., 1998). Einige Experten haben daher die Notwendigkeit betont, die gegenwärtig verfolgten Vakzinierungsstrategien zu überdenken. Insbesondere sollte versucht werden, gB als immundominantes B-Zell-Antigen mit pp65 als stärkstem Induktor der zellulären Immunantwort gegen HCMV zu kombinieren (Edresz et al., 1999).

Die natürlicherweise gebildeten DB scheinen bereits eine ideale Quelle eines derartigen Immunogens darzustellen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass eine Immunisierung mit DB hohe Spiegel an neutralisierenden Antikörpern, vergleichbar mit Titern nach durchlaufener natürlicher Infektion, induzierte. Diese Antikörper waren auch ein Jahr nach Immunisierung noch nachweisbar, wenn auch die Spiegel zurückgingen. Darüber hinaus konnten in Mäusen CTL etabliert werden, die Zielzellen, die mit dem Reporterepitop pp65(495-503) beladen worden waren, in effizienter Weise erkannten. Die Aktivität der induzierten Zytotoxizität war beinahe genauso hoch wie nach einer mCMV-Infektion. Zudem wurde durch Immunisierung mit DB eine Th1-artige Immunantwort erzeugt, die für die Erhaltung der CTL-Antwort von entscheidender Bedeutung ist und die Kontrolle viraler Infektionen erleichtert (Walter et al., 1995). DB

waren also in der Lage, ähnliche Immunantworten gegen HCMV zu generieren, wie dies mit dem *Towne*-Lebendimpfstoff gelungen war (Plotkin, 1999). Der Vorteil von DB liegt jedoch darin, dass es sich um nicht-infektiöse Partikel handelt, die im Wesentlichen aus Protein bestehen, jedoch keine DNA enthalten. Sie sind daher nicht mit den Risiken behaftet, die ein Lebendimpfstoff gegen Herpesviren zwangsläufig mit sich bringt. Dazu gehören die Fähigkeit zur lebenslangen Persistenz im betroffenen Organismus in einem Stadium der Latenz und die wiederholte Reaktivierung aus diesem Stadium, z.B. durch Einwirkung von physiologischem Stress, und damit die Ausbildung von Rezidiven. Darüber hinaus sind einige Vertreter der Familie der Herpesviren mit der Ausbildung von Tumoren assoziiert, so z.B. das Epstein-Barr-Virus mit dem Burkitt-Lymphom und dem Nasopharynxkarzinom oder das Humane Herpesvirus 8 mit dem Kaposi-Sarkom. Auch in Bezug auf das Humane Cytomegalovirus gab es Berichte über eine Beteiligung an der Entstehung von Tumoren (Cinatl et al., 1996; Shen et al., 1997). Ein direkter Einfluß einer HCMV-Infektion auf die Tumorgenese konnte bislang nicht schlüssig nachgewiesen werden. Jedoch sollte dieses Risiko nicht gänzlich außer Acht gelassen werden. Ähnliches gilt für die Verwendung von DNA-Vakzinen. Die als Vektoren verwendeten Plasmide stellen Vehikel für eine länger anhaltende Expression der immunogenen Proteine eines Erregers in Körperzellen dar und waren im Tiermodell erfolgreich. Es gibt jedoch bislang keine Langzeitstudien, die Risiken wie Insertionsmutagenesen oder die Freisetzung von endogenen Retroviren abschließend beurteilen könnten. Da DB ein Totantigen darstellen, können durch ihre Verwendung als Antigenquelle alle genannten Risiken umgangen werden. Zudem kann auf eine jahrzehntelange Erfahrung in der Immunisierung mit Totimpfstoffen zurückgegriffen werden. Selbstverständlich müssen aber die vielversprechenden Ergebnisse, die mit der Immunisierung von Mäusen mit DB erzielt werden konnten, auf ihre Relevanz beim Menschen hin überprüft werden. Zurückhaltung ist angebracht, da bereits andere Antigene, die im Versuchstier Protektion vermitteln konnten, beim Menschen weniger erfolgreich waren.

Zusammengefaßt konnten die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente zeigen, dass *Dense Bodies* des HCMV ein hohes immunogenes Potential besitzen und in der Lage sind, humorale und zelluläre Immuneffektormechanismen gleichermaßen zu induzieren.

#### 4.2. HCMV-Deletionsmutanten als Grundlage für die Generierung rekombinanter *Dense Bodies*

Die Immunisierung mit DB führte zu einer effizienten Induktion humoraler und zellulärer Immunantworten. Darüber hinaus erwiesen sich DB als wirksames Antigen-transportsystem, das die in dem Partikel enthaltenen Antigene in eine Vielzahl von Zelltypen einschleusen konnte. Die zelluläre Aufnahme verstärkte die Immunogenität der Partikel signifikant. DB stellen somit eine geeignete Grundlage zur Entwicklung einer neuartigen HCMV-Vakzine dar. Um einen auf DB basierenden Impfstoff für die Anwendung am Menschen herzustellen, wird es jedoch nötig sein, zusätzliche antigene Determinanten in das Immunogen einzubauen.

In dem immundominanten Tegumentprotein pp65 sind CTL-Epitope enthalten, die durch die HLA-Allele HLA-A2, -B7, -B8, -B12 und -B35 restringiert sind (Gavin et al., 1993; Wills et al., 1996; Kern et al., 1998; Weekes et al., 1999). Da diese HLA-Allele in der europäischen Bevölkerung weit verbreitet sind (Imanishi et al., 1990), sollte die Mehrheit der Impflinge in der Lage sein, eine zelluläre Immunantwort gegen pp65 auszubilden. Es gibt jedoch auch eine Reihe von Personen, die eine HCMV-Infektion in erster Linie durch CTL, die gegen das Nicht-Strukturprotein IE1 gerichtet sind, kontrollieren (Kern et al., 1999). IE1 ist im *Dense-Body*-Partikel nicht enthalten. Daher könnte die Verpackung von CTL-Epitopen des IE1 in einen rekombinanten *Dense-Body*-Partikel, z.B. durch Fusion an pp65, dessen Immunogenität verstärken. Zudem sollte durch Insertion zusätzlicher CTL-Epitope, die von verschiedenen HLA-Allelen präsentiert werden, dem HLA-Polymorphismus der menschlichen Bevölkerung Rechnung getragen werden, um so einen möglichst hohen Prozentsatz der vorkommenden HLA-Allele zu erfassen. Der Einbau von zusätzlichen T-Helfer-Zell-Epitopen und Domänen zur Induktion neutralisierender Antikörper in rekombinante DB dürfte ebenfalls dazu beitragen, das immunogene Potential zu erhöhen. Durch die Inkorporation von antigenen Determinanten aus verschiedenen HCMV-Isolaten in einen rekombinanten DB-Partikel, könnte zudem eine Stammspezifität der resultierenden Immunantwort verhindert werden. Es lassen sich noch viele Beispiele anführen, wie die Immunogenität von DB optimiert werden kann, um der Diversität der menschlichen Immunantwort einerseits und der Variabilität der verschiedenen HCMV-Stämme andererseits gerecht zu werden, und somit eine breit wirksame Vakzine gegen HCMV zu entwickeln. Derartige rekombinant veränderte DB lassen sich jedoch nur durch die Konstruktion rekombinanter Cytomegaloviren generieren. Die Herstellung mutanter HCMV-Genome ist aufgrund der Größenlimitation des HCMV-Genoms jedoch schwierig (Grzimek, 1999). Selbst geringe Abweichungen von der Genomlänge von ca. 3-4 kB führen dazu, dass keine infektiösen Nachkommenviren mehr gebildet und somit auch keine

rekombinanten DB produziert werden können. Daher wurden zwei Genombereiche, der Leserahmen UL32, der für das pp150-Protein kodiert, und die 5 kB-Region, die für das IE4-Transkript kodiert, dahingehend untersucht, ob sie für die Virusreplikation und die Ausbildung und Freisetzung von DB entbehrlich sind. Im positiven Fall können diese Bereiche aus dem HCMV-Genom deletiert werden, um Spielraum für genetische Manipulationen zu schaffen, die zur Konstruktion stärker immunogener, rekombinanter DB benötigt werden.

#### **4.2.1. Essentielle Funktion des pp150-Proteins (pUL32) im Rahmen der Virusreplikation**

Das Phosphoprotein pp150 von HCMV, das auch als pUL32 oder BPP (*basic phosphoprotein*) bezeichnet wird, ist ein basisches Phosphoprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 140 kD (Pande et al., 1989). Es ist im Tegument von Virionen lokalisiert und macht ca. 15-20% der Gesamtproteinmasse von Virionen aus (Greis et al., 1994; Mocarski, 1996). In *Dense Bodies* ist pp150 ebenfalls vorhanden, liegt aber weniger abundant vor als in Virionen (siehe 3.1.6.). PP150 stellt einen der viralen Hauptphosphataktzeptoren in infizierten Zellen und somit eine Zielstruktur für Virus-assoziierte Kinasen dar (Roby & Gibson, 1986). Das Protein wird zusätzlich durch zwei N-Acetylglucosamin-Reste modifiziert, die O-glykosidisch verknüpft sind (Greis et al., 1994). Diese Modifikation spielt offenbar generell bei der Protein-Protein-Wechselwirkung eine Rolle; ihr Einfluß auf die biologische Funktion des pp150-Proteins wurde jedoch noch nicht untersucht. Seit längerem gibt es Hinweise darauf, dass pp150 eine wesentliche Rolle beim *assembly* der Virionen spielt (Hensel et al., 1995; Meyer et al., 1997; Greis et al., 1994). Diese Vermutung konnte in einer jüngsten Untersuchung der Arbeitsgruppe von William Britt bestätigt werden (Sanchez et al., 2000). Diese Gruppe konnte zeigen, dass pp150 ab dem dritten Tag nach Infektion in Ad169-infizierten Fibroblasten exprimiert wird und während des gesamten Replikationszyklusses ausschließlich im Zytoplasma verbleibt. Dort akkumuliert es in stabilen, kernnahen Strukturen, die teilweise mit dem trans-Golgi-Netzwerk kolokalisieren und in direkter Nähe zu den Organisationszentren der Mikrotubuli liegen. Zu späten Infektionszeitpunkten kolokalisieren zwei weitere Tegumentproteine, das pp28 und das pp65, sowie drei Glykoproteine, das gB, das gH und das gp65, mit pp150. Die Autoren ziehen daraus den Schluß, dass pp150 eine virus-induzierte, zytoplasmatische Struktur initialisiert, die als Ort der Virionmorphogenese fungiert (Sanchez et al., 2000). Das in die Virionpartikel verpackte pp150 scheint eine wichtige Rolle bei der Infektion von Wirtszellen zu spielen, wo es möglicherweise am Transport der Kapside zum Zellkern beteiligt ist. Diese Vermutung konnte jedoch noch nicht abschließend bestätigt werden.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, ein rekombinantes HCMV zu generieren, dem der Leserahmen UL32, der für pp150 kodiert, fehlt (RVAd150). Mit Hilfe einer derartigen pp150-Deletionsmutante sollte die Frage beantwortet werden, ob das Phosphoprotein pp150 für die Virusreplikation und die Bildung von DB verzichtbar ist.

Die Deletion von Tegumentproteinen des HCMV ist grundsätzlich möglich. So ist es gelungen, ein rekombinantes HCMV zu generieren, dem der Leserahmen für das Tegumentprotein pp65 fehlt (RVAd65; Schmolke et al., 1995 b). Obwohl pp65 zu den am abundantesten synthetisierten HCMV-Proteinen gehört (Rüger et al., 1987) und struktureller Bestandteil aller drei Formen von extrazellulären Partikeln ist (Irmieri & Gibson, 1983), ist dieses Protein für die Virusreplikation nicht essentiell. Die pp65-Deletionsmutante RVAd65 zeigte *in vitro* eine ähnliche Replikationskinetik wie das Wildtyp-Virus Ad169. Es konnten keine signifikanten Unterschiede bei der Virionmorphogenese beider Viren beobachtet werden (Schmolke et al., 1995 b). RVAd65 war jedoch nicht mehr in der Lage, DB auszubilden.

Zur Konstruktion der pp150-Deletionsmutante RVAd150 wurde die gleiche Strategie der homologen Rekombination verfolgt, wie sie zur Herstellung von RVAd65 verwendet wurde. Die Generierung und nachfolgende Selektion rekombinanter Viren mittels homologer Rekombination wird durch das simultane Einbringen von Selektionsmarkern, welche einen Wachstumsvorteil für die Rekombinante mit sich bringen, deutlich erleichtert. Verschiedene Markergene haben sich bereits für die Herstellung rekombinanter Herpesviren bewährt, darunter das Thymidinkinase-Gen (Post & Roizman, 1981; Roizman & Sears, 1993), das  $\beta$ -Glukuronidase-Gen (Jones et al., 1991), das  $\beta$ -Galactosidase-Gen (Spaete & Mocarski, 1996), das Guanin-Phosphoribosyl-Transferase-Gen aus *E. coli* (Viera et al., 1994; Greaves et al., 1995) sowie das bakterielle Neomycin-Phosphotransferase-Gen (Neo) (Wolff et al., 1993).

In der vorliegenden Arbeit wurde einerseits das Neo-Gen alleine, andererseits eine neuartige duale Markergenkassette verwendet, die sich aus dem Neo-Gen und der chromophoren Gruppe des *green fluorescent protein* (GFP) aus der lumineszierenden Qualle *Aequorea victoria* (Shimomura et al., 1962) zusammensetzte (Gfp-neo). Diese duale Markergenkassette hat den Vorteil, dass sowohl positiv als auch negativ auf entstandene rekombinante Viren selektiert werden kann. Durch Zugabe des Antibiotikums G418 zum Kulturmedium wird ein starker Selektionsdruck auf Wildtyp-Viren ausgeübt. Dadurch können rekombinante Viren innerhalb weniger Passagen effizient angereichert und dadurch in der Regel durch nur eine Plaquereinigung von Wildtyp-Viren abgetrennt werden (Wolff et al., 1993). Darüber hinaus stellt die Phosphorylierung von Kanamycin (Neo-Test) einen guten Indikator zur Identifizierung Neo-exprimierender Viren dar. Der GFP-Anteil des dualen Markergens ermöglicht zudem die einfache und schnelle Positivselektion

entstandener rekombinanter Viren anhand ihres grün-fluoreszierenden Phänotyps im Fluoreszenzmikroskop oder im FACS.

Es gelang jedoch weder durch Selektion mit Neo noch durch Selektion mit Gfp-neo, wildtyp-freie Isolate einer pp150-Deletionsmutante zu gewinnen. Es konnte zwar durch verschiedene Methoden (Neo-Test, GFP-Fluoreszenz, *Southern Blot*) bestätigt werden, dass die gewünschte, homologe Rekombination zwischen dem Rekombinationsplasmid und dem Ad169-Genom korrekt stattgefunden hatte und eine pp150-Deletionsmutante existierte; es gelang aber trotz intensiver Plaquereinigungen nicht, ein wildtyp-freies, pp150-negatives Virus zu isolieren. Eine mögliche Erklärung dieser Befunde ist, dass in den infizierten Zellkulturen ein Selektionsdruck auf eine Koinfektion mit beiden Viren herrschte. Offenbar fand zwischen RAd150 und dem Wildtyp-Virus Ad169 eine Komplementation *in trans* statt, so dass nur eine Koinfektion mit beiden Viren zur Synthese von propagierbaren Nachkommenviren führte. Derartige Phänomene werden als Helfervirus-abhängige Replikation bezeichnet. Sie wurden in Fällen beobachtet, in denen ein durch eine Mutation zerstörtes Gen oder Regulationselement für die Vermehrung essentiell war oder in denen eine Mutation zu einer starken Attenuierung der Virusreplikation geführt hatte (Morsy & Caskey, 1999; Barrett et al., 1973). Die gezeigten Experimente wiesen somit erstmals darauf hin, dass das pp150-Protein für die Replikation von HCMV essentiell ist. Eine pp150-Deletionsmutante ist daher ohne ein komplementierendes Helfervirus nicht replikationskompetent.

Eine Möglichkeit, die Abhängigkeit von einem Helfervirus zu überwinden, ist die Supplementierung des deletierten Genproduktes *in trans*. Dieses Ziel wurde in der vorliegenden Arbeit durch die Herstellung einer pp150-exprimierenden Zelllinie verfolgt. Eine Komplementation von essentiellen herpesviralen Genen durch eine supplementierende Helferzelllinie ist grundsätzlich möglich (Gao et al., 1994; Desai et al., 1993). Im Falle von HCMV ist die Herstellung einer komplementierenden Helferzelllinie jedoch schwierig, da bislang keine permissive Zelllinie zur Verfügung steht. Der Gruppe von Greaves gelang die Komplementation einer IE1-Deletionsmutante durch retroviralen Gentransfer in primäre Fibroblasten (HFF) (Mocarski et al., 1996). In der vorliegenden Arbeit wurde ein Transfektionsansatz verfolgt. Es gelang, pp150-exprimierende HFF herzustellen und zu klonieren. Bei den Klonen, bei denen pp150 unter der Kontrolle des CMV-Promotors exprimiert wurde (pcDNA6-pp150), ging die Expressionsstärke jedoch bereits nach wenigen Passagen stark zurück. Derartige *silencing*-Effekte des CMV-Promotors sind in der Literatur bekannt (Doerfler et al., 1989; Komura et al., 1995; Prosch et al., 1996). Verschiedene Methoden zur Aufhebung der Promotorinhibition (Geelen et al., 1987) blieben erfolglos. HFF-pp150, bei denen das pp150-Gen durch den RSV-Promotor getrieben wurde, exprimierten das pp150-Protein kontinuierlich. Jedoch war sowohl die



intrazelluläre Lokalisation als auch die Proteingröße im Vergleich mit dem von Ad169 exprimierten pp150 verändert. Zahlreiche Versuche zur Isolierung eines wildtyp-freien Plaques von RVAd150 auf den generierten Zelllinien blieben erfolglos.

Eine Erklärung dafür wäre, daß eine pp150 exprimierende Zelllinie grundsätzlich nicht zu einer Komplementation der Funktion von pp150 *in trans* geeignet ist, weil beispielsweise das zellulär exprimierte Protein in anderen subzellulären Kompartimenten lokalisiert ist, als das viral exprimierte. Alternativ könnten die genannten Eigenschaften der HFF-pp150 oder eine zu geringe Expressionsstärke für das Scheitern einer Supplementation verantwortlich sein. Welche der beiden Möglichkeiten zutrifft, konnte anhand der erhobenen Daten nicht beurteilt werden. Zusammenfassend zeigten die durchgeführten Experimente, daß der Leserahmen UL32 eine essentielle Funktion im Rahmen der Virusvermehrung ausübt und nicht aus dem HCMV-Genom deletiert werden kann. Diese Region ist somit nicht zur Insertion von Fremdsequenzen zur Konstruktion rekombinanter DB geeignet.

#### **4.2.2. Verzichtbarkeit des IE4-Transkriptes für die Virusvermehrung**

Das IE4-Gen von HCMV kodiert für ein Transkript von ca. 5 kB Länge, das in allen drei Infektionsphasen nachweisbar ist (DeMarchi, 1983; Jahn et al., 1984 a, b; Wathen & Stinski, 1982). Die größten Mengen des Transkriptes liegen in der L-Phase des Replikationszyklusses vor. Die IE4-Region weist einen für HCMV ungewöhnlich hohen AT-Gehalt auf. Das 5kB-Transkript enthält ein polyA-Signal und zwei potentielle Adenylierungsstellen (Plachter et al., 1988). Die RNA wird nicht gespleißt. Ebenso wenig befinden sich am 5'Ende bekannte Regulationssequenzen für die Transkriptions-Initiation durch Polymerase II, wie TATA- oder CCAAT-Boxen. Obwohl die meisten eukaryonten RNA-Polymerase II-Promotoren diese Elemente enthalten, gibt es Beispiele von funktionellen Promotoren, denen TATA- und CCAAT-Boxen fehlen (Hall & Brown, 1985; Melton et al., 1984). Bei der Analyse der DNA-Sequenz wurden multiple Stop-Codons in der kodierenden Region der 5kB-RNA gefunden. Der längste potentielle offene Leserahmen (ORF) beträgt lediglich 99 AS und beginnt erst nach dem achtzehnten ATG-Startcodon (Plachter et al., 1988). Nach dem bisherigen Kenntnisstand über Transkription und Translation scheint dieses Gen nicht für ein virales Protein zu kodieren. Es handelt sich also offensichtlich um ein großes, nicht-kodierendes Transkript, das in großen Mengen während des gesamten Replikationszyklusses in lytisch infizierten Zellen vorliegt. Der einzige Hinweis auf eine mögliche Funktion dieser Region besteht bisher darin, daß das IE4-Gen auf einem DNA-Fragment liegt, für das *in vitro* eine transformierende Aktivität beschrieben wurde (Nelson et al., 1984). Die Tatsache, daß diesem Transkript bis dato keine wichtige Funktion im Rahmen der Replikation zugeordnet werden konnte, veranlaßte

uns zu überprüfen, ob die IE4-Region aus dem HCMV-Genom deletiert werden kann. Im positiven Fall stünden 5kB Spielraum für die Klonierungsarbeiten zur Herstellung rekombinanter *Dense Bodies* zur Verfügung.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, eine IE4-Deletionsmutante des HCMV-Laborstammes Ad169, RVAdIE4, zu generieren. Zur Konstruktion von RVAdIE4 wurde die gleiche Strategie der homologen Rekombination verfolgt wie zur Herstellung von RVAd150. In dem verwendeten Rekombinationsplasmid wurde der Großteil der IE4-Region durch das Gen für die bakterielle Neomycin-Phosphotransferase (Neo) ersetzt (siehe 3.2.2.). Die Zugabe des Antibiotikums G418 zum Wachstumsmedium übte einen sehr starken Selektionsdruck auf Wildtyp-Viren aus, so dass bereits nach 15 Passagen des infektiösen Überstandes wildtyp-freie Plaques von RVAdIE4 isoliert werden konnten. Molekularbiologische Untersuchungen der IE4-Deletionsmutante auf DNA-Ebene bestätigten die korrekte homologe Insertion des Markergens in den IE4-Locus. Die Deletion von IE4 hatte keinen signifikanten Einfluß auf das Replikationsverhalten der Mutante im Vergleich zum Wildtyp.

Diese Experimente wiesen erstmals darauf hin, dass das 5kB-Transkript keine essentielle Funktion im Rahmen der Virusvermehrung ausübt. Es sollte aber erwähnt werden, dass sich die Mutante vom Wildtyp durch das zusätzlich inserierte Neo-Gen unterschied. Es kann formal nicht ausgeschlossen werden, dass die Neo-Aktivität einen Einfluß auf das Wachstumsverhalten der IE4-Deletionsmutante hatte. Dies ist aber unwahrscheinlich, da das Neo-Genprodukt als inert gilt (Günzburg & Salmons, 1997). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Produktion und Freisetzung aller drei Formen von extrazellulären Partikeln, der Virionen, der NIEPS und der *Dense Bodies* bei RVAdIE4 im Vergleich zum Wildtyp unverändert waren. Auch die relativen Verhältnisse der drei Partikelformen zueinander unterschieden sich nicht.

Die Tatsache, dass mit der IE4-Region ein relativ großer Bereich von 5kB Länge auf dem HCMV-Genom identifiziert werden konnte, der für die Virusreplikation und DB-Formation entbehrlich ist, ist von großem Vorteil. Dieser Genomabschnitt kann in zukünftigen Experimenten zur Konstruktion rekombinanter DB deletiert werden, um in der Folge Fremdsequenzen von mindestent 5 kB in das HCMV-Genom einzubringen, ohne dass die genannten Probleme der Größenlimitation des Genoms (siehe 3.2.) auftreten sollten.

Obwohl sich das Replikationsverhalten von RVAdIE4 von dem von Ad169 nicht signifikant unterschied und gleiche Mengen der extrazellulären Partikel produziert wurden, konnten in detaillierteren Untersuchungen Unterschiede zwischen beiden Viren gefunden werden. So zeigte sich eine unterschiedliche Aktivierbarkeit früher viraler Promotoren durch beide Viren. Der dramatischste Effekt war bei der Analyse des UL112/113-Promotors zu erkennen. Dieser wurden zehn Stunden nach Infektion von RVAdIE4 30 mal schwächer

aktiviert als von Wildtyp-HCMV. Zu späteren Infektionszeitpunkten wurde die Differenz zwischen beiden Viren kleiner.

Der UL112/113-Promotor treibt die Transkription des UL112/113-Gens. Von diesem Gen werden mehrere Phosphoproteine abgeschrieben, die für eine effiziente Replikation der viralen DNA benötigt werden (pp84, pp50, pp43 und pp34; Yamamoto et al., 1998). Das Hauptprodukt pp43 fungiert zudem als Koaktivator der IE2-abhängigen Aktivierung der Transkription und weist selbst IE2-Bindestellen in seinem Promotor auf (Li et al., 1999; Rodems et al., 1998). Die IE2- und UL112/113-Genprodukte kolokalisieren in infizierten Zellen in Kernkörperchen, sog. ND10 Domänen. ND10-Domänen stellen den Ort dar, an den die durch Infektion eingebrachten Virusgenome transportiert werden. Zudem findet in ihnen die *immediate-early*-Genexpression statt. Die UL112/113-Proteine scheinen für die effiziente virale Genexpression sowie die DNA-Replikation notwendig zu sein, indem sie in der initialen Phase nach Infektion Bestandteile der Replikationsmaschinerie zu den ND10-Domänen rekrutieren (Ahns et al., 1999). In welcher Form (direkt, indirekt) das IE4-Transkript mit dem UL112/113-Promotor interagiert, um die gezeigte Aktivitätssteigerung zu bewirken, ist noch unklar.

Trotz der deutlichen Unterschiede in der Aktivierung des UL112/113-Promotors zu frühen Infektionszeitpunkten durch beide Viren, unterschied sich die Expression der UL112/113-Genprodukte in infizierten Zellen nicht signifikant. Diese Diskrepanz läßt sich möglicherweise dadurch erklären, dass die angewandte Immunfluoreszenzmethode zu insensitiv war, um die Unterschiede aufzudecken. Es wäre daher sicherlich sinnvoll, die Menge der gebildeten UL112/113-Transkripte auf RNA-Ebene zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion zu vergleichen, um den Effekt zu verifizieren. Durch Infektion der Zellen mit geringerer m.o.i. ließen sich die Effekte möglicherweise zusätzlich verstärken. Der Vergleich der Expressionskinetik bestimmter Schlüsselproteine der viralen Replikation ergab ebenfalls Unterschiede zwischen RVAdIE4 und Ad169 (nicht gezeigt). Auch bei dieser Untersuchung waren die Unterschiede zu frühen Zeitpunkten der Infektion stärker ausgeprägt und glichen sich im Laufe der Replikation aneinander an. Das HCMV verfügt offensichtlich über die Möglichkeit, die Deletion von nicht-essentiellen Genprodukten im Laufe der Replikation zu kompensieren

Eine mechanistische Vorstellung, wie das 5 kB Transkript Einfluß auf die Aktivierung früher viraler Promotoren bzw. die Expression viraler Proteine nehmen kann, existiert bislang nicht. Das Transkript weist keinerlei Ähnlichkeiten mit bisher bekannten funktionellen RNAs auf, wie sie beispielsweise bei Epstein-Barr- oder Adenoviren beschrieben wurden (Akusjärvi et al., 1980; Rosa et al., 1981). Diese funktionellen RNAs sind in der Regel kleiner als 200 Nukleotide und liegen weder polyadenyliert noch mit einem *CAP* versehen vor. Natürlich ist jedoch nicht auszuschließen, dass es noch weitere Arten funktioneller

RNAs mit anderen Charakteristika gibt. Am ehesten könnten die beobachteten Effekte durch ein Protein, z.B. durch ein DNA-bindendes Protein, erklärt werden. Die *in vitro* Transkription und Translation der kodierenden Region des IE4-Gens lieferte jedoch keine Hinweise auf die Synthese eines Proteins. Ein fehlender Nachweis eines Proteins mit dieser *in vitro*-Methode schließt jedoch die Synthese eines Polypeptids in der virusinfizierten Zelle nicht aus. Weitere funktionelle Analysen müssen sich anschließen, um die Rolle dieser Genomregion bei der Vermehrung von HCMV aufzuklären.

Obwohl die IE4-Deletionsmutante RVAdIE4 noch viele Fragen aufwirft und Hinweise auf eine mechanistische Vorstellung der Wirkungsweise des IE4-Transkriptes noch viele Untersuchungen erfordern werden, so konnte doch das Ziel der Arbeit klar erfüllt werden. Es wurde gezeigt, dass das IE4-Gen sowohl für die Virusvermehrung als auch für die Ausbildung und Freisetzung von *Dense Bodies* entbehrlich ist. Somit konnte eine relativ große Region auf dem HCMV-Genom identifiziert werden, die mindestens 5 kB Spielraum für die Insertion von Fremdsequenzen schafft und die Konstruktion rekombinanter *Dense Bodies* erlauben wird.

## 5.                   Ausblick

Aus den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen lassen sich verschiedene Optionen für die Verwendung von DB als Vakzine ableiten. Zunächst müssen DB in klinischen Studien auf ihre Immunogenität im Menschen hin untersucht werden. Diese Studien könnten sich auf DB alleine beziehen; DB könnten aber auch in Kombination mit anderen Vakzineformulierungen im Sinne eines sog. „*Prime-Boost-Verfahrens*“ (Adler et al., 1999) auf ihre Wirksamkeit getestet werden. Unter Verwendung der rekombinanten DNA-Technologie könnten die Partikel in einer Weise verändert werden, die ihre Antigenität weiter verbessert. Durch Insertion zusätzlicher antigener Determinanten, z.B. in Fusion an das Tegumentprotein pp65, den Hauptbestandteil von DB, könnte der Variabilität der menschlichen Immunantwort und der Diversität verschiedener HCMV-Stämme Rechnung getragen werden. Mit der IE4-Region konnte im Rahmen dieser Arbeit ein Bereich des HCMV-Genoms identifiziert werden, der für die Replikation von HCMV und die DB-Formation entbehrlich ist und daher Spielraum für genetische Manipulationen in dem stark größenlimitierten HCMV-Genom schafft.

Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass DB von einer Vielzahl von Zelltypen, darunter auch professionell antigen-präsentierende Zellen (APZ), aufgenommen werden, stellen sie ein wirksames Vehikel zur Einschleusung von Antigenen in Zellen dar. Diese Eigenschaft könnte man sich zu Nutze machen, um Antigene anderer Erreger in DB zu verpacken. Dies würde eine Möglichkeit zur Entwicklung multivalenter Vakzinen eröffnen, die aufgrund der Zahl an vorhandenen Impfstoffen und der wachsenden Impfmüdigkeit in der Bevölkerung seitens der Impfstoffindustrie verstärkt angemahnt werden. Darüber hinaus könnte die Untersuchung der einzelnen Komponenten, die für die Ausbildung eines DB-Partikels notwendig sind, wertvolle Hinweise auf Möglichkeiten zur Rekonstitution DB-ähnlicher Partikel bei gleichzeitiger Abwesenheit von infektiösem Virus geben.

Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten immunogenen Eigenschaften von *Dense Bodies* eröffnen eine Reihe von Möglichkeiten, dem Ziel, der Entwicklung eines wirksamen Impfstoffes gegen HCMV, einen Schritt näher zu kommen und damit sowohl die Morbidität als auch die Mortalität, die mit dieser Virusinfektion assoziiert sind, zu verringern.

## 6. Literaturverzeichnis

**Abremski, K., R. Hoess, and N. Stenberg.** 1983. Studies on the properties of P1 site-specific recombination: evidence for topologically unlinked products following recombination. *Cell* **32**: 1301-1311.

**Adler, S. P., S. E. Starr, S. A. Plotkin, S. H. Hempfling, J. Buis, M. Manning, and M. A. Best.** 1995. Immunity induced by primary human cytomegalovirus infection protects against secondary infection among women of childbearing age. *J. Inf. Dis.* **171**: 26-32.

**Adler, S. P., S. H. Hempfling, S. E. Starr, S. A. Plotkin, and S. Riddell.** 1998. Safety and immunogenicity of the Towne strain cytomegalovirus vaccine. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **17**:200-206.

**Adler, S. P., S. A. Plotkin, E. Gonczol, M. Cadoz, C. Meric, J. B. Wang, P. Dellamonica, A. M. Best, J. Zahradnik, S. Pincus, K. Berencsi, W. I. Cox, and Z. Gyulai.** 1999. A Canarypox Vector Expressing Cytomegalovirus (CMV) Glycoprotein B Primes for Antibody Responses to a Live Attenuated CMV Vaccine (Towne). *J. Infect. Dis.* **180**:843-846.

**Ahn, J. H., W. Jang, and G. S. Hayward.** 1999. The human cytomegalovirus IE2 and UL112/113 proteins accumulate in DNA replication compartments that initiate from the periphery of promyelocytic leukemia protein associated nuclear bodies (PODs or ND10). *J. Virol.* **73**: 10458-10471.

**Akusjärvi, G., M. B. Matthews, P. Anderson, B. Vennström, and U. Petterson.** 1980. Structure of genes for virus-associated RNA I and RNA II of adenovirus type 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 2424-2428.

**Alford, C. A., S. Stagno, R.F. Pass, and W. Britt.** 1990. Congenital and perinatal cytomegalovirus infections. *Rev. Infect. Dis.* **12**: 745- 753.

**Alp, N. J. T. D. Allport, J. vanZanten, B. Rodgers, J. G. Sissons, and L. K. Borysiewicz.** 1991. Fine specificity of cellular immune responses in humans to human cytomegalovirus immediate-early 1 protein. *J. Virol.* **65**: 4812-4820.

**Anders, D. G., M. A. Kacia, G. Pari, and S. M. Puntunieri.** 1992. Boundaries and structure of human cytomegalovirus orilyt, a complex origin for lytic-phase DNA replication. *J. Virol.* **66**: 3373-3384.

**Andreoni, M., M. Faircloth, L. Vugler, and W. J. Britt.** 1989. A rapid microneutralization assay for the measurement of neutralizing antibody reactive with human cytomegalovirus. *J. Virol. Meth.* **23**: 157-168.

**Baldick, C. J., Jr. and T. Shenk.** 1996. Proteins associated with purified human cytomegalovirus particles. *J. Virol.* **70**:6097-6105.

**Barrett, K., R. Calendar, W. Gibbs, R. N. Goldstein, B. Lindqvist, and E. Six.** 1973. Helper-dependent bacteriophage P4: a model satellite virus and its implications for animal virology. *Prog. Med. Virol.* **15**:309-330.

**Beninga, J., B. Kropff, and M. Mach.** 1995. Comparative analysis of fourteen individual human cytomegalovirus proteins for helper T cell response. *J. Gen. Virol.* **76**:153-160.

**Boppana, S. B., R. F. Pass, W. J. Britt, S. Stagno, and A. C. Alford.** 1992. Symptomatic congenital cytomegalovirus infection: neonatal morbidity and mortality. *Pediatr. Inf. Dis. J.* **11**: 93-99.

- Boppana, S. B. and W. J. Britt.** 1995. Antiviral antibody responses and intrauterine transmission after primary maternal cytomegalovirus infection. *J. Infect. Dis.* **171**:1115-1121.
- Boppana, S. B. and W. J. Britt.** 1996. Recognition of human cytomegalovirus gene products by HCMV-specific cytotoxic T cells. *Virology.* **222**:293-296.
- Boppana, S. B., K. B. Fowler, W. J. Britt, S. Stagno, and R. F. Pass.** 1999. Symptomatic congenital cytomegalovirus infection in infants born to mothers with preexisting immunity to cytomegalovirus. *Pediatrics* **104**: 55-60.
- Borst, E. M., G. Hahn, U. H. Koszinowski, and M. Messerle.** 1999. Cloning of the human cytomegalovirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome in *Escherichia coli*: a new approach for construction of HCMV mutants. *J. Virol.* **73**: 8320-8329.
- Borysiewicz, L. K., B. Rodgers, S. Morris, S. Graham, and J. G. Sissons.** 1985. Lysis of human cytomegalovirus infected fibroblasts by natural killer cells: demonstration of an interferone-independent component requiring expression of early viral proteins and characterization of effector cells. *J. Immunol.* **134**: 2695-2701.
- Borysiewicz, L. K. J. K. Hickling, S. Graham, J. Sinclair, M. P. Cranage, G. L. Smith, and J. G. Sissons.** 1988. Human cytomegalovirus-specific cytotoxic T cells: relative frequency of stage-specific CTL recognizing the 72-kD immediate-early protein and glycoprotein B expressed by recombinant vaccinia viruses. *J. Exp. Med.* **168**: 919-931.
- Bowden, R. A.** 1991. Cytomegalovirus infection in transplant patients: methods of prevention of primary cytomegalovirus. *Transplant. Proc.* **23**: 136-138.
- Bowden, R. A. S. J. Slichter, M. H. Sayers, M. Mori, M. J. Cays, and J. D. Meyers.** 1991. Use of leucocyte depleted platelets and cytomegalovirus-negative red blood cells for prevention of primary cytomegalovirus infection after marrow transplant. *Blood* **78**: 246-250.
- Bradley, L. M., K. Yoshimoto, and S. L. Swain.** 1995. The cytokines IL-4, IFN-gamma, and IL-12 regulate the development of subsets of memory effector helper T cells in vitro. *J. Immunol.* **155**:1713-1724.
- Britt, W. J., L. Vugler, and E. B. Stephens.** 1988. Induction of complement-dependent and -independent neutralizing antibodies by recombinant-derived human cytomegalovirus gp55-116 (gB). *J. Virol.* **62**:3309-3318.
- Britt, W. J., L. Vugler, E. J. Butfiloski, and E. B. Stephenson.** 1990. Cell surface expression of human cytomegalovirus gp55-116 (gB): use of HCMV-recombinant vaccinia virus-infected cells in analysis of the human neutralizing antibody response. *J. Virol.* **64**: 1079-1085.
- Britt, W. J.** 1996. Vaccines against human cytomegalovirus: time to test. *Trends in Microbiol.* **4**: 34-38.
- Britt W. J., and M. Mach.** 1996. Human cytomegalovirus glycoproteins. *Intervirology* **39**:401-12.
- Bruggeman, C. A.** 1993. Cytomegalovirus and latency: an overview. *Virchows Archiv B Cell Pathol.* **64**: 325-333.

- Brune, W., C. Menard, U. Hobom, S. Odenbreit, M. Messerle, and U. H. Koszinowski.** 1999. Rapid identification of essential and nonessential herpesvirus genes by direct transposon mutagenesis. *Nature Biotech.* **17**: 360-364.
- Brown, F., L. Banken, K. Saywell, and I. Arum.** 1999. Pharmacokinetics of valganciclovir and ganciclovir following multiple oral dosages of valganciclovir in HIV- and CMV-seropositive volunteers. *Clin. Pharmacokinet.* **37**: 167-176.
- Burnette, W. N.** 1981. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal-Biochem.* **112**: 195-203.
- Canabes-Bastos, E., A. G. Day, and C. P. Lichtenstein.** 1989. A sensitive and simple assay for neomycin phosphotransferase II activity in transgenic tissue. *Gene* **77**: 169-176.
- Carney, W. P., M. S. Hirsch, V. R. Iacovello.** 1983. T-lymphocyte subsets and proliferative responses following immunization with cytomegalovirus vaccine. *J. Inf. Dis.* **147**: 958.
- Cha, T. A., E. Tom, G. W. Kemble, G. M. Duke, E. S. Mocarski, and R. R. Spaete.** 1996. Human cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains. *J. Virol.* **70**: 78-83.
- Chandler, S. H., and J. K. McDougall.** 1986. Comparison of restriction site polymorphisms among clinical isolates and laboratory strains of human cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.* **67**: 2179-2192.
- Chee, M. S., A. T. Bankier, S. Beck, R. Bohni, C. M. Brown, R. Cerny, T. Horsnell, C. A. Hutchinson, T. Kouzarides, J. A. Martignetti.** 1990. Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **154**:125-169.
- Cinatl, J. Jr., J. Cinatl, J. U. Vogel, H. Rabenau, B. Kornhuber, and H. Doerr.** 1996. Modulatory effects of human cytomegalovirus infection on malignant properties of cancer cells. *Intervirology* **39**:259-69.
- Clark, B. R., J. A. Zaia, L. Balce-Directo, and Y. P. Ting.** 1984. Isolation and partial chemical characterization of a 64 kD glycoprotein of human cytomegalovirus. *J. Virol.* **49**: 279-282.
- Coligan, J. E., A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, W. Strober** (Editoren). 1994. *Current Protocols in Immunology*. New York.
- Compton, T., D. M. Nowlin, and N. R. Cooper.** 1993. Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology* **193**: 834-841.
- Constant, S. and K. Bottomly.** 1997. Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses. *Ann. Rev. Immunol.* **15**: 297-322.
- Craighead, J. E., R. E. Kanich, and J. D. Almeida.** 1972. Nonviral microbodies with viral antigenicity produced in cytomegalovirus infected cells. *J. Virol.* **10**: 766-775.
- DelPrete, G.** 1998. The concept of type-1 and type-2 helper T cells and their cytokines in Humans. *Intern. Rev. Immunol.* **16**: 427-455.



- DeMarchi, J. M.** 1983. Posttranscriptional control of human cytomegalovirus gene expression. *Virology* **124**: 390-402.
- Desai, P., N. A. DeLuca, J. C. Glorioso, and S. Person.** 1993. Mutations in herpes simplex virus type 1 genes encoding VP5 and VP23 abrogate capsid formation and cleavage of replicated DNA. *J. Virol.* **67**:1357-1364.
- Diamond, D. J., J. York, J. Y. Sun, C. L. Wright, and S. J. Forman.** 1997. Development of a candidate HLA A\*0201 restricted peptide-based vaccine against human cytomegalovirus infection. *Blood* **90**:1751-1767.
- Docke, W. D., S. Prosch, E. Fietze, V. Kimel, H. Zuckermann, C. Klug, U. Syrbe, D. Kruger, R. von Baehr, and H. D. Volk.** 1994. Cytomegalovirus reactivation and tumor necrosis factor. *Lancet* **343**: 268-269.
- Doerfler, W., A. Hoeveler, B. Weisshaar, P. Dobrzanski, D. Knebel, K. D. Langer, S. Achten, and U. Müller.** 1989. Promotor inactivation or inhibition by sequence-specific methylation and mechanisms of reactivation. *Cell Biophys.* **15**: 21-27.
- Elek, S. D. and H. Stern.** 1974. Development of a vaccine against mental retardation caused by cytomegalovirus infection in utero. *Lancet* **1**:1-5.
- Endresz, V., L. Kari, K. Berencsi, C. Kari, Z. Gyulai, C. Jeney, S. Pincus, U. Rodeck, C. Meric, S. A. Plotkin, and E. Gonczol.** 1999. Induction of human cytomegalovirus glycoprotein B specific neutralizing antibody and phosphoprotein 65 specific cytotoxic T lymphocyte responses by naked DNA immunization. *Vaccine* **17**: 50-58.
- Faizi-Khan R., S. Mori, Y. Eizuru, K. Kumura Ishii, and Y. Minamishima.** 1998. Genetic analysis of a ganciclovir-resistant human cytomegalovirus mutant. *Antiviral Res.* **40**: 95-103.
- Falagas, M. E., D. R. Snyderman, J. Griffith, R. Ruthazer, and B. G. Werner.** 1997 a. Effect of cytomegalovirus infection status on first-year mortality rates among orthotopic liver transplant recipients. The Boston Center for Liver Transplantation CMVIG Study Group. *Ann. Intern. Med.* **126**:275-279.
- Falagas, M. E., D. R. Snyderman, R. Ruthazer, J. Griffith, B. G. Werner, R. Freeman, and R. Rohrer.** 1997 b. Cytomegalovirus immune globulin (CMVIG) prophylaxis is associated with increased survival after orthotopic liver transplantation. The Boston Center for Liver Transplantation CMVIG Study Group. *Clin. Transplant.* **11**:432-437.
- Falagas, M. E., C. Paya, R. Ruthazer, A. Badley, R. Patel, R. Wiesner, J. Griffith, R. Freeman, R. Rohrer, B. G. Werner, and D. R. Snyderman.** 1998. Significance of cytomegalovirus for long-term survival after orthotopic liver transplantation: a prospective derivation and validation cohort analysis. *Transplantation* **66**:1020-1028.
- Fiala, M., R. W. Honess, D. C. Heiner, J. W. Heine, J. Murnane, R. Wallace, and L. B. Guze.** 1976. Cytomegalovirus proteins. I. Polypeptides of virions and Dense Bodies. *J. Virol.* **19**: 243-54.
- Feltquate, D. M., S. Heaney, R. G. Webster, and H. L. Robinson.** 1997. Different T helper cell types and antibody isotypes generated by saline and gene gun DNA immunization. *J. Immunol.* **158**:2278-2284.
- Fowler, K. B., S. Stagno, R. F. Pass, W. J. Britt, T. J. Boll, and C. A. Alford.** 1992. The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status. *N. Engl. J. Med.* **326**: 663-667.

- Fowler, K. B., A. J. Dable, S. B. Boppana, and R. F. Pass.** 1999. Newborn hearing screening: will children with hearing loss caused by congenital cytomegalovirus infection be missed? *J. Pediatr.* **135**: 60-64.
- Fries, B. C., S. Chou, M. Boeckh, and B. Torok-Storb.** 1994. Frequency distribution of cytomegalovirus envelope glycoprotein genotypes in bone marrow transplant recipients. *J. Infect. Dis.* **169**: 769-774.
- Gallina, A., L. Simoncini, S. Garbelli, E. Percivalle, G. Pedrali-Noy, K. S. Lee, R. Erikson, B. Plachter, G. Gerna, and G. Milanesi.** 1999. Polo-like kinase 1 as a target for human cytomegalovirus pp65 lower matrix protein. *J. Virol.* **73**: 1468-1478.
- Gao, M., L. Matusick-Kumar, W. Hurlburt, S. F. DiTusa, W. W. Newcomb, J. Brown, P. McCann, I. Deckman, and R. J. Colonno.** 1994. The protease of herpes simplex virus type 1 is essential for functional capsid formation and viral growth. *J. Virol.* **68**: 3702-3712.
- Gavin, M. A., M. J. Gilbert, S. R. Riddell, P. D. Greenberg, and M. J. Bevan.** 1993. Alkali hydrolysis of recombinant proteins allows for the rapid identification of class I MHC-restricted CTL epitopes. *J. Immunol.* **151**: 3971-3980.
- Geelen, L. M., R. Boom, G. P. Klaver, R. P. Minnaar, M. Feltkamp, F. J. van Millingen, C. Sol, and J. van der Noordaa.** 1987. Transcriptional activation of the major immediate early transcription unit of human cytomegalovirus by heat-shock, arsenite and protein synthesis inhibitors. *J. Gen. Virol.* **68**: 2925-2931.
- Gibson, W.** 1983. Protein counterparts of human and simian cytomegaloviruses. *Virology* **128**: 391-406.
- Gibson, W. and A. Irmiere.** 1984. Selection of particles and proteins for use as human cytomegalovirus subunit vaccines. *Birth Defects* **20**:305-324
- Gonczol, E., F. Giuliano, J. Ianacone, and S. A. Plotkin.** 1986. A rapid microneutralization assay for cytomegalovirus. *J. Virol. Methods* **14**: 37-41.
- Gonczol, E., J. Ianacone, W. Z. Ho, S. Starr, B. Meignier, and S. Plotkin.** 1990. Isolated gA/gB glycoprotein complex of human cytomegalovirus envelope induces humoral and cellular immune-responses in human volunteers. *Vaccine* **8**:130-136.
- Gonczol, E., C. deTaisne, G. Hirka, K. Berencsi, W. Lin, E. Paoletti, and S. Plotkin.** 1991. High expression of human cytomegalovirus gB protein in cells infected with a vaccinia-gB recombinant: the importance of the gB protein in HCMV immunity. *Vaccine* **9**: 631-637.
- Gonczol, E., K. Berencsi, S. Pincus, V. Endresz, C. Meric, E. Paoletti, and S. A. Plotkin.** 1995. Preclinical evaluation of an ALVAC (canarypox)--human cytomegalovirus glycoprotein B vaccine candidate. *Vaccine* **13**:1080-1085.
- Goodrich, J. M., R. A. Bowden, L. Fishner, C. Keller, G. Schoch, and J. D. Meyers.** 1993. Ganciclovir prophylaxis to prevent cytomegalovirus disease after allogeneic marrow transplantation. *Ann. Intern. Med.* **118**: 173-178.
- Grattan, M. T., C. E. Moreno-Cabral, V. Starnes, P. E. Oyer, E. B. Stinson, and N. E. Shumway.** 1989. Cytomegalovirus infection is associated with cardiac allograft rejection and atherosclerosis. *JAMA* **261**: 3561-3565.

- Greaves, R. F., J. M. Brown, J. Vieira, and E. S. Mocarski.** 1995. Selectable insertion and deletion mutagenesis of the human cytomegalovirus genome using the E.coli guanosine phosphoribosyl transferase (gpt) gene. *J. Gen. Virol.* **76**: 2151-2160.
- Greenaway, P. J., J. D. Oram, R. G. Downing, and K. Patel.** 1982. Human cytomegalovirus DNA: BamHI, EcoRI, and PstI restriction endonuclease cleavage maps. *Gene* **18**: 355-360.
- Grefte, J. M., B. T. van-der-Gun, S. Schmolke, M. van-der-Giessen, W. J. van-Son, B. Plachter, G. Jahn, and T. H. The.** 1992. The lower matrix protein pp65 is the principal viral antigen present in peripheral blood leukocytes during an active cytomegalovirus infection. *J. Gen. Virol.* **73**:2923-2932.
- Grefte, J. M., M. van-der-Giessen, N. Blom, T.H. The, and W. J. van-Son.** 1995. Circulating cytomegalovirus-infected endothelial cells after renal transplantation: possible clue to pathophysiology? *Transplant. Proc.* **27**: 939-942.
- Greis, K. D., W. Gibson, and G. W. Hart.** 1994. Site-specific glycosylation of the human cytomegalovirus tegument basic phosphoprotein (UL32) at serine 921 and serine 952. *J. Virol.* **68**: 8339-8349.
- Griffiths, P. D. and C. Baboonian.** 1984. A prospective study of primary cytomegalovirus infection during pregnancy: final report. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* **91**: 307-315.
- Grzimek, N. K. A.** 1999. In vivo Replikation eines rekombinanten murinen Cytomegalovirus unter der Kontrolle der paralogen Promotor-Enhancer Region des humanen Cytomegalovirus. Dissertation. Universität Tübingen.
- Günzburg, W. H. and B. Salmons.** 1997. Gentransfer in Säugetierzellen. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Gyulai, Z., S. Pincus, B. Cox, et al.** Canarypox-CMV-pp65 recombinant immunization of seronegative subjects elicits pp65 specific CTL precursors with a frequency of naturally seropositive individuals [Abstract]. Seventh International Cytomegalovirus Workshop, Brighton, UK, March 7 to 9, 1999.
- Hahn, G., R. Jones, and E.S. Mocarski.** 1998. Cytomegalovirus remains latent in a common precursor of dendritic and myeloid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 3937-3942.
- Halbert, C. L., G. W. Demers, and D. A. Galloway.** 1991. The E7 gene of Human Papillomavirus Type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells. *J. Virol.* **65**: 473-478.
- Hall, A., and R. Brown.** 1985. Human N-ras. cDNA cloning and gene structure. *Nuc. Acids Res.* **13**: 5255-5268.
- Harris, J. R. and R. W. Horne.** 1991. Negative staining, p. 203-208. *In* J. R. Harris (ed.), *Electron microscopy in biology*. IRL Press, Oxford, England.
- Harris, J. R.** 1997. *Negative staining and cryoelectron microscopy: the thin film techniques*. Bios Scientific Publishers, Oxford, England.
- Hendrix, M. G., M. M. Salismans, C. P. vanBoven, and C. A. Bruggeman.** 1990. High prevalence of latently present cytomegalovirus DNA in arterial walls of patient suffering from grade III atherosclerosis. *Am. J. Pathol.* **136**: 23-28.

**Hengel, H., W. Brune, and U. H. Koszinowski.** 1998. Immune evasion by cytomegalovirus - survival strategies of a highly adapted opportunist. *Trends in Microbiol.* **6**: 190-197.

**Ho, M.** 1991. Cytomegalovirus biology and infection. Plenum Medical Book co. New York.

**Holden, H. T., R. K. Oldham, J. R. Ortaldo, R. B. Herberman.** 1977. Standardization of the chromium-51 release, cell-mediated cytotoxicity assay: cryopreservation of mouse effector and target cells. *J. Natl. Cancer Inst.* **58**: 611-22.

**Holtappels, R., J. Podlech, G. Geginat, H. P. Steffens, D. Thomas, and M. J. Reddehase.** 1998. Control of murine cytomegalovirus in the lungs: relative but not absolute immunodominance of the immediate-early 1 nonapeptide during the antiviral cytolytic T-lymphocyte response in pulmonary infiltrates. *J. Virol.* **72**:7201-7212.

**Hopkins, J. I., A. N. Fiander, A. S. Evans, M. Delchambre, D. Gheysen, and L. K. Borysiewicz.** 1996. Cytotoxic T cell immunity to human cytomegalovirus glycoprotein B. *J. Med. Virol.* **49**: 124-131.

**Huber, M. T., and T. Compton.** 1999. Intracellular formation and processing of the heterotrimeric gH-gL-gO (gCIII) glycoprotein envelope complex of human cytomegalovirus. *J. Virol.* **73**: 3886-3892.

**Imanishi, T., T. Akaza, A. Kimura, K. Tokunaga, and T. Gojobori.** 1992. Allele and haplotype frequencies for HLA and complement loci in various ethnic groups. 1065-1974. In k. Tsuji, M. Aizawa, T. Sazazuki. HLA. 1991 Proceedings of the 11<sup>th</sup> international histocompatibility workshop and conference, Vol. 1, Oxford University Press.

**Iwasaki, Y., T. Furukawa, S. Plotkin, H. Koprowski.** 1973. Ultrastructural study on the sequence of human cytomegalovirus infection in human diploid cells. *Archives Gesamte Virusforschung* **40**: 311-324.

**Jahn, G., E. Knust, H. Schmolla, T. Sarre, J. Nelson, J. McDougall, and B. Fleckenstein.** 1984 a. Predominant immediate-early transcripts of human cytomegalovirus Ad169. *J. Virol.* **49**: 3349-3355.

**Jahn, G., J. Nelson, B. Plachter, J. McDougall, and B. Fleckenstein.** 1984 b. Transcription of a human cytomegalovirus DNA region which is capable of transforming rodent cells. In *Herpesvirus*, pp. 455-463. Edited by F. Rapp. New York.

**Jahn, G., B.C. Scholl, B. Traupe, B. Fleckenstein.** 1987. The two major structural phosphoproteins (pp65 and pp150) of human cytomegalovirus and their antigenic properties. *J. Gen. Virol.* **68**: 1327-1337.

**Jones, T. R., V. P. Muzithras, and Y. Gluzman.** 1991. Replacement mutagenesis of the human cytomegalovirus genome: US10 and US11 gene products are nonessential. *J. Virol.* **65**: 5860-5872.

**Jonjic, S., I. Pavic, B. Polic, I. Crnkovic, P. Lucin, and U.H. Koszinowski.** 1994. Antibodies are not essential for the resolution of primary cytomegalovirus infection but limit dissemination of recurrent virus. *J. Exp. Med.* **179**: 1713-1717.

**Just, M., A. Buergin-Wolff, G. Emoedi, and R. Hernandez.** 1975. Immunization trials with live attenuated cytomegalovirus Towne 125. *Infection* **3**: 111-114.

**Kaerber G.** 1931: Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Arch. exp. Pathol. Pharmacol.* **162**: 480.

- Kanich, R. E., and J. E. Craighead.** 1972. Human cytomegalovirus infection of cultured fibroblasts II. Viral replicative sequence of a wild and an adapted strain. *Lab. Invest.* **27**: 273-282.
- Kari, B, and R. Gehrz.** 1992. A human cytomegalovirus glycoprotein complex designated gC-II is a major heparin-binding component of the envelope. *J. Virol.* **66**:1761-1764.
- Kern, F., I. P. Surel, C. Brock, B. Freisetdt, H. Radtke, A. Scheffold, R. Blascyk, R. Reinke, J. Schneider-Mergener, A. Radbruch, P. Walden and H. D. Volk.** 1998. T-cell epitope mapping by flow cytometry. *Nature Medicine* **4**: 975-978.
- Kern, F., I. P. Surel, N. Faulhaber, C. Frömmel, J. Schneider-Mergener, C. Schönemann, P. Reinke, and H. D. Volk.** 1999. Target structures of the CD8+ T-cell response to human cytomegalovirus: the 72 kD major immediate early protein revisited. *J. Virol.* **73**: 8179-8184.
- Kern, F., E. Khatamzas, I. Surel, C. Frommel, P. Reinke, S. L. Waldrop, L. J. Picker, and H. D. Volk.** 1999. Distribution of human CMV-specific memory T cells among the CD8pos. subsets defined by CD57, CD27, and CD45 isoforms. *Eur. J. Immunol.* **29**: 2908-2915.
- Klatt E. C., and D. Shibata.** 1988. Cytomegalovirus infection in the acquired immunodeficiency syndrome. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **112**: 540-544.
- Klinman, D. M., A. K. Yi, S. L. Beaucage, J. Conover, and A. M. Krieg.** 1996. CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**:2879-2883.
- Komura, J., T. Okada, and T. Ono.** 1995. Repression of transient expression by DNA methylation in transcribed regions of reporter genes introduced into cultured human cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1260**: 73-78.
- Koszinowski, U. H., M. J. Reddehase, and M. Del-Val.** 1992. Principles of cytomegalovirus antigen presentation in vitro and in vivo. *Semin. Immunol.* **4**:71-79.
- Kovacsovics, B. M., K. Clark, B. Benacerraf, and K. L. Rock.** 1993. Efficient major histocompatibility complex class I presentation of exogenous antigen upon phagocytosis by macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**: 4942-4946.
- Kranz, D. M., S. Tonegawa, and H. N. Eisen.** 1984. Attachment of an anti-receptor antibody to non-target cells renders them susceptible to lysis by a clone of cytotoxic T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**:7922-7926.
- Krieg, A. M., A. K. Yi, S. Matson, T. J. Waldschmidt, G. A. Bishop, R. Teasdale, G. A. Koretzky, and D. M. Klinman.** 1995. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* **374**:546-549.
- Kropff, B., M. P. Landini, and M. Mach.** 1993. An ELISA using recombinant proteins for the detection of neutralizing antibodies against human cytomegalovirus. *J. Med. Virol.* **39**: 187-195.
- Kurz, S., and M. J. Reddehase.** 1999. Patchwork pattern of transcriptional reactivation in the lungs indicates sequential checkpoints in the transition from murine cytomegalovirus latency to recurrence. *J. Virol.* **73**: 8612-8622.

**Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **27**: 680-685.

**LaFace, D. M., M. Vestberg, Y. Yang, R. Srivastava, J. DiSanto, N. Flomenberg, S. Brown, L. A. Sherman, and P. A. Peterson.** 1995. Human CD8 transgene regulation of HLA recognition by murine T cells. *J. Exp. Med.* **182**:1315-1325.

**Landini, M. P., G. Mirolò, P. Coppolecchia, M. C. Re, M. LaPlace.** 1985. Serum antibodies to individual cytomegalovirus structural polypeptides studied by immunoblotting. *J. Med. Virol.* **17**: 303-311.

**Landini, M. P., M. X. Guan, G. Jahn, W. Lindenmaier, M. Mach, A. Ripalti, A. Necker, T. Lazzarotto, and B. Plachter.** 1990. Large scale screening of M. LaPlace sera with cytomegalovirus recombinant antigens. *J. Clin. Microbiol.* **28**: 1375-1379.

**Landini, M. P., and M. LaPlace.** 1991. Humoral immune response to human cytomegalovirus proteins: a brief review. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **14**: 97-105.

**Landini, M. P., A. Riplati, K. Sra, and P. Pouletti.** 1991. Human cytomegalovirus structural proteins: immune reaction against pp150 synthetic peptides. *J. Clin. Microbiol.* **29**: 1868-1872.

**Li, C. R., P. D. Greenberg, M. J. Gilbert, J. M. Goodrich, and S. R. Riddell.** 1994. Recovery of HLA-restricted cytomegalovirus (CMV)-specific T-cell responses after allogeneic bone marrow transplant: correlation with CMV disease and effect of ganciclovir prophylaxis. *Blood* **83**:1971-1979.

**Li, C., X. Yang, W. Tu, and S. R. Riddell.** 1997. Human cytomegalovirus matrix protein pp150 is efficiently presented as one of target antigens for cytotoxic T lymphocyte recognition. *Chin Med. J. (Engl.)* **110**:397-400.

**Li, J., T. Yamamoto, K. Ohtsubo, M. Shirakata, and K. Hirai.** 1999. Major product pp43 of human cytomegalovirus UL112/113 gene is a transcriptional coactivator with two functionally distinct domains. *Virology* **260**: 89-97.

**Liu Y. N., A. Klaus, B. Kari, M. F. Stinski, J. Eckhardt, and R. C. Gehrz.** 1991. The N-terminal 513 amino acids of the envelope glycoprotein gB of human cytomegalovirus stimulates both B- and T-cell immune responses in humans. *J. Virol.* **65**:1644-8.

**Ljungman, P., D. Engelhard, H. Link, P. Biron, L. Brandt, S. Brunet, C. Cordonnier, L. Debusscher, and H. J. Kolb.** 1992. Treatment of interstitial pneumonitis due to cytomegalovirus with ganciclovir and intravenous immune globulin: experience of European Bone Marrow Transplant Group. *Clin. Infect. Dis.* **14**: 831-835.

**Luse, S. A. and M. G. Smith.** 1958. Electron microscopy of salivary gland viruses. *J. Exp. Med.* **10**: 623-632.

**Mach, M.** 1999. Persönliche Mitteilung.

**Maciejewski, J. P., and S. C. StJeor.** 1999. Human cytomegalovirus infection of human hematopoietic progenitor cells. *Leuk. Lymphoma* **33**: 1-13.

**Marks J. R., and D. H. Spector.** 1988. Fusion of the termini of the murine cytomegalovirus genome after infection. *J. Virol.* **52**: 24-28.

- Marshall, G. S., G. P. Rabelais, G. G. Stout, and S. L. Waldeyer.** 1992. Antibodies to recombinant-derived glycoprotein B after natural human cytomegalovirus infection correlate with neutralizing activity. *J. Inf. Dis.* **165**: 381-384.
- Masse, M. J., S. Karlin, G. A. Schachtel, and E. S. Mocarski.** 1992. Human cytomegalovirus origin of DNA replication (oriLyt) resides within a highly complex repetitive region. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **89**: 5246-5250.
- McGavran, M. H., and M. G. Smith.** 1965. Ultrastructural, cytochemical, and microchemical observation on cytomegalovirus (salivary gland virus) infection of human cells in tissue culture. *Exp. Mol. Pathol.* **4**: 1-10.
- McLaughlin-Taylor, E., H. Pande, S. J. Forman, B. Tanamachi, C. R. Li, J. A. Zaia, P. D. Greenberg, and S. R. Riddell.** 1994. Identification of the major late human cytomegalovirus matrix protein pp65 as a target antigen for CD8+ virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *J. Med. Virol.* **43**:103-110.
- McVoy, M. A. and S. P. Adler.** 1994. Human cytomegalovirus DNA replicates after early circularization by concatemer formation, and inversion occurs within the concatemer. *J. Virol.* **68**: 1040-1051.
- Melnick, J. L., C. Hu, J. Burek, E. Adam, and M. E. DeBaakey.** 1994. Cytomegalovirus DNA in arterial walls of patients with atherosclerosis. *J. Med. Virol.* **42**: 170-174.
- Melton, D., D. Konecki, J. Brennard, and C. T. Caskey.** 1984. Structure, expression, and mutation of the hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 2147-2151.
- Messerle, M., I. Crnkovic, W. Hammerschmidt, H. Ziegler, and U. H. Koszinowski.** 1997. Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 14759-14763.
- Meyer, H., A. T. Bankier, M. P. Landini, C. M. Brown, B. G. Barrell, B. Rüger, and M. Mach.** 1988. Identification and prokaryotic expression of the gene coding for the highly immunogenic 28-kilodalton structural phosphoprotein (pp28) of human cytomegalovirus. *J. Virol.* **62**: 2243-2250.
- Meyer H., Y. Masuho, and M. Mach.** 1990. The gp116 of the gp58/116 complex of human cytomegalovirus represents the amino-terminal part of the precursor molecule and contains a neutralizing epitope. *J. Gen. Virol.* **71**: 2443-50.
- Meyer, H., V. A. Sundquist, L- Pereira, and M. Mach.** 1992. Glycoprotein gp116 of human cytomegalovirus contains epitopes for strain-common and strain-specific antibodies. *J. Gen. Virol.* **73**: 2375-2383.
- Meyer, H. H., A. Ripalti, M. P. Landini, K. Radsak, H. F. Kern, and G. M. Hensel.** 1997. Human cytomegalovirus late-phase maturation is blocked by stably expressed UL32 antisense mRNA in astrocytoma cells. *J. Gen. Virol.* **78**: 2621-2631.
- Meyers J. D.** 1988. Prevention and treatment of cytomegalovirus infection after marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **3**: 95-104.
- Mocarski, E. S.** 1993. Cytomegalovirus biology and replication. In: Roizman B., Whitley, R., Lopez, C. (eds) *The human herpesviruses*. New York: Raven; 173-226.
- Mocarski, E. S.** 1996. Cytomegaloviruses and their replication, p. 2447-2492. In B.N. Fields (ed.), *Virology*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.

- Mocarski, E. S., and G. W. Kemble.** 1996. Recombinant cytomegaloviruses for study of replication and pathogenesis. *Intervirology* **39**: 320-330.
- Mocarski, E. S., G. W. Kemble, J. M. Lyle, and R. F. Greaves.** 1996. A deletion mutant in the human cytomegalovirus gene encoding IE1(491aa) is replication defective due to a failure in autoregulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:11321-11326 .
- Monaco, J. J.** 1992. A molecular model for MHC class I restricted antigen processing. *Immunol. Today* **13**: 173-179.
- Morsy, M. A., and C. T. Caskey.** 1999. Expanded-capacity adenoviral vectors--the helper-dependent vectors. *Mol. Med. Today* **5**: 18-24.
- Nelson, J., B. Fleckenstein, G. Jahn, D. Galloway, and J. K. McDougall.** 1984. Structure of the transforming region of human cytomegalovirus Ad169. *J. Virol.* **15**: 27-35.
- Noble, S. and D. Faulds.** 1998. Ganciclovir: an update of its ude in the prevention of cytomegalovirus infection and disease in transplant patients. *Drugs* **56**: 115-146.
- Noraz, N., L. Lathey, and S. A. Spector.** 1997. Human cytomegalovirus-associated immunosuppression is mediated through interferon-alpha. *Blood* **89**: 2443-1452.
- Nowak, B., C. Sullivan, and P. Sarnow.** 1984. Characterization of monoclonal antibodies and polyclonal immune sera directed against human cytomegalovirus proteins. *Virology* **132**: 325-338.
- O'Garra, A. and K. Murphy.** 1994. Role of cytokines in determining T-lymphocyte function. *Curr. Opin. Immunol.* **6**:458-466.
- Oh, Y. K., C. V. Harding, and J. A. Swanson.** 1997. The efficiency of antigen delivery from macrophage phagosomes into cytoplasm for MHC class I-restricted antigen presentation. *Vaccine* **15**:511-518.
- Ohlin, M., B. Plachter, V. Sundquist, P. G. Steenbakkers, J. M. Middeldorp, and C. A. Borrebaeck.** 1995. Human antibody reactivity against the lower matrix protein pp65 produced by cytomegalovirus. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **2**: 325-329.
- Oronato, I. M., D. M. Morens, W. J. Martone, and S. K. Stansfield.** 1985. Epidemiology of cytomegalovirus infections: recommendations for prevention and control. *Rev. Infect. Dis.* **7**: 479-497.
- Pande, H., K. Campo, M. A. Churchill, and J. A. Zaia.** 1989. Genomic locus for a 140 kDa structural protein (pp150) of human cytomegalovirus in strains Towne and Ad169. *Virus Res.* **12**: 11-18.
- Pande, H. K. Campo, B. Tanamachi.** 1998. Direct DNA immunization of mice with plasmid DNA encoding the tegument protein pp65 of human cytomegalovirus induces high levels of circulating antibody to the encodes protein. *Scand. J. Infect. Dis.* **99**:117-120.
- Pass, R. F., A. M. Duliege, S. Boppana, R. Sekulovich, S. Percell, W. Britt, and R. L. Burke.** 1999. A subunit cytomegalovirus vaccine based on recombinant envelope glycoprotein B and a new adjuvant. *J. Infect. Dis.* **180**: 970-975.



- Pepperl, S., G. Benninger-Döring, S. Modrow, H. Wolf, and W. Jilg.** 1998. Immediate-early transactivator Rta of Epstein-Barr virus (EBV) shows multiple epitopes recognized by EBV-specific cytotoxic T lymphocytes. *J. Virol.* **72**:8644-8649.
- Pescovitz, M. D.** 1999. Absence of teratogenicity of oral ganciclovir used during early pregnancy in a liver transplant recipient. *Transplantation* **67**:758-759.
- Pfeifer, J. D., M. J. Wick, R. L. Roberts, K. Findlay, S. J. Normark, and C. V. Harding.** 1993. Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells. *Nature* **361**:359-362.
- Pietropaolo, R. L., and T. Compton.** 1997. Direct interaction between human cytomegalovirus glycoprotein B and cellular annexin II. *J. Virol.* **71**: 9803-9807.
- Plachter, B., B. Traupe, J. Albrecht, and G. Jahn.** 1988. Abundant 5 kB RNA of human cytomegalovirus without a major translational reading frame. *J. Gen. Virol.* **69**: 2251-2266.
- Plachter, B., S. Klages, S. Hagelmann, W. Britt, M. P. Landini, and G. Jahn.** 1990. Procaryotic expression of phosphorylated tegument protein pp65 of human cytomegalovirus and application of recombinant peptides for immunoblot analyses. *J. Clin. Microbiol.* **28**: 1229-1235.
- Plachter, B., W. Britt, R. Vornhagen, T. Stamminger, and G. Jahn.** 1993. Analysis of proteins encoded by IE regions 1 and 2 of human cytomegalovirus using monoclonal antibodies generated against recombinant antigens. *Virology* **193**: 642-652.
- Plachter, B.** 1999. Immuno-evasion during cytomegalovirus infection. *Biomedical Progress* **12**: 71-74.
- Plotkin, S. A., T. Furukawa, N. Zygraich, C. Huygelen.** 1975. Candidate cytomegalovirus strain for human vaccination. *Infect. Immun.* **12**: 521-527.
- Plotkin, S.A., J. Farquar, and E. Hornberger.** 1976. Clinical trials of immunization with the Towne 125 strain of human cytomegalovirus. *J. Inf. Dis.* **134**: 470-472.
- Plotkin, S. A., and D. Huygelen.** 1977. Cytomegalovirus vaccine prepared in WI-38. *Dev. Biol. Stand.* **37**: 301-305.
- Plotkin, S. A. M.L. Smiley, H.M. Friedman.** 1984. Towne vaccine induced prevention of cytomegalovirus disease after renal transplants. *Lancet* **1**:528-530.
- Plotkin, S. A., R. E. Weibel, G. Alpert, S. E. Starr, H. M. Friedman, S. R. Preblud, and J. Hoxie.** 1985. Resistance of seropositive volunteers to subcutaneous challenge with low-passaged human cytomegalovirus. *J. Infect. Dis.* **151**:737-739.
- Plotkin, S. A., S. E. Starr, H. M. Friedman, E. Gonczol, and R. E. Weibel.** 1989. Protective effects of Towne cytomegalovirus vaccine against low- passage cytomegalovirus administered as a challenge. *J. Infect. Dis.* **159**:860-865.
- Plotkin, S.A., S.E. Starr, H. Friedman, E. Gonczol, and K. Brayman.** 1990. Vaccines for the prevention of human cytomegalovirus infection. *Rev. Infect. Dis. J.* **17**: 200-206.

- Plotkin, S. A., S. E. Starr, H. M. Friedman, K. Brayman, S. Harris, S. Jackson, N. B. Tustin, R. Grossman, D. Dafoe, and C. Barker.** 1991. Effect of Towne live virus vaccine on cytomegalovirus disease after renal transplant. A controlled trial. *Ann. Intern. Med.* **114**:525-531.
- Plotkin, S. A., R. Higgins, and J. B. Kurtz.** 1994. Multicenter trial of Towne strain attenuated virus vaccine in seronegative renal transplant recipients. *Transplantation* **58**: 1176-1178.
- Plotkin, S. A.** 1999. Vaccination against cytomegalovirus, the chageling demon. *Pediatr. Inf. Dis. J.* **18**: 313-326.
- Portoles, P., J. Rojo, A. Golby, M. Bonneville, S. Gromkowski, L. Greenbaum, C. A. Janeway, D. B. Murphy, and K. Bottomly.** 1989. Monoclonal antibodies to murine CD3 epsilon define distinct epitopes, one of which may interact with CD4 during T cell activation. *J. Immunol.* **142**: 4169.
- Post, L. E., and B. Roizman.** 1981. A generalized technique for the deletion of specific genes in large genomes:  $\alpha$  gene 22 of herpes simplex virus 1 is not essential for growth. *Cell* **25**: 227-232.
- Prosch, S., J. Stein, K. Staak, C. Liebenthal, H. D. Volk, and D. H. Kruger.** 1996. Inactivation of the very strong HCMV immediate early promotor by DNA CpG methylation in vitro. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **377**: 195-201.
- Qadri, I., D. Navarro, P. Paz, and L. Pereira.** 1992. Assembly of conformation-dependent neutralizing domains on glycoprotein B of human cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.* **73**: 2913-2921.
- Quinnan, G. V. J., N. Kirmani, A. H. Rook, J. F. Manischewitz, L. Jackson, G. Moreschi, G. W. Santos, R. Saral, and W. H. Burns.** 1982. Cytotoxic t cells in cytomegalovirus infection: HLA-restricted T- lymphocyte and non-T-lymphocyte cytotoxic responses correlate with recovery from cytomegalovirus infection in bone-marrow-transplant recipients. *N. Engl. J. Med.* **307**:7-13.
- Rapp, M., M. Messerle, P. Lucin, and U. H. Koszinowski.** 1993. In vivo protection studies with MCMV glycoproteins gB and gH expressed by vaccinia virus. In: *Multidisciplinary Approach in Understanding Cytomegalovirus Disease*, pp 327-332. S. Michelson und S.A. Plotkin (Hrsg), Amsterdam, Excerpta Medica.
- Reddehase, M. J., G. M. Keil, and U. H. Koszinowski.** 1984. The cytolytic T lymphocyte response to the murine cytomegalovirus. II. Detection of virus replication stage- specific antigens by separate populations of in vivo active cytolytic T lymphocyte precursors. *Eur. J. Immunol.* **14**:56-61.
- Reddehase, M. J., and U. H. Koszinowski.** 1984. Significance of herpesvirus immediate early gene expression in cellular immunity to cytomegalovirus infection. *Nature* **312**: 369-371.
- Reddehase, M. J., W. Mutter, K. Münch, H. J. Buhning, and U. H. Koszinowski.** 1987. CD8-positive T lymphocytes specific for murine cytomegalovirus immediate-early antigens mediate protective immunity. *J. Virol.* **61**:3102-3108.
- Reddehase, M. J., M. Balthesen, M. Rapp, S. Jonjic, I. Pavic, and U. H. Koszinowski.** 1994. The conditions of primary infection define the load of latent viral genome in organs and the risk od recurrent cytomegalovirus disease. *J. Exp. Med.* **179**: 185-193.

- Reed, E. C., R. A. Bowden, P. S. Dandliker, E. Lilleby, and J. D. Meyers.** 1988. Treatment of cytomegalovirus pneumonia with ganciclovir and intravenous cytomegalovirus immunoglobulin in patients with bone marrow transplants. *Ann. Intern. Med.* **109**: 783-788.
- Reiner, S. L. and R. A. Seder.** 1995. T helper cell differentiation in immune response. *Curr. Opin. Immunol.* **7**:360-366.
- Reusser, P., S. R. Riddell, J. D. Meyers, and P. D. Greenberg.** 1991. Cytotoxic T-lymphocyte response to cytomegalovirus after human allogeneic bone marrow transplantation: pattern of recovery and correlation with cytomegalovirus infection and disease. *Blood* **78**:1373-1380.
- Reusser, P., G. Cathomas, R. Attenhofer, M. Tamm, and G. Thiel.** 1999. Cytomegalovirus (CMV)-specific T cell immunity after renal transplantation mediates protection from CMV disease by limiting the systemic virus load. *J. Infect. Dis.* **180**:247-253.
- Riddell, S. R., M. Rabin, A. P. Geballe, W. J. Britt, and P. D. Greenberg.** 1991. Class I MHC-restricted cytotoxic T lymphocyte recognition of cells infected with human cytomegalovirus does not require endogenous viral gene expression. *J. Immunol.* **146**:2795-2804.
- Riddell, S. R., K. S. Watanabe, J. M. Goodrich, C. R. Li, M. E. Agha, and P. D. Greenberg.** 1992. Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science* **257**:238-241
- Ridell, S. R., M. J. Gilbert, and P. D. Greenberg.** 1993. CD8+ cytotoxic T Cell therapy of cytomegalovirus and HIV infection. *Curr. Opin. Immunol.* **5**: 484-491.
- Roby, C. and W. Gibson.** 1986. Characterization of phosphoproteins and protein kinase activity of virions, noninfectious enveloped particles, and dense bodies of human cytomegalovirus. *J. Virol.* **59**: 714-727.
- Rodems, S. M., and D. H. Spector.** 1998. Extracellular signal-regulated kinase activity is sustained early during human cytomegalovirus infection. *J. Virol.* **72**: 9173-9180.
- Roizman, B., and A. M. Sears.** 1993. Herpes simplex viruses and their replication. The human herpesviruses. Pp 11-68. Edited by B. Roizman, R. Whitley, and C. Lopez. New York. Raven Press.
- Romagnani, S.** 1992. Induction of Th1 and Th2 responses: a key role for the natural immune response?. *Immunol. Today* **13**: 379-381.
- Rowe, W. P., J. W. Hartley, S. Waterman, H. C. Turner, and R. J. Huebner.** 1956. Cytopathogenic agent resembling human salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **92**: 418-424.
- Rubin, R. H., N. E. Tolkoff-Rubin, D. Oliver, T. R. Rota, J. Hamilton, R. F. Betts, R. F. Pass, W. Hillis, W. Szmunes, and M. L. Farell.** 1985. Multicenter seroepidemiologic study of the impact of cytomegalovirus infection on renal transplantation. *Transplantation* **40**: 243-249.
- Rubin, R. H.** 1990. Impact of cytomegalovirus infection on organ transplant recipients. *Rev. Infect. Dis.* **12 Suppl 7**:S754-S766.

- Rüger, B., S. Klages, B. Walla, J. Albrecht, B. Fleckenstein, P. Tomlinson, and B. Barrell. 1987. Primary structure and transcription of the genes coding for the two virion phosphoproteins pp65 and pp71 of human cytomegalovirus. *J. Virol.* **61**: 446-453.
- Saiki, R. K., P. S. Walsh, C. H. Levenson, and H. A. Erlich. 1989. Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 6230-6234.
- Salter, R. D., D. N. Howell, and P. Cresswell. 1985. Genes regulating HLA class I antigen expression in T-B lymphoblast hybrids. *Immunogenetics* **21**: 235-246.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning – a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Press, USA.
- Sanchez, V., K. D. Greis, E. Sztul, and W. J. Britt. 2000. Accumulation of virion tegument and envelope proteins in a stable cytoplasmic compartment during human cytomegalovirus replication: characterization of a potential site of virus assembly. *J. Virol.* **74**: 975-986.
- Sarov, I. and I. Abady. 1975. The morphogenesis of human cytomegalovirus. Isolation and polypeptide characterization of cytomegalovirions and dense bodies. *Virology* **66**:464-473.
- Sauer, B. 1994. Site-specific recombination: developments and applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* **5**: 521-527.
- Schoppel, K., C. Schmidt, H. Einsele, H. Hebart, and M. Mach. 1998. Kinetics of the antibody response against human cytomegalovirus specific proteins in allogeneic bone marrow transplant recipients. *J. Inf. Dis.* **178**: 1233-1243.
- Schmolke, S., P. Drescher, G. Jahn, and B. Plachter. 1995 a. Nuclear targeting of the tegument protein pp65 (UL83) of human cytomegalovirus: an unusual bipartite nuclear localization signal functions together with other portions of the protein to mediate its efficient nuclear transport. *J. Virol.* **69**: 1071-1078.
- Schmolke, S., H. F. Kern, P. Drescher, G. Jahn, and B. Plachter. 1995 b. The dominant phosphoprotein pp65 (UL83) of human cytomegalovirus is dispensable for growth in cell culture. *J. Virol.* **69**: 5959-5968.
- Seder, R. A. and W. E. Paul. 1994. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu. Rev. Immunol.* **12**:635-673.
- Sedlik, C., A. Dridi, E. Deriaud, M. F. Saron, P. Rueda, J. Sarraseca, J. I. Casal, and C. Leclerc. 1999. Intranasal delivery of recombinant parvovirus-like particles elicits cytotoxic T-cell and neutralizing antibody responses. *J. Virol.* **73**:2739-2744.
- Shen, Y., H. Zhu, and T. Shen. 1997. Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins are mutagenic and mediate "hit-and-run" oncogenic transformation in cooperation with the adenovirus E1A proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:3341-3345 .
- Sherman, L. A., S. V. Hesse, M. J. Irwin, D. La Face, and P. Peterson. 1992. Selecting T cell receptors with high affinity for self-MHC by decreasing the contribution of CD8. *Science* **258**:815-818.
- Shimomura, O., F. H. Johnson, and Y. Saiga. 1962. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, *Aequorea*. *J. Cell. Comp. Physiol.* **59**: 223-227.

- Slobedman, B., and E. S. Mocarski.** 1999. Quantitative analysis of latent human cytomegalovirus. *J. Virol.* **73**: 4806-4812.
- Smith, K. A.** 1988. Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science* **240**: 1169-1176.
- Smith, J. D., and E. de Harven.** 1973. Herpes simplex virus and human cytomegalovirus replication in WI-38 cells. I. Sequence of viral replication. *J. Virol.* **12**: 919-930.
- Smith, I. L., J. M. Cherrington, R. E. Jiles, M. D. Fuller, W. R. Freeman, and S. A. Spector.** 1997. High-level resistance of cytomegalovirus to ganciclovir is associated with alterations in both the UL97 and DNA polymerase genes. *J. Infect. Dis* **176**: 69-77.
- Smyth, R. L., J. P. Scott, L. K. Borysiewicz, L. D. Sharples, S. Stewart, T. G. Wreghitt, J. J. Gray, T. W. Higenbottam, and J. Wallwork.** 1991. Cytomegalovirus infection in heart-lung transplant recipients: risk factors, clinical associations, and response to treatment. *J. Infect. Dis.* **164**:1045-1050.
- Snydman, D. R., B. G. Werner, H. C. Meissner, S. Cheeseman, J. Schwab, F. Bednarek, J. L. Kennedy, M. Herschel, A. Magno, and M. J. Levin.** 1995. Use of cytomegalovirus immunoglobulin in multiply transfused premature neonates. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **14**: 34-40.
- Snydman, D. R., B. G. Werner, B. Heinze-Lacey, V. P. Berardi, N. L. Tilney, R. L. Kirkman, E. L. Milford, S. I. Chio, H. J. Bush, A. S. Levey.** 1987. Use of cytomegalovirus immunoglobulin to prevent cytomegalovirus disease in renal transplant recipients. *N. Engl. J. Med.* **317**: 1049-1054.
- Southern, E. M.** 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.
- Spaete, R. R., and E. S. Mocarski.** 1987. Insertion and deletion mutagenesis of the human cytomegalovirus genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 7213-7217.
- Spaete, R. R., R. C. Gehrz, and M. P. Landini.** 1994. Human cytomegalovirus structural proteins. *J. gen. Virol.* **75**: 3287-3298.
- Speckner, A., Glykofrydes, D., M. Ohlin, and M. Mach.** 1999. Antigenic domain 1 of human cytomegalovirus glycoprotein B induces a multitude of different antibodies which, when combined, results in incomplete virus neutralization. *J. Gen. Virol.* **80**: 2183-2191.
- Speidel, K., W. Osen, S. Faath, I. Hilgert, R. Obst, J. Braspenning, F. Momburg, G. J. Hammerling, and H. G. Rammensee.** 1997. Priming of cytotoxic T lymphocytes by five heat-aggregated antigens in vivo: conditions, efficiency, and relation to antibody responses. *Eur. J. Immunol.* **27**:2391-2399.
- Stagno, S., D. W. Reynolds, E. S. Huang, S. D. Thames, R. J. Smith, and C. A. Alford.** 1977. Congenital cytomegalovirus infection. *N. Engl. J. Med.* **296**: 1254-1258.
- Stagno, S., D. W. Reynolds, R. F. Pass, and C. A. Alford.** 1980. Breast milk and the risk of cytomegalovirus infection. *N. Engl. J. Med.* **302**: 1073-1076.
- Stagno, S., R. F. Pass, M. E. Dworski, R. E. Henderson, E. G. Moore, P. Walton, and C. A. Alford.** 1982. Congenital cytomegalovirus infection: The relative importance of primary and recurrent maternal infection. *N. Engl. J. Med.* **306**: 945-949.

- Stagno, S., R. F. Pass, G. Cloud, W. J. Britt, R. E. Henderson, P. D. Walton, D. A. Veren, F. Page, and C. A. Alford.** 1986. Primary cytomegalovirus infection in pregnancy. Incidence, transmission to fetus, and clinical outcome. *JAMA* **256**: 1904-1908.
- Starr, S. E., J. P. Glazer, H. M. Friedman, J. D. Farquhar, and S. A. Plotkin.** 1981. Specific cellular and humoral immunity after immunization with live Towne strain cytomegalovirus vaccine. *J. Infect. Dis.* **143**:585-589.
- Stinski, M. F.** 1976. Human cytomegalovirus: glycoproteins associated with virions and dense bodies. *J. Virol.* **19**:594-609.
- Stinski, M. F., E. S. Mocarski, D. R. Thomsen, and M. L. Urbanowski.** 1979. Membrane glycoproteins and antigens induced by human cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.* **43**:119-129.
- Stinski, M. F., D. R. Thomsen, R. M. Stenberg, and L. C. Goldstein.** 1983. Organization and expression of the immediate early genes of human cytomegalovirus. *J. Virol.* **46**: 1-14.
- Stocchi R., R. Szydlo, C. Craddock, E. Kanfer, J. F. Apperley, J. M. Goldman, and K. N. Ward.** 1999. A comparison of prophylactic versus pre-emptive ganciclovir to prevent cytomegalovirus disease after T-cell depleted volunteer unrelated donor bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **23**:705-9.
- Talbot, P., and J. D. Almeida.** 1977. Human cytomegalovirus: purification of enveloped virions and dense bodies. *J. Gen. Virol.* **36**: 345-349.
- Tanaka, A., H. Moriuchi, K. Hirota, and Y. Numazaki.** 1991. Neutralizing antibody response to cytomegalovirus in seropositive pregnant women. *J. Med. Virol.* **34**: 85-88.
- Tomazin, R. J. Boname, N. R. Hedge, D. M. Lewinson, Y. Altschuler, T. R. Jones, P. Cresswell, J. A. Nelson, S. R. Riddell, and D. C. Johnson.** 1999. Cytomegalovirus US2 destroys two components of the MHC class II pathway, preventing recognition by CD4+ T cells. *Nat. Med.* **5**(9): 1039-43.
- Topilko, A. and S. Michelson.** 1994. Hyperimmediate entry of human cytomegalovirus virions and Dense Bodies into human fibroblasts. *Res. Virol.* **145**:75-82.
- Toro, A.I., and J. Ossa.** 1996 PCR activity of CMV in healthy CMV-seropositive individuals: does latency need redefinition? *Res. Virol.* **147**: 233-238.
- Torok-Storb, B., M. Boeckh, C. Hoy, W. Leisenring, D. Myerson, and T. Gooley.** 1997. Association of specific cytomegalovirus genotypes with death from myelosuppression after marrow transplantation. *Blood* **90**: 2097-2102.
- Urban, M., M. Klein, W. J. Britt, E. Hasfurth, and M. Mach.** 1992. Glycoprotein H of human cytomegalovirus is a major antigen for the neutralizing humoral immune response. *J. Gen. Virol.* **77**: 1537-1547.
- Urban, M., T. Winkler, M. P. Landini, W. Britt, and M. Mach.** 1994. Epitope-specific distribution of IgG subclasses against antigenic domains on glycoproteins of human cytomegalovirus. *J. Infect. Dis.* **169**: 83-90.
- Urban, M., M. Klein, W. J. Britt, E. Hassfurth, and M. Mach.** 1996. Glycoprotein H of human cytomegalovirus is a major antigen for the neutralizing humoral immune response. *J. Gen. Virol.* **77**:1537-1547.

- vanZanten, J., T. Lazzarotto, B. Campisi.** 1995. Comparative immunoblot analysis with ten different, partially overlapping recombinant fusion proteins derived from five different cytomegalovirus proteins. *Micobiologica* **18**: 223-228.
- Vieira, J., H. E. Farell, W. D. Rawlinson, and E. S. Mocarski.** 1994. Genes in the HindIII J fragment of the murine cytomegalovirus genome are dispensable for growth in cultured cells: insertion mutagenesis with a lacZ/gpt cassette. *J. Virol.* **68**: 4837-4846.
- Vitiello, A., D. Marchesini, J. Furze, L. A. Sherman, and R. W. Chesnut.** 1991. Analysis of the HLA-restricted influenza-specific cytotoxic T lymphocyte response in transgenic mice carrying a chimeric human-mouse class I major histocompatibility complex. *J. Exp. Med.* **173**:1007-1015.
- Vornhagen, R., B. Plachter, W. Hinderer, T. H. The, J. Van-Zanten, L. Matter, C. A. Schmidt, H. H. Sonneborn, and G. Jahn.** 1994. Early serodiagnosis of acute human cytomegalovirus infection by enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant antigens. *J. Clin. Microbiol.* **32**:981-986.
- Vornhagen, R., W. Hinderer, H. H. Sonneborn, G. Bein, L. Matter, T. H. The, G. Jahn, and B. Plachter.** 1996. Immunoglobulin A-specific serodiagnosis of acute human cytomegalovirus infection by using recombinant viral antigens. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 1020-1023.
- Walter, E. A., P. D. Greenberg, M. J. Gilbert, R. J. Finch, K. S. Watanabe, E. D. Thomas, and S. R. Riddell.** 1995. Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N. Engl. J. Med.* **333**:1038-1044.
- Wathen, M. W., and M.F. Stinski.** 1982. Temporal patterns of human cytomegalovirus transcription: mapping the viral RNAs synthesized at immediate-early, early and late times after infection. *J. Virol.* **41**: 462-477.
- Watson B, and E. Rothstein.** 1999. Varicella vaccine: progress 4 years after licensure. *Pediatr Ann.* **28**(8):516-29.
- Webster, A., C. A. Lee, D. G. Cook, J. E. Grundy, V. C. Emery, P. B. Kernoff, and P. D. Griffiths.** 1989. Cytomegalovirus infection and progression towards AIDS in haemophiliacs with human immunodeficiency virus infection. *Lancet* **2**: 63-66.
- Weekes, M.P., M.R. Wills, K. Mynard, A.J. Carmichael, and P.G. Sissons.** 1999. The memory cytotoxic T-Lymphocyte response to human cytomegalovirus infection contains individual peptide-specific CTL clones that have undergone extensive expansion in vivo. *J. Virol.* **73**: 2099-2108.
- Werner, B. G., D. R. Snyderman, R. Freeman, R. Rohrer, N. L. Tilney, and R. L. Kirkman.** 1993. Cytomegalovirus immune globulin for the prevention of primary CMV disease in renal transplant patients: analysis of usage under treatment IND status. The Treatment IND Study Group. *Transplant. Proc.* **25**:1441-1443.
- Wills, M. R., A. J. Carmichael, K. Mynard, X. Jin, M. P. Weekes, B. Plachter, and J. G. Sissons.** 1996. The human cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to cytomegalovirus is dominated by structural protein pp65: frequency, specificity, and T-cell receptor usage of pp65- specific CTL. *J. Virol.* **70**:7569-7579.
- Winkler, M. and T. Stamminger.** 1996. A specific subform of the human cytomegalovirus transactivator protein pUL69 is contained within the tegument of virus particles. *J. Virol.* **70**: 8984-8987.

- 
- Wolf, D. G., A. Honigman, J. Lazarovits, E. Tavor, and A. Panet.** 1998. Characterization of the human cytomegalovirus UL97 gene product as a virion-associated protein kinase. *Arch. Virol.* **143**:1223-1232.
- Wolff, D., G. Jahn, and B. Plachter.** 1993. Generation and effective enrichment of selectable human cytomegalovirus mutants using site-directed insertion of the neo-gene. *Gene* **130**: 167-173.
- Yeager, A. S., F. C. Grumet, E. B. Hafleigh, A. M. Arvin, J. S. Bradley, and C. G. Prober.** 1981. Prevention of transfusion-acquired cytomegalovirus infections in newborn infants. *J. Pediatr.* **98**:281-287.
- Yamamoto, T., S. Suzuki, K. Radsak, and K. Hirai.** 1998. The UL112/113 gene products of human cytomegalovirus which colocalize with viral DANN in infected cell nuclei are related to efficient viral DNA replication. *Virus Res.* **56**: 107-111.
- Yamauchi, M., Y. Nishiyama, H. Fujioaka, S. Isomura, and K. Maeno.** 1985. In the intracellular transport and the nuclear association of human cytomegalovirus structural proteins. *J. Gen. Virol.* **65**: 829-841.
- Zawydiwski, R., and R. Duncan.** 1978. Spontaneous <sup>51</sup>Cr release by isolated rat hepatocytes: an indicator of membrane damage. *In Vitro* **14**:707-714.
- Zhou L., T. C. Harder, U. Ullmann, and P. Rautenberg.** 1999. Rapid detection by reverse hybridization of mutations in the UL97 gene of human cytomegalovirus conferring resistance to ganciclovir. *J. Clin. Virol.* **13**: 53-59.



## 7. Veröffentlichungen, Posterpräsentationen und Vorträge

### Veröffentlichungen

Pepperl, S., Benninger-Doering, G., Modrow, S., Wolf, H., and Jilg, W. 1998. Immediate-early transactivator Rta of Epstein-Barr virus (EBV) shows multiple epitopes recognized by EBV-specific cytotoxic T lymphocytes. *J. Virol.* 72: 8644-8649.

Benninger-Döring, G., Pepperl, S., Deml, L., Modrow, S., Wolf, H., and Jilg, W. 1999. Frequency of CD8+ T lymphocytes for lytic and latent antigens of Epstein-Barr virus (EBV) in healthy virus carriers. *Virology* 264: 289-297.

Pepperl, S., Münster, J., Mach, M., Harris, J.R., and Plachter, B. 2000. Dense Bodies of human cytomegalovirus induce both humoral and cellular immune responses in the absence of viral gene expression. *J. Virol.* 74: Im Druck.

### Posterpräsentationen

Benninger-Döring, G., Pepperl, S., Bogedain, C., Meckl, M., Wolf, H., Modrow, S., and Jilg, W. (Dezember 1996). International EBV-Workshop, Hong-Kong.

Pepperl, S., Benninger-Döring, G., Bogedain, C., Wolf, H., Modrow, S., and Jilg. (März 1997). Die immediate-early transaktivatoren Zta (BZLF1) und Rta (BRLF1) des Epstein-Barr Virus werden von spezifischen zytotoxischen T-Zellen erkannt. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Hamburg.

Pepperl, S., Benninger-Döring, G., Bogedain, C., Wolf, H., Modrow, S., and Jilg. (Juni 1997). EBV-specific cytotoxic T-cells (CTL) recognize the immediate-early transactivators Zta (BZLF1) and Rta (BRLF1) of EBV. 13th European Immunology Meeting, Amsterdam, Niederlande.

Pepperl, S., und Plachter, B. (März 1998). Rekombinante Dense Bodies des Humanen Cytomegalovirus zur Entwicklung einer neuartigen Vakzine. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Regensburg.

Pepperl, S., und Plachter, B. (April 1999). HCMV defective particles as a novel antigen delivery system. Keystone Symposia on Molecular Approaches to Human Viral Vaccines. Snowbird, Utah, USA.

#### Vorträge

Pepperl, S., Benninger-Döring, G., Bogedain, C., Wolf, H., Modrow, S., and Jilg. (März 1997). EBV-specific cytotoxic T-cells (CTL) recognize the immediate-early transactivators Zta (BZLF1) and Rta (BRLF1) of EBV. 13. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Ostseebad Binz.

Pepperl, S., und Plachter, B. (Juni 1998). Herstellung von Rekombinanten des HCMV. 9. Berichtskolloquium des Forschungsverbundes "Komplikationen des Organtransplantation durch Herpesviren", Erlangen.

Pepperl, S., und Plachter, B. (Dezember 1998). Immunogenität von Dense Bodies des HCMV. 10. Berichtskolloquium des Forschungsverbundes "Komplikationen des Organtransplantation durch Herpesviren", Erlangen.

Pepperl, S., und Plachter, B. (März 1999). Defekte Partikel des HCMV als neuartiges Antigen-Transportsystem. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Bremen.

Pepperl, S., Muenster, J., and Plachter, B. (Juli 1999). Efficient induction of cellular and humoral immune responses after immunization with HCMV Dense Bodies. 24th International Herpesvirus Workshop, Boston, MA, USA.