

# **Einfluss subviraler Partikel des humanen Cytomegalovirus auf die Induktion der antiviralen Immunantwort**

## **Dissertation**

zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Caroline Sauer**

geboren am 28. Februar 1986  
in Menden (Sauerland)

Mainz 2013

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 28.01.2014

## Zusammenfassung

Das humane Cytomegalovirus (HCMV) ist ein opportunistischer Krankheitserreger, der insbesondere bei Patienten mit unreifem oder geschwächtem Immunsystem schwere, teilweise lebensbedrohliche Erkrankungen verursacht. Aufgrund der klinischen Relevanz wird die Entwicklung einer Impfung gegen HCMV mit großem Nachdruck verfolgt. Subvirale Partikel des HCMV, sogenannte *Dense Bodies* (DB), stellen eine vielversprechende Impfstoff-Grundlage dar. Die innere Struktur der Partikel besteht aus viralen Proteinen, die als dominante Antigene der zellulären Immunantwort gegen HCMV identifiziert wurden. Die äußere Hülle der Partikel entspricht der Virushülle, sie enthält die viralen Oberflächenproteine als Zielantigene der neutralisierenden Antikörper (NTAk)-Antwort in ihrer natürlichen Konformation. Die für ein Totantigen außergewöhnlich hohe Immunogenität der Partikel wurde bereits in Vorarbeiten dokumentiert. Ein Ziel dieser Arbeit war es, den molekularen Hintergrund für die herausragenden, immunogenen Eigenschaften von DB aufzuklären. Im ersten Teil der Arbeit wurde daher die Hypothese geprüft, dass DB geeignet sind, die Ausreifung und Aktivierung von dendritischen Zellen (DC) zu vermitteln und damit deren Fähigkeit zur Antigenpräsentation zu stimulieren. Derart aktivierten DC kommt eine wichtige Rolle beim Priming der T-lymphozytären Immunantwort zu. In der Tat konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von unreifen dendritischen Zellen (iDC) mit DB zu verstärkter Expression von solchen Molekülen auf der DC-Oberfläche führt, die mit Ausreifung der Zellen verknüpft sind. Der Nachweis der verstärkten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine belegte die Aktivierung der Zellen im Sinne einer entzündlichen Reaktion. Die erfolgreiche Stimulation von CD4 und CD8 T-Lymphozyten durch DB-behandelte DC belegte schließlich die funktionelle Relevanz der Ergebnisse. Zusammengefasst konnten in diesem Abschnitt der Arbeit die molekularen Grundlagen der adjuvanten Wirkung von DB aufgeklärt werden.

In einem zweiten Abschnitt wurde die NTAk-Antwort nach DB-Immunisierung näher untersucht. Der humoralen Immunantwort kommt eine entscheidende Bedeutung bei der Prävention der HCMV-Übertragung zu. Hier galt es zu prüfen, welchen Einfluss stammspezifische Unterschiede in der Expression viraler Oberflächenproteine auf die Induktion der NTAk-Antwort nach DB-Immunisierung nehmen. Im Fokus stand dabei die variable Expression des pentameren Proteinkomplexes aus den viralen Proteinen gH/gL/pUL128-UL131A. Dieser Komplex wird nur von klinischen HCMV-Stämmen (HCMV<sub>Klin</sub>) exprimiert und ist für deren breiten Zelltropismus verantwortlich. Der pentamere Komplex fehlte in allen bisherigen Analysen der DB-Immunogenität, die auf der Grundlage von Laborstämmen des HCMV (HCMV<sub>Lab</sub>) durchgeführt worden waren. Ein erster Versuchsansatz zeigte, dass die NTAk-Antwort, die durch DB von HCMV<sub>Lab</sub> (DB<sub>Lab</sub>) induziert wird, auch gegen die Infektion mit HCMV<sub>Klin</sub> einen gewissen Schutz vermittelt. Dies war ein überraschender Befund, da Antikörpern gegen den pentameren Komplex eine entscheidende Rolle bei der Neutralisation von HCMV<sub>Klin</sub> zugeschrieben wurde. Die Ergebnisse zeigten jedoch, dass Antikörper gegen andere Zielstrukturen zur Neutralisation von HCMV<sub>Klin</sub> beitragen. Hieraus resultierte unmittelbar die Frage, inwieweit eine Aufnahme des pentameren Komplexes in einen DB-basierten Impfstoff überhaupt notwendig war. Um dies zu beantworten war es notwendig, DB herzustellen, die den pentameren Komplex enthielten. Hierzu wurde ein HCMV<sub>Lab</sub> durch Mutagenese des 235 kbp Genoms so modifiziert, dass von dem resultierenden Stamm der pentamere Komplex exprimiert wurde. In gereinigten DB dieses Stammes konnten die Komponenten des pentameren Komplexes nachgewiesen werden. Die Seren von Tieren, die mit DB dieses neuen Stammes immunisiert wurden, zeigten in der Tat eine deutlich gesteigerte Kapazität zur Neutralisation von HCMV<sub>Klin</sub> auf verschiedenen Zielzellen. Diese Ergebnisse unterstreichen schlussendlich, dass die Expression des pentameren Komplexes einen Vorteil bei der Induktion der antiviralen NTAk-Antwort erbringt. Zusammengefasst liefern die Erkenntnisse aus dieser Arbeit einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der immunogenen Wirkung von DB. Auf dieser Grundlage war es nunmehr möglich, ein Projekt zur Austestung der DB-Vakzine in einer ersten klinischen Studie zu initiieren.

## Summary

The human cytomegalovirus (HCMV) is an opportunistic agent that may cause serious and life-threatening diseases in individuals with a premature or a compromised immune system. Because of its clinical relevance, the development of a vaccine is a major goal in biomedical science. Subviral dense bodies (DB) represent a promising basis for the HCMV vaccine development. The internal structure of these particles consists of dominant target antigens of the T lymphocyte responses. The envelope of DB resembles that of mature virions and contains the viral surface proteins, the targets of the neutralizing antibody (ntabs) response, in their natural conformation. The extraordinary immunogenicity of DB had been documented before. One goal of this work was to elucidate the molecular background of the extraordinary immunogenicity of DB. In a first part, the hypothesis was tested that DB mediate maturation and activation of dendritic cells (DC), thereby enhancing their capacity for antigen presentation. Such cells play an important role in the priming of T-lymphocyte responses. DB loading of DC resulted in up-regulation of co-stimulatory molecules that are related to the maturation of these cells. The release of pro-inflammatory cytokines provided the evidence for DC activation, representing an inflammatory response. DB loaded DC were further suitable to stimulate CD4 and CD8 T cell responses. These results showed that DB indeed impart an adjuvant effect which is the basis for their immunogenic properties.

The ntabs response to DB immunization was analyzed in a second part of this work. Antibodies are key effectors for the prevention of HCMV transmission. One task of this work was to test, if strain specific differences in the expression of viral surface proteins had an impact on the induction of ntabs following DB immunization. The major parameter to be tested here was whether the variable expression of a pentameric protein complex, consisting of gH/gL/pUL128-UL131A influenced the ntabs response. This complex is an integral part of the surface of clinical HCMV isolates (HCMV<sub>Clin</sub>), only, and determines their broad host cell range; laboratory strains (HCMV<sub>Lab</sub>) are devoid of this complex and thus the response towards it had not been addressed in past studies on DB immunogenicity, based on DB<sub>Lab</sub>. A first set of experiments showed that DB<sub>Lab</sub> immunization induced an ntabs response that are also, to some extent, protective against HCMV<sub>Clin</sub> infection. This was a surprising finding, as, according to current literature, one would have expected antibodies specific for the pentameric complex to be essential for HCMV<sub>Clin</sub> neutralization. In contrast to that, this work showed that the response to other surface protein complexes may suffice to confer some level of protection. This raised the question about the requirement to include the pentameric complex in a DB-based vaccine. In order to investigate, if DB containing the pentameric complex were more effective in inducing ntabs, a laboratory strain was modified by mutating its 235 kpb genome in a way to allow expression of the pentameric complex. The components of the pentameric complex could be detected in DB of this strain, providing the proof that DB do also package the pentameric complex. The sera of animals that were immunized with these DB indeed showed increased neutralization capacity on different cell types. These results underscore that the expression of the pentameric complex on DB confers an advantage over DB<sub>Lab</sub> in inducing ntabs. Taken together the findings of this work provide a valuable contribution in our understanding of the immunogenicity of DB. This work has provided the basis for a now ongoing project to test the DB-vaccine in first clinical trials.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>VI</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Das Humane Cytomegalovirus</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Zelltropismus des HCMV</b> .....	<b>2</b>
<b>1.3 Infektionsverlauf</b> .....	<b>3</b>
<b>1.4 Klinische Relevanz</b> .....	<b>4</b>
<b>1.5 Immunantwort</b> .....	<b>6</b>
1.5.1 DC als Vermittler zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort .....	6
1.5.2 Zelluläre Immunantwort.....	7
1.5.3 Humorale Immunantwort .....	7
<b>1.6 Impfstoffentwicklung</b> .....	<b>8</b>
1.6.1 Klinische Relevanz einer HCMV-Vakzine .....	8
1.6.2 Impfstoffkandidaten .....	9
1.6.2.1 Lebend attenuierte Viren .....	9
1.6.2.2 Totantigene und Vektorexpressionssysteme .....	10
<b>1.7 Zielsetzungen</b> .....	<b>12</b>
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>13</b>
<b>2.1 Allgemeine Laborgeräte</b> .....	<b>13</b>
<b>2.2 Chemikalien</b> .....	<b>15</b>
<b>2.3 Kultivierung von Bakterienzellen</b> .....	<b>15</b>
2.3.1 Bakterienstämme.....	15
2.3.2 Medien und Medienzusätze.....	15
2.3.2.1 Medien.....	15
2.3.2.2 Medienzusätze .....	16
2.3.3 Kultivierung und Kryokonservierung .....	17
2.3.3.1 Flüssigkulturen .....	17
2.3.3.2 Kultivierung auf Agarplatten.....	17
2.3.3.3 Kryokonservierung (Glycerinkulturen) .....	17
2.3.4 Transformation von <i>E. coli</i> .....	17

2.3.4.1	Herstellung elektrokompenter <i>E. coli</i> EL250 bzw. SW102 .....	17
2.3.4.2	Herstellung elektrokompenter SW102 Bakterien für die BAC-Mutagenese.....	18
2.3.4.3	Elektroporation kompetenter <i>E. coli</i> EL250.....	18
2.3.4.4	Elektroporation kompetenter <i>E. coli</i> SW102.....	18
<b>2.4</b>	<b>Kultivierung von Säugerzellen .....</b>	<b>19</b>
2.4.1	Puffer und Lösungen .....	19
2.4.2	Medien und Medienzusätze.....	19
2.4.3	Antibiotika.....	20
2.4.4	Zytokine .....	21
2.4.5	Bestimmung der Zellzahl und der Zellvitalität.....	21
2.4.6	Verwendete Zellen und Zelllinien.....	22
2.4.7	Separation von humanen PBMC .....	22
2.4.8	Generierung unreifer, humaner DC.....	23
2.4.9	Ausreifung humaner iDC .....	23
2.4.10	Isolation humaner T-Lymphozyten aus PBMC.....	23
2.4.11	<i>In vitro</i> Restimulation von humanen T-Lymphozyten .....	23
2.4.12	Kryokonservierung und Reaktivierung von Zellen.....	24
<b>2.5</b>	<b>Kultivierung von Viren .....</b>	<b>24</b>
2.5.1	Virusstämme.....	24
2.5.2	Virus-Rekonstitution aus BACmiden.....	25
2.5.3	Herstellung virushaltiger Zellkulturüberstände.....	26
2.5.4	Bestimmung des Virustiters .....	26
2.5.5	Infektion eukaryonter Zellen mit HCMV.....	27
2.5.6	Aufreinigung viraler Partikel aus Zellkulturüberstand.....	27
2.5.7	Behandlung von Zellen mit aufgereinigten <i>Dense Bodies</i> .....	28
<b>2.6</b>	<b>Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>29</b>
2.6.1	Verwendete Plasmide.....	29
2.6.2	Verwendete BACmide .....	29
2.6.3	Isolierung von DNA .....	30
2.6.3.1	Isolierung von BACmid- / Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i> .....	30
2.6.3.2	Isolierung viraler DNA aus infizierten Zellen bzw. aus Zellkulturüberstand .....	31
2.6.4	Fällung von DNA mit Isopropanol.....	31

2.6.5	DNA-Konzentrationsbestimmung.....	31
2.6.6	Agarose-Gelelektrophorese.....	31
2.6.7	DNA-Extraktion aus Agarosegelen.....	32
2.6.8	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	32
2.6.8.1	Verwendete Oligonukleotide (Primer).....	32
2.6.8.2	Durchführung einer PCR.....	33
2.6.8.3	Kolonie-PCR.....	34
2.6.8.4	Aufreinigung von PCR-Produkten.....	34
2.6.8.5	Template-Eliminierung.....	34
2.6.9	Quantitative Real-Time PCR (Taqman™ PCR).....	34
2.6.10	Genetische Manipulation des HCMV-Genoms durch BAC-Mutagenese.....	36
2.6.10.1	Herstellung von BACmiden über positive Selektion mit Ampicillin.....	36
2.6.10.2	Herstellung von BACmiden über positive und negative Selektion mit der Galaktokinase.....	37
2.6.11	BAC-DNA Restriktionsanalyse.....	39
2.6.12	Sequenzierung.....	39
<b>2.7</b>	<b>Biochemische Methoden .....</b>	<b>39</b>
2.7.1	Verwendete Antikörper.....	39
2.7.1.1	Antikörper für die Durchflusszytometrie.....	40
2.7.1.2	Antikörper für die Immunfluoreszenz.....	40
2.7.1.3	Antikörper für den Western-Blot.....	41
2.7.1.4	Antikörper für die Alkalische Phosphatase-anti-alkalische Phosphatase-Färbung ..	42
2.7.2	Aufreinigung von Antikörpern.....	42
2.7.3	Durchflusszytometrie.....	43
2.7.4	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	43
2.7.5	Zytospin.....	44
2.7.6	Gelelektrophorese.....	44
2.7.6.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	44
2.7.6.2	Bis-Tris-PAGE.....	44
2.7.7	Silberfärbung.....	45
2.7.8	Western Blot.....	45
2.7.9	Indirekte Immunfluoreszenz.....	46
2.7.10	APAAP-Färbung.....	46

<b>2.8</b>	<b>Immunologische Methoden.....</b>	<b>47</b>
2.8.1	Tierversuche.....	47
2.8.1.1	Versuchstiere.....	47
2.8.1.2	Immunisierung von Kaninchen.....	47
2.8.1.3	Immunisierung von Mäusen.....	47
2.8.2	<i>Enzyme-linked Immuno Spot Assay</i> (ELISpot).....	48
2.8.3	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA).....	49
2.8.4	Neutralisationstest.....	49
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>51</b>
<b>3.1</b>	<b>Einfluss von DB Behandlung auf iDC .....</b>	<b>51</b>
3.1.1	DB-Behandlung führt zur Ausreifung von iDC.....	53
3.1.2	DB-Behandlung führt zur Aktivierung von iDC.....	56
3.1.3	iDC nehmen Antigene aus viralen Partikeln auf und präsentieren diese im Kontext von MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II.....	58
<b>3.2</b>	<b>Neutralisierende Antikörperantwort nach DB Immunisierung.....</b>	<b>61</b>
3.2.1	Immunisierung mit DB eines Laborstammes führt zur Ausbildung einer breiten Antikörperantwort.....	62
3.2.2	Komplementabhängigkeit der neutralisierenden Antikörperantwort.....	66
3.2.3	Analyse der NTAk-Antwort nach Immunisierung mit DB <sub>Klin</sub> .....	67
3.2.3.1	Analyse der DB <sub>Klin</sub> Freisetzung nach Infektion mit RV-TB40/E.....	68
3.2.3.2	Herstellung einer HCMV <sub>Klin</sub> -Mutante zur pp65-Überexpression in infizierten Zellen.....	70
3.2.3.2.1	Insertion einer zusätzlichen pp65-Kopie in das Genom von RV-TB40/E.....	71
3.2.3.2.2	Insertion des pp65-Gens führt zur verstärkten Expression des Proteins.....	72
3.2.3.2.3	Einfluss der pp65-Überexpression auf die Virusreplikation.....	74
3.2.3.2.4	Analyse der Freisetzung von DB durch RV-TB40/Epp65 infizierte Zellen..	76
3.2.3.3	Etablierung eines HCMV <sub>Lab</sub> mit funktionellem pentameren Komplex.....	77
3.2.3.3.1	Reparatur des HCMV <sub>Lab</sub> RV-Towne-BAC.....	78
3.2.3.3.2	RV-Towne <sub>rep</sub> zeigt HCMV <sub>Klin</sub> Zelltropismus.....	80
3.2.3.3.3	Nachweis von UL128 und UL130 in den Partikeln von RV-Towne <sub>rep</sub> .....	83
3.2.3.3.4	Analyse der Freisetzung von DB durch RV-Towne <sub>rep</sub> infizierte Zellen.....	85
3.2.4	Immunisierungen mit DB von RV-Towne <sub>rep</sub> induzieren eine stärkere neutralisierende Antikörperantwort als DB von HCMV <sub>Lab</sub> .....	86



<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>90</b>
<b>4.1</b>	<b>Einfluss von DB Behandlung auf iDC .....</b>	<b>90</b>
4.1.1	Ausreifung und Aktivierung von DC durch DB-Behandlung.....	90
4.1.2	Infektion von DC mit HCMV .....	91
4.1.3	Kreuzpräsentation von antigenen Peptiden nach DB-Behandlung .....	92
4.1.4	T-Zell-Stimulation durch DB behandelte und infizierte DC.....	92
4.1.5	Einfluss der UV-Behandlung auf die Wirksamkeit von DB .....	93
<b>4.2</b>	<b>Neutralisierende Antikörperantwort nach DB-Immunsierung .....</b>	<b>94</b>
4.2.1	DB <sub>Lab</sub> induzieren eine breite NT-Antwort.....	94
4.2.2	Komplementabhängigkeit der HCMV-spezifischen NTak-Antwort.....	95
4.2.3	Bereitstellung von DB <sub>Klin</sub> .....	95
4.2.4	NTak-Antwort nach DB RV-Towne <sub>rep</sub> -Immunsierung .....	98
4.2.5	Pentamerer Komplex und HCMV-Zelltropismus .....	99
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>101</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>120</b>
	<b>Erklärung .....</b>	<b>121</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>122</b>

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
AEC	3-Amino-9-Ethyl-Carbazol
APAAP	Alkalische Phosphatase-anti-alkalische Phosphatase
ARPE-19	<i>adherent retinal pigmented epithelium</i>
ATCC	American Type Culture Collection
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
BDCRB	2-Brom-5,6-Dichlor-1-beta-D-Ribofuranosyl-Benzimidazol
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumine</i> (Rinderserum-Albumin)
ca.	circa
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CPE	<i>cytopathic effect</i> (zytopathischer Effekt)
CTL	Zytotoxische T-Lymphozyten
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DB	<i>Dense bodies</i>
DB <sub>Klin</sub>	<i>Dense Bodies</i> eines kliniknahen HCMV-Isolats
DB <sub>Lab</sub>	<i>Dense Bodies</i> eines HCMV-Laborstammes
DC	<i>dendritic cell</i> (Dendritische Zelle)
DC-SIGN	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
DMEM:F12	Dulbecco`s Modiefied Eagle`s Medium:Ham`s Nutrient Mixture F-12
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DOG	Desoxygalaktose
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	enzyme-linked-immunosorbent assay

ELISpot	<i>enzyme-linked immunosorbent spot assay</i>
F	Farad
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
fwd	<i>forward</i>
g	Gramm
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
gp	Glykoprotein
HCMV	Humanes Cytomegalovirus
HCMV <sub>Klin</sub>	kliniknahes Isolat des humanen Cytomegalovirus (endotheliotrop)
HCMV <sub>Lab</sub>	Laborstamm des humanen Cytomegalovirus
HFF	<i>human foreskin fibroblasts</i> (humane Vorhautfibroblasten)
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HRP	<i>horseradish-peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
HS	Humanserum
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>
i	<i>immature</i> (unreif)
i.p.	Intraperitoneal
IE	<i>immediate early</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
k	Kilo
LB	Luria Bertani
LSM	<i>Lymphocyte Separation Medium</i>
m	milli
M	Molar
MACS	<i>magnetic-activated cell sorting</i>
MCP	<i>major capsid Protein</i>
MEM	<i>Minimal Essential Medium</i>

MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MIEP	<i>major immediate early promotor</i>
min	Minuten
ml	Milliliter
moi	<i>multiplicity of infection</i> (Infektionsdosis)
MVA	<i>Modified Vaccinia Ankara Virus</i>
NIEPs	<i>non-infectious enveloped particles</i>
nm	Nanometer
NT50	Neutralisierender Titer 50
NTAk	neutralisierende Antikörper
OD	Optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
PAGE	Polyacryamid-Gelelektrophorese
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll
PG	Proteoglykane
PGE2	Prostaglandin E2
pH	H <sup>+</sup> -Konzentration einer Lösung
pp	Phosphoprotein
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rev	<i>reverse</i>
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>revolution per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RV	rekombinantes Virus
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SPF	<i>specified-pathogen-free</i>
TB40/E	TB40/E-BAC7
TB40/Epp65	TB40/E-BAC7pp65

TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	<i>tris buffered saline</i> (Tris-gepufferte Kochsalzlösung)
TCR	T-Zell-Rezeptor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TNF	Tumornekrosefaktor
Towne	Towne-BAC
Towne <sub>rep</sub>	Towne-UL130repaired
Tris	Trishydroxymethylethyldiamin
U	<i>Unit</i> (Einheit)
U <sub>L</sub>	<i>unique long</i>
U <sub>S</sub>	<i>unique short</i>
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	<i>weight per volume</i> (Gewicht pro Volumen)
z.B.	zum Beispiel

Die international gültige Terminologie in Englisch wurde beibehalten und zur Kennzeichnung *kursiv* dargestellt.

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Humane Cytomegalovirus

Das humane Cytomegalovirus (HCMV) ist ein Vertreter der Herpesvirus-Familie, zu deren bekanntesten Vertretern die Herpes-Simplex Viren Typ 1 und 2, das Epstein-Barr-Virus und das Varicella-Zoster-Virus gehören. HCMV wird anhand seiner charakteristischen Wirtszellspezifität und seines langsamen Replikationszyklus der Unterfamilie der beta ( $\beta$ )-*Herpesviridae* zugeordnet (Davison, 2010). Die Infektion mit HCMV führt zu einer charakteristischen Vergrößerung der Zelle mit nukleären Einschlusskörpern. Der Nachweis solcher „cytomegalen Zellen“ im histologischen Gewebepräparat prägte ursprünglich den Begriff der Cytomegalie, der die Symptome der kongenitalen HCMV-Erkrankung beschrieb (Ribbert, 1904; Jesionek und Kielomenoglou, 1904). Eine Infektion mit HCMV führt zur Etablierung einer lebenslangen, latenten Infektion, die durch Reaktivierungen unterbrochen werden kann.

Mit einem Genom von etwa 230-240 kb gehört HCMV zu den komplexesten aller humanpathogenen Viren. Die doppelsträngige DNA kodiert für 150-200 *open reading frames* (ORFs) (Chee et al., 1990; Murphy und Shenk, 2008). Durch alternative Transkriptionsstartpunkte und alternatives Spleißen könnte die Kodierungskapazität jedoch weit höher liegen (Stern-Ginossar et al., 2012). Im Viruspartikel wird die lineare DNA von einem ikosaedrischen Kapsid eingeschlossen. Das Kapsid wiederum ist von einer Proteinschicht, dem Tegument, umgeben. Im Tegument stellt das Phosphoprotein 65 (pp65; UL83) mit etwa 15 % der gesamten Proteinmasse des Partikels den Hauptbestandteil dar (Varnum et al., 2004). Umschlossen wird das Tegument von einer Lipiddoppelschicht, in die verschiedene virale Glykoproteine eingelagert sind (Mocarski et al., 2013). Diesen Glykoproteinen werden entscheidende Funktionen beim „*Envelopment*“ sowie bei Adsorption und Penetration von HCMV zugeschrieben.

Mit HCMV infizierte Zellen setzen drei unterschiedliche Partikelformen frei. Neben den reifen, infektiösen Virionen werden *non-infectious enveloped particles* (NIEPs) und *Dense Bodies* (DB) gefunden. NIEPs zeigen einen ähnlichen Aufbau wie Virionen, ihnen fehlt jedoch die virale DNA im Kapsid. DB bestehen in ihrer inneren Struktur im Wesentlichen aus Tegumentproteinen, die von einer Virushülle umgeben sind. Die Tegument- und Hüllstrukturen von NIEPs, DB und Virionen enthalten die gleichen viralen Proteine, wengleich insbesondere DB eine abweichende, stöchiometrische Zusammensetzung der Polypeptide aufweisen (Irmiere und Gibson, 1983; Varnum et al., 2004). Aufgrund der fehlenden DNA sind weder NIEPs noch DB infektiös.

## 1.2 Zelltropismus des HCMV

HCMV weist einen ausgesprochen breiten Zelltropismus auf. Es repliziert in einer Vielzahl verschiedener Zellen in nahezu allen Geweben des Menschen. Besonders Epithel- und Endothelzellen sind neben Fibroblasten und glatten Muskelzellen Ziele der HCMV-Infektion (Plachter et al., 1996; Sinzger et al., 1995).

Zur Analyse der HCMV-Infektion *in vitro* standen über viele Jahre hinweg nur humane Fibroblasten-Zellkulturen zu Verfügung, nur diese gewährleisteten eine hinreichende Bildung von Nachkommen-Viren. Eine lange Passage von Viren führt jedoch in der Regel zur Adaptation der Stämme auf den verwendeten Zelltyp. Zum Teil sind die phänotypischen Veränderungen, die mit der Adaptation einhergehen, genetisch fixiert. Es war bekannt, dass Laborstämme des HCMV (HCMV<sub>Lab</sub>) nach ihrer langen Fibroblasten-Passage ihren natürlichen Tropismus für andere Zelltypen, wie Epithel- oder Endothelzellen, verlieren (Cha et al., 1996). In neueren Studien konnte gezeigt werden, dass diese Einschränkung des Zelltropismus mit Mutationen im Genlokus UL128-UL131A assoziiert ist. Die Gene UL128, UL130 und UL131A kodieren für drei Proteine, die zusammen mit den Glykoproteinen H und L (gH; gL) einen pentameren Proteinkomplex bilden. Dieser Komplex wird in die Hülle von Virionen eingebaut und ist nach außen hin orientiert. Von verschiedenen Arbeitsgruppen konnte gezeigt werden, dass nur solche Virusstämme, die den Komplex bilden, Epithel- und Endothelzellen und auch andere Zelltypen wie Dendritische Zellen (DC) infizieren können (Hahn et al., 2004; Wang und Shenk, 2005a; Wang und Shenk, 2005b; Gerna et al., 2005). Alle bislang charakterisierten, klinischen Isolate enthalten Viren, die diesen Komplex exprimieren und einen breiten Zelltropismus aufweisen. Nach aktuellem Kenntnisstand stellen HCMV-Isolate jedoch keine homogene Population dar, sondern liegen bereits *in vivo* in einer Vielzahl von genetischen Varianten vor. So kann schon eine Passage eines Isolats in Fibroblasten-Kulturen dazu führen, dass Mutanten im UL128-UL131A-Genlokus angereichert werden (Dolan et al., 2004). Aus bislang nicht vollständig geklärten Gründen besteht bei HCMV-Infektion von Fibroblasten ein negativer Selektionsdruck auf die Bildung des pentameren Komplexes und somit auf die Expression der UL128-UL131A-Genregion.

HCMV-Stämme, die den pentameren Komplex aus gH/gL und pUL128-UL131A besitzen, werden auch als endotheliotrope Stämme bezeichnet. Die Replikationsfähigkeit dieser Stämme ist in Fibroblasten im Vergleich zu HCMV<sub>Lab</sub> eingeschränkt. Erst nach Selektion einer Mutante im UL128-UL131A-Lokus wird dieses Defizit ausgeglichen (Dargan et al., 2010; Stanton et al., 2010).

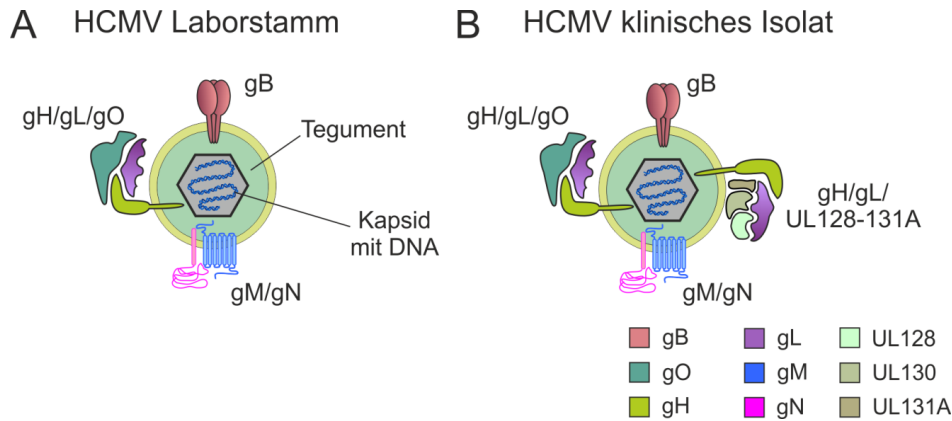
### 1.3 Infektionsverlauf

Kenntnisstand zum Beginn dieser Arbeit war, dass HCMV über Membranfusion an der Zelloberfläche in Fibroblasten eintritt (Compton et al., 1992). Demgegenüber sollte die Aufnahme in andere Zellen, wie z.B. in Epithel- oder Endothelzellen über rezeptorvermittelte Endozytose erfolgen (Bodaghi et al., 1999; Ryckman et al., 2006; Sinzger, 2008).

Adsorption und Penetration von HCMV sind bislang nur unzureichend molekular aufgeklärt. Es ist jedoch bekannt, dass bestimmte Glykoprotein-Komplexe der viralen Hüllmembran für diese beiden Prozesse notwendig sind. Vier derartige Komplexe sind für HCMV näher charakterisiert (gCI, gCII, gCIII, pentamerer Komplex). Der gCI wird von Glykoprotein B (gB) gebildet (Gretch et al., 1988a; Gretch et al., 1988b). Diesem Komplex wird eine essentielle Rolle in der Fusion der viralen Membran mit der Zellmembran zugesprochen (Navarro et al., 1993; Tugizov et al., 1994; Tugizov et al., 1995; Isaacson und Compton, 2009; Wille et al., 2013). Die Glykoproteine M und N (gM; gN) bilden den zweiten Komplex (gCII) (Kari et al., 1990; Mach et al., 2000). Zusammen mit gN fungiert gM vermutlich als Initiator früher Schritte der Aufnahme in die Zelle, wie z.B. das Binden an einen zellulären Rezeptor (Mach et al., 2005; Kari und Gehrz, 1992). Dem Heterodimer wird auch eine Rolle während der Morphogenese zugesprochen (Mach et al., 2007; Krzyzaniak et al., 2007). Der dritte Glykoproteinkomplex (gCIII) wird von den Glykoproteinen H und L (gH; gL) gebildet (Li et al., 1997). Diesem kommt wahrscheinlich eine Funktion bei der Membranfusion sowie der Rezeptorbindung zu (Patrone et al., 2007; Ryckman et al., 2008a). Die beiden Proteine gH und gL liegen entweder als trimerer Komplex mit gO vor oder bilden mit pUL128-UL131A einen pentameren Komplex (Huber und Compton, 1998; Adler et al., 2006; Wang und Shenk, 2005b).

HCMV<sub>Lab</sub>-Stämmen fehlen aufgrund einer Mutation im UL128-UL131A-Lokus der pentamere Komplex, gH/gL liegen ausschließlich als trimerer Komplex zusammen mit gO vor (Hahn et al., 2004; Ryckman et al., 2008b; Jiang et al., 2008). Klinische Isolate von HCMV hingegen exprimieren beide gH/gL-basierten Komplexe auf ihrer Oberfläche (Ryckman et al., 2010). Gegenwärtig wird angenommen, dass die Fähigkeit zur Expression der beiden unterschiedlichen gH/gL-Komplexe den Unterschied im Zelltropismus von HCMV<sub>Lab</sub> und klinischen Isolaten determiniert. Die Unterschiede der Oberflächenprotein-komplexe sind schematisch für HCMV<sub>Lab</sub> und klinische Isolate in Abbildung 1 dargestellt.





**Abbildung 1: Schematischer Aufbau von HCMV Laborstämmen und klinischen Isolaten.** Das Kapsid mit der linearen DNA wird vom Tegument eingeschlossen. In der äußeren Membran sind verschiedene Glykoproteinkomplexe exprimiert. (A), HCMV<sub>Lab</sub> exprimieren ausschließlich den trimeren Komplex aus gH/gL/gO auf der Oberfläche. (B), Klinische Isolate exprimieren den trimeren Komplex gH/gL/gO und den pentameren Komplex gH/gL/pUL128-131A auf der Oberfläche. Abbildung verändert nach Plotkin und Plachter 2013.

Der initiale Kontakt von HCMV mit der Zelloberfläche erfolgt über seine Interaktion mit Heparansulfat-Proteoglykane (PG), die ubiquitär auf vielen Zellen gefunden werden. Diese erste Bindung wird möglicherweise über gB und gM/gN hergestellt (Kari und Gehrz, 1993; Kari und Gehrz, 1992). Nach der gegenwärtig gültigen Lehrmeinung erfolgt dann erst in einem zweiten Schritt die Interaktion viraler Glykoproteine mit zelltypspezifischen Rezeptoren. In der Literatur werden verschiedene Oberflächenmoleküle als mögliche Rezeptoren für HCMV diskutiert. Hierzu zählen MHC-Klasse-I-Moleküle, CD13, *Epidermal growth factor receptor* (EGFR) und Heterodimere der verschiedenen Integrine (Beersma et al., 1990; Beersma et al., 1991; Soderberg et al., 1993; Wang et al., 2003; Chan et al., 2009; Isaacson und Compton, 2009; Wang et al., 2005; Feire et al., 2004). Ein schlussendlicher Beweis, dass einer dieser Kandidaten tatsächlich als HCMV-Rezeptor wirkt, steht jedoch trotz intensiver Bemühungen immer noch aus.

## 1.4 Klinische Relevanz

HCMV stellt einen der am weitesten verbreiteten viralen Krankheitserreger dar, wie aus einer Prävalenz von bis zu 100 % HCMV-spezifischer Antikörper in Serumproben gesunder Probanden abgeleitet werden kann. Dabei hängt die Durchseuchungsrate von verschiedenen Faktoren wie dem Alter, der geographischen Lage oder dem sozioökonomischen Status ab (Furui et al., 2013; Correa et al., 2010; Zhao et al., 2009; Ahmed et al., 2006). In einer Analyse von Serumproben von über 54.000 Blutspendern in Frankfurt am Main ergab sich eine durchschnittliche Seroprävalenz von etwa 60 % (Lubeck et al., 2010). Ähnliche Zahlen sind auch für die USA bekannt (Marshall und Stout, 2005).

HCMV kann sowohl vertikal als auch horizontal übertragen werden. Die horizontale Übertragung erfolgt über Kontakt mit Körperflüssigkeiten, aber auch durch Organ- oder Blutspenden. Die vertikale Übertragung kann prä- oder perinatal erfolgen (Ho, 2008). Während Primärinfektionen bei immunkompetenten Personen meist asymptomatisch verlaufen, kann eine Infektion oder eine Reaktivierung bei geschwächtem oder unausgereiftem Immunsystem gravierende Folgen haben.

Ein herausragendes, klinisches Problem stellt die HCMV-Infektion in der Schwangerschaft dar. Eine solche Infektion kann zu transplazentarer Übertragung und zur Infektion des Fötus führen. Bislang war davon ausgegangen worden, dass insbesondere die Erstinfektionen der Schwangeren ein hohes Risiko für schwere, klinische Manifestationen nach kongenitaler Infektion darstellen. Untersuchungen in Ländern mit sehr hoher Durchseuchung im jungen Erwachsenenalter stellen dieses Dogma jedoch infrage, hier fanden sich auch nach sekundärer Infektion Fälle von schwerst-geschädigten Neugeborenen (Bello und Whittle, 1991; Mussi-Pinhata et al., 2009; Yamamoto et al., 2011; Yamamoto et al., 2010).

Die kongenitale HCMV-Infektion, die in Ländern der westlichen Hemisphäre in einer Häufigkeit von 0,2-2 % bezogen auf alle Neugeborenen auftritt, ist die häufigste, infektionsbedingte Ursache für schwere Erkrankungen bei Neugeborenen und Kleinkindern. In etwa 10-15 % der Infektionen kommt es entweder zum intrauterinen Fruchttod oder zur Entwicklung schwerer Krankheitszeichen, wobei bevorzugt das Zentralnervensystem und die Sinnesorgane betroffen sind. Mentale Retardation, aber auch Seh- und Hörstörung in unterschiedlicher Ausprägung sind typische Manifestationen (Jahn et al., 1988; Fowler et al., 1992; Pass et al., 2006; Bristow et al., 2011; Kenneson und Cannon, 2007). In der Gruppe der Kinder, die bei der Geburt asymptomatisch waren, zeigen sich mit Häufigkeit von 10-15 % Spätmanifestationen (Dollard et al., 2007; Cheeran et al., 2009).

Die Immunsuppression, die im Rahmen der Transplantation solider Organe oder von Blutstammzellen die Abstoßung verhindern soll, stellt einen weiteren erheblichen Risikofaktor für die Entwicklung von schweren HCMV-Erkrankungen dar. Die Infektion kann dabei entweder durch das Transplantat selbst erfolgen oder im Rahmen der viralen Reaktivierung beim Transplantat-Empfänger entstehen. Schwere Manifestationen können verschiedene Organe betreffen, wobei aus klinischer Sicht der HCMV-Pneumonie ein hoher Stellenwert zukommt. Darüber hinaus ist die HCMV-Infektion bei diesen Patienten auch gehäuft mit Transplantat-Abstoßung assoziiert (Ljungman et al., 2002). Durch eine prophylaktische oder präemptive Behandlung mit antiviralen Medikamenten kann das Risiko der HCMV-assoziierten Erkrankungen nach der Transplantation verringert werden. Schwachpunkte der bisher zugelassenen, antiviralen Substanzen sind die hohe Toxizität sowie die mögliche Ausbildung von viralen Resistenzen (Drew et al., 1991; Rosen et al., 1997; Steininger, 2007; Buhles, Jr. et al., 1988). Virostatika spielen bei der Prävention von kongenitalen HCMV-Infektionen jedoch keine Rolle (Ornoy und Diav-Citrin, 2006).

## 1.5 Immunantwort

Bei der Infektion einer immunkompetenten Person wird die HCMV-Infektion in einem Zusammenspiel von angeborenen und adaptiven Immunabwehrmechanismen effizient kontrolliert. Auch Reaktivierungen bleiben daher bei Gesunden in der Regel asymptomatisch.

### 1.5.1 DC als Vermittler zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort

Dendritische Zellen (DC) spielen als professionelle antigenpräsentierende Zellen eine Hauptrolle als Vermittler der angeborenen und adaptiven Immunantworten (Steinman und Hemmi, 2006). Das *Priming* einer Immunantwort wird durch DC wesentlich effektiver vermittelt als beispielsweise durch Monozyten oder Makrophagen. DC nehmen Antigene aus der Umgebung auf und präsentieren diese über *major histocompatibility*-Komplexe (MHC) Klasse-I oder über MHC-Klasse-II. Man unterscheidet verschiedene Subtypen von DC. Den myeloiden DC, zu denen z.B. die Langerhans Zellen oder die aus Monozyten generierten DC gehören, stehen die plasmazytoiden DC gegenüber. Plasmazytoide DC produzieren zur direkten viralen Abwehr große Mengen an Interferon (IFN)- $\alpha$  (Siegal et al., 1999). Auch myeloide DC produzieren INF- $\alpha$ , jedoch in deutlich geringeren Mengen. Eher stimulieren sie durch die Freisetzung von Interleukin (IL)-12 die T-Helferzell 1 ( $T_H1$ )-abhängige Immunantwort (Guermontprez et al., 2002).

Unreife DC kommen in verschiedenen Geweben vor, ihnen fehlt jedoch in diesem Differenzierungsstadium noch die Fähigkeit zur T-Zell-Stimulation. Die primäre Funktion unreifer DC besteht in der Aufnahme von Antigen. Die Antigenaufnahme erfolgt meist über Mechanismen wie der Makropinozytose oder der Endozytose (Haspot et al., 2012; Kamphorst et al., 2010). Durch die Antigenaufnahme der DC kommt es zu deren Ausreifung. Mit dem Prozess der Ausreifung geht eine Veränderung der Expression verschiedener Oberflächenmoleküle einher. Die MHC-Klasse-I und Klasse-II-Moleküle werden verstärkt auf der Oberfläche exprimiert. Zusätzlich kommt es zu einer erhöhten Expression der zur T-Zellaktivierung notwendigen kostimulatorischen Moleküle wie z.B. CD40, CD80 und CD86. Diese Veränderung der DC bewirkt eine Migration der DC aus den jeweiligen Geweben zu den Lymphknoten, wo die Stimulation der T-Zellen erfolgt (Lipscomb und Masten, 2002).

Exogen aufgenommenes Antigen wird normalerweise über MHC-Klasse-II-Moleküle gegenüber CD4 T-Zellen präsentiert, während endogen produzierte Peptide über MHC-Klasse-I-Moleküle gegenüber CD8 T-Zellen präsentiert werden. Als kreuzpräsentierende Zellen können DC jedoch auch mit exogenen, nicht selbstsynthetisierten Antigenen CD8 T-Zellen über MHC-Klasse-I Präsentation *primen* (Bevan, 2006). Infolge der Ausreifung verlieren DC die Fähigkeit weiterhin Antigene aus ihrer Umgebung aufzunehmen.

DC der myeloiden Linie können durch klinische Isolate von HCMV lytisch infiziert werden (Riegler et al., 2000; Gerna et al., 2005). Die Infektion von DC mit HCMV verhindert die gesteigerte Expression verschiedener kostimulatorischer Moleküle und der MHC-Komplexe, so dass die T-zellstimulierende Kapazität der DC verringert ist. (Raftery et al., 2001; Grigoleit et al., 2002; Moutaftsi et al., 2002; Beck et al., 2003; Senechal et al., 2004). Eine exogene Antigenaufnahme mit nachfolgender Präsentation ist geeignet, diese inhibitorischen Mechanismen zu umgehen (Mandron et al., 2008; Arrode et al., 2000; Busche et al., 2013).

### **1.5.2 Zelluläre Immunantwort**

Bei der Kontrolle der HCMV-Infektion spielen zytotoxische CD8 T-Zellen (CTLs) eine entscheidende Rolle. Über die Präsentation viraler, antigener Peptide durch MHC-Klasse-I-Moleküle auf ihrer Oberfläche werden infizierte Zellen erkannt und eliminiert. Dies erfolgt durch die Bindung des T-Zell-Rezeptors (TCR) an den Komplex aus MHC-Klasse-I und Peptid. Unter Verstärkung dieser Interaktion durch kostimulatorische Moleküle setzen CTLs Perforin und Granzyme frei, die in der Zelle Apoptose induzieren und so zum Zelltod führen (Trapani und Smyth, 2002). Aktivierte CTL können aber auch verschiedene Zytokine freisetzen und auf diese Weise zur Immunabwehr beitragen.

Durch Studien mit adoptivem T-Zelltransfer bei Knochenmarks-Transplantations-Patienten konnte gezeigt werden, dass CD8 T-Lymphozyten an der Kontrolle der HCMV-Infektion in entscheidender Weise beteiligt sind (Riddell et al., 1992; Peggs et al., 2003). Auch gibt es Hinweise, dass T-Zellen einen hemmenden Effekt auf die pränatale Transmission vermitteln (Lilleri et al., 2007). Das Tegumentprotein pp65 und das *Immediate Early* Proteine (IE) 1 wurden als dominante CD8 T-Zellantigene identifiziert. Allerdings konnten bei gesunden Spendern CD8 wie auch CD4 T-Zellen gegen eine Vielzahl von HCMV-Proteinen gefunden werden (Sylwester et al., 2005; Elkington et al., 2003).

Neben CD8 spielen auch CD4 T-Zellen eine wichtige Rolle in der Kontrolle einer HCMV-Infektion (Walter et al., 1995). Die Aktivierung von CD4 T-Zellen erfolgt über den Kontakt ihres TCR mit dem Komplex aus MHC-Klasse-II und einem z.B. viralen Peptid auf der Oberfläche von professionellen antigenpräsentierenden Zellen. Aktivierte CD4 T-Zellen sind für die Stimulation der Antikörperproduktion von B-Zellen ( $T_H2$ -Antwort), für die Aktivierung von Makrophagen und für die Unterstützung der Reifung und Aktivierung von CD8 T-Zellen ( $T_H1$ -Antwort) von zentraler Bedeutung.

### **1.5.3 Humorale Immunantwort**

Die HCMV-Infektion induziert eine breite humorale Immunantwort. Dabei wird zwischen neutralisierenden und nicht-neutralisierenden Antikörpern unterschieden. Nicht-neutralisierende Antikörper werden bevorzugt gegen Strukturproteine wie das *major capsid*

Protein (MCP) oder pp65 (UL83) gebildet. Ihre Funktion im Rahmen der Virusabwehr ist unklar. Neutralisierende Antikörper (NTAk) hingegen sind in aller Regel gegen die Glykoproteine auf der Virionenoberfläche gerichtet. Beispiele für solche Proteine sind gB, gM/gN oder gH (Funaro et al., 2008; Shimamura et al., 2006). Bislang wurde gB eine dominierende Rolle als Antigen der NTAk-Antwort zugeschrieben (Mach et al. 2013). Diese Annahme muss aufgrund neuerer Erkenntnisse jedoch relativiert werden. Die Erkenntnis, dass bei allen Analysen der NTAk-Antworten HCMV<sub>Lab</sub> eingesetzt wurden und somit der pentamere Komplex aus gH/gL/pUL128-UL131A nicht berücksichtigt wurde, gab Veranlassung zu weiteren Studien. So konnte gezeigt werden, dass ein erheblicher Anteil der Neutralisationskapazität aus humanen Seren durch *in vitro*-Depletion mit Proteinen des pentameren Komplexes entfernt werden kann (Fouts et al., 2012). Experimente mit dem Ziel der Etablierung humaner monoklonaler NTAk zeigten, dass der pentamere Komplex mehrere, konformationsabhängige Epitope enthält, die in einigen Fällen von mehr als einer Komponente des Komplexes gebildet werden. Es wurden bevorzugt solche konformationsabhängigen Antikörper isoliert, was darauf hindeutet, dass ein erheblicher Anteil der NTAk-Antwort gegen den pentameren Komplex strukturabhängig ist (Macagno et al., 2010).

Die neutralisierende Wirkung von NTAk kann auf verschiedene Weise vermittelt werden. So können Antikörper die Bindung des Virus an die Zelle verhindern, indem sie die Bindestellen auf den viralen Oberflächenproteinen blockieren. Alternativ kann durch Antikörper-Bindung die Konformation der viralen Oberflächenproteine in einer Weise verändert werden, dass keine Rezeptor-Interaktion mehr stattfinden kann oder die Membranfusion verhindert wird. Bislang ist nicht geklärt, welche dieser Mechanismen für die Neutralisation von HCMV verantwortlich sind (Mach et al. 2013).

## **1.6 Impfstoffentwicklung**

### **1.6.1 Klinische Relevanz einer HCMV-Vakzine**

Es konnte gezeigt werden, dass der Nachweis einer HCMV-spezifischen Immunantwort bei der Mutter mit einem um 70 % verringertem Risiko einer kongenitalen HCMV-Infektion korreliert (Fowler et al., 2003). Die Induktion einer HCMV-spezifischen Immunität durch einen Impfstoff ist daher ein wichtiges, medizinisches Ziel. Bereits 1999 hat das *Institute of Medicine* der *US National Academy of Science* und das *National Vaccine Advisory Committee* des *US Public Health Service* die Entwicklung eines HCMV-Impfstoffes mit höchster Priorität eingestuft (Arvin et al., 2004). Dabei sollte der Schutz vor einer kongenitalen HCMV-Infektion im Vordergrund stehen. In den USA werden jährlich etwa 8.000 Kinder mit HCMV-Infektion geboren oder perinatal infiziert. Von diesen Kindern entwickeln 20 % permanente klinische Manifestationen (Kenneson und Cannon, 2007). Die Behandlung der HCMV-assoziierten Krankheiten kostete in den 90er Jahren in etwa 1,86 Milliarden US Dollar pro Jahr, wobei die Aufwendungen für jedes Kind mehr als 300.000

Dollar ausmachen (Fowler et al., 1992; Arvin et al., 2004). Daher ist die Entwicklung eines Impfstoffes nicht nur aus gesundheitlichen Aspekten, sondern auch aus ökonomischen Aspekten dringlich.

Ein Impfstoff muss geeignet sein, neben der zellulären auch die humorale Immunantwort zu stimulieren. Besonders NTAK können ungeborene Kinder vor einer Infektion schützen oder zumindest den Krankheitsverlauf abmildern (Snydman et al., 1995; Pass et al., 2006; Nigro et al., 2005; Nozawa et al., 2009; Adler und Nigro, 2009). Ob NTAK auch eine entscheidende Rolle beim Schutz von Transplantatempfängern gegenüber HCMV-Infektion spielen, wird noch diskutiert. Im Fall der Transplantation solider Organe ist ein Einfluss von NTAK wahrscheinlich, wohingegen ein Vorteil bei einer Stammzelltransplantation noch zu bestätigen wäre (Cordonnier et al., 2003; Bonaros et al., 2008; Ohizumi et al., 1994). Den NTAK steht die zelluläre Immunantwort gegenüber. CD8 T-Lymphozyten schützen im Mausmodell vor einer Reaktivierung des Virus (Holtappels et al., 2008). Durch adoptiven T-Zelltransfer nach Stammzelltransplantation kommt es zur schnelleren Rekonstitution des Immunsystems und damit zu einem besseren Schutz vor HCMV-Infektionen oder Reaktivierungen (Peggs et al., 2003; Riddell et al., 1992; Walter et al., 1995). Durch einen Impfstoff könnten die T-Zellen des Spenders nach dem Transfer stimuliert werden und so zur Optimierung des adoptiven T-Zell-Transfers beitragen (Herr und Plachter, 2009). Um die Ziele der Aktivierung einer breiten Immunantwort zu gewährleisten, muss die Antigenzusammensetzung eines Impfstoffkandidaten beide Seiten der adaptiven Immunität ansprechen.

## **1.6.2 Impfstoffkandidaten**

### **1.6.2.1 Lebend attenuierte Viren**

In den 70er Jahren wurden vermehrt Impfstoffe gegen Viruserkrankungen zugelassen, die auf vermehrungsfähigen, aber attenuierten Impfstämmen beruhten. Auch die ersten Versuche zur Entwicklung eines HCMV-Impfstoffes wurden mit attenuierten HCMV-Stämmen durchgeführt (Elek und Stern, 1974; Plotkin et al., 1975; Just et al., 1975). Die Attenuierung erfolgte dabei durch Zellkulturpassage. Immunisierungen mit einem der Stämme, der in der Folge als Stamm Towne bezeichnet wurde, war geeignet, NTAK zu induzieren (Plotkin, 1981). Die Immunantwort war jedoch schwächer als die natürlich erworbene Immunität. Ein Schutz vor primärer Infektion konnte nicht vermittelt werden (Adler et al., 1995). Als Grund für die nur eingeschränkte Immunogenität des verwendeten Stammes Towne wird das hohe Ausmaß seiner Attenuierung angeführt. Um die Immunogenität der attenuierten Viren zu verbessern, wurden in jüngerer Vergangenheit rekombinante Viren hergestellt, die neben genomischen Abschnitten des Stammes Towne auch solche des kliniknahen Isolates Toledo enthielten. Diese Towne-Toledo-Chimäre wurden in ersten Phasen von klinischen Studien getestet und erwiesen sich als verträglich (Heineman et al., 2006). Weitergehende Studien stehen noch aus.

### 1.6.2.2 Totantigene und Vektorexpressionssysteme

Neben den attenuierten Impfstoffen werden auch verschiedene Ansätze der Impfstoffentwicklung verfolgt, die auf der Applikation von viralen Peptiden oder viralen Proteinen beruhen. Daneben werden verschiedene Expressionssysteme eingesetzt, die die Antigenexpression *in vivo* zum Ziel haben. Zumeist erfolgt die Applikation von Proteinuntereinheiten oder Proteinen zusammen mit Adjuvantien.

#### *Glykoprotein B*

Ein Schwerpunkt der Impfstoffentwicklung lag bisher auf der Induktion von NTAK gegen gB. Vier antigene Domänen konnten als Zielstrukturen für NTAK auf gB charakterisiert werden (AD-1, -2, -4, -5) (Wagner et al., 1992; Meyer et al., 1990; Potzsch et al., 2011). Nach einer natürlichen Infektion kommt es schnell zu einem signifikanten Anstieg an gB-spezifischen Antikörpern im Serum (Zhang et al., 2006). In Analogie führte die Applikation von rekombinantem gB mit dem Adjuvans MF59, einer Öl/Wasser-Emulsion, ebenfalls zu einem deutlichen Anstieg gB-spezifischer Antikörper. Dies war in einer klinischen Studie mit 50 %igem Schutz gegenüber HCMV-Infektionen assoziiert (Pass et al., 2009). Bei Transplantations-Patienten konnte durch die Applikation von gB in MF59 die Dauer der Virämie verringert und die Behandlung mit Virostatika reduziert werden (Griffiths et al., 2011).

Eine Expression von gB in verschiedenen Expressionssystemen, wie z.B. dem *Alphavirus-Replicon*, oder einem *Modified Vaccinia Ankara Virus* (MVA), führte zur Induktion von NTAK (Reap et al., 2007; Adler et al., 1999; Wang et al., 2004a); allerdings bleibt noch zu zeigen, dass dies auch mit einem Schutz vor einer Infektion einhergeht.

#### *pp65 (UL83)*

Als Hauptantigen für die zelluläre Immunantwort sollte auch pp65 als Bestandteil in einem Impfstoff enthalten sein. Das Tegumentprotein ist daher bei einer Reihe von Impfstoffkandidaten in der einen oder anderen Form berücksichtigt worden.

Eine Möglichkeit zur Induktion einer T-Zellantwort nach Impfung ist die Applikation von synthetischen Peptiden. Die Applikation von pp65-Peptiden, gekoppelt an Tetanustoxin steigerte bei seropositiven Studienteilnehmern in der Tat die Frequenz der pp65-spezifischen T-Zellen (La Rosa et al., 2012). Ein Problem bei Peptid-basierten Vakzinen ist jedoch, dass „passende“ Peptide für die häufigsten HLA-Allomorphe verwendet werden müssen, eine Tatsache, die den Ansatz kompliziert gestaltet.

Ein weiterer, ebenfalls in klinischen Studien getesteter, Impfstoffkandidat enthielt zwei Plasmide, die für gB und pp65 kodierten. Durch Applikation dieser Plasmide konnten bei seronegativen Studienteilnehmern T-Zell-Antworten und Antikörper induziert werden, die jedoch keinen Schutz vor einer HCMV-assoziierten Erkrankung boten (Selinsky et al.,

2005; Wloch et al., 2008; Kharfan-Dabaja et al., 2012). Neben diesen Ansätzen wurden eine Reihe von Kandidaten im Tiermodell oder in klinischen Studien getestet, die, basierend auf viralen Vektorsystemen, pp65 alleine oder in Kombination mit anderen HCMV-Proteinen exprimierten. Ein überzeugender Erfolg konnte jedoch bislang mit keinem dieser Ansätze erzielt werden (Plotkin und Plachter, 2013)

#### *UL128-UL131A*

Neuere Studien fokussieren auf den Einsatz des pentameren Proteinkomplexes gH/gL/pUL128-UL131A als Impfstoff. Antikörper gegen diesen Komplex werden nach primärer Infektion schnell gebildet und zeigen hohes Neutralisationspotential (Gerna et al., 2008; Wang et al., 2011; Macagno et al., 2010; Genini et al., 2011). In Rhesusaffen konnte gezeigt werden, dass der pentamere Komplex bei der horizontalen Ausbreitung des Rhesus-CMV wichtig ist (Oxford et al., 2011). Im gleichen Modell führte die Applikation von MVA, das die Bestandteile des pentameren Komplexes koexprimierte, zur Induktion einer breiten NTak-Antwort (Wussow et al., 2013). Eine Immunisierung von Kaninchen mit Peptiden der Proteine UL130 und UL131A in Freundschem Adjuvans, führte zur Bildung von NTak, die eine Infektion von Epithelzellen verhindern konnten (Saccoccio et al., 2011).

#### *Subvirale Partikel - Dense Bodies*

DB werden in großen Mengen von HCMV<sub>Lab</sub>-infizierten Fibroblasten freigesetzt. Ihnen fehlt das Kapsid und das virale Genom, so dass keine Infektion der Zielzellen möglich ist. Der Hauptbestandteil von DB ist mit über 60 % das Tegumentprotein pp65 (Varnum et al., 2004). In der äußeren Membran enthalten diese Partikel zusätzlich gM, gB, gH und gL. Die Erkenntnis, dass DB in ähnlicher Form wie Virionen aufgenommen werden, legt den Schluss nahe, dass diese Glykoproteine in der DB-Membran in ihrer natürlichen, funktionellen Konformation vorliegen (Topilko und Michelson, 1994). Aufgrund dieser Zusammensetzung aus immundominanten Antigenen für die Induktion der humoralen und zellulären Immunantwort eignen sich DB als vielversprechender Impfstoffkandidat. Ihre Immunogenität konnte im Mausmodell bereits bestätigt werden (Pepperl et al., 2000; Mersseman et al., 2008; Becke et al., 2010a).



## 1.7 Zielsetzungen

Die Entwicklung einer Impfung gegen HCMV-Infektionen hat aufgrund der klinischen Relevanz hohe Priorität. Bisher ist es jedoch nicht gelungen, einen Impfstoff-Kandidaten bis zu seiner Zulassung weiterzuentwickeln. Eine Vakzine steht daher trotz intensiver Forschung nicht zur Verfügung.

Einen vielversprechenden Impfstoff-Kandidaten stellen subvirale Partikel von HCMV dar, die als *Dense Bodies* (DB) bezeichnet werden. Ihre Struktur wird aus viralen Proteinen aufgebaut, die als wichtige Zielantigene der humoralen wie der zellulären Immunabwehr gegen HCMV identifiziert sind. Die herausragende Immunogenität von DB eines Laborstammes von HCMV war im Tierversuch zu Beginn dieser Arbeit bereits gezeigt. Ohne die Zugabe eines Adjuvans war es gelungen, nach DB-Applikation ausgeprägte humorale wie zelluläre Immunantworten auszulösen. Ein Ziel der hier vorgestellten Experimente war es, die Gründe für die besondere Antigenität von DB aufzuklären. Es sollte die Hypothese geprüft werden, dass DB die Ausreifung und funktionelle Aktivierung von Dendritischen Zellen (DC) induzieren. Eine solche Aktivierung ist für die Präsentation von Fremdartigen im Kontext von MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II-Molekülen durch DC und für die nachfolgende Induktion der adaptiven Immunabwehr von zentraler Bedeutung. Es sollte die Frage beantwortet werden, ob DB, für ein Totantigen unerwartet, in der Lage sind, diese Prozesse anzustoßen und darüber das *Priming* einer Immunantwort effizient zu induzieren.

In einem weiteren Abschnitt sollte die Induktion von neutralisierenden Antikörpern (NTAk) durch DB untersucht werden. Es war bekannt, dass DB von Laborstämmen eine ausgeprägte NTAk-Antwort induzieren, die allerdings nur unter Verwendung von homologen Laborstämmen des HCMV experimentell untersucht worden war. Diesen Stämmen fehlt der pentamere Komplex aus gH/gL/pUL128-UL131A, der den im Vergleich zu Laborstämmen deutlich breiteren Zelltropismus klinischer Isolate des HCMV begründet. Ziel war es zu prüfen, ob DB von klinischen Isolaten den pentameren Komplex tragen und ob eine Immunisierung mit solchen DB die NTAk-Antwort in einer Weise verbreitert, dass der Schutz auch gegenüber Infektion relevanter Zielzellen des HCMV, wie Epithel- oder Endothelzellen vermittelt wird.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Allgemeine Laborgeräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Analysewaage	BP61	Sartorius (Göttingen)
Brutschrank	B12	Heraeus (Hanau)
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Steri-Cult Incubator 3035	Forma Scientific (Marietta, OH, USA)
Durchflusszytometer	FACS Canto II	Becton Dickinson (Heidelberg)
Elektroblot-Apparatur	Semidry Blotter	H.Hölzel Laborgeräte (Wörth / Hörlkofen)
Elektroporations-Apparatur	Gene Pulser II	Bio-Rad (München)
Fluoreszenzlampe	HB100	Leistungselektronik GmbH Jena (Jena)
Folienschweißgerät	Polystar 583	Rische & Herforth (Hamburg)
Gelapparaturen	DNA-Gelelektrophorese	Von Keutz Labortechnik (Reiskirchen)
	Protein-Gelelektrophorese (SE600 Series)	Hofer / Pharmacia Biotech (Freiburg)
	Novex Bolt Gelsystem	Life Technologies GmbH (Darmstadt)
Geldokumentation	Bio Doc Analyze live H	Biometra (Göttingen)
Heizrührer	yellow MAG HS 7	IKA Werke (Staufen)
Heizschüttler	Thermomixer 5436	Eppendorf (Hamburg)
Laborwaage	LP5200P	Sartorius (Göttingen)
Infrarot-Scanner	Odyssey Infrared Imager	LI-COR (Lincoln, NE, USA)
Mehrkanalpipette, verstellbar	30-300 µl, Research Plus	Eppendorf (Hamburg)
	20-200 µl, Discovery	ABIMED (Langenfeld)
MACS-System	MACS MultiStand und MidiMACS Separator	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Mikroskop	Axiovert 25	Zeiss (Jena)
	Axiophot	Zeiss (Jena)
	Leitz DM IRB	Leica (Solms)

<b>Gerät</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Mikrowelle	M1712N	Samsung (Schwalbach / Ts.)
Stromquelle	Electrophoresis Power Supply 600	Pharmacia Biotech (Freiburg)
PCR-Cycler	TPersonal Thermocycler	Biometra (Göttingen)
pH-Meter	Five Easy	Mettler Toledo (Gießen)
Photometer	MRX- Revelation	Dynex technologies (Denkendorf)
	Orion II Microplate Luminometer	Berthold Detection System (Pfortzheim)
	Multiskan MS (96-Well-Platten-Reader)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
	Nanodrop ND-100	PeqLab (Erlangen)
	Ultrospec III	Pharmacia Biotech (Freiburg)
Pipettierhilfen	2, 20, 200, 1.000 µl	Gilson (Langenfeld)
	50-1.000 µl, Research Pro	Eppendorf (Hamburg)
	Pipetboy acu	Integra Biosciences (Fernwald)
<i>Real Time-Cycler</i>	ABI Prism 7700 Sequence Detector	PE Applied Biosystems (Weiterstadt)
Schüttelinkubator	Certomat R mit Certomat H	Labotec (Wiesbaden)
	MaxQ 4.000	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Schüttelwasserbad	OLS 200	Grant (Cambridge, GB)
Schüttler	HS501 digital	IKA Werke (Staufen)
Sterilbank	Herasafe	Heraeus (Hanau)
Ultrazentrifuge	Optima L-90K	Beckman Coulter (Krefeld)
UV-Lampe	Type NU-4	Herolab GmbH Laborgeräte (Wiesloch)
UV-Tisch	UVstar 30i, 312 nm	Biometra (Göttingen)
Vortex	MS1 und MS3 Minishaker	IKA Werke (Staufen)
Wasserbad mit Thermostat		Memmert (Schwabach)
Zellbestrahlungsanlage	Gammacell 2.000	Mølsgaard Medical (Ganløse, Dänemark)

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Zentrifugen	Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg)
	Megafuge 2.0	Heraeus (Hanau)
	Sorvall RC6+ (Rotoren F21(S)_8x50y, F14(S)_6x250y)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
	Tischzentrifuge 5417C	Eppendorf (Hamburg)
	Cytospin 4	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)

## 2.2 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien von Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma (Deisenhofen) bezogen. Das Ansetzen von Puffern erfolgte mit autoklaviertem, bidestilliertem Wasser.

## 2.3 Kultivierung von Bakterienzellen

### 2.3.1 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Literatur
<i>E. coli</i> DH10B	F <sup>-</sup> araD139 Δ(ara, leu)7697 ΔlacX74 galU galK rpsL deoR φ80dlacZΔM15 endA1 nupG recA1 mcrA Δ(mrr hsdRMS mcrBC)	(Grant et al., 1990)
<i>E. coli</i> EL250	DH10B [λcl857 ( <i>cro-bioA</i> ) <> araC-P <sub>BAD</sub> flpe] <sup>b</sup>	(Lee et al., 2001)
<i>E. coli</i> SW102	F <sup>-</sup> -mcrAΔ(mrr-hsdRMS-mcrBC) F80dlacZDM15 ΔlacX74 deoR recA1 endA1 araD139 Δ(ara,leu)7649 gal <sup>+</sup> galU ΔgalK rspL nupG Δcl857 ( <i>cro-bioA</i> ) <> Tet( <i>cro-bioA</i> ) <> Tet indicates substitution of <i>cro-bioA</i> with <i>tet</i>	(Warming et al., 2005)

### 2.3.2 Medien und Medienzusätze

#### 2.3.2.1 Medien

##### Luria Bertani (LB)-Medium

10 g Trypton, 5 g Hefe-Extrakt und 5 g NaCl mit H<sub>2</sub>O ad 1 l, pH 7,5, autoklaviert

### **LB-Agarplatten**

1,5 % (w/v) Agar in LB-Medium, autoklaviert

Vor dem Gießen des LB-Agars in Petrischalen (Greiner Bio-One, Frickenhausen) wurden in den flüssigen, 50 bis 60 °C warmen LB-Agar die gewünschten Antibiotika hinzugegeben.

### **Einfriermedium**

LB-Medium mit 30 % (v/v) Glycerin

### **M9 - Medium 1x**

6 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, 3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g NaH<sub>4</sub>Cl, 0,5 g NaCl mit H<sub>2</sub>O ad 1 l, pH 7,0, autoklaviert

### **M63 - Minimalmedium 5x**

10 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 68 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,5 mg FeSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O mit H<sub>2</sub>O ad 1 l, pH 7,0, sterilfiltriert

### **M63 - Agarplatten**

1,5 % (w/v) Agar + M63-Minimalmedium, autoklaviert

Nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 60 °C wurden Antibiotika sowie die Kohlenstoffquelle zugegeben.

### **MacConkey-Agar**

Die Verwendung des MacConkey-Agars erfolgte nach Herstellerangaben (Becton Dickinson, Heidelberg).

## **2.3.2.2 Medienzusätze**

### **Antibiotika**

Lagerung bei -20 °C

<b>Bezeichnung</b>	<b>Stocklösung</b>	<b>Endkonzentration</b>
Chloramphenicol	34 mg / ml in Ethanol absolut	15 µg / ml
Ampicillin	25 mg / ml in H <sub>2</sub> O, sterilfiltriert	100 µg / ml

### **Galaktose**

Stock 20 % (w/v) Galaktose in H<sub>2</sub>O, sterilfiltriert, Endkonzentration 0,2 %

### **d-Biotin**

Stock 0,2 mg/ml d-Biotin in H<sub>2</sub>O, sterilfiltriert, Endkonzentration 1 mg/ml

### **2-desoxy-Galaktose (DOG)**

Stock 20 % (w/v) 2-desoxy-Galaktose in H<sub>2</sub>O, sterilfiltriert, Endkonzentration 0,2 %

### **L-Leucin**

Stock 10 mg/ml L-Leucin in H<sub>2</sub>O, sterilfiltriert, Endkonzentration 45 mg/l

### **Glycerin**

Stock 20 % (v/v) Glycerin in H<sub>2</sub>O, sterilfiltriert, Endkonzentration 0,2 %

### **Magnesiumsulfat (MgSO<sub>4</sub>)**

Stock 1 M MgSO<sub>4</sub> in H<sub>2</sub>O, autoklaviert, Endkonzentration 1 μM

## **2.3.3 Kultivierung und Kryokonservierung**

### **2.3.3.1 Flüssigkulturen**

Die Anzucht der Bakterien in Flüssigkulturen erfolgte durch Animpfen einer Einzelkolonie oder 20 μl einer Glycerinkultur in sterilem LB-Medium, dem die jeweiligen Antibiotika zugesetzt worden waren. Über Nacht wurde die Kultur auf einem Schüttelinkubator bei 200 rpm sowie bei 32 °C (*E. coli* E250; *E. coli* SW102) bzw. 37 °C (*E. coli* DH10B) inkubiert.

### **2.3.3.2 Kultivierung auf Agarplatten**

Mit einer sterilen Impföse wurden die Bakterien auf einer LB-Agarplatte mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 32 °C (*E. coli* EL250; *E. coli* SW102) bzw. 37 °C (*E. coli* DH10B) kultiviert.

### **2.3.3.3 Kryokonservierung (Glycerinkulturen)**

Flüssigkulturen wurden zur Kryokonservierung mit 30 % (v/v) sterilem Glycerin versetzt und bei -80 °C eingefroren.

## **2.3.4 Transformation von *E. coli***

### **2.3.4.1 Herstellung elektrokompenter *E. coli* EL250 bzw. SW102**

Eine Flüssigkultur von *E. coli* EL250 bzw. SW102 wurde in 200 ml LB-Medium bei 32 °C bis zu einer optischen Dichte (OD) bei 600 nm von etwa 0,6 kultiviert. Nach Abkühlen der Kultur auf Eis wurde diese auf zwei Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und für 10 min bei 6.000 rpm bei 4 °C (Zentrifuge Sorvall RC6+ mit Rotor F21(S)\_8x50y) pelletiert. Das Pellet wurde in 250 ml 4 °C kaltem H<sub>2</sub>O resuspendiert und erneut zentrifugiert, bevor

zweimal mit kaltem 10 % (v/v) Glycerin gewaschen wurde. Zum Aliquotieren der Bakterien wurde das Pellet in 3 ml 10 % (v/v) Glycerin aufgenommen und 25 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C bis zur Verwendung.

#### **2.3.4.2 Herstellung elektrokompetenter SW102 Bakterien für die BAC-Mutagenese**

Eine Flüssigkultur des Bakterienstammes *E. coli* SW102 pTowne-BAC wurde bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 bei 32 °C in 50 ml LB-Medium kultiviert. Die Hälfte der Kultur wurde nach Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase für 15 min einem Hitzeschock bei 42 °C unterzogen, die anderen 25 ml wurden bei 32 °C weiter kultiviert. Alle nachfolgenden Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Nach Abkühlen der beiden Kulturen wurden diese in je ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und für 6 min bei 4.500 rpm in einer Megafuge 2.0 pelletiert. Die Bakterien wurden in 1 ml kaltem H<sub>2</sub>O durch vorsichtiges Schwenken aufgenommen und anschließend 19 ml kaltes H<sub>2</sub>O dazugegeben. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde das Pellet ein weiteres Mal gewaschen. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet in der zurückbleibenden Flüssigkeit resuspendiert. Für die Elektroporation wurden die SW102 pTowne-BAC Bakterien aliquotiert.

#### **2.3.4.3 Elektroporation kompetenter *E. coli* EL250**

Zur Elektroporation wurden 150 bis 500 ng der zu transformierenden DNA zu 25 µl elektrokompetenten Zellen gegeben und das Gemisch in eine vorgekühlte *Gene Pulser* Küvette (Bio-Rad, München) überführt. Die anschließende Elektroporation erfolgte mit Pulsbedingungen von 200 Ω, 2,5 kV und 25 µF. Zur Regeneration und Expression der Antibiotikaresistenz wurde direkt nach der Transformation 1 ml vorgewärmtes LB-Medium zu den Bakterien gegeben und der Ansatz für eine Stunde bei 32 °C bzw. 37 °C auf dem Schüttler inkubiert.

#### **2.3.4.4 Elektroporation kompetenter *E. coli* SW102**

Zur Elektroporation wurden 150 bis 300 ng der zu transformierenden DNA zu 25 µl elektrokompetenten Zellen gegeben und das Gemisch in eine vorgekühlte *Gene Pulser* Küvette (Bio-Rad, München) überführt. Die Impulsbedingungen betragen 200 Ω, 1,75 kV und 25 µF. Zur Regeneration und Expression der Antibiotikaresistenz wurden direkt nach der Transformation 1 ml vorgewärmtes LB-Medium zu den Bakterien gegeben und der Ansatz für eine bzw. viereinhalb Stunden bei 32 °C auf dem Schüttler inkubiert.

## 2.4 Kultivierung von Säugerzellen

Um Kontaminationen mit Mikroorganismen zu vermeiden wurden jegliche Arbeiten mit eukaryonten Zellkulturen an einer sterilen Werkbank mit sterilen Glas- und Plastikwaren durchgeführt. Alle Zellen wurden bei 37 °C, einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % sowie einer relativen Luftfeuchte von 95 % kultiviert.

Die Kultivierung der adhärennten Zellen erfolgte in 25, 75 oder 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen von Greiner (Frickenhausen). 6-, 12-, 24-, 48- und 96-Lochplatten sowie sterile Zellkulturschalen wurden von BD Falcon (Heidelberg) bezogen, sterile Einmalplastikpipetten wurden von der Firma Greiner (Frickenhausen) bezogen. Das Pelletieren der Zellen erfolgte bei Raumtemperatur in der Megafuge 2.0 für 4 min bei 1.500 rpm (HFF) bzw. 800 rpm (ARPE-19).

In regelmäßigen Abständen wurden die Zellkulturen unter Verwendung des "VenorGeM-Mykoplasmen-Detektionskits" (Minerva Biolabs, Berlin) auf Kontamination mit Mykoplasmen getestet. Bei einem positiven Testergebnis wurden die jeweiligen Zellen mit der Antibiotika-Kombination BM Cyclin (Roche, Mannheim) nach Herstellerangaben behandelt.

### 2.4.1 Puffer und Lösungen

#### ***Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS; Invitrogen, Karlsruhe)***

136 mM NaCl; 26 mM KCl; 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

#### **Trypanblau (Sigma, Deisenhofen)**

0,4 % (v/v) in 85 % (w/v) Kochsalzlösung; Endkonzentration 0,1 % (v/v) Verdünnung 1:4 in PBS

#### **Trypsin/ EDTA (PAA, Cölbe)**

0,5 g/l Trypsin; 0,2 g/l EDTA in PBS (10x), 1:10 in Aqua B. Braun (B. Braun Melsungen, Melsungen)

### 2.4.2 Medien und Medienzusätze

Alle verwendeten Zellkulturmedien und Medienzusätze wurden, wenn nicht anders angegeben, von der Firma Life Technologies GmbH (Darmstadt) bezogen. Das fötale Kälber Serum (FKS) stammte von der Firma Biochrom (Berlin) und das humane Serum (HS) wurde von der Transfusionszentrale Mainz bereitgestellt. Vor der Verwendung wurde das jeweilige Serum für 45 min bei 56 °C hitzeinaktiviert. Phenolrot diente in sämtlichen Zellkulturmedien als pH-Indikatorfarbstoff.



<b>MEM + 5 % FKS</b>	<i>Minimum Essential</i> Medium mit 5 % (v/v) hitzeinaktiviertem FKS; 2 mM L-Glutamin; 50 mg/l Gentamycin (PAA, Cölbe), 0,5 ng/ml bFGF ( <i>basic fibroblast growth factor</i> ) (Invitrogen, Karlsruhe)
<b>MEM + 10 % FKS</b>	<i>Minimum Essential</i> Medium mit 10 % (v/v) hitzeinaktiviertem FKS; 2 mM L-Glutamin; 50 mg/l Gentamycin, 0,5 ng/ml bFGF (Invitrogen, Karlsruhe)
<b>DMEM:F12 (1:1) + 10 % FKS</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Ham's Nutrient Mixture</i> F-12, 1:1, mit 10 % (v/v) hitzeinaktiviertem FKS; 2,5 mM L-Glutamin; 50 mg/l Genatmycin
<b>AIM V + 1 % HS</b>	AIM V mit 1 % (v/v) hitzeinaktiviertem HS, mit L-Glutamin; 50 µg/ml Streptomycin; 10 µg/ml Gentamycin
<b>AIM V + 10 % HS</b>	AIM V mit 10 % (v/v) hitzeinaktiviertem HS, mit L-Glutamin; 50 µg/ml Streptomycin; 10 µg/ml Gentamycin
<b>Einfriermedium</b>	90 % (v/v) FKS; 10 % (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO; Roth, Karlsruhe)

### 2.4.3 Antibiotika

<b>Antibiotikum</b>	<b>Stocklösung</b>	<b>Endkonzentration</b>	<b>Bezugsquelle</b>
BM Cyclin (1)	2,5 mg/ml	10 µg/ml	Minerva Biolabs (Berlin)
BM Cyclin (2)	1,25 mg/ml	5 µg/ml	Minerva Biolabs (Berlin)
Gentamycin	50 mg/ml	50 µg/ml	PAA (Cölbe)

#### 2.4.4 Zytokine

Zytokin (human)	Stocklösung	Endkonzentration	Bezugsquelle
GM-CSF	1.000 U/ $\mu$ l	800-1.600 U/ml	Bayer (Leverkusen)
Interleukin (IL)-15	5 ng/ $\mu$ l	5 ng/ml	R&D systems (Wiesbaden- Nordenstedt)
IL-1 $\beta$	10 $\mu$ g/ml	10 ng/ml	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
IL-2 (Proleukin™)	25 U/ $\mu$ l	25 U/ml	Novartis (Nürnberg)
IL-6	1.000.000 U/ml	1.000 U/ml	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
IL-7	5 ng/ $\mu$ l	5 ng/ml	R&D systems (Wiesbaden- Nordenstedt)
IL-4	500 U/ $\mu$ l	500- 1.000 U/ml	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
PGE2	1 $\mu$ g/ $\mu$ l	1 $\mu$ g/ml	Sigma (Deisenhofen)
TNF- $\alpha$	10 $\mu$ g/ml	10 ng/ml	PromoCell (Heidelberg)

#### 2.4.5 Bestimmung der Zellzahl und der Zellvitalität

Die Zahl der lebenden Zellen sowie die Vitalität wurden durch die Zugabe von Trypanblau bestimmt. Aufgrund der Membranundurchlässigkeit von lebenden Zellen, werden durch diesen Farbstoff ausschließlich tote Zellen bläulich angefärbt, während lebende Zellen ungefärbt bleiben. Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte durch Zugabe von Trypanblau zur Zellsuspension und mikroskopischer Auszählung der nicht angefärbten Zellen in einer Neubauer-Zählkammer (Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen). Die Zellzahl/ml wurde mit der nachfolgenden Formel berechnet:  $\text{Zellzahl / ml} = \frac{N}{n \times V \times 10^4}$

$N$  = Anzahl gezählter lebender Zellen;

$n$  = Anzahl ausgezählter Großquadrate;

$V$  = Verdünnungsfaktor;

$10^4$  = Kammerfaktor

## 2.4.6 Verwendete Zellen und Zelllinien

### Adhärente Zellen

Bei Erreichen der Konfluenz wurden die adhärennten Zellen gesplittet. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit PBS gespült, dann durch Zugabe von Trypsin-EDTA-Lösung bei 37 °C für 5 min abgelöst. Nach Hinzufügen von Medium wurden die Zellen pelletiert und anschließend gezählt. Die Zellen wurden entsprechend der benötigten Zellzahl in neue Kulturflaschen, Schalen oder Lochplatten ausgesät.

### *Primäre humane Vorhautfibroblasten (HFF)*

Bei den HFF handelt es sich um primäre Fibroblasten, welche in der Zellkultur permissiv für HCMV sind. Für Experimente wurden die Zellen zwischen den Passagen 10 und 25 verwendet.

Medium: MEM + 5 % FKS

### *ARPE-19*

Bei diesen Zellen handelt es sich um retinales Pigmentepithel des Auges von einem 19-Jährigen männlichen Spender. Bezogen wurden die Epithelzellen mit der Nummer CRL-2302 von ATCC (Wesel) und für Experimente zwischen den Passagen 10 und 25 verwendet.

Medium: DMEM : F12 1:1 + 10 % FKS

## 2.4.7 Separation von humanen PBMC

Die verwendeten dendritischen Zellen (DC) wurden aus Monozyten generiert. Dazu wurden periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) eines HCMV-seropositiven oder -seronegativen Spenders aus einem *buffy coat* isoliert. Bei einem *buffy coat* handelt es sich um ein Lymphozytenkonzentrat, das nach dem Abzentrifugieren von Vollblut erhalten wird. Über Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation lassen sich die PBMC in der Interphase zwischen Plasma und Ficoll-Hypaque separieren, während Erythrozyten sowie Granulozyten das Zellsediment mit einer höheren Dichte ausmachen. Dazu wurden 75 ml des Lymphozytenkonzentrats mit 75 ml PBS vermennt und jeweils 30 ml dieser Verdünnung auf 15 ml LSM (1077, PAA, Cölbe) geschichtet. Die Separation erfolgte bei 2.200 rpm für 20 min ohne Bremse in der Megafuge 2.0. Nach Abnahme der PBMC-Schicht und 3-4 Waschschritten mit PBS, wurden die Zellen in Einfriermedium aufgenommen und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

#### 2.4.8 Generierung unreifer, humaner DC

Als Ursprung für die verwendeten DC dienten Monozyten. Dazu wurden  $20\text{-}30 \times 10^6$  PBMC pro Vertiefung einer 6-Lochplatte in je 3 ml AIM V + 1 % HS für 1 h bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Alle nicht-adhärenen Zellen wurden mit PBS entfernt, während zu den adhärenen Zellen, den Monozyten, 3 ml frisches AIM V + 1 % HS zugesetzt wurde. Am nachfolgenden Tag wurde pro ml Medium 800 U GM-CSF sowie 1.000 U IL-4 zugegeben. Zwei Tage später erfolgte die Zugabe von jeweils 1 ml frischen Mediums mit 1.600 U/ml GM-CSF und 1.000 U/ml IL-4. Nach zwei weiteren Tagen konnten die aus Monozyten generierten, unreifen DC (*immature* DC; iDC) geerntet werden.

#### 2.4.9 Ausreifung humaner iDC

Für die Analyse des Einflusses von DB auf DC wurden die unreifen DC in einer Konzentration von  $5 \times 10^5$  in die Vertiefung einer 12-Lochplatte in 3 ml AIM V + 1 % HS mit 800 U/ml GM-CSF und 500 U/ml IL-4 überführt. Zu den noch unreifen DC wurden jeweils 10 µg virale Partikel gegeben und der Ansatz für zwei bis drei Tage bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde die Ausreifung der unterschiedlich behandelten DC anhand der Oberflächenexpression verschiedener Moleküle (CD40, CD80, CD83, CD86, HLA-ABC, HLA-DR) im Durchflusszytometer analysiert. Des Weiteren erfolgte eine Beurteilung der Morphologie der Zellen in der Phasenkontrastmikroskopie sowie eine Messung freigesetzter Zytokine (IL-6, IL-12p70, TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ ).

Als Positivkontrolle dienten DC, die durch Zugabe eines Zytokinmixes, bestehend aus 800 U/ml GM-CSF, 500 U/ml IL-4, 10 ng/ml IL-1 $\beta$ , 10 ng/ml TNF- $\alpha$ , 1.000 U/ml IL-6 und 1 µg/ml PGE<sub>2</sub>, zur Ausreifung gebracht wurden (Jonuleit *et al.*, 1997).

#### 2.4.10 Isolation humaner T-Lymphozyten aus PBMC

Die Gewinnung humaner CD4 und CD8 positiver T-Zellen aus PBMC eines HCMV-seropositiven Spenders erfolgte über magnetgekoppelte Antikörper gegen das jeweilige Oberflächenmolekül. Dazu wurden PBMC zunächst mit den *MicroBeads* vorinkubiert, bevor die T-Zellen über eine *LS Column* in einem starken äußeren Magnetfeld separiert wurden. Die Isolation der humanen T-Zellen erfolgte nach Herstellerangaben von Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach).

#### 2.4.11 *In vitro* Restimulation von humanen T-Lymphozyten

Die aus PBMC isolierten T-Zellen wurden entweder direkt *ex vivo* oder nach zweimaliger Restimulation mit überlappendem pp65 Peptidmix (PepTivator®; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) im ELISpot (2.8.2) eingesetzt. Dazu wurden je  $1 \times 10^6$  CD4 oder CD8

T-Zellen nach der Isolation aus PBMC zusammen mit  $1 \times 10^6$  peptidbeladenen und bestrahlten autologen PBMC in einem Gesamtvolumen von 2 ml AIM V 10 % HS inkubiert. Maximal  $10^9$  PBMC wurden zuvor mit  $10^{-7}$  M PepTivator<sup>®</sup> für eine Stunde in einem geringen Volumen Medium im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf  $1 \times 10^6$  pro ml eingestellt und mit 3.500 rad bestrahlt. Zu den bereits in einer 24-Lochplatte ausgesäten T Zellen ( $1 \times 10^6$  / ml) wurden jeweils  $1 \times 10^6$  peptidbeladene PBMC zur Restimulation gegeben. Am zweiten Tag der Kokultur erfolgte die Zugabe verschiedener Zytokine (IL-2, IL-7 und IL-15). Nach weiteren fünf Tagen erfolgte eine erneute Stimulation der T-Zellen. Zur ELISpot Analyse wurden die T-Zellen fünf Tage nach der zweiten Stimulation verwendet.

#### **2.4.12 Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen**

Für eine Langzeitlagerung von humanen Zellen in flüssigem Stickstoff, wurden  $2 \times 10^6$  bis  $5 \times 10^6$  Zellen pelletiert und das Pellet in einem ml Einfriermedium resuspendiert und in spezielle Kryogefäße (Sarstedt, Nümbrecht) überführt. Mittels Einfriergefäßen (NALGENE<sup>™</sup> *Cryo 1 °C Freezing Container*; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) erfolgte zunächst eine langsame Abkühlung der Zellen, bevor diese in flüssigem Stickstoff gelagert wurden. Eine langsame Abkühlung sowie der Zusatz von DMSO im Einfriermedium verhindern die Zellschädigung durch Bildung von Eiskristallen.

Für die Rekultivierung der eingefrorenen Zellen wurden diese zügig aufgetaut und in vorgewärmtes Medium überführt, um die zytotoxische Wirkung des DMSO zu minimieren. Nach einem Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in frischem Medium ausgesät.

## **2.5 Kultivierung von Viren**

### **2.5.1 Virusstämme**

#### **Rekombinantes Virus (RV)-HB5**

Dieses Virus wurde durch die Rekonstitution des *Bacterial Artificial Chromosomes* (BACmid, BAC) pHB5 in HFF generiert (Besold et al., 2007; Borst et al., 1999). BACmide machen eine genetische Manipulation des Virusgenoms in Bakterien möglich (Shizuya et al., 1992). Bei einem BACmid handelt es sich um ein künstliches Chromosom, das auf dem F-Plasmid von *E. coli* beruht. Es ermöglicht die episomale Replikation von großen DNA Fragmenten. RV-HB5 ist ein Abkömmling des HCMV-Laborstammes (HCMV<sub>Lab</sub>) Ad169 (ROWE et al., 1956), bei dem die Gene US2-US6 durch das BAC ersetzt wurden.

**RV-TB40/E-BAC7**

Das BACmid dieses Virus-Stammes wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Christian Sinzger zur Verfügung gestellt. Bei RV-TB40/E handelt es sich um einen endotheliotropen HCMV-Stamm (kliniknahes Isolat; HCMV<sub>Klin</sub>), der Endothelzellen lytisch infizieren kann (Sinzger et al., 1999). Die Herstellung des BACmids erfolgte analog zu der Herstellung von RV-TB40/E-BAC4 (Sinzger et al., 2008), wobei die Gene US2-US6 durch das BAC ersetzt wurden. RV-TB40/E-BAC7 wurde durch die Rekonstitution des BACs pTB40/E-BAC7 in HFF erhalten.

**RV-TB40/E-BAC7pp65**

Das Virus wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch die Rekonstitution des BACmids pTB40/E-BAC7pp65 in HFF generiert. Das virale Genom enthält eine zusätzliche Kopie des pp65-Gens (UL83) unter der Kontrolle des *major immediate early*-Promotors (MIEP). Die Insertion erfolgte im Austausch gegen die genomische Region UL106-109 von HCMV. Diese Region kodiert für das IE4-Transkript und ist für die Replikation in HFF-Zellkultur nicht essentiell (Pepperl 2000).

**RV-Towne**

HCMV<sub>Lab</sub> RV-Towne wurde auf der Grundlage des pTowne-BAC, das freundlicher Weise von Dr. Hua Zhu zur Verfügung gestellt wurde, in HFF rekonstituiert. Dem pTowne-BAC fehlt die Region US1-US11 des HCMV-Genoms. Diese Region wurde für die Insertion des BAC-Vektors entfernt (Marchini et al., 2001; Dunn et al., 2003).

**RV-Towne-UL130repaired (RV-Towne<sub>rep</sub>)**

Das Virus wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch die Rekonstitution des BACmids pTowne-UL130repaired in HFF generiert. Das virale Genom enthält UL130 aus pTB40/E-BAC7, das gegen das genomische UL130 des pTowne-BAC ausgetauscht wurde. Durch den Austausch handelt es sich bei RV-Towne<sub>rep</sub> um einen endotheliotropen HCMV-Stamm (HCMV<sub>Klin</sub>) basierend auf HCMV<sub>Lab</sub> Towne.

**2.5.2 Virus-Rekonstitution aus BACmiden**

Für die Rekonstitution von Viren aus HCMV-BACmiden wurden diese in HFF transfiziert. Dazu wurden die BACmide zunächst mit dem "Plasmid DNA Purification"-Kit von Machery & Nagel (Düren) nach Herstellerangaben aus *E.coli* aufgereinigt. Die Transfektion der isolierten BACmide erfolgte mit SuperFect (Qiagen, Hilden). HFF wurden am Vortag in einer Dichte von  $1 \times 10^5$  Zellen pro 6-Well ausgesät. Die Transfektion erfolgte dann nach dem Protokoll des Herstellers für die transiente Transfektion adhärenter Zellen mit 5 µl bzw. 20 µl BAC-DNA. Da eine Konzentrationsbestimmung der BAC-DNA ungenau war, wurden immer zwei unterschiedliche Mengen zur Rekonstitution eingesetzt. Die transfizierten HFF wurden anschließend so lange passagiert, bis nach etwa 4 bis 6

Wochen ausreichend Plaques erkennbar waren. Der virushaltige Überstand wurde dann zur weiteren Passage auf neue HFF überführt. Für weiterführende Analysen wurde der Virusüberstand ab der dritten Viruspassage verwendet.

### **2.5.3 Herstellung virushaltiger Zellkulturüberstände**

Subkonfluente HFF wurden mit rekombinanten Viren infiziert und sechs bis acht Tage bei 37 °C inkubiert. Bei deutlich erkennbarem zytopathischen Effekt (CPE) wurde der virushaltige Zellkulturüberstand geerntet und durch einen Zentrifugationsschritt für 10 min bei 2.500 rpm in der Megafuge 2.0 von Zelltrümmern getrennt. Der jeweilige Überstand wurde dann in Aliquots bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert.

### **2.5.4 Bestimmung des Virustiters**

Nach Infektion mit HCMV kommt es initial zur Expression viraler Proteine, wobei das *Immediate Early* Protein 1 (IE1) besonders stark gebildet wird. Die Anzahl der Zellen, die IE1 exprimieren, wird als Maß für infektiöse Partikel in einem definierten Volumen Virusüberstand genommen.

Zur Bestimmung des Virustiters eines virushaltigen Zellkulturüberstandes wurden in eine 96-Lochplatte pro Vertiefung  $5 \times 10^3$  HFF oder ARPE-19 ausgesät. Am nachfolgenden Tag wurden die zu testenden Virusüberstände im Verhältnis  $10^{-3}$  und  $10^{-4}$  in dem entsprechenden Medium verdünnt und in Achtfachansätzen zu je 100 µl zu den Zellen gegeben. Nach 48 Stunden wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und für 20 min mit 96 % Ethanol fixiert, bevor die IE1-exprimierenden Zellen angefärbt wurden. Hierzu wurden die permeabilisierten Zellen, nach der Fixierung und einem erneuten Waschschrift, mit 50 µl Hybridomüberstand des IE1-spezifischen, monoklonalen Antikörpers p63-27 für eine Stunde in einer feuchten Kammer bei 37 °C inkubiert. Zur Detektion der infizierten Zellen wurde ein Meerrettich-Peroxidase (horseradish-peroxidase, HRP)-konjugierter Maus-IgG-spezifischer Sekundäantikörper verwendet ("Rabbit-anti-Mouse Immunoglobulins/HRP" Dako, Hamburg). Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS wurden 50 µl von einer 1:500 Verdünnung des Sekundäantikörpers für eine Stunde in einer feuchten Kammer bei 37 °C auf die Zellen gegeben. Die Anfärbung der infizierten IE1-positiven Zellen erfolgte nun nach zwei weiteren Waschschriften über die Zugabe von 100 µl einer 3-Amino-9-Ethyl-Carbazol (AEC)-Färbelösung pro Vertiefung. Zur Herstellung der Färbelösung wurde die AEC-Stammlösung in Acetatpuffer 1:20 verdünnt und eine 1:1.000 Verdünnung einer 30 %igen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Lösung hinzugefügt. Die Farbreaktion wurde nach einstündiger Inkubation bei 37 °C in einer feuchten Kammer durch Waschen mit PBS abgestoppt und die Zellen zur mikroskopischen Auswertung in 200 µl PBS belassen. Der Virustiter wurde über die Bestimmung des Mittelwertes aus den Achtfachansätzen mit der nachfolgenden Formel berechnet.

Anzahl infektiöser Partikel / ml Virusüberstand =  $N \times V \times 10$

N = Anzahl IE1-positiver Zellen (Mittelwert)

V = Verdünnungsfaktor

x 10 = Umrechnungsfaktor um von 100 µl auf 1 ml zu kommen

AEC-Stammlösung                    400 mg AEC (Sigma, Deisenhofen) in 100 ml n,n-Dimethylformamid (DMF)

Acetat-Puffer                        13,6 g Natriumacetat in 2,88 ml Eisessig, mit H<sub>2</sub>O ad 1 l, pH 4,9

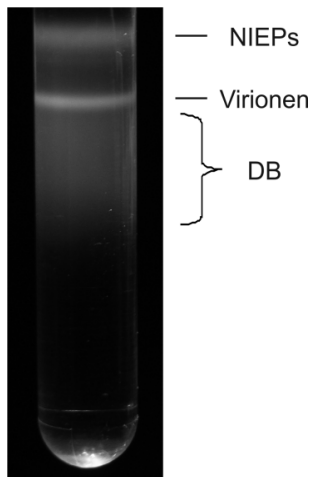
### 2.5.5 Infektion eukaryonter Zellen mit HCMV

Zur Infektion wurden subkonfluente HFF- bzw. ARPE-19-Kulturen verwendet. Die gewünschte Infektionsstärke in *multiplicity of infection (moi)* oder Genome pro Zelle wurde für eineinhalb Stunden mit den Zellen zur Adsorption inkubiert. Dabei wurde das Infektionsvolumen so gewählt, dass die Zellen gerade noch mit Medium bedeckt waren. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium aufgefüllt und die infizierten Zellen bis zur Verwendung bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

### 2.5.6 Aufreinigung viraler Partikel aus Zellkulturüberstand

Die in HFF-Zellkultur gebildeten viralen Partikel (NIEPs, Virionen, DB) können aus Zellkulturüberständen mittels eines positiven Dichte- / negativen Viskositäts-Gradienten-Systems separiert und aufgereinigt werden (Talbot und Almeida, 1977; Irmiere und Gibson, 1983). Bei einem deutlichen CPE von über 90 %, spätestens aber acht Tage nach Infektion, wurde der virushaltige Zellkulturüberstand geerntet und Zelltrümmer wie unter 2.5.3 beschrieben entfernt. Die Viruspartikel wurden bei 10 °C durch Ultrazentrifugation für 70 min im Rotor 45Ti bei 23.000 rpm pelletiert, bevor das Pellet in maximal 1 ml PBS resuspendiert wurde. Zur Auftrennung der unterschiedlichen viralen Partikel wurden diese auf den Dichte-Gradienten geschichtet, der sich aus 4 ml 35 % Na-Tartrat-Lösung und 5 ml 15 % Na-Tartrat-Lösung zusammensetzte. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 60 min bei 10 °C und 23.000 rpm ohne Bremse und mit langsamer Beschleunigung im SW41 Rotor. Aufgrund der unterschiedlichen Dichte der viralen Partikel werden diese aufgetrennt. Die DB finden sich dabei, aufgrund ihrer variablen Größe, in einer relativ diffusen Bande. Darüber war die dünne, scharfe Virionen-Bande zu erkennen und mit der geringsten Dichte bilden die NIEPs eine deutliche Bande relativ weit oben im Gradient (Abbildung 2).





**Abbildung 2: Dichtegradient einer HCMV-Partikelaufreinigung.** Entsprechend ihrer Dichte erfolgte die Auftrennung der viralen Partikel im Gradienten durch Ultrazentrifugation. Die Aufreinigung von HCMV-Partikeln zeigt drei typische Banden. Die oberste entspricht den NIEPs, die scharfe mittlere Bande den Virionen und die DB sind als diffuse Bande erkennbar.

Diese Banden der viralen Partikel wurden mit Kanülen (1,20 x 40 mm; B.Braun, Melsungen) abgezogen und auf 10 ml bzw. 20 ml mit PBS aufgefüllt, um sie zu waschen. Es folgte ein Zentrifugationsschritt im SW41 Rotor bei 24.000 rpm für 90 min bei 10 °C um die Partikel erneut zu pelletieren. Die Pellets wurden je nach Größe in 100 µl - 300 µl PBS aufgenommen und Aliquots bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

0,04 M Na-Phosphatpuffer	1,1 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 1 H <sub>2</sub> O und 5,7 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O, mit H <sub>2</sub> O ad 1 l, pH 7,4, autoklaviert
35 % Na- Tartrat-Lösung	207,5 g Na-Tartrat in 325 ml 0,04 M Na-Phosphatpuffer, autoklaviert
15 % Na-Tartrat-Lösung	88,9 g Na-Tartrat und 150 ml Glycerin in 275 ml 0,04 M Na-Phosphatpuffer, autoklaviert

### 2.5.7 Behandlung von Zellen mit aufgereinigten *Dense Bodies*

Die aufgereinigten DB (siehe 2.5.6) wurden auf eine Konzentration von 20 µg/ml Medium eingestellt. 500 µl dieses Materials wurden zu 5 x 10<sup>5</sup> Zellen in eine 10 cm Zellkulturschale bzw. eine Vertiefung einer 12-Lochplatte gegeben. Um jegliche Restinfektiösität der DB zu eliminieren, wurden in einem parallelen Ansatz jeweils 10 µg der Partikel vor Zugabe zu den Zellen in 500 µl Medium für 2 min mit einer Wellenlänge von 254 nm UV-bestrahlt. Die mit DB behandelten Zellen wurden bis zur Analyse weiter bei 37 °C inkubiert.

## 2.6 Molekularbiologische Methoden

### 2.6.1 Verwendete Plasmide

#### **pCDNA6-pp65\_35**

Dieses auf pCDNA6B basierende Plasmid (Invitrogen, Karlsruhe) wurde von S. Thirion kloniert. Es enthält neben einer Ampicillin-Resistenzkassette das Gen für pp65 (UL83) unter der Kontrolle des HCMV-MIEP. Das pp65-Gen kann über *Bam*HI-Schnittstellen freigesetzt werden.

#### **pgalK**

Dieses auf pBluescript (Stratagene, La Jolla, CA, USA) basierende Plasmid wurde freundlicherweise von Prof. Neil Copeland, *National Cancer Institute*, Frederick, Maryland, zur Verfügung gestellt (Warming et al., 2005). Es enthält die Gene für die Galaktokinase, *galK*, die unter der Kontrolle des bakteriellen *em7* Promotors stehen. *pgalK* diente als *PCR-Template* zur Amplifikation des *galK*-Fragmentes, welches dann über homologe Rekombination in pTowne-BAC inseriert wurde.

### 2.6.2 Verwendete BACmide

#### **pHB5**

Dieses BACmid enthält das Genom des HCMV<sub>Lab</sub> Ad169. Der BAC-Vektor wurde zwischen US1 und US7 inseriert. Die genomische Region zwischen US2 und US6 wurde durch die Insertion deletiert (Borst et al., 1999).

#### **pTB40/E-BAC7**

Dieses BACmid enthält das Genom des HCMV<sub>Klin</sub> TB40/E und wurde freundlicherweise von Prof. Christian Sinzger, Institut für Virologie, Universitätsklinikum Ulm, zur Verfügung gestellt. Die Klonierung erfolgte analog zur Herstellung von pTB40/E-BAC4 (Sinzger et al., 2008). Der BAC-Vektor wurde zwischen US1 und US7 inseriert. Die genomische Region zwischen US2 und US6 wurde durch die Insertion deletiert.

#### **pTB40/E-BAC7pp65**

Das BACmid pTB40/E-BAC7pp65 wurde im Rahmen dieser Arbeit hergestellt. Es enthält eine zusätzliche Kopie des pp65-Gens (UL83) unter der Kontrolle des MIEP. Die Insertion ins HCMV-Genom erfolgte unter Austausch gegen die Region UL106-UL109. Eine Selektion positiver Klone konnte über eine Ampicillin-Resistenzkassette erfolgen. Das UL83-Gen sowie die Resistenzkassette wurden aus dem Plasmid pCDNA6-pp65\_35 amplifiziert und über homologe Rekombination gegen UL106-UL109 ausgetauscht. Diese Region ist für die Replikation in HFF Zellkultur nicht essentiell (Pepperl 2000).

### **pTowne-BAC**

Dieses BACmid enthält das Genom des HCMV-Laborstammes Towne und wurde freundlicherweise von Prof. Hua Zhu, *Department of Microbiology and Molecular Genetics, New Jersey Medical School*, zur Verfügung gestellt. Die Insertion des BAC-Vektors zur ursprünglichen Klonierung führte zur Verkürzung des IRS1-Gens von HCMV nach 719 Basen sowie zur Deletion der genomischen Region von US1 bis US11 und des 3'-Endes von US12 (Marchini et al., 2001).

### **pTowne-UL130repaired (pTowne<sub>rep</sub>)**

Das BACmid pTowne<sub>rep</sub> basiert auf dem pTowne-BAC und wurde im Rahmen dieser Arbeit kloniert. Zur Herstellung wurde über einen Zwischenschritt das Gen UL130 des pTowne-BACs gegen UL130 aus pTB40/E-BAC7 ausgetauscht. Damit wurde das Genom so verändert, dass es sich nun nicht mehr um einen HCMV<sub>Lab</sub> handelt.

## **2.6.3 Isolierung von DNA**

### **2.6.3.1 Isolierung von BACmid- / Plasmid-DNA aus *E.coli***

Für die Isolierung geringer Mengen BACmid-DNA wurde nach dem Prinzip der alkalischen Lyse verfahren. Unter Verwendung der Puffer des "High Purity Plasmid Purification"-Kits von Marligen Bioscience (Rockville, MD, USA) wurde DNA aus 10 ml Übernachtskultur gewonnen. Die Bakterien wurden zunächst für 5 min bei 3.500 rpm in der Megafuge 2.0 pelletiert und das Pellet anschließend in 200 µl E1-Puffer (Suspensionspuffer) aufgenommen. Nach Durchmischung mit 300 µl E2-Puffer (Lysispuffer), wurden 300 µl E3-Puffer (Neutralisationspuffer) hinzugefügt, durchmischt und für 5 bis 10 min auf Eis inkubiert. Die ausgefallene chromosomale DNA wurde über einen Zentrifugationsschritt in der Kühlzentrifuge 5417R für 10 min bei 14.000 rpm pelletiert. Durch Inkubation des Überstandes mit 600 µl Isopropanol wurde die Plasmid-DNA gefällt und anschließend für 30 min bei 14.000 rpm und 4 °C pelletiert. Nach einem Waschschrift mit 1 ml 70 % Ethanol (5 min, 14.000 rpm, 4 °C), wurde die Plasmid-DNA in H<sub>2</sub>O aufgenommen und einem RNase-Verdau (20 µg/ml) für 10 min bei 37 °C unterzogen.

Für die Isolierung größerer Mengen BACmid- bzw. Plasmid-DNA wurden 200 ml Übernachtskultur verwendet. Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des "High Purity Plasmid Purification"-Kits von Marligen (Rockville, MD, USA) isoliert und BACmid-DNA mittels des "Plasmid DNA Purification"-Kits von Machery & Nagel (Düren), jeweils nach Herstellerangaben. BAC-DNA konnte aufgrund der großen Größe und der Anfälligkeit gegenüber Scherkräften nur bei 4 °C gelagert werden, während Plasmid-DNA bei -20 °C gelagert werden konnte.

### 2.6.3.2 Isolierung viraler DNA aus infizierten Zellen bzw. aus Zellkulturüberstand

Die Isolierung viraler DNA aus infizierten HFF oder Epithelzellen, sowie aus virushaltigem Zellkulturüberstand erfolgte nach Herstellerangaben mit Hilfe des "High Pure Viral Nucleic Acid"- Kits von Roche (Mannheim). Bis zur Verwendung als PCR-*Template* wurde die virale DNA bei -20 °C gelagert.

### 2.6.4 Fällung von DNA mit Isopropanol

Durch eine Fällung der DNA mit Isopropanol kann nicht nur die Konzentration einer Lösung erhöht werden, sondern es werden auch Salze entfernt. Die DNA-Lösung wurde dazu mit 1,5 M NaCl versetzt, bevor 0,8 Volumen Isopropanol zugefügt wurden. Nach einer 20 minütigen Inkubation auf Eis wurde die DNA bei 4 °C für 10 min bei 14.000 rpm in einer Kühlzentrifuge pelletiert. Anschließend wurde mit 70 % Ethanol für 5 min bei 14.000 rpm gewaschen. Das luftgetrocknete Pellet wurde in einem geeigneten Volumen H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 2.6.5 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration einer DNA-haltigen Lösung wurde durch die Messung der OD bei 260 nm im Nanodrop-Photometer bestimmt. Eine OD<sub>260</sub> von 1 entsprach 50 µg/ml DNA. Über die Reinheit der DNA gab die Ratio 260 nm / 280 nm Aufschluss. H<sub>2</sub>O diente als Referenz.

### 2.6.6 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse oder Aufreinigung von DNA-Fragmenten fand die Agarose-Gelelektrophorese Verwendung. Abhängig von der Größe der zu analysierenden Fragmente wurden Gele mit einem Agarosegehalt von 0,8 % (w/v) bis 1 % (w/v) in TBE-Puffer verwendet. Aufgrund der negativen Ladung der DNA, hervorgerufen durch die Phosphatgruppen, bewegen sich die DNA-Moleküle im elektrischen Feld zur Anode. Die Auftrennung erfolgt nach Größe durch den Widerstand der Matrix des Gels. Die zu analysierenden Proben wurden 1:5 mit Auftragspuffer vermennt und im Vergleich zu 0,5 µg DNA-Größenmarker "1 kb-DNA-Ladder" von PeqLab (Erlangen) analysiert. Zur Visualisierung der DNA-Fragmente waren dem Gel 0,05 mg/ml Ethidiumbromid zugesetzt, das in die DNA interkaliert und im UV-Licht sichtbar gemacht werden kann.

Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer      89 mM Tris-Borat und 2 mM EDTA, pH 8,0

Auftragspuffer für DNA-Gele      50 mg Bromphenolblau, 100 mg Xylencyanol, 1 mM EDTA  
und 25 g Saccharose, mit H<sub>2</sub>O ad 50 ml

### **2.6.7 DNA-Extraktion aus Agarosegelen**

Zur Extraktion wurde das gewünschte DNA-Fragment unter UV-Licht aus dem Agarosegel nach der Elektrophorese ausgeschnitten und mit dem "QIAquick Gel Extraction"-Kit von Qiagen (Hilden) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

### **2.6.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Für die *in vitro* Amplifikation definierter DNA-Sequenzen von einer Matrize (*Template*) diente die Methode der PCR (Saiki et al., 1988). Unter Verwendung einer thermostabilen DNA-Polymerase werden durch zyklische Wiederholung von Denaturierung, Primerhybridisierung und DNA-Synthese (Elongation) kleinste DNA-Mengen exponentiell vervielfältigt.

#### **2.6.8.1 Verwendete Oligonukleotide (Primer)**

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Martinsried) bezogen. Große Primer über 40 Basen wurden von der Firma einer HPLC-Reinigung unterzogen.

CA1fwd*	5'	<b>AAC TTA TCC GTT TCC CCG GTC CGC GGT GTC TCC TCG CGA GGC TGA CAG TCA AGT TCC TAT ACT TTC TAG AGA ATA GGA ACT TGA GTA AAC TTG GTC TGA CAG</b> 3'
CA1rev*	5'	<b>CCG CAG CAT GCC GCC CCA GTC CGC CAC CCA ACT GCG CGT CCC AGG TAG GTA AGT TCC TAT TCT CTA GAA AGT ATA GGA ACT TAA GCC ATA GAG CCC ACC GCA</b> 3'
CA2fwd*	5'	<b>TGA CGC GCG GTT TTC AAA ATT CCC TGC GCG CGC GAC GGG CTC AAA CGA TGC CTG TTG ACA ATT AAT CAT CGG CA</b> 3'
CA2rev*	5'	<b>CAA CGC CCT GTC TGG CGT CTC CCT GGT CGA CGC TAA CGG CAA ACC AGA ATT CAG CAC TGT CCT GCT CCT T</b> 3'
CA3fwd	5'	CCA CAA CGC CGT CAA GAA C 3'
CA3rev	5'	CCA CTT TCA CTG CCT GCT TCT G 3'
CA4fwd	5'	GTA CGC GAC GGT GAA GCG ATT G 3'
CA4rev	5'	CCG AGG TGT CGT TGC TCA TCA G 3'
CMV-FP	5'	TCA TCT ACG GGG ACA CGG AC 3'
CMV-RP	5'	TGC GCA CCA GAT CCA CG 3'
JH6rev	5'	GCT TCG GCC TCG CTG ATC G 3'
S1fwd	5'	TCT TTA TCG TCG TCG TCG CCG GCT TCG 3'
S2rev	5'	GTG TCT CCG TGA CGG TAC TTA TC 3'
SR14	5'	TGT TCC GCT TCC TTT AGC AG 3'
SR38	5'	GGC TGC GCT CTT CTT TTT C 3'

Die mit einem \* versehenen Primer wurden speziell für die BAC-Mutagenese konzipiert. Die fettgedruckten Bereiche sind homolog zu der Zielregion im Virusgenom, in die das PCR-Produkt inseriert werden sollte, um eine homologe Rekombination zu ermöglichen. Die normalgedruckten Bereiche entsprechen kurzen Abschnitten der *Template*-DNA.

#### 2.6.8.2 Durchführung einer PCR

Die PCR wurde üblicherweise in einem Reaktionsansatz von 50 µl 1 x PCR-Puffer durchgeführt. Von der *Template*-DNA wurden 0,1 bis 200 ng eingesetzt. Neben jeweils 2-5 pmol der beiden Primer wurden 10 mM dNTPs (PeqLab, Erlangen) sowie die DNA-Polymerase zugefügt. Für analytische Zwecke wurden 1,3 U der "mi-Taq-only" von Metabion (Martinsried) eingesetzt, während für PCR-Produkte, die für die BAC-Mutagenese bestimmt waren, 2,6 U "Expand High Fidelity Enzyme mix" von Roche (Mannheim) verwendet wurden.

Im PCR-*Cycler* wurde die PCR unter Verwendung des folgenden Programms durchgeführt:

Initiale Denaturierung	2 min	94 °C	} 30 - 35 Zyklen
Denaturierung	1 min	94 °C	
Hybridisierung	1 min	... - ... °C	
Elongation	1 min - 4,5 min	72 °C	
Terminale Elongation	10 min	72 °C	

Abhängig der Schmelztemperatur des jeweiligen *Primer*-Paars wurde die Hybridisierungstemperatur festgelegt. Die Dauer des Elongationsschrittes richtete sich nach der Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragments, mit einem Richtwert von 1.000 bp pro Minute.

### 2.6.8.3 Kolonie-PCR

Um eine Vielzahl an Klonen gleichzeitig und zügig auf die gewünschte DNA-Modifikationen hin untersuchen zu können, wurde Gesamt-DNA direkt aus der *E.coli*-Kolonie gewonnen und einer PCR-Analyse unterzogen. Dazu wurde zunächst eine Einzelkolonie in 15 µl H<sub>2</sub>O gepickt und für 5 min auf 100 °C erhitzt, um die Zellen aufzubrechen. Die zurückbleibenden Zelltrümmer wurden durch einen Zentrifugationsschritt für 1 min bei 14.000 rpm sedimentiert und 5 µl der DNA im Überstand direkt für die PCR eingesetzt.

### 2.6.8.4 Aufreinigung von PCR-Produkten

PCR-Produkte zwischen 100 bp und 10 kbp wurden mit dem "QIAquick PCR Purification"-Kit von Qiagen (Hilden) aufgereinigt. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

### 2.6.8.5 Template-Eliminierung

Um parentale, methylierte und nicht modifizierte *Template*-DNA aus einem PCR Ansatz zu entfernen, wurde das PCR-Produkt mit *DpnI* verdaut. Dazu wurde das PCR-Produkt mit *DpnI* (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) bei 37 °C nach Herstellerangaben inkubiert.

### 2.6.9 Quantitative Real-Time PCR (Taqman<sup>TM</sup> PCR)

Um virale Genome zu quantifizieren kann die Bestimmung der Anzahl an *Template*-DNA in einer Probe herangezogen werden. Mittels sogenannter Taqman<sup>TM</sup>-Sonden (Livak et al., 1995), die am 5'-Ende ein Reporter-Fluorochrom und am 3'-Ende ein Quencher-

Fluorochrom tragen, kann direkt proportional die Menge der in der Probe vorhandenen *Template*-DNA bestimmt werden. Das Emissionsspektrum des Reporter-Fluorochroms überlappt dabei mit dem Absorptionsspektrum des Quencher-Fluorochroms. Durch die räumliche Nähe der beiden Fluorochrome tritt der sogenannte Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) auf, wodurch die Fluoreszenz des Reporter-Fluorochroms abgeschwächt wird. Binden die Taqman<sup>TM</sup>-Sonden an die Zielsequenz im Genom und werden durch die Taq-Polymerase elongiert, so kommt es aufgrund der 5'-3'-Exonukleasefunktion der Polymerase zur Hydrolyse der Sonden. Dadurch werden beide Fluorochrome voneinander getrennt und die Fluoreszenz des Reporter-Fluorochroms entspricht der Anzahl der amplifizierten Zielsequenz.

Durchführung:

Zur Quantifizierung der Probe wurde jeweils ein Standard, eine Verdünnungsreihe des Cosmids pCM1049 (Fleckenstein et al., 1982), mitgeführt. Unter anderem kodiert dieses Cosmid für UL54, dem HCMV-Gen, gegen das sich die Taqman<sup>TM</sup>-Sonde richtete (5' CCACTTTGCCGATGTAACGTTTCTTGCAT 3'). Als Reporter-Fluorochrom trug die Sonde 6-Carboxyfluorescein und als Quencher-Fluorochrom Tetramethylrhodamin. Jede Probe wurde in Triplets analysiert, wobei ein PCR-Ansatz insgesamt 50 µl umfasste und neben 5 µl *Template*- bzw. Standard-DNA folgende Bestandteile in den jeweiligen Endkonzentrationen enthielt:

PCR Puffer (Qiagen, Hilden)	1 x Puffer mit 1,5 mM MgCl <sub>2</sub>
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
dNTPs (PeqLab, Erlangen)	0,2 mM
CMV-FP	0,3 µM
CMV-RP	0,3 µM
Taqman <sup>TM</sup> -Sonde (TIB Molbiol, Berlin)	0,1 µM
X-Rhodamin (TIB Molbiol, Berlin)	0,5 µM
Hot Star-Taq (Qiagen, Hilden)	2,5 U



Im *Real-Time Cycler* wurde die Reaktion mit folgenden Bedingungen durchgeführt:

Aktivierung	5 min	94 °C	} 45 Zyklen
Denaturierung	15 sec	94 °C	
Hybridisierung +	1 min	60 °C	
Elongation			

Ausgewertet wurde die Messung mit Hilfe der Betriebssoftware des Real-Time-Cyclers (7500 Real Time PCR System; Applied Biosystems, Life Technologies GmbH, Darmstadt) über die Erstellung einer Eichkurve aus den Messpunkten der Standardreihe.

### 2.6.10 Genetische Manipulation des HCMV-Genoms durch BAC-Mutagenese

Die Klonierung des kompletten HCMV-Genoms von 230 kbp in BACmide-Vektoren hat die Möglichkeit eröffnet, genetische Veränderungen nunmehr gezielt in Bakterien vorzunehmen (Borst et al., 1999). Dies hat die Mutagenese von HCMV wesentlich vereinfacht. Bei BACmiden handelt es sich um Vektoren, die auf dem *E.coli* F-Plasmid basieren und große Fragmente eukaryotischer DNA enthalten können. Die BACs liegen in geringer Kopienzahl in der Zelle vor und es kommt nur selten zu Rearrangierungen (Shizuya et al., 1992). In der Literatur sind mittlerweile diverse BACs beschrieben, welche das HCMV-Genom verschiedener Stämme beinhalten (Borst et al., 1999; Hobom et al., 2000; Yu et al., 2002; Marchini et al., 2001; Hahn et al., 2003; Sinzger et al., 2008). Basierend auf Red $\alpha$ , Red $\beta$  und Red $\gamma$  Genen des Bakteriophagen  $\lambda$  wurde ein Rekombinationssystem entwickelt, das es erlaubt, lineare DNA-Fragmente, wie beispielsweise PCR-Produkte, über homologe DNA-Abschnitte zielgenau ins virale Genom zu inserieren (Zhang et al., 1998; Muylers et al., 1999). Diese Rekombinationsproteine brauchen nur eine Homologie von 30 bis 50 Nukleotiden, die durch synthetische Oligonukleotide dem einzusetzenden PCR-Produkt angehängt werden können. Da solche homologen Rekombinationen seltene Ereignisse darstellen, wird mit verschiedenen Selektionsmarkern gearbeitet, die häufig in einem zweiten Rekombinationsschritt wieder aus dem Genom entfernt werden können.

#### 2.6.10.1 Herstellung von BACmiden über positive Selektion mit Ampicillin

Für die Konstruktion eines Virus, das im TB40/E-BAC7 Genom eine zusätzliche pp65-Genkopie enthielt (TB40/E-BAC7pp65), wurde zunächst ein PCR-Produkt erstellt, das neben pp65 unter der Kontrolle des HCMV-MIEP auch eine Ampicillin-Resistenzkassette enthielt. Als *Template* diente das Plasmid pCDNA6-pp65. Unter Verwendung der Primer CA1fwd und CA1rev wurde ein PCR-Produkt generiert, das über die verwendeten Primer homologe Überhänge zu den Genen UL106 und UL109 enthielt. Das Produkt wurde aufgereinigt (siehe 2.6.8.4), durch einen *DpnI*-Verdau wurde die *Template*-DNA entfernt

(siehe 2.6.8.5). Eine weitere Aufarbeitung erfolgte durch Gelextraktion (siehe 2.6.7) und Isopropanolfällung (siehe 2.6.4), bevor das PCR-Produkt in einem möglichst geringen Volumen H<sub>2</sub>O (maximal 20 µl) aufgenommen wurde.

Für eine Modifikation des BACmids von TB40/E-BAC7 wurde der *E. coli* Stamm EL250 eingesetzt. Die für die Rekombination notwendigen Gene werden in diesem Stamm unter Kontrolle eines temperatursensitiven Promotor exprimiert. Zur Vermeidung einer unkontrollierten Aktivierung des Systems wurde *E. coli* EL250 bei 32 °C kultiviert. Ein ml einer Übernachtskultur wurde in 50 ml LB-Medium überführt, das Chloramphenicol zur Selektion der BACmid-haltigen Bakterien enthielt. Nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> von etwa 0,6 wurden 10 ml der Kultur zur Induktion des Rekombinationssystems 15 min bei 42 °C inkubiert. Als Negativkontrolle wurden 10 ml der gleichen Kultur weiter bei 32 °C geschüttelt. Die weitere Behandlung erfolgte für beide Ansätze gleich.

Zum Abstoppen der Reaktion wurden die Kulturen für 10 min auf Eis inkubiert, bevor die Bakterien dreimal mit eiskaltem H<sub>2</sub>O gewaschen wurden. Das Pellet wurde in 100 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und 50 µl davon zur Elektroporation mit 500 ng des PCR-Produktes eingesetzt (2.3.4.3). Zur Expression der Ampicillin-Resistenzkassette, die durch das PCR-Produkt zusammen mit dem pp65-Gen in den Bereich zwischen UL106-UL109 integriert wurde, wurden die elektroporierten Bakterien zunächst für 90 min bei 32 °C in LB-Medium ohne Antibiotikazusatz geschüttelt. Nachfolgend wurden die Bakterien in geeigneten Verdünnungen auf LB-Platten ausgestrichen (siehe 2.3.3.2), die neben Chloramphenicol nun auch Ampicillin als Selektionsmarker enthielten. Über Nacht konnten somit nur Klone anwachsen, die das PCR-Produkt über homologe Rekombination ins Genom integriert hatten. Die erfolgreiche Mutagenese wurde mittels einer qualitativen PCR mit den Primern S1fwd und S2rev, sowie SR38 überprüft (siehe 2.6.8.3), bevor die positiven Klone kryokonserviert wurden (siehe 2.3.3.3). Bestätigt wurde die Modifikation des im BACmid enthaltenen viralen Genoms mittels Restriktionsanalyse (siehe 2.6.11) sowie über DNA-Sequenzanalysen (siehe 2.6.12).

#### **2.6.10.2 Herstellung von BACmiden über positive und negative Selektion mit der Galaktokinase**

Zum Austausch des Gens UL130 aus pTowne-BAC gegen UL130 aus pTB40/E-BAC7, wurde die positive und negative Selektion über die Galaktokinase (galK) genutzt (Warming et al., 2005). Dieses System erlaubt die Insertion von Genbereichen, ohne dass verfahrensbedingte Fremdsequenzen zurückbleiben. Um dieses System nutzen zu können, musste das zu modifizierende BACmid in *E. coli* SW102 vorliegen. Diesem Stamm fehlt das Gen für die Galaktokinase. Das Wachstum der Bakterien wird unterdrückt, wenn Galaktose als einzige Kohlenstoffquelle angeboten wird. Der Stamm enthält zusätzlich das Rekombinationssystem des Phagen λ.

Für die positive Selektion wurde zunächst das *galK*-Gen aus *pgalK* mit den Primern CA2fwd und CA2rev amplifiziert. Durch die Verwendung dieser Primer wurde *galK* durch 50 Nukleotide flankiert, die homolog zu den Insertionsstellen im UL130-Bereich des pTowne-BACs waren. Nach Aufreinigung und Aufarbeitung des PCR-Produktes wie unter 2.6.10.1 beschrieben, wurden 50 ml LB-Medium mit einem ml Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 kultiviert. Anschließend wurden 10 ml dieser Kultur einem Hitzeschock bei 42 °C zur Aktivierung des Rekombinationssystems unterzogen. Weitere 10 ml wurden bei 32 °C belassen. Nach Abkühlung beider Kulturen im Eiswasserbad, wurden die Bakterien für 6 min bei 0 °C und 4.500 rpm in einer Megafuge 2.0 pelletiert. Das Pellet wurde durch Schwenken in 1 ml eiskaltem H<sub>2</sub>O gelöst. Nach Zugabe von weiteren 19 ml kaltem H<sub>2</sub>O wurde erneut zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde wiederholt, bevor das Bakterienpellet für die Elektroporation in etwa 100 µl kaltem H<sub>2</sub>O resuspendiert wurde. 25 µl der Bakterienkultur, die jeweils pTowne-BAC enthielt, wurden mit etwa 150 ng des PCR Produktes transformiert (siehe 2.3.4.4). Nach Expression der Galaktokinase für eine Stunde bei 32 °C, wurden die Bakterien dreimal mit M9-Medium gewaschen und wieder pelletiert (20 Sekunden bei 13.200 rpm; Tischzentrifuge). Das Pellet wurde in 500 µl M9-Medium aufgenommen und in verschiedenen Verdünnungsstufen auf M63 Minimalplatten mit 1 mg/l D-Biotin, 45 mg/l L-Leucin und 0,2 % Galaktose, sowie 12,5 µg/ml Chloramphenicol, ausgestrichen. Nur Bakterienklone, die *galK* über homologe Rekombination in das BACmid integriert hatten, konnten auf diesem Minimalmedium mit Galaktose als einziger Kohlenstoffquelle wachsen.

Nach Inkubation für drei bis vier Tage bei 32 °C wurden einige der Klone zur Verdünnung auf MacConkey (Becton Dickinson, Heidelberg)-Indikatorplatten ausgestrichen. Die korrekte Insertion wurde über Kolonie-PCR (siehe 2.6.8.3) unter Verwendung der Primer CA3fwd und CA3rev bestätigt.

Ausgehend von diesen Klonen wurde im zweiten Schritt die *galK*-Kassette gegen UL130 des pTB40/E-BAC7s ausgetauscht. Hierzu wurde die Möglichkeit der negativen Selektion *galK*-exprimierender Bakterien genutzt. Zunächst wurde ein PCR-Produkt mit UL130 wie zuvor beschrieben hergestellt und aufgereinigt. Durch die Verwendung des Primer-Paares CA3fwd und CA3rev wurden Überhänge erzeugt, die homolog zur Insertionsstelle waren. 50 ml LB-Medium wurden mit 1 ml einer Übernachtskultur des pTowne-BAC-*galK* versetzt und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 kultiviert. Analog zur positiven Selektion erfolgten der Hitzeschock sowie die nachfolgenden Waschschriffe. Für die Elektroporation wurden diesmal 300 ng PCR-Produkt verwendet. Die transformierten Bakterien wurden in 10 ml vorgewärmtes LB-Medium überführt und für 4,5 Stunden bei 32 °C kultiviert. Waschschriffe und Ausplattieren erfolgte wie bei der positiven Selektion beschrieben. Im Gegensatz zu den M63 Minimalplatten der positiven Selektion enthielten die hier verwendeten Platten jedoch Desoxygalaktose (DOG, 0,2 %) und Glycerol (0,2 %) statt Galaktose als Kohlenstoffquelle. Alle Bakterienklone die noch das *galK*-Gen enthielten, phosphorylieren DOG zu 2-Desoxy-Galaktose-1-Phosphat. Dieses Produkt kann von den Bakterien nicht weiter verarbeitet werden und wirkt toxisch. Das Wachstum wird dabei

unterdrückt. Solche Klone, bei denen *galK* gegen UL130 aus pTB40/E-BAC7 über homologe Rekombination ausgetauscht wurde, können nur Glycerin als Kohlenstoffquelle nutzen, DOG wird nicht umgewandelt. So können sich bei 32 °C Kolonien auf den Selektionsplatten bilden.

Nach 3 bis 4 Tagen wurden von einigen Kolonien Verdünnungsausstriche auf LB-Platten mit Chloramphenicol hergestellt. Von den verdünnten Klonen wurden einige auf die erfolgreiche homologe Rekombination mittels Kolonie-PCR (siehe 2.6.8.3) mit den Primern CA4fwd und CA4rev getestet und die mutationsfreie Insertion von UL130 durch Restriktionsanalysen (siehe 2.6.11) und Sequenzierungen (2.6.12) bestätigt.

M63 Minimalmedium (5 x)	5 g (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 34 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 100 µl FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O (45 mM) ad 500 ml mit H <sub>2</sub> O, pH 7,0
M9 Medium (1 x)	6 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 3g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1 g NH <sub>4</sub> Cl, 0,5 g NaCl, ad 1 l mit H <sub>2</sub> O, autoklaviert

### 2.6.11 BAC-DNA Restriktionsanalyse

Zur Analyse der modifizierten BACmide wurde eine Restriktionsanalyse durchgeführt. Dazu wurden die präparierten BACmide (siehe 2.6.3.1) zunächst nach Herstellerangaben mit dem jeweiligen Enzym verdaut (New England Bioscience, Ipswich, MA, USA), bevor mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.6.6, 0,8 %iges Gel) die entstandenen Fragmente mit denen der ursprünglichen BACmide verglichen wurden.

### 2.6.12 Sequenzierung

Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Sequenzierungen wurden durch die Firma GENterprise GENOMICS (Mainz) durchgeführt. Dazu wurde der zu analysierende Bereich des viralen Genoms mittels PCR amplifiziert und per Home Run<sup>TM</sup> sequenziert.

## 2.7 Biochemische Methoden

### 2.7.1 Verwendete Antikörper

Die Lagerung aller Antikörper erfolgte bei 4 °C und die Entnahme unter sterilen Bedingungen.

**2.7.1.1 Antikörper für die Durchflusszytometrie**

Spezifität	Modifikation	Herkunft	Bezugsquelle	Verdünnung
CD11c	APC	Maus	Beckman Coulter, Marseille, Frankreich	1:50-1:100
CD3	V450 Horizon	Maus	Becton Dickinson, Heidelberg	1:50-1:100
CD4	PE	Maus	Beckman Coulter, Marseille, Frankreich	1:50-1:100
CD8	PerCP	Maus	Becton Dickinson, Heidelberg	1:50-1:100
CD40	PE	Maus	Beckman Coulter, Marseille, Frankreich	1:50-1:100
CD80	PE	Maus	Beckman Coulter, Marseille, Frankreich	1:50-1:100
CD83	PE	Maus	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach	1:50-1:100
CD86	PE	Maus	Beckman Coulter, Marseille, Frankreich	1:50-1:100
HLA-ABC	PE	Maus	Becton Dickinson, Heidelberg	1:50-1:100
HLA-DR	PE	Maus	Beckman Coulter, Marseille, Frankreich	1:50-1:100
IgG1	PE	Maus	Becton Dickinson, Heidelberg	1:50-1:100

**2.7.1.2 Antikörper für die Immunfluoreszenz****Primärantikörper**

Spezifität	Bezeichnung	Herkunft	Bezugsquelle	Verdünnung
IE1	Klon p63-27	Maus	(Andreoni et al., 1989)	unverdünnt
pp65	Klon p65-33	Maus	Dr. W. Britt, Birmingham, AL, USA	1: 10

**Sekundärantikörper**

Spezifität	Modifikation	Herkunft	Bezugsquelle	Verdünnung
Maus IgG, IgA, und IgM	FITC	Kaninchen	Dako, Hamburg	1: 500

**2.7.1.3 Antikörper für den Western-Blot**

**Primärantikörper**

Spezifität	Bezeichnung	Herkunft	Bezugsquelle	Verdünnung
$\beta$ -Aktin		Kaninchen	Rockland, Gilbertsville, PA, USA	1:400
pp65	Klon p65-33	Maus	Dr. W. Britt, Birmingham, AL, USA	1: 500
gB	27-287	Maus	Dr. W. Britt, Birmingham, AL, USA (Utz et al., 1989)	unverdünnt
UL128	4B10	Maus	Dr. T. Shenk, Princeton, New Jersey, USA (Wang und Shenk, 2005b)	unverdünnt
UL130	3C5	Maus	Dr. T. Shenk, Princeton, New Jersey, USA (Wang und Shenk, 2005b)	1:250

**Sekundärantikörper**

Spezifität	Modifikation	Herkunft	Bezugsquelle	Verdünnung
Kaninchen IgG	Alexa Fluor® 680	Esel	Life Technologies GmbH, Darmstadt	1:400
Maus IgG	IRDye 800	Esel	Rockland, Gilbertsville, PA, USA	1:5.000

**2.7.1.4 Antikörper für die Alkalische Phosphatase-anti-alkalische Phosphatase-Färbung**

**Primärantikörper**

Spezifität	Bezeichnung	Herkunft	Bezugsquelle	Verdünnung
pp65	Clonab CMV	Maus	Biotest AG, Dreieich	1:10

**Brückenantikörper**

Spezifität	Bezeichnung	Herkunft	Bezugsquelle	Verdünnung
Maus IgG	M5899	Ziege	Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA	1:25

**Sekundärantikörper**

Spezifität	Modifikation	Herkunft	Bezugsquelle	Verdünnung
Alkalische Phosphatase	Alkalische Phosphatase	Maus	Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA	1:50

**2.7.2 Aufreinigung von Antikörpern**

Die Aufreinigung von Antikörpern erfolgte mittels des "Montage Antibody Purification"-Kits mit Prosep-A Medium (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) nach Herstellerangaben.

### 2.7.3 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie (*Fluorescence activated Cell Sorting*; FACS) kann die Expression von Proteinen auf Einzelzellebene analysiert werden. Dazu finden Fluorochrom-gekoppelte Antikörper Verwendung, die spezifisch an ein Protein auf der Zelloberfläche oder auch im Zellinneren binden. Die so markierten Zellen werden einzeln durch einen Flüssigkeitsstrom geleitet, der von einem Laser bestrahlt wird. Über die Streuung des Laserstrahls können Aussagen über die Größe der Zellen (*Forward Scatter*) und über die Granularität (*Side Scatter*) getroffen werden. Über die Anregung des Fluorochroms eines Antikörpers können spezifisch intrazelluläre und Oberflächenmoleküle nachgewiesen werden.

Um zu untersuchen, inwieweit eine Behandlung von DC mit DB zu deren Ausreifung führt, wurden die unterschiedlich behandelten DC in der Durchflusszytometrie auf die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle analysiert. Dazu wurden die DC zunächst mit PBS gewaschen und das Pellet in FACS-Puffer (PBS + 1 g/l BSA) resuspendiert und auf 7 FACS-Röhrchen verteilt. Anschließend erfolgte die Inkubation der verschiedenen Antikörper (IgG1, CD40, CD80, CD83, CD86, HLA-ABC und HLA-DR) zusammen mit dem CD11c-Antikörper für 20 min im Dunkeln bei Raumtemperatur. Nachdem die DC mit FACS-Puffer gewaschen wurden, wurden sie in 100 µl FACS-Puffer für die Messung im Durchflusszytometer aufgenommen. Der Grad der Verunreinigung von DC mit CD3 positiven Zellen wurde analog unter Verwendung eines CD3-spezifischen Antikörpers überprüft.

Konzentration an CD8 bzw. CD4 T-Zellen nach immunomagnetischer Separation aus PBMC, wurden vor und nach der Aufreinigung mit CD3, CD4 und CD8 Antikörpern ermittelt.

Zur durchflusszytometrischen Messung wurde das Durchflusszytometer *FACSCanto II* (Becton Dickinson, Heidelberg) mit der Betriebssoftware *BD FACSDiva* (Becton Dickinson, Heidelberg) und den entsprechenden Puffern verwendet. Die weiterführende Auswertung erfolgte mit der Software *FlowJo*<sup>®</sup> (Tree star, Inc., Ashland, OR, USA).

### 2.7.4 Proteinkonzentrationsbestimmung

Basierend auf einem Farbumschlag einer Reagenzlösung proportional zur Proteinkonzentration einer Lösung, wurde mittels des "BCA Protein Assay"-Kits von Pierce (Rockford, IL, USA) die Proteinkonzentration einer Lösung bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte durch eine BSA-Eichgraden nach Herstellerangaben.



### 2.7.5 Zytospin

Zur Analyse der Antigenaufnahme von DC mussten diese auf Objektträger überführt werden. Dazu wurden die Objektträger (Cytoträger, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) zunächst in die entsprechenden Halterungen (EZ Double Cytofunnel, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) geklemmt.  $5 \times 10^4$  DC in maximal 200  $\mu$ l PBS wurden in die Trichter gegeben und für 5 min bei 800 rpm (Cytospin 4) auf die Objektträger zentrifugiert. Anschließend wurden die Spots über Nacht getrocknet, bevor pp65 über eine Alkalische Phosphatase-anti-alkalische Phosphatase (APAAP)-Färbung detektiert wurde (siehe 2.7.10).

### 2.7.6 Gelelektrophorese

#### 2.7.6.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine können durch die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) anhand ihres Molekulargewichtes aufgetrennt werden (Laemmli, 1970). Durch das anionische Detergenz werden die Proteine nicht nur denaturiert, sondern auch gleichmäßig mit negativer Ladung umhüllt. Anhand der Acrylamidkonzentration des Gels wird die Maschengröße bestimmt, die zur Auftrennung der Proteine nach Größe dient. Im elektrischen Feld wandern die Proteine daher je nach Molekulargewicht in unterschiedlicher Geschwindigkeit zur Anode. Zunächst wurden alle Proteine in einem Sammelgel synchronisiert, bevor die Trennung im Trenngel erfolgte. Zur Denaturierung, zum Zellaufschluss und zur Reduktion von Disulfidbrücken wurden die Proben 1:1 mit SDS-Probenpuffer verdünnt und aufgekocht. Für eine Größenabschätzung der aufgetrennten Proteine wurde der vorgefärbte "Protein Marker IV" (PeqLab, Erlangen) verwendet. Nach der SDS-PAGE wurden die Proteine mit Silbernitrat angefärbt.

Sammelgel	2,1 ml Gel 30 (Acrylamid:Bisacrylamid-Verhältnis 37:1), 8,65 ml H <sub>2</sub> O, 1,5 ml Tris 1,0 M (pH 6,8), 125 $\mu$ l 10% SDS, 125 $\mu$ l 10% APS und 15 $\mu$ l TEMED
Trenngel 10 %	6,7 ml Gel 30, 11,5 ml H <sub>2</sub> O, 6,25 ml Tris 1,5 M (pH 8,8), 250 $\mu$ l 10% SDS, 250 $\mu$ l 10% APS und 15 $\mu$ l TEMED
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin und 0,1% SDS in H <sub>2</sub> O
SDS-Probenpuffer	125 mM Tris, 2% $\beta$ -Mercaptoethanol, 10% Glycerin, 1 mM EDTA, 0,005% Bromphenolblau und 2% SDS in H <sub>2</sub> O

#### 2.7.6.2 Bis-Tris-PAGE

Ein weiteres System zur Auftrennung von Proteinen ist die Bis-Tris-PAGE. Zur Analyse kleiner Proteine sowie von Gesamtzellextrakten wurde dieses System verwendet. Während für die Analyse kleiner Proteine ein 4-12 % Gel verwendet wurde, erfolgte die Auftrennung von Gesamtzellextrakten mit einem 10 % igen Gel. Alle benötigten Materialien, sowie die

bereits fertigen Gele wurden von Life Technologies GmbH (Darmstadt) als Teile des Novex Bolt Gelsystems bezogen. Die Probenvorbereitung sowie die Durchführung der PAGE erfolgten nach Herstellerangaben. Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine auf eine PVDF Membran transferiert (siehe 2.7.8).

### **2.7.7 Silberfärbung**

Zum sensitiven Proteinnachweis wurden die SDS-Gele mit einer Silbernitratlösung angefärbt. Mit dem „Roti®-Black P“-Kit (Roth, Karlsruhe), das nach Herstellerangaben verwendet wurde, konnten Proteine ab 1 ng/mm<sup>2</sup> visualisiert werden.

### **2.7.8 Western Blot**

Um Proteine spezifisch nach der Gelelektrophorese mit Antikörpern nachweisen zu können, müssen diese zunächst auf eine PVDF-Membran transferiert werden. Dazu wurden die Gele nach der PAGE kurz in H<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend in Transferpuffer für 10 bis 20 min equilibriert. Eine auf die Gelgröße zurechtgeschnittene Membran (PVDF-Membran Immobilon-FL, Millipore, Billerica, MA, USA) wurde für 5 min in Methanol inkubiert, mit H<sub>2</sub>O gewaschen und ebenfalls für 10 min in Transferpuffer equilibriert. Auf die Kathodenplatte der Elektrobplot-Apparatur wurden zunächst drei zurechtgeschnittene Lagen Whatman-Papier (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) gelegt, die vorher in Transferpuffer getränkt worden waren. Auf diese Schicht wurde, luftblasenfrei, die Membran, dann passend das Gel gelegt. Darüber wurden nochmals drei in Transferpuffer getränkte und zugeschnittene Lagen Whatman-Papiere gelegt. Nach Auflegen der Anodenplatte erfolgte der Proteintransfer aus dem Gel auf die Membran für 1,5 Stunden mit 2 mA pro cm<sup>2</sup>. Nach dem Transfer wurde die Membran kurz in PBS gewaschen, bevor die freien Bindungsstellen durch eine einstündige Inkubation in *Blocking*-Puffer besetzt wurden. Der Erstantikörper wurde in *Blocking*-Puffer mit 0,1 % (v/v) Tween-20 verdünnt und die Membran mit dieser Lösung über Nacht, in Folie eingeschweißt, geschüttelt. Am Folgetag erfolgte nach drei Waschschritten mit PBS + 0,2 % (v/v) Tween-20 die Inkubation mit dem Sekundärantikörper. Die Verdünnung des Antikörpers erfolgte in *Blocking*-Reagenz mit 0,1 % Tween-20 und 0,1 % SDS. Diese Lösung wurde für zwei Stunden im Dunkeln auf die Membran gegeben und anschließend nicht gebundene Antikörper über zwei Waschschrritte mit PBS + 0,2 % Tween-20 entfernt. Der Nachweis der Fluoreszenz markierten Sekundärantikörper erfolgte nach einem Waschschrtritt mit PBS im "Odyssey Imager" (LI-COR, Lincoln, NE, USA). Eine weitere Auswertung, wie eine Quantifizierung, erfolgte mit der geräteinternen Software von LI-COR (Lincoln, NE, USA).

Transferpuffer	25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin und 10 % (v/v) Methanol in H <sub>2</sub> O
Blocking-Puffer	5 % (w/v) Milchpulver in PBS

### **2.7.9 Indirekte Immunfluoreszenz**

Um virale Proteine direkt in humanen Zellen nachzuweisen, wird häufig die indirekte Immunfluoreszenz verwendet. Die Bindung eines spezifischen Primärantikörpers wird dabei durch einen Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper sichtbar gemacht. Dazu wurden humane Zellen auf Deckgläschen ausgesät, die mit Aceton vorbehandelt waren. Am Folgetag erfolgte die Infektion oder die Inkubation mit nicht-infektiösen, viralen Partikeln. Zu ausgewählten Zeitpunkten wurden die Zellen in 90 % Aceton bei 4 °C über Nacht fixiert. Anschließend wurden die Präparate dreimal mit PBS + 0,1 % (v/v) Triton gewaschen und mit dem Primärantikörper für eine Stunde in einer feuchten Kammer bei 37 °C inkubiert. Nach weiteren, dreimaligen Waschschritten mit PBS + 0,1 % (v/v) Triton, wurden die Deckgläschen mit dem Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper bei 37 °C für eine Stunde in einer feuchten Kammer inkubiert. Zur Anfärbung des Zellkerns wurde unmittelbar nach Ablauf der Inkubationszeit der Hoechst-Farbstoff 4,6-Diamidido-2-Phenylindol (DAPI, (Tanious et al., 1992)) für 10 min im Dunkeln zugegeben. Nach dreimaligem Waschen mit PBS + 0,1 % Triton und einem letzten Waschschriff mit H<sub>2</sub>O wurden die Deckgläschen in Mowiol mit Bleichschutz eingebettet. Die Analyse erfolgte mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskope (Axiovert 25 und Axiophot, Zeiss, Jena) und zur Dokumentation wurde die Kamera Spot FLEX (Visitron System GmbH, Puchheim) sowie die dazugehörige Software verwendet.

### **2.7.10 APAAP-Färbung**

Nachdem die Zellen auf Objektträger zentrifugiert wurden (2.7.5), wurden die Spots über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurden die Spots in -20 °C kaltem Methanol:Aceton (1:1) für etwa eine Minute fixiert und für 5 min getrocknet. Die Objektträger wurden bei Raumtemperatur für 5 min in TBS gewaschen, danach für 30 min mit dem Primärantikörper in TBS mit 1 % BSA in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschriffen in TBS wurden die Objektträger für 30 min in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur mit dem Brückenantikörper behandelt. Nach zwei weiteren Waschschriffen in TBS wurde alkalische Phosphatase-anti-alkalische Phosphatase in TBS mit 1 % BSA auf die Spots gegeben und für 30 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Fuchsinfärbung wurde nach zwei Waschschriffen der Objektträger in TBS nach Herstellerangaben durchgeführt (Fuchsin+ Substrate-Chromogen System, Dako, Hamburg). Zur Visualisierung der Zellkerne wurde Hämatoxylin nach Harris Gill 2 (Thermo Scientific,

Waltham, MA, USA) für eine min bei Raumtemperatur verwendet. Durch Anhebung des pH-Wertes durch Spülen mit H<sub>2</sub>O, entsteht die typisch blau-violette Färbung der Kerne. Zum Schutz wurden die Spots mit 10-12 mm Deckgläschen und Mounting Medium (IFA Mounting Medium Focus, Genzyme Virotech GmbH, Rüsselsheim) eingedeckt.

## **2.8 Immunologische Methoden**

### **2.8.1 Tierversuche**

#### **2.8.1.1 Versuchstiere**

Alle in dieser Arbeit verwendeten Mäuse wurden in der Zentralen Versuchstiereinrichtung der Universitätsmedizin Mainz der Johannes Gutenberg-Universität unter *specified-pathogen-free* (SPF)-Bedingungen gezüchtet. Es wurden ausschließlich Balb/c-(Haplotyp H-2<sup>d</sup>) Mäuse im Alter von 8-12 Wochen für die Versuche eingesetzt.

Die verwendeten weißen Neuseelandkaninchen wurden von der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) gezüchtet und bereitgestellt.

#### **2.8.1.2 Immunisierung von Kaninchen**

Zur Induktion von neutralisierenden Antikörpern wurden je zwei Kaninchen viermal mit je 100 µg DB nach dem Schema 0, 14, 28, 56 ohne zusätzliche Adjuvantien subkutan immunisiert. Am Tag 87 erfolgte die Blutentnahme (Standardprotokoll von Eurogentec; Seraing, Belgien). Die entnommenen Seren wurden anschließend bei -20 °C in Aliquots gelagert und im Neutralisationstest analysiert.

#### **2.8.1.3 Immunisierung von Mäusen**

Zur Induktion von neutralisierenden Antikörpern wurden Mäuse zweimal intraperitoneal (i.p.) im Abstand von 14 Tagen immunisiert. Dabei wurden jeweils 10 µg DB oder Virionen in 500 µl PBS appliziert. Die Immunisierung erfolgte ohne die zusätzliche Gabe von Adjuvantien an nicht-narkotisierten Tieren. Nach der Immunisierung der Mäuse wurden diese an Tag 28 getötet und Blut entnommen. Die Blutentnahme erfolgte aus den großen retrobulbären venösen Gefäßen. Nach Agglutination des Blutes bei 4°C über Nacht, wurden die zellulären Bestandteile bei 8.700 rpm für 10 min bei 4 °C abzentrifugiert. Das Serum wurde in frische, sterile Reaktionsgefäße überführt und in kleinen Aliquots bei -20 °C gelagert.

### 2.8.2 *Enzyme-linked Immuno Spot Assay (ELISpot)*

Zum Nachweis aktivierter, IFN- $\gamma$  produzierender T-Zellen wurde ein ELISpot durchgeführt. Es fanden die ELISpot Platten Multiscreen HST<sup>TM</sup> IP der Firma Millipore (Schwalbach/Ts.) Verwendung. Nach Befeuchten der Membran mit 35 % Ethanol und drei Waschschritten mit PBS, wurde die Platte über Nacht bei 4 °C mit dem Primärantikörper Maus-anti-Mensch-IFN- $\gamma$  Klon 1-D1K (Mabtech AB, Stockholm, Schweden) inkubiert. Ungebundener Antikörper wurde in drei PBS-Waschschritten entfernt. Zum Blocken wurde die Platte mit AIM V mit 10 % HS für mindestens zwei Stunden bei 37 °C inkubiert, bevor die Vertiefungen mit Effektor- sowie Antigenpräsentierenden Zellen belegt wurden. Die Konzentration der T-Zellen variierte zwischen  $5 \times 10^4$  und  $15 \times 10^4$  Zellen in 50  $\mu$ l pro Vertiefung. Als antigenpräsentierende Zellen dienten DC, die zuvor für zwei Tage mit DB oder Virionen kokultiviert wurden, in einer Konzentration von  $50 \times 10^4$  in 50  $\mu$ l. Als Kontrolle wurden unreife DC verwendet, die mit  $10^{-7}$  M PepTivator<sup>®</sup> CMV pp65 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) beladen wurden. Bis zur Detektion des sezernierten IFN- $\gamma$  wurden die Zellen 20 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach sechs Waschschritten mit Waschpuffer wurde die Platte mit dem Biotin gekoppelten Sekundärantikörper (Maus- $\alpha$ -human-IFN- $\gamma$ , Klon 7-B6-1) für zwei Stunden behandelt. Es folgten sechs weitere Waschschrritte mit Waschpuffer, bevor 100  $\mu$ l Streptavidin-Mix (Streptavidin-Peroxidase-Kit, Vectastain, Vector Laboratories, INC., Burlingame, CA, USA) pro Vertiefung hinzugefügt wurden. Eine Stunde nach Zugabe des Mixes und Inkubation im Dunkeln, wurde die Membran der Platte dreimal mit Waschpuffer gewaschen und anschließend dreimal mit PBS. Die Visualisierung erfolgte durch die Zugabe von 100  $\mu$ l AEC-Lösung mit 0,5  $\mu$ l/ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für etwa 10 min. Zum Stoppen der Farbreaktion wurde die Platte gründlich mit Wasser gespült. Nachdem die Membran getrocknet war, erfolgte die Auswertung der Spots unter Verwendung des „CTL ELISpot reader S5 Versa Analyzer“ (Cellular Technology Limited, Shaker Heights, OH, USA) sowie der ImmunoCapture und der ImmunoSpot Software (Cellular Technology Limited, Shaker Heights, OH, USA).

3-amino-9-ethylcarbazol (AEC)-Lösung	10 AEC Tabletten in 25 ml DMF, auf 500 ml mit Acetat-Puffer
Acetat-Puffer	2,9 g/l Natriumacetat und 1,5 % (v/v) Essigsäure in H <sub>2</sub> O
Streptavidin-Peroxidase-Lösung	10 ml PBS mit 0,01 % (v/v) Tween-20 und 1 Tropfen Reagenz A und 1 Tropfen Reagenz B
Waschpuffer	PBS mit 0,05 % (v/v) Tween-20

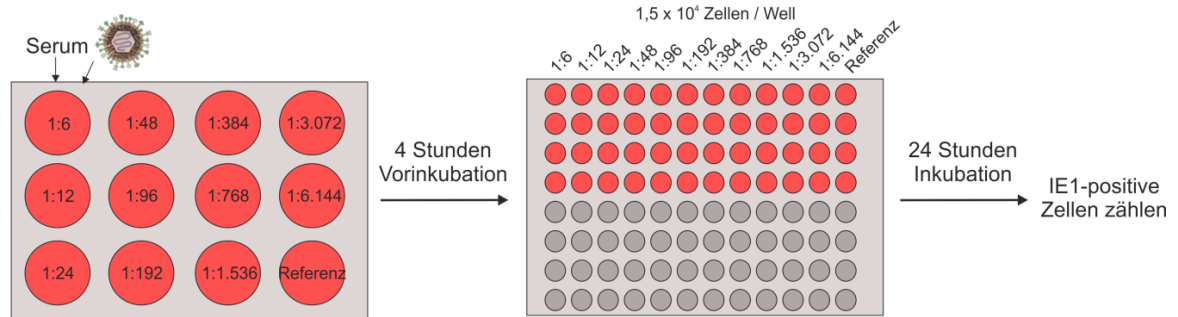
### 2.8.3 *Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)*

Zur Analyse aktivierter DC wurde der Zellkulturüberstand auf das Vorhandensein verschiedener Zytokine hin untersucht. Dazu fanden die aufgelisteten Kits nach Herstellerangaben mit jeweils unverdünntem Überstand Verwendung.

Kit	Hersteller
VeriKine™ Human IFN- $\alpha$ ELISA Kit	PBL InterferonSource (Piscataway, NJ, USA)
Human IL-6 ELISA Ready-SET-Go!	eBioscience (San Diego, CA, USA)
Human IL-12p70 ELISA Ready-SET-Go!	eBioscience (San Diego, CA, USA)
Human TNF- $\alpha$ ELISA Ready-SET-Go!	eBioscience (San Diego, CA, USA)
Human IL-1 $\beta$ ELISA Kit	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)

### 2.8.4 *Neutralisationstest*

Die Titer an HCMV-spezifischen, neutralisierenden Antikörpern in Serumproben wurden in Anlehnung an die von Andreoni und Kollegen publizierte Methode analysiert (Andreoni et al., 1989). Die Seren wurden hierzu entweder unbehandelt eingesetzt oder zuvor 30 min bei 56 °C hitzeinaktiviert. Anschließend wurden die Proben 1:6 in geeignetem Zellkulturmedium vorverdünnt. Die weitere Verdünnung erfolgte in Zwischenschritten bis zu einer Verdünnung von 1:6144. Als Referenzpunkt wurde ein Ansatz verwendet, in dem kein Serum zugegeben wurde. Zu den Serumverdünnungen wurde in gleichem Volumen Virusüberstand gegeben, der so verdünnt wurde, dass in der Referenz etwa 250-300 positive Zellen sichtbar wurden (Abbildung 3). Das Serum-Virus-Gemisch wurde für vier Stunden im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Währenddessen wurden die ARPE-19 in einer Konzentration von  $1,5 \times 10^4$  in 25  $\mu$ l DMEM:F12 10 % FKS pro Vertiefung in eine zuvor mit 0,1 % Gelatine behandelte 96-Lochplatte ausgesät und für mindestens drei Stunden inkubiert. In gleicher Konzentration wurden HFF in MEM 5 % FKS 15 Minuten vor Zugabe des Serum-Virus-Gemisches ausgesät. Im Anschluss wurden je 100  $\mu$ l des Gemisches auf die Zellen gegeben und für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Anfärbung des Kerns infizierter Zellen erfolgte mit Hilfe des IE1-spezifischen, monoklonalen Primärantikörpers. Die Färbung erfolgte wie unter 2.5.4 beschrieben. Zur Quantifizierung wurden die positiven Zellkerne mikroskopisch ausgezählt. Der Titer, bei dem im Vergleich zur Infektion ohne Zusatz von Serum mindestens 50 % oder mehr der Infektion neutralisiert wurden, wurde als neutralisierender Titer 50 (NT50) bestimmt.



**Abbildung 3: Schema des Neutralisationstests.** Das Serum wurde in geeignetem Zellkulturmedium vorverdünnt. Virusüberstand wurde in gleichem Volumen dazugegeben, so verdünnt, dass in der Referenz ohne Serum 250-300 IE1-positive Zellen zählbar waren. Das Serum-Virus-Gemisch wurde für vier Stunden bei 37 °C vorinkubiert. Anschließend wurde das Gemisch in Vierfachansätzen auf die zuvor ausgesäten Zellen gegeben und bei 37 °C inkubiert. 24 Stunden später wurden IE1-positive Zellkerne angefärbt und mikroskopisch ausgezählt.

Der Neutralisationstest mit Endothelzellen (HUVEC) wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Christian Sinzger durchgeführt. Hier wurden, kurz zusammengefasst,  $1,5 \times 10^4$  Zellen ausgesät. Die jeweils zu testenden Seren wurden 1:10 vorverdünnt. Die weitere Verdünnung erfolgte in Zweierschritten bis zu einer Verdünnung von 1:640. Als Referenz diente auch hier ein Ansatz ohne Serumzugabe. RV-TB40/E wurde mit einer *moi* von 1,7 eingesetzt. Nach zwei Stunden Koinkubation des Virus mit dem Serum, wurde das Gemisch auf die Zellen gegeben. 24 Stunden später wurden IE1-positive Zellen über eine Immunfluoreszenzfärbung mit dem E13-Antikörper (Abcam, Cambridge, UK) angefärbt. Die Dokumentation erfolgte automatisch mit der Zeiss Axiovision Software (Zeiss, Jena). Durch Auszählen der infizierten Zellen und der DAPI gefärbten Zellkerne, konnte neben dem NT50 auch die Infektionsrate bestimmt werden.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Einfluss von DB Behandlung auf iDC

Die Infektion mit HCMV unterliegt einer effizienten Kontrolle durch das Immunsystem. Beim *Priming* einer antiviralen Immunantwort nehmen DC eine zentrale Stellung ein (Gredmark-Russ und Soderberg-Naucler, 2012). Unreife, aus peripheren Blutmonozyten etablierte DC (*immature* DC, iDC) unterstützen die HCMV-Replikation. Dies trifft jedoch nur auf solche Stämme zu, die in ihrer Hülle den pentameren Komplex aus gH/gL und pUL128-UL131A exprimieren (Riegler et al., 2000; Gerna et al., 2005). Eine HCMV-Infektion von iDC führt zur Hemmung der Ausreifung und Aktivierung dieser Zellen, sie ist somit geeignet, das *Priming* einer antiviralen Antwort zu behindern (Raftery et al., 2001; Sinclair, 2008; Moutaftsi et al., 2002; Beck et al., 2003). Demgegenüber führt die Immunisierung mit DB, auch ohne die Zugabe von Wirkverstärkern, zur Induktion von ausgeprägten zellulären und humoralen Immunantworten (Pepperl et al., 2000; Becke et al., 2010a). Wir stellten daher die Hypothese auf, dass, im Gegensatz zur HCMV-Infektion, die Interaktion von DB mit DC zur Ausreifung und Aktivierung der Zellen führt und dass dies das für ein Totantigen herausragende immunogene Potential dieser Partikel erklärt.

Zur Analyse, ob DB den Prozess der Ausreifung und Aktivierung von iDC unterstützen würden, wurden zunächst iDC aus PBMC HCMV-seronegativer Spender etabliert. Der Grad der Kontamination mit Lymphozyten wurde mittels Durchflusszytometrie mit CD3-spezifischen Antikörpern analysiert. 99 % der Zellen wurden als CD3-negativ gemessen.

DB und Virionen der Stämme RV-HB5 oder RV-TB40/E-BAC7 (RV-TB40/E) wurden aus Fibroblasten-Kultur mittels Gradientenzentrifugation aufgereinigt (Irmiere und Gibson, 1983; Pepperl et al., 2000). Zur weiteren Charakterisierung der Partikelfractionen wurden HFF und DC mit den einzelnen Proben behandelt und anschließend einer indirekten Immunfluoreszenz-Analyse unterzogen. Die Anfärbung mit einem Primärantikörper gegen das virale IE1-Protein diente zum Nachweis der Infektion, ein Antikörper gegen das Tegumentprotein pp65 wurde als Indikator für die Aufnahme von Antigen verwendet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Die Fraktion der unbehandelten DB zeigte nur sehr geringe Restinfektiösität in DC-Kulturen, die UV-Bestrahlung war geeignet, infektiöses Virus vollständig zu entfernen (Abbildung 4). Das Tegumentprotein pp65 wurde jedoch, unabhängig von der UV-Behandlung der DB, sehr effizient von DC aufgenommen. Dies zeigte, dass DB ein effizientes System zum *antigen-delivery* in professionelle Antigenpräsentierende Zellen darstellen und dass die Antigenaufnahme durch DC nicht von der Infektiösität der Fraktionen abhängt. Die Ergebnisse bestätigen darüber hinaus, dass Virionen eines Laborstammes (HCMV<sub>Lab</sub>), hier des Ad169 (RV-HB5), DC kaum infizieren können, wohingegen der klinische Stamm (HCMV<sub>Klin</sub>) RV-TB40/E DC infizieren kann.



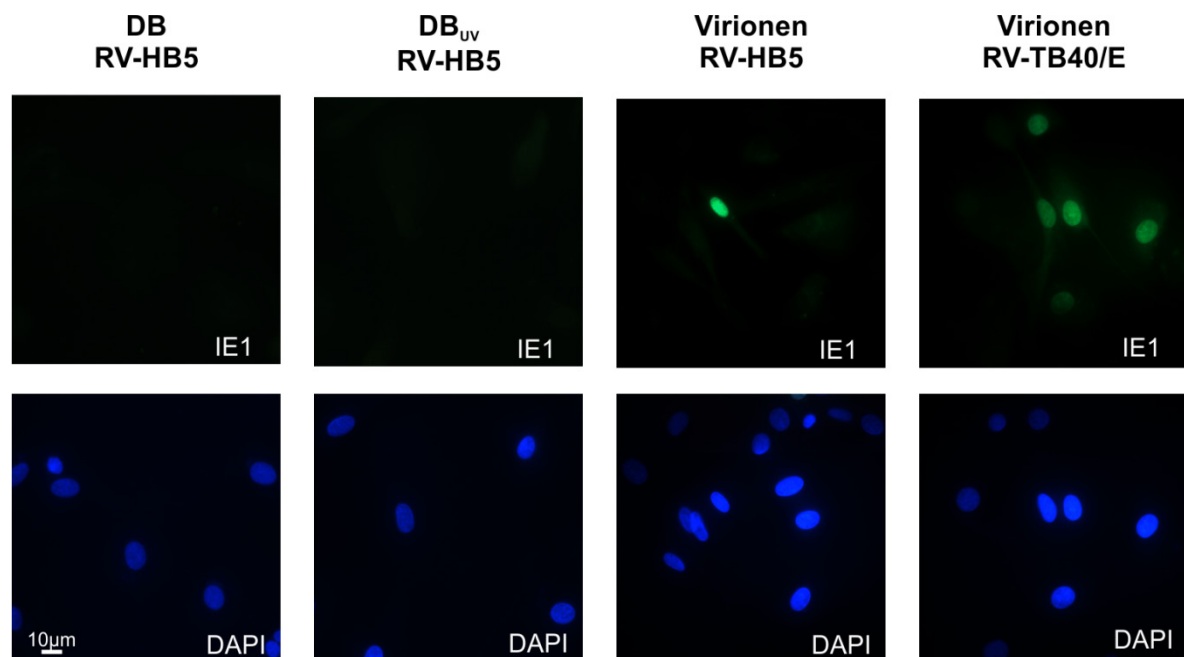
**Tabelle 1: Analyse der DB- und Virionenfraktionen durch indirekte Immunfluoreszenz.**

	HFF <sup>a</sup>		DC <sup>a</sup>	
	IE1 <sup>b</sup>	pp65 <sup>b</sup>	IE1 <sup>b</sup>	pp65 <sup>b</sup>
DB RV-HB5	32 %	99 %	0,4 %	56,6 %
DB <sub>UV</sub> RV-HB5	< 2 %	92 %	0 %	38,5 %
Virionen RV-HB5	96,2 %	80 %	1,08 %	25 %
Virionen RV-TB40/E	74,6 %	62 %	34,1 %	22 %

<sup>a</sup>5 x 10<sup>5</sup> Zellen wurden mit jeweils 10 µg viralen Partikeln inkubiert

<sup>b</sup>prozentualer Anteil der angefärbten Zellen

Diese Experimente zeigten die Effizienz der gewählten Reinigungs- und Inaktivierungsschritte und bildeten somit die Grundlage, die Wirkung von DB auf DC-Ausreifung und Aktivierung ohne verfälschende Einflüsse durch Infektion zu prüfen.

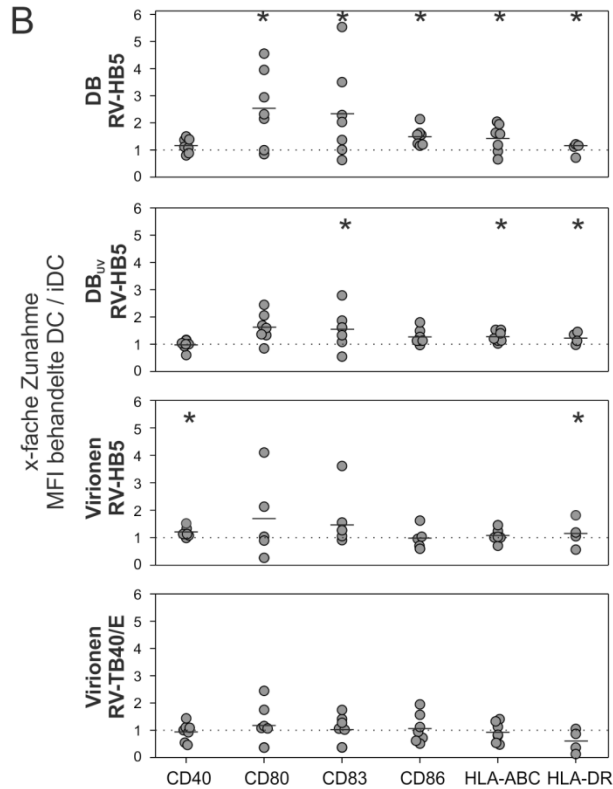
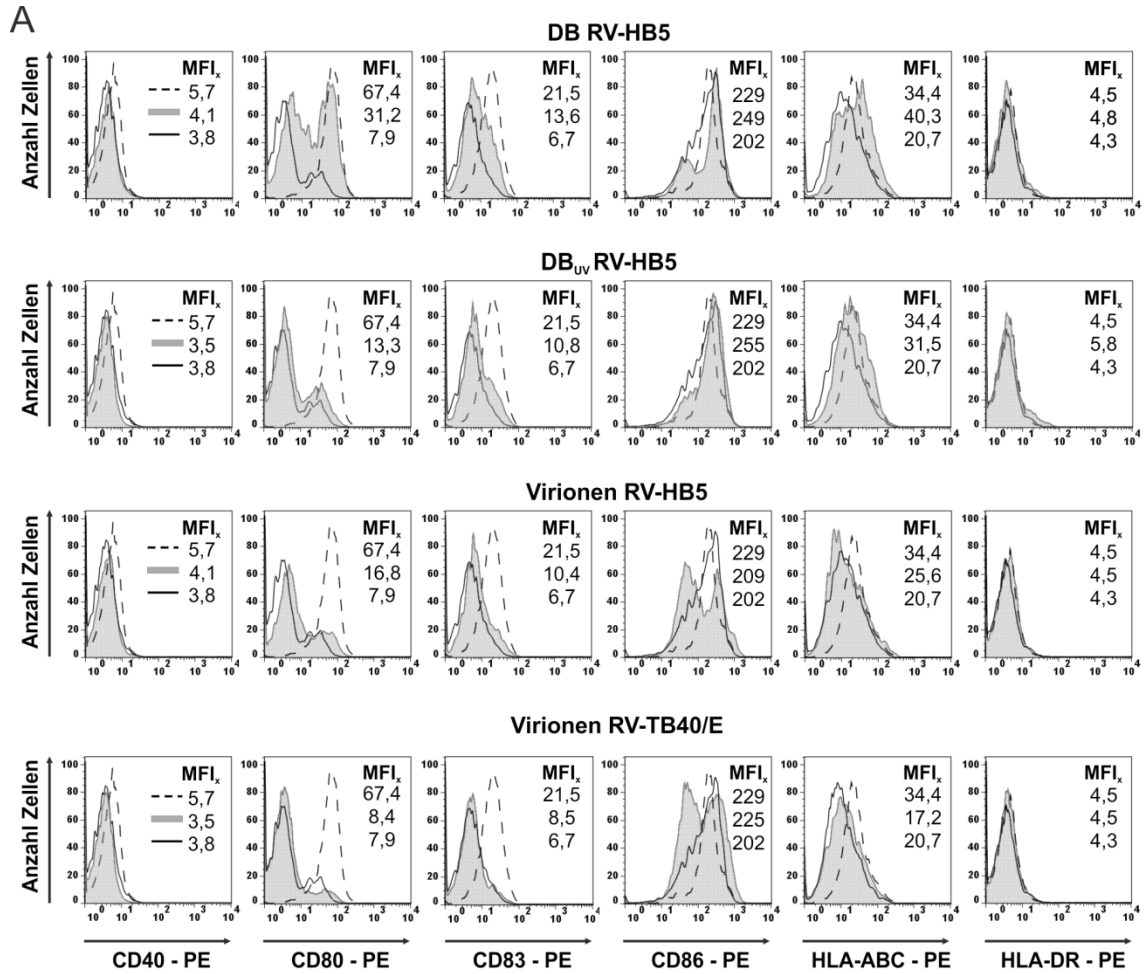


**Abbildung 4: Indirekte Immunfluoreszenz-Analysen unterschiedlich behandelter DC.** iDC wurden für 48 Stunden mit den angegebenen viralen Partikelfractionen auf Deckgläsern inkubiert. Im Anschluss wurde die Expression des viralen IE1-Proteins mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt.

### 3.1.1 DB-Behandlung führt zur Ausreifung von iDC

Zur Untersuchung des Einflusses von DB auf die Ausreifung von iDC wurden  $5 \times 10^5$  iDC von HCMV-seronegativen Spendern in 12-Lochplatten mit  $10 \mu\text{g}$  Viruspartikeln für 2-3 Tage inkubiert. Anschließend wurden die DC in der Durchflusszytometrie auf die Expression unterschiedlicher Reifungsmarker und auf die Expression von MHC-Komplexen hin untersucht (Abbildung 5). CD11c-positive iDC des jeweiligen Spenders wurden als Negativkontrolle verwendet, als Positivkontrolle dienten DC, die exogen mit einem Gemisch von Zytokinen aus IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  und PGE2 ausgereift wurden. In Abbildung 2A ist exemplarisch das Ergebnis anhand der Zellen eines ausgewählten Spenders gezeigt. Nach Applikation von DB des Stammes RV-HB5 zeigten die DC gesteigerte Expression der kostimulatorischen Moleküle im Vergleich zu den iDC. Besonders CD86 war deutlich erhöht, der gemessene Wert überstieg sogar den zum Vergleich herangezogenen Wert von CD86 auf den Zellen der positiven Kontrolle. Die Oberflächenexpression von MHC-Klasse-I und II-Molekülen war nach DB-Inkubation ebenfalls erhöht. Bemerkenswert war, dass sowohl unbehandelte wie auch UV-bestrahlte DB diese Ausreifung vermitteln konnten. Durch die Behandlung der iDC mit Virionen von RV-HB5 wurde die Expression der verschiedenen Moleküle leicht gesteigert. Die gemessenen Werte waren jedoch niedriger als nach DB-Behandlung. Nach Infektion der iDC durch RV-TB40/E-Virionen zeigte die Expression der Oberflächenmoleküle kaum Veränderungen zu den unbehandelten iDC.

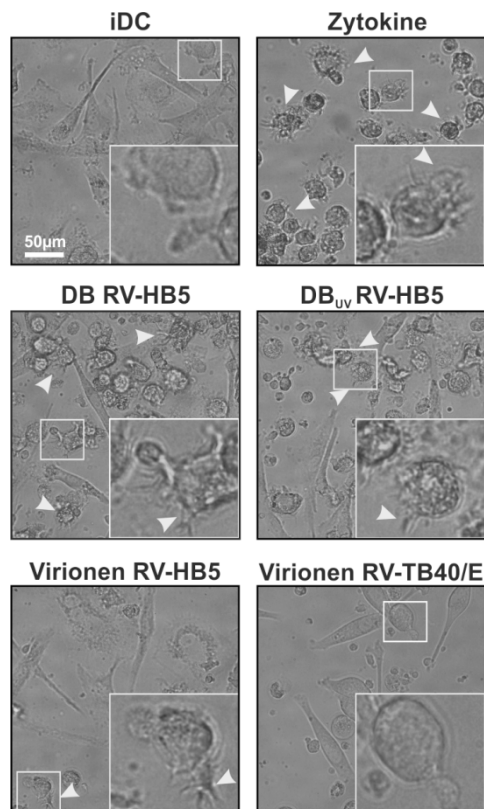
In Abbildung 2B ist die Auswertung der Ergebnisse dargestellt, die anhand der Zellen von sieben HCMV-seronegativen Spendern erhalten wurden. Eine Behandlung der iDC mit DB führte zu einer verstärkten Expression der kostimulatorischen Moleküle, mit Ausnahme von CD40, sowie einer erhöhten Expression der MHC-Klasse-I und II-Moleküle. Dies zeigte, dass die Behandlung der iDC mit DB von RV-HB5 zu deren Ausreifung führt. Eine UV-Behandlung der DB verminderte die Effekte im Vergleich zu der Behandlung mit unbehandelten DB. Verglichen mit der Oberflächenexpression der iDC nach RV-TB40/E-Infektion zeigte sich dennoch eine gesteigerte Expression für CD83 und die MHC-Moleküle. Wurden die iDC mit Virionen von HCMV<sub>Lab</sub> RV-HB5 inkubiert, so waren CD40 und MHC-Klasse-II-Moleküle signifikant stärker exprimiert. Eine Infektion mit RV-TB40/E-Virionen führte zu einer geringeren Expression der MHC-Klasse-II-Moleküle verglichen mit unbehandelten iDC. Das Expressionsmuster der kostimulatorischen Moleküle unterschied sich kaum von dem der iDC.



**Abbildung 5: Durchflusszytometrische Analyse von aktivierungsspezifischen Oberflächenmolekülen auf DC nach deren Behandlung mit viralen Partikeln.** (A), Exemplarische Darstellung der Expression verschiedener kostimulatorischer Moleküle und MHC-Komplexe auf DC eines HCMV-seronegativen Spenders nach Behandlung mit viralen Partikeln. Nach zweitägiger Koinkubation der iDC mit den angegebenen Partikelfraktionen wurde die Oberflächenexpression der unterschiedlichen Ausreifungsmarker im Durchflusszytometer ermittelt. Die eingesetzten Antikörper waren an den Fluoreszenzfarbstoff Phycoerythrin (PE) gekoppelt. Dargestellt sind die Histogramme der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI). (B), Zusammenfassende Darstellung der Analysen von den Zellen sieben HCMV-seronegativer Spender. Zur Berechnung des Anstiegs der dargestellten Ausreifungsmarker wurde die MFI der einzelnen Marker durch die MFI der jeweiligen angefärbten iDC dividiert. Die gestrichelte Linie gibt die MFI der iDC wieder. Jedes Symbol repräsentiert die Ergebnisse aus Analysen der Zellen eines individuellen Spenders. Der Mittelwert ist durch einen horizontalen Strich dargestellt. Statistische Signifikanz ( $p < 0,05$ , gekennzeichnet durch Sterne) wurde über den gerichteten Mann-Whitney-Test berechnet.

Zusammengefasst zeigten diese Experimente, dass die Behandlung von iDC mit DB mit Ausnahme von CD40 zur deutlich verstärkten Expression von solchen Oberflächenmolekülen führt, die üblicher Weise als „Marker“ für die Ausreifung von DC herangezogen werden. Dieser Einfluss von DB war auch zu sehen, wenn die Partikelfraktionen zur Inaktivierung von kontaminierenden Virionen vorher UV-bestrahlt wurden. Allerdings erreichte in diesen Fällen nur die Expression von CD83 und der beiden MHC-Komplexe statistische Signifikanz. Geringere Unterschiede wurden nach Inkubation von iDC mit Virionen des HCMV<sub>Lab</sub> RV-HB5 beobachtet. Die Inkubation mit HCMV<sub>Klin</sub> RV-TB40/E-Virionen, die tatsächlich mit einer Infektion der Zelle verknüpft ist, führte, wie erwartet, nicht zu einer Aktivierung von iDC.

Zur Bestätigung der durchflusszytometrischen Analysen wurden die DC 48 Stunden nach Zugabe der Partikel lichtmikroskopisch dargestellt (Abbildung 6). Zum Vergleich wurden unbehandelte iDC (Negativkontrolle) und, wie oben beschrieben, exogen ausgereifte DC (Positivkontrolle) untersucht. Nach DB und DB<sub>UV</sub> Inkubation zeigte ein Großteil der DC die für die Ausreifung charakteristischen Zellfortsätze, die als Dendriten bezeichnet werden. Ein ähnliches Phänomen fand sich in der positiven Kontrolle. Einige DC behielten nach DB- oder DB<sub>UV</sub>-Behandlung den Phänotyp unreifer DC. Nur geringe morphologische Veränderungen waren in den DC Kulturen zu sehen, die mit Virionen des HCMV<sub>Lab</sub> RV-HB5 behandelt oder mit HCMV<sub>Klin</sub> RV-TB40/E infiziert worden waren. Während reife DC in Suspension gehen, bleiben iDC eher adhärent. Diese Adhärenz blieb auch bei den mit Virionen behandelten DC-Kulturen dominant. Auffällig war, im Vergleich zu den anderen Kulturen, die geringere Zellzahl in den DC-Kulturen, die mit Virionen von RV-TB40/E infiziert worden waren.



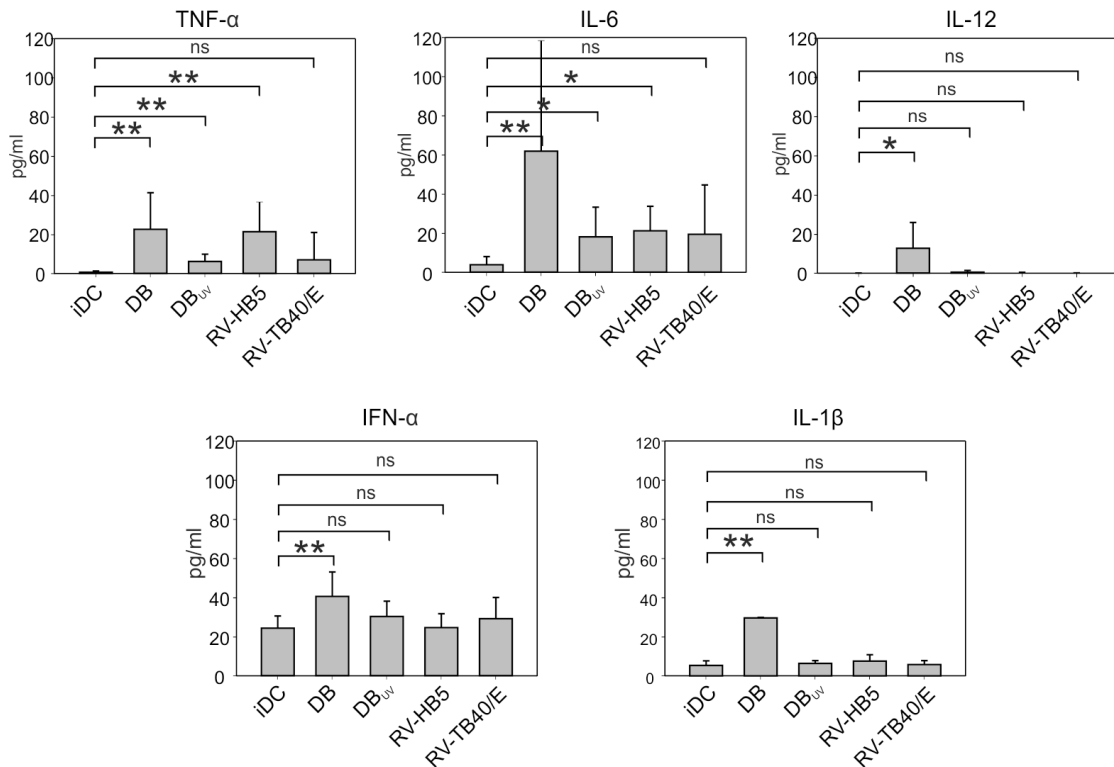
**Abbildung 6: Phänotypische Ausreifung der DC nach DB-Behandlung.** Phasenkontrast Aufnahmen von DC, die für 2 Tage mit den unterschiedlichen Partikelfractionen behandelt worden waren. Die eingesetzten Fraktionen sind über dem jeweiligen Bild angegeben. Als Positivkontrolle dienten mit IL-1 $\beta$ , IL-6, PGE2 und TNF- $\alpha$  exogen ausgereifte DC (Zytokine). Dendritische Zellfortsätze als Kennzeichen reifer DC sind durch weiße Pfeile markiert. Zur besseren Darstellung wurden einige Zellen in dreifacher Vergrößerung hervorgehoben. Die Ergebnisse, die anhand der Zellen eines von zwei Spendern erhalten wurden, sind hier exemplarisch dargestellt.

Diese Experimente bestätigten, dass DB von HCMV tatsächlich geeignet sind, die Ausreifung von DC zu vermitteln, dass jedoch eine Infektion diese phänotypische Ausreifung verhindert.

### 3.1.2 DB-Behandlung führt zur Aktivierung von iDC

Nachdem gezeigt werden konnte, dass eine Behandlung von iDC mit DB zu deren Ausreifung führt, sollte getestet werden, ob dieser Prozess mit einer funktionellen Aktivierung der DC verknüpft war. Hierzu wurde die Freisetzung solcher Zytokine durch DC analysiert, die mit DC-Aktivierung assoziiert sind und die Wanderung in sekundär-lymphatische Organe unterstützen. Derartige Zytokine sind außerdem für das *Priming* und die vollständige Aktivierung von T-Lymphozyten notwendig.

Zellkulturüberstände der DC von fünf Spendern wurden bezüglich der Freisetzung von TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12 und IFN- $\alpha$  im *Enzyme-Linked-ImmunoSorbent Assay* (ELISA) untersucht. Zusätzlich wurde die IL-1 $\beta$  Freisetzung geprüft, wobei hier nur mehr Material aus zwei der fünf Ansätze zur Verfügung stand. Nach 48-stündiger Koinkubation von  $5 \times 10^5$  DC mit je  $10 \mu\text{g}$  viraler Partikel, wurden  $100 \mu\text{l}$  Kulturüberstand in Duplikaten für die Analyse eingesetzt. Inkubation mit DB von RV-HB5 führte zu statistisch signifikanter Freisetzung von allen fünf getesteten Zytokinen, bezogen auf Proben von unbehandelten iDC Kulturen (Negativkontrolle; Abbildung 7).



**Abbildung 7: Zytokinfreisetzung durch DC nach Behandlung mit viralen Partikeln.** Kulturüberstände von DC wurden nach 2-3 Tagen Koinkubation mit den genannten Partikelfractionen entnommen und der Zytokingehalt im ELISA bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte der Messungen anhand der Kulturen von fünf HCMV-seronegativen Spendern. Die Ergebnisse mit IL-1 $\beta$  beziehen sich auf Proben von nur zwei Spendern. Die Analyse wurde im Doppelansatz durchgeführt. Standardabweichungen sind durch die vertikalen Linien dargestellt. Signifikante Anstiege der Zytokinspiegel im Vergleich zu iDC wurden durch den 1-tailed-t-Test bestimmt (ns, nicht signifikant; \* signifikant,  $p < 0,05$ ; \*\* sehr signifikant,  $p < 0,01$ ). DB, DB von RV-HB5; DB<sub>UV</sub>, UV-bestrahlte DB von RV-HB5, RV-HB5, Virionen von RV-HB5; RV-TB40/E, Virionen von RV-TB40/E.

Behandlung der iDC mit UV-inaktivierten DB führte zur verstärkten Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-6, wohingegen die Unterschiede in den Spiegeln der anderen Zytokine in Bezug auf die negative Kontrolle keine statistische Signifikanz erreichten. In analoger Weise zeigten sich die Veränderungen im Zytokinmuster in Kulturen von DC, die mit Virionen von RV-HB5 behandelt worden waren. Im Gegensatz hierzu führte die Infektion mit RV-TB40/E Virionen nicht zu signifikanten Veränderungen der Zytokinspiegel.

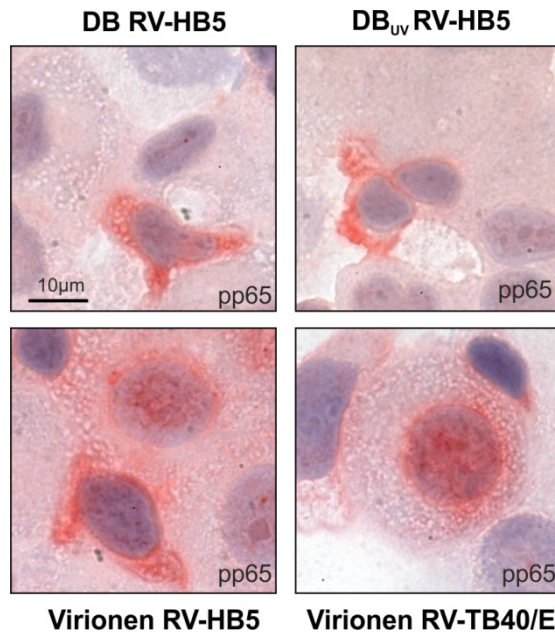
Zusammenfassend zeigten diese Ergebnisse, dass DB sowohl die Ausreifung wie auch die Aktivierung monozytärer iDC induzieren. Im Gegensatz dazu blockiert die aktive Infektion von iDC diesen Prozess.

### 3.1.3 iDC nehmen Antigene aus viralen Partikeln auf und präsentieren diese im Kontext von MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II

Wie in Tabelle 1 dargestellt, können iDC virale Proteine aus DB aufnehmen. Die Aufnahme von viralen Partikeln und die nachfolgende Verfügbarkeit dieser Proteine zur proteolytischen Prozessierung und Ladung der resultierenden Peptide auf MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Moleküle sind entscheidend für die Stimulation der T-lymphozytären Immunantwort. Geltende Lehrmeinung ist es, dass hierbei der zytoplasmatischen Lokalisation der Proteine in professionell Antigenpräsentierenden Zellen, wie DC, eine besondere Bedeutung zukommt. Im nächsten Abschnitt dieser Arbeit wurde daher die Lokalisation von viralen Proteinen nach DB-Inkubation von DC-Kulturen am Beispiel des pp65 untersucht. Im Gegensatz zur oben beschriebenen Immunfluoreszenz-Analyse sollte hier eine Präparations- und Färbemethode eingesetzt werden, die eine deutlich bessere Auflösung der zellulären Strukturen zuließ. Hierzu wurden sogenannte Zytospin-Präparate der DC-Kulturen mit Hilfe einer Zytozentrifuge angefertigt. Der spezifische Proteinnachweis erfolgte unter Verwendung eines pp65-spezifischen Primärantikörpers, zur Detektion wurde aber nun die sogenannte APAAP-Färbung eingesetzt (Grefte et al., 1992).  $5 \times 10^5$  der iDC wurden mit den unterschiedlichen Partikelfractionen (10  $\mu$ g) für 48 Stunden koinkubiert. Anschließend wurden  $5 \times 10^4$  DC aus den Kulturen zur Fixierung auf Objektträger zentrifugiert (Abbildung 8). Zur Gegenfärbung der Zellkerne wurde Hämatoxylin verwendet.

Während eine Aufnahme von Antigen aus allen viralen Partikeln detektiert werden konnte, so gab es Unterschiede in der Lokalisation des pp65. Nach Koinkubation der iDC mit DB und DB<sub>UV</sub> zeigte die Färbung eine primär zytoplasmatische Lokalisation von pp65. Eine Infektion der iDC mit Virionen von RV-TB40/E führte dagegen zur Translokation von pp65 in den Zellkern. Eine solche nukleäre Translokation von pp65 wird als Indikator für eine permissive Infektion von DC angesehen. Ein gemischter Phänotyp wurde durch Inkubation mit RV-HB5-Virionen erzielt, in den meisten angefärbten DC fand sich pp65 im Zytoplasma. Eine deutlich geringere Zellfraktion wies nukleäre Lokalisation von pp65 auf. Ähnliche Ergebnisse wurden auch 16 Stunden nach Inkubation der iDC mit den unterschiedlichen viralen Partikeln erzielt (nicht gezeigt).

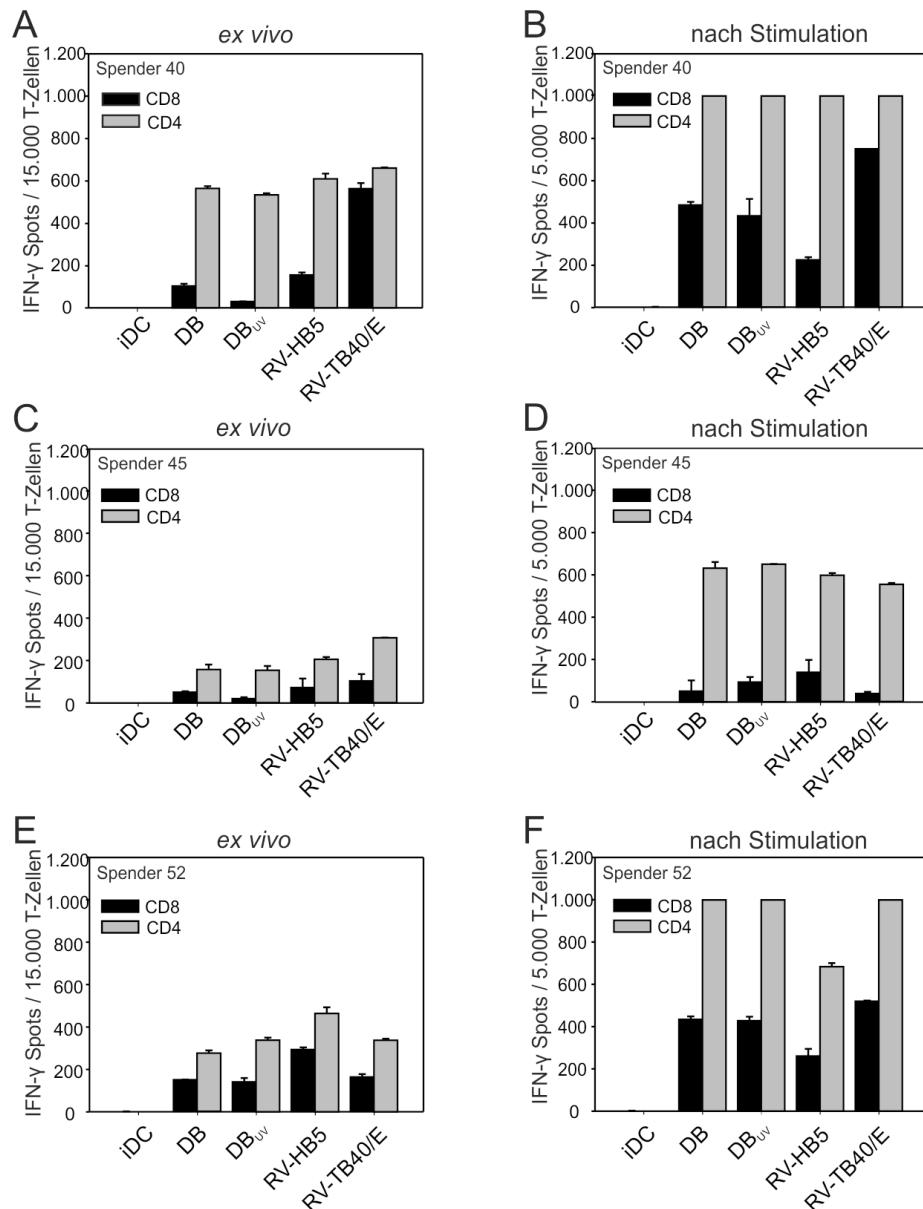
Diese Experimente zeigten, dass virale Partikel aus DB ins Zytoplasma von DC eingeschleust werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass virale Antigene aus DB, im Gegensatz zur Infektion, in DC-Kompartimente gelangen, die der proteolytischen Prozessierung zugänglich sind und damit zur effizienten Präsentation von Peptidfragmenten dieser Antigene auf der Zelloberfläche führen.



**Abbildung 8: Subzelluläre Lokalisation des viralen Tegumentproteins pp65 in iDC.** iDC wurden mit den genannten Partikelfractionen für 48 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mittels Zytocentrifugation auf Objektträger aufgebracht und mit einem pp65-spezifischen Antikörper nach dem APAAP-Färbeprotokoll behandelt. Vergleichbare Resultate wurden mit den Proben aus drei individuellen Spendern erzielt, ein repräsentatives Beispiel ist abgebildet.

Um diese Hypothese auf funktioneller Ebene zu untersuchen wurden DB-beladene iDC hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Antigenpräsentation im IFN- $\gamma$ -ELISpot untersucht. Als *Responder*-Zellen wurden autologe T-Zellpopulationen verwendet, die aus den PBMC der gleichen HCMV-seropositiven Spender unter Verwendung Magnet-gekoppelter Antikörper gegen CD4 bzw. CD8 isoliert wurden. In einem ersten Ansatz wurden die T-Zellen direkt nach der Isolation aus PBMC im ELISpot als *Responder*-Zellen verwendet (*ex vivo*) (Abbildung 9 A, C, E). Hier zeigte sich, dass sowohl DB-beladene wie auch infizierte iDC geeignet waren, CD4 und CD8 T-Zellen zur IFN- $\gamma$ -Sekretion zu stimulieren. Bei allen drei Spendern zeigte sich eine leicht stärkere CD4 T-Zellantwort im Vergleich zur CD8 T-Zellantwort. Das Verhältnis der CD4 T-Zellantwort zwischen den unterschiedlichen Spendern war sehr ähnlich, auch wenn die absoluten Spitzzahlen variierten. Grundsätzlich zeigten sich individuell bedingte Schwankungen in der Antwort, wobei die maximalen Antworten durch Vorbehandlung mit Virionen von RV-HB5 oder RV-TB40/E erzielt wurden.





**Abbildung 9: IFN- $\gamma$  ELISpot-Analyse der Antigenpräsentation durch DB-behandelte DC.** CD4 und CD8 T-Zellen wurden von PBMC HCMV-seropositiver Spender isoliert und entweder direkt *ex vivo* (A, C, E) oder nach zweimaliger Stimulation mit einem überlappendem pp65-Peptidgemisch (nach Stimulation) verwendet (B, D, F). Autologe DC wurden für 48 Stunden mit je 10  $\mu$ g der viralen Partikel inkubiert und dann als Stimulatoren im ELISpot eingesetzt. Als Negativkontrolle wurden unbehandelte iDC mit einbezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus Doppelansätzen mit Standardabweichung der Zellen von drei individuellen Spendern. 1.000 Spots wurden als maximal noch zählbare Grenze festgesetzt. Ergebnisse mit höheren Spotzahlen wurden mit 1.000 Spots dargestellt. DB, DB von RV-HB5; DB<sub>UV</sub>, UV-bestrahlte DB von RV-HB5, RV-HB5, Virionen von RV-HB5; RV-TB40/E, Virionen von RV-TB40/E.

In einem zweiten Ansatz wurden T-Zellen nach magnetischer Isolation in Kultur durch Antigenkontakt angereichert (Abbildung 9 B, D, F). Zur Stimulation wurden autologe PBMC mit einem Gemisch aus überlappenden Peptiden des pp65 beladen und anschließend bestrahlt. Gleiche Mengen an bestrahlten PBMC und T-Zellen wurden kokultiviert. Am

zweiten Tag erfolgte die Zugabe von T-Zell-simulierenden Zytokinen. Nach sieben Tagen der Kokultur erfolgte eine zweite Stimulation für weitere fünf Tage, bevor die T-Zellen im ELISpot mit den unterschiedlich behandelten DC als *Responder*-Zellen verwendet wurden.

Auch nach Anreicherung der Zwischenkultur zeigte sich, dass CD4 T-Lymphozyten in allen Ansätzen deutlich durch beladene oder infizierte DC stimulierbar waren. Im Gegensatz hierzu war die Stimulation der CD8 T-Lymphozyten zwar ausgeprägt, die Spotzahlen waren aber niedriger. Die Absolutzahlen unterlagen auch hier, wie erwartet, individuellen Schwankungen.

Zusammenfassend konnte durch diese Versuche nachgewiesen werden, dass DC, die durch DB-Behandlung ausreifen und aktiviert werden, geeignet sind, virale Proteine aus Partikeln aufzunehmen und Peptide daraus effizient an ihrer Oberfläche gegenüber CD4 und CD8 T-Lymphozyten zu präsentieren.

### **3.2 Neutralisierende Antikörperantwort nach DB Immunisierung**

Neutralisierende Antikörper (NTAk) spielen eine wichtige Rolle bei der Prävention der HCMV-Infektion. Daneben scheinen NTAk auch geeignet zu sein, die Folgen einer bereits bestehenden Infektion abzumildern. So waren die Folgen einer Infektion im Neugeborenenalter milder, wenn diaplazentar Antikörper von HCMV-seropositiven Müttern auf das Kind übertragen worden waren (Yeager et al., 1981; Fowler et al., 1992; Mussi-Pinhata et al., 2003). Der Antikörpertiter scheint dabei mit dem Ausmaß des Schutzes zu korrelieren (Adler, 1995; Wang et al., 2011). Daneben konnte gezeigt werden, dass ein gewisser Schutz vor einer kongenitalen Infektion durch passive Immunisierung erreicht werden kann (Snydman et al., 1995; Nigro et al., 2005; Adler und Nigro, 2008). Aber auch bei Transplantationspatienten wurde eine Korrelation zwischen der Nachweisbarkeit von NTAk und dem Schutz vor HCMV-Infektion gefunden (Glowacki und Smaill, 1994; Schoppel et al., 1998). Dies alles deutet darauf hin, dass der humoralen Immunantwort ein hoher Stellenwert bei der Prävention und der Kontrolle der HCMV-Infektion zukommt. Dementsprechend stand die Induktion von NTAk als Ziel einer HCMV-Vakzinierung bei vielen Ansätzen im Vordergrund.

Neuere Erkenntnisse zu den molekularen Mechanismen der Adsorption und Penetration von HCMV in verschiedene Zielzellen haben Anlass gegeben, die bislang verfolgten Vakzinierungsstrategien infrage zu stellen. Fast alle bisherigen Analysen der NTAk-Antwort wurden mit HCMV<sub>Lab</sub> durchgeführt. Dabei wurde geprüft, inwieweit eine Serumprobe geeignet war, die Infektion mit HCMV<sub>Lab</sub> in Fibroblastenkulturen zu hemmen (Wang et al., 2004b). Die Analysen der NTAk-Antwort nach DB-Immunisierung im Mausmodell wurden ebenfalls unter Verwendung von HFF-Kulturen durchgeführt (Pepperl et al., 2000; Becke et al., 2010a). Gleichzeitig war aber bekannt, dass HCMV *in vivo* ganz verschiedene Zelltypen infizieren kann, Fibroblasten wurden als Modell hierfür angesehen.

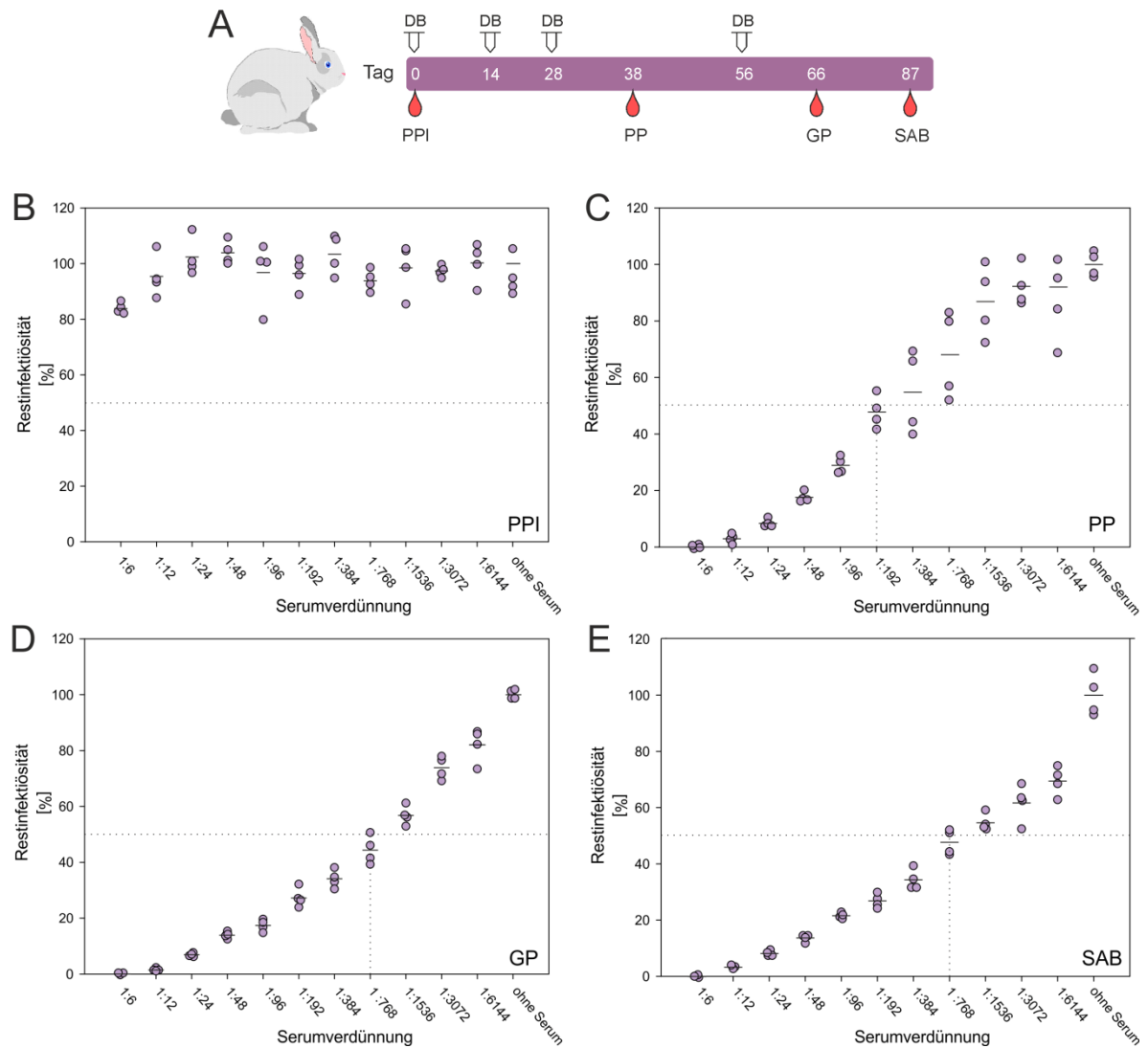
Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass die HCMV-Infektion zelltypspezifisch ist. Während der Weg der Membranfusion an der Zelloberfläche bereits lange als Infektionsweg von Fibroblasten bekannt war (Compton et al., 1992), wurde nun gefunden, dass Epithel- und Endothelzellen durch einen endozytotischen Prozess infiziert werden (Bodaghi et al., 1999; Ryckman et al., 2006; Sinzger, 2008). Der dafür notwendige, pentamere Komplex aus den viralen Oberflächenproteinen gH/gL/pUL128-UL131A fehlt HCMV<sub>Lab</sub> (Hahn et al., 2004; Wang und Shenk, 2005b). Klinische HCMV-Isolate tragen diesen pentameren Komplex. Dieser Komplex induziert während der natürlichen Infektion eine ausgeprägte, antivirale Antikörperantwort (Fouts et al., 2012; Macagno et al., 2010). Diese Antikörper wurden bei Analysen der Antikörperantwort, auch etwa im Rahmen von Vakzinierungsstudien, mit den gängigen Neutralisationstests nicht erfasst.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, das Potential von DB zur Induktion einer breiten NTAk-Antwort unter Einschluss von Antikörpern gegen den pentameren Komplex zu prüfen.

### **3.2.1 Immunisierung mit DB eines Laborstammes führt zur Ausbildung einer breiten Antikörperantwort**

DB von HCMV<sub>Lab</sub> (DB<sub>Lab</sub>) enthalten auf der Oberfläche mit Ausnahme der Proteine der UL128-UL131A-Region die gleichen Proteine wie die Virionen von klinischen Isolaten. Daher sollte zunächst untersucht werden, ob eine Immunisierung mit DB<sub>Lab</sub> Antikörper induziert, die auch eine Infektion mit Virionen von HCMV<sub>Klin</sub> verhindern können. Dafür wurde die Neutralisation von HCMV<sub>Lab</sub> (RV-HB5) auf HFF mit der Neutralisation des kliniknahen Stammes (HCMV<sub>Klin</sub>) RV-TB40/E auf HFF und Epithelzellen (ARPE-19) verglichen.

DB<sub>Lab</sub> von RV-HB5 wurden aus HFF-Zellkulturüberstand aufgereinigt und zur Immunisierung von Neuseelandkaninchen verwendet. Die Immunisierung von Kaninchen ermöglichte die Gewinnung größerer Serummengen. Pro Injektion wurden 100 µg der DB<sub>Lab</sub> subkutan appliziert. Die Tiere wurden mit dem in Abbildung 10 A dargestellten Schema immunisiert. Zur Kontrolle wurde jeweils vor Immunisierung ein Präimmuserum (PPI) gewonnen. Zehn Tage nach der dritten und der vierten Injektion wurde den Tieren jeweils eine geringe Menge eines Testserums (PP bzw. GP) entnommen. Am Tag 87 erfolgte die finale Blutentnahme (SAB). Die verschiedenen Seren wurden auf ihre Neutralisationskapazität in einem modifizierten Neutralisationstest nach Andreoni und Kollegen getestet (Andreoni et al., 1989). Die Serumverdünnungen, die jeweils zu einer Reduktion der Zahl infizierter Zellen um 50 % oder mehr, verglichen mit der positiven Kontrolle führten, wurden als neutralisierende Titer 50 (NT50) bezeichnet. Je höher die Verdünnung ist, desto mehr neutralisierende Antikörper befinden sich im analysierten Serum.

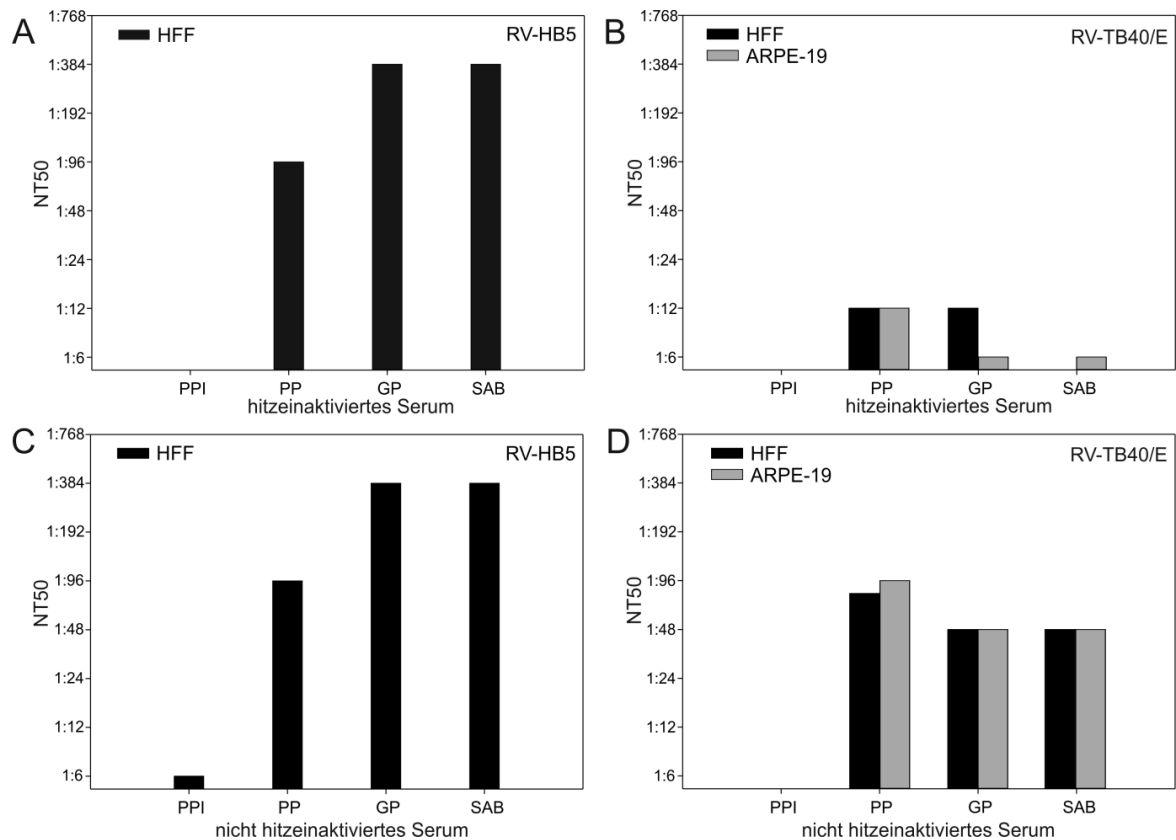


**Abbildung 10: Exemplarische Darstellung einer Analyse der neutralisierenden Antikörperantwort gegen HCMV<sub>Lab</sub> (RV-HB5) nach DB<sub>Lab</sub> Immunisierung unter Verwendung von HFF-Kulturen.** (A), Immunisierungsschema zur Induktion einer Antikörperantwort. Die Kaninchen wurden viermal mit je 100 µg DB<sub>Lab</sub> subkutan immunisiert und die Seren zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen. (B), Analyse des Neutralisationsvermögens des PPI-Serums gegen die Infektion von HFF mit RV-HB5. Das Serum wurde nach 30 minütiger Hitzeinaktivierung in den entsprechenden Verdünnungsstufen mit RV-HB5 für drei Stunden inkubiert. Anschließend wurden HFF mit diesem Ansatz für 24 Stunden infiziert. IE1-positive Zellen wurden angefärbt und mikroskopisch ausgezählt. Um die Restinfektiosität zu berechnen, wurde die Anzahl an IE1-positiven Zellen einer Verdünnungsstufe durch die Anzahl der positiven Zellen ohne Serumzugabe dividiert (violette Punkte). Mittelwerte aus Vierfachbestimmungen sind durch horizontale Balken gekennzeichnet. (C), Analyse des Neutralisationsvermögens des PP-Serums gegen die Infektion von HFF mit RV-HB5. Nach Durchführung des Neutralisationstests wie unter B beschrieben wurde der NT50 bestimmt (gepunktete Linie). Der NT50 Wert beschreibt die Serumverdunnung, die mindestens 50 % der Infektion inhibieren kann. (D), Analyse des Neutralisationsvermögens des GP-Serums gegen die Infektion von HFF mit RV-HB5. (E), Analyse des Neutralisationsvermögens des SAB-Serums gegen die Infektion von HFF mit RV-HB5.

Die Ergebnisse des Neutralisationstests unter Verwendung von RV-HB5 (HCMV<sub>Lab</sub>) in HFF-Kultur sind in den Abbildung 10 B-E dargestellt. Die vier Kaninchenserum wurden jeweils nach Hitzeinaktivierung in den Test eingesetzt. Während, wie erwartet, im Präimmunserum keine HCMV-spezifischen NTAKs nachweisbar waren (Abbildung 10 B), führte die Immunisierung mit DB zu ansteigenden NT50-Werten. Nach dreimaliger DB-Applikation wurde ein NT50-Wert von 1:96 erreicht (Abbildung 10 C), in der Probe nach der vierten Injektion fand sich ein NT50 von 1:384 (Abbildung 10 D). Diese Titer der NTAK wurden auch in einem als Positivkontrolle mitgeführten Humanserum gemessen (nicht gezeigt).

Abbildung 10 zeigt, exemplarisch die ausführliche Analyse der Neutralisation von HCMV<sub>Lab</sub>. Für eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse beschränken sich die nachfolgenden Abbildungen auf die Darstellung des NT50 in Form von Balkendiagrammen. Die Ergebnisse aus Abbildung 10 B-E wurden in Abbildung 11 A zusammengefasst. Diese Ergebnisse zeigten, dass die Immunisierung mit DB<sub>Lab</sub>, wie erwartet, eine deutliche NTAK-Antwort gegen Infektion des homologen Stammes (HCMV<sub>Lab</sub>) in Fibroblasten-Kulturen induziert.

In den nachfolgenden Experimenten wurden die Seren hinsichtlich ihrer Neutralisationskapazität gegenüber eines HCMV<sub>Klin</sub> untersucht. Dabei wurden die Seren entweder direkt in den Test eingesetzt oder vorher durch 30 minütige Inkubation bei 56 °C hitzeinaktiviert. Durch diese Inaktivierung des Serums werden Proteine des Komplementsystems denaturiert, so dass der Einfluss des Komplements auf die Neutralisation untersucht werden kann. Wie bereits dargestellt, führte die Immunisierung mit DB<sub>Lab</sub> RV-HB5 zur Induktion von NTAK, die eine Infektion von HFF mit dem homologen Stamm verhindern können (Abbildung 11 A). Im Gegensatz dazu war dieses Serum nach Hitzeinaktivierung kaum geeignet, den Stamm RV-TB40/E (HCMV<sub>Klin</sub>) zu neutralisieren. Dies war sowohl bei Verwendung von HFF wie auch von Epithelzellen zu beobachten. Die gemessenen Titer schienen im Verlauf der Immunisierung sogar abzufallen, wobei aufgrund der diskreten Natur der Messwerte eine experimentelle Varianz nicht auszuschließen ist.



**Abbildung 11: Analyse der neutralisierenden Antikörperantwort nach DB RV-HB5-Immunisierung.** (A) und (B), Analyse der hitzeinaktivierten Seren auf HFF und ARPE-19. Die Seren wurden vor Einsatz im Neutralisationstest für 30 min bei 56 °C hitzeinaktiviert. Anschließend wurden die Seren auf die Neutralisation von RV-HB5 (HCMV<sub>Lab</sub>) auf HFF (A) und die Neutralisation von RV-TB40/E (HCMV<sub>Klin</sub>) auf HFF und ARPE-19 hin analysiert (B). Angegeben ist die Serumverdünnung aus Vierfachbestimmungen, die mindestens 50 % der Infektion der ausgewiesenen Zelltypen verhindert (NT50). (C) und (D), Analyse der nicht hitzeinaktivierten Seren auf HFF und ARPE-19. Die Seren wurden auf die Neutralisation von RV-HB5 (HCMV<sub>Lab</sub>) auf HFF (C) und die Neutralisation von RV-TB40/E (HCMV<sub>Klin</sub>) auf HFF und ARPE-19 hin analysiert (D).

Ein interessantes Ergebnis zeigte sich, wenn die Seren der Tiere ohne vorherige Hitzeinaktivierung eingesetzt wurden. Während die Ergebnisse für den HCMV<sub>Lab</sub> nahezu unverändert blieben, fand sich ein deutlicher Unterschied in der Kapazität der nativen Seren zur Neutralisation von RV-TB40/E (HCMV<sub>Klin</sub>), verglichen mit den inaktivierten Seren. Die unbehandelten Seren, die aktives Komplement enthielten, waren geeignet, die Infektion von HFF und ARPE-19 durch HCMV<sub>Klin</sub> wirksam zu blockieren. Dies zeigte, dass DB<sub>Lab</sub> eine humorale Immunantwort induzieren, die komplementabhängig sehr wohl auch die Infektion mit HCMV<sub>Klin</sub> verhindern kann. Demgegenüber wurde die Infektion von HFF mit dem homologen Stamm (HCMV<sub>Lab</sub>) komplementunabhängig sehr wirksam verhindert. Bemerkenswert ist auch, dass die NT50-Werte, die mit DB<sub>Lab</sub>-Seren für den homologen Stamm erzielt wurden, durchgängig höher waren als die, die mit dem HCMV<sub>Klin</sub> gefunden wurden.

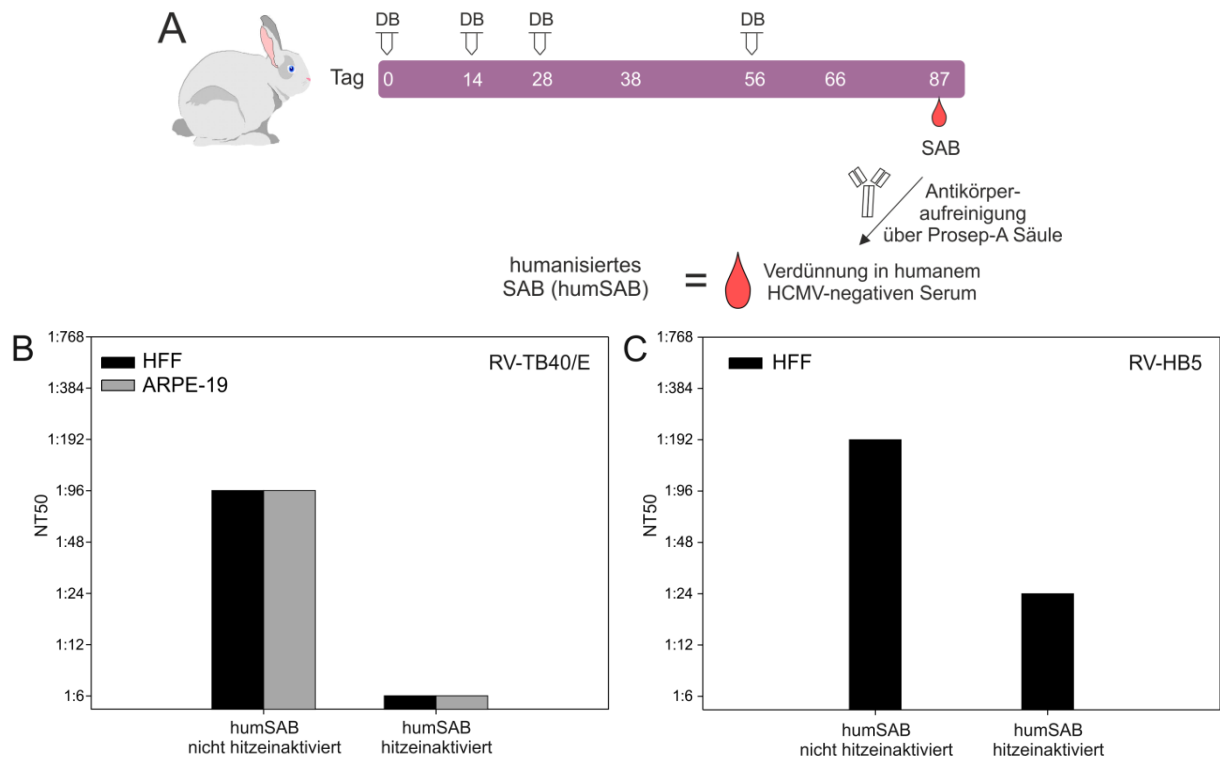
### 3.2.2 Komplementabhängigkeit der neutralisierenden Antikörperantwort

Die Ergebnisse zur Neutralisation von HCMV<sub>Klin</sub> durch die Seren nach DB<sub>Lab</sub>-Immunisierung hatten den überraschenden Hinweis auf eine mögliche Komplementabhängigkeit hergegeben. Bei der Interpretation dieser Daten musste jedoch berücksichtigt werden, dass unspezifische Effekte, wie z.B. unspezifische Kreuzreaktionen, durch das tierische Komplement nicht ausgeschlossen werden konnten. Zur Überprüfung wurde daher ein experimenteller Aufbau gewählt, bei dem die Immunglobulin G (IgG) Fraktion der Seren mit humanem Komplement versetzt wurde. Hierzu wurde die IgG Fraktion aus dem SAB-Serum über eine Prosep-A Säule angereichert. Dieses Konzentrat wurde mit Serum eines HCMV-seronegativen Spenders versetzt. Dieses Serum war vor seiner Verwendung hinsichtlich hemmender Effekte auf die HCMV-Infektion geprüft worden. Solche unspezifischen Effekte waren nicht beobachtet worden (nicht gezeigt).

Zu den aufgereinigten IgG des SAB-Serums wurde die Hälfte des ursprünglichen Volumens an Humanserum gegeben. Diese Volumenreduktion sollte grob die Verluste bei der Säulenreinigung ausgleichen (Abbildung 12 A). Das nun „humanisierte“ SAB-Serum (humSAB) wurde vor und nach Hitzeinaktivierung im Neutralisationstest mit HCMV<sub>Lab</sub> und HCMV<sub>Klin</sub> untersucht.

Die Ergebnisse bestätigten die Vermutung, dass die Neutralisation des HCMV<sub>Klin</sub> RV-TB40/E komplementabhängig ist. Während sowohl unter Verwendung von HFF wie auch von ARPE-19-Zellen das unbehandelte, humanisierte Serum geeignet war, die Infektion noch deutlich zu blockieren, war nach Hitzeinaktivierung nahezu kein Effekt mehr zu beobachten (Abbildung 12 B). Abweichend zu den Experimenten mit Kaninchen-Komplement, war hier auch eine deutliche Reduktion der Neutralisationskapazität des eingesetzten Serums nach Inaktivierung gegen RV-HB5 auf HFF zu beobachten (Abbildung 12 C).

Zusammengefasst zeigten diese Experimente, dass DB<sub>Lab</sub> eine deutliche NTak-Antwort induzieren. Diese Antikörper sind geeignet, die Infektion von beiden HCMV-Stämmen zu blockieren. Der homologe Stamm HCMV<sub>Lab</sub> wird dabei aber immer deutlich besser neutralisiert als HCMV<sub>Klin</sub>. Beide Stämme werden in Gegenwart von menschlichem Komplement deutlich stärker gehemmt als nach Hitzeinaktivierung der betreffenden Seren.



**Abbildung 12: Komplementabhängigkeit eines „humanisierten“ Kaninchenserums.** (A), Schema der Herstellung des humSAB. Die Antikörper aus 15 ml des SAB-Kaninchenserums wurden über eine Prosep-A Säule aufgereinigt. Anschließend wurden die Antikörper wieder in 7 ml HCMV-seronegativen Humanserum aufgenommen. (B) und (C), Neutralisationskapazität des humSAB auf HFF und ARPE-19 mit RV-TB40/E (B) und RV-HB5 (C) getestet. Das Serum wurde sowohl vor als auch nach 30 minütiger Hitzeinaktivierung bei 56 °C auf den verschiedenen Zelltypen getestet. Dargestellt sind die NT50-Werte aus Vierfachbestimmungen im Neutralisationstest.

### 3.2.3 Analyse der NTAk-Antwort nach Immunisierung mit DB<sub>Klin</sub>

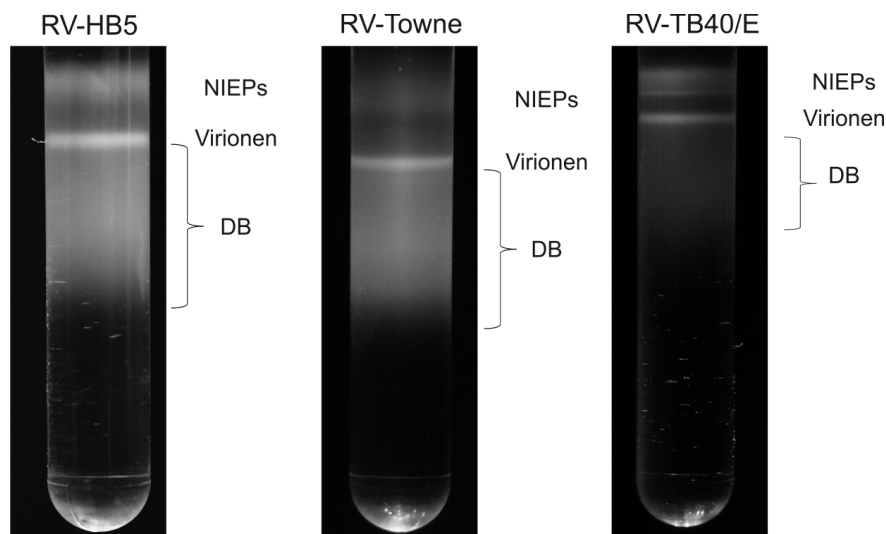
Der pentamere Komplex aus gH/gL/pUL128-UL131A von HCMV wurde in der Literatur als wichtige Zielstruktur der NTAk-Antwort nach natürlicher Infektion beschreiben (Macagno et al., 2010; Lilleri et al., 2012; Genini et al., 2011). Der Komplex ist für die HCMV-Infektion von verschiedenen Zelltypen, wie Epithel- und Endothelzellen essentiell. In dieser Arbeit konnte aber gezeigt werden, dass DB<sub>Lab</sub>, die diesen Komplex nicht tragen, gleichwohl Antikörper induzieren, die die Infektion auf Epithelzellen teilweise blockieren können. Im folgenden Abschnitt der Experimente sollte nun geprüft werden, ob die zusätzliche Expression des pentameren Komplexes auf DB deren Immunogenität hinsichtlich der Induktion einer breiten NTAk-Antwort verbessert.



### 3.2.3.1 Analyse der DB<sub>Klin</sub> Freisetzung nach Infektion mit RV-TB40/E

Der HCMV<sub>Klin</sub> RV-TB40/E exprimiert alle Komponenten des pentameren Komplexes. Die Virionen dieses Stammes tragen den Komplex auf ihrer Oberfläche. Zu Beginn dieser Arbeiten war jedoch unklar, ob auch DB dieses Stammes den pentameren Komplex enthalten.

Es wurden DB von RV-TB40/E über Gradientenzentrifugation wie oben beschrieben aufgereinigt. Hierzu wurden 400 ml Zellkulturüberstand von  $3,6 \times 10^7$  infizierten HFF verwendet (Abbildung 13). Die Inspektion des Gradienten zur Reinigung von RV-TB40/E Partikeln zeigte nur eine schwache Darstellung einer „DB-Bande“. Die entsprechenden Banden der HCMV<sub>Lab</sub> waren deutlich ausgeprägter. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Partikel der Laborstämme auf vier bzw. fünf Ultrazentrifugen-Röhrchen verteilt werden mussten, um eine Überladung des Gradienten zu vermeiden. Bei den Partikeln von RV-TB40/E genügte bereits ein Röhrchen, um eine hinreichende Auftrennung zu erzielen. Dies deutete bereits auf eine sehr geringe „Ausbeute“ an DB des Stammes RV-TB40/E hin. Abhängig der Größe des Pellets nach dem ersten Zentrifugationsschritt der Aufreinigung wurden die anschließend in PBS aufgenommenen Partikel über eine unterschiedliche Anzahl an Gradienten aufgetrennt.



**Abbildung 13: Fraktionierung von extrazellulären, viralen Partikeln der Virus-Stämme RV-HB5, RV-Towne und RV-TB40/E mittels Natriumtartrat-Gradientenzentrifugation.** 400 ml Zellkulturüberstand wurden sieben Tage nach Infektion konzentriert und anschließend im Natriumtartrat-Glycerolgradienten aufgetrennt.

Zur weiteren Analyse wurden die DB- und Virionen-Fractionen mit einer Spritze abgezogen, mit PBS gewaschen und anschließend pelletiert. Das Pellet wurde in PBS aufgenommen und die Proteinkonzentration bestimmt. Die mittleren Werte der Proteinkonzentrationen in den Virionen- und DB-Fractionen aller drei Stämme sind in Tabelle 2 gezeigt.

**Tabelle 2: Freisetzung von DB und Virionen aus HFF und ARPE-19 nach Infektion mit HCMV<sub>Lab</sub> und HCMV<sub>Klin</sub>**

	RV-HB5		RV-Towne		RV-TB40/E	
	DB <sup>a</sup>	Virionen <sup>a</sup>	DB <sup>b</sup>	Virionen <sup>b</sup>	DB <sup>b</sup>	Virionen <sup>b</sup>
Freisetzung von 1 x 10 <sup>6</sup> HFF	27,3 µg ± 3,1 µg	5 µg ± 0,09 µg	34,8 µg ± 0,17 µg	12,3 µg ± 0,5 µg	1,3 µg ± 0,03 µg	3,4 µg ± 0,2 µg
Freisetzung von 1 x 10 <sup>6</sup> ARPE-19	kR <sup>c</sup>	kR <sup>c</sup>	kR <sup>c</sup>	kR <sup>c</sup>	nd <sup>d</sup>	0,02 µg

<sup>a</sup>Mittelwert aus drei unabhängigen Aufreinigungen mit Standardabweichung

<sup>b</sup>Mittelwert aus zwei unabhängigen Aufreinigungen mit Standardabweichung

<sup>c</sup>kR, keine Replikation

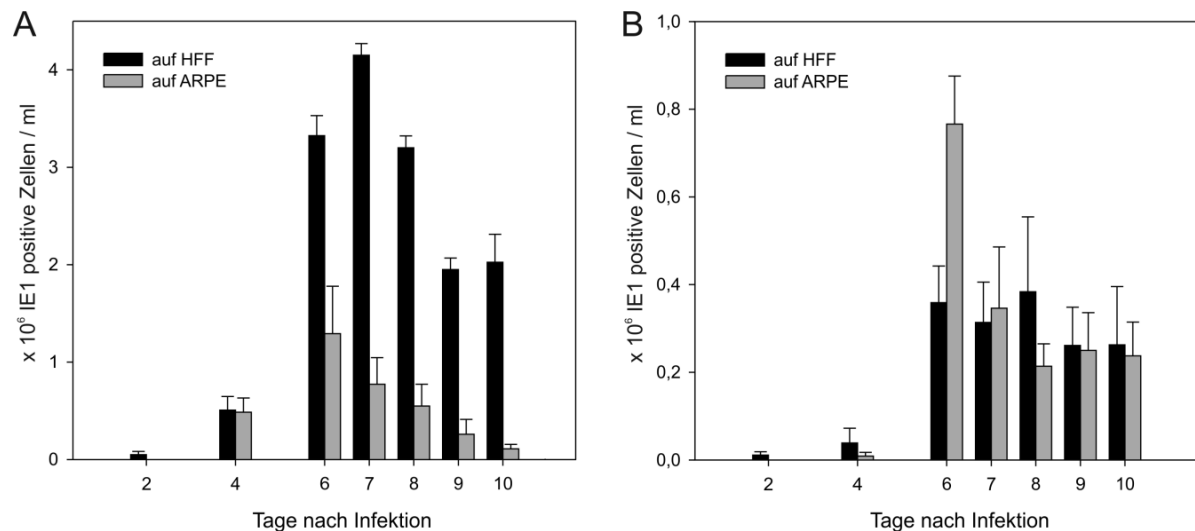
<sup>d</sup>nd, nicht detektierbar

Wie bereits in den Gradienten erkennbar war, setzten HFF, die mit HCMV<sub>Lab</sub> infiziert worden waren, deutlich mehr DB frei, als solche, die mit HCMV<sub>Klin</sub> infiziert worden waren. RV-TB40/E infizierte HFF setzten zwar nach sieben Tagen deutliche Mengen an infektiösem Virus frei, die Menge an DB, die gewonnen werden konnte, war jedoch für die geplanten Experimente unzureichend. Um eine hinreichende „Ausbeute“ an DB von RV-TB40/E zu erzielen, wurde zunächst geprüft, ob infizierte ARPE-19 Zellen vermehrt DB freisetzen. Bei identischer Infektion der ARPE-19 konnte keine DB Freisetzung festgestellt werden. Im Gradienten war keine „DB-Bande“ zu sehen. Proteine konnten in der blind abgezogenen DB-Fraktion nicht nachgewiesen werden. Analog dazu war auch die Menge an freigesetzten Virionen im Vergleich zur Freisetzung von HFF deutlich verringert (Tabelle 2).

In einem nächsten Schritt sollte geprüft werden, ob der Zeitpunkt der Aufreinigung nach Infektion einen Einfluss auf die Menge der freigesetzten Partikel hatte. Um den idealen Zeitpunkt festzulegen wurden 1,8 x 10<sup>6</sup> HFF oder ARPE-19 mit RV-TB40/E (*moi* 3) infiziert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten Überstand entnommen. Die Virusüberstände wurden auf HFF und ARPE-19 titriert, um den Gehalt an infektiösem Virus zu bestimmen. Die Menge an freigesetztem, infektiösem Virus diente als Indikator für die DB-Produktion. In Abbildung 14 A sind die Virustiter dargestellt, die von RV-TB40/E infizierten HFF freigesetzt wurden. Abbildung 14 B zeigt die Virustiter, die von infizierten ARPE-19 freigesetzt wurden.

Zu Beginn der Infektion wurden nur sehr geringe Mengen an infektiösem Virus im Kulturüberstand von HFF und ARPE-19 gefunden. Maximale Mengen konnten nach sechs bis acht Tagen Infektion nachgewiesen werden. Bemerkenswert war, dass die Infektiosität der aus HFF freigesetzten Virionen für HFF deutlich höher war als für ARPE-19. Im

Überstand von infizierten ARPE-19 konnten nur deutlich geringere Titer als im Überstand von HFF bestimmt werden (Abbildung 14 B; beachte unterschiedliche Skala der y-Achse). Auf der Basis dieser Ergebnisse wurden erneut Virusaufreinigungen aus HFF und ARPE-19 nach sechs und acht Tagen durchgeführt. Auch hier konnte keine Steigerung der Ausbeute erzielt werden (nicht gezeigt).



**Abbildung 14: Freisetzung von infektiösem RV-TB40/E aus HFF und ARPE-19.** (A), Virustitration des Überstandes von RV-TB40/E infizierten HFF auf HFF und ARPE-19.  $1,8 \times 10^6$  HFF wurden mit RV-TB40/E (*moi* 3) infiziert. Ein Aliquot des Überstandes wurde zu den angegebenen Zeitpunkten (x-Achse) abgenommen. Anschließend wurde der Virusüberstand auf HFF und ARPE-19 titriert und so die IE1-positiven Zellen pro ml Überstand bestimmt (y-Achse). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Versuchen. (B), Virustitration des Überstandes von RV-TB40/E infizierten ARPE-19 auf HFF und ARPE-19. Weiter wurde analog zu A verfahren.

Zusammengefasst zeigten die Ergebnisse, dass die Verwendung des Stammes RV-TB40/E zur Aufreinigung von DB nicht geeignet war, die für weitere Experimente notwendigen Mengen dieser Partikel bereitzustellen.

### 3.2.3.2 Herstellung einer HCMV<sub>Klin</sub>-Mutante zur pp65-Überexpression in infizierten Zellen

Für Immunisierungsstudien und eine spätere industrielle Produktion von DB als Vakzine wird ein HCMV<sub>Klin</sub>-Stamm benötigt, der zur Freisetzung großer Mengen der viralen Partikel aus infizierten Zellen führt. Da weder eine Variation des verwendeten Zelltyps noch eine Veränderung des Zeitpunkts der Aufreinigung nach Infektion mit RV-TB40/E zu einer höheren DB-Ausbeute führte, musste eine alternative Möglichkeit der Optimierung hinsichtlich der DB Produktion gefunden werden. Hierzu wurde zunächst die Strategie der Überexpression der wichtigsten DB-Komponente, des Tegumentproteins pp65, gewählt.

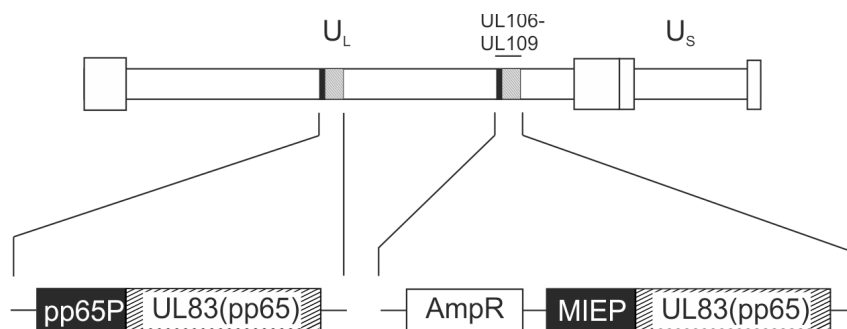
### 3.2.3.2.1 Insertion einer zusätzlichen pp65-Kopie in das Genom von RV-TB40/E

Es ist bekannt, dass pp65 als Hauptbestandteil des viralen Teguments für die Ausbildung von DB notwendig ist (Schmolke et al., 1995). DB bestehen zu über 60 % aus pp65 (Varnum et al., 2004). Es lag daher die Vermutung nahe, dass eine gesteigerte pp65-Expression zu einer vermehrten Freisetzung der subviralen Partikel führt. Um diese Hypothese zu verifizieren, wurde in das Genom des RV-TB40/E eine zusätzliche pp65-Genkopie inseriert.

Hierzu wurde die Methodik der Mutagenese des großen DNA-Genoms von HCMV in Bakterien gewählt. Das 230 kbp Genom von RV-TB40/E lag als *bacterial artificial chromosome* (BAC) Klon vor (Sinzger et al., 2008). Zur Insertion der zweiten Kopie des pp65-Gens wurde eine Strategie gewählt, die eine Deletion der Genomregion UL106-UL109 von HCMV vorsah (Abbildung 15). Diese Region ist für die Replikation *in vitro* verzichtbar (Kulesza und Shenk, 2004).

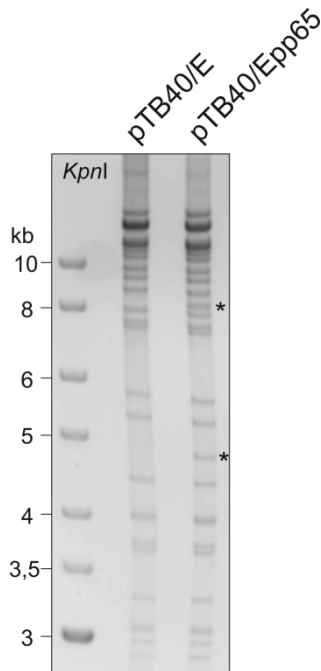
Zur Insertion wurde unter Verwendung der Primer CA1fwd und CA1rev ein PCR-Fragment ausgehend vom Plasmid pCDNA6-pp65\_35 generiert. Dieses Fragment kodierte für pp65 unter der Kontrolle des MIEP von HCMV. Zusätzlich beinhaltete das Fragment ein Ampicillin-Resistenzgen unter Kontrolle eines bakteriellen Promotors zur Selektion.

Die Überhänge der Primer für die Amplifikation waren so gewählt, dass eine punktgenaue Insertion des DNA-Fragments in das pTB40/E unter Deletion von UL106-UL109 über Red-Rekombination möglich war (Zhang et al., 1998; Muyrers et al., 1999). Über die Expression des Ampicillin-Resistenzgens konnte auf diejenigen Bakterienklone selektioniert werden, die das modifizierte BAC-Konstrukt enthielten. Die Struktur des resultierenden pTB40/E-BAC7pp65 (pTB40/Epp65) ist in Abbildung 15 gezeigt.



**Abbildung 15: Schematischer Aufbau der Mutante TB40/E-BAC7pp65.** Dargestellt ist das HCMV-Genom mit seinen *unique long* ( $U_L$ )- und *unique short* ( $U_S$ )-Regionen. In detaillierterer Ansicht sind die beiden pp65-Genkopien (UL83) dargestellt. Die Genomregion UL106-UL109 ist in TB40/E-BAC7pp65 deletiert. pp65P, natürlicher Promotor des pp65-Gens; MIEP, *major immediate early* Promotor von HCMV; AmpR, Ampicillin-Resistenzgen

Die BACmide der so erhaltenen Klone wurden zunächst mittels Restriktionsanalyse untersucht. BAC-Mini-Präparationen der BAC-DNA wurden mit 50 Einheiten des Restriktionsenzym *KpnI* verdaut. Anschließend erfolgte die Analyse der entstanden Fragmente in der Agarose-Gelelektrophorese. In Abbildung 16 ist exemplarisch der Klon von pTB40/Epp65 im Vergleich zum parentalen Stamm pTB40/E dargestellt, der für die weiteren Analysen verwendet wurde.



**Abbildung 16: Restriktionsanalyse von pTB40/E und pTB40/Epp65.** BAC-DNA des Ursprungsstammes (pTB40/E) und des rekombinanten Stammes pTB40/Epp65 wurde mit 50 Einheiten der Restriktionsendonuklease *KpnI* verdaut. Die Fragmente wurden 48 Stunden im 0,8 %igen Agarose-Gel bei 60 V aufgetrennt. Durch die genetische Manipulation befindet sich eine zusätzliche *KpnI*-Schnittstelle (GGTACC) im Genom. Die entstehenden Fragmente sind durch Sterne gekennzeichnet. Links sind die Größen des verwendeten peqGOLD DNA Ladder Mix angegeben.

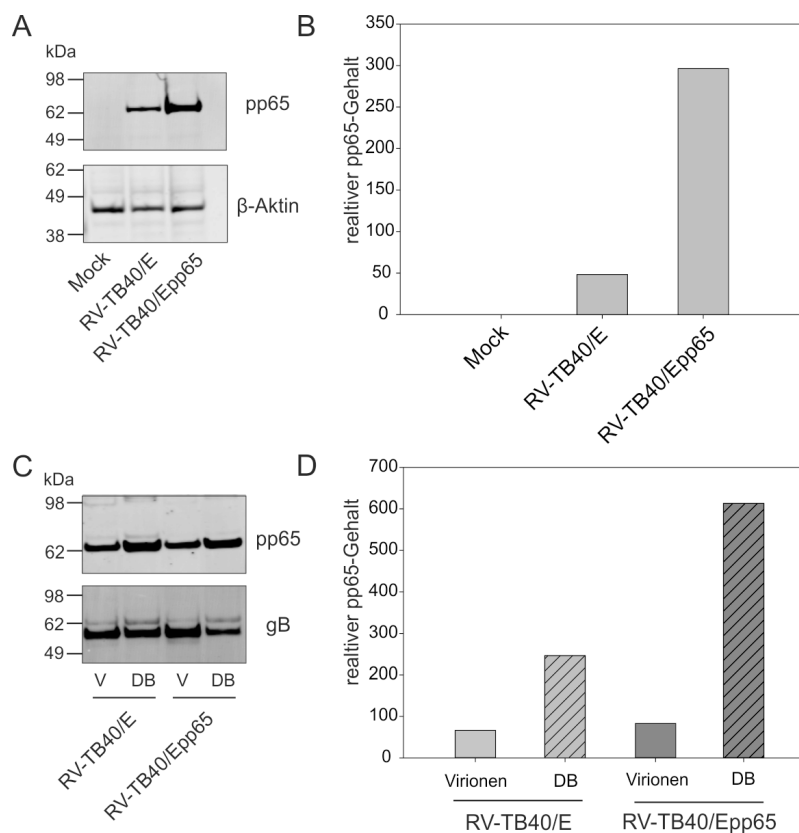
Durch die Manipulation wurde eine weitere *KpnI*-Schnittstelle in das Genom von pTB40/E inseriert. Die Spaltung von pTB40/Epp65 mit *KpnI* führte dementsprechend zum Auftreten von zwei neuen Banden im Spaltmuster, verglichen mit dem Muster von pTB40/E. Die korrekte Insertion an der gewünschten Position im HCMV-Genom wurde anschließend durch Nukleotid-Sequenzierung verifiziert. Der ausgewählte BAC-Klon wurde dann zur Virus-Rekonstitution in HFF transfiziert, das resultierende Virus wurde als RV-TB40/E-BAC7pp65 (RV-TB40/Epp65) bezeichnet.

#### 3.2.3.2.2 Insertion des pp65-Gens führt zur verstärkten Expression des Proteins

In einem ersten Schritt der phänotypischen Analyse von RV-TB40/Epp65 sollte geprüft werden, ob die Insertion des zweiten pp65-Gens tatsächlich zur gesteigerten pp65-Expression führte. Dazu wurden HFF mit einer *multiplicity of infection (moi)* von eins infiziert und die Zellen nach 72 Stunden geerntet. Die Proteine im Zelllysat wurden unter denaturierenden Bedingungen gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend einer Immunoblot-Analyse mit einem pp65-spezifischen Antikörper unterzogen (Abbildung 17 A). Zur quantitativen Analyse wurde parallel  $\beta$ -Aktin mit einem spezifischen Antikörper angefärbt. Die Expression dieses Proteins variiert nicht zwischen HCMV-infizierten und

uninfizierten HFF. Die pp65-Bandenstärken wurden mittels LI-COR „Odyssey Imager“ ermittelt und mit der Aktin-Bandenstärke in Beziehung gesetzt. Die Ergebnisse zeigten, dass pp65 in der Tat nach Infektion mit RV-TB40/Epp65 im Vergleich zur Infektion mit dem parentalen Stamm in sechsfacher Menge in der infizierten Zelle nachweisbar ist (Abbildung 17 B).

In analoger Weise sollte die Verpackung von pp65 in die Partikel des parentalen Stammes und der Mutante geprüft werden. Hierzu wurden HFF, wie oben beschrieben, mit den beiden Viren infiziert. Nach siebentägiger Infektion wurden Virionen und DB aus den Kulturüberständen mittels Gradientenzentrifugation aufgereinigt und einer Immunoblot-Analyse unterzogen. Als Kontrolle diente hier der Nachweis des viralen Hüllproteins gB, das, nach bisherigem Kenntnisstand, pp65-unabhängig in Viruspartikel verpackt wird.



**Abbildung 17: pp65-Gehalt in RV-TB40/E und RV-TB40/Epp65 infizierten HFF und viralen Partikeln.**

(A),  $5 \times 10^5$  HFF wurden mit einer *moi* von 1 infiziert. 72 Stunden nach der Infektion wurden Zelllysate der HFF bezüglich des Gehalts an  $\beta$ -Aktin und pp65 analysiert. Pro Spur in der Bis-Tris-PAGE wurden  $1 \times 10^5$  Zellen eingesetzt. (B), Quantifizierung der pp65-Mengen aus A bezogen auf den  $\beta$ -Aktin-Gehalt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der „Odyssey Imager“-Software. Fluoreszenzintensitäten von pp65 wurden durch die des jeweiligen  $\beta$ -Aktins dividiert. (C), aus HFF aufgereinigte Virionen und DB der verschiedenen Viren wurden hinsichtlich des pp65-Gehalts analysiert. Pro Spur wurden drei  $\mu$ g virale Partikel in der Bis-Tris-PAGE eingesetzt, auf eine Membran geblottet und anschließend im „Odyssey Imager“ detektiert. (D), Quantifizierung der in den viralen Partikeln enthaltenen pp65-Mengen bezogen auf den gB-Gehalt. Die Fluoreszenzintensitäten von pp65 wurden durch die von gB dividiert. V, Virionen; DB, *Dense Bodies*

Es zeigte sich, dass die Überexpression von pp65 zu einer verstärkten Verpackung des Tegumentproteins, bezogen auf gB führte (Abbildung 17 C und D). Während der Anstieg für die Virionen von RV-TB40/Epp65 im Vergleich zu den Virionen des Ausgangsstamms noch relativ diskret war, fand sich in den DB der Mutante mehr als doppelt so viel pp65 als in den DB von RV-TB40/E.

Zusammengefasst zeigten diese Analysen, dass die Insertion einer zweiten Kopie des pp65-Gens in der Tat zu einer Überexpression des Tegumentproteins in der Zelle führt und dass dies zu einer höheren Verpackungsrate von pp65 in virale Partikel führt.

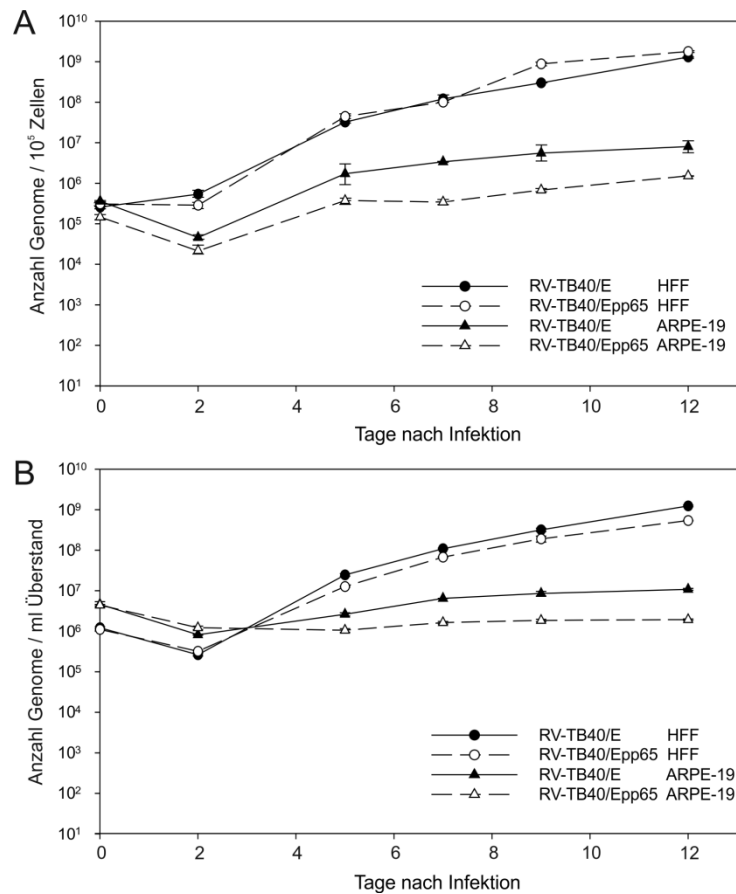
### 3.2.3.2.3 Einfluss der pp65-Überexpression auf die Virusreplikation

Zur phänotypischen Analyse der Replikationsfähigkeit von RV-TB40/Epp65 wurde die Methodik der quantitativen PCR-Analyse gewählt. Es wurden je  $5 \times 10^5$  HFF und ARPE-19 mit einer *moi* von 0,1 mit dem parentalen Stamm oder mit der Mutante infiziert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Infektion wurden Zellproben entnommen und daraus virale DNA isoliert. Die DNA wurde bis zum Zeitpunkt der Analyse bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  weggefroren. Die Konzentration an viraler DNA in den Proben wurde dann in einem Ansatz mittels TaqMan<sup>TM</sup> PCR Analyse bestimmt (Abbildung 18 A).

Nach Infektion von HFF zeigte sich keine Veränderung in der Replikation viraler DNA in Abhängigkeit vom verwendeten Stamm. Demgegenüber zeigte RV-TB40/Epp65 im Vergleich zum Ausgangsstamm in ARPE-19-Zellen eine eingeschränkte Genomreplikation. Für beide Stämme war die Replikation der DNA in HFF deutlich effizienter als in Epithelzellen.

In einem zweiten Schritt wurde der Gehalt an viraler DNA im Kulturmedium der infizierten Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht. Dieser Parameter hatte sich in Vorarbeiten als zuverlässiges Surrogat für die Freisetzung viraler Partikel erwiesen. Als initiale Infektionsdosis wurde wiederum eine *moi* von 0,1 eingesetzt.

Es zeigte sich, dass infizierte HFF vergleichbare Kopienzahlen viraler Genome der beiden Stämme freisetzen, wobei RV-TB40/Epp65 leicht hinter seinem parentalen Stamm zurückblieb (Abbildung 18 B). Analog zur DNA-Replikation fanden sich in den Überständen von RV-TB40/Epp65 infizierten ARPE-19 Zellen deutlich weniger Genome als bei RV-TB40/E infizierten Epithelzellen.



**Abbildung 18: Analyse der Genomreplikation und der Genomfreisetzung nach Infektion mit RV-TB40/E und RV-TB40/Epp65.** (A), TaqMan<sup>TM</sup>-PCR Analyse der viralen Genomreplikation in HFF und ARPE-19. Die Zellen wurden mit einer *moi* von 0,1 infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion wurden die Zellen geerntet, gesamtzelluläre DNA isoliert und diese bis zur Analyse weggefroren. Die PCR-Analyse wurde für alle Proben zum gleichen Zeitpunkt durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus drei Reaktionsansätzen. (B), TaqMan<sup>TM</sup>-PCR Analyse der Freisetzung viraler Genome aus HFF und ARPE-19. Die Zellen wurden mit einer *moi* von 0,1 infiziert. Die Überstände wurden zu den angegebenen Zeitpunkten gewonnen und bis zur Analyse weggefroren. Die PCR-Analyse wurde für alle Proben zum gleichen Zeitpunkt durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte und die Standardabweichung aus drei Reaktionsansätzen.

Zusammenfassend zeigten diese Experimente, dass RV-TB40/E und RV-TB40/Epp65 in HFF in vergleichbarer Weise ihre DNA replizieren und viralen Nachkommen freisetzen. Demgegenüber führte die Überexpression von pp65 in RV-TB40/Epp65 infizierten Epithelzellen zu einer klaren Einschränkung der viralen DNA-Replikation und Virusfreisetzung. Für beide Stämme galt, dass die Replikation und Freisetzung in Fibroblasten deutlich effizienter war als in Epithelzellen.



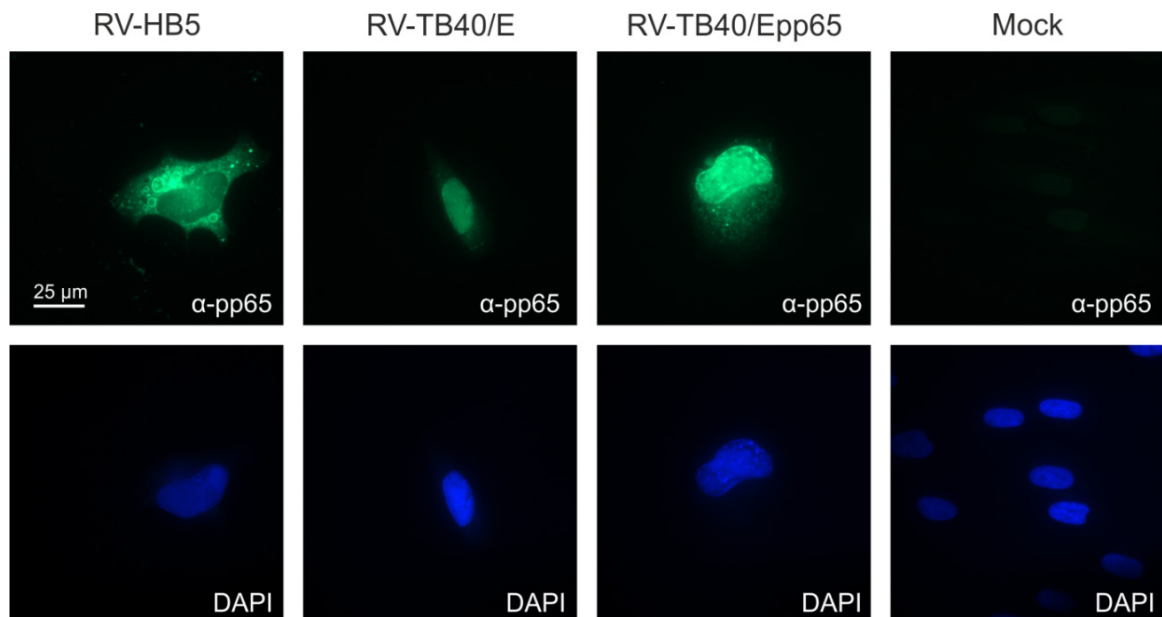
#### 3.2.3.2.4 Analyse der Freisetzung von DB durch RV-TB40/Epp65 infizierte Zellen

Das Ziel der pp65-Überexpression war es, die Produktion und Freisetzung von DB durch einen HCMV-Stamm, der gH/gL/pUL128-UL131A exprimiert (RV-TB40/E) zu steigern. Um zu prüfen, ob dieses Ziel erreicht wurde, wurden HFF mit RV-TB40/Epp65 infiziert. Die freigesetzten Partikel wurden sieben Tage nach Infektion aus dem Kulturüberstand mittels Gradientenzentrifugation aufgereinigt. Es zeigte sich, dass im Vergleich zu den bereits ermittelten Werten für RV-TB40/E (Tabelle 2) nur eine geringe Steigerung der Ausbeute von DB, gemessen an der Proteinkonzentration in der Probe, erzielt werden konnte. So betrug die Steigerung auf eine Zellzahl von  $3,6 \times 10^7$  initial infizierten HFF lediglich 3,6 µg.

Zur Klärung, warum eine deutliche pp65 Überexpression nach Infektion mit RV-TB40/Epp65 nicht zu einer analog gesteigerten Freisetzung von DB führte, wurde die pp65-Lokalisation in infizierten HFF untersucht. Die DB-Freisetzung aus der infizierten Zelle korreliert direkt mit der zytoplasmatischen Anordnung des eigentlich nukleophilen Proteins zu späten Phasen der HCMV-Infektion. HFF wurden für acht Tage mit RV-TB40/Epp65 und, zum Vergleich, mit dem HCMV<sub>Lab</sub> RV-HB5 und mit RV-TB40/E infiziert. Die zelluläre Lokalisation von pp65 wurde in der indirekten Immunfluoreszenz mit einem pp65-spezifischen Antikörper dargestellt (Abbildung 19).

Es zeigte sich, dass pp65 sowohl nach Infektion mit RV-TB40/E wie auch nach Infektion mit RV-TB40/Epp65 nahezu ausschließlich nukleär lokalisiert blieb. Für RV-TB40/Epp65 konnte eine schwache zytoplasmatische pp65-Färbung nachgewiesen werden (Abbildung 19). Im Gegensatz dazu fand sich nach achttägiger Infektion mit RV-HB5 der für HCMV<sub>Lab</sub> bekannte Phänotyp einer fast vollständigen zytoplasmatischen Lokalisation von pp65. Ähnliche Befunde ergaben sich auch nach sechstägiger Infektion (nicht gezeigt). Bei der Analyse infizierter ARPE-19 zeigte sich sowohl für RV-TB40/E als auch für RV-TB40/Epp65 eine ausschließliche nukleäre pp65 Lokalisation. RV-HB5 ist für ARPE-19 nicht infektiös, so dass eine analoge Analyse hier nicht durchgeführt werden konnte.

Die globulären Strukturen, die nach HCMV<sub>Lab</sub>-Infektion von HFF im Zytoplasma zu detektieren waren, können als Hinweis auf die Produktion von DB gewertet werden (Abbildung 19). Bei RV-TB40/Epp65 infizierten HFF konnten ebenfalls solche Strukturen, wenngleich in deutlich geringerem Ausmaß, detektiert werden.



**Abbildung 19: Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse von RV-TB40/Epp65 infizierten HFF.**  $5 \times 10^5$  HFF wurden mit den HCMV<sub>Klin</sub>-Stämmen RV-TB40/Epp65 und RV-TB40/E, sowie dem HCMV<sub>Lab</sub> RV-HB5 infiziert. Acht Tage nach Infektion mit den angegebenen Virus-Stämmen wurden die HFF mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert. Zum Nachweis der pp65-Lokalisation wurden spezifische, monoklonale Antikörper verwendet. Die Zellkerne sind mit DAPI angefärbt worden. Gezeigt ist jeweils eine repräsentative Zelle.

Zusammenfassend zeigten diese Ergebnisse, dass die Bildung und Freisetzung von DB selbst durch massive Überexpression des Hauptbestandteils der Partikel, des pp65, nicht wesentlich gesteigert werden kann. Ein naheliegender Grund hierfür konnte in der nukleären Retention des pp65 liegen, die nach Infektion mit HCMV<sub>Klin</sub> gefunden wird. Das pp65 steht bei diesen Stämmen offensichtlich nicht für die zytoplasmatische Formation von DB zur Verfügung, die Menge an freigesetzten Partikeln ist daher minimal. Interessanterweise führt selbst eine massive Überexpression von pp65 nicht zu einer Umverteilung des Proteins. Die Gründe für die unterschiedliche pp65-Verteilung in HCMV<sub>Klin</sub> und HCMV<sub>Lab</sub> infizierten HFF sind bislang nicht geklärt.

### 3.2.3.3 Etablierung eines HCMV<sub>Lab</sub> mit funktionellem pentamerem Komplex

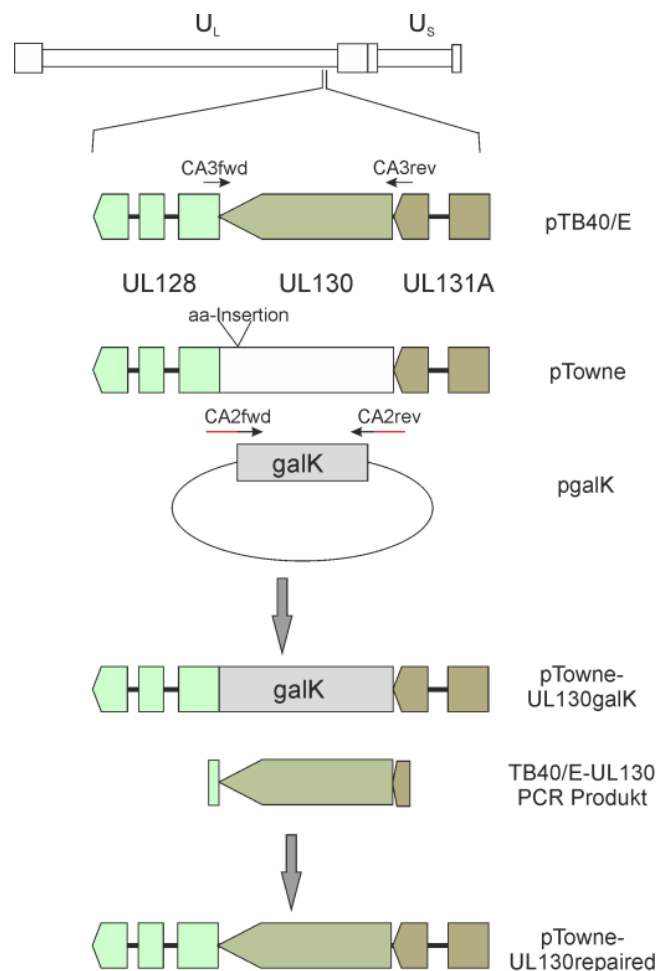
Die Insertion einer zweiten Kopie des pp65-Gens in das Genom eines HCMV<sub>Klin</sub> und die damit verbundene Überexpression des Tegumentproteins führte zwar zu leicht erhöhter Freisetzung von DB aus HFF, jedoch nicht in einem Maß, um Immunisierungsversuche oder eine industrielle DB Produktion zuzulassen. Es wurde daher ein weiterer alternativer Weg zur Etablierung eines Pentamer-positiven HCMV-Stammes mit hoher DB Produktion gewählt. Hierzu sollte der HCMV<sub>Lab</sub> Towne herangezogen werden, der bekannter Maßen hohe Mengen an DB produziert (Tabelle 2). Aufgrund einer Mutation in UL130 wird in HFF nach Infektion mit diesem Stamm kein pentamerer Komplex gebildet.

Ziel der hier verfolgten Strategie war es nun, das mutierte UL130-Gen des Stammes Towne durch das intakte UL130-Gen von TB40/E mittels BAC-Mutagenese zu ersetzen und so den pentameren Komplex zu rekonstituieren. Damit sollte die hohe DB Produktionsrate mit der Expression des pentameren Komplexes kombiniert werden.

### 3.2.3.3.1 Reparatur des HCMV<sub>Lab</sub> RV-Towne-BAC

Zur Rekonstitution des pentameren Komplexes war es notwendig, den mutierten Bereich im Genom von RV-Towne-BAC (RV-Towne) zu ersetzen. Dies wurde nach dem von unserem Labor für HCMV etablierten Verfahren der GalK Positiv-/ Negativselektion durchgeführt (Mersseman et al., 2008).

Hierzu wurde in einem ersten Schritt das UL130-Gen in pTowne-BAC (pTowne) gegen das der Galaktokinase ausgetauscht (Abbildung 20).

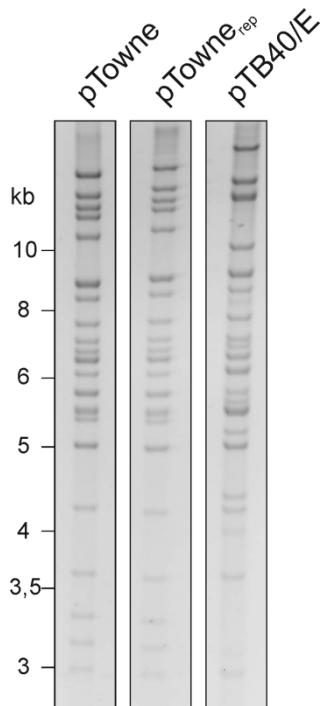


**Abbildung 20: Schematische Darstellung der Reparatur von pTowne.** Im oberen Teil ist das HCMV-Genom mit seinen *unique long* ( $U_L$ )- und *unique short* ( $U_S$ )-Regionen dargestellt. In detaillierter Ansicht ist der genomische Bereich, der UL128-UL131A umfasst, abgebildet. a, Adenin

Durch Verwendung der Primer CA2fwd und CA2rev wurden dazu während der PCR-Amplifikation homologe Überhänge an das 3'- und 5'-Ende des *galK*-Gens angefügt, um eine punktgenaue Insertion durch Red-Rekombination in pTowne zu ermöglichen. Durch Transformation des PCR-Fragments in Bakterien, die pTowne enthielten, und Induktion der Red-Rekombinase konnte die Insertion des *galK*-Gens unter Deletion des mutierten UL130-Gens erreicht werden. Da nur die Bakterien, die die Galaktokinase exprimierten Galaktose als Kohlenstoffquelle verwerten konnten, war eine Selektion positiver Klone auf Minimalmedium mit Galaktose-Zusatz möglich. Die erhaltenen Klone wurden im Anschluss mit Kolonie-PCR hinsichtlich der korrekten Insertion der *galK*-Kassette in pTowne überprüft. Die resultierenden BAC-Intermediate wurden als pTowne-UL130galK bezeichnet.

In einem zweiten Schritt wurde das *galK*-Gen gegen das UL130-Gen des Stammes TB40/E ausgetauscht. Hierzu wurde ein PCR-Fragment des UL130-Gens erzeugt, das an seinen 3'- und 5'-Enden Überhänge zur punktgenauen Insertion in den UL130-Lokus unter gleichzeitiger Deletion von *galK* enthielt. Nach Transformation des PCR-Fragments in Bakterien, die pTowne-UL130galK enthielten und nachfolgender Induktion der Red-Rekombinase, entstanden Konstrukte, die ein intaktes UL130-Gen enthielten, denen aber nun die Expression der Galaktokinase fehlte. Zur Negativselektion wurde dem Minimalmedium nunmehr Desoxygalaktose zugesetzt. Die Galaktokinase setzt dieses Substrat zu 2-Desoxy-Galaktose-1-Phosphat um, einem toxischen Produkt, das kein Bakterienwachstum zulässt. So konnten solche Klone vereinzelt werden, bei denen *galK* fehlte, die aber UL130 enthielten. Mittels Kolonie-PCR und anschließender Sequenzierung wurde die Insertion des UL130 aus pTB40/E bestätigt. Die resultierenden BACmide wurden als pTowne-UL130*repaired* (pTowne<sub>rep</sub>) bezeichnet.

Zum Ausschluss größerer Deletionen als Folge der Mutagenese des HCMV-BACmids in *E. coli* wurden Restriktionsanalysen durchgeführt. Die BACmide pTowne, pTowne<sub>rep</sub> und, zu Vergleichszwecken, pTB40/E wurden hierzu mit *Xho*I verdaut und die Fragmente im Agarose-Gel aufgetrennt (Abbildung 21). Das Restriktionsmuster von pTowne und pTowne<sub>rep</sub> zeigte in der Tat keinerlei Unterschiede. Dies entsprach der Erwartung, da sich die beiden BACmide nur durch zwei zusätzliche Adenine in UL130 von pTowne unterscheiden. Im Gegensatz dazu zeigte der zur Kontrolle mitgeführte pTB40/E ein deutlich abweichendes Restriktionsmuster, charakteristisch für die Varianz zwischen unterschiedlichen HCMV-Stämmen.



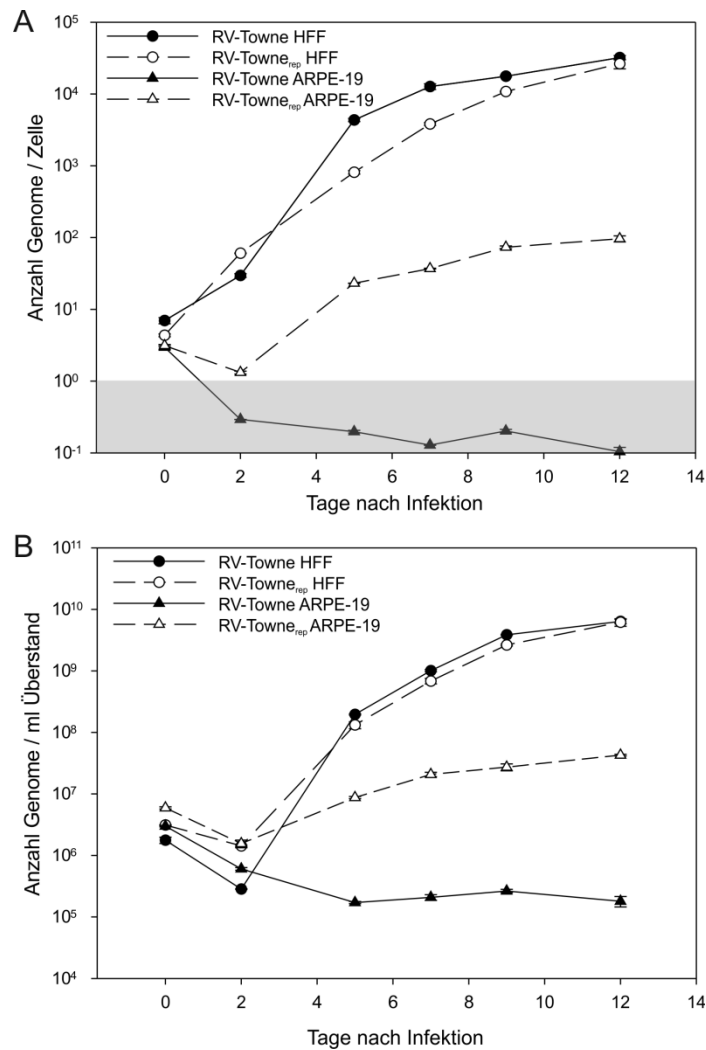
**Abbildung 21: Restriktionsanalyse von pTowne<sub>rep</sub>.** Die BAC-DNA von pTowne<sub>rep</sub> sowie des parental Stammes und, als Vergleich, von pTB40/E wurden mit 50 Einheiten der Restriktionsendonuklease *XhoI* verdaut. Die entstandene Fragmente wurden 48 Stunden bei 60 V im 0,8 %igen Agarose-Gel aufgetrennt. Links sind die Größen des verwendeten peqGOLD DNA Ladder Mix angegeben.

Eine weitere Restriktionsanalyse mit *BamHI* lieferte ein vergleichbares Ergebnis (nicht gezeigt). pTowne<sub>rep</sub> wurde in der Folge zur Rekonstitution in HFF transfiziert, der resultierende Virusstamm wurde als RV-Towne-UL130repaired (RV-Towne<sub>rep</sub>) bezeichnet.

#### 3.2.3.3.2 RV-Towne<sub>rep</sub> zeigt HCMV<sub>Klin</sub> Zelltropismus

Zur näheren Charakterisierung von RV-Towne<sub>rep</sub> wurden die virale Genomreplikation und die Freisetzung viraler Nachkommen vergleichend zum parental Stamm untersucht. Hierzu wurden HFF und ARPE-19 mit je vier Genomen pro Zelle (*moi* 0,1) infiziert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten Proben von infizierten Zellen entnommen. Die virale DNA wurde isoliert und nachfolgend mittels TaqMan<sup>TM</sup> PCR quantifiziert (Abbildung 22 A).

Die Analysen zeigten, dass die Genomreplikation von RV-Towne<sub>rep</sub> in HFF geringgradig hinter der von RV-Towne zurückbleibt (Abbildung 22 A). Bei einer Infektion von ARPE-19 ist nur der HCMV<sub>Klin</sub> RV-Towne<sub>rep</sub> in der Lage zu replizieren. Zwar waren zu Beginn auch Genome des HCMV<sub>Lab</sub> RV-Towne in ARPE-19 detektierbar, jedoch lag die DNA Menge bereits zwei Tage nach der initialen Infektion unterhalb der Nachweisgrenze der TaqMan<sup>TM</sup>-PCR. RV-Towne<sub>rep</sub> replizierte in ARPE-19, in Analogie zu RV-TB40/E, langsamer als in HFF (Abbildung 18 A).

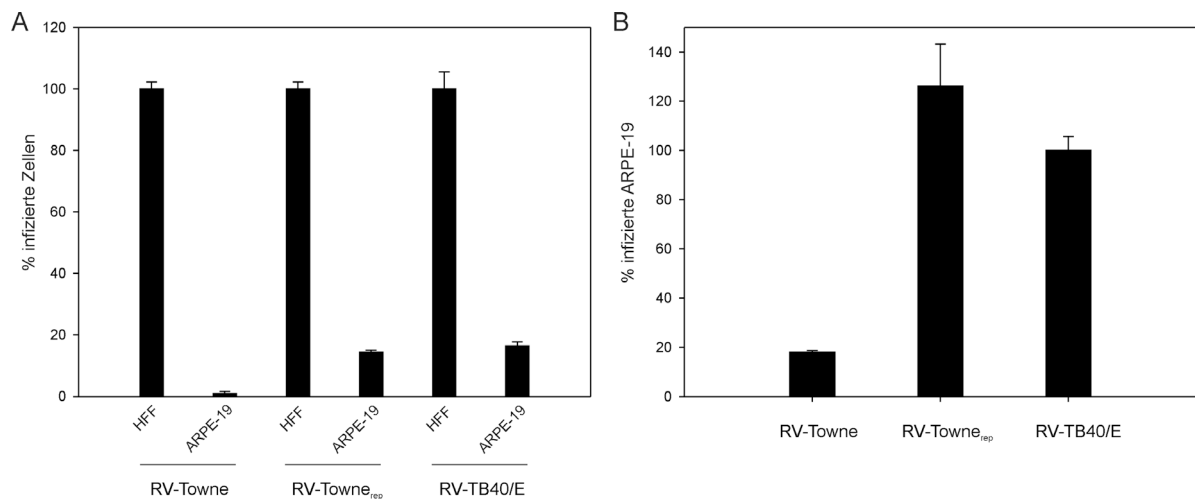


**Abbildung 22: Analyse der Genomreplikation und der Genomfreisetzung nach Infektion mit RV-Towne<sub>rep</sub> und RV-Towne.** (A), TaqMan<sup>TM</sup>-PCR Analyse der viralen Genomreplikation in HFF und ARPE-19. Je  $5 \times 10^5$  Zellen wurden mit einer *moi* von 0,1 infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion wurden die Zellen geerntet, gesamtzelluläre DNA isoliert und bis zur Analyse weggefroren. Die PCR-Analyse wurde für alle Proben zum gleichen Zeitpunkt durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus drei Reaktionsansätzen. Der grau hinterlegte Bereich gibt die Nachweisgrenze der qRT-PCR an. (B), TaqMan<sup>TM</sup>-PCR Analyse der Freisetzung viraler Genome aus HFF und ARPE-19. Die Zellen wurden mit einer *moi* von 0,1 infiziert. Die Überstände wurden zu den angegebenen Zeitpunkten gewonnen und bis zur Analyse weggefroren. Dargestellt sind Mittelwerte und die Standardabweichung aus drei Reaktionsansätzen.

In analoger Weise wurden die Zellkulturüberstände hinsichtlich der Freisetzung viraler Genome untersucht. Während im Überstand von HFF keine Unterschiede in der Freisetzung von RV-Towne und RV-Towne<sub>rep</sub> festgestellt werden konnten, setzten nur solche ARPE-19-Kulturen virale Genome frei, die mit RV-Towne<sub>rep</sub> infiziert worden waren (Abbildung 22 B). Die Menge an freigesetzten Genomen als Surrogat für Virusfreisetzung war hier deutlich niedriger als für HFF.

Die Ergebnisse zeigten, dass RV-Towne<sub>rep</sub> im Gegensatz zu seinem parentalen Stamm RV-Towne nach der „Reparatur“ von UL130 nun in der Lage war, Epithelzellen zu infizieren. Dies legte nahe, dass RV-Towne<sub>rep</sub> nunmehr wieder einen funktionell wirksamen pentameren Komplex auf seiner Oberfläche exprimiert und dadurch den breiten Zelltropismus von HCMV<sub>Klin</sub> zurückgewonnen hatte.

In einem nächsten Schritt sollte die Infektionseffizienz von RV-Towne<sub>rep</sub> der von RV-TB40/E gegenüber gestellt werden. Dazu wurden HFF und ARPE-19 mit einer *moi* von eins infiziert. Als Negativkontrolle wurde RV-Towne eingesetzt. 24 Stunden nach Infektion wurde eine indirekte Immunfluoreszenz-Analyse mit einem IE1-spezifischen Antikörper durchgeführt. Zellkerne wurden mit DAPI dargestellt. Die Mittelwerte der infizierten HFF wurden gleich 100 % gesetzt und waren für alle drei unterschiedlichen Viren vergleichbar (Abbildung 23 A). Die Anzahl der IE1-positiven ARPE-19 wurde entsprechend umgerechnet. Die Ergebnisse mit hoher *moi* zeigten, dass RV-Towne<sub>rep</sub> ARPE-19 Zellen mit einer Effizienz infizierte, die mit der von RV-TB40/E vergleichbar war. Diese lag, wie erwartet, für beide Viren deutlich unter der Infektionseffizienz gegenüber HFF.



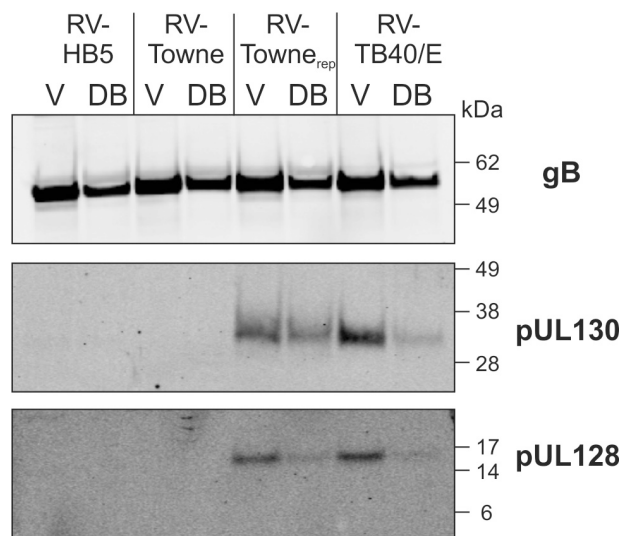
**Abbildung 23: Infektionsvergleich von RV-Towne<sub>rep</sub> und RV-TB40/E.** (A), Quantitative Analyse des Zelltropismus von RV-Towne<sub>rep</sub>. ARPE-19 und HFF wurden mit einer *moi* von eins der jeweiligen Viren infiziert. Nach 24 Stunden wurden IE1-positive Zellen über indirekte Immunfluoreszenz detektiert. Fünf zufällig ausgewählte mikroskopische Felder wurden ausgezählt und die mittlere Anzahl der infizierten HFF als 100 % gesetzt. Der prozentuale Anteil von infizierten ARPE-19 wurde entsprechend umgerechnet. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. (B), ARPE-19-Zellen wurden mit einer *moi* von 0,2 infiziert. 24 Stunden später wurden die IE1-positiven Zellen in fünf zufällig ausgewählten mikroskopischen Feldern ausgezählt. Die mit RV-TB40/E infizierten Zellen wurden als 100 % gesetzt und die anderen dementsprechend umgerechnet.

Um die Ergebnisse zu bestätigen, wurde in einem zweiten Ansatz mit niedriger *moi* infiziert (Abbildung 23 B). Auch hier war keine deutliche Abweichung in der Infektionsrate von RV-Towne<sub>rep</sub> im Vergleich zu RV-TB40/E erkennbar.

Zusammengefasst zeigten diese Ergebnisse, dass RV-Towne<sub>rep</sub> durch die „Reparatur“ von UL130 nunmehr wieder in der Lage war, ARPE-19-Zellen mit gleicher Effizienz zu infizieren wie RV-TB40/E, einem typischen Vertreter von HCMV<sub>Klin</sub>-Stämmen.

### 3.2.3.3.3 Nachweis von UL128 und UL130 in den Partikeln von RV-Towne<sub>rep</sub>

Die Infektion von ARPE-19-Zellen durch RV-Towne<sub>rep</sub> deutete darauf hin, dass der pentamere Komplex aus gH/gL/pUL128-UL131A im Gegensatz zum parentalen Stamm in Viruspartikel verpackt wird. Um den Nachweis dafür zu erbringen, wurden Virionen und DB von RV-Towne<sub>rep</sub> im Western-Blot analysiert. Dazu wurden aus HFF freigesetzte Partikel zweier HCMV<sub>Lab</sub> (RV-HB5; RV-Towne), von RV-Towne<sub>rep</sub> und von RV-TB40/E aufgereinigt und die Proteine aus jeweils gleichen Mengen an Virionen und DB durch Bis-Tris-PAGE aufgetrennt. Im Odyssey-Western Blot wurden anschließend die Oberflächenproteine gB, UL128 und UL130 durch spezifische Antikörper angefärbt (Abbildung 24). Unter Verwendung des Antikörpers gegen pUL130 konnte eine Bande an erwarteter Position in denjenigen Spuren nachgewiesen werden, die mit Virionen und DB der Stämme RV-Towne<sub>rep</sub> und RV-TB40/E beladen worden waren (Abbildung 24). Derartige Signale fehlten in den entsprechenden Spuren mit Partikeln der beiden HCMV<sub>Lab</sub>. Dies zeigte, dass RV-Towne<sub>rep</sub> im Gegensatz zu seinem parentalen Stamm pUL130 mit der erwarteten molekularen Masse exprimierte.



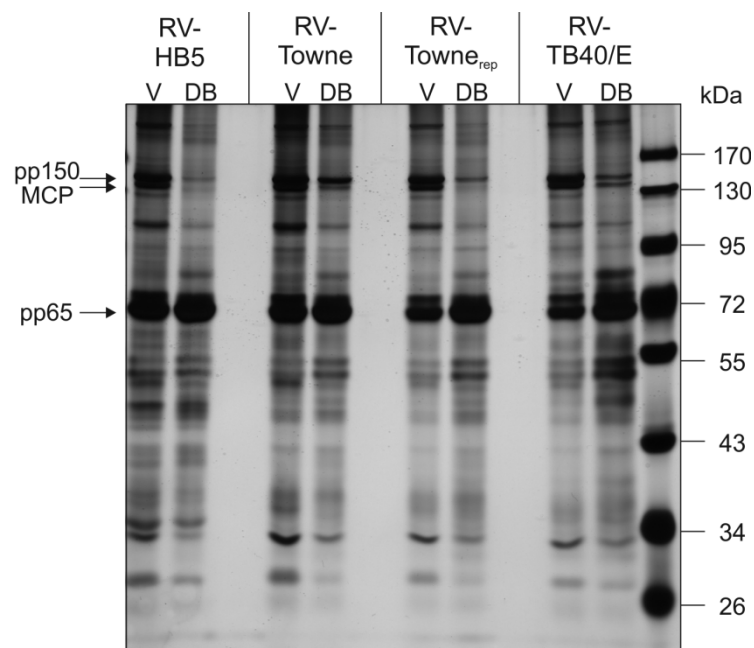
**Abbildung 24: Nachweis der Proteine des pentameren Komplexes auf viralen Partikeln.** Die Verpackung von pUL128 und pUL130 in Virionen und DB der verschiedenen Viren wurde im Western-Blot analysiert. Pro Spur wurden drei µg Partikel aus HFF aufgetragen. Für den Nachweis wurden monoklonale Antikörper verwendet. Als Kontrolle wurde gB angefärbt. Die molekularen Massen des verwendeten Markers sind rechts angegeben. V, Virionen; DB, *Dense Bodies*



Ein analoges Ergebnis zeigte sich mit einem pUL128-spezifischen Antikörper, auch hier fanden sich spezifische Signale an erwarteter Position nur in Proben mit Partikeln der beiden HCMV<sub>Klin</sub>. Der Nachweis beider Proteine im Partikel lieferte einen weiteren Hinweis, dass der pentamere Komplex in der Tat in infizierten Zellen gebildet und in Partikel des RV-Towne<sub>rep</sub> verpackt wird. Die Verpackung beider Proteine ist von der Ausbildung des Komplexes abhängig (Wang und Shenk, 2005b; Ryckman et al., 2008b). Dadurch wurde gleichzeitig der Hinweis erbracht, dass DB analog zu Virionen von RV-Towne<sub>rep</sub> diesen Komplex enthalten.

Zur weiteren Analyse des Proteinmusters von DB und Virionen von RV-Towne<sub>rep</sub> wurden die Partikel einer SDS-PAGE unterzogen und die Polypeptide durch Silberfärbung sichtbar gemacht (Abbildung 25). Die Analyse zeigte im Vergleich der vier Stämme keine wesentlichen Unterschiede im Bandenmuster der Virionen und DB. Bei allen DB Präparationen sind erwartungsgemäß MCP und pp150 unterrepräsentiert, wohingegen pp65 dominiert. Die Proteine des pentameren Komplexes finden sich in den Partikeln in deutlich geringeren Mengen als die genannten Proteine, so dass eine eindeutige Zuordnung zu bestimmten Banden mit einer derartigen Analyse nicht möglich ist.

Diese Analyse zeigte, dass sich durch die genetische Manipulation, die zur Herstellung von RV-Towne<sub>rep</sub> notwendig war, die Zusammensetzung viraler Partikel in Bezug auf ihre weiteren, wesentlichen Bestandteile nicht verändert hatte.



**Abbildung 25: Vergleichende Analyse des Proteinmusters von Virionen und DB verschiedener Virus-Stämme.** Pro Spur wurden zwei  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein aufgetragen und über SDS-PAGE aufgetrennt. Durch die anschließende Silberfärbung wurden die verschiedenen Proteinbestandteile dargestellt. Rechts sind die entsprechenden molekularen Massen des Markers angegeben. V, Virionen; DB, *Dense Bodies*

#### 3.2.3.3.4 Analyse der Freisetzung von DB durch RV-Towne<sub>rep</sub> infizierte Zellen

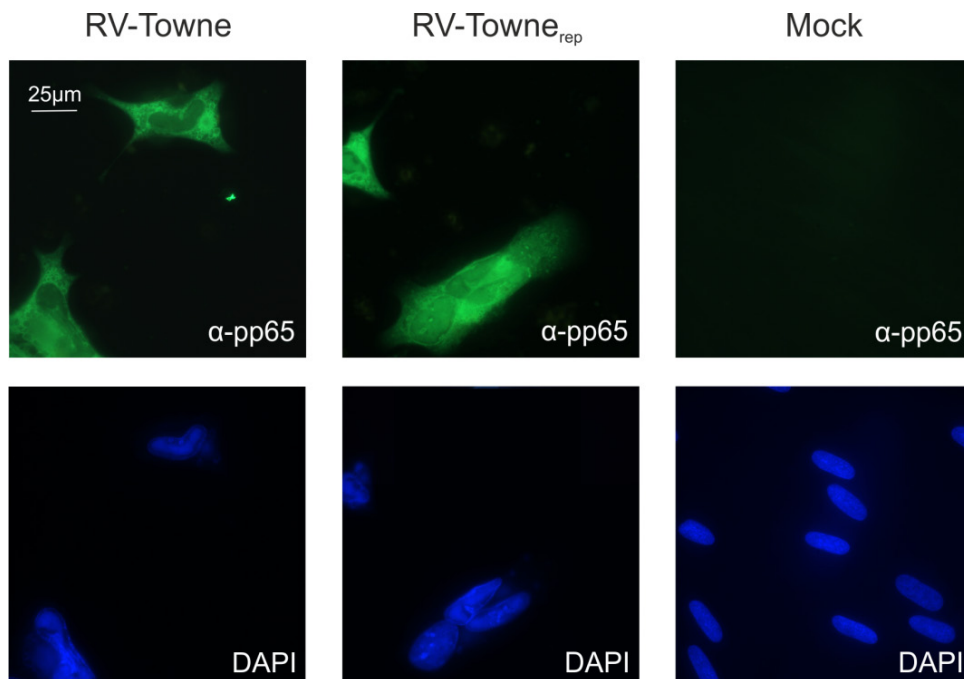
Genetische Manipulation am großen DNA-Genom von HCMV in Bakterien ist grundsätzlich mit dem Risiko sekundärer Mutationen verknüpft. Derartige Mutationen stehen bei der Vermehrung der BAC-DNA in *E. coli* nicht unter negativem Selektionsdruck. Solange Mutationen nicht solche viralen Funktionen betreffen, deren Expression die für die Vermehrung in Zellkultur unverzichtbar sind, werden diese bei der Rekonstitution des Virus in HFF nicht notwendigerweise auffallen. Es war daher unklar, ob die Eigenschaft des parentalen Stammes RV-Towne zur Produktion großer Mengen an DB nach Rekonstitution von RV-Towne<sub>rep</sub> erhalten war. Eine direkte, genetische Überprüfung war nicht möglich, da die Mechanismen, die in der infizierten Zelle den Spiegel an DB-Produktion bestimmen, nicht geklärt sind. Es wurde daher eine phänotypische Analyse der DB-Bildung nach RV-Towne<sub>rep</sub>-Infektion durchgeführt.

In einem ersten Schritt wurden RV-Towne<sub>rep</sub> infizierte HFF in der indirekten Immunfluoreszenz-Analyse mit einem pp65-spezifischen Antikörper dargestellt. Als Kontrolle dienten RV-Towne infizierte Zellen (Abbildung 26). Nach achttägiger Infektion zeigte sich kein Unterschied in der subzellulären Anordnung des Tegumentproteins zwischen den beiden Stämmen. In beiden Fällen war pp65 weitgehend zytoplasmatisch lokalisiert. Dabei konnten globuläre Strukturen, die mit dem pp65-spezifischen Antikörper angefärbt wurden, an den zytoplasmatischen Ausläufern der infizierten HFF detektiert werden. Derartige Strukturen werden als Hinweis für die DB Produktion gewertet. Identische Ergebnisse wurden auch nach sechstägiger Infektion von HFF beobachtet (nicht gezeigt). Diese Ergebnisse deuteten bereits einen klaren phänotypischen Unterschied zwischen RV-Towne<sub>rep</sub> und dem HCMV<sub>Klin</sub> RV-TB40/E an. Bei letzterem Stamm war pp65 weitgehend nukleär angeordnet, die Bildung von DB im Zytoplasma konnte nicht gefunden werden.

Trotz einer vergleichbaren Lokalisation von pp65 zeigte sich auch ein Unterschied im Phänotyp von RV-Towne<sub>rep</sub> und RV-Towne. Eine Infektion mit der reparierten Variante führte zu einer verstärkten Fusionsaktivität der infizierten HFF, so dass mehrkernige Riesenzellen entstanden. Durch die Infektion mit dem HCMV<sub>Lab</sub> RV-Towne konnte diese Fusionsaktivität kaum beobachtet werden.

In einem nächsten Ansatz wurde die Menge an DB bestimmt, die aus RV-Towne<sub>rep</sub> infizierten HFF freigesetzt wurden. Hierzu wurden die Partikel von beiden Stämmen über Gradientenzentrifugation aus Kulturüberstand infizierter Zellen aufgereinigt und analysiert. Eine Bestimmung des Proteingehalts in der Fraktion Gradienten-gereinigter DB von RV-Towne<sub>rep</sub> ergab einen Wert von  $19,3 \mu\text{g} \pm 6,1 \mu\text{g}$  auf  $1 \times 10^6$  HFF (Mittelwert mit Standardabweichung aus zwei unabhängigen Reinigungen). Zwar setzten RV-Towne<sub>rep</sub> infizierte HFF damit nur noch knapp die Hälfte der Menge an DB frei, die nach RV-Towne Infektion erhalten worden war, im Vergleich zur Freisetzung nach RV-TB40/E-Infektion war dies aber eine fast 15fache Steigerung (Tabelle 2). Die Menge an freigesetzten

Virionen war mit  $16,02 \mu\text{g} \pm 3,72 \mu\text{g}$  pro  $1 \times 10^6$  HFF vergleichbar mit der Menge, die nach RV-Towne-Infektion freigesetzt wurde ( $12,3 \pm 0,5 \mu\text{g}$ , Tabelle 2).



**Abbildung 26: Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse von RV-Towne<sub>rep</sub> infizierten HFF.**  $5 \times 10^5$  HFF wurden mit RV-Towne<sub>rep</sub> und RV-Towne infiziert. Acht Tage nach Infektion mit den angegebenen Virus-Stämmen wurden die HFF mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert. Zum Nachweis der pp65-Lokalisation wurden spezifische, monoklonale Antikörper verwendet. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Gezeigt ist ein repräsentativer Ausschnitt.

Zusammenfassend zeigten diese Analysen, dass ein Austausch des mutierten UL130 von RV-Towne gegen UL130 aus RV-TB40/E zu einem Virus führte, dessen Zelltropismus mit einem HCMV<sub>Klin</sub> vergleichbar war. Die nach Infektion mit RV-Towne<sub>rep</sub> von HFF freigesetzten Partikel enthielten, im Gegensatz zu den Virionen und DB des HCMV<sub>Lab</sub>-Stammes RV-Towne, pUL128 und pUL130. Das Proteinmuster der Partikel nach SDS-PAGE war in beiden Stämmen vergleichbar. Schließlich konnte in RV-Towne<sub>rep</sub> infizierten HFF-Kulturen ein Ausmaß an DB Freisetzung gefunden werden, das nun weitergehende Analysen zur Immunogenität von DB mit dem pentameren Komplex erlaubte.

### 3.2.4 Immunisierungen mit DB von RV-Towne<sub>rep</sub> induzieren eine stärkere neutralisierende Antikörperantwort als DB von HCMV<sub>Lab</sub>

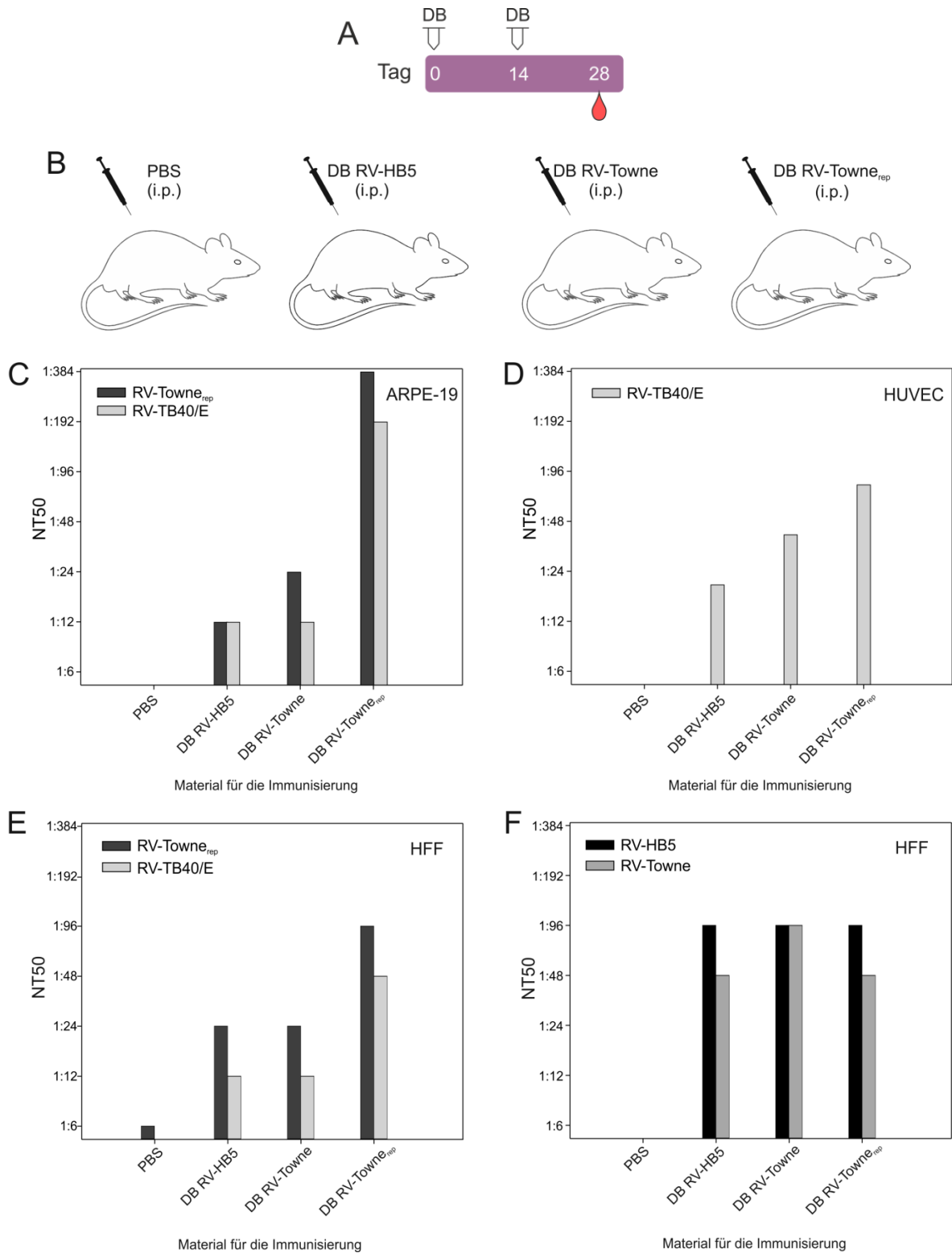
Eine Immunisierung mit DB<sub>Lab</sub> induziert NTAk, die effizient HCMV<sub>Lab</sub> neutralisieren können (Pepperl et al., 2000; Becke et al., 2010a). Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, schützen diese Antikörper jedoch nur bedingt vor einer Infektion von HFF oder

ARPE-19 mit HCMV<sub>Klin</sub>. Es sollte nun geprüft werden, ob die Immunisierung mit DB von RV-Towne<sub>rep</sub> eine breitere NTAK-Antwort induziert als die Immunisierung mit DB<sub>Lab</sub>.

Daher wurde in dieser Arbeit ein HCMV<sub>Klin</sub> Stamm kloniert, der den pentameren Komplex exprimiert und daher einen natürlichen Zelltropismus zeigt. Ein weiterer Vorteil dieses Stammes war, dass eine Infektion von HFF zur Freisetzung ausreichender Mengen an subviralen Partikeln, den DB, führte. Die DB von RV-Towne<sub>rep</sub> wurden für Immunisierungsversuche von Mäusen verwendet.

Die Verfügbarkeit von hinreichenden Mengen an DB RV-Towne<sub>rep</sub> ermöglichte es nun die zentrale Frage nach einer Verstärkung der NTAK-Antwort gegen HCMV<sub>Klin</sub> Infektion in Abhängigkeit vom pentameren Komplex aus gH/gL/pUL128-UL131A zu stellen. Hierzu wurden Balb/c Mäuse nach dem in Abbildung 27 A dargestellten Schema intraperitoneal (i.p.) immunisiert. Die Immunisierung erfolgte jeweils mit den in Abbildung 27 B dargestellten DB, sowie mit PBS als Negativkontrolle. Zur Vergleichbarkeit der induzierten NTAK-Antworten wurden zwei Gruppen mit DB von HCMV<sub>Lab</sub> (RV-Towne; RV-HB5) und eine Gruppe mit DB von RV-Towne<sub>rep</sub> immunisiert.

Die Seren der unterschiedlichen Gruppen wurden an Tag 28 nach der ersten Immunisierung entnommen, zusammengeführt und in verschiedenen Neutralisationstests eingesetzt. In einem ersten Ansatz wurde die Frage gestellt, inwieweit Immunisierungen mit DB RV-Towne<sub>rep</sub> zu einer NTAK-Antwort führt, die geeignet ist, die Infektion von HCMV<sub>Klin</sub> auf ARPE-19-Zellen zu neutralisieren und inwieweit sich dieser Schutz von dem abhebt, der durch DB<sub>Lab</sub>-Immunisierung erzielt wird. In der Tat konnten die Seren nach DB RV-Towne<sub>rep</sub>-Immunisierung die Infektion von klinisch relevanten Stämmen des HCMV bereits in Verdünnungsstufen zu 50 % neutralisieren, die 3-4 Titerstufen höher lagen als die für den gleichen Effekt nötigen Verdünnungen der Seren nach DB<sub>Lab</sub>-Immunisierung (Abbildung 27 C). Eine ähnliche Tendenz zeigte sich bei der Verwendung von Endothelzellen (HUVEC) als Zielzellen im Neutralisationstest, wenngleich hier diskretere Unterschiede zwischen den Gruppen zu beobachten waren (Abbildung 27 D). Selbst in HFF-Kulturen wurde die Infektion mit HCMV<sub>Klin</sub> durch die DB RV-Towne<sub>rep</sub>-Seren besser neutralisiert als durch die DB<sub>Lab</sub>-Seren (Abbildung 27 E). Dies war ein überraschendes Ergebnis, da bislang angenommen wurde, dass alle HCMV-Stämme HFF unabhängig vom pentameren Komplex infizieren. Die Anwesenheit des Komplexes bei Immunisierungen hätte danach keinen Einfluss auf die spätere Neutralisationskapazität der Seren gegenüber HCMV<sub>Klin</sub> in HFF haben sollen. Diese Vorstellung muss nach den hier vorliegenden Ergebnissen revidiert werden. In der Tat scheinen HCMV<sub>Klin</sub> auch Fibroblasten auf Wegen zu infizieren, die abhängig vom pentameren Komplex sind.



**Abbildung 27: Induktion von neutralisierenden Antikörpern durch Immunisierung mit DB verschiedener HCMV-Stämme.** (A), Immunisierungsschema zur Analyse der NTAk-Antwort. Balb/c Mäuse wurden im Abstand von zwei Wochen i.p. immunisiert und das Serum an Tag 28 entnommen. (B), Immunisierungsschema der Mausimmunisierung. Je Gruppe wurden fünf Balb/c Mäuse wie in A beschrieben immunisiert. An Tag 28 wurden die Seren entnommen und innerhalb einer Gruppe vereinigt. (C), Analyse der Neutralisationskapazität der hitzeinaktivierten Serumpools gegenüber RV-Towne<sub>rep</sub> oder RV-TB40/E in ARPE-19-Zellkultur. Dargestellt sind Mittelwerte aus Vierfachbestimmungen. (D), Analyse der Neutralisationskapazität der hitzeinaktivierten Serumpools gegenüber RV-TB40/E in Endothelzellkultur (HUVEC). Neutralisationstests mit HUVECs wurden freundlicherweise von Prof. Christian Sinzger durchgeführt. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von zwei Neutralisationstests. (E), Analyse der Neutralisationskapazität der hitzeinaktivierten Serumpools gegenüber RV-Towne<sub>rep</sub> und RV-TB40/E in HFF Zellkultur. (F), Analyse der Neutralisationskapazität der hitzeinaktivierten Serumpools gegenüber RV-HB5 und RV-Towne in HFF-Zellkultur.

Demgegenüber wurden HCMV<sub>Lab</sub> von den verschiedenen Seren auf HFF in allen Ansätzen mit vergleichbarer Effizienz neutralisiert (Abbildung 27 F). Diese Stämme können die Zellen ausschließlich Pentamer-unabhängig infizieren. Es muss an dieser Stelle angemerkt werden, dass Neutralisationstests mit HCMV<sub>Lab</sub> in ARPE-19- oder HUVEC-Kulturen aufgrund fehlender Infektiosität nicht durchgeführt werden konnten.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass in der Tat in Abhängigkeit von der Expression des pentameren Komplexes aus gH/gL/pUL128-UL131A eine deutlich bessere NTAk-Antwort nach DB Immunisierung erreicht wird.

## 4 Diskussion

### 4.1 Einfluss von DB Behandlung auf iDC

Infektionen mit HCMV sind die Ursache für schwere klinische Manifestationen bei Neugeborenen und bei immunsupprimierten Patienten. Bei immunkompetenten Patienten wird die Infektion rasch vom Immunsystem kontrolliert. Eine herausragende Stellung nehmen hierbei DC ein (Gredmark-Russ und Soderberg-Naucler, 2012). Ihre Ausreifung ist für das *Priming* der T-zellulären Immunantwort entscheidend. T-Lymphozyten wiederum wird eine zentrale Stellung der Kontrolle der Virusinfektion zugeschrieben (Reddehase et al., 1987). Allerdings hat HCMV Mechanismen entwickelt, die Ausreifung von DC nach deren Infektion zu verhindern. So ist die HCMV-Infektion von DC mit geringer HLA-Expression, eingeschränkter Migrationsfähigkeit sowie niedriger immunstimulatorischer Kapazität verbunden (Varani et al., 2005; Grigoleit et al., 2002; Moutaftsi et al., 2002).

#### 4.1.1 Ausreifung und Aktivierung von DC durch DB-Behandlung

Die zu Beginn dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse hatten gezeigt, dass eine Applikation von DB auch ohne Adjuvans eine ungewöhnlich starke humorale und zelluläre Immunantwort auslöst (Pepperl et al., 2000; Pepperl-Klindworth et al., 2002; Becke et al., 2010a; Cayatte et al., 2013). Eine solch starke Antwort auf die Applikation eines Totantigens war ungewöhnlich und führte zu unserer Hypothese, dass DB im Gegensatz zu infektiösem Virus die Ausreifung von DC stimulieren. In der Tat führte die Behandlung von iDC mit DB zur signifikanten Steigerung der Oberflächenexpression verschiedener kostimulatorischer Marker, wie CD80 und CD86. Die beiden Vertreter der B7-Familie werden als Marker für ausgereifte DC angesehen. Die beiden kostimulatorischen Moleküle sind für die Aktivierung von T-Zellen über CD28 essentiell und werden nach DB-Behandlung erhöht exprimiert. CD83 ist ein charakteristischer Marker für aktivierte, vollausgereifte DC und ebenfalls nach DB-Behandlung erhöht exprimiert.

DC, die mit DB behandelt wurden, setzten darüber hinaus, verglichen mit unbehandelten iDC, signifikant höhere Mengen von solchen Zytokinen frei, die mit Aktivierung assoziiert sind, wie z.B. TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-12. IL-6 induziert die Aktivierung von Lymphozyten sowie eine verstärkte Antikörperproduktion von aktivierten B-Zellen. Durch TNF- $\alpha$  wird die Wanderung der DC zu den Lymphknoten stimuliert, wo sie antigene Peptide im Kontext von MHC-Klasse-I oder -Klasse-II präsentieren. Eine weitere Reifung der DC wird zusätzlich durch freigesetztes TNF- $\alpha$  gefördert (Janeway et al. 2008). Die Freisetzung von IL-12 fördert die Ausbildung einer T<sub>H</sub>1-abhängigen T-Zellantwort (Guermontprez et al., 2002). T<sub>H</sub>1-Antworten induzieren durch die Freisetzung weiterer proinflammatorischer Zytokine eine Entzündungsreaktion, die eine zelluläre Immunantwort gegen infizierte Zellen auslöst. Die Ausbildung der T<sub>H</sub>1-Antwort kann durch eine T<sub>H</sub>2-Antwort abgelöst

werden (Langenkamp et al., 2000), die unter anderem durch das Vorkommen von IL-6 induziert wird. Eine Induktion der T<sub>H</sub>2-Antwort aktiviert wiederum B-Zellen spezifische Antikörper zu produzieren. Diese Antikörper erzeugen, nach der zellulären Bekämpfung infizierter Zellen, Schutz vor einer erneuten Infektion mit extrazellulären Virionen. All diese Befunde zusammen erklären, warum DB im Gegensatz zur Virusinfektion sowohl die humorale wie auch die zelluläre Immunantwort effizient stimulieren.

Ein möglicher Mechanismus, wie DB-Behandlung zur Ausreifung von iDC führen könnte, liegt in der Interaktion der Hüllproteine gB und gH mit den DC begründet. Es konnte gezeigt werden, dass exprimiertes gB und gH eine proinflammatorische Typ 1 IFN-Antwort auslösen können (Isaacson et al., 2008; Boehme et al., 2004; Simmen et al., 2001). Dabei binden diese Glykoproteine an den *Toll-like-Rezeptor* (TLR) 2, der in der Plasmamembran myeloider Zellen vorkommt. Durch die Interaktion wird eine intrazelluläre Signalkaskade ausgelöst, die in der nukleären Translokation des Transkriptionsfaktors NFκB mündet. NFκB stimuliert u.a. die Expression proinflammatorischer Proteine, die die Ausreifung der Zellen unterstützen (Compton et al., 2003). Im Gegensatz hierzu, so die gegenwärtige Vorstellung, exprimiert HCMV nach Infektion Proteine, die diese Signalkaskade unterbrechen und damit die DC-Auseifung verhindern. Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse stellen eine Grundlage dar, dies weiterführend zu analysieren.

#### **4.1.2 Infektion von DC mit HCMV**

Klinische HCMV-Isolate, die den pentameren Komplex aus gH/gL/pUL128-UL131A exprimieren, infizieren DC. Infizierte DC zeigten jedoch im Gegensatz zu DB behandelten Zellen weder eine verstärkte Oberflächenexpression kostimulatorischer Moleküle noch eine erhöhte Freisetzung von Zytokinen. Dies entspricht den Ergebnissen aus anderen Studien (Sinclair, 2008). Eine phänotypische Analyse der unterschiedlich behandelten DC, konnte bestätigen, dass infizierte DC den Phänotyp unreifer DC behalten, während die DC-Kulturen nach DB-Behandlung einer reifen DC-Kultur ähneln (Abbildung 6). In der Tat berichten einige Autoren, dass die Infektion zu einer deutlichen Begrenzung der Kapazität von DC zur Antigenpräsentation führt (Raftery et al., 2001; Grigoleit et al., 2002; Moutaftsi et al., 2002; Beck et al., 2003; Senechal et al., 2004). Diese Arbeit konnte zwar bestätigen, dass Ausreifung und Aktivierung von DC durch HCMV-Infektion beeinträchtigt sind; ein Einfluss auf die Antigenpräsentation konnte jedoch nicht beobachtet werden (s.u.). Ähnliches wurde auch von Gerna und Kollegen beschrieben (Gerna et al., 2005).

Den Zellen der myeloiden Linie wird eine Funktion bei der Dissemination von HCMV zugeschrieben (Maciejewski et al., 1992; Zhuravskaya et al., 1997). Es ist somit im Interesse des Virus, die Aktivierung dieser Zellen zu verhindern um damit die Induktion der adaptiven Immunantwort zu vermindern. Offensichtlich hat HCMV in der Tat Mechanismen entwickelt, die nach Infektion die Aktivierungs- und Differenzierungswege myeloider Zellen, wie z.B. der DC blockieren (Raftery et al., 2001; Grigoleit et al., 2002;



Moutaftsi et al., 2002; Beck et al., 2003; Senechal et al., 2004; Raftery et al., 2008). Es ist eine attraktive Hypothese anzunehmen, dass im Gegenzug der Wirt Mechanismen entwickelt hat, um gleichwohl die Aktivierung und Differenzierung von DC voranzutreiben. Die Synthese von DB durch die infizierte Zelle wäre ein neuer Weg dazu. Die Ergebnisse aus der hier vorgelegten Arbeit würden eine solche Hypothese unterstützen.

#### **4.1.3 Kreuzpräsentation von antigenen Peptiden nach DB-Behandlung**

DB beladene DC waren geeignet, autologe CD4 und CD8 T-Lymphozyten zu stimulieren. Proteine, die gegenüber CD4 T-Zellen präsentiert werden, werden üblicher Weise von DC durch Phagozytose aufgenommen und in den MHC-Klasse-II-Präsentationsweg eingeschleust. Insofern war zu erwarten, dass auch DB von DC aufgenommen, die viralen Proteine proteolytisch prozessiert und die resultierenden Peptide anschließend präsentiert werden. Erstaunlich war jedoch die Kapazität von DB behandelten DC, virale Peptide im Kontext von MHC-Klasse-I zu präsentieren und damit auch CD8 T-Zellen zu stimulieren. Üblicher Weise setzt die MHC-Klasse-I-Präsentation von antigenen Peptiden die Synthese der entsprechenden Proteine in der Zelle voraus. Die hier erhaltenen Daten bestätigen, dass DB geeignet sind, virale Proteine „exogen“ in den MHC-Klasse-I-Präsentationsweg von professionell Antigen-präsentierenden Zellen einzuschleusen. In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, dass DB-Behandlung von DC zur Einschleusung von Antigenen ins Zytoplasma führt, ein Phänomen, das bereits vor einiger Zeit beobachtet wurde (Pepperl-Klindworth et al., 2003). Eine zytoplasmatische Lokalisation der viralen Proteine, wie z.B. des pp65, macht sie für die proteolytische Prozessierung durch das Proteasom zugänglich. Dies erklärt die effiziente Präsentation viraler Peptide durch MHC-Klasse-I-Moleküle. Demgegenüber führt eine Infektion zur nukleären pp65-Lokalisation (Pepperl-Klindworth et al., 2003). Der Grund für diese Unterschiede ist unklar. Es liegt jedoch nahe anzunehmen, dass sich die Wege der Aufnahme von Virionen und DB durch DC unterscheiden. Es gibt Hinweise, dass die Infektion von DC über die Bindung viraler Oberflächenproteine an DC-SIGN (*Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*) erfolgt, die im Anschluss zur Makropinozytose der Partikel führt (Haspot et al., 2012; Halary et al., 2002). Wie genau die Aufnahme von DB in DC geschieht ist noch nicht abschließend geklärt. Es liegt jedoch nahe anzunehmen, dass hier ein im Vergleich zur Infektion anderer Aufnahmeweg wirksam ist. Weitere Untersuchungen müssen hier Klarheit schaffen.

#### **4.1.4 T-Zell-Stimulation durch DB behandelte und infizierte DC**

DB behandelte DC sind geeignet, das aufgenommene Antigen *in vitro* gegenüber autologen T-Zellen zu präsentieren und diese zur IFN- $\gamma$ -Produktion anzuregen. Dabei waren die Antworten der CD4 T-Zellen stärker als die der CD8 T-Zellen, ein Phänomen, das auch von

anderen Gruppen berichtet wurde (Gerna et al., 2005). Grundsätzlich zeigten diese Ergebnisse, dass die Stimulation durch DB nicht nur zur Ausreifung und Aktivierung von DC führte, sondern dass virales Antigen in einer sehr effizienten Weise von DC präsentiert wurde. Dies wird dadurch dokumentiert, dass die HCMV-spezifische *Memory Response*, direkt *ex vivo* messbar, aus der Gesamtheit der Antigen-spezifischen T-Zellen des Spenders herausgefiltert werden konnte. Das antigene Potential von DB wird dadurch nachdrücklich unterstrichen.

Etwas überraschend war, dass auch infizierte DC sehr effizient T-Zell-Antworten stimulierten. Diese Antworten waren in ihrem Ausmaß mit der Stimulation nach DB-Inkubation vergleichbar. Eine Stimulation von T-Zellen durch infizierte DC wurde auch von Gerna und Kollegen gefunden (Gerna et al., 2005). Andere zeigten jedoch eine Beeinträchtigung der T-Zell-Stimulation nach Infektion von DC mit HCMV (Raftery et al., 2001; Grigoleit et al., 2002; Moutaftsi et al., 2002; Beck et al., 2003). Bei der Betrachtung der Ergebnisse muss bedacht werden, dass die Virusinfektion grundsätzlich dazu führt, dass eine größere Vielfalt an viralen Proteinen synthetisiert wird als durch eine DB-Behandlung exogen eingebracht wird. Somit werden mehr T-Zellspezifitäten nach Infektion stimuliert. Ein Beispiel für ein immundominantes Antigen, das nicht in DB vorkommt, ist das virale Regulatorprotein IE1 (Borysiewicz et al., 1988). Darüber hinaus muss berücksichtigt werden, dass der hier eingesetzte HCMV<sub>Klin</sub> die viralen Immunevasionsproteine US2-US6 nicht exprimiert. Die Evasine greifen in die MHC-Klasse-I-abhängige Antigenpräsentation ein. Eine Deletion dieser Gene führt wieder zur Rekonstitution der MHC-Klasse-I-abhängigen Antigenpräsentation (Schempp et al., 2011). Möglicherweise hängt die Kapazität der DC T-Zellen zu aktivieren aber auch vom Zeitpunkt der Analyse und den gewählten experimentellen Bedingungen ab (Gerna et al., 2005). Die hier erhaltenen Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass unter bestimmten Bedingung auch infizierte DC in der Lage sind, Antigen zu präsentieren und damit die antivirale Immunantwort zu stimulieren.

#### **4.1.5 Einfluss der UV-Behandlung auf die Wirksamkeit von DB**

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Grundlage für die Weiterentwicklung der DB als Impfstoff zu erarbeiten. Aufgrund regulatorischer Vorgaben muss ein solcher Impfstoff vollständig frei von infektiösem Virus bereitgestellt werden. Die Inaktivierung durch UV-Bestrahlung ist ein standardisierbares Verfahren, das für einen Produktionsprozess akzeptiert ist (Schmidt und Kauling, 2006). UV-Bestrahlung von DB schwächte jedoch in den hier durchgeführten Experimenten den DC-Ausreifungsprozess ab. Erklärung hierfür könnte sein, dass die DB-Hülle und die darin enthaltenen viralen Glykoproteine durch die Bestrahlung in ihrer Struktur verändert wurden und sich dadurch die Aufnahme der Partikel in die Zelle weniger effizient gestaltete. Sollte sich die UV-Bestrahlung als ungeeignet erweisen, infektionsfreie und immunogene DB bereitzustellen, so sind jedoch alternative Verfahren denkbar. Eine Möglichkeit besteht in der Behandlung der Zellen, die für die DB-

Produktion infiziert werden, mit BDCRB (2-Brom-5,6-Dichlor-1-beta-D-Ribofuranosyl-Benzimidazol). Diese Substanz verhindert die Verpackung viraler Genome in Kapside und blockiert damit die Synthese und Freisetzung infektiöser Virionen. Die DB-Bildung wird dadurch aber nicht beeinträchtigt (Cayatte et al., 2013).

## 4.2 Neutralisierende Antikörperantwort nach DB-Immunsierung

Neuere Studien haben gezeigt, dass sich Laborstämme und klinische Isolate des HCMV genetisch deutlich unterscheiden. Eine wichtige Erkenntnis war es, dass zusätzlich zu den bekannten viralen Glykoproteinkomplexen klinische Isolate einen zusätzlichen, pentameren Komplex aus gH/gL/pUL128-UL131A auf der Oberfläche von Viruspartikeln exprimieren. Dies macht eine Neubewertung der Immunantwort, die zur Neutralisation von HCMV führt, notwendig.

### 4.2.1 DB<sub>Lab</sub> induzieren eine breite NT-Antwort

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine Immunsierung mit DB<sub>Lab</sub> zur Induktion einer breiten NTAK-Antwort führt, die nicht auf die Neutralisation der homologen HCMV<sub>Lab</sub>-Stämme beschränkt ist. Analysen der NTAK-Antwort nach DB-Immunsierung waren bislang nur unter Verwendung von HCMV<sub>Lab</sub> durchgeführt worden (Pepperl et al., 2000; Becke et al., 2010a). Hier konnte eine deutliche und langanhaltende Antikörperantwort nachgewiesen werden, die Schutz gegenüber dem homologen HCMV<sub>Lab</sub> vermittelte. In der vorliegenden Arbeit konnte dieses Ergebnis bestätigt werden. Parallel dazu wurden die Analysen durch die Verwendung eines HCMV<sub>Klin</sub> im Test erweitert. Es zeigte sich, dass Seren von Tieren, die mit DB<sub>Lab</sub> immunisiert worden waren, auch heterologe HCMV<sub>Klin</sub> auf verschiedenen Zielzellen neutralisieren konnten. Ähnliche Ergebnisse wurden kürzlich auch von anderen Autoren publiziert (Cayatte et al., 2013). Dies beweist, dass die Neutralisation von klinisch relevanten Stämmen des HCMV nicht alleine auf Antikörpern beruht, die gegen den pentameren Komplex aus gH/gL/pUL128-UL131A gerichtet sind. In der Tat werden gH und gL auch im Komplex mit gO auf der Virusoberfläche exprimiert. Dieser Komplex findet sich nach neueren Erkenntnissen sowohl bei HCMV<sub>Lab</sub> wie auch bei HCMV<sub>Klin</sub> (Jiang et al., 2008; Zhou et al., 2013). Insbesondere gH ist als Zielantigen der NTAK-Antwort bereits lange Zeit bekannt (Urban et al., 1996). Es ist denkbar, dass gH-spezifische Antikörper-Antworten, die durch DB<sub>Lab</sub> induziert wurden, über die Bindung an gH im pentameren Komplex Neutralisation von HCMV<sub>Klin</sub> vermittelt. Daneben neutralisieren gH-spezifische Antikörper ganz offensichtlich auch Pentamer-unabhängig (Urban et al., 1996; Funaro et al., 2008; Simpson et al., 1993). Somit lässt sich alleine durch die gH-spezifische Antikörper-Antwort die hier beobachtete Neutralisation von HCMV<sub>Klin</sub> nach DB<sub>Lab</sub>-Immunsierung erklären. Eine Bestätigung dafür kann auch aus einer Impfstudie abgeleitet werden. Die Applikation eines bizistronischen

Alphavirus-Replikons, dass gH und gL koexprimierte, konnte in Mäusen eine breite, vom pentameren Komplex unabhängige NTAk-Antwort induzieren (Loomis et al., 2013). Neben gH und gL sind aber auch noch weitere Glykoproteine der Virushülle, allen voran gB und gM, als dominante Zielstrukturen der NTAk-Antwort nach HCMV-Infektion bekannt (Britt et al., 1990; Meyer et al., 1992; Ohta et al., 2009; Potzsch et al., 2011; Spindler et al., 2013; Funaro et al., 2008; Shimamura et al., 2006).

Zusammengefasst zeigen die hier erhaltenen Ergebnisse, dass neben der NTAk-Antwort gegen den pentameren Komplex aus gH/gL/pUL128-UL131A auch Antikörper gegen andere Oberflächen-Glykoproteine zum Schutz von wichtigen Zielzellen der HCMV-Infektion, wie Epithel- oder Endothelzellen beitragen.

#### **4.2.2 Komplementabhängigkeit der HCMV-spezifischen NTAk-Antwort**

Bei der Analyse der NTAk-Antwort nach DB<sub>Lab</sub>-Immunisierung fiel auf, dass die Neutralisation von HCMV<sub>Klin</sub> komplementabhängig war. Dabei wurde, im Gegensatz zu anderen Studien (Rasmussen et al., 1985; Ohta et al., 2009) humanes Komplement in dem Test eingesetzt. Ein solches Vorgehen hat den Vorteil, dass artifizielle Effekte durch tierisches Serum vermieden werden. Humanes Komplement war alleine nicht in der Lage, HCMV<sub>Klin</sub> oder HCMV<sub>Lab</sub> zu neutralisieren. Eine solche direkte Virolyse durch Komplementfaktoren war für andere umhüllte Viren gezeigt worden (Hirsch, 1982), konnte aber hier ausgeschlossen werden. Die Abhängigkeit von HCMV-spezifischen Antikörpern spricht für eine Aktivierung des Komplementsystems über den klassischen Weg. Dieser Aktivierungsweg wurde für HCMV auch von anderen berichtet (Spiller et al., 1997). Bislang ist jedoch unklar, auf welche Weise Komplement die Neutralisation von HCMV vermittelt bzw. unterstützt. Es wurde lediglich berichtet, dass IgG-Subtypen einen Einfluss auf die Abhängigkeit der HCMV-Neutralisation von Komplement nehmen (Furebring et al., 2002). Aufgrund der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse wird jedoch klar, dass weiterführende Studien zur Aufklärung der molekularen Mechanismen der HCMV-Neutralisation in jedem Fall die Beteiligung von Komplement berücksichtigen müssen.

#### **4.2.3 Bereitstellung von DB<sub>Klin</sub>**

Neuere Analysen zeigten die Bedeutung des pentameren Komplexes aus gH/gL/pUL128-UL131A für die NTAk-Antwort gegen HCMV auf (Macagno et al., 2010; Lilleri et al., 2012; Lilleri et al., 2013; Fouts et al., 2012). Alle bisher durchgeführten Studien zur Verwendung von DB als Immunogen beschränkten sich jedoch auf Partikel, die diesen Komplex nicht enthielten (Pepperl et al., 2000; Becke et al., 2010a; Cayatte et al., 2013). Ein Schwerpunkt dieser Arbeit war es daher zu untersuchen, ob durch DB, die den pentameren Komplex enthalten, eine breitere oder wirksamere NTAk-Antwort erzielt werden kann. HCMV<sub>Klin</sub> setzen nach Infektion von Fibroblasten-Kulturen nur geringe Mengen an DB frei. Auch eine

Verwendung von Epithelzellen oder das Variieren des Zeitpunktes der jeweiligen Aufreinigung steigerte die Effizienz der DB-Freisetzung nicht. Es war daher notwendig, durch genetische Veränderung einen „DB-Produktionsstamm“ zu etablieren. Ein Ansatz hierfür war die Überexpression des pp65, das mit über 60 % der Gesamtmasse von DB eine dominante Komponente darstellt (Varnum et al., 2004).

In der Tat führte die Überexpression von pp65 nach Insertion einer zweiten Kopie seines Gens in das Genom des kliniknahen Stammes RV-TB40/E zur deutlichen intrazellulären Anreicherung von pp65. Überraschend war jedoch, dass dies nicht zu einer deutlichen Steigerung der DB-Freisetzung führte. Die Hypothese von Klages und Kollegen (Klages et al., 1989), dass eine pp65-Überexpression zur Freisetzung größerer Mengen an viralen Partikeln führt, konnte somit durch diese Arbeit widerlegt werden.

Bei der phänotypischen Analyse der Mutante RV-TB40/Epp65 fiel auf, dass das pp65 im Verlauf der Infektion weitgehend nukleär lokalisiert blieb. Dies entsprach dem Phänotyp des Ausgangsstammes, unterschied sich jedoch deutlich von der pp65-Lokalisation in Zellen, die mit HCMV<sub>Lab</sub> infiziert worden waren. Es ist gängige Meinung, dass die Bildung von DB von einer zytoplasmatischen Lokalisation des pp65 in der infizierten Zelle abhängt. Die nukleäre Retention korreliert daher mit der nur begrenzten DB-Synthese von RV-TB40/Epp65 infizierten Zellen. Die zytoplasmatische Anhäufung von pp65 ist daher ganz offensichtlich von anderen Faktoren abhängig, die durch die Überexpression des Tegumentproteins nicht betroffen sind. Einige mögliche Interaktionspartner, die einen Einfluss auf die Translokation von pp65 haben könnten, wurden identifiziert (To et al., 2011). Dazu zählt z.B. die Kinase UL97, deren Aktivität über die subzelluläre Lokalisation bestimmen könnte (Goldberg et al., 2011; Krosky et al., 2003; Prichard et al., 2005; Becke et al., 2010b). Eine mögliche Erklärung der Unterschiede könnte in unterschiedlicher Aktivität der Kinasen in infizierten Zellen begründet sein. Hier sind jedoch weitere Analysen notwendig, um diese Vorstellung zu überprüfen.

Die Überexpression von pp65 schien sich auf die Replikationsfähigkeit in Fibroblasten-Kultur nicht wesentlich auszuwirken. Im Gegensatz hierzu war die Replikation in ARPE-19-Zellen jedoch durch die erhöhte Expression von pp65 beeinträchtigt. Möglicherweise kommt pp65 bei der Replikation in Epithelzellen eine Funktion zu, die bei der Vermehrung in Fibroblasten nicht essentiell ist. Dass es zelltypspezifische Funktionen von pp65 geben könnte, zeigten Chevillotte und Kollegen. Das virale Wachstum war in monozytären Makrophagen bei fehlendem pp65 beeinträchtigt. Kein Effekt wurde jedoch bei Fibroblasten und Endothelzellen gesehen (Chevillotte et al., 2009). Alternativ ist denkbar, dass durch massive Überproduktion eines einzelnen viralen Proteins die Syntheserate anderer essentieller Virusproteine und so die Vermehrung beeinträchtigt wird.

Zusammenfassend kann aus diesen Ergebnissen abgeleitet werden, dass eine bloße Überproduktion von pp65 nicht zur Überproduktion von subviralen Partikeln wie DB führt.

Es musste daher ein alternativer Ansatz zur Produktion von DB<sub>Klin</sub> für Immunisierungsstudien gefunden werden. Durch die Reparatur des HCMV<sub>Lab</sub> RV-Towne, wurde in dieser Arbeit ein HCMV-Stamm kloniert, der die Fähigkeit zur DB-Produktion in infizierten Fibroblasten trotz der Erweiterung des Zelltropismus behalten hatte. RV-Towne<sub>rep</sub> zeigte den breiten Zelltropismus von klinischen Isolaten. Dieser Stamm konnte daher stellvertretend für einen HCMV<sub>Klin</sub> eingesetzt werden.

Durch die Reparatur verschlechterte sich die Replikationsfähigkeit von RV-Towne<sub>rep</sub> in Fibroblasten geringgradig. Der selbe Effekt konnte für einen anderen reparierten Laborstamm gezeigt werden (Wang und Shenk, 2005a). Ein Grund dafür könnte die verstärkte Fusionsaktivität sein, die nach Infektion mit diesem Stamm im Vergleich zum Ausgangsstamm beobachtet wurde. Der Grund für diese hohe Rate der Zellfusion in HFF-Kulturen ist unklar. Dieser Prozess führt jedoch zur Bildung von mehrkernigen Riesenzellen, die mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht mehr für eine effiziente virale Genomvermehrung zur Verfügung stehen und somit die relative Replikationsrate beeinträchtigen.

In den DB von RV-Towne<sub>rep</sub> konnten in der Tat nach UL130-Reparatur sowohl UL130 als auch UL128 nachgewiesen werden. Für UL131A stand uns leider kein Antikörper zur Verfügung. Gleichwohl kann aufgrund des aktuellen Kenntnisstandes davon ausgegangen werden, dass DB-Towne<sub>rep</sub> einen funktionellen pentameren Komplex auf ihrer Oberfläche tragen (Ryckman et al., 2008b). Unterstützt wird dies von der Tatsache, dass DB RV-Towne<sub>rep</sub> in ARPE-19-Zellen eindringen können (nicht dargestellt). Dieses Ergebnis erweitert nun die Erkenntnisse anderer Arbeitsgruppen, die zeigen konnten, dass der natürliche Zelltropismus von HCMV durch Reparatur des UL128-UL131A-Genlokus wieder hergestellt werden kann. Die Erkenntnis, dass derart „reparierte“ Virionen den Komplex exprimieren (Ryckman et al., 2008b; Wang und Shenk, 2005b; Fu et al., 2012), kann nun auch auf DB übertragen werden.

Ein ähnliches Proteinmuster von DB und Virionen des RV-Towne<sub>rep</sub> und des HCMV<sub>Lab</sub> RV-Towne spricht dafür, dass die Proteinzusammensetzung der viralen Partikel bis auf den pentameren Komplex vergleichbar ist. Die Proteine des pentameren Komplexes sind jedoch nicht abundant genug, um sie durch eine Silberfärbung nachzuweisen. Eine massenspektrometrische Analyse kann die Analyse des Proteinmusters erweitern und präzisieren.

Die gesteigerte Freisetzung von DB durch RV-Towne<sub>rep</sub> verglichen mit RV-TB40/E, korrelierte erwartungsgemäß mit der zytoplasmatischen Lokalisation von pp65 zu späten Zeitpunkten der Infektion. Da kein Unterschied zwischen RV-Towne und RV-Towne<sub>rep</sub> erkennbar war, zeigte dieses Ergebnis auch, dass die Proteine des pentameren Komplexes keinen Einfluss auf die Lokalisation von pp65 nehmen.

Die aus HFF freigesetzten Virionen von RV-Towne<sub>rep</sub> wiesen im Vergleich zu den aus Epithelzellen freigesetzten Virionen eine höhere Kapazität zur Reinfektion von Epithelzellen auf. Ein ähnliches Ergebnis wurde auch bei Versuchen mit Endothelzellen

und Fibroblasten gezeigt (Scrivano et al., 2011). Das Phänomen wurde von den Autoren mit einer verstärkten Retention der Virionen auf der Oberfläche von Endothelzellen begründet. Nur solche Partikel, die keinen oder wenig pentameren Komplex auf der Oberfläche trugen, sollten von der Oberfläche von Endothelzellen abgelöst werden und zur Reinfektion zur Verfügung stehen. Dies wiederum würde voraussetzen, dass auf Endothel- und Epithelzellen ein Rezeptor für den pentameren Komplex exprimiert würde, der Fibroblasten fehlt. Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse würden diese Hypothese unterstützen. Es scheint jedoch nicht wahrscheinlich, dass zwei unterschiedliche Populationen von Virionen freigesetzt werden, solche die den pentameren Komplex aus gH/gL/pUL128-UL131A exprimieren und solche die den trimeren Komplex aus gH/gL/gO exprimieren. Naheliegender ist, dass das Verhältnis aus trimeren und pentameren Komplexen auf der Virusoberfläche für die zell- und stammspezifischen Variationen im Zelltropismus von HCMV verantwortlich sind (Zhou et al., 2013). Mit RV-Towne und RV-Towne<sub>rep</sub> stehen nun Stämme zur Verfügung, dies vergleichend zu analysieren.

#### 4.2.4 NTak-Antwort nach DB RV-Towne<sub>rep</sub>-Immunisierung

Durch die Reparatur von RV-Towne standen im Rahmen dieser Arbeit erstmalig hinreichende Mengen an DB zur Verfügung, die den pentameren Komplex aus gH/gL/pUL128-131A enthielten. Die Immunisierungsversuche mit diesen Partikeln zeigten klar, dass im Versuchstier eine stärkere NTak-Antwort erzielt wird als mit Pentamer-negativen DB. Der Schutz, der durch diese „DB<sub>Klin</sub>-Seren“ vermittelt wurde, war sowohl auf Endothelzellen wie auch auf Epithelzellen wesentlich deutlicher ausgeprägt als der durch die „DB<sub>Lab</sub>-Seren“ vermittelte Schutz. Die Ergebnisse waren darüber hinaus unabhängig von dem für den Test eingesetzten HCMV<sub>Klin</sub>-Stamm (RV-Towne<sub>rep</sub>; RV-TB40/E). Ein vergleichbares Ergebnis wurde von anderen Arbeitsgruppen berichtet, die Virionen von HCMV<sub>Lab</sub> und HCMV<sub>Klin</sub> zur Immunisierung im Tiermodell eingesetzt hatten (Fu et al., 2012).

Aus diesen Ergebnissen und klinischen Studien folgt, dass ein zukünftiger Impfstoff, z.B. basierend auf DB, den pentameren Komplex beinhalten sollte. Ein Vorteil dabei ist es, dass der Komplex offensichtlich strukturell konserviert ist und eine Immunantwort gegen einen Impfstoff eine breite Immunität gegen unterschiedliche klinische Isolate vermitteln sollte (Macagno et al., 2010). Die Proteine pUL128-UL131A zeigen bei verschiedenen HCMV-Stämmen eine Identität in 91 % der Aminosäuresequenz (Baldanti et al., 2006). Andere HCMV-Glykoproteine sind weniger konserviert. So variiert die Aminosäuresequenz von gO in 45 % (Rasmussen et al., 2002). Auch gB enthält unterschiedliche Epitope, die zwischen verschiedenen Stämmen variieren, so dass kein ubiquitärer Schutz vor einer Reinfektion mit einem weiteren Stamm trotz gB-spezifischer Antikörper gegeben sein muss (Basgoz et al., 1992; Meyer et al., 1992).

Bislang sind nur wenige Arbeiten publiziert, die direkt die Induktion von NTAK gegen den pentameren Komplex untersuchten. In einer Studie wurden Kaninchen mit Peptiden von pUL130 und pUL131A immunisiert. Die resultierende Antikörper-Antwort war geeignet, eine Infektion von Epithelzellen *in vitro* zu verhindern (Saccoccio et al., 2011). Da viele der gegen den pentameren Komplex gerichteten Antikörper jedoch von der Konformation der Proteine abhängen (Macagno et al., 2010), kann die Verwendung von linearen Peptiden als Impfstoff nicht als optimal angesehen werden. Gleichzeitig ist es aber schwierig, einen Komplex aus fünf Proteinen rekombinant zu exprimieren. DB bieten hier eine attraktive Alternative. Da DB ähnlich wie Virionen in verschiedene Zellen gelangen, wird angenommen, dass auch DB die Glykoproteinkomplexe in der natürlichen Form enthalten (Topilko und Michelson, 1994). Somit imitieren DB die Oberflächenstruktur von infektiösem Virus und sind daher ideal geeignet, auch Immunantworten gegen konformationsabhängige, neutralisierende Epitope zu induzieren.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die „Verpackung“ des pentameren Komplexes in DB einen deutlichen Zugewinn an immunologischer Wirksamkeit dieser Partikel erbringt. Dies wird durch eine Reihe von Untersuchungen unterstützt, die die Rolle von Antikörpern gegen den pentameren Komplex während einer natürlichen Infektion beleuchten. In diesen Studien wurde der Nachweis erbracht, dass solche NTAK, die eine Infektion von Epithelzellen verhindern, effektiver Schutz vermitteln als die, die nur vor Infektion auf HFF schützen (Gerna et al., 2008; Wang et al., 2011; Tang et al., 2011). Aufgrund des Fehlens eines Tiermodells für die HCMV-Infektion bleibt es jedoch klinischen Studien, z.B. unter Verwendung von DB RV-Towne<sub>rep</sub>, vorbehalten, den tatsächlichen Stellenwert Pentamer-spezifischer Antikörper bei der Neutralisation der HCMV-Infektion festzulegen.

#### 4.2.5 Pentamerer Komplex und HCMV-Zelltropismus

Ein interessantes Ergebnis war, dass Seren nach DB<sub>Klin</sub>-Immunisierung klinische Isolate auf HFF-Kulturen besser neutralisieren konnten als Seren aus DB<sub>Lab</sub>-Immunisierungen. Bisherige Lehrmeinung war es, dass Fibroblasten, unabhängig vom verwendeten HCMV-Stamm, durch direkte Fusion mit der Plasmamembran infiziert werden. Dieser Prozess ist bekannter Maßen unabhängig vom Vorhandensein des pentameren Komplexes (Compton et al., 1992). Demnach wäre zu erwarten gewesen, dass die Antikörper, die zusätzlich in den DB<sub>Klin</sub>-Seren (gerichtet gegen den pentameren Komplex) enthalten waren, keinen Einfluss auf die Neutralisation von HCMV<sub>Klin</sub> auf Fibroblastenkulturen haben sollten. Das erhaltene Ergebnis widerspricht jedoch dem Erwartungswert und deutet darauf hin, dass Fibroblasten, entgegen der Literatur, auch gH/gL/pUL128-UL131A abhängig über Endozytose infiziert werden. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass Laborstämme, die keinen pentameren Komplex enthalten und somit keine Endozytose auslösen können, von allen Seren gleich gut neutralisiert wurden (Abbildung 27).



Aus dieser Erkenntnis leitet sich die Hypothese ab, dass die HCMV-Adsorption und -Penetration bei allen wichtigen Zielzellen durch Endozytose vermittelt wird und dass ein *Entry* nur bei ausgewählten Zellen auch durch Membranfusion möglich ist. Es bleibt zu klären, ob dabei die Membranfusion nur einen sekundären Eintrittsweg darstellt, der von dem Virus unter besonderen Bedingungen gewählt wird.

Gleichwohl haben diese Ergebnisse jedoch eine wichtige und unerwartete Erkenntnis erbracht. Nach gegenwärtigem Kenntnisstand muss davon ausgegangen werden, dass für Endozytose und Membranfusion jeweils ein unterschiedlicher, zellständiger Rezeptor verantwortlich ist. Die bisherige Annahme, dass die Expression des einen Rezeptors auf Fibroblasten, des anderen auf Epithel- und Endothelzellen den Zelltropismus von HCMV determiniert, muss nach den hier vorgelegten Ergebnissen revidiert werden. Es ist offensichtlich in der Tat so, dass zumindest Fibroblasten beide, bislang unbekannte Rezeptoren exprimieren und dass HCMV hier beide Rezeptoren für sein *Entry* nutzen kann. Demgegenüber exprimieren Endothel- oder Epithelzellen exklusiv einen Rezeptor, der mit dem pentameren Komplex interagiert und den endozytotischen Infektionsweg vermittelt.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass DB des HCMV DC effizient aktivieren. Dies erklärt, warum diese Partikel auch ohne zusätzlichen Wirkverstärker eine deutliche zelluläre und humorale Immunantwort induzieren. Es konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass DB den Proteinkomplex aus gH/gL/pUL128-UL131A in ihrer Membran in funktionell wirksamer Konfiguration exprimieren und dass die Applikation derartiger, Pentamer-positiver Partikel eine breite Antikörperantwort im Versuchstier auslöst. Diese Antwort ist geeignet, Schutz gegenüber HCMV-Infektion verschiedener natürlicher Zielzellen zu vermitteln - eine Grundvoraussetzung für die Verwendung dieser Partikel als Impfstoff.

## 5 Literaturverzeichnis

Adler,B., Scrivano,L., Ruzcics,Z., Rupp,B., Sinzger,C., and Koszinowski,U. (2006). Role of human cytomegalovirus UL131A in cell type-specific virus entry and release. *J. Gen. Virol.* *87*, 2451-2460.

Adler,S.P. (1995). Immunoprophylaxis against cytomegalovirus disease. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl* *99*, 105-109.

Adler,S.P. and Nigro,G. (2008). The importance of cytomegalovirus-specific antibodies for the prevention of fetal cytomegalovirus infection or disease. *Herpes.* *15*, 24-27.

Adler,S.P. and Nigro,G. (2009). Findings and conclusions from CMV hyperimmune globulin treatment trials. *J. Clin. Virol.* *46 Suppl 4*, 54-57.

Adler,S.P., Plotkin,S.A., Gonczol,E., Cadoz,M., MERIC,C., Wang,J.B., Dellamonica,P., Best,A.M., Zahradnik,J., Pincus,S., Berencsi,K., Cox,W.I., and Gyulai,Z. (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.

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

Ahmed,S.A., Al-Joudi,F.S., Zaidah,A.W., Roshan,T.M., Rapiaah,M., Abdullah,Y.M., and Rosline,H. (2006). The prevalence of human cytomegalovirus seropositivity among blood donors at the Unit of Blood Transfusion Medicine, Hospital Universiti Sains Malaysia. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* *37*, 294-296.

Andreoni,M., Faircloth,M., Vugler,L., and Britt,W.J. (1989). A rapid microneutralization assay for the measurement of neutralizing antibody reactive with human cytomegalovirus. *J. Virol. Methods* *23*, 157-167.

Arrode,G., Boccaccio,C., Lule,J., Allart,S., Moinard,N., Abastado,J.P., Alam,A., and Davrinche,C. (2000). Incoming human cytomegalovirus pp65 (UL83) contained in apoptotic infected fibroblasts is cross-presented to CD8(+) T cells by dendritic cells. *J. Virol.* *74*, 10018-10024.

Arvin,A.M., Fast,P., Myers,M., Plotkin,S., and Rabinovich,R. (2004). Vaccine development to prevent cytomegalovirus disease: report from the National Vaccine Advisory Committee. *Clin. Infect. Dis.* *39*, 233-239.

Baldanti,F., Paolucci,S., Campanini,G., Sarasini,A., Percivalle,E., Revello,M.G., and Gerna,G. (2006). Human cytomegalovirus UL131A, UL130 and UL128 genes are highly conserved among field isolates. *Arch. Virol.* *151*, 1225-1233.

Basgoz,N., Qadri,I., Navarro,D., Sears,A., Lennette,E., Youngblom,J., and Pereira,L. (1992). The amino terminus of human cytomegalovirus glycoprotein B contains epitopes that vary among strains. *J. Gen. Virol.* *73 (Pt 4)*, 983-988.

- Beck,K., Meyer-Konig,U., Weidmann,M., Nern,C., and Hufert,F.T. (2003). Human cytomegalovirus impairs dendritic cell function: a novel mechanism of human cytomegalovirus immune escape. *Eur. J. Immunol.* *33*, 1528-1538.
- Becke,S., Aue,S., Thomas,D., Schader,S., Podlech,J., Bopp,T., Sedmak,T., Wolfrum,U., Plachter,B., and Reyda,S. (2010a). Optimized recombinant dense bodies of human cytomegalovirus efficiently prime virus specific lymphocytes and neutralizing antibodies without the addition of adjuvant. *Vaccine* *28*, 6191-6198.
- Becke,S., Fabre-Mersseman,V., Aue,S., Auerochs,S., Sedmak,T., Wolfrum,U., Strand,D., Marschall,M., Plachter,B., and Reyda,S. (2010b). Modification of the major tegument protein pp65 of human cytomegalovirus inhibits virus growth and leads to the enhancement of a protein complex with pUL69 and pUL97 in infected cells. *J. Gen. Virol.* *91*, 2531-2541.
- Beersma,M.F., Wertheim-van Dillen,P.M., and Feltkamp,T.E. (1990). The influence of HLA-B27 on the infectivity of cytomegalovirus for mouse fibroblasts. *Scand. J. Rheumatol. Suppl* *87*, 102-103.
- Beersma,M.F., Wertheim-van Dillen,P.M., Geelen,J.L., and Feltkamp,T.E. (1991). Expression of HLA class I heavy chains and beta 2-microglobulin does not affect human cytomegalovirus infectivity. *J. Gen. Virol.* *72 (Pt 11)*, 2757-2764.
- Bello,C. and Whittle,H. (1991). Cytomegalovirus infection in Gambian mothers and their babies. *J. Clin. Pathol.* *44*, 366-369.
- Besold,K., Frankenberg,N., Pepperl-Klindworth,S., Kuball,J., Theobald,M., Hahn,G., and Plachter,B. (2007). Processing and MHC class I presentation of human cytomegalovirus pp65-derived peptides persist despite gpUS2-11-mediated immune evasion. *J. Gen. Virol.* *88*, 1429-1439.
- Bevan,M.J. (2006). Cross-priming. *Nat. Immunol.* *7*, 363-365.
- Bodaghi,B., Slobbe-van Drunen,M.E., Topilko,A., Perret,E., Vossen,R.C., van Dam-Mieras,M.C., Zipeto,D., Virelizier,J.L., Lehoang,P., Bruggeman,C.A., and Michelson,S. (1999). Entry of human cytomegalovirus into retinal pigment epithelial and endothelial cells by endocytosis. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* *40*, 2598-2607.
- Boehme,K.W., Singh,J., Perry,S.T., and Compton,T. (2004). Human cytomegalovirus elicits a coordinated cellular antiviral response via envelope glycoprotein B. *J. Virol.* *78*, 1202-1211.
- Bonaros,N., Mayer,B., Schachner,T., Laufer,G., and Kocher,A. (2008). CMV-hyperimmune globulin for preventing cytomegalovirus infection and disease in solid organ transplant recipients: a meta-analysis. *Clin. Transplant.* *22*, 89-97.
- Borst,E.M., Hahn,G., Koszinowski,U.H., and Messerle,M. (1999). Cloning of the human cytomegalovirus (HCMV) genome as an infectious bacterial artificial chromosome in *Escherichia coli*: a new approach for construction of HCMV mutants. *J. Virol.* *73*, 8320-8329.

- Borysiewicz,L.K., Hickling,J.K., Graham,S., Sinclair,J., Cranage,M.P., Smith,G.L., and Sissons,J.G. (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.
- Bristow,B.N., O'Keefe,K.A., Shafir,S.C., and Sorvillo,F.J. (2011). Congenital cytomegalovirus mortality in the United States, 1990-2006. *PLoS. Negl. Trop. Dis.* *5*, e1140.
- Britt,W.J., Vugler,L., Butfiloski,E.J., and Stephens,E.B. (1990). Cell surface expression of human cytomegalovirus (HCMV) gp55-116 (gB): use of HCMV-recombinant vaccinia virus-infected cells in analysis of the human neutralizing antibody response. *J. Virol.* *64*, 1079-1085.
- Buhles,W.C., Jr., Mastre,B.J., Tinker,A.J., Strand,V., and Koretz,S.H. (1988). Ganciclovir treatment of life- or sight-threatening cytomegalovirus infection: experience in 314 immunocompromised patients. *Rev. Infect. Dis.* *10 Suppl 3*, 495-506.
- Busche,A., Jirmo,A.C., Welten,S.P., Zischke,J., Noack,J., Constabel,H., Gatzke,A.K., Keyser,K.A., Arens,R., Behrens,G.M., and Messerle,M. (2013). Priming of CD8+ T cells against cytomegalovirus-encoded antigens is dominated by cross-presentation. *J. Immunol.* *190*, 2767-2777.
- Cayatte,C., Schneider-Ohrum,K., Wang,Z., Irrinki,A., Nguyen,N., Lu,J., Nelson,C., Servat,E., Gemmell,L., Citkowicz,A., Liu,Y., Hayes,G., Woo,J., Van,N.G., Jin,H., Duke,G., and McCormick,A.L. (2013). Cytomegalovirus vaccine strain Towne-derived dense bodies induce broad cellular immune responses and neutralizing antibodies that prevent infection of fibroblasts and epithelial cells. *J. Virol.* *87*, 11107-11120.
- Cha,T.A., Tom,E., Kemble,G.W., Duke,G.M., Mocarski,E.S., and Spaete,R.R. (1996). Human cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains. *J. Virol.* *70*, 78-83.
- Chan,G., Nogalski,M.T., and Yurochko,A.D. (2009). Activation of EGFR on monocytes is required for human cytomegalovirus entry and mediates cellular motility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *106*, 22369-22374.
- Chee,M.S., Bankier,A.T., Beck,S., Bohni,R., Brown,C.M., Cerny,R., Horsnell,T., Hutchison,C.A., III, Kouzarides,T., Martignetti,J.A., and . (1990). Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *154*, 125-169.
- Cheeran,M.C., Lokensgard,J.R., and Schleiss,M.R. (2009). Neuropathogenesis of congenital cytomegalovirus infection: disease mechanisms and prospects for intervention. *Clin. Microbiol. Rev.* *22*, 99-126.
- Chevillotte,M., Landwehr,S., Linta,L., Frascaroli,G., Luske,A., Buser,C., Mertens,T., and von,E.J. (2009). Major tegument protein pp65 of human cytomegalovirus is required for the incorporation of pUL69 and pUL97 into the virus particle and for viral growth in macrophages. *J. Virol.* *83*, 2480-2490.

- Compton,T., Kurt-Jones,E.A., Boehme,K.W., Belko,J., Latz,E., Golenbock,D.T., and Finberg,R.W. (2003). Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. *J. Virol.* *77*, 4588-4596.
- Compton,T., Nepomuceno,R.R., and Nowlin,D.M. (1992). Human cytomegalovirus penetrates host cells by pH-independent fusion at the cell surface. *Virology* *191*, 387-395.
- Cordonnier,C., Chevret,S., Legrand,M., Rafi,H., Dhedin,N., Lehmann,B., Bassompierre,F., and Gluckman,E. (2003). Should immunoglobulin therapy be used in allogeneic stem-cell transplantation? A randomized, double-blind, dose effect, placebo-controlled, multicenter trial. *Ann. Intern. Med.* *139*, 8-18.
- Correa,C.B., Kouri,V., Verdasquera,D., Martinez,P.A., Alvarez,A., Aleman,Y., Perez,L., Viera,J., Gonzalez,R., Perez,E., Moro,I., Navarro,M.A., and Melin,P. (2010). HCMV seroprevalence and associated risk factors in pregnant women, Havana City, 2007 to 2008. *Prenat. Diagn.* *30*, 888-892.
- Dargan,D.J., Douglas,E., Cunningham,C., Jamieson,F., Stanton,R.J., Baluchova,K., McSharry,B.P., Tomasec,P., Emery,V.C., Percivalle,E., Sarasini,A., Gerna,G., Wilkinson,G.W., and Davison,A.J. (2010). Sequential mutations associated with adaptation of human cytomegalovirus to growth in cell culture. *J. Gen. Virol.* *91*, 1535-1546.
- Davison,A.J. (2010). Herpesvirus systematics. *Vet. Microbiol.* *143*, 52-69.
- Dolan,A., Cunningham,C., Hector,R.D., Hassan-Walker,A.F., Lee,L., Addison,C., Dargan,D.J., McGeoch,D.J., Gatherer,D., Emery,V.C., Griffiths,P.D., Sinzger,C., McSharry,B.P., Wilkinson,G.W., and Davison,A.J. (2004). Genetic content of wild-type human cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.* *85*, 1301-1312.
- Dollard,S.C., Grosse,S.D., and Ross,D.S. (2007). New estimates of the prevalence of neurological and sensory sequelae and mortality associated with congenital cytomegalovirus infection. *Rev. Med. Virol.* *17*, 355-363.
- Drew,W.L., Miner,R.C., Busch,D.F., Follansbee,S.E., Gullett,J., Mehalko,S.G., Gordon,S.M., Owen,W.F., Jr., Matthews,T.R., Buhles,W.C., and . (1991). Prevalence of resistance in patients receiving ganciclovir for serious cytomegalovirus infection. *J. Infect. Dis.* *163*, 716-719.
- Dunn,W., Chou,C., Li,H., Hai,R., Patterson,D., Stolc,V., Zhu,H., and Liu,F. (2003). Functional profiling of a human cytomegalovirus genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *100*, 14223-14228.
- Elek,S.D. and Stern,H. (1974). Development of a vaccine against mental retardation caused by cytomegalovirus infection in utero. *Lancet* *1*, 1-5.
- Elkington,R., Walker,S., Crough,T., Menzies,M., Tellam,J., Bharadwaj,M., and Khanna,R. (2003). Ex vivo profiling of CD8+-T-cell responses to human cytomegalovirus reveals broad and multispecific reactivities in healthy virus carriers. *J. Virol.* *77*, 5226-5240.

- Feire,A.L., Koss,H., and Compton,T. (2004). Cellular integrins function as entry receptors for human cytomegalovirus via a highly conserved disintegrin-like domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *101*, 15470-15475.
- Fleckenstein,B., Muller,I., and Collins,J. (1982). Cloning of the complete human cytomegalovirus genome in cosmids. *Gene* *18*, 39-46.
- Fouts,A.E., Chan,P., Stephan,J.P., Vandlen,R., and Feierbach,B. (2012). Antibodies against the gH/gL/UL128/UL130/UL131 complex comprise the majority of the anti-cytomegalovirus (anti-CMV) neutralizing antibody response in CMV hyperimmune globulin. *J. Virol.* *86*, 7444-7447.
- Fowler,K.B., Stagno,S., and Pass,R.F. (2003). Maternal immunity and prevention of congenital cytomegalovirus infection. *JAMA* *289*, 1008-1011.
- Fowler,K.B., Stagno,S., Pass,R.F., Britt,W.J., Boll,T.J., and Alford,C.A. (1992). The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status. *N. Engl. J. Med.* *326*, 663-667.
- Fu,T.M., Wang,D., Freed,D.C., Tang,A., Li,F., He,X., Cole,S., Dubey,S., Finnefrock,A.C., ter,M.J., Shiver,J.W., and Casimiro,D.R. (2012). Restoration of viral epithelial tropism improves immunogenicity in rabbits and rhesus macaques for a whole virion vaccine of human cytomegalovirus. *Vaccine* *30*, 7469-7474.
- Funaro,A., Gribaudo,G., Luganini,A., Ortolan,E., Lo,B.N., Vicenzi,E., Cassetta,L., Landolfo,S., Buick,R., Falciola,L., Murphy,M., Garotta,G., and Malavasi,F. (2008). Generation of potent neutralizing human monoclonal antibodies against cytomegalovirus infection from immune B cells. *BMC. Biotechnol.* *8*, 85.
- Furebring,C., Speckner,A., Mach,M., Sandlie,I., Norderhaug,L., Borrebaeck,C.A., Turesson,H., and Ohlin,M. (2002). Antibody-mediated neutralization of cytomegalovirus: modulation of efficacy induced through the IgG constant region. *Mol. Immunol.* *38*, 833-840.
- Furui,Y., Satake,M., Hoshi,Y., Uchida,S., Suzuki,K., and Tadokoro,K. (2013). Cytomegalovirus (CMV) seroprevalence in Japanese blood donors and high detection frequency of CMV DNA in elderly donors. *Transfusion.* *53*, 2190-2197.
- Genini,E., Percivalle,E., Sarasini,A., Revello,M.G., Baldanti,F., and Gerna,G. (2011). Serum antibody response to the gH/gL/pUL128-131 five-protein complex of human cytomegalovirus (HCMV) in primary and reactivated HCMV infections. *J. Clin. Virol.* *52*, 113-118.
- Gerna,G., Percivalle,E., Lilleri,D., Lozza,L., Fornara,C., Hahn,G., Baldanti,F., and Revello,M.G. (2005). Dendritic-cell infection by human cytomegalovirus is restricted to strains carrying functional UL131-128 genes and mediates efficient viral antigen presentation to CD8+ T cells. *J. Gen. Virol.* *86*, 275-284.

- Gerna,G., Sarasini,A., Patrone,M., Percivalle,E., Fiorina,L., Campanini,G., Gallina,A., Baldanti,F., and Revello,M.G. (2008). Human cytomegalovirus serum neutralizing antibodies block virus infection of endothelial/epithelial cells, but not fibroblasts, early during primary infection. *J. Gen. Virol.* *89*, 853-865.
- Glowacki,L.S. and Smaill,F.M. (1994). Use of immune globulin to prevent symptomatic cytomegalovirus disease in transplant recipients--a meta-analysis. *Clin. Transplant.* *8*, 10-18.
- Goldberg,M.D., Honigman,A., Weinstein,J., Chou,S., Taraboulos,A., Rouvinski,A., Shinder,V., and Wolf,D.G. (2011). Human cytomegalovirus UL97 kinase and nonkinase functions mediate viral cytoplasmic secondary envelopment. *J. Virol.* *85*, 3375-3384.
- Grant,S.G., Jessee,J., Bloom,F.R., and Hanahan,D. (1990). Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *87*, 4645-4649.
- Gredmark-Russ,S. and Soderberg-Naucler,C. (2012). Dendritic cell biology in human cytomegalovirus infection and the clinical consequences for host immunity and pathology. *Virulence.* *3*.
- Grefte,J.M., van der Gun,B.T., Schmolke,S., van der Giessen,M., van Son,W.J., Plachter,B., Jahn,G., and The,T.H. (1992). Cytomegalovirus antigenemia assay: identification of the viral antigen as the lower matrix protein pp65. *J. Infect. Dis.* *166*, 683-684.
- Gretch,D.R., Gehrz,R.C., and Stinski,M.F. (1988a). Characterization of a human cytomegalovirus glycoprotein complex (gcI). *J. Gen. Virol.* *69 (Pt 6)*, 1205-1215.
- Gretch,D.R., Kari,B., Rasmussen,L., Gehrz,R.C., and Stinski,M.F. (1988b). Identification and characterization of three distinct families of glycoprotein complexes in the envelopes of human cytomegalovirus. *J. Virol.* *62*, 875-881.
- Griffiths,P.D., Stanton,A., McCarrell,E., Smith,C., Osman,M., Harber,M., Davenport,A., Jones,G., Wheeler,D.C., O'Beirne,J., Thorburn,D., Patch,D., Atkinson,C.E., Pichon,S., Sweny,P., Lanzman,M., Woodford,E., Rothwell,E., Old,N., Kinyanjui,R., Haque,T., Atabani,S., Luck,S., Prideaux,S., Milne,R.S., Emery,V.C., and Burroughs,A.K. (2011). Cytomegalovirus glycoprotein-B vaccine with MF59 adjuvant in transplant recipients: a phase 2 randomised placebo-controlled trial. *Lancet* *377*, 1256-1263.
- Grigoleit,U., Riegler,S., Einsele,H., Laib,S.K., Jahn,G., Hebart,H., Brossart,P., Frank,F., and Sinzger,C. (2002). Human cytomegalovirus induces a direct inhibitory effect on antigen presentation by monocyte-derived immature dendritic cells. *Br. J. Haematol.* *119*, 189-198.
- Guermonprez,P., Valladeau,J., Zitvogel,L., Thery,C., and Amigorena,S. (2002). Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* *20*, 621-667.

- Hahn,G., Revello,M.G., Patrone,M., Percivalle,E., Campanini,G., Sarasini,A., Wagner,M., Gallina,A., Milanesi,G., Koszinowski,U., Baldanti,F., and Gerna,G. (2004). Human cytomegalovirus UL131-128 genes are indispensable for virus growth in endothelial cells and virus transfer to leukocytes. *J. Virol.* 78, 10023-10033.
- Hahn,G., Rose,D., Wagner,M., Rhiel,S., and McVoy,M.A. (2003). Cloning of the genomes of human cytomegalovirus strains Toledo, TownevarRIT3, and Towne long as BACs and site-directed mutagenesis using a PCR-based technique. *Virology* 307, 164-177.
- Halary,F., Amara,A., Lortat-Jacob,H., Messerle,M., Delaunay,T., Houles,C., Fieschi,F., Arenzana-Seisdedos,F., Moreau,J.F., and Dechanet-Merville,J. (2002). Human cytomegalovirus binding to DC-SIGN is required for dendritic cell infection and target cell trans-infection. *Immunity.* 17, 653-664.
- Haspot,F., Lavault,A., Sinzger,C., Laib,S.K., Stierhof,Y.D., Pilet,P., Bressolette-Bodin,C., and Halary,F. (2012). Human cytomegalovirus entry into dendritic cells occurs via a macropinocytosis-like pathway in a pH-independent and cholesterol-dependent manner. *PLoS. One.* 7, e34795.
- Heineman,T.C., Schleiss,M., Bernstein,D.I., Spaete,R.R., Yan,L., Duke,G., Prichard,M., Wang,Z., Yan,Q., Sharp,M.A., Klein,N., Arvin,A.M., and Kemble,G. (2006). A phase 1 study of 4 live, recombinant human cytomegalovirus Towne/Toledo chimeric vaccines. *J. Infect. Dis.* 193, 1350-1360.
- Herr,W. and Plachter,B. (2009). Cytomegalovirus and varicella-zoster virus vaccines in hematopoietic stem cell transplantation. *Expert. Rev. Vaccines.* 8, 999-1021.
- Hirsch,R.L. (1982). The complement system: its importance in the host response to viral infection. *Microbiol. Rev.* 46, 71-85.
- Ho,M. (2008). The history of cytomegalovirus and its diseases. *Med. Microbiol. Immunol.* 197, 65-73.
- Hobom,U., Brune,W., Messerle,M., Hahn,G., and Koszinowski,U.H. (2000). Fast screening procedures for random transposon libraries of cloned herpesvirus genomes: mutational analysis of human cytomegalovirus envelope glycoprotein genes. *J. Virol.* 74, 7720-7729.
- Holtappels,R., Bohm,V., Podlech,J., and Reddehase,M.J. (2008). CD8 T-cell-based immunotherapy of cytomegalovirus infection: "proof of concept" provided by the murine model. *Med. Microbiol. Immunol.* 197, 125-134.
- Huber,M.T. and Compton,T. (1998). The human cytomegalovirus UL74 gene encodes the third component of the glycoprotein H-glycoprotein L-containing envelope complex. *J. Virol.* 72, 8191-8197.
- Irmiere,A. and Gibson,W. (1983). Isolation and characterization of a noninfectious virion-like particle released from cells infected with human strains of cytomegalovirus. *Virology* 130, 118-133.



- Isaacson, M.K. and Compton, T. (2009). Human cytomegalovirus glycoprotein B is required for virus entry and cell-to-cell spread but not for virion attachment, assembly, or egress. *J. Virol.* *83*, 3891-3903.
- Isaacson, M.K., Juckem, L.K., and Compton, T. (2008). Virus entry and innate immune activation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *325*, 85-100.
- Jahn, G., Pohl, W., Plachter, B., and Hintzenstern, J. (1988). [Congenital cytomegalovirus infection with fatal outcome]. *Dtsch. Med. Wochenschr.* *113*, 424-427.
- Janeway, C.A., Murphy, K., Travers, P., and Walport, M. (2008). Induced innate responses to infection. In *Immunobiology*, 7th edition, 82-102. New York: Garland Science Publishing. 82-103.
- Jesionek, A., Kiolemenoglou B. Über einen Befund von protozoenartigen Gebilden in den Organen eines hereditärluetischen Fötus. *Munch. Med. Wochenschr.* 1904;51:1905–1907.
- Jiang, X.J., Adler, B., Sampaio, K.L., Digel, M., Jahn, G., Ettischer, N., Stierhof, Y.D., Scrivano, L., Koszinowski, U., Mach, M., and Sinzger, C. (2008). UL74 of human cytomegalovirus contributes to virus release by promoting secondary envelopment of virions. *J. Virol.* *82*, 2802-2812.
- Jonuleit, H., Kuhn, U., Müller, G., Steinbrink, K., Paragnik, L., Schmitt, E., Knop, J., and Enk, A.H. (1997). Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur. J. Immunol.* *27*, 3135-3142.
- Just, M., Buerger-Wolff, A., Emoedi, G., and Hernandez, R. (1975). Immunisation trials with live attenuated cytomegalovirus TOWNE 125. *Infection* *3*, 111-114.
- Kamphorst, A.O., Guermónprez, P., Dudziak, D., and Nussenzweig, M.C. (2010). Route of antigen uptake differentially impacts presentation by dendritic cells and activated monocytes. *J. Immunol.* *185*, 3426-3435.
- Kari, B. and Gehr, R. (1992). A human cytomegalovirus glycoprotein complex designated gC-II is a major heparin-binding component of the envelope. *J. Virol.* *66*, 1761-1764.
- Kari, B. and Gehr, R. (1993). Structure, composition and heparin binding properties of a human cytomegalovirus glycoprotein complex designated gC-II. *J. Gen. Virol.* *74 ( Pt 2)*, 255-264.
- Kari, B., Goertz, R., and Gehr, R. (1990). Characterization of cytomegalovirus glycoproteins in a family of complexes designated gC-II with murine monoclonal antibodies. *Arch. Virol.* *112*, 55-65.
- Kenneson, A. and Cannon, M.J. (2007). Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *Rev. Med. Virol.* *17*, 253-276.

- Kharfan-Dabaja, M.A., Boeckh, M., Wilck, M.B., Langston, A.A., Chu, A.H., Wloch, M.K., Guterwill, D.F., Smith, L.R., Rolland, A.P., and Kenney, R.T. (2012). A novel therapeutic cytomegalovirus DNA vaccine in allogeneic haemopoietic stem-cell transplantation: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Infect. Dis.* *12*, 290-299.
- Klages, S., Ruger, B., and Jahn, G. (1989). Multiplicity dependent expression of the predominant phosphoprotein pp65 of human cytomegalovirus. *Virus Res.* *12*, 159-168.
- Krosky, P.M., Baek, M.C., Jahng, W.J., Barrera, I., Harvey, R.J., Biron, K.K., Coen, D.M., and Sethna, P.B. (2003). The human cytomegalovirus UL44 protein is a substrate for the UL97 protein kinase. *J. Virol.* *77*, 7720-7727.
- Krzyzaniak, M., Mach, M., and Britt, W.J. (2007). The cytoplasmic tail of glycoprotein M (gpUL100) expresses trafficking signals required for human cytomegalovirus assembly and replication. *J. Virol.* *81*, 10316-10328.
- Kulesza, C.A. and Shenk, T. (2004). Human cytomegalovirus 5-kilobase immediate-early RNA is a stable intron. *J. Virol.* *78*, 13182-13189.
- La Rosa, C., Longmate, J., Lacey, S.F., Kaltcheva, T., Sharan, R., Marsano, D., Kwon, P., Drake, J., Williams, B., Denison, S., Broyer, S., Couture, L., Nakamura, R., Kelsey, M.I., Krieg, A.M., Diamond, D.J., and Zaia, J.A. (2012). Clinical evaluation of safety and immunogenicity of PADRE-cytomegalovirus (CMV) and tetanus-CMV fusion peptide vaccines with or without PF03512676 adjuvant. *J. Infect. Dis.* *205*, 1294-1304.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680-685.
- Langenkamp, A., Messi, M., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2000). Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat. Immunol.* *1*, 311-316.
- Lee, E.C., Yu, D., Martinez, d., V, Tessarollo, L., Swing, D.A., Court DL, Jenkins, N.A., and Copeland, N.G. (2001). A highly efficient Escherichia coli-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA. *Genomics* *73*, 56-65.
- Li, L., Nelson, J.A., and Britt, W.J. (1997). Glycoprotein H-related complexes of human cytomegalovirus: identification of a third protein in the gCIII complex. *J. Virol.* *71*, 3090-3097.
- Lilleri, D., Fornara, C., Furione, M., Zavattoni, M., Revello, M.G., and Gerna, G. (2007). Development of human cytomegalovirus-specific T cell immunity during primary infection of pregnant women and its correlation with virus transmission to the fetus. *J. Infect. Dis.* *195*, 1062-1070.
- Lilleri, D., Kabanova, A., Lanzavecchia, A., and Gerna, G. (2012). Antibodies Against Neutralization Epitopes of Human Cytomegalovirus gH/gL/pUL128-130-131 Complex and Virus Spreading May Correlate with Virus Control In Vivo. *J. Clin. Immunol.* *32*, 1324-1331.

- Lilleri,D., Kabanova,A., Revello,M.G., Percivalle,E., Sarasini,A., Genini,E., Sallusto,F., Lanzavecchia,A., Corti,D., and Gerna,G. (2013). Fetal Human Cytomegalovirus Transmission Correlates with Delayed Maternal Antibodies to gH/gL/pUL128-130-131 Complex during Primary Infection. *PLoS. One.* 8, e59863.
- Lipscomb,M.F. and Masten,B.J. (2002). Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiol Rev.* 82, 97-130.
- Livak,K.J., Flood,S.J., Marmaro,J., Giusti,W., and Deetz,K. (1995). Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl.* 4, 357-362.
- Ljungman,P., Griffiths,P., and Paya,C. (2002). Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clin. Infect. Dis.* 34, 1094-1097.
- Loomis,R.J., Lilja,A.E., Monroe,J., Balabanis,K.A., Brito,L.A., Palladino,G., Franti,M., Mandl,C.W., Barnett,S.W., and Mason,P.W. (2013). Vectored co-delivery of human cytomegalovirus gH and gL proteins elicits potent complement-independent neutralizing antibodies. *Vaccine* 31, 919-926.
- Lubeck,P.R., Doerr,H.W., and Rabenau,H.F. (2010). Epidemiology of human cytomegalovirus (HCMV) in an urban region of Germany: what has changed? *Med. Microbiol. Immunol.* 199, 53-60.
- Macagno,A., Bernasconi,N.L., Vanzetta,F., Dander,E., Sarasini,A., Revello,M.G., Gerna,G., Sallusto,F., and Lanzavecchia,A. (2010). Isolation of human monoclonal antibodies that potently neutralize human cytomegalovirus infection by targeting different epitopes on the gH/gL/UL128-131A complex. *J. Virol.* 84, 1005-1013.
- Mach,M., Kropff,B., Dal,M.P., and Britt,W. (2000). Complex formation by human cytomegalovirus glycoproteins M (gpUL100) and N (gpUL73). *J. Virol.* 74, 11881-11892.
- Mach,M., Kropff,B., Kryzaniak,M., and Britt,W. (2005). Complex formation by glycoproteins M and N of human cytomegalovirus: structural and functional aspects. *J. Virol.* 79, 2160-2170.
- Mach,M., Osinski,K., Kropff,B., Schloetzer-Schrehardt,U., Krzyzaniak,M., and Britt,W. (2007). The carboxy-terminal domain of glycoprotein N of human cytomegalovirus is required for virion morphogenesis. *J. Virol.* 81, 5212-5224.
- Mach,M., Wieggers,A.-K., Spindler,N., and Winkler,T. (2013). Protective Humoral Immunity. In: *Cytomegaloviruses: From Molecular Pathogenesis to Intervention*. Ed: Reddehase M.J., Caister Academic Press, 214-230.
- Maciejewski,J.P., Bruening,E.E., Donahue,R.E., Mocarski,E.S., Young,N.S., and St Jeor,S.C. (1992). Infection of hematopoietic progenitor cells by human cytomegalovirus. *Blood* 80, 170-178.
- Mandron,M., Martin,H., Bonjean,B., Lule,J., Tartour,E., and Davrinche,C. (2008). Dendritic cell-induced apoptosis of human cytomegalovirus-infected fibroblasts promotes cross-presentation of pp65 to CD8+ T cells. *J. Gen. Virol.* 89, 78-86.

- Marchini,A., Liu,H., and Zhu,H. (2001). Human cytomegalovirus with IE-2 (UL122) deleted fails to express early lytic genes. *J. Virol.* 75, 1870-1878.
- Marshall,G.S. and Stout,G.G. (2005). Cytomegalovirus seroprevalence among women of childbearing age during a 10-year period. *Am. J. Perinatol.* 22, 371-376.
- Mersseman,V., Besold,K., Reddehase,M.J., Wolfrum,U., Strand,D., Plachter,B., and Reyda,S. (2008). Exogenous introduction of an immunodominant peptide from the non-structural IE1 protein of human cytomegalovirus into the MHC class I presentation pathway by recombinant dense bodies. *J. Gen. Virol.* 89, 369-379.
- Meyer,H., Masuho,Y., and Mach,M. (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 ( Pt 10), 2443-2450.
- Meyer,H., Sundqvist,V.A., Pereira,L., and Mach,M. (1992). Glycoprotein gp116 of human cytomegalovirus contains epitopes for strain-common and strain-specific antibodies. *J. Gen. Virol.* 73 ( Pt 9), 2375-2383.
- Mocarski, E.S., T. Shenk, P. Griffiths and R. F. Pass (2013) Cytomegaloviruses. In D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin (Eds.) *Fields Virology*, 6th Edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 1960-2014.
- Moutaftsi,M., Mehl,A.M., Borysiewicz,L.K., and Tabi,Z. (2002). Human cytomegalovirus inhibits maturation and impairs function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 99, 2913-2921.
- Murphy,E. and Shenk,T. (2008). Human cytomegalovirus genome. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 325, 1-19.
- Mussi-Pinhata,M.M., Pinto,P.C., Yamamoto,A.Y., Berencsi,K., de Souza,C.B., Andrea,M., Duarte,G., and Jorge,S.M. (2003). Placental transfer of naturally acquired, maternal cytomegalovirus antibodies in term and preterm neonates. *J. Med. Virol.* 69, 232-239.
- Mussi-Pinhata,M.M., Yamamoto,A.Y., Moura Brito,R.M., de,L., I, de Carvalho e Oliveira PF, Boppana,S., and Britt,W.J. (2009). Birth prevalence and natural history of congenital cytomegalovirus infection in a highly seroimmune population. *Clin. Infect. Dis.* 49, 522-528.
- Muyrers,J.P., Zhang,Y., Testa,G., and Stewart,A.F. (1999). Rapid modification of bacterial artificial chromosomes by ET-recombination. *Nucleic Acids Res.* 27, 1555-1557.
- Navarro,D., Paz,P., Tugizov,S., Topp,K., La,V.J., and Pereira,L. (1993). Glycoprotein B of human cytomegalovirus promotes virion penetration into cells, transmission of infection from cell to cell, and fusion of infected cells. *Virology* 197, 143-158.
- Nigro,G., Adler,S.P., La,T.R., and Best,A.M. (2005). Passive immunization during pregnancy for congenital cytomegalovirus infection. *N. Engl. J. Med.* 353, 1350-1362.

- Nozawa,N., Fang-Hoover,J., Tabata,T., Maidji,E., and Pereira,L. (2009). Cytomegalovirus-specific, high-avidity IgG with neutralizing activity in maternal circulation enriched in the fetal bloodstream. *J. Clin. Virol.* *46 Suppl 4*, 58-63.
- Ohizumi,Y., Suzuki,H., Numazaki,Y., Imaizumi,M., Koisumi,Y., Suzuki,H., Tada,K., Minegishi,M., Tsuchiya,S., and Konno,T. (1994). Human cytomegalovirus neutralizing antibody response in Japanese children with bone marrow transplantation. *Tohoku J. Exp. Med.* *174*, 11-17.
- Ohta,A., Fujita,A., Murayama,T., Iba,Y., Kurosawa,Y., Yoshikawa,T., and Asano,Y. (2009). Recombinant human monoclonal antibodies to human cytomegalovirus glycoprotein B neutralize virus in a complement-dependent manner. *Microbes. Infect.* *11*, 1029-1036.
- Ornoy,A. and Diav-Citrin,O. (2006). Fetal effects of primary and secondary cytomegalovirus infection in pregnancy. *Reprod. Toxicol.* *21*, 399-409.
- Oxford,K.L., Strelow,L., Yue,Y., Chang,W.L., Schmidt,K.A., Diamond,D.J., and Barry,P.A. (2011). Open reading frames carried on UL/b' are implicated in shedding and horizontal transmission of rhesus cytomegalovirus in rhesus monkeys. *J. Virol.* *85*, 5105-5114.
- Pass,R.F., Fowler,K.B., Boppana,S.B., Britt,W.J., and Stagno,S. (2006). Congenital cytomegalovirus infection following first trimester maternal infection: symptoms at birth and outcome. *J. Clin. Virol.* *35*, 216-220.
- Pass,R.F., Zhang,C., Evans,A., Simpson,T., Andrews,W., Huang,M.L., Corey,L., Hill,J., Davis,E., Flanigan,C., and Cloud,G. (2009). Vaccine prevention of maternal cytomegalovirus infection. *N. Engl. J. Med.* *360*, 1191-1199.
- Patrone,M., Secchi,M., Bonaparte,E., Milanese,G., and Gallina,A. (2007). Cytomegalovirus UL131-128 products promote gB conformational transition and gB-gH interaction during entry into endothelial cells. *J. Virol.* *81*, 11479-11488.
- Peggs,K.S., Verfuert,S., Pizzey,A., Khan,N., Guiver,M., Moss,P.A., and Mackinnon,S. (2003). Adoptive cellular therapy for early cytomegalovirus infection after allogeneic stem-cell transplantation with virus-specific T-cell lines. *Lancet* *362*, 1375-1377.
- Pepperl, S. (2000). Untersuchung des immunogenen Potentials von *Dense Bodies* des Humanen Cytomegalovirus (HCMV) als Grundlage für die Entwicklung einer neuartigen HCMV-Vakzine. Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg Universität Mainz.
- Pepperl,S., Munster,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*, 6132-6146.
- Pepperl-Klindworth,S., Frankenberg,N., and Plachter,B. (2002). Development of novel vaccine strategies against human cytomegalovirus infection based on subviral particles. *J. Clin. Virol.* *25*, 75-85.

- Pepperl-Klindworth,S., Frankenberg,N., Riegler,S., and Plachter,B. (2003). Protein delivery by subviral particles of human cytomegalovirus. *Gene Ther.* *10*, 278-284.
- Plachter,B., Sinzger,C., and Jahn,G. (1996). Cell types involved in replication and distribution of human cytomegalovirus. *Adv. Virus Res.* *46*, 195-261.
- Plotkin,S.A. (1981). Prevention of intrauterine and perinatal infections. *Clin. Perinatol.* *8*, 617-637.
- Plotkin,S.A., Furukawa,T., Zygraich,N., and Huygelen,C. (1975). Candidate cytomegalovirus strain for human vaccination. *Infect. Immun.* *12*, 521-527.
- Plotkin,S.A., and Plachter,B. (2013). Cytomegalovirus Vaccine: On the Way to the Future? In: *Cytomegaloviruses: From Molecular Pathogenesis to Intervention*. Ed: Reddehase M.J., Caister Academic Press, 422-447.
- Potzsch,S., Spindler,N., Wiegers,A.K., Fisch,T., Rucker,P., Sticht,H., Grieb,N., Baroti,T., Weisel,F., Stamminger,T., Martin-Parras,L., Mach,M., and Winkler,T.H. (2011). B cell repertoire analysis identifies new antigenic domains on glycoprotein B of human cytomegalovirus which are target of neutralizing antibodies. *PLoS. Pathog.* *7*, e1002172.
- Prichard,M.N., Britt,W.J., Daily,S.L., Hartline,C.B., and Kern,E.R. (2005). Human cytomegalovirus UL97 Kinase is required for the normal intranuclear distribution of pp65 and virion morphogenesis. *J. Virol.* *79*, 15494-15502.
- Raftery,M.J., Hitzler,M., Winau,F., Giese,T., Plachter,B., Kaufmann,S.H., and Schonrich,G. (2008). Inhibition of CD1 antigen presentation by human cytomegalovirus. *J. Virol.* *82*, 4308-4319.
- Raftery,M.J., Schwab,M., Eibert,S.M., Samstag,Y., Walczak,H., and Schonrich,G. (2001). Targeting the function of mature dendritic cells by human cytomegalovirus: a multilayered viral defense strategy. *Immunity.* *15*, 997-1009.
- Rasmussen,L., Geissler,A., Cowan,C., Chase,A., and Winters,M. (2002). The genes encoding the gCIII complex of human cytomegalovirus exist in highly diverse combinations in clinical isolates. *J. Virol.* *76*, 10841-10848.
- Rasmussen,L., Mullenax,J., Nelson,R., and Merigan,T.C. (1985). Viral polypeptides detected by a complement-dependent neutralizing murine monoclonal antibody to human cytomegalovirus. *J. Virol.* *55*, 274-280.
- Reap,E.A., Dryga,S.A., Morris,J., Rivers,B., Norberg,P.K., Olmsted,R.A., and Chulay,J.D. (2007). Cellular and humoral immune responses to alphavirus replicon vaccines expressing cytomegalovirus pp65, IE1, and gB proteins. *Clin. Vaccine Immunol.* *14*, 748-755.
- Reddehase,M.J., Mutter,W., Munch,K., Buhring,H.J., and Koszinowski,U.H. (1987). CD8-positive T lymphocytes specific for murine cytomegalovirus immediate-early antigens mediate protective immunity. *J. Virol.* *61*, 3102-3108.
- Ribbert,D. Über protozoenartige Zellen in der Niere eines syphilitischen Neugoborenen und in der Parotis von Kindern. *Zentralbl. Allg. Pathol.* 1904;15:945–948.

- Riddell,S.R., Watanabe,K.S., Goodrich,J.M., Li,C.R., Agha,M.E., and Greenberg,P.D. (1992). Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science* 257, 238-241.
- Riegler,S., Hebart,H., Einsele,H., Brossart,P., Jahn,G., and Sinzger,C. (2000). Monocyte-derived dendritic cells are permissive to the complete replicative cycle of human cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.* 81, 393-399.
- Rosen,H.R., Benner,K.G., Flora,K.D., Rabkin,J.M., Orloff,S.L., Olyaei,A., and Chou,S. (1997). Development of ganciclovir resistance during treatment of primary cytomegalovirus infection after liver transplantation. *Transplantation* 63, 476-478.
- ROWE,W.P., HARTLEY,J.W., WATERMAN,S., TURNER,H.C., and HUEBNER,R.J. (1956). Cytopathogenic agent resembling human salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 92, 418-424.
- Ryckman,B.J., Chase,M.C., and Johnson,D.C. (2008a). HCMV gH/gL/UL128-131 interferes with virus entry into epithelial cells: evidence for cell type-specific receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105, 14118-14123.
- Ryckman,B.J., Chase,M.C., and Johnson,D.C. (2010). Human cytomegalovirus TR strain glycoprotein O acts as a chaperone promoting gH/gL incorporation into virions but is not present in virions. *J. Virol.* 84, 2597-2609.
- Ryckman,B.J., Jarvis,M.A., Drummond,D.D., Nelson,J.A., and Johnson,D.C. (2006). Human cytomegalovirus entry into epithelial and endothelial cells depends on genes UL128 to UL150 and occurs by endocytosis and low-pH fusion. *J. Virol.* 80, 710-722.
- Ryckman,B.J., Rainish,B.L., Chase,M.C., Borton,J.A., Nelson,J.A., Jarvis,M.A., and Johnson,D.C. (2008b). Characterization of the human cytomegalovirus gH/gL/UL128-131 complex that mediates entry into epithelial and endothelial cells. *J. Virol.* 82, 60-70.
- Saccoccio,F.M., Sauer,A.L., Cui,X., Armstrong,A.E., Habib,e., Johnson,D.C., Ryckman,B.J., Klingelhutz,A.J., Adler,S.P., and McVoy,M.A. (2011). Peptides from cytomegalovirus UL130 and UL131 proteins induce high titer antibodies that block viral entry into mucosal epithelial cells. *Vaccine* 29, 2705-2711.
- Saiki,R.K., Gelfand,D.H., Stoffel,S., Scharf,S.J., Higuchi,R., Horn,G.T., Mullis,K.B., and Erlich,H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Schempp,S., Topp,M., Kessler,T., Sampaio,K.L., Dennehy,K.M., Einsele,H., Hahn,G., Grigoleit,G.U., and Jahn,G. (2011). Deletion mutant of human cytomegalovirus lacking US2-US6 and US11 maintains MHC class I expression and antigen presentation by infected dendritic cells. *Virus Res.* 155, 446-454.
- Schmidt,S. and Kauling,J. (2006). UV-Inaktivierung von Viren und Bakterien mit einem innovativen Wendelrohrreaktor im Labor- und Prozessmaßstab. *Chemie Ingenieur Technik* 78(11), 1739-1745.

- Schmolke,S., Kern,H.F., Drescher,P., Jahn,G., and Plachter,B. (1995). The dominant phosphoprotein pp65 (UL83) of human cytomegalovirus is dispensable for growth in cell culture. *J. Virol.* *69*, 5959-5968.
- Schoppel,K., Schmidt,C., Einsele,H., Hebart,H., and Mach,M. (1998). Kinetics of the antibody response against human cytomegalovirus-specific proteins in allogeneic bone marrow transplant recipients. *J. Infect. Dis.* *178*, 1233-1243.
- Scrivano,L., Sinzger,C., Nitschko,H., Koszinowski,U.H., and Adler,B. (2011). HCMV spread and cell tropism are determined by distinct virus populations. *PLoS. Pathog.* *7*, e1001256.
- Selinsky,C., Luke,C., Wloch,M., Geall,A., Hermanson,G., Kaslow,D., and Evans,T. (2005). A DNA-based vaccine for the prevention of human cytomegalovirus-associated diseases. *Hum. Vaccin.* *1*, 16-23.
- Senechal,B., Boruchov,A.M., Reagan,J.L., Hart,D.N., and Young,J.W. (2004). Infection of mature monocyte-derived dendritic cells with human cytomegalovirus inhibits stimulation of T-cell proliferation via the release of soluble CD83. *Blood* *103*, 4207-4215.
- Shimamura,M., Mach,M., and Britt,W.J. (2006). Human cytomegalovirus infection elicits a glycoprotein M (gM)/gN-specific virus-neutralizing antibody response. *J. Virol.* *80*, 4591-4600.
- Shizuya,H., Birren,B., Kim,U.J., Mancino,V., Slepak,T., Tachiiri,Y., and Simon,M. (1992). Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *89*, 8794-8797.
- Siegel,F.P., Kadowaki,N., Shodell,M., Fitzgerald-Bocarsly,P.A., Shah,K., Ho,S., Antonenko,S., and Liu,Y.J. (1999). The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* *284*, 1835-1837.
- Simmen,K.A., Singh,J., Luukkonen,B.G., Lopper,M., Bittner,A., Miller,N.E., Jackson,M.R., Compton,T., and Fruh,K. (2001). Global modulation of cellular transcription by human cytomegalovirus is initiated by viral glycoprotein B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *98*, 7140-7145.
- Simpson,J.A., Chow,J.C., Baker,J., Avdalovic,N., Yuan,S., Au,D., Co,M.S., Vasquez,M., Britt,W.J., and Coelingh,K.L. (1993). Neutralizing monoclonal antibodies that distinguish three antigenic sites on human cytomegalovirus glycoprotein H have conformationally distinct binding sites. *J. Virol.* *67*, 489-496.
- Sinclair,J. (2008). Manipulation of dendritic cell functions by human cytomegalovirus. *Expert. Rev. Mol. Med.* *10*, e35.
- Sinzger,C. (2008). Entry route of HCMV into endothelial cells. *J. Clin. Virol.* *41*, 174-179.



- Sinzger,C., Grefte,A., Plachter,B., Gouw,A.S., The,T.H., and Jahn,G. (1995). Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues. *J. Gen. Virol.* *76 ( Pt 4)*, 741-750.
- Sinzger,C., Hahn,G., Digel,M., Katona,R., Sampaio,K.L., Messerle,M., Hengel,H., Koszinowski,U., Brune,W., and Adler,B. (2008). Cloning and sequencing of a highly productive, endotheliotropic virus strain derived from human cytomegalovirus TB40/E. *J. Gen. Virol.* *89*, 359-368.
- Sinzger,C., Schmidt,K., Knapp,J., Kahl,M., Beck,R., Waldman,J., Hebart,H., Einsele,H., and Jahn,G. (1999). Modification of human cytomegalovirus tropism through propagation in vitro is associated with changes in the viral genome. *J. Gen. Virol.* *80 ( Pt 11)*, 2867-2877.
- Snydman,D.R., Werner,B.G., Meissner,H.C., Cheeseman,S.H., Schwab,J., Bednarek,F., Kennedy,J.L., Jr., Herschel,M., Magno,A., Levin,M.J., and . (1995). Use of cytomegalovirus immunoglobulin in multiply transfused premature neonates. *Pediatr. Infect. Dis. J.* *14*, 34-40.
- Soderberg,C., Larsson,S., Bergstedt-Lindqvist,S., and Moller,E. (1993). Definition of a subset of human peripheral blood mononuclear cells that are permissive to human cytomegalovirus infection. *J. Virol.* *67*, 3166-3175.
- Spiller,O.B., Hanna,S.M., Devine,D.V., and Tufaro,F. (1997). Neutralization of cytomegalovirus virions: the role of complement. *J. Infect. Dis.* *176*, 339-347.
- Spindler,N., Rucker,P., Potzsch,S., Diestel,U., Sticht,H., Martin-Parras,L., Winkler,T.H., and Mach,M. (2013). Characterization of a discontinuous neutralizing epitope on glycoprotein B of human cytomegalovirus. *J. Virol.* *87*, 8927-8939.
- Stanton,R.J., Baluchova,K., Dargan,D.J., Cunningham,C., Sheehy,O., Seirafian,S., McSharry,B.P., Neale,M.L., Davies,J.A., Tomasec,P., Davison,A.J., and Wilkinson,G.W. (2010). Reconstruction of the complete human cytomegalovirus genome in a BAC reveals RL13 to be a potent inhibitor of replication. *J. Clin. Invest* *120*, 3191-3208.
- Steininger,C. (2007). Novel therapies for cytomegalovirus disease. *Recent Pat Antiinfect. Drug Discov.* *2*, 53-72.
- Steinman,R.M. and Hemmi,H. (2006). Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *311*, 17-58.
- Stern-Ginossar,N., Weisburd,B., Michalski,A., Le,V.T., Hein,M.Y., Huang,S.X., Ma,M., Shen,B., Qian,S.B., Hengel,H., Mann,M., Ingolia,N.T., and Weissman,J.S. (2012). Decoding human cytomegalovirus. *Science* *338*, 1088-1093.
- Sylwester,A.W., Mitchell,B.L., Edgar,J.B., Taormina,C., Pelte,C., Ruchti,F., Sleath,P.R., Grabstein,K.H., Hosken,N.A., Kern,F., Nelson,J.A., and Picker,L.J. (2005). Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *J. Exp. Med.* *202*, 673-685.

- Talbot,P. and Almeida,J.D. (1977). Human cytomegalovirus: purification of enveloped virions and dense bodies. *J. Gen. Virol.* *36*, 345-349.
- Tang,A., Li,F., Freed,D.C., Finnefrock,A.C., Casimiro,D.R., Wang,D., and Fu,T.M. (2011). A novel high-throughput neutralization assay for supporting clinical evaluations of human cytomegalovirus vaccines. *Vaccine* *29*, 8350-8356.
- Tanious,F.A., Veal,J.M., Buczak,H., Ratmeyer,L.S., and Wilson,W.D. (1992). DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) binds differently to DNA and RNA: minor-groove binding at AT sites and intercalation at AU sites. *Biochemistry* *31*, 3103-3112.
- To,A., Bai,Y., Shen,A., Gong,H., Umamoto,S., Lu,S., and Liu,F. (2011). Yeast two hybrid analyses reveal novel binary interactions between human cytomegalovirus-encoded virion proteins. *PLoS. One.* *6*, e17796.
- Topilko,A. and Michelson,S. (1994). Hyperimmediate entry of human cytomegalovirus virions and dense bodies into human fibroblasts. *Res. Virol.* *145*, 75-82.
- Trapani,J.A. and Smyth,M.J. (2002). Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat. Rev. Immunol.* *2*, 735-747.
- Tugizov,S., Navarro,D., Paz,P., Wang,Y., Qadri,I., and Pereira,L. (1994). Function of human cytomegalovirus glycoprotein B: syncytium formation in cells constitutively expressing gB is blocked by virus-neutralizing antibodies. *Virology* *201*, 263-276.
- Tugizov,S., Wang,Y., Qadri,I., Navarro,D., Maidji,E., and Pereira,L. (1995). Mutated forms of human cytomegalovirus glycoprotein B are impaired in inducing syncytium formation. *Virology* *209*, 580-591.
- Urban,M., Klein,M., Britt,W.J., Hassfurther,E., and Mach,M. (1996). Glycoprotein H of human cytomegalovirus is a major antigen for the neutralizing humoral immune response. *J. Gen. Virol.* *77 (Pt 7)*, 1537-1547.
- Utz,U., Britt,W., Vugler,L., and Mach,M. (1989). Identification of a neutralizing epitope on glycoprotein gp58 of human cytomegalovirus. *J. Virol.* *63*, 1995-2001.
- Varani,S., Frascaroli,G., Gibellini,D., Potena,L., Lazzarotto,T., Lemoli,R.M., Magelli,C., Soderberg-Naucler,C., and Landini,M.P. (2005). Impaired dendritic cell immunophenotype and function in heart transplant patients undergoing active cytomegalovirus infection. *Transplantation* *79*, 219-227.
- Varnum,S.M., Streblow,D.N., Monroe,M.E., Smith,P., Auberry,K.J., Pasa-Tolic,L., Wang,D., Camp,D.G., Rodland,K., Wiley,S., Britt,W., Shenk,T., Smith,R.D., and Nelson,J.A. (2004). Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome. *J. Virol.* *78*, 10960-10966.
- Wagner,B., Kropff,B., Kalbacher,H., Britt,W., Sundqvist,V.A., Ostberg,L., and Mach,M. (1992). A continuous sequence of more than 70 amino acids is essential for antibody binding to the dominant antigenic site of glycoprotein gp58 of human cytomegalovirus. *J. Virol.* *66*, 5290-5297.

- Walter,E.A., Greenberg,P.D., Gilbert,M.J., Finch,R.J., Watanabe,K.S., Thomas,E.D., and Riddell,S.R. (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.
- Wang,D., Li,F., Freed,D.C., Finnefrock,A.C., Tang,A., Grimes,S.N., Casimiro,D.R., and Fu,T.M. (2011). Quantitative analysis of neutralizing antibody response to human cytomegalovirus in natural infection. *Vaccine* *29*, 9075-9080.
- Wang,D. and Shenk,T. (2005a). Human cytomegalovirus UL131 open reading frame is required for epithelial cell tropism. *J. Virol.* *79*, 10330-10338.
- Wang,D. and Shenk,T. (2005b). Human cytomegalovirus virion protein complex required for epithelial and endothelial cell tropism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *102*, 18153-18158.
- Wang,X., Huang,D.Y., Huong,S.M., and Huang,E.S. (2005). Integrin alphavbeta3 is a coreceptor for human cytomegalovirus. *Nat. Med.* *11*, 515-521.
- Wang,X., Huong,S.M., Chiu,M.L., Raab-Traub,N., and Huang,E.S. (2003). Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus. *Nature* *424*, 456-461.
- Wang,Z., La,R.C., Maas,R., Ly,H., Brewer,J., Mekhoubad,S., Daftarian,P., Longmate,J., Britt,W.J., and Diamond,D.J. (2004a). Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing a soluble form of glycoprotein B causes durable immunity and neutralizing antibodies against multiple strains of human cytomegalovirus. *J. Virol.* *78*, 3965-3976.
- Wang,Z., Mo,C., Kemble,G., and Duke,G. (2004b). Development of an efficient fluorescence-based microneutralization assay using recombinant human cytomegalovirus strains expressing green fluorescent protein. *J. Virol. Methods* *120*, 207-215.
- Warming,S., Costantino,N., Court DL, Jenkins,N.A., and Copeland,N.G. (2005). Simple and highly efficient BAC recombineering using galK selection. *Nucleic Acids Res.* *33*, 36.
- Wille,P.T., Wisner,T.W., Ryckman,B., and Johnson,D.C. (2013). Human cytomegalovirus (HCMV) glycoprotein gB promotes virus entry in trans acting as the viral fusion protein rather than as a receptor-binding protein. *MBio.* *4*, e00332-13.
- Wloch,M.K., Smith,L.R., Boutsaboualoy,S., Reyes,L., Han,C., Kehler,J., Smith,H.D., Selk,L., Nakamura,R., Brown,J.M., Marbury,T., Wald,A., Rolland,A., Kaslow,D., Evans,T., and Boeckh,M. (2008). Safety and immunogenicity of a bivalent cytomegalovirus DNA vaccine in healthy adult subjects. *J. Infect. Dis.* *197*, 1634-1642.
- Wussow,F., Yue,Y., Martinez,J., Deere,J.D., Longmate,J., Herrmann,A., Barry,P.A., and Diamond,D.J. (2013). A vaccine based on the rhesus cytomegalovirus UL128 complex induces broadly neutralizing antibodies in rhesus macaques. *J. Virol.* *87*, 1322-1332.
- Yamamoto,A.Y., Mussi-Pinhata,M.M., Boppana,S.B., Novak,Z., Wagatsuma,V.M., Oliveira,P.F., Duarte,G., and Britt,W.J. (2010). Human cytomegalovirus reinfection is associated with intrauterine transmission in a highly cytomegalovirus-immune maternal population. *Am. J. Obstet. Gynecol.* *202*, 297-298.

- Yamamoto,A.Y., Mussi-Pinhata,M.M., Isaac,M.L., Amaral,F.R., Carvalheiro,C.G., Aragon,D.C., Manfredi,A.K., Boppana,S.B., and Britt,W.J. (2011). Congenital cytomegalovirus infection as a cause of sensorineural hearing loss in a highly immune population. *Pediatr. Infect. Dis. J.* *30*, 1043-1046.
- Yeager,A.S., Grumet,F.C., Hafleigh,E.B., Arvin,A.M., Bradley,J.S., and Prober,C.G. (1981). Prevention of transfusion-acquired cytomegalovirus infections in newborn infants. *J. Pediatr.* *98*, 281-287.
- Yu,D., Smith,G.A., Enquist,L.W., and Shenk,T. (2002). Construction of a self-excisable bacterial artificial chromosome containing the human cytomegalovirus genome and mutagenesis of the diploid TRL/IRL13 gene. *J. Virol.* *76*, 2316-2328.
- Zhang,C., Buchanan,H., Andrews,W., Evans,A., and Pass,R.F. (2006). Detection of cytomegalovirus infection during a vaccine clinical trial in healthy young women: seroconversion and viral shedding. *J. Clin. Virol.* *35*, 338-342.
- Zhang,Y., Buchholz,F., Muyrers,J.P., and Stewart,A.F. (1998). A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *Nat. Genet.* *20*, 123-128.
- Zhao,P., Ma,D., Xue,F., Ji,C., Wang,S., Zhang,X., Zhou,Y., and Yu,X. (2009). Seroprevalence and risk factors of human cytomegalovirus infection in the eastern Chinese population. *Arch. Virol.* *154*, 561-564.
- Zhou,M., Yu,Q., Wechsler,A., and Ryckman,B.J. (2013). Comparative Analysis of gO Isoforms Reveals that Strains of Human Cytomegalovirus Differ in the Ratio of gH/gL/gO and gH/gL/UL128-131 in the Virion Envelope. *J. Virol.* *87*, 9680-9690.
- Zhuravskaya,T., Maciejewski,J.P., Netski,D.M., Bruening,E., Mackintosh,F.R., and St,J.S. (1997). Spread of human cytomegalovirus (HCMV) after infection of human hematopoietic progenitor cells: model of HCMV latency. *Blood* *90*, 2482-2491.

## **Danksagung**

## **Erklärung**

## **Lebenslauf**