

**Immunevasive Strategien des Humanen
Cytomegalovirus: Einfluss des Tegumentproteins
pp71 und des Immunevasins gpUS3 auf die MHC-
Klasse-I-Antigenpräsentation infizierter Zellen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Julia Hesse
geboren am 18. Februar 1983
in Kassel

Mainz, 2012

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 10. September 2012

Zusammenfassung

Bei Menschen mit unreifem oder geschwächtem Immunsystem kann eine Infektion mit dem Humanen Cytomegalovirus (HCMV) zu schweren Erkrankungen führen. Hingegen kontrolliert das Immunsystem bei Gesunden die HCMV-Infektion fast vollständig. Wichtige Effektoren hierbei sind CD8-positive zytotoxische T-Zellen (CTLs). Um dieser Kontrolle entgegenzuwirken, exprimiert HCMV die als Immunevasine bekannten Proteine gpUS2, gpUS3, gpUS6 und gpUS11. Sie greifen an unterschiedlichen Stellen in die MHC-Klasse-I (MHC-I)-vermittelte Antigenpräsentation ein und schützen so infizierte Zellen vor der Erkennung durch CTLs. Zusätzlich waren auch den Tegumentproteinen pp65 und pp71 immunevasive Funktionen zugeschrieben worden, wobei jedoch über diese Funktionen bisher nur wenig bekannt war. Daher sollte im ersten Teil der vorliegenden Arbeit die Beteiligung von pp71 an der MHC-I-Immunevasion von HCMV-infizierten humanen Fibroblasten untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden HCMV-Mutanten eingesetzt, die pp71 verstärkt exprimierten. Entgegen der postulierten immunevasiven Rolle von pp71 konnte zu keinem Zeitpunkt der Infektion ein inhibierender Effekt von pp71 auf die Antigenpräsentation infizierter Fibroblasten festgestellt werden. Sehr früh nach Infektion war sogar eine pp71-vermittelte Steigerung der Präsentation des HCMV-Proteins IE1 zu beobachten. Um zu prüfen, ob es auch während einer natürlichen Infektion zu einer Erhöhung der pp71-Expression und den damit verbundenen Effekten kommen kann, wurde untersucht, ob die Expression von pp71 durch Zellstress induzierbar ist. Dies erschien möglich, da der Leserahmen für pp71 von einer bizistronischen mRNA kodiert wird. Über die Erzeugung von Zellstress durch Serumentzug konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Expression des wichtigen viralen Transaktivators pp71 abhängig vom physiologischen Zustand der infizierten Zellen reguliert wird. Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle des Immunevasins gpUS3 näher beleuchtet werden. Sein Wirkmechanismus war, wie die Mechanismen der drei anderen Immunevasine gpUS2, gpUS6 und gpUS11, bereits ausführlicher untersucht worden. Der individuelle Beitrag von gpUS3 zur MHC-I-Immunevasion in infizierten Zellen sowie ein mögliches Zusammenspiel mit den anderen Immunevasinen waren hingegen noch zu erforschen. Hierzu wurden HCMV-Mutanten eingesetzt, die keines oder nur eines der Immunevasine exprimierten. Mit ihrer Hilfe konnte gezeigt werden, dass gpUS3 sehr früh nach Infektion überraschenderweise die Immunevasion in infizierten Fibroblasten behindert. Zu späteren Infektionszeitpunkten war dagegen ein immunevasiver Effekt von gpUS3 in Form einer Kooperation mit jeweils einem der drei anderen Immunevasine festzustellen. Aus diesen Ergebnissen ergibt sich die neue Hypothese, dass die Hauptaufgabe von gpUS3 im Rahmen der HCMV-Immunevasion in der Regulation der Funktionen der übrigen Immunevasine liegt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Humane Cytomegalovirus	1
1.1.1	Virionstruktur und Genom	1
1.1.2	Replikation	2
1.2	Klinische Bedeutung	4
1.3	Immunreaktion	5
1.3.1	Angeborene Immunantwort	5
1.3.2	Adaptive Immunantwort	6
1.4	Immunevasion	8
1.4.1	Die HCMV-Proteine der US2-11-Genregion	9
1.4.1.1	GpUS2, gpUS3, gpUS6 und gpUS11 – die „klassischen“ Immunevasine	9
1.4.1.2	GpUS7, gpUS8, gpUS9 und gpUS10	13
1.4.2	Die HCMV-Proteine pp65 und pp71	14
1.5	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	16
1.5.1	Immunevasive Funktion von pp71 in HCMV-infizierten Fibroblasten	17
1.5.2	Immunevasive Funktionen von gpUS3 in HCMV-infizierten Fibroblasten	18
2	Material und Methoden	19
2.1	Allgemeine Laborgeräte	19
2.2	Chemikalien	21
2.3	Bakterien und ihre Kultivierung	21
2.3.1	Bakterienstämme	21
2.3.2	Medien und Medienzusätze	21
2.3.3	Kultivierung und Kryokonservierung	22
2.3.3.1	Flüssigkulturen	22
2.3.3.2	Kultivierung auf Agarplatten	22

2.3.3.3	Kryokonservierung (Glycerinkulturen)	22
2.3.4	Transformation von <i>E. coli</i>	22
2.3.4.1	Herstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i> EL250	22
2.3.4.2	Elektroporation kompetenter <i>E. coli</i> EL250	23
2.4	Säugerzellen und ihre Kultivierung.....	23
2.4.1	Suspensionszellen	24
2.4.2	Adhärente Zellen	24
2.4.3	Murine CTL-Linien	25
2.4.3.1	Restimulierung.....	26
2.4.4	Bestimmung der Zellzahl und der Zellvitalität	27
2.4.5	Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen.....	27
2.5	Viren und ihre Kultivierung.....	28
2.5.1	Virusstämme.....	28
2.5.2	Virus-Rekonstitution aus BACmiden	32
2.5.3	Infektion eukaryonter Zellen mit HCMV	32
2.5.3.1	Behandlung infizierter Zellen mit Cycloheximid und Actinomycin D	33
2.5.3.2	Stressinduktion in infizierten HFF durch Serumentzug	33
2.5.4	Herstellung von Virusstocks	34
2.5.5	Bestimmung des Virustiters über die Induktion von IE1-positive Zellen	34
2.5.6	Bestimmung des Virustiters über virale Genome.....	35
2.5.7	Aufreinigung von Viruspartikeln aus Zellkulturüberstand.....	36
2.6	Präparation und Analyse von DNA.....	37
2.6.1	Verwendete BACmide und Plasmide	37
2.6.2	Isolierung von DNA	40
2.6.2.1	Isolierung von BACmid- / Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	40
2.6.2.2	Isolierung von viraler DNA aus infizierten HFF oder aus Zellkulturüberstand infizierter HFF	41
2.6.3	DNA-Konzentrationsbestimmung	41
2.6.4	Fällung von DNA mit Isopropanol.....	41

2.6.5	Agarose-Gelelektrophorese für DNA	41
2.6.6	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	42
2.6.7	Qualitative PCR	42
2.6.7.1	Durchführung einer PCR	43
2.6.7.2	Verwendete <i>Primer</i>	44
2.6.7.3	Gewinnung von <i>Template</i> -DNA aus Bakterienkolonien	45
2.6.7.4	Aufreinigung von PCR-Produkten	45
2.6.7.5	<i>Template</i> -Eliminierung.....	45
2.6.8	Quantitative <i>Real-Time</i> PCR	46
2.6.8.1	Genomquantifizierung mittels quantitativer <i>Real-Time</i> PCR.....	46
2.6.9	Manipulation des HCMV-Genoms durch BAC-Mutagenese	48
2.6.9.1	Herstellung des PCR-Produkts zur homologen Rekombination	48
2.6.9.2	Deletion der viralen Zielsequenz durch Integration der Selektionsmarker- Kassette.....	49
2.6.10	Restriktionsanalyse	50
2.6.11	DNA-Sequenzierung	50
2.7	Präparation und Analyse von RNA.....	50
2.7.1	Isolierung von RNA	50
2.7.2	Northern Blot	51
2.7.2.1	Herstellung DIG-markierter DNA-Sonden	51
2.7.2.2	Agarose-Gelelektrophorese für RNA.....	52
2.7.2.3	Blot und Detektion	52
2.8	Immunologische Methoden	54
2.8.1	<i>Enzyme-linked immuno spot assay</i> (ELISpot)	54
2.8.1.1	Analyse von infizierten Zellen unter IE-Bedingungen	58
2.9	Analyse von Proteinen	59
2.9.1	Verwendete Antikörper.....	59
2.9.2	Durchflusszytometrie.....	60
2.9.3	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	61

2.9.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	61
2.9.5	Coomassie-Färbung.....	63
2.9.6	Western Blot.....	63
3	Ergebnisse	66
3.1	Immunevasive Funktion von pp71 in infizierten HFF	66
3.1.1	Identifikation und Charakterisierung von HCMV-Mutanten zur Analyse der immunevasiven Funktion von pp71.....	67
2.1.1.1	pp71-Expression in HFF nach Infektion mit pp65-Deletionsmutanten.....	68
3.1.2	Etablierung der HCMV-Mutanten zur Analyse der immunevasiven Funktion von pp71	75
3.1.3	Einfluss von pp71 auf die MHC-I-vermittelte Antigenpräsentation.....	78
2.1.1.2	Einfluss von Partikel-assoziiertem pp71 auf die MHC-I-vermittelte Antigenpräsentation.....	81
2.1.1.3	Modulation der pp71-Expression durch Zellstress	83
3.2	Immunevasive Funktionen von gpUS3 in infizierten HFF	85
3.2.1	Einfluss von gpUS3 auf die MHC-I-vermittelte Antigenpräsentation.....	85
3.2.2	Wechselwirkung von gpUS3 mit den E-Proteinen gpUS2 oder gpUS11	91
3.2.3	Wechselwirkung von gpUS3 mit gpUS6	96
4	Diskussion.....	99
4.1	Immunevasive Funktion von pp71 in infizierten HFF	99
4.2	Immunevasive Funktionen von gpUS3 in infizierten HFF	105
5	Literaturverzeichnis.....	114
6	Abkürzungsverzeichnis.....	126
	Danksagung.....	130
	Erklärung	131
	Lebenslauf	132

1 Einleitung

1.1 Das Humane Cytomegalovirus

Das Humane Cytomegalovirus (HCMV) wurde 1956/57 von Smith, Weller und Rowe als Erreger der sogenannten Zytomegalie bei Neugeborenen identifiziert (Rowe *et al.*, 1956; Smith, 1956; Weller *et al.*, 1957). Es gehört zur Herpesviridae-Familie der DNA-Viren und ist innerhalb dieser Familie ein typischer Vertreter der γ -Herpesviren [zusammengefasst in (Roizman and Pellett, 2001)].

1.1.1 Virionstruktur und Genom

HCMV-Virionen sind von innen nach außen aus einem ikosaedrischen Kapsid, das das virale Genom enthält, einer als Tegument bezeichneten Proteinmatrix und einer Lipid-Hülle aufgebaut (Abb. 1) [zusammengefasst in (Liu and Zhou, 2007)].

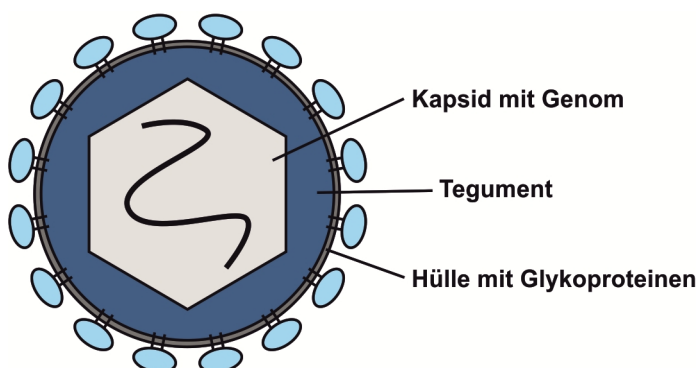


Abb. 1: Schematische Darstellung eines HCMV-Virions

Das Kapsid, das der Verpackung der viralen DNA dient, ist aus vier Proteinen zusammengesetzt, von denen das *major capsid protein* (MCP) den Hauptanteil ausmacht [zusammengefasst in (Davison and Bhella, 2007)]. Das Tegument besteht vor allem aus den Proteinen pp65 und pp150, wobei letzteres eng mit dem Kapsid assoziiert ist. Des Weiteren sind Proteine enthalten, die unter anderem Funktionen bei der Initiation des viralen Replikationszyklus übernehmen. Beispiele für solche Proteine sind ppUL69 und pp71, die die virale Genexpression induzieren [zusammengefasst in (Kalejta, 2008; Landolfo *et al.*, 2003)]. Die Hülle besteht aus einer Lipid-Doppelmembran, in die virale Glykoproteine inseriert sind. Die Glykoproteine bilden

verschiedene Komplexe aus und vermitteln den Eintritt der Virionen in die Zellen [zusammengefasst in (Davison and Bhella, 2007)].

In Zellkultursystemen werden neben Virionen noch zwei weitere Partikelarten gebildet: *dense bodies* (DBs) und *non-infectious enveloped particles* (NIEPs). Beide Partikelarten sind nicht infektiös. Sie sind wie Virionen umhüllt, haben aber eine andere Struktur. DBs sind bis zu dreimal größer als Virionen und enthalten kein Kapsid oder virale DNA. Ihr Haupt-Proteinbestandteil ist das Tegumentprotein pp65. Im Gegensatz dazu sind NIEPs in ihrem Aufbau Virionen sehr ähnlich, enthalten aber nur unreife, DNA-freie Kapside (Irmiere and Gibson, 1983; Liu and Zhou, 2007).

Das HCMV-Genom besteht aus doppelsträngiger DNA und gehört mit seinen 230 kbp zu den größten viralen Genomen. Es kodiert Schätzungen zufolge für 165 Proteine. Das Genom kann in eine *unique long* (U_L)- und eine *unique short* (U_S)-Region eingeteilt werden. Diese beiden Regionen sind jeweils von Bereichen mit Sequenzwiederholungen umgeben und sind dadurch im Genom einzeln invertierbar (Abb. 2) [zusammengefasst in (Davison, 2007; Davison and Bhella, 2007)].

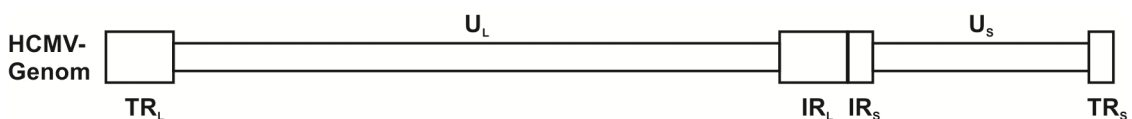


Abb. 2: Schematische Darstellung des HCMV-Genoms

Die als *unique long* (U_L) und *unique short* (U_S) bezeichneten Abschnitte des doppelsträngigen DNA-Genoms von HCMV werden von repetitiven Abschnitten eingerahmt, die als *terminal repeat long* (TR_L) und *internal repeat long* (IR_L) bzw. als *terminal repeat short* (TR_S) und *internal repeat short* (IR_S) bezeichnet werden.

1.1.2 Replikation

Während einer natürlichen Infektion kann sich HCMV in einer Reihe verschiedener Zelltypen wie Fibroblasten, Epithelzellen, Endothelzellen oder Zellen der glatten Muskulatur vermehren (Sinzger *et al.*, 1995). Eine Replikation zu hohen Virustitern wird jedoch nur in Kulturen primärer, humaner Fibroblasten beobachtet.

Die primäre Adsorption von HCMV an die Wirtszelle wird durch Heparansulfat-Proteoglykane vermittelt (Compton *et al.*, 1993). In einem zweiten Schritt erfolgt die feste Bindung der Virionen an einen bislang nicht eindeutig identifizierten Membranrezeptor. In der Folge kommt es zur pH-unabhängigen Fusion der Virionhülle mit der zellulären Membran und zur Freisetzung von Tegument und Kapsid ins Zytoplasma (Compton *et al.*, 1992). Für einige Zelltypen, wie Epithel- und

Endothelzellen, wurde alternativ eine endocytotische Aufnahme der Virionen in die Zellen beschrieben (Ryckman *et al.*, 2006).

Nach der Penetration gelangt das HCMV-Kapsid über das Mikrotubuli-Netzwerk der Zelle zum Zellkern. Das Virusgenom wird aus dem Kapsid über Kernporen ins Kerninnere eingeschleust. Die virale Genexpression durch die zelluläre RNA-Polymerase II wird dann unter anderem über die Tegumentproteine ppUL69 und pp71 initiiert [zusammengefasst in (Kalejta, 2008; Landolfo *et al.*, 2003)].

Die virale Genexpression verläuft in drei, aufeinanderfolgenden Phasen. Initial werden, beginnend innerhalb einer Stunde nach Infektion, die sehr frühen (*immediate early*, IE-) Proteine exprimiert. Diese Proteine regulieren die weitere, virale Genexpression (Colberg-Poley *et al.*, 1992; Malone *et al.*, 1990; Pizzorno *et al.*, 1988). Sie nehmen darüber hinaus Einfluss auf die Expression zellulärer Gene (Browne *et al.*, 2001; Hagemeyer *et al.*, 1992). Die IE-Proteine induzieren die Expression der frühen (*early*, E-) Proteine, die ab vier Stunden nach Infektion nachweisbar werden. Eine wichtige Aufgabe dieser Proteine ist die Replikation des viralen Genoms [zusammengefasst in (White and Spector, 2007)]. Zuletzt im Infektionsverlauf werden die späten (*late*, L-) Proteine exprimiert. Die Transkription ihrer Gene beginnt 24 Stunden nach Infektion. Späte Proteine sind vor allem Strukturproteine und sind entscheidend für die Morphogenese der Viruspartikel [zusammengefasst in (Anders *et al.*, 2007)].

Die Morphogenese beginnt im Zellkern. Dort werden Kapsidproteine zu Kapsiden zusammengesetzt und darin virale Genome verpackt. Vermutlich assoziieren auch schon einige Tegumentproteine mit den Kapsiden [zusammengefasst in (Britt, 2007a; Kalejta, 2008)]. Anschließend gelangen die Kapside über einen Mechanismus ins Zytoplasma, bei dem eine transiente Umhüllung mit der inneren Kernmembran eine Rolle spielt [zusammengefasst in (Mettenleiter *et al.*, 2006)]. Im Zytoplasma lagern sich die restlichen Tegumentproteine an die Kapside an. Danach erhalten die vom Tegument umgebenen Kapside vermutlich durch Knospung in Vesikel des Golgi-Apparats ihre endgültige Hülle. Die so gebildeten Virionen werden schließlich durch Fusion der Golgi-Vesikel mit der Zellmembran freigesetzt [zusammengefasst in (Britt, 2007a)].

Die HCMV-Replikation wirkt sich auf das Erscheinungsbild der infizierten Zellen aus. Infizierte Fibroblasten in Zellkultur sind in der Regel abgerundet und vergrößert. Gleichzeitig sind Einschlüsse im Zytoplasma und im Kern sichtbar. Auch während einer natürlichen Infektion sind in verschiedenen Geweben und Organen, wie zum Beispiel in

der Speicheldrüse, morphologisch veränderte Zellen zu finden. Diese werden aufgrund ihres charakteristischen Aussehens nach histologischen Färbungen „Eulenaugenzellen“ genannt. Auf Organebene scheint die HCMV-Replikation mit funktionellen Störungen einherzugehen. Zu den Störungen tragen aber wohl auch entzündliche Prozesse bei, die begleitend zur HCMV-Infektion auftreten [zusammengefasst in (Britt, 2007b; Landolfo *et al.*, 2003)].

1.2 Klinische Bedeutung

Die HCMV-Infektion verläuft in der Regel asymptomatisch, da die Virusreplikation durch das Immunsystem effektiv kontrolliert werden kann. Die Infektion geht in der Folge in eine latente Phase über und bleibt so lebenslang bestehen. Aus der Latenz kommt es sporadisch zu Reaktivierungen der Virusreplikation, wodurch immer wieder infektiöse Virionen produziert und freigesetzt werden. Die Ausscheidung von infektiösen Virionen während einer Primärinfektion, einer Reaktivierung oder auch einer Reinfektion erfolgt über verschiedene Körperflüssigkeiten, wie zum Beispiel Speichel, Urin oder auch Muttermilch. Dadurch kann die HCMV-Infektion sowohl horizontal als auch vertikal übertragen werden. HCMV ist eines der am weitesten verbreiteten Pathogene und erreicht in Asien und Afrika eine Durchseuchung von bis zu 100% [zusammengefasst in (Boppana and Fowler, 2007; Landolfo *et al.*, 2003)].

Bei Menschen mit eingeschränkter Immunabwehr kann die Infektion mit HCMV schwere Erkrankungen hervorrufen. So kann eine HCMV-Infektion von immunsupprimierten Transplantations-Patienten zum Verlust des Transplantats beitragen. Auch die Folgen einer intrauterinen, embryofetalen Infektion können aufgrund des unreifen Immunsystems gravierend sein. Die kongenitale HCMV-Infektion ist die führende Ursache für Geburtsdefekte wie mentale Retardierung und Taubheit [zusammengefasst in (Heineman, 2007; Landolfo *et al.*, 2003)].

Derzeit sind für den Einsatz bei ernsten oder lebensbedrohlichen HCMV-Infektionen von immungeschwächten Patienten Hemmer der viralen DNA-Polymerase (UL54), wie zum Beispiel Ganciclovir, zugelassen. Diese Medikamente führen zwar zu einer Verbesserung der klinischen Symptome, können aber die Infektion nicht eliminieren. Zudem ist ihr Einsatz zum Beispiel durch ihre Toxizität und das Auftreten von Resistenzen beschränkt. In einem präventiven Behandlungsansatz von Transplantations-Patienten, bei dem die Behandlung eingeleitet wird, sobald die Infektion mit sensitiven Tests nachgewiesen wird, aber bevor Krankheitssymptome

einsetzen, sind diese Medikamente dennoch durchaus erfolgreich [zusammengefasst in (Griffiths and Boeckh, 2007; Landolfo *et al.*, 2003)]. Bezüglich kongenitalen Infektionen sind diese Medikament aber kaum nützlich. Hier könnte ein HCMV-Impfstoff sehr hilfreich sein, der die Infektion in der Schwangerschaft und somit auch die Infektion der ungeborenen Kinder verhindert. Ein HCMV-Impfstoff ist aber derzeit nicht verfügbar [zusammengefasst in (Heineman, 2007)].

1.3 Immunreaktion

HCMV ruft eine ausgeprägte Reaktion des Immunsystems hervor. Durch die Immunreaktion wird während einer akuten Infektion sowohl die Ausbreitung des Virus im Organismus als auch die Virusreplikation begrenzt und während der latenten Infektionsphase das Auftreten von Reaktivierungen limitiert.

1.3.1 Angeborene Immunantwort

Dringt HCMV in eine Zelle ein, so werden Bestandteile des Virions durch Sensoren, wie zum Beispiel *Toll-like* Rezeptoren (TLRs), als Zell-fremde *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) erkannt. Dies hat die Aktivierung der Faktoren IRF3 und NF B zur Folge, die die Induktion und Sekretion von Typ-I-Interferonen (IFN- und -) und anderen proinflammatorischen Zytokinen vermitteln [zusammengefasst in (Marshall and Geballe, 2009)].

Typ-I-Interferone versetzen Zellen in einen antiviralen Zustand [zusammengefasst in (Sadler and Williams, 2008)]. Die Expression verschiedener Proteine wird induziert, die für einen viralen Replikationszyklus hinderlich sind. Zu diesen Proteinen gehört die Proteinkinase RNA (PKR). Sie wird in der Regel durch doppelsträngige RNA aktiviert, die auch in HCMV-infizierten Zellen zu finden ist (Marshall *et al.*, 2009). Die PKR inhibiert die allgemeine, vom 5'-Cap der mRNA abhängige Proteinsynthese durch Phosphorylierung eines der an der Translationsinitiation beteiligten Faktoren [zusammengefasst in (Saunders and Barber, 2003)]. Da Viren im Rahmen ihres Replikationszyklus den zellulären Proteinsynthese-Apparat für die Herstellung ihrer Proteine nutzen, wirkt sich eine derartige Blockade der Proteinsynthese störend auf ihre Replikation aus.

Durch die sezernierten proinflammatorischen Zytokine werden zudem Zellen der angeborenen Immunantwort an den Infektionsort rekrutiert und aktiviert. Zu ihnen gehören natürliche Killerzellen (NK-Zellen), die zur Kontrolle der HCMV-Infektion

beitragen. Außerdem wird die Expression von kostimulatorischen Molekülen wie CD80 und CD86 auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen (*antigen presenting cells*, APCs) verstärkt, die der Aktivierung der adaptiven Immunantwort dienen [zusammengefasst in (Crough and Khanna, 2009)].

1.3.2 Adaptive Immunantwort

Die adaptive Immunantwort kann lebenslang die HCMV-Replikation kontrollieren und vor schweren Folgeerkrankungen schützen. Die humorale Immunantwort kann durch neutralisierende Antikörper, die gegen die Glykoproteine der Virionhülle gerichtet sind, die Ausbreitung des Virus einschränken [zusammengefasst in (Crough and Khanna, 2009; Landolfo *et al.*, 2003)].

Die Zellen der adaptiven Immunantwort übernehmen wohl die Hauptfunktion in der Kontrolle der HCMV-Infektion. CD4-positive Zellen tragen nicht nur zur Induktion der humoralen Immunantwort bei, sondern scheinen auch eine direkte Funktion bei der Eliminierung von infizierten Zellen zu übernehmen. Dennoch üben CD8-positive zytotoxische T-Zellen (*cytotoxic T lymphocytes*, CTLs) wohl die wesentliche Rolle bei der Kontrolle der viralen Infektion aus [zusammengefasst in (Crough and Khanna, 2009; Reddehase, 2002)]. Sie können HCMV-infizierte Zellen anhand von viralen Peptiden erkennen, die diese auf ihrer Oberfläche durch Moleküle des *major histocompatibility complex class I* (MHC-I) präsentieren. CTLs beschränken während der akuten Phase der Infektion die virale Replikation und schützen während der Latenz vor Reaktivierungen (Steffens *et al.*, 1998).

Der Mechanismus der MHC-I-vermittelten Antigenpräsentation besteht aus mehreren Schritten (Abb. 3). Zunächst assoziieren im Endoplasmatischen Retikulum (ER) neu synthetisierte schwere Ketten (*heavy chains*, HCs) des MHC-I mit dem Chaperon-Protein Calnexin. Dieses Protein hält die HCs in einem partiell gefalteten Zustand, bis β_2 -Mikroglobulin (β_2m) an sie bindet. Die MHC-I-Moleküle lösen sich dann von Calnexin und bilden mit anderen Chaperon-Proteinen, wie Calreticulin und Erp57, sowie Tapasin und einem Peptid-Transporter (*transporter associated with antigen processing*, TAP) den Peptidladekomplex (PLC). Das TAP-assoziierte Protein Tapasin fungiert dabei als Brücke zwischen MHC-I-Molekül und TAP und ermöglicht so die Beladung der MHC-I-Moleküle mit Peptiden, die mittels TAP ATP-abhängig aus dem Zytoplasma ins ER transportiert werden [zusammengefasst in (Janeway *et al.*, 2005)]. Bei der Beladung werden Peptide bevorzugt, die hochaffin an MHC-I-Moleküle binden, wodurch das Repertoire der präsentierten Peptide optimiert wird. Dabei spielt sowohl

eine zusätzliche, katalytische Funktion von Tapasin eine Rolle, als auch eine weitere Komponente des PLC, die Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) (Park *et al.*, 2006).

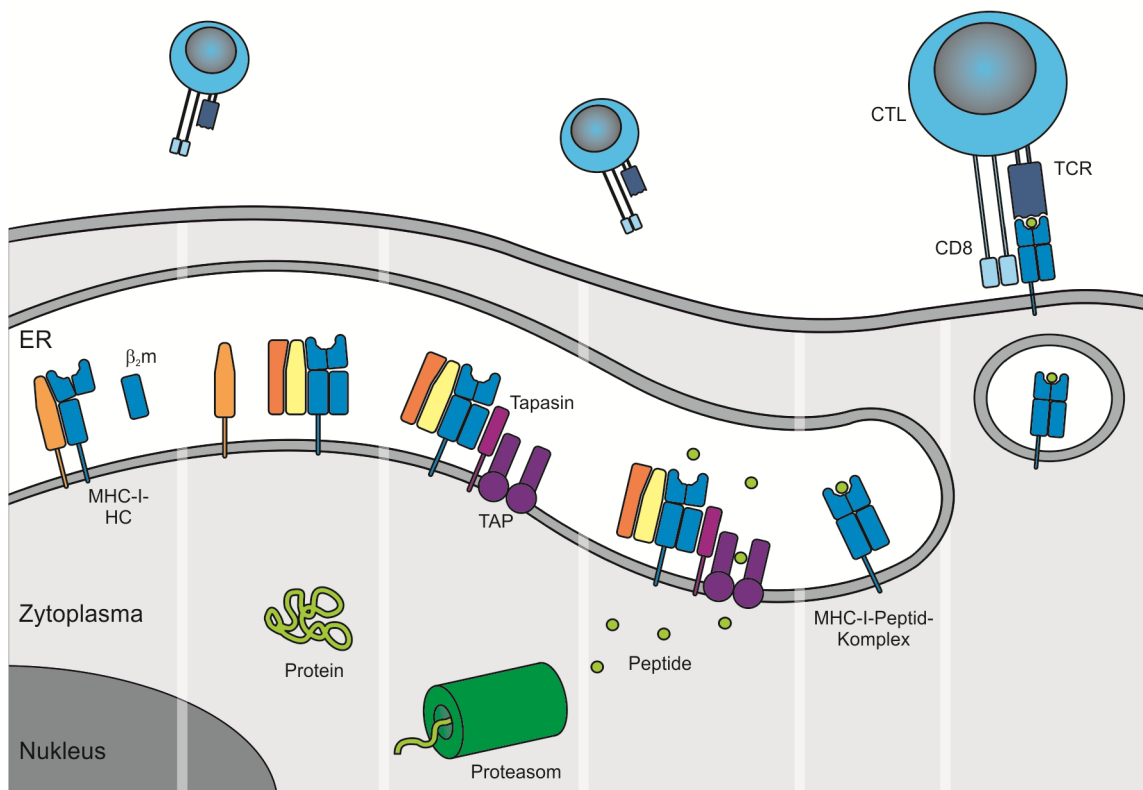


Abb. 3: Schematische Darstellung der MHC-I-vermittelten Antigenpräsentation

Zytoplasmatische Proteine werden durch das Proteasom in Peptide degradiert. Diese werden mit Hilfe des TAP-Transporters ins ER transportiert und dort in einem Proteinkomplex auf MHC-I-Moleküle geladen. Die MHC-I-Moleküle wurden zuvor mit Hilfe von verschiedenen Chaperon-Proteinen aus MHC-I-HCs und β_2m -Molekülen zusammengesetzt.

[Darstellung modifiziert nach (Janeway *et al.*, 2005)]

Peptide werden im Zytoplasma durch die proteasomale Degradation von Proteinen hergestellt. Die Proteine können dabei sowohl zellulären Ursprungs sein als auch von Pathogenen, wie zum Beispiel Viren, stammen, die in das Zytoplasma der Zelle eingedrungen sind (Riddell *et al.*, 1991; Yewdell *et al.*, 1988). Um eine optimale Länge für das Laden auf MHC-I-Moleküle zu erreichen, können die Peptide durch Aminopeptidasen sowohl direkt im Zytoplasma (Reits *et al.*, 2004; Stoltze *et al.*, 2000) als auch nach ihrem Transport ins ER-Lumen (Saric *et al.*, 2002; Saveanu *et al.*, 2005; Serwold *et al.*, 2002) weiter prozessiert werden.

Die MHC-I-Moleküle im ER erlangen durch das Beladen mit geeigneten Peptiden schließlich ihre endgültige Faltung und werden aus dem PLC entlassen. Die MHC-I-Peptid-Komplexe gelangen dann aus dem ER über das Golgi-Netzwerk an die

Zelloberfläche, wo sie von CTLs mit Hilfe ihrer Antigen-spezifischen Rezeptoren (*T cell receptors*, TCRs) detektiert werden können [zusammengefasst in (Janeway *et al.*, 2005)]. Die TCRs HCMV-spezifischer CTLs sind gegen Peptide aus viralen Proteinen gerichtet, die verschiedenste Funktionen in allen Phasen der HCMV-Genexpression wahrnehmen. Zu den immundominantesten Proteinen gehören dabei die IE-Proteine 1 und 2 (IE1 und IE2) sowie das Tegumentprotein pp65 [zusammengefasst in (Crough and Khanna, 2009)].

1.4 Immunevasion

HCMV hat eine Vielzahl von Mechanismen entwickelt, um der Kontrolle bzw. der Eliminierung durch das Immunsystem zu entgehen. Das Virus kodiert in seinem großen Genom für Proteine, die die Wirkung sowohl der angeborenen wie auch der adaptiven Immunantwort beeinträchtigen.

Mehrere HCMV-Proteine greifen in die Signalwege der IFN-Antwort ein. Angriffspunkte sind hier sowohl die Aktivierung der IFN-Antwort selbst wie auch die durch IFN induzierten Signalwege. Daran sind neben Virion-assoziierten Proteinen, wie pp65 (Abate *et al.*, 2004; Browne and Shenk, 2003), auch neu synthetisierte Proteine, wie IE2 (Taylor and Bresnahan, 2006a), beteiligt. Auch die Funktionen von IFN-induzierten Proteinen werden durch HCMV-Proteine beeinträchtigt. So verhindert zum Beispiel IRS1/TRS1 die Aktivierung des PKR-Signalwegs (Child *et al.*, 2004).

Im Zuge der adaptiven Immunantwort spielt die MHC-I-vermittelte Antigenpräsentation für die Kontrolle der HCMV-Infektion durch CTLs eine zentrale Rolle. HCMV greift hier mit verschiedenen Mechanismen an unterschiedlichen Stellen ein, um infizierte Zellen vor der Erkennung durch CTLs zu schützen. Im ER unterbinden mehrere Proteine der Genregion von US2 bis US11 auf unterschiedliche Weisen die Bildung des MHC-I-Peptidkomplexes [zusammengefasst in (Gewurz *et al.*, 2007)]. Wie erst kürzlich gezeigt wurde, behindert HCMV aber auch auf Ebene der Proteinexpression die MHC-I-Antigenpräsentation, indem es über einen noch zu identifizierenden Mechanismus die Transkription von PLC-Bestandteilen, insbesondere Tapasin, reduziert (Halenius 2011). Zusätzlich wurde auch den in den Virionen enthaltenen Proteinen pp65 und pp71 ein inhibitorischer Einfluss auf die MHC-I-Präsentation zugeschrieben (Gilbert *et al.*, 1996; Trgovcich *et al.*, 2006).

1.4.1 Die HCMV-Proteine der US2-11-Genregion

Die Interferenz von HCMV mit der MHC-I-vermittelten Antigenpräsentation resultiert in der Reduktion der Expression von MHC-I-Molekülen auf der Oberfläche infizierter Zellen. Nach der Infektion mit einer HCMV-Mutante, in der die Genregion von US2 bis US11 deletiert ist, unterbleibt diese Reduktion (Jones *et al.*, 1995). In der US2-11-Region sind die Gene von acht Membran-Glykoproteinen lokalisiert [zusammengefasst in (Davison and Bhella, 2007)]. GpUS2, gpUS3, gpUS6 und gpUS11 reduzieren über ausführlich untersuchte Mechanismen die MHC-I-Oberflächenexpression. Die Funktion der restlichen Proteine der US2-11-Region hingegen ist noch nicht endgültig geklärt.

1.4.1.1 GpUS2, gpUS3, gpUS6 und gpUS11 – die „klassischen“ Immunevasine

Die Proteine gpUS2, gpUS3, gpUS6 und gpUS11 werden aufgrund ihrer Funktion auch Immunevasine genannt. Ihre Aktivität konnte bei der Infektion von verschiedenen Zelltypen, wie Fibroblasten, Epithelzellen und dendritischen Zellen (DCs), nachgewiesen werden (Benz *et al.*, 2001; Jones *et al.*, 1995; Schempp *et al.*, 2011). Sie sind in der ER-Membran verankert und greifen an verschiedenen Stellen in den Zusammenbau des MHC-I-Peptidkomplexes ein. Ihre Expression erfolgt sequentiell und deckt den gesamten Zeitraum der viralen Genexpression ab (Abb. 4).

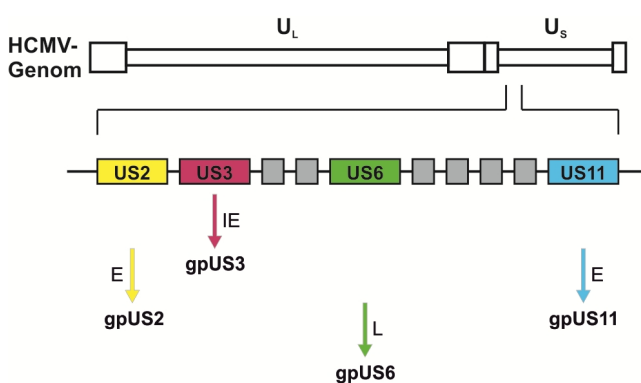


Abb. 4: Schematische Darstellung der Expression der „klassischen“ Immunevasine

Die „klassischen“ Immunevasine gpUS2, gpUS3, gpUS6 und gpUS11 werden im Verlauf der Infektion nacheinander exprimiert. Zunächst wird in der *immediate early* (IE)-Phase gpUS3 exprimiert, dann in der *early* (E)-Phase gpUS2 sowie gpUS11 und schließlich in der *late* (L)-Phase gpUS6.

Als erstes der vier Immunevasine wird in der IE-Phase der Infektion ein 22 kDa-Protein vom Gen US3 exprimiert. Von diesem Gen werden durch alternatives Spleißen zusätzlich Transkripte für ein 17 kDa-Protein und, laut Vorhersagen, für ein 3,5 kDa-Protein abgelesen. Nur das 22 kDa-Protein hat eine immunevasive Funktion und wird im folgenden gpUS3 genannt [zusammengefasst in (Liu *et al.*, 2009)]. Die Transkription von gpUS3 unterliegt einer strengen Regulation durch ein ganzes Netzwerk an Proteinen. Sie erreicht drei Stunden nach Infektion ihr Maximum und wird fünf Stunden nach Infektion wieder nahezu vollständig eingestellt (Liu *et al.*, 2002). Das

gpUS3-Protein hat eine Halbwertszeit von weniger als 60 Minuten und ist in infizierten Zellen in etwa demselben Zeitraum wie sein Transkript nachweisbar (Ahn *et al.*, 1996; Jones *et al.*, 1996). gpUS3 bindet sowohl an MHC-I-HCs als auch an Tapasin und PDI und interferiert mit den Funktionen dieser beiden PLC-Komponenten (Abb. 5). Durch die Bindung an Tapasin beeinflusst gpUS3 vermutlich dessen Konformation und inhibiert die katalytische Funktion von Tapasin bei der Optimierung des Peptid-Repertoires. Die brückenbildende Funktion von Tapasin zwischen MHC-I-Molekül und TAP wird hingegen durch gpUS3 nicht blockiert (Park *et al.*, 2004). Der Funktion von PDI wirkt gpUS3 vermutlich entgegen, indem es dessen Degradation vermittelt (Park *et al.*, 2006). Aufgrund dieser gpUS3-vermittelten Inhibition der beiden PLC-Komponenten können MHC-I-Moleküle nicht mehr mit Peptid beladen werden und verbleiben daher im ER. Der immunevasiven Funktion von gpUS3 wirkt das 17 kDa-US3-Protein kompetitiv entgegen. Dieses Protein unterscheidet sich von gpUS3 nur durch das Fehlen der Transmembran-Region. Es bindet zwar an Tapasin, aber nicht an MHC-I-HCs und hat selbst keinen Effekt auf die MHC-I-vermittelte Antigenpräsentation (Liu *et al.*, 2002; Shin *et al.*, 2006). Ob das 3,5 kDa-US3-Protein in infizierten Zellen tatsächlich synthetisiert wird und welche Funktion es hat, konnte bisher nicht geklärt werden.

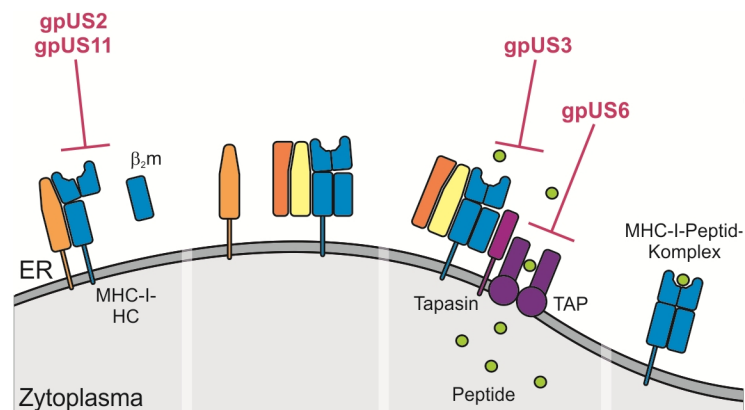


Abb. 5: Schematische Darstellung der Wirkungsmechanismen der „klassischen“ Immunevasine

Die „klassischen“ Immunevasine gpUS2, gpUS3, gpUS6 und gpUS11 greifen an verschiedenen Punkten in die MHC-I-vermittelte Antigenpräsentation ein. GpUS3 behindert die Tapasin-abhängige Beladung von MHC-I-Molekülen mit Peptid. Sowohl gpUS2 als auch gpUS11 vermitteln den Transport von MHC-I-HCs aus dem ER hinaus ins Zytoplasma, wo die HCs in der Folge proteasomal degradiert werden. GpUS6 blockiert den Transport von Peptiden aus dem Zytoplasma ins ER durch den TAP-Transporter.

In der E-Phase der Infektion werden die Immunevasine gpUS2 und gpUS11 exprimiert. Diese beiden Proteine weisen hinsichtlich ihrer Expressionskinetiken und ihren Wirkungsmechanismen einige Ähnlichkeiten auf. Ihre Transkripte sind in infizierten

Zellen rund zwei bis 72 Stunden nach Infektion nachweisbar, wobei ihr Transkriptionsmaximum bei acht Stunden nach Infektion liegt (Jones and Muzithras, 1991; Jones and Sun, 1997). Sowohl gpUS2 als auch gpUS11 stören die MHC-I-vermittelte Antigenpräsentation, indem sie den Transport einzelner MHC-I-HCs oder β_2m -assoziierter MHC-I-HCs aus dem ER und ihre Degradation im Zytoplasma vermitteln (Abb. 5) (Wiertz *et al.*, 1996a; Wiertz *et al.*, 1996b). Dabei unterscheiden sich ihre Mechanismen aber in einigen Details. Beide Proteine nutzen den zellulären Weg zur Entsorgung von fehlgefalteten Proteinen (*ER-associated degradation*, ERAD), bedienen sich dafür aber unterschiedlicher zellulärer Faktoren. Für die gpUS2-vermittelte Degradation ist zum Beispiel die im ER lokalisierte Signalpeptid-Peptidase essentiell, während die gpUS11-vermittelte Degradation von den Proteinen Derlin-1 und Sel1L abhängig ist (Lilley and Ploegh, 2004; Loureiro *et al.*, 2006; Mueller *et al.*, 2006). Außerdem begleitet gpUS2 die MHC-I-HCs bei ihrem Transport aus dem ER, gpUS11 aber nicht (Wiertz *et al.*, 1996b). Ferner binden gpUS2 und gpUS11 MHC-I-HCs an unterschiedlichen Stellen. GpUS2 bindet die HCs an der Verbindung zwischen der peptidbindenden Region der Domänen 1/ 2 und der 3-Domäne (Gewurz *et al.*, 2001), gpUS11 an die 1/ 2-Domänen selbst (Barel *et al.*, 2003). Die Effektivität der Bindung und der anschließenden proteasomalen Degradation von MHC-I-HCs durch gpUS2 bzw. gpUS11 wird durch das jeweilige Allel der MHC-I-HCs bestimmt [zusammengefasst in (Gewurz *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2007)]. Außerdem sind die immunevasiven Mechanismen von gpUS2 und gpUS11 abhängig vom Typ der infizierten Zellen. In DCs ist der Mechanismus von gpUS11 bei der Degradation von MHC-I-HCs effizienter als der Mechanismus von gpUS2 (Rehm *et al.*, 2002). Auch der Typ des präsentierten Peptids kann den Wirkungsgrad der Mechanismen beeinflussen. Die Präsentation eines pp65-Peptids erwies sich als resistenter gegen die gpUS2- und gpUS11-vermittelte Immunevasion als die Präsentation eines IE1-Peptids (Besold *et al.*, 2009).

Als letztes Immunevasin wird gpUS6 in der L-Phase der Infektion exprimiert. Transkripte des US6-Gens sind in infizierten Zellen ab acht Stunden nach Infektion nachweisbar (Jones and Muzithras, 1991). GpUS6 bindet an TAP und inhibiert dessen Transporterfunktion (Abb. 5). Die Transporterfunktion wird initiiert, wenn Peptid an den zytoplasmatischen Teil von TAP bindet. Die Bindung hat eine Konformationsänderung der TAP-Untereinheiten zur Folge, die wiederum die Hydrolyse des an die Untereinheiten gebundenen ATPs auslöst und so den Peptidtransport aktiviert (Gorbulev *et al.*, 2001). GpUS6 verhindert durch Interaktion mit der TAP1-Untereinheit

im ER-Lumen die für die ATP-Hydrolyse notwendige Konformationsänderung und blockiert so den Peptidtransport (Hewitt *et al.*, 2001).

Da die vier HCMV-Immunevasine gpUS2, gpUS3, gpUS6 und gpUS11 für die Störung der MHC-I-vermittelten Antigenpräsentation unterschiedliche Mechanismen nutzen, erscheint eine Kooperation der Immunevasine möglich. Auf der einen Seite ist es denkbar, dass sich deren Mechanismen im Infektionsverlauf über die Zeit ergänzen. So vermuteten Ahn und Kollegen, dass während der IE-Phase einer HCMV-Infektion MHC-I-Moleküle durch gpUS3 im ER angesammelt werden und diese MHC-I-Moleküle dann in der E-Phase mit Hilfe von gpUS11 degradiert werden (Ahn *et al.*, 1996). Sie verwendeten für ihre Analysen sowohl Zellen, die gpUS3 oder gpUS11 nach Transfektion exprimierten, als auch Zellen, die mit einem Wildtyp (WT)-HCMV-Stamm infiziert worden waren. In Übereinstimmung mit der Vermutung von Ahn und Kollegen konnten Jones und Sun durch die Infektion von gpUS3-exprimierenden Zellen mit verschiedenen HCMV-Mutanten zeigen, dass sowohl gpUS2 als auch gpUS11 die Degradation von MHC-I-HCs vermitteln können, die durch gpUS3 im ER zurückgehalten werden (Jones and Sun, 1997). Laut diesem Modell übernehmen die Immunevasine also entsprechend ihrer Expressionskinetik im Infektionsverlauf aufeinanderfolgend die Inhibition der Antigenpräsentation. Auf der anderen Seite ist es auch möglich, dass die Immunevasine in den Zeiträumen, in denen sich ihre Expression überschneidet, direkt zusammenwirken. Noriega und Tortorella konnten bei gleichzeitiger Expression von gpUS2 und gpUS3 in transfizierten Zellen eine verstärkte Inhibition der Antigenpräsentation im Vergleich zu Transfektionsansätzen mit gpUS2 oder gpUS3 alleine feststellen (Noriega and Tortorella, 2009). Sie beobachteten, dass gpUS3 die Bindung zwischen gpUS2 und MHC-I-HCs intensiviert und so die gpUS2-vermittelte Degradation von MHC-I-Molekülen steigerte. Ob eine solche direkte Kooperation von gpUS3 und gpUS2 aber auch in infizierten Zellen eine Rolle spielt, in denen die Dauer der gleichzeitigen Expression begrenzt ist, ist noch offen. Generell gibt es bisher an HCMV-infizierten Zellen nur sehr wenige Untersuchungen zur individuellen Rolle der Immunevasine und zu ihrem möglichen Zusammenspiel. Eine Strategie für solche Untersuchungen ist der Einsatz von HCMV-Mutanten, die in infizierten Zellen jeweils nur eines der Immunevasine exprimieren. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass gpUS2 oder gpUS11 alleine jeweils nur einen begrenzten Einfluss auf die Antigenpräsentation infizierter Zellen haben. Auch die Inhibition der Antigenpräsentation in Zellen, die nach einer Koinfektion mit den jeweiligen Mutanten sowohl gpUS2 als auch gpUS11 exprimierten, war nicht voll ausgeprägt (Besold *et al.*,

2009). Diese Ergebnisse deuteten erneut auf ein Zusammenspiel der verschiedenen Mechanismen von gpUS2, gpUS3, gpUS6 und gpUS11 in der HCMV-Immunevasion hin, wobei hier noch erheblicher Untersuchungsbedarf bestand.

1.4.1.2 GpUS7, gpUS8, gpUS9 und gpUS10

Die Gene US7, US8, US9 und US10 gehören zur US6-Familie (Chee *et al.*, 1990; Weston and Barrell, 1986). Ihre Proteine bewirken aber, trotz ihrer Homologien zu gpUS6, keine Reduktion der Oberflächenexpression von klassischen MHC-I-Molekülen (Ahn *et al.*, 1997). GpUS7, gpUS9 und gpUS10 sind im ER lokalisiert. GpUS8 ist zusätzlich zum ER auch im Golgi-Apparat und im *trans*-Golgi-Netzwerk zu finden (Huber *et al.*, 2002; Tirabassi and Ploegh, 2002). Im Gegensatz zu den vier bekannten Immunevasinen der US2-11-Region sind die Funktionen von gpUS7, gpUS8, gpUS9 und gpUS10 noch relativ unerforscht.

Sowohl gpUS8 als auch gpUS10 binden im ER an MHC-I-HCs. Für die Bindung von gpUS8 an die HCs sind aber keine Konsequenzen für den Zusammenbau der MHC-I-Peptid-Komplexe bekannt (Tirabassi and Ploegh, 2002). Die Bindung von gpUS10 an die HCs verlangsamt die Reifung der MHC-I-Komplexe, hat aber keine detektierbare Auswirkung auf die Expression von klassischen MHC-I-Molekülen auf der Oberfläche von infizierten Zellen (Furman *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 1995). Allein für die Expression des nicht-klassischen MHC-I-Moleküls HLA-G konnte kürzlich eine inhibierende Wirkung von gpUS10 gezeigt werden (Park *et al.*, 2010). Demnach vermittelt gpUS10 die Degradation von HLA-G-Molekülen und nimmt so vermutlich Einfluss auf den Aktivierungszustand von NK-Zellen und deren Zytokinproduktion.

Interaktionen von gpUS7 oder gpUS9 mit MHC-I-Molekülen sind bisher nicht bekannt. Für gpUS9 wurde eine Rolle in der HCMV-Übertragung von Zelle zu Zelle vermutet, was aber noch kontrovers diskutiert wird (Huber *et al.*, 2002; Maidji *et al.*, 1996; Pereira *et al.*, 1995). Zusätzlich scheint für gpUS9 eine Rolle in der Regulation der apoptotischen Signalwege infizierter Zellen möglich, da es ein Lokalisationssignal für Mitochondrien enthält (Mandic *et al.*, 2009). Die Funktion von gpUS7 ist vollkommen ungeklärt. Seit kurzem ist aber bekannt, dass seine Expression durch zwei virale microRNAs, miR-US5-1 und -2, posttranskriptional reguliert wird (Tirabassi *et al.*, 2011).

Neben miR-US5-1 und -2 wird in der US2-11-Region noch eine dritte microRNA, miR-US4-1, kodiert. Erst kürzlich wurde beobachtet, dass diese microRNA die Expression der ER-Aminopeptidase 1 (ERAP1) reduziert (Kim *et al.*, 2011). Dadurch

behindert miR-US4-1 die Prozessierung und MHC-I-vermittelte Präsentation verschiedener viraler Peptide und trägt so zur HCMV-Immunevasion bei.

1.4.2 Die HCMV-Proteine pp65 und pp71

Nur bei zwei außerhalb der US2-11-Genregion kodierten Proteinen wurde bisher ein immunevasiver Effekt auf die MHC-I-vermittelte Antigenpräsentation beobachtet. Dabei handelt es sich um die beiden Tegumentproteine pp65 und pp71, die von den benachbarten Genen UL83 und UL82 kodiert werden. Da diese beiden Proteine mit den Virionen in die Zellen gelangen, könnten sie schon vor dem Start der viralen Genexpression die MHC-I-Antigenpräsentation der infizierten Zellen beeinträchtigen. So könnten sie zum Beispiel die Präsentation von viralen Peptiden verhindern, die von Proteinen der HCMV-Virionen stammen.

Laut Gilbert und Kollegen behindert pp65 selektiv die Präsentation von Peptiden des IE1-Proteins, indem es IE1 phosphoryliert und so die Produktion von IE1-Peptiden beeinträchtigt (Gilbert *et al.*, 1996). Für pp71 wurde beobachtet, dass es, wie die gpUS2-11-Immunevasine, die Expression von MHC-I-Molekülen auf der Zelloberfläche reduziert (Trgovcich *et al.*, 2006). Diese Reduktion konnte bisher jedoch nur in humanen Glioblastomzellen gezeigt werden, der zugrundeliegende Mechanismus wurde bislang nicht aufgeklärt.

Im Vergleich zu den gpUS2-11-Immunevasinen ist über die immunevasiven Funktionen von pp65 und pp71 nur wenig bekannt. Nach den ersten Publikationen zu den immunevasiven Effekten von pp65 und pp71 fehlen bislang weitere Veröffentlichungen, in denen die zugrunde liegenden Mechanismen weiter aufgeklärt und die Effekte im Verlauf einer HCMV-Infektion näher beleuchtet worden wären. So ist zum Beispiel noch offen, mit welcher Kinetik die Effekte im Infektionsverlauf auftreten, ob es ein Zusammenspiel mit der durch gpUS2-11 vermittelten Immunevasion gibt und ob die immunevasiven Mechanismen von pp65 und pp71 in allen Zelltypen wirken.

Neben einem möglichen Einfluss auf MHC-I werden pp65 immunevasive Funktionen in Bezug auf MHC-II (Odeberg *et al.*, 2003), NK-Zellaktivierung (Arnon *et al.*, 2005) und IFN-Signaltransduktion [zusammengefasst in (Kalejta, 2008; Marshall and Geballe, 2009)] zugeschrieben. Daneben legen neuere Daten nahe, dass pp65 an der Regulation des nukleären Exports viraler mRNAs beteiligt ist (Becke *et al.*, 2010). Für die Virusreplikation in einer Fibroblasten-Kultur ist pp65 allerdings nicht essentiell (Schmolke *et al.*, 1995). Im Gegensatz zu pp65 wird pp71 für eine effiziente

Virusreplikation in Fibroblasten-Kultur benötigt. Ein Grund dafür ist seine Rolle als Transaktivator der IE-Genexpression. Pp71 vermittelt im Zellkern die proteasomale Degradation des zellulären Proteins Daxx. Dieses Protein rekrutiert Histon-Deacetylasen (HDACs) an bestimmte Promotoren, unter anderem auch an den HCMV Haupt-IE-Promotor (*major IE promotor*, MIEP). Dadurch kommt es zur Repression der Genexpression. Durch die pp71-vermittelte Degradation von Daxx wird die Repression des MIEP aufgehoben und die MIEP-kontrollierten IE-Gene werden transkribiert (Saffert and Kalejta, 2006). Über die Lokalisation von pp71 in infizierten Zellen wird möglicherweise der Übergang zwischen Phasen mit aktiver Virusreplikation und latenten Infektionsphasen gesteuert. In latenten Phasen könnte der Transport von pp71 in den Zellkern unterbrochen sein, so dass die virale Genexpression durch Daxx reprimiert wird. Ferner beeinflusst pp71 als eines von mehreren HCMV-Proteinen den Zellzyklus von infizierten Zellen. Es fördert den Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus, unter anderem indem es die proteasomale Degradation von Proteinen der Retinoblastom-Familie vermittelt [zusammengefasst in (Kalejta, 2008)].

Von der Region der pp65- und pp71-Gene UL83 und UL82 werden zwei mRNAs abgelesen (Abb. 6). Eine abundante, bizistronische mRNA von 4 kb kodiert beide Leserahmen. Dabei ist UL82 3'-terminal zu UL83 angeordnet. Eine weitere, weniger abundante mRNA von 1,9 kb kodiert ausschließlich UL82. Sie ist mit der RNA von 4 kb koterminale. Es gibt experimentelle Hinweise, dass von der bizistronischen RNA tatsächlich sowohl pp65 als auch pp71 translatiert werden (DalMonte *et al.*, 1996; Rürger *et al.*, 1987). Ein abschließender Beweis dafür steht jedoch noch aus.

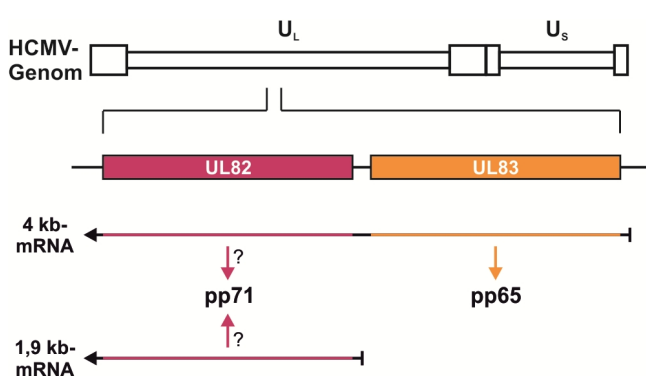


Abb. 6: Schematische Darstellung der Expression von pp65 und pp71

Die Proteine pp65 und pp71 werden von zwei benachbarten Genen kodiert: UL83 bzw. UL82. Von dieser Genregion werden zwei mRNAs abgelesen. Die mRNA von 4 kb kodiert für beide Leserahmen, während die mRNA von 1,9 kb nur den Leserahmen UL82 für pp71 kodiert. Von welcher der beiden mRNAs pp71 in infizierten Zellen tatsächlich translatiert wird, ist unklar.

Sollte pp71 in der Tat von der 4 kb-mRNA translatiert werden, dann wäre dafür ein 5'-Cap-unabhängiger Mechanismus zu postulieren. Eine Konsequenz einer solchen Cap-unabhängigen Expression ist die besondere Regulation der Proteinsynthese unter Bedingungen, bei denen die konventionelle Cap-abhängige Translation nur

eingeschränkt funktioniert. Dies ist unter anderem dann der Fall, wenn die Zelle äußeren Bedingungen ausgesetzt ist, die zu Zellstress führen [zusammengefasst in (Spriggs *et al.*, 2008)]. Derartige Einflüsse sind zum Beispiel Hypoxie, Nährstoffmangel, oder auch eine Virusinfektion [zusammengefasst in (Buchkovich *et al.*, 2008; Holcik and Sonenberg, 2005)]. Eine Reaktion auf solche Stress-Signale ist die Einschränkung von Energie-intensiven Prozessen, zu denen die *Cap*-abhängige Proteinsynthese gehört [zusammengefasst in (Buchkovich *et al.*, 2008)].

Dies kann über diverse Signalwege und Effektormoleküle geschehen. Häufig spielen dabei Proteinkinasen eine Rolle, die ähnlich wie die durch IFN-induzierte PKR (siehe 1.3.1) durch Phosphorylation die *Cap*-abhängige Translationsinitiation inhibieren. Wegen dieser Inhibition tritt dann die Synthese von Proteinen in den Vordergrund, deren Translation mit Hilfe von alternativen, *Cap*-unabhängigen Strategien intern initiiert wird [zusammengefasst in (Spriggs *et al.*, 2008)]. Solche Proteine dienen bei Zellstress unter anderem der Regulation von Sterben oder Überleben der Zellen [zusammengefasst in (Holcik and Sonenberg, 2005)].

Für das HCMV-Protein pUL138 konnte kürzlich eine Translation von einem Leserahmen nachgewiesen werden, der 3'-terminal auf polyzistronischen mRNAs angeordnet ist (Grainger *et al.*, 2010). Gleichzeitig wurde als Konsequenz dieser polyzistronischen Kodierung auch die Induktion der Synthese von pUL138 unter Zellstress-Bedingungen gezeigt. Derartige Analysen waren für pp71 aber bisher noch nicht durchgeführt worden.

1.5 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Eine HCMV-Infektion kann bei Menschen mit unreifem oder geschwächtem Immunsystem zu schweren Erkrankungen führen (siehe 1.2). Selbst bei Gesunden wird die Infektion zwar kontrolliert, aber nicht eliminiert. Die Etablierung von Latenz wird vermutlich durch die ausgeprägte HCMV-Immunevasion ermöglicht (siehe 1.4). Daher ist es in Hinblick auf die Entwicklung von effektiven Behandlungsmethoden und HCMV-Impfstoffen von großem Interesse, die Immunevasions-Mechanismen des Virus zu verstehen. So könnten zum Beispiel virale Antigene bestimmt werden, deren Präsentation von den Immunevasions-Mechanismen nicht gestört wird, und die daher als Zielstrukturen für Impfstoffe geeignet sein könnten. Weiterhin könnte das Verständnis der Immunevasions-Mechanismen dazu beitragen, Wirkstoffe zu identifizieren, die die HCMV-Immunevasion hemmen. Mit solchen Wirkstoffen könnte

man das humane Immunsystem dabei unterstützen, eine bestehende HCMV-Infektion zu bekämpfen. Von besonderem Interesse sind dabei sicherlich die Mechanismen der Interferenz mit der MHC-I-vermittelten Antigenpräsentation, die die infizierten Zellen vor der Eliminierung durch CTLs schützen.

1.5.1 Immunevasive Funktion von pp71 in HCMV-infizierten Fibroblasten

Im ersten Teil der Arbeit sollte der Einfluss des HCMV-Tegumentproteins pp71 auf die MHC-I-vermittelte Antigenpräsentation HCMV-infizierter Fibroblasten untersucht werden. Als Tegumentprotein könnte pp71 sowohl direkt nach Viruseintritt als auch später im Infektionsverlauf nach seiner Neusynthese zur HCMV-Immunevasion beitragen.

Fibroblasten sind natürliche Zielzellen der HCMV-Replikation (Sinzger *et al.*, 1995). Sie stellen daher ein repräsentatives Zellkulturmodell der Infektion dar. Anhand dieser Zellen sollte die Frage beantwortet werden, ob bzw. wie pp71 an der MHC-I-Immunevasion beteiligt ist. Hierzu sollten in der vorliegenden Arbeit Fibroblasten *in vitro* mit HCMV-Mutanten infiziert werden, die sich in der Expressionsstärke von pp71 unterscheiden. Vergleichend sollten in den infizierten Zellen Unterschiede bei der MHC-I-Antigenpräsentation in Abhängigkeit von der pp71-Expressionsstärke herausgearbeitet werden. Zu diesem Zweck mussten zunächst HCMV-Mutanten identifiziert werden, die für die vorgesehenen Experimente geeignet waren. Dafür sollten in dieser Arbeit verschiedene, uns bereits vorliegende HCMV-Mutanten hinsichtlich ihrer pp71-Expression charakterisiert werden. Nach der Auswahl bzw. Herstellung und Etablierung weiterer, geeigneter Mutanten sollte der Einfluss von pp71 auf die MHC-I-vermittelte Antigenpräsentation infizierter Fibroblasten zu verschiedenen Infektionszeitpunkten und mit verschiedenen Analysemethoden untersucht werden.

Parallel hierzu sollte geprüft werden, ob die Expression von pp71 durch Zellstress regulierbar ist. Der Leserahmen UL82 wird von einer abundanten, bizistronischen mRNA kodiert, so dass in der Tat eine *Cap*-unabhängige Translation von pp71 möglich ist. Grundlage der Untersuchungen war die Hypothese, dass die pp71-Translation einer besonderen, vom physiologischen Zustand der infizierten Zellen abhängigen Regulation unterliegt (siehe 1.4.2). Pp71 ist ein unverzichtbares Schlüssel-molekül der HCMV Infektion, dem neben seiner möglichen immunevasiven Wirkung noch eine Reihe weiterer Funktionen bei der Replikation von HCMV zugeschrieben werden. Dem Nachweis einer regulierten Expression dieses Proteins kam daher ein hoher biologischer Stellenwert zu.

1.5.2 Immunevasive Funktionen von gpUS3 in HCMV-infizierten Fibroblasten

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die Rolle des HCMV-Proteins gpUS3 bei der Immunevasion infizierter Fibroblasten beleuchtet werden. Der molekulare Wirkmechanismus von gpUS3 ist bereits, wie auch die Mechanismen der anderen drei „klassischen“ HCMV-Immunevasine gpUS2, gpUS6 und gpUS11, ausführlicher untersucht worden. Der individuelle Beitrag von gpUS3 zur Immunevasion im Infektionsverlauf sowie seine möglichen Wechselwirkungen mit den anderen Immunevasinen sind aber bisher noch kaum aufgeklärt (siehe 1.4.1.1). Um in der vorliegenden Arbeit die Rolle von gpUS3 in der Immunevasion infizierter Fibroblasten zu untersuchen, sollten HCMV-Mutanten eingesetzt werden, die in Voruntersuchungen hergestellt worden waren und nur noch eines der vier „klassischen“ Immunevasine exprimieren. GpUS3 nimmt unter den HCMV-Immunevasinen eine besondere Stellung ein, da es als einziges in der IE-Phase der HCMV-Infektion exprimiert wird und seine Expression zudem strikt reguliert ist. Daher sollte der individuelle Einfluss von gpUS3 auf die MHC-I-vermittelte Antigenpräsentation in Fibroblasten nach Infektion mit der gpUS3-exprimierenden Mutante nicht nur im späteren Infektionsverlauf, sondern insbesondere auch direkt nach der Infektion analysiert werden. Die Wechselwirkungen von gpUS3 mit den anderen drei Immunevasinen hinsichtlich der Hemmung der MHC-I-Antigenpräsentation sollten in Fibroblasten nach gleichzeitiger Infektion mit der gpUS3-Mutante und einer der anderen Immunevasin-Mutanten untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Allgemeine Laborgeräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Analysewaage	BP61	Sartorius, Göttingen
Binokular	SZX-12	Olympus, Hamburg
Brutschrank	B12	Heraeus, Hanau
CO ₂ -Inkubator	Steri-Cult Incubator 3035	Forma Scientific, Marietta, OH, USA
Durchflusszytometer	FACSort	Becton Dickinson, Heidelberg
	Cytomics FC500	Beckman Coulter, Krefeld
Elektroblot-Apparatur	Semidry Blotter	H.Hölzel Laborgeräte, Wörth / Hörlkofen
Elektroporations-Apparatur	Gene Pulser II	Bio-Rad, München
Folienschweißgerät	Polystar 583	Rische & Herforth, Hamburg
Gelapparaturen	DNA-Gelelektrophorese	Von Keutz Labortechnik, Reiskirchen
	Protein-Gelelektrophorese (SE600 Series)	Hoefer / Pharmacia Biotech, Freiburg
Geldokumentation	Bio Doc Analyze live H	Biometra, Göttingen
Heizrührer	RCT Basic und 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

Mikrowelle	M1712N	Samsung, Schwalbach / Ts.
Stromquelle	Electrophoresis Power Supply 600	Pharmacia Biotech, Freiburg
PCR-Cycler	TPersonal Thermocycler	Biometra, Göttingen
pH-Meter	CG 842	Schott, Mainz
Photometer	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
Real Time-Cycler	ABI Prism 7700 Sequence Detector	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
Schüttelinkubator	Cellstar	Nunc, Wiesbaden
	Certomat R mit Certomat H	Sartorius BBI Systems, Melsungen
	MaxQ 4000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Schüttelwasserbad	OLS 200	Grant, Cambridge, GB
Schüttler	HS501 digital	IKA Werke, Staufen
Sterilbank	Herasafe	Heraeus, Hanau
Ultrazentrifuge	Sorvall Combi Plus	Sorvall, Hanau
	Optima L-90K Ultrazentrifuge	Beckman Coulter, Krefeld
UV-Tisch	UVstar 30i, 312 nm	Biometra, Göttingen
	FL-40-M FLUO-LINK (Crosslinking)	Bachofer, Reutlingen
Vortex	MS1 und MS3 Minishaker	IKA Werke, Staufen
Wasserbad mit Thermostat		Memmert, Schwabach
Zentrifugen	Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
	Megafuge 2.0	Heraeus, Hanau

RC5C Plus (Rotoren SLA-1500, SS-34)	Sorvall, Hanau
Tischzentrifuge 5417C	Eppendorf, Hamburg

2.2 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien von Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma (Deisenhofen) bezogen. Zum Ansetzen von Puffern und Lösungen wurde autoklaviertes bidestilliertes Wasser verwendet.

2.3 Bakterien und ihre Kultivierung

2.3.1 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Literatur
<i>E. coli</i> DH10B	F ⁻ araD139 (ara, leu)7697 lacX74 galU galK rpsL deoR ϕ 80dlacZ M15 endA1 nupG recA1 mcrA (mrr hsdRMS mcrBC)	(Grant <i>et al.</i> , 1990)
<i>E. coli</i> EL250	DH10B [<i>c857 (cro-bioA) < > araC-P_{BAD}flpe</i>] ^b	(Lee <i>et al.</i> , 2001)

2.3.2 Medien und Medienzusätze

Luria Bertani (LB)-Medium

10 g Trypton, 5 g Hefe-Extrakt und 5 g NaCl mit H₂O ad 1 l, pH 7,5, autoklavieren

LB-Agarplatten

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

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.

Einfrriermedium

LB-Medium mit 30% Glycerin

Antibiotika

Lagerung bei -20°C

Bezeichnung	Stocklösung	Endkonzentration
Chloramphenicol	34 mg / ml in Ethanol absolut	15 µg / ml
Kanamycin	10 mg / ml in H ₂ O, sterilfiltriert	15 µg / ml

2.3.3 Kultivierung und Kryokonservierung

2.3.3.1 Flüssigkulturen

Zur Anzucht von Bakterien in Flüssigkultur wurde steriles LB-Medium, versetzt mit den gewünschten Antibiotika, mit einer Einzelkolonie oder mit 30 µl einer Glycerinkultur angeimpft und über Nacht auf einem Schüttelinkubator mit 200 rpm bei 32°C (*E. coli* EL250) bzw. 37°C (*E. coli* DH10B) inkubiert.

2.3.3.2 Kultivierung auf Agarplatten

Zur Anzucht von Bakterien auf einer Agarplatte wurden Bakterien aus einer Glycerinkultur mit einer sterilen Impföse auf LB-Agar mit Antibiotikumzusatz ausgestrichen und über Nacht bei 32°C (*E. coli* EL250) bzw. 37°C (*E. coli* DH10B) inkubiert.

2.3.3.3 Kryokonservierung (Glycerinkulturen)

Zur Kryokonservierung von Bakterien wurden Flüssigkulturen mit 30% sterilem Glycerin versetzt und nach sorgfältigem Mischen bei -80°C eingefroren.

2.3.4 Transformation von *E. coli*

2.3.4.1 Herstellung elektrokompetenter *E. coli* EL250

Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Zunächst wurde eine Flüssigkultur von *E. coli* EL250 in 200 ml LB-Medium ohne Zusätze angezogen. Bei einer optischen Dichte (OD) bei 600 nm von 0,6 wurde die Flüssigkultur sofort auf Eis überführt und dort für 15 min inkubiert. Anschließend wurde die Flüssigkultur auf zwei Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und für 10 min mit 6.000 rpm bei 4°C (Zentrifuge RC5C Plus mit Rotor SLA-1500) pelletiert. Für einen Waschschrift wurden die Pellets in 250 ml eiskaltem Wasser resuspendiert und erneut zentrifugiert. Die Pellets wurden dann in insgesamt 5 ml eiskaltem 10% Glycerin vereinigt. Nach erneutem Waschen mit

5 ml 10% Glycerin wurden die pelletierten Bakterien in 3 bis 4 ml 10% Glycerin resuspendiert und in 30 μ l Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

2.3.4.2 Elektroporation kompetenter *E. coli* EL250

Zur Elektroporation wurden 2 bis 10 μ l der zu transformierenden DNA zu 30 μ l elektrokompenten Zellen zugegeben. Nach einer Inkubation für 1 min auf Eis wurde das Gemisch in eine vorgekühlte Küvette überführt. Die anschließende Elektroporation erfolgte mit Pulsbedingungen von 200 μ s, 2,5 kV und 25 μ F. Die elektroporierten Bakterien wurden zur Regeneration in 1 ml vorgewärmtes LB-Medium gegeben und für 1 h bei 32°C im Schüttelinkubator inkubiert.

Materialien

Gene Pulser Küvette

Bio-Rad, München

2.4 Säugerzellen und ihre Kultivierung

Sämtliche Arbeiten wurden, um Kontaminationen mit Mikroorganismen zu vermeiden, an einer sterilen Werkbank unter Verwendung von sterilen Glas- und Plastikwaren durchgeführt. Die Kultivierung aller Zellen erfolgte bei 37°C , einem CO_2 -Gehalt von 5% und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95%. Soweit nicht anders angegeben, wurden die Zellen für 4 bis 5 min mit 1.500 rpm in der Megafuge 2.0 oder für 3 min mit 3.500 rpm in der Kühlzentrifuge 5417R pelletiert.

Die Zellkulturen wurden in regelmäßigen Abständen mittels des „Venor GeM-Mykoplasmen-Detektionskits“ von Minerva Biolabs (Berlin) auf die Kontamination mit Mykoplasmen getestet. Befallene Zellkulturen wurden mit der Antibiotika-Kombination BM Cyclin (Roche, Mannheim) entsprechend der Herstellerangaben behandelt.

Zur Kultivierung von Suspensionszellen und adhärenente Zellen wurden 25, 75 oder 175 cm^2 Zellkulturflaschen, sterile Zellkulturschalen oder 6-, 24-, 48- und 96-Well-Platten von BD Falcon (Heidelberg) oder Greiner Bio-One (Frickenhausen) verwendet. Zur Kultivierung von T-Zell-Klonen wurden 24-Well-Platten von Costar Corning (Wiesbaden) benutzt. Sterile Einmalplastikpipetten wurden von Greiner Bio-One (Frickenhausen) bezogen.

Alle Zellkulturmedien und Mediumzusätze wurden, wenn nicht anders angegeben, von Invitrogen (Karlsruhe) oder PAA (Cölbe) bezogen. Sämtliche Zellkulturmedien enthielten als pH-Indikatorfarbstoff Phenolrot.

Allgemeine Reagenzien

<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i> (PBS)	Invitrogen, Karlsruhe (136 mM NaCl; 26 mM KCl; 8 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,5 mM KH ₂ PO ₄)
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom (Berlin) oder Invitrogen (Karlsruhe), vor Verwendung für 45 min bei 56°C hitzeinaktiviert

2.4.1 Suspensionszellen

Suspensionszellen wurden bei Farbumschlag des im Kulturmedium enthaltenen Phenolrots von Rot nach Gelb je nach Wachstum und Bedarf 1:2 bis 1:4 gesplittet. Das Pelletieren von Suspensionszellen erfolgte für 5 min mit 1.200 rpm in der Megafuge 2.0.

T2 (174 x CEM.T2); ATCC CRL-1992

T2 sind TAP-defiziente Hybride aus humanen B- und T-Zell-Lymphomen. Sie sind HLA-A*0201-positiv (Salter *et al.*, 1985).

Medium

Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium mit 10% FKS, 2 mM L-Glutamin, 50 mg / l Gentamycin und 5 µM -Mercaptoethanol

JA2

JA2 sind stabile Transfektanten der humanen T-Zell-Linie Jurkat [ATCC TIB-152; (Schneider *et al.*, 1977)]. Sie tragen das HLA-A2-Gen (Irwin *et al.*, 1989).

Medium

RPMI 1640 Medium mit 10% FKS, 2 mM L-Glutamin, 50 mg / l Gentamycin, 5 µM -Mercaptoethanol und 280 µg / ml Geneticin (G418; PAA, Cölbe)

2.4.2 Adhärenente Zellen

Adhärenente Zellen wurden bei Konfluenz gesplittet. Dazu wurden die Zellen nach einem Waschschrift mit PBS durch Inkubation in Trypsin-Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA)-

Medium

RPMI 1640 Medium mit 10% FKS, 2 mM L-Glutamin, 50 mg / l Gentamycin und 5 μ M -Mercaptoethanol

2.4.3.1 Restimulierung

Die Kulturen der CTL-Linien wurden einmal pro Woche restimuliert. Dabei wurden sie, um ihre Antigenspezifität zu erhalten, mit neuen Stimulatorzellen versorgt und je nach Wachstum 1:2 bis 1:3 gesplittet.

Für die Restimulierung wurden JA2-Zellen mit 20.000 rad bestrahlt und für 35 Min bei 37°C mit 5 μ g des spezifischen, synthetischen Peptids in Anwesenheit von 5 μ g humanem γ_2 -Mikroglobulin (Sigma, Deisenhofen) beladen. Nach zweimaligem Waschen wurden 5×10^5 peptidbeladene JA2-Zellen, 6×10^6 mit 3.000 rad bestrahlte C57BL/6-Milzzellen und die gewünschte Menge an CTLs in einem Gesamtvolumen von 2 ml in eine Vertiefung einer 6-Well-Platte ausgesät. Je nach Wachstum wurden die Ansätze mit 5 bzw. 10% wachstumsfaktorhaltigem Überstand von Kulturmedium von Lewis-Ratten-Milzzellen versetzt, die mit Concanavalin A (Invitrogen, Karlsruhe) aktiviert worden waren (Irwin *et al.*, 1989).

Peptide

Die verwendeten Peptide wurden von der Firma JPT Peptide Technologies (Berlin) mit einer Reinheit von > 80% synthetisiert und trugen am C-Terminus eine freie Carboxyl-Gruppe. Zur Herstellung von Stocklösungen wurden sie entweder in H₂O alleine oder in einem 1:1 Gemisch aus H₂O und Dimethylsulfoxid (DMSO) in Lösung gebracht.

Protein	Aminosäureposition	Aminosäuresequenz	Stocklösung
pp65	495-503	NLVPMVATV	1 mg / ml in H ₂ O
IE1	297-305	TMYGGISLL	10 mg / ml in H ₂ O / DMSO

Versuchstiere

Für die Restimulierung wurden C57BL/6 Mäuse als Spender für Milzzellen verwendet. Sie wurden in der Zentralen Versuchstiereinrichtung (ZVTE) der Universitätsmedizin Mainz und der Johannes Gutenberg-Universität Mainz unter *Specified Pathogen Free* (SPF)-Bedingungen gehalten.

2.4.4 Bestimmung der Zellzahl und der Zellvitalität

Bei der Bestimmung der Zellzahl wurde durch Zugabe von Trypanblau gleichzeitig die Zellvitalität geprüft. Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde die Zellsuspension 1:2 mit Trypanblau verdünnt und auf eine Neubauer Zählkammer (Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen) gegeben. Anschließend wurden die nicht angefärbten Zellen unter dem Mikroskop gezählt. Milzzellen wurden, um störende Erythrozyten zu lysieren, vor dem Zählen zusätzlich mit Essigsäure vermischt (Milzzellen, Trypanblau und 4% Essigsäure im Verhältnis 1:1:2).

Die Berechnung der Zellzahl / ml erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Zellzahl / ml} = \frac{N}{n \times V \times 10^4}$$

N = Anzahl gezählter lebender Zellen;

n = Anzahl ausgezählter Großquadrate;

V = Verdünnungsfaktor; 10^4 = Kammerfaktor

Reagenzien

Trypanblau „*Trypan Blue Solution* (0,4%)“ von Sigma (Deisenhofen) 1:4 in PBS von Invitrogen (Karlsruhe)

2.4.5 Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen

Um Zellen in flüssigem Stickstoff bei -172°C zu konservieren, wurden 1×10^5 bis 5×10^5 Zellen pelletiert, in 1,5 ml Einfriermedium resuspendiert und in Kryoampullen (Sarstedt, Nümbrecht) überführt. Diese wurden zur Vermeidung der Bildung von Eiskristallen zunächst mit Hilfe eines Einfriergefäßes („*NALGENE™ Cryo 1°C Freezing Container*“ von Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) über Nacht bei -80°C langsam ($-1^\circ\text{C} / \text{min}$) heruntergekühlt und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt.

Zur Rekultivierung wurden die eingefrorenen Zellen, um die zytotoxische Wirkung des im Einfriermedium enthaltenen DMSO zu minimieren, im Wasserbad bei 37°C möglichst zügig aufgetaut, in vorgewärmtes Medium überführt, pelletiert und in frischem Medium ausgesät.

Reagenzien

Einfriermedium 90% FKS und 10% DMSO

2.5 Viren und ihre Kultivierung

2.5.1 Virusstämme

AD169

Dieser HCMV-Laborstamm wurde 1956 von W. P. Rowe isoliert (Rowe *et al.*, 1956) und diente als Grundlage für die Sequenzierung des HCMV-Genoms (Chee *et al.*, 1990).

Rekombinantes Virus (RV)-HB15

Bacterial artificial chromosome (BACmid): pHB15

RV-HB15 wurde von K. Besold, Mainz, durch Rekonstitution des BACmids pHB15 [(Hobom *et al.*, 2000); pHB15 heißt hier AD169-BAC] in HFF generiert (Besold *et al.*, 2007). Das pHB15 wurde freundlicherweise von U. H. Koszinowski, München, zur Verfügung gestellt. Das Virus enthält das komplette AD169-Genom.

RV-Hd65

Ausgangsstamm: HB15

BACmid: pHB15_ pp65

Kurzbeschreibung: pp65-Deletionsmutante

RV-Hd65 wurde von K. Besold, Mainz, durch Rekonstitution des BACmids pHB15_ pp65 hergestellt (Besold *et al.*, 2007). Dem Virus fehlt das virale Tegumentprotein pp65.

RV-AD169/EYFP-pp71

Ausgangsstamm: HB15

BACmid: pHB15/EYFP-pp71

Kurzbeschreibung: EYFP-pp71-Mutante

RV-AD169/EYFP-pp71 wurde durch Rekonstitution des BACmids pHB15/EYFP-pp71 (Tavalai *et al.*, 2008) in HFF generiert. Das pHB15/EYFP-pp71 wurde freundlicherweise von T. Stamminger, Erlangen, zur Verfügung gestellt. Das Virus exprimiert ein Fusionsprotein aus pp71 und EYFP.

RV-JH7

Ausgangsstamm: HB15

BACmid: pJH7

Kurzbeschreibung: US2-11-Deletionsmutante

RV-JH7 wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch Rekonstitution des BACmids pJH7 in HFF generiert. Dem Virus fehlt die gesamte Region von US2 bis US11.

RV-JH9

Ausgangsstamm: HB15

BACmid: pJH9

Kurzbeschreibung: EYFP-pp71-Mutante mit US2-11-Deletion

RV-JH9 wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch Rekonstitution des BACmids pJH9 in HFF generiert. Das Virus exprimiert ein Fusionsprotein aus pp71 und EYFP. Gleichzeitig fehlt ihm die gesamte Region von US2 bis US11.

RV-HB5

BACmid: pHB5

RV-HB5 wurde von K. Besold, Mainz, durch Rekonstitution des BACmids pHB5 (Borst *et al.*, 1999) in HFF generiert (Besold, 2006). Das pHB5 wurde freundlicherweise von U. H. Koszinowski, München, zur Verfügung gestellt. Dem Virus fehlt die Genomregion US2 bis US6, da an dieser Stelle der BAC-Vektor in das Genom von AD169 integriert worden war.

RV-dUS2-11

Ausgangsstamm: HB5

BACmid: p US2-11-(EGFP-loxP)

Kurzbeschreibung: US2-11-Deletionsmutante

RV-dUS2-11 wurde von K. Besold, Mainz, durch Rekonstitution des BACmids p US2-11-(EGFP-loxP) (Falk *et al.*, 2002) in HFF generiert (Besold, 2006). Das p US2-11-(EGFP-loxP) wurde freundlicherweise von G. Hahn, Ingolstadt, zur Verfügung gestellt. Dem Virus fehlt die gesamte Region von US2 bis US11.

RV-dUS2-11_dpp65

Ausgangsstamm: HB5

BACmid: p US2-11_ pp65-(EGFP-loxP)

Kurzbeschreibung: US2-11/pp65-Deletionsmutante

RV-dUS2-11_dpp65 wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch Rekonstitution des BACmids p US2-11_ pp65-(EGFP-loxP) in HFF generiert. Dem Virus fehlt sowohl die Region von US2 bis US11 als auch das UL83-Gen.

RV-BADwt

BACmid: pAD/Cre

RV-BADwt wurde von K. Besold, Mainz, durch Rekonstitution des BACmids pAD/Cre (Yu *et al.*, 2002) in HFF generiert (Besold *et al.*, 2009). Das pAD/Cre wurde freundlicherweise von T. Shenk, Princeton, NJ, USA, zur Verfügung gestellt. Das BACmid enthält das komplette AD169-Genom und eine Expressionskassette für die Cre-Rekombinase. Bei der Transfektion des BACmids in HFF werden so der BAC-Vektor und das Cre-Gen ohne zusätzliche Transfektion eines Expressionsplasmids für die Cre-Rekombinase durch ortsspezifische Rekombination entfernt.

RV-JH10

Ausgangsstamm: BADwt

BACmid: pJH10

Kurzbeschreibung: US2-11-Deletionsmutante

RV-JH10 wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch Rekonstitution des BACmids pJH10 in HFF generiert. Dem Virus fehlt die gesamte Region von US2 bis US11.

RV-KB5

Ausgangsstamm: BADwt

BACmid: pKB5

Kurzbeschreibung: gpUS6-exprimierende Mutante

RV-KB5 wurde von K. Besold, Mainz, durch Rekonstitution des BACmids pKB5 in HFF generiert. Von den vier Immunevasinen gpUS2, gpUS3, gpUS6 und gpUS11 exprimiert dieses Virus nur noch gpUS6.

RV-KB6

Ausgangsstamm: BADwt

BACmid: pKB6

Kurzbeschreibung: US2/US3/US6/US11-Deletionsmutante

RV-KB6 wurde von K. Besold, Mainz, durch Rekonstitution des BACmids pKB6 in HFF generiert (Besold *et al.*, 2009). Das Virus exprimiert keines der vier Immunevasine gpUS2, gpUS3, gpUS6 und gpUS11.

RV-KB7

Ausgangsstamm: BADwt

BACmid: pKB7

Kurzbeschreibung: gpUS3-exprimierende Mutante

RV-KB7 wurde von K. Besold, Mainz, durch Rekonstitution des BACmids pKB7 in HFF generiert. Von den vier Immunevasinen gpUS2, gpUS3, gpUS6 und gpUS11 exprimiert dieses Virus nur noch gpUS3.

RV-KB9

Ausgangsstamm: BADwt

BACmid: pKB9

Kurzbeschreibung: gpUS11-exprimierende Mutante

RV-KB9 wurde von K. Besold, Mainz, durch Rekonstitution des BACmids pKB9 in HFF generiert (Besold *et al.*, 2009). Von den vier Immunevasinen gpUS2, gpUS3, gpUS6 und gpUS11 exprimiert dieses Virus nur noch gpUS11.

RV-KB13

Ausgangsstamm: BADwt

BACmid: pKB13

Kurzbeschreibung: gpUS2-exprimierende Mutante

RV-KB13 wurde von K. Besold, Mainz, durch Rekonstitution des BACmids pKB13 in HFF generiert (Besold *et al.*, 2009). Von den vier Immunevasinen gpUS2, gpUS3, gpUS6 und gpUS11 exprimiert dieses Virus nur noch gpUS2.

RV-KB14

Ausgangsstamm: BADwt

BACmid: pKB14

Kurzbeschreibung: pp65-Deletionsmutante

RV-KB14 wurde von K. Besold, Mainz, durch Rekonstitution des BACmids pKB14 in HFF generiert. Dem Virus fehlt das virale Tegumentprotein pp65.

2.5.2 Virus-Rekonstitution aus BACmiden

Zur Rekonstitution von Virus aus BACmiden wurden diese in HFF transfiziert. Die BACmid-DNA wurde mit Hilfe des „Plasmid DNA Purification“-Kits von Macherey & Nagel (Düren) aus *E. coli* präpariert (siehe 2.6.2) und mittels der SuperFect-Methode von Qiagen (Hilden) transfiziert. Um am Tag der Transfektion eine Konfluenz der HFF von 40 bis 80% zu gewährleisten, wurden einen Tag vor Transfektion 1×10^5 HFF in eine Vertiefung einer 6-Well-Platte ausgesät. Die Transfektion wurde nach Herstellerangaben (Protokoll „Transient Transfection of Adherent Cells“) durchgeführt, wobei jeweils 2 μ l oder 10 μ l BACmid-DNA transfiziert wurden. Zusätzlich wurden 0,5 μ g des die Cre-Rekombinase kodierenden Plasmids pBRep-cre kotransfiziert. Mittels der Cre-Rekombinase wurde der BAC-Vektor in den transfizierten Zellen durch ortsspezifische Rekombination an den flankierenden loxP-*sites* aus dem Genom der rekombinanten Viren entfernt. Die transfizierten Zellen wurden solange passagiert, bis die Freisetzung von rekonstituiertem Virus in den Zellkulturüberstand anhand der Bildung von Plaques aus infizierten Zellen zu beobachten war. Die virushaltigen Überstände dieser Kulturen wurden für weitere Passagen des Virus und für die Herstellung von Virusstocks zur Infektion von HFF-Kulturen genutzt.

2.5.3 Infektion eukaryonter Zellen mit HCMV

Zur Infektion mit HCMV wurden subkonfluente HFF-Kulturen verwendet. Nach Abnahme des Zellkulturmediums wurde die gewünschte Menge an Virusüberstand in einem geringen Volumen Medium auf die Zellen gegeben. Zur Virus-Zell-Adsorption wurde dieser Ansatz für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde wieder ausreichend Kulturmedium hinzugefügt und die infizierten Zellen bis zur Verwendung weiter bei 37°C inkubiert.

Die Infektionsstärke wurde entweder in *multiplicity of infection (moi)* oder in Genomen / Zelle bemessen. Sollten Zellen mit zwei verschiedenen HCMV-Mutanten koinfiziert

werden, so wurden für die Koinfektion beide Mutanten jeweils mit der Infektionsstärke der Einzelinfektionen eingesetzt.

2.5.3.1 Behandlung infizierter Zellen mit Cycloheximid und Actinomycin D

Um Analysen von Effekten in der IE-Phase der Infektion zu erleichtern, kann das Fortschreiten der Infektion aus der IE-Phase durch eine Behandlung der infizierten Zellen mit Cycloheximid (CH) und Actinomycin D (ActD) verhindert werden. Die Behandlung mit dem Translationshemmer CH führt zunächst zur Akkumulation von IE-mRNAs in den infizierten Zellen. Anschließend wird CH von den Zellen entfernt und der Transkriptionshemmer ActD zu den Zellen gegeben. Dadurch kommt es zur Translation der akkumulierten IE-mRNAs, ohne dass die translatierten IE-Proteine die Transkription von E-Genen induzieren. Somit wird durch die CH/ActD-Behandlung der infizierten Zellen die Infektion über einen längeren Zeitraum in der IE-Phase gehalten und IE-Proteine werden verstärkt exprimiert.

Zur CH/ActD-Behandlung wurde das Zellkulturmedium von HFF zunächst 1 h vor Infektion mit 250 µg / ml CH (125 µl CH-Lösung / 1 ml Medium) versetzt. Diese CH-Konzentration wurde auch während der Infektion der HFF aufrechterhalten. Die CH-Behandlung wurde 9 h nach Infektion (p.i.) beendet, indem das CH-haltige Medium von den infizierten Zellen abgenommen wurde und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen wurden. Danach wurde frisches, mit 10 µg / ml ActD versetztes Medium (1 µl ActD-Lösung / 1 ml Medium) auf die Zellen gegeben. Nach 13,5 h Inkubation wurden die Zellen geerntet und in die Analysen eingesetzt.

Sollte aus den infizierten Zellen IE-mRNA zur Analyse im Northern Blot isoliert werden, so wurden die Zellen direkt nach der CH-Behandlung geerntet.

Reagenzien

CH-Lösung	2 mg / ml in H ₂ O
PBS	Invitrogen, Karlsruhe (136 mM NaCl; 26 mM KCl; 8 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,5 mM KH ₂ PO ₄)
ActD-Lösung	10 mg / ml in DMSO

2.5.3.2 Stressinduktion in infizierten HFF durch Serumentzug

Um in infizierten HFF den Einfluss von Zellstress zu analysieren, wurde den infizierten HFF 48 h vor der Analyse Serum entzogen. Dafür wurde das Zellkulturmedium von den

infizierten HFF abgenommen und nach Waschen mit PBS durch FKS-freies Medium ersetzt.

Reagenzien

PBS	Invitrogen, Karlsruhe (136 mM NaCl; 26 mM KCl; 8 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,5 mM KH ₂ PO ₄)
FKS-freies Medium	MEM mit 2 mM L-Glutamin; 50 mg / l Gentamycin und 0,5 ng / ml bFGF (Invitrogen, Karlsruhe)

2.5.4 Herstellung von Virusstocks

Zur Herstellung von Virusstocks wurden subkonfluente HFF-Kulturen infiziert und sechs bis acht Tage inkubiert. Der dann erkennbare zytopathische Effekt (CPE) zeigte die Freisetzung großer Virusmengen in den Zellkulturüberstand an. Das virushaltige Medium wurde, um Zelltrümmer zu entfernen, für 10 min bei 2.500 bis 3.000 rpm in der Megafuge 2.0 zentrifugiert. Es wurden 1 bis 5 ml Aliquots hergestellt und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

2.5.5 Bestimmung des Virustiters über die Induktion von IE1-positive Zellen

Die Infektion mit HCMV führt initial zur Expression von viralen Proteinen, von denen IE1 besonders abundant gebildet wird. Die Zahl der Zellen, die das IE1-Protein exprimieren, dient als Maß für die in einem definierten Volumen von Virusüberstand enthaltenen infektiösen Partikel. Sie kann somit für die Bemessung der Infektionsstärke dienen.

Zur Bestimmung des Virustiters über die Erzeugung von IE1-positiven Zellen wurden in eine 96-Well-Platte pro Vertiefung 5×10^3 HFF ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen im Achtfachansatz mit jeweils 100 µl einer 10^{-3} - oder 10^{-4} -Verdünnung des Virusüberstandes infiziert. 48 h nach Infektion wurden IE1-exprimierende Zellen angefärbt. Dafür wurden die Zellen zunächst nach einem Waschschrift mit PBS mit 96% Ethanol für 20 min bei Raumtemperatur (RT) fixiert. Nach einem erneuten Waschschrift mit PBS wurden 50 µl Hybridomüberstand des IE1-spezifischen monoklonalen Antikörpers p63-27 (Andreoni *et al.*, 1989) pro Vertiefung auf die Zellen gegeben und für 1 h bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Detektion des gebundenen, IE1-spezifischen Antikörpers erfolgte mit Hilfe eines Meerrettich-Peroxidase (*horseradish-peroxidase*, HRP) -konjugierten, Maus-IgG-spezifischen Sekundärantikörpers. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden 50 µl einer

Sekundärantikörper-Verdünnung (1:500 in PBS) pro Vertiefung hinzugefügt und die Zellen erneut für 1 h bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Anfärbung der so markierten, IE1-exprimierenden Zellen erfolgte nach zwei Waschschrritten mit PBS durch Zugabe von 200 µl einer 3-Amino-9-Ethyl-Carbazol (AEC)-Färbelösung pro Vertiefung. Nach einer Inkubation von 1 h bei 37°C in einer feuchten Kammer wurde die Anfärbung durch Waschen mit PBS gestoppt. Zur mikroskopischen Auszählung der IE1-positiven Zellen anhand der angefärbten Zellkerne wurden in die Vertiefungen 200 µl PBS gegeben. Pro Virus und Verdünnung wurden acht Vertiefungen ausgezählt und aus den gewonnenen Werten der Mittelwert gebildet. Mit Hilfe des so bestimmten Mittelwertes wurde der Virustiter errechnet:

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

N = Mittelwert der Anzahl IE1-positiver Zellen aus acht Vertiefungen;

V = Verdünnungsfaktor;

$\times 10$ = Umrechnung des Infektionsvolumens von 100 µl auf 1 ml

Reagenzien

PBS	Invitrogen, Karlsruhe (136 mM NaCl; 26 mM KCl; 8 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,5 mM KH ₂ PO ₄)
Sekundärantikörper	„Rabbit-anti-Mouse Immunoglobulins HRP“ (Dako, Hamburg)
AEC-Stammlösung	400 mg AEC in 100 ml n,n-Dimethylformamid (DMF)
Acetat-Puffer	13,6 g Natriumacetat und 2,88 ml Eisessig, mit H ₂ O ad 1 l, pH 4,9
AEC-Färbelösung	AEC-Stammlösung 1:20 in Acetat-Puffer, versetzt mit 1:1.000 H ₂ O ₂ (30%)

2.5.6 Bestimmung des Virustiters über virale Genome

Eine weitere Methode, um bei Infektionen die Infektionsstärke zu bemessen, ist die Bestimmung des Virustiters eines Virusstocks über die Anzahl an viralen Genomen im Stock oder in Zellen, die mit einem definierten Volumen an Stock infiziert wurden. Diese Methode eignet sich besonders für HCMV-Mutanten, deren IE-Genexpression in

infizierten Zellen aufgrund der eingeführten Mutation verändert sein könnte. Wenn nicht anders angegeben, wurde in der vorliegenden Arbeit die Bestimmung des Virustiters über virale Genome anhand der in infizierten Zellen enthaltenen Genome vorgenommen.

Zur Bestimmung des Virustiters über die Anzahl der in infizierten Zellen enthaltenen Genome wurden 5×10^5 HFF mit verschiedenen Volumina des Stocks infiziert. Die infizierten Zellen wurden 6 h.p.i. geerntet und die intrazelluläre virale DNA isoliert (siehe 2.6.2.2). Die Anzahl der enthaltenen viralen Genome wurde mittels quantitativer *Real-Time* Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) (siehe 2.6.8) bestimmt. Aus den Ergebnissen wurde eine Eichgerade erstellt, von der das für eine bestimmte Genomanzahl benötigte Infektionsvolumen abgelesen werden konnte.

Zur Bestimmung des Virustiters über die Anzahl der im Stock enthaltenen Genome wurde die virale DNA aus 1 ml Stock isoliert (siehe 2.6.2.2). Von dem Isolat wurden verschiedene Verdünnungen hergestellt und die in den Verdünnungen enthaltene Anzahl an viralen Genomen mittels quantitativer PCR (siehe 2.6.8) bestimmt. Die Ergebnisse wurden mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor multipliziert und daraus der Mittelwert gebildet. Aus dem Mittelwert wurde mit Hilfe eines Dreisatzes das für eine bestimmte Genomanzahl benötigte Infektionsvolumen ermittelt.

2.5.7 Aufreinigung von Viruspartikeln aus Zellkulturüberstand

Viruspartikel können aus Zellkulturüberstand mittels eines positiven Dichte- / negativen Viskositäts-Gradienten-Systems aufgereinigt werden (Irmiere and Gibson, 1983; Talbot and Almeida, 1977). Dabei werden die bei der Infektion entstehenden Viruspartikel (Virionen, DBs und NIEPs) anhand ihrer physikalischen Eigenschaften aufgetrennt.

Zur Aufreinigung von Viruspartikeln wurde der Zellkulturüberstand von infizierten HFF gewonnen, sobald ein CPE von mindestens 90% zu beobachten war. Zelltrümmer wurden durch eine Zentrifugation für 10 min mit 3.000 rpm (Megafuge 2.0) entfernt. Danach wurden die Viruspartikel durch Ultrazentrifugation für 70 min mit $9,5 \times 10^4 \times g$ bei 10°C pelletiert. Nach Resuspendieren des Pellets in 1 ml PBS wurden die Viruspartikel auf einen Gradienten geschichtet, der aus 4 ml der 35% Na-Tartrat-Lösung und 5 ml der 15% Na-Tartrat / 30% Glycerin-Lösung aufgebaut wurde. Die Auftrennung in die verschiedenen Partikelfractionen erfolgte mittels einer Ultrazentrifugation für 90 min mit $9,9 \times 10^4 \times g$ bei 10°C ohne Bremse. Im Durchlicht konnten nun die Partikelfractionen als distinkte Banden beobachtet werden: DBs als

breite und diffuse Bande, darüber Virionen als dünne und scharf begrenzte Bande und darüber NIEPs ebenfalls als dünne und scharf begrenzte Bande. Die gewünschten Partikelfractionen wurden mit Hilfe von Kanülen abgezogen und auf Ultrazentrifugationsröhrchen verteilt. Anschließend wurde das Flüssigkeitsvolumen der Fractionen mit PBS auf 10 ml aufgefüllt. Nach einer Zentrifugation für 90 min mit $9,1 \times 10^4 \times g$ bei 10°C wurden die Pellets in PBS resuspendiert und bis zur Verwendung in Aliquots bei -80°C gelagert.

Materialien

Ultrazentrifugationsröhrchen	Sorvall, Hanau oder Beckman Coulter, Krefeld
Kanülen 1,20 x 40 mm	B. Braun, Melsungen

Reagenzien

PBS	Invitrogen, Karlsruhe (136 mM NaCl; 26 mM KCl; 8 mM Na_2HPO_4 ; 1,5 mM KH_2PO_4)
0,04 M Na-Phosphatpuffer,	1,1 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 1 \text{ H}_2\text{O}$ und 5,7 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$, mit H_2O ad 1 l, pH 7,4, autoklaviert
35% Natrium-Tartrat-Lösung	207,5 g Na-Tartrat in 325 ml 0,04 M Na-Phosphatpuffer, autoklaviert
15% Natrium-Tartrat / 30% Glycerin-Lösung	88,9 g Na-Tartrat und 150 ml Glycerin in 275 ml 0,04 M Na-Phosphatpuffer, autoklaviert

2.6 Präparation und Analyse von DNA

2.6.1 Verwendete BACmide und Plasmide

pCP-IE1

pCP-IE1 basiert auf pCP15 (Cherepanov and Wackernagel, 1995) und wurde von S. Reyda, Mainz, kloniert. Es enthält eine von FRT-sites flankierte

Kanamycinresistenz-Kassette. Es wurde bei der BAC-Rekombination als *Template* zur Herstellung eines Kanamycinresistenz-Kassette-haltigen PCR-Produkts genutzt.

pBRep-cre

pBRep-cre ist ein Expressionsplasmid für die Cre-Rekombinase (Hobom *et al.*, 2000) und wurde freundlicherweise von W. Brune, Hamburg, zur Verfügung gestellt. Es wurde bei der Rekonstitution von auf pHB15 basierenden BACmiden kotransfiziert, um den BAC-Vektor durch ortsspezifische Rekombination an *loxP-sites* mittels der Cre-Rekombinase aus dem HCMV-Genom herauszuschneiden.

pHB15

Das BACmid pHB15 enthält die Sequenz des gesamten AD169-Genoms [(Hobom *et al.*, 2000); pHB15 heißt hier AD169-BAC].

pHB15_ pp65

Für die Herstellung des BACmids pHB15_ pp65 wurde von K. Besold, Mainz, in pHB15 die kodierende Region für pp65, UL83, bis auf 150 bp am 5' Ende und das Stopcodon deletiert (Besold *et al.*, 2007).

pHB15/EYFP-pp71

Für die Herstellung des BACmids pHB15/EYFP-pp71 wurde die kodierende Sequenz für EYFP so in pHB15 integriert, dass EYFP an den N-Terminus von pp71 fusioniert ist (Tavalai *et al.*, 2008).

pJH7

Für die Herstellung des BACmids pJH7 wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit in pHB15 mittels homologer Rekombination die gesamte Region von US2 bis US11 deletiert.

pJH9

Für die Herstellung des BACmids pJH9 wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit in pHB15/EYFP-pp71 mittels homologer Rekombination die gesamte Region von US2 bis US11 deletiert.

pHB5

Das BACmid pHB5 enthält das Genom von AD169 mit Ausnahme der Region von US2 bis US6. An dieser Stelle ist der BAC-Vektor in das Genom von AD169 inseriert (Borst *et al.*, 1999).

p US2-11-(EGFP-loxP)

Im BACmid p US2-11-(EGFP-loxP), das auf pHB5 basiert, ist die gesamte Region von US2 bis US11 deletiert (Falk *et al.*, 2002).

p US2-11_ pp65-(EGFP-loxP)

Für die Herstellung des BACmids p US2-11_ pp65-(EGFP-loxP) wurde von K. Besold, Mainz, in p US2-11-(EGFP-loxP) die kodierende Region für pp65 deletiert (Besold, 2006).

pAD/Cre

Das BACmid pAD/Cre enthält das komplette AD169-Genom und eine Expressionskassette für die Cre-Rekombinase (Yu *et al.*, 2002).

pJH10

Für die Herstellung des BACmids pJH10 wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit in pAD/Cre mittels homologer Rekombination die gesamte Region von US2 bis US11 deletiert.

pKB5

Für die Herstellung des BACmids pKB5 wurden von K. Besold, Mainz, in pAD/Cre sequentiell die Leserahmen US2, US3 und US11 deletiert.

pKB6

Für die Herstellung des BACmids pKB6 wurden von K. Besold, Mainz, in pAD/Cre sequentiell die Leserahmen US2, US3, US6 und US11 deletiert.

pKB7

Für die Herstellung des BACmids pKB7 wurden von K. Besold, Mainz, in pAD/Cre sequentiell die Leserahmen US2, US6 und US11 deletiert.

pKB9

Für die Herstellung des BACmids pKB6 wurden von K. Besold, Mainz, in pAD/Cre sequentiell die Leserahmen US2, US3 und US6 deletiert.

pKB13

Für die Herstellung des BACmids pKB6 wurden von K. Besold, Mainz, in pAD/Cre sequentiell die Leserahmen US3, US6 und US11 deletiert.

pKB14

Für die Herstellung des BACmids pKB14 wurde von K. Besold, Mainz, in pAD/Cre die kodierende Region für pp65 bis auf 150 bp am 5' Ende und das Stopcodon deletiert.

2.6.2 Isolierung von DNA**2.6.2.1 Isolierung von BACmid- / Plasmid-DNA aus *E. coli***

Kleine Mengen BACmid-DNA wurden aus 10 ml Übernachtskultur mittels alkalischen Lyse isoliert (Sambrook and Russel, 2001). Dafür wurden Puffer des „High Purity Plasmid Purification“-Kits von Marligen Bioscience (Rockville, MD, USA) verwendet. Die in der Übernachtskultur enthaltenen Bakterien wurden zunächst für 5 min mit 3.500 rpm (Megafuge 2.0) bei RT zentrifugiert. Nach Resuspension des Pellets in 200 µl E1-Puffer (Suspensionpuffer) wurden 300 µl E2-Puffer (alkalischer Lysepuffer) hinzugegeben und durch mehrmaliges Invertieren untergemischt. Anschließend wurde 300 µl E3-Puffer (Neutralisationspuffer, pH 5,5) hinzugegeben. Nach Mischen der Suspension durch Invertieren folgte eine Inkubation von 5 bis 10 min auf Eis. Die ausgefallene chromosomale DNA wurde durch eine Zentrifugation für 10 min mit 14.000 rpm (ab hier alle Zentrifugationsschritte in Kühlzentrifuge 5417R) bei 4°C pelletiert. Zu dem Überstand mit der noch in Lösung befindlichen Plasmid-DNA wurden 600 µl Isopropanol gegeben und durch Invertieren untergemischt. Die dadurch ausgefällte Plasmid-DNA wurde für 30 min mit 14.000 rpm bei 4°C pelletiert, ohne zu resuspendieren mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen und nach einer Zentrifugation für 5 min mit 14.000 rpm bei 4°C in 60 µl H₂O aufgenommen. Abschließend wurde die gewonnene DNA-Lösung einem RNase-Verdau unterzogen. Dazu wurde die DNA-Lösung mit 20 µg / ml RNase A versetzt und für 10 min bei 37°C inkubiert.

Größere Mengen von BACmid- bzw. Plasmid-DNA wurden aus 100 bis 200 ml Übernachtskultur aufgereinigt. Für Plasmide wurde das „High Purity Plasmid Purification“-Kit von Marligen Bioscience (Rockville, MD, USA) verwendet, für

BACmide das „Plasmid DNA Purification“-Kit von Macherey & Nagel (Düren). Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des jeweiligen Herstellers.

Bis zur weiteren Verwendung wurden aufgereinigte BACmide bei 4°C gelagert, aufgereinigte Plasmide bei -20°C.

2.6.2.2 Isolierung von viraler DNA aus infizierten HFF oder aus Zellkulturüberstand infizierter HFF

Für die Isolierung von viraler DNA aus infizierten HFF oder deren Zellkulturüberstand wurde das „High Pure Viral Nucleic Acid“-Kit von Roche (Mannheim) verwendet. Die Durchführung erfolgte anhand der Herstellerangaben. Zur Isolierung aus infizierten HFF wurden 100 µl einer Zellsuspension mit 1×10^6 Zellen / ml eingesetzt und die Herstellerangaben für die eingesetzten Lösungen entsprechend reduziert. Die isolierte DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.6.3 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration einer DNA-Lösung wurde mit dem Nanodrop-Photometer über die Messung der OD bei 260 nm bestimmt. Eine OD_{260} von 1 entsprach dabei einer Konzentration von 50 µg / ml doppelsträngiger DNA in H₂O.

2.6.4 Fällung von DNA mit Isopropanol

Um Salze aus einer DNA-Lösung zu entfernen und die DNA-Konzentration einer Lösung zu erhöhen, wurde die DNA mittels Isopropanol gefällt. Dazu wurde die DNA-Lösung mit 1,5 M NaCl versetzt und 1,8 Volumen Isopropanol zugegeben. Nach einer Inkubation für 20 min auf Eis wurde die nun gefällte DNA für 10 min mit 14.000 rpm (Tischzentrifuge 5417C) pelletiert. Nach einem Waschschrift mit 70% Ethanol und einer erneuten Zentrifugation für 5 min mit 14.000 rpm wurde das Pellet für wenige Minuten an der Luft bei RT getrocknet. Schließlich wurde die pelletierte DNA in einem geeigneten Volumen an H₂O aufgenommen.

2.6.5 Agarose-Gelelektrophorese für DNA

Agarose-Gelelektrophorese wurde eingesetzt, um DNA-Fragmente zur Analyse oder Aufreinigung nach ihrer Größe aufzutrennen. Hierzu wurden, abhängig von der erwarteten Größe der DNA-Fragmente, Gele mit Agarose-Konzentrationen von 0,7 bis 2% (w / v) verwendet. Zur Herstellung des Gels wurde die gewünschte Menge an Agarose durch Aufkochen in TBE-Puffer gelöst und nach Zugabe von 0,5 mg / ml

Ethidiumbromid in den Gelschlitten gegossen. Nach dem Erstarren wurde das Gel mit dem Gelschlitten in die Gelkammer eingesetzt und mit TBE-Puffer bedeckt. Die DNA-Proben wurden 4:1 bis 9:1 mit Auftragspuffer vermischt und auf das Gel aufgetragen. Zusätzlich wurden als Molekulargewichtsmarker 0,5 µg „1 kb-DNA-Ladder“ von PeqLab (Erlangen) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einem 11 cm × 7 cm-Gel mit einer Spannung von 80 V, bei einem 18 cm × 10 cm-Gel mit 120 V und bei einem 25 cm × 20 cm-Gel mit 60 V durchgeführt. Die aufgetrennten DNA-Fragmente waren wegen des verwendeten, in die DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid im UV-Licht sichtbar und konnten zur Analyse fotografiert oder zur Aufreinigung ausgeschnitten werden.

Reagenzien

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 ₂ O ad 50 ml

2.6.6 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten einer bestimmten Größe wurden die Fragmente per Agarose-Gelelektrophorese auf einem Gel aufgetrennt (siehe 2.6.5), die Banden der gewünschten Fragmente ausgeschnitten und die DNA aus den Gelbanden extrahiert. Dazu wurde das „QIAquick Gel Extraction“-Kit von Qiagen (Hilden) verwendet, das für DNA Fragmente zwischen 70 bp und 10 kb geeignet ist. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers unter Verwendung einer Mikrozentrifuge.

2.6.7 Qualitative PCR

Die PCR dient der *in vitro*-Amplifikation definierter DNA-Sequenzen von einer DNA-Matrize (*Template*) (Saiki *et al.*, 1988). Dabei werden zwei Oligonukleotide (*Primer*) eingesetzt, die komplementär zu den beiden Regionen sind, die die Zielsequenz stromaufwärts und stromabwärts (*sense* und *antisense*) begrenzen. Die Amplifikation erfolgt mittels der enzymatischen Kettenreaktion exponentiell, so dass kleinste Mengen DNA so weit vervielfältigt werden können, dass sie mit herkömmlichen molekularbiologischen Analysemethoden (zum Beispiel in der Agarose-Gelelektrophorese) nachweisbar werden.

2.6.7.1 Durchführung einer PCR

Die PCR wurde in 50 µl Reaktionsansätzen durchgeführt. Dazu wurden 0,1 bis 200 ng *Template*-DNA in 1× PCR-Puffer unter Zugabe von 0,4 µM *sense-Primer*, 0,4 µM *antisense-Primer*, 200 µM dNTPs und als Taq-DNA-Polymerase entweder 1,3 U „mi-Taq only“ von Metabion oder 2,6 U „Expand High Fidelity Enzyme mix“ von Roche eingesetzt. Die Taq-Polymerase von Metabion wurde für analytische PCRs verwendet, während für die Herstellung von PCR-Produkten für die BAC-Mutagenese (siehe 2.6.9.1) der „Expand High Fidelity Enzyme Mix“ von Roche, der eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität aufweist, genutzt wurde.

Die Reaktion wurde im PCR-Cycler unter Verwendung folgenden Programms durchgeführt:

Aktivierungsschritt	3 min	95°C	
Denaturierung	1 min	95°C	30 - 35 Zyklen
Hybridisierung	1 min	...°C	
Elongation	45 sec – 90 sec	72°C	
Finale Elongation	10 min	72°C	

Die Hybridisierungstemperatur wurde abhängig von den verwendeten *Primern* gewählt. Die Dauer des Elongationsschritts richtete sich nach der Länge der zu amplifizierenden DNA-Sequenz (Richtwert: 1 min pro 1.000 bp).

Reagenzien

PCR-Puffer (10×, inkl. MgCl ₂)	vom Hersteller der verwendeten Polymerase, s.u.
dNTPs (10 mM)	PeqLab, Erlangen
„mi-Taq only“-Polymerase (5 U / µl)	Metabion, Martinsried
„Expand High Fidelity Enzyme mix“ (3,5 U / µl)	Roche, Penzberg

2.6.7.2 Verwendete *Primer*

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer wurden von Metabion (Martinsried) synthetisiert.

Primer-Paar	Sequenz (5' nach 3')	Hybridisierungstemperatur
Kana_rev/ KB17	AAC TGT TCG CCA GGC TCA AG (Kana_rev) CCG TGA CGT GCA AGA CTA C (KB17)	61°C
KB10/SR14	CAC ACG TAA TGG GTA CTC (KB10) TGT TCC GCT TCC TTT AGC AG (SR14)	61°C
JH5 fwd/ JH5 rev	CTT ACA GCT TTT GAG TCT AGA CAG GGT AAC AGC CTT CCC TTG TAA GAC AGA AGA GCG CTT TTG AAG CTG GG (JH5 fwd) GGG TAC TCG TGG CTA GAT TTA TTG AAA TAA ACC GCG ATC CCG GGC GTC GGA ATA GGA ACT TCA AGA TCC CCC (JH5 rev)	55°C
JH7 fwd/ JH7 rev	GTG AGT CGT GAT GCA GAA AC (JH7 fwd) CGT AGA CCT GAC CGA CTT AAA C (JH7 rev)	57°C
JH8 fwd/ JH8 rev	CGA TGT ACT CGG GAT GTA TGC (JH8 fwd) TGG ACC TGC GTA CCA ACA TAG (JH8 rev)	58°C
KB10/KB11	CAC ACG TAA TGG GTA CTC (KB10) GGG AGG AAT TGG CAG GAA AGA C (KB11)	55°C
KB12/KB13	GTA TCA GAC ACG CTG ACC TAC (KB12) ACC GTT CAG TCC ACA CGC TAC (KB13)	57°C
KB16/KB17	ACC ACA ACA GGC AGA TCG (KB16) CCG TGA CGT GCA AGA CTA C (KB17)	55°C
KB28/KB29	ACC GCA TCC ACA TCA TAG AC (KB28) CCC GAT GGA ATC ACT AAA GC (KB29)	55°C
KB30/KB31	TAA ATC GCA GAC GGG CGC TCA C (KB30) GCC GTC TTG TTC CTG AGA CTC G (KB31)	63°C
KB34/KB35	TGT CGG TGC AGC CAA CCT TTC (KB34) ACC GCC TCT GTC CGA TGT TTC (KB35)	60°C

SB44/SB45	ACG GGA AGC CCA TCA CCA TC (SB44) AGG CCA TGT AGG CCA TGA GG (SB45)	58°C
SB46/SB47	TGG AGT CTA CTG GTG TCT TC (SB46) GCT TCA CCA CCT TCT TGA TG (SB47)	57°C

Das *Primer*-Paar JH5 fwd/JH5 rev wurde speziell für die Herstellung eines PCR-Produkts für die BAC-Mutagenese (siehe 2.6.9.1) konzipiert. Die fettgedruckten Anteile der *Primer* dienen zur Amplifikation der Kanamycinresistenz-Kassette. Die Sequenzen der restlichen Anteile sind identisch zu an den Deletionsbereich angrenzenden Sequenzen und werden zur homologen Rekombination benötigt.

2.6.7.3 Gewinnung von *Template*-DNA aus Bakterienkolonien

Eine Methode zur Überprüfung von BACmid-enthaltenden *E. coli*-Kolonien auf die erfolgreiche Mutagenese der BACmid-DNA ist der Nachweis der modifizierten BACmid-DNA-Region per PCR. Um eine Vielzahl von *E. coli*-Kolonien schnell testen zu können, wurde die *Template*-DNA direkt aus den Kolonien gewonnen.

Dazu wurden Einzelkolonien gepickt und in 10 µl steriles H₂O gegeben. Um die Bakterienzellen aufzubrechen, wurde die Suspension 5 min bei 100°C gekocht. Die Zelltrümmer wurden durch eine Zentrifugation für 1 min bei 14.000 rpm (Tischzentrifuge 5417C) pelletiert. Die im Überstand enthaltene DNA wurde nun als *Template*-DNA für die PCR eingesetzt. Dafür wurden 5 µl des Überstands in den PCR-Ansatz gegeben.

2.6.7.4 Aufreinigung von PCR-Produkten

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten in der Größe von 100 bp bis 10 kb aus den Reaktionsansätzen wurde das „QIAquick PCR Purification“-Kit von Qiagen (Hilden) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben unter Verwendung einer Mikrozentrifuge.

2.6.7.5 *Template*-Eliminierung

Um nach einer PCR die *Template*-DNA zu eliminieren, wurde das aufgereinigte PCR-Produkt mit dem Enzym *Dpn* I (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) über Nacht nach Herstellerangaben verdaut.

2.6.8 Quantitative *Real-Time* PCR

Die quantitative *Real-Time* PCR dient zur Bestimmung der vorliegenden Anzahl an Kopien von *Template*-DNA in einer Probe. Dazu können sogenannte TaqManTM-Sonden verwendet werden (Livak *et al.*, 1995). Diese Sonden tragen am 5'-Ende ein Reporter-Fluorochrom und am 3'-Ende ein *Quencher*-Fluorochrom. Dabei überlappt das Emissionsspektrum des Reporter-Fluorochroms mit dem Absorptionsspektrum des *Quencher*-Fluorochroms. Durch die räumliche Nähe der Fluorochrome auf der Sonde tritt ein Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) auf, wodurch die Fluoreszenz des Reporter-Fluorochroms unterdrückt wird. Die TaqMan-Sonden sind komplementär zu einem Bereich in der Zielsequenz und binden dort an die *Template*-DNA. Wird dieser Bereich nun von der in der PCR eingesetzten Taq-Polymerase mit 5'-3'-Exonuklease-Aktivität amplifiziert, hydrolysiert die Taq-Polymerase die TaqMan-Sonde und trennt so das Reporter-Fluorochrom vom *Quencher*-Fluorochrom. Somit wird die Fluoreszenz der Reporter-Fluorochroms nicht länger unterdrückt und kann detektiert werden. Die Zunahme der Fluoreszenz des Reporter-Fluorochroms ist somit direkt proportional zur Menge an freigesetztem Reporter-Fluorochrom und damit auch zur Menge der in der PCR-Reaktion vorhandenen *Template*-DNA.

2.6.8.1 Genomquantifizierung mittels quantitativer *Real-Time* PCR

Die quantitative *Real-Time* PCR wurde in der vorliegenden Arbeit zur Quantifizierung von HCMV-Genomen in infizierten HFF oder deren Zellkulturüberstand verwendet. Hierzu wurde aus den infizierten HFF oder deren Überstand DNA isoliert (siehe 2.6.2.2) und als *Template*-DNA in die Reaktion eingesetzt. Als Zielsequenz für die PCR diente ein Bereich des UL54-Gen von HCMV, der mittels des *Primer*-Paares CMV-FP (5' TCATCTACGGGACACGGAC 3') und CMV-RP (5' TGCGCACCAGATCCACG 3') amplifiziert wurde. Die gegen die Zielsequenz gerichtete TaqMan-Sonde (5' CCACTTTGCCGATGTAACGTTTCTTG CAT 3') trug 6-Carboxyfluorescein als Reporter-Fluorochrom und Tertramethylrhodamin als *Quencher*-Fluorochrom. Zur absoluten Quantifizierung der in den Proben enthaltenen Genome wurde ein Plasmidstandard genutzt. Dafür wurde eine Verdünnungsreihe von 10⁵ bis 10¹ Kopien des Cosmids pCM1049 hergestellt, das eine Kopie des UL54-Gens enthält (Fleckenstein *et al.*, 1982).

Die *Real-Time* PCR wurde in 50 µl Reaktionsansätzen durchgeführt, wobei für jede Probe drei Reaktionsansätze analysiert wurden:

	Stammlösung	Menge für 50 µl	Endkonzentration
PCR Puffer	10× Puffer, mit 15 mM MgCl ₂	5 µl	1× Puffer; mit 1,5 mM MgCl ₂
MgCl ₂	25 mM	2 µl	1 mM
dNTPs	2 mM	5 µl	0,2 mM
CMV-FP	3 µM	5 µl	0,3 µM
CMV-RP	3 µM	5 µl	0,3 µM
TaqMan-Sonde	1 µM	5 µl	0,1 µM
X-Rhodamin	100 µM	0,25 µl	0,5 µM
HotStar Taq	5 units / µl	0,5 µl	0,05 units / µl
Proben- / Standard-DNA	-	5 µl	-
H ₂ O	-	17,25 µl	-

Die Reaktion wurde im *Real-Time Cycler* mit folgendem Programm durchgeführt:

Aktivierungsschritt	5 min	95°C	45 Zyklen
Denaturierung	15 sec	95°C	
Hybridisierung + Elongation	1 min	60°C	

Die Auswertung erfolgte mit der Betriebssoftware des *Real-Time Cyclers* über die Erstellung einer Eichkurve aus den Messpunkten der Verdünnungsreihe des Plasmidstandards.

Reagenzien

Puffer (10×, inkl. MgCl ₂)	Qiagen, Hilden
dNTPs	PeqLab, Erlangen
Primer	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
TaqMan-Sonde	TIB Molbiol, Berlin
X-Rhodamin	TIB Molbiol, Berlin
HotStar Taq-DNA-Polymerase	Qiagen, Hilden

2.6.9 Manipulation des HCMV-Genoms durch BAC-Mutagenese

Die Technik der Manipulation des HCMV-Genoms durch BAC-Mutagenese wurde in der vorliegenden Arbeit genutzt, um die Region von US2 bis US11 aus dem HCMV-Genom zu deletieren.

Das BAC-System ist ein Vektorensystem zur Amplifikation von DNA-Fragmenten mit einer Länge von bis zu 320 kb (Shizuya *et al.*, 1992). Diese Vektoren erlauben so die Vermehrung und Manipulation des vollständigen HCMV-Genoms in *E. coli*. In der Literatur sind verschiedene BAC-Vektoren beschrieben, die das HCMV-Genom enthalten (Borst *et al.*, 1999; Hobom *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2002).

Die Manipulation des in einem BAC-Vektor enthaltenen HCMV-Genoms wurde nach einer von Lee und Kollegen entwickelten Methode durchgeführt (Lee *et al.*, 2001). Hierbei wird ein viraler Genomabschnitt mittels homologer Rekombination durch eine Selektionsmarker-Kassette ersetzt.

Das modifizierte HCMV-Genom wurde im Anschluss zunächst durch Restriktionsanalyse und DNA-Sequenzierung überprüft und dann zur Rekonstitution der viralen Deletionsmutante in HFF transfiziert (siehe 2.5.2).

2.6.9.1 Herstellung des PCR-Produkts zur homologen Rekombination

Das PCR-Produkt zur homologen Rekombination bestand aus der gewünschten Selektionsmarker-Kassette, flankiert von etwa 50 bp langen Überhängen. Diese Überhänge waren homolog zu den Sequenzen, die die zu deletierende Zielregion im HCMV-Genom flankierten.

Als Selektionsmarker-Kassette wurde hier eine Kanamycinresistenz-Kassette verwendet, die aus dem Plasmid pCP-IE1 mittels eines speziell konzipierten *Primer*-Paares (JH5 fwd/JH5 rev) amplifiziert wurde (siehe 2.6.7). Die *Primer* enthielten neben den für die Amplifikation der Kanamycinresistenz-Kassette nötigen Sequenzen zusätzlich für die Rekombination benötigte homologe Überhänge.

Das PCR-Produkt wurde mittels des „QIAquick PCR Purification“-Kits von Qiagen (Hilden) aufgereinigt (siehe 2.6.7.4) und zur Abtrennung der *Template*-DNA einem *Dpn* I-Verdau unterzogen (siehe 2.6.7.5). Anschließend wurde das PCR-Produkt über Gelextraktion und Isopropanolfällung weiter aufgereinigt (siehe 2.6.6 und 2.6.4). Das so erhaltene PCR-Produkt wurde in einem möglichst kleinem Volumen H₂O aufgenommen und nach Bestimmung der DNA-Konzentration (siehe 2.6.3) bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.6.9.2 Deletion der viralen Zielsequenz durch Integration der Selektionsmarker-Kassette

Um ein BACmid zu modifizieren, wurde dieses zunächst in *E. coli* DH10B amplifiziert, DNA isoliert und diese anschließend in *E. coli* EL250 transformiert (siehe 2.6.2.1 und 2.3.4). Dieser *E. coli* Stamm enthält das für die homologe Rekombination benötigte Rekombinationssystem des Phagen unter Kontrolle eines temperatursensitiven Repressors. Um eine unkontrollierte Aktivierung des -Rekombinationssystems zu vermeiden, wurden *E. coli* EL250 generell bei 32°C kultiviert. Für die Selektion BACmid-haltiger Klone wurde das Kulturmedium mit Chloramphenicol versetzt (siehe 2.3.2).

Eine 5 ml-Kultur wurde mit einem BACmid-haltigem *E. coli* EL250 Klon angeimpft und über Nacht inkubiert (siehe 2.3.3.1). Anschließend wurden mit 1 ml dieser Kultur eine 50 ml-Kultur (inkl. Chloramphenicol) angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,8 amplifiziert. Zur Induktion des -Rekombinationssystems wurden 10 ml der 50 ml-Kultur auf einem Schüttelinkubator mit 200 rpm bei 42°C inkubiert. Als Negativkontrolle wurden gleichzeitig 10 ml der 50 ml-Kultur bei 32°C belassen. Die beiden Ansätze wurden anschließend identisch weiterbehandelt. Zum Beenden der Induktion des -Rekombinationssystems wurden die Bakterien durch Schütteln im Eiswasserbad schnell abgekühlt und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach drei Waschschritten mit eiskaltem H₂O wurden die Bakterien schließlich in 100 µl eiskaltem H₂O aufgenommen. Für die Elektroporation wurden 50 µl dieser Zellsuspension und 500 ng des oben beschriebenen PCR-Produkts eingesetzt (Durchführung der Elektroporation siehe 2.3.4). Die elektroporierten Bakterien wurden in 1 ml LB-Medium ohne Zusätze aufgenommen und für 90 min bei 32°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien in geeigneten Verdünnungen auf LB-Platten mit Chloramphenicol und Kanamycin ausplattiert (siehe 2.3.2 und 2.3.3.2) und über Nacht bei 32°C inkubiert. Dadurch fand eine Selektion derjenigen Klone statt, in denen das PCR-Produkt mit der Kanamycinresistenz-Kassette durch homologe Rekombination in das BACmid integriert worden war.

Die so gewonnenen bakteriellen Klone wurden in Kryokulturen konserviert (siehe 2.3.3.3) und mit Hilfe einer qualitativen PCR auf die erfolgreiche Mutagenese der BACmid-DNA überprüft (siehe 2.6.7). Für diese PCR-Reaktion mit dem *Primer*-Paar Kana_rev/KB17 wurde die *Template*-DNA direkt aus den Bakterienkolonien gewonnen. Anschließend wurde die korrekte Modifikation des HCMV-Genoms im BACmid mittels Restriktionsanalyse (siehe 2.6.10) und Sequenzierung (siehe 2.6.11) bestätigt.

2.6.10 Restriktionsanalyse

Zur Überprüfung der Integrität der modifizierten BACmide wurde eine Restriktionsanalyse durchgeführt. Dabei wurde die präparierte BACmid-DNA (siehe 2.6.2.1) mit Xho I (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) verdaut und die entstandenen DNA-Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.6.5; 25 cm × 20 cm großes 0,7% Agarose-Gel, Laufzeit 24 bis 48 h mit 60 Volt bei 4°C) aufgetrennt. Der Verdau erfolgte in 50 µl Ansätzen für 5 h nach Herstellerangaben. Durch Vergleich der Bandenmuster von Ursprungs-BACmid und modifiziertem BACmid konnten Rückschlüsse auf die Integrität des modifizierten BACmids und die Richtigkeit der eingebrachten Veränderungen gezogen werden.

2.6.11 DNA-Sequenzierung

Zur Überprüfung der Nukleotidsequenz in den durch die BAC-Mutagenese modifizierten Bereichen des HCMV-Genoms im BACmid wurden diese Bereiche sequenziert.

Um in der vorliegenden Arbeit die Deletion der Region von US2 bis US11 durch die Insertion einer Kanamycinresistenz-Kassette zu überprüfen, wurden die Übergangsbereiche zwischen HCMV-Genom und inserierter Kassette mit Hilfe der *Primer*-Paare Kana_rev/KB17 und KB10/SR14 amplifiziert (siehe 2.6.7) und an die Firma Genterprise Genomics (Mainz) zur Sequenzierung weitergegeben.

2.7 Präparation und Analyse von RNA

2.7.1 Isolierung von RNA

Für die Northern Blot-Analyse wurde Gesamt-RNA aus infizierten HFF mit Hilfe des „RNeasy Mini“-Kits von Qiagen (Hilden) isoliert. Hierzu wurde das Zelllysate mittels QIAshredder-Säulchen von Qiagen (Hilden) homogenisiert. Zusätzlich wurde nach dem Beladen der RNeasy-Säulchen ein *on-column* DNase I-Verdau mit dem „RNase-Free DNase Set“ von Qiagen (Hilden) eingeschoben. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben unter Verwendung einer Mikrozentrifuge.

Bis zur weiteren Verwendung wurde die aufgereinigte RNA bei -80°C gelagert.

Die Konzentration einer RNA-Lösung wurde wie die einer DNA-Lösung bestimmt (siehe 2.6.3), wobei eine OD₂₆₀ von 1 einer Konzentration von 40 µg / ml RNA in H₂O entsprach.

2.7.2 Northern Blot

Mit Hilfe der Northern Blot-Analyse kann die Expression von Proteinen in infizierten Zellen auf mRNA-Niveau untersucht werden.

Zur Northern Blot-Analyse wurde die aus infizierten HFF isolierte RNA (siehe 2.7.1) denaturiert und mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach dem Transfer der RNA auf eine Nylonmembran wurden spezifische RNA-Banden mittels Hybridisierung mit Digoxigenin (DIG)-markierten DNA-Sonden detektiert. Die Durchführung der Northern Blot-Analyse erfolgte nach Angaben des „DIG Applications Manual for Filter Hybridization“ von Roche (Mannheim).

Zur Inaktivierung von RNasen wurden alle Utensilien zur Gelelektrophorese mit „RNase AWAY“ behandelt und alle Lösungen entweder mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt oder mit DEPC-behandeltem H₂O angesetzt. Zur Behandlung von Flüssigkeiten mit DEPC wurden diese mit 0,1% DEPC versetzt, für mindestens 30 min bei RT gerührt und anschließend autoklaviert.

2.7.2.1 Herstellung DIG-markierter DNA-Sonden

Für die Northern Blot-Analyse wurden DIG-11-UTP markierte, doppelsträngige DNA-Sonden mit Hilfe des „PCR DIG Probe Synthesis“-Kits von Roche (Mannheim) hergestellt.

Zunächst wurde in einer ersten PCR ein Bereich aus dem HCMV-BACmid pAD/Cre als Template für die Sondenherstellung amplifiziert (siehe 2.6.7). Anschließend erfolgte in einer zweiten PCR die Sondenherstellung nach Herstellerangaben. Die DIG-Markierung des PCR-Produkts wurde mittels einer Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.6.5) anhand der verringerten Laufgeschwindigkeit im Vergleich zu einem unmarkierten PCR-Produkt überprüft. Das markierte PCR-Produkt wurde mittels des „QIAquick PCR Purification“-Kits von Qiagen (Hilden) aufgereinigt (siehe 2.6.7.4).

Primerpaare für die Sondenherstellung

GAPDH-Sonde	1. SB44/SB45, 2. SB46/SB47
Pp71-Sonde	1. JH8 fwd/JH8 rev, 2. JH7 fwd/JH7 rev
US2-Sonde	1. KB10/KB11, 2. KB28/KB29
US3-Sonde	1. KB12/KB13, 2. KB30/KB31
US11-Sonde	1. KB16/KB17, 2. KB34/KB35

2.7.2.2 Agarose-Gelelektrophorese für RNA

Zur Gelelektrophorese wurde ein 25 cm × 20 cm großes, Formaldehyd (FA)-haltiges Gel mit einer Agarose-Konzentration von 1% hergestellt. Dazu wurden 4 g Agarose in 400 ml 1× FA-Puffer durch Aufkochen gelöst. Nach Abkühlen der Lösung auf 60°C wurde sie mit 7,2 ml FA (37%) und 20 µl Ethidiumbromid versetzt und in den Gelschlitten gegossen. Nach dem Erstarren wurde das Gel mit dem Gelschlitten in die Gelkammer eingesetzt und mit FA-Laufpuffer bedeckt. Zum Auftragen der aus infizierten Zellen isolierten Gesamt-RNA (siehe 2.7.1) wurde diese 1:1 mit Auftragspuffer gemischt, für 10 min bei 65°C denaturiert und danach für 5 min auf Eis abgekühlt. Der RNA-Marker wurde vor dem Auftragen auf die gleiche Weise behandelt. Die Elektrophorese wurde für 5 h mit 120 V bei 4°C durchgeführt und das Gel im Anschluss unter UV-Licht fotografiert. Dabei konnte anhand der Banden der zellulären ribosomalen 18S- und 28S-RNA die geladene Menge an Gesamt-RNA überprüft werden.

Reagenzien

10× FA-Puffer	41,86 g 3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure, 4,1 g Na-Acetat und 3,72 g EDTA in 1 l H ₂ O lösen, pH 7,0, autoklavieren
FA-Laufpuffer	200 ml 10× FA-Puffer und 10 ml FA (37%), mit H ₂ O ad 2 l
Auftragspuffer für RNA-Gele	80 µl EDTA (0,5 M, pH 8,0), 720 µl FA (37%), 2 ml Glycerin, 3084 µl Formamid, 4 ml 10× FA-Puffer, 100 µl H ₂ O und 1 Spatelspitze Bromphenolblau
RNA-Marker: „ssRNA Ladder“	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA

2.7.2.3 Blot und Detektion

Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert, in H₂O gespült und für 30 min in 20× SSC äquilibriert. Die RNA-Moleküle wurden im *dry blot*-Verfahren mittels Kapillartransfer auf die Nylonmembran übertragen. Dazu wurde eine für 30 min in 10× SSC äquilibrierte Nylonmembran auf das Gel gelegt und darüber drei Lagen in 10× SSC getränktes Whatman-Papier geschichtet. Abschließend wurden saugfähige Papiertücher aufgelegt und der Aufbau gleichmäßig mit Gewicht belastet. Über Nacht

wurden dann die RNA-Moleküle durch den Flüssigkeitstransfer vom Gel auf die Membran übertragen. Um die RNA-Moleküle kovalent an die Membran zu binden, wurde ein UV-Crosslinking mit $1,5 \text{ kJ} / \text{m}^2$ durchgeführt. Als Vorbereitung für die Hybridisierung der Sonden wurde die Membran in Church-Puffer für 2 h bei 50°C geschwenkt. Nachdem die Sondenmoleküle durch Kochen für 10 min denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt worden waren, wurden sie zu der Membran in den Church-Puffer hinzugegeben. Die Hybridisierung erfolgte bei 50°C über Nacht unter ständigen Schwenken. Die hybridisierten, DIG-markierten Sonden wurden über einen DIG-spezifischen Antikörper detektiert, der mit alkalischen Phosphatasen gekoppelt war. Dafür wurde die Membran zunächst für zweimal 15 min in Wasch-I-Lösung geschwenkt, um ungebundene Sonden zu entfernen, anschließend für dreimal 15 min in Wasch-II-Lösung bei 68°C unter stringenten Bedingungen gewaschen. Nach Äquilibrieren der Membran für 5 min in Wasch-III-Lösung wurde die Membran für 1 h in Puffer 2 geblockt. Der anti-DIG-Antikörper wurde 1:10.000 in Puffer 2 verdünnt und auf die Membran gegeben. Nach einer Inkubation für 30 min unter starkem Schütteln wurde die Membran dreimal für 15 min in Wasch-III-Lösung gewaschen und für 5 min in Puffer 3 äquilibriert. Anschließend wurde die Membran mit CSPD-Lösung für 5 min im Dunkeln inkubiert. Nach Entfernen der CSPD-Lösung wurde die Membran abschließend für 15 min bei 37°C inkubiert. Durch Auflegen von Röntgenfilm wurden die hybridisierten Sonden über den Umsatz des in der CSPD-Lösung enthaltenen Substrats durch die an die Antikörper gekoppelten alkalischen Phosphatasen detektiert.

Materialien

Nylonmembran, positiv geladen	Roche, Mannheim
„Whatman Chromatography Paper“, 3 mm	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Kodak Bio Max Röntgenfilm	Sigma, Deisenhofen

Reagenzien

20× SSC	3 M NaCl und 0,3 M Na-Citrat, pH 7,0, autoklaviert
10× SSC	1,5 M NaCl und 0,15 M Na-Citrat, pH 7,0, autoklaviert

Church-Puffer	35 g Natriumdodecylsulfat (SDS), 124,5 ml 20× SSC, 100 ml 10× <i>Blocking</i> -Reagenz, 5 ml 10% N-L-Sarkosyl, 25 ml 1 M NaHPO ₄ (pH 7,0) und 250 ml Formamid deionisiert, mit H ₂ O ad 500 ml, bei 65°C in Lösung bringen
10× <i>Blocking</i> -Reagenz	10% „blocking reagent for nucleic acid hybridization and detection“ (Roche, Mannheim) in Puffer 1
Wasch-I	2× SSC und 0,1% SDS
Wasch-II	0,5× SSC und 0,1% SDS
Wasch-III	0,5 l Puffer 1 + 1,5 ml Tween-20
Puffer 1	0,1 M Maleinsäure und 0,15 M NaCl, pH 7,5, autoklavieren
Puffer 2	10 ml 10× <i>Blocking</i> -Reagenz und 90 ml Puffer 1
Anti-DIG-Antikörper	„Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments“ von Roche, Mannheim
Puffer 3	25 ml 2 M Tris-HCl und 50 ml 1 M NaCl, mit H ₂ O ad 1 l, pH 9,5, autoklavieren
CSPD-Lösung	„CSPD chemiluminescence substrate“ (Roche, Mannheim) 1:100 in Puffer 3

2.8 Immunologische Methoden

2.8.1 *Enzyme-linked immuno spot assay* (ELISpot)

Mit Hilfe der IFN- γ -ELISpot-Analyse kann die MHC-I-vermittelte Antigenpräsentation durch infizierte Zellen quantitativ erfasst werden. Hierzu werden CTLs einer bestimmten Peptidspezifität und infizierte Zielzellen (hier HLA-A2-positive HFF) zusammen auf Membranen ausgesät, die zuvor mit IFN- γ -spezifischen Antikörpern beschichtet wurden. Diejenigen CTLs, die ihr spezifisches Peptid auf den Zielzellen erkennen, werden dadurch aktiviert und sezernieren IFN- γ . Das sezernierte IFN- γ wird von den

anti-IFN- γ -Antikörpern auf der Membran in der Nähe der aktivierten CTLs gebunden. Nach dem Entfernen der Zellen wird das gebundene IFN- γ durch die Zugabe von IFN- γ -spezifischen, Biotin-gekoppelten Antikörpern detektiert. An diese werden über eine Biotin-Streptavidin-Interaktion Peroxidasen gebunden, die ein Substrat in ein farbiges Produkt umsetzen. Dadurch werden auf der Membran Spots sichtbar. Jeder Spot repräsentiert eine aktivierte CTL. Über die Bestimmung der Anzahl der Spots kann auf das Ausmaß der Antigenpräsentation der infizierten Zellen geschlossen werden.

Für die ELISpot-Analyse wurden 96-Well-Platten eingesetzt, deren Boden entweder aus Nylonmembran (Platten von NUNC, Wiesbaden) oder aus Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Platten von Millipore, Billerica, MA, USA) bestand. Zur Beschichtung mit anti-IFN- γ -Antikörpern wurde auf NUNC-Platten 50 μ l einer *Coating*-Antikörper-Lösung (10 μ g / ml *Coating*-Antikörper in *Coating*-Puffer) pro Vertiefung gegeben. Millipore-Platten wurden zunächst mit 20 μ l 35% Ethanol pro Vertiefung befeuchtet, dann dreimal mit 150 μ l 1 \times PBS pro Vertiefung gewaschen und mit 60 μ l einer *Coating*-Antikörper-Lösung (5 μ g / ml *Coating*-Antikörper in 1 \times PBS) pro Vertiefung beschichtet. Die Platten wurden bei 4°C über Nacht inkubiert. Danach wurden NUNC-Platten viermal mit 200 μ l H₂O pro Vertiefung gewaschen, Millipore-Platten dreimal mit 150 μ l 1 \times PBS pro Vertiefung. Zum Blockieren der bei der Beschichtung frei gebliebenen Bindungsstellen auf der Membran wurden in die Vertiefungen der NUNC-Platten jeweils 200 μ l Medium, in die Vertiefungen der Millipore-Platten jeweils 100 μ l Medium gegeben. Die Blockierung erfolgte für mindestens 2 h bei 37°C im CO₂-Inkubator. Währenddessen wurden Zielzellen und die CTLs für das Aussäen auf die Platten vorbereitet. Alle Ansätze wurden in Triplikaten durchgeführt.

Die Zielzellen wurden gezählt und auf eine Konzentration von 2×10^6 Zellen / ml (für 1×10^5 Zellen pro Vertiefung) oder von 1×10^6 Zellen / ml (für 5×10^4 Zellen pro Vertiefung) in Medium eingestellt. Zur Kontrolle der Funktion der CTLs wurden neben den infizierten HFF auch peptidbeladene T2-Zellen eingesetzt. Deren Zellsuspension wurden nach dem Einstellen der Konzentration auf 2×10^6 Zellen / ml mit 10^{-5} M des jeweiligen Peptids versetzt, das die CTLs spezifisch erkennen (siehe 2.4.3). Die CTLs wurden ebenfalls gezählt und auf die gewünschte Konzentration in Medium eingestellt. In der Regel wurden 200 CTLs pro Vertiefung eingesetzt, wofür die Konzentration auf 4×10^3 Zellen / ml eingestellt wurde.

Nach dem Blocken wurden die Platten ausgeschlagen und in die Vertiefungen 50 µl Medium, 50 µl Zielzell-Suspension und 50 µl CTL-Suspension gegeben. Anschließend wurden die Platten bei 37°C für 18 bis 22 h bei 37°C im CO₂-Inkubator inkubiert.

Zur Detektion des an die Plattenmembran gebundenen IFN- wurden die ausgesäten Zellen zunächst durch zehnmaliges Waschen mit Waschpuffer von der Membran entfernt. Dabei verblieb der Waschpuffer bei jedem Waschschritt für 2 min auf der Membran. Auf NUNC-Platten wurden dann 50 µl einer Detektions-Antikörper-Lösung (1 µg / ml Detektions-Antikörper in Detektions-Puffer) pro Vertiefung gegeben und für 2 h bei RT inkubiert. Auf Millipore-Platten wurden 60 µl einer Detektions-Antikörper-Lösung (1 µg / ml Detektions-Antikörper in Detektions-Puffer) pro Vertiefung gegeben und für 2 h bei 37°C im CO₂-Inkubator inkubiert. Anschließend wurden nicht gebundene Antikörper durch mehrmaliges Waschen mit Waschpuffer (NUNC-Platten fünfmaliges Waschen, Millipore Platten sechsmaliges Waschen) entfernt. Zur Bindung von Peroxidasen an die auf der Membran verbliebenen Detektions-Antikörper wurde auf die Platten eine 1:250 Verdünnung eines HRPO-Streptavidin-Konjugats in Waschpuffer mit 5% FKS gegeben und bei RT inkubiert. Bei NUNC-Platten wurde pro Vertiefung 50 µl der Verdünnung eingesetzt, bei Millipore-Platten 60 µl. Die Inkubationszeit war für NUNC-Platten 1,5 h, für Millipore-Platten 2 h. Das Abwaschen der nicht gebundenen Peroxidasen erfolgte bei NUNC-Platten durch fünfmaliges Waschen mit Waschpuffer, bei Millipore-Platten durch dreimaliges Waschen mit Waschpuffer und anschließendes dreimaliges Waschen mit 1× PBS. Für die Färbung der Spots wurde AEC als Peroxidase-Substrat eingesetzt. Auf NUNC-Platten wurden 50 µl pro Vertiefung einer AEC-Färbelösung gegeben, auf Millipore-Platten 60 µl pro Vertiefung. Die Platten wurden 5 bis 10 min bei RT inkubiert. Die Farbreaktion wurde durch Waschen mit H₂O gestoppt. Nach dem Trocknen der Membranen wurde die Auswertung bei zehnfacher Vergrößerung in einem Binokular vorgenommen.

Materialien

NUNC-Platte („Silent Screen Plate“)	NUNC, Wiesbaden
Millipore-Platte („Multiscreen HTS, IP“)	Millipore, Billerica, MA, USA

Reagenzien NUNC-Platten

Waschpuffer	1× PBS mit 0,25% Tween-20
Stammlösung A	1,59 g Na ₂ CO ₃ mit H ₂ O ad 100 ml

Stammlösung B	2,93 g NaHCO ₃ mit H ₂ O ad 100 ml
<i>Coating</i> -Puffer	1 ml Stammlösung A und 1 ml Stammlösung B mit H ₂ O ad 10 ml, pH 9,6 (eingestellt mit Stammlösung B)
Detektions-Puffer	1× PBS mit 1% bovines Serumalbumin (BSA)-Lösung (23,3%; von Ortho Diagnostic Systems, Neckargemünd)
Acetat-Puffer	74 ml 0,2 M Essigsäure (11,5 ml Eisessig / l) und 176 ml 0,2 M Natriumacetat mit H ₂ O ad 1 l, pH 5,0
AEC-Färbelösung	9,5 ml Acetat-Puffer und 500 µl AEC-DMF-Lösung, nach Filtration Zugabe von 5 µl 30% H ₂ O ₂
<i>Reagenzien Millipore-Platten</i>	
Waschpuffer	1× PBS mit 0,01% Tween-20
Detektions-Puffer	1× PBS mit 0,5% BSA-Lösung (23,3%; von Ortho Diagnostic Systems, Neckargemünd), steril filtriert
Acetat-Puffer	2,88 g Natriumacetat und 14,7 ml Eisessig mit H ₂ O ad 1 l
AEC-Färbelösung	9,5 ml Acetat-Puffer und 500 µl AEC-DMF-Lösung, nach Filtration Zugabe von 5 µl 30% H ₂ O ₂
<i>Allgemeine Reagenzien</i>	
5× PBS	40 g NaCl, 1 g KCl, 6,5 g Na ₂ HPO ₄ und 1 g KH ₂ PO ₄ mit H ₂ O ad 1 l
<i>Coating</i> -Antikörper	Ratte- -Maus-IFN- Klon RMMG-1 von Biosource Europe (Solingen)
Medium	RPMI 1640 Medium mit 10% FKS, 2 mM L-Glutamin, 50 mg / l Gentamycin und 5 µM -Mercaptoethanol

Detektions-Antikörper	Biotin-gekoppelter Ratte- Klon XMG 1.2 von Becton Dickinson (Heidelberg)
HRPO-Streptavidin-Konjugat	Dianova, Hamburg
FKS	Biochrom, Berlin oder Invitrogen, Karlsruhe
AEC-DMF-Lösung	200 mg AEC in 25 ml DMF

2.8.1.1 Analyse von infizierten Zellen unter IE-Bedingungen

Um infizierte HFF in der IE-Phase der Infektion mittels ELISpot untersuchen zu können, wurde die Infektion durch eine CH/ActD-Behandlung der infizierten Zellen in der IE-Phase arretiert (siehe 2.5.3.1). Im Anschluss daran wurden die Zellen mit Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Dazu wurden die HFF abgelöst und zentrifugiert. Das Pellet wurde in 150 µl PBS aufgenommen. Zu dieser Zellsuspension wurden 50 µl der PFA-Lösung (Endkonzentration: 0,5% PFA) gegeben und das Gemisch für 20 bis 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit 10 ml PBS gewaschen, gezählt und in den ELISpot eingesetzt. Hierzu wurden 1.000 oder 5.000 IE1-spezifische CTLs pro Vertiefung verwendet. Diese hohe Anzahl an CTLs wurde notwendig, da die Erkennung von PFA-fixierten Zielzellen durch IE1-spezifische CTLs im Vergleich zu unfixierten Zielzellen vermindert war.

Beim Einsatz von 5.000 CTLs pro Vertiefung wurden die IE1-CTLs zuvor anhand ihrer CD8-Expression aus ihrer Kultur immunomagnetisch angereichert. Dadurch sollte eine störende Wirkung der in der CTL-Linien-Kultur ebenfalls enthaltenen Stimulatorzellen auf den ELISpot verhindert werden. Für die Anreicherung wurde das MACS-System von Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach) verwendet. Zunächst wurden die Zellen aus einer Vertiefung der 6-Well-Platte der IE1-CTL-Linien-Kultur für 5 min bei 1.500 rpm in der Megafuge 2.0 pelletiert und in 90 µl MACS-Puffer resuspendiert. Nach der Zugabe von 10 µl MACS *MicroBeads* gegen humanes CD8 folgte eine Inkubation für 15 min bei 4°C unter ständiger Bewegung. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 2 ml MACS-Puffer gewaschen, wobei die Zentrifugationsschritte bei 1.200 rpm für 10 min in der Megafuge 2.0 erfolgten. Abschließend wurden die Zellen in 500 µl MACS-Puffer aufgenommen und auf eine LS *column* gegeben. Die MACS-Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

Reagenzien

PBS	Invitrogen, Karlsruhe (136 mM NaCl; 26 mM KCl; 8 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,5 mM KH ₂ PO ₄)
PFA-Lösung	2% PFA in PBS (Invitrogen, Karlsruhe)
MACS-Puffer	0,5% BSA und 2 mM EDTA in PBS

2.9 Analyse von Proteinen**2.9.1 Verwendete Antikörper****Primärantikörper**

Die nachfolgend aufgelisteten Primärantikörper wurden zum spezifischen Proteinnachweis in der Durchflusszytometrie oder im Western Blot verwendet. Die dabei eingesetzten Verdünnungen sind jeweils angegeben.

Spezifität	Bezeichnung	Herkunft	Hersteller	Durchflusszytometrie	WB
HLA-ABC	Klon W6/32	Maus	Dako, Hamburg	1:15	-
HLA-A2	Klon BB7.2	Maus	Becton Dickinson, Heidelberg	1:10	-
-Aktin		Kaninchen	Rockland, Gilbertsville, PA, USA	-	1:2.000
pp65	Klon 65-33	Maus	Dr. W. Britt, Birmingham, AL, USA	-	1:500
pp71	vC-20	Ziege	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	-	1:200
pUL44	BS510	Maus	Biotest, Dreieich	-	unverdünnt

Sekundärantikörper

Zur Detektion der gebundenen Primärantikörper wurden Sekundärantikörper verwendet, die mit einem Marker gekoppelt waren. Die dabei eingesetzten Verdünnungen sind jeweils angegeben.

Spezifität	Modifikation	Herkunft	Hersteller	Durchflusszytometrie	WB
Maus IgG, IgA und IgM	FITC	Kaninchen	Dako, Hamburg	1:15	-
Maus IgG	PE	Ziege	R&D Systems, Wiesbaden	1:2	-
Kaninchen IgG	Alexa Fluor 680	Ziege	Invitrogen, Karlsruhe	-	1:10.000
Maus IgG	IRDye 800	Ziege	Rockland, Gilbertsville, PA, USA	-	1:10.000
Ziege IgG	IRDye 800	Esel	Rockland, Gilbertsville, PA, USA	-	1:5.000

2.9.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Analyse der Expression von Proteinen auf Einzelzell-Niveau. Dabei können sowohl Proteine analysiert werden, die auf der Oberfläche der Zelle vorhanden sind, als auch Proteine, die im Zellinneren vorliegen. Bei der Durchflusszytometrie passieren Zellen einzeln nacheinander einen Laserstrahl. Aufgrund der Streuung des Laserstrahls durch die Zelle können Aussagen über die Größe der Zelle (*Forward Scatter*) und ihre Granularität (*Side Scatter*) getroffen werden. Wenn Proteine der Zelle zuvor mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern gefärbt wurden, kann auch über die Messung der durch den Laserstrahl angeregten Fluoreszenz die Expression der gefärbten Proteine analysiert werden.

HFF aus einer 10 cm Zellkulturschale (ca. 5×10^5 Zellen) wurden abgelöst und in FACS-Puffer gewaschen. Die Bindung von Primärantikörper (siehe 2.9.1) erfolgte in einem Volumen von 10 bis 15 μl für 30 min bei 4°C. Nach einem Waschschrift mit FACS-Puffer wurden die Zellen in 10 bis 15 μl der Sekundärantikörper-Verdünnung (siehe 2.9.1) aufgenommen und für weitere 30 min bei 4°C inkubiert. Nach einem erneuten

Waschschritt mit FACS-Puffer wurden die Zellen in einem geeigneten Volumen FACS-Puffer aufgenommen und im Durchflusszytometer analysiert. Für jede Probe wurde eine Kontrolle für die Hintergrundfärbung durch den Sekundärantikörper mitgeführt. Diese Hintergrund-Kontrolle wurde hergestellt, indem die Zellen zwar mit dem Sekundärantikörper, nicht jedoch mit dem Primärantikörper inkubiert wurden. Die Auswertung erfolgte bei der Messung am FACSort-Durchflusszytometer mit Hilfe der CellQuest-Software von Becton Dickinson (Heidelberg), bei der Messung am Cytomics FC500-Durchflusszytometer mit der CXP-Software von Beckman Coulter (Krefeld). Für jede Probe wurde die spezifische mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) errechnet. Dazu wurde die MFI der Zellen der Hintergrund-Kontrolle von der MFI der mit Primär- und Sekundärantikörper inkubierten Zellen abgezogen. Falls innerhalb einer Probe eine Subpopulation ungefärbter Zellen detektiert wurde, so wurde diese nicht in die Berechnung der spezifischen MFI einbezogen.

Reagenzien

PBS	Invitrogen, Karlsruhe (136 mM NaCl; 26 mM KCl; 8 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,5 mM KH ₂ PO ₄)
FACS-Puffer	PBS mit 0,4% BSA, 0,03% NaN ₃ , 10 mM EDTA und 20 mM HEPES, sterilfiltriert

2.9.3 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration einer Lösung wurde mit Hilfe des „BCA Protein Assay“-Kits von Pierce (Rockford, IL, USA) bestimmt. Diese Methode basiert auf den Farbwechsel einer Reagenzlösung, der proportional zur Proteinkonzentration der Probe ist und photometrisch gemessen werden kann. Die Durchführung erfolgte laut Herstellerangaben.

2.9.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli wurde eingesetzt, um Proteine in einer Probe nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen (Laemmli, 1970). Dabei werden Proteine durch das anionische Detergenz SDS sowohl denaturiert als auch gleichmäßig negativ geladen. In der nachfolgenden Elektrophorese werden dann die Proteine anhand ihres Laufverhaltens durch ein Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Der Gehalt an Acrylamid bestimmt die Maschengröße des Gels und somit auch die Laufgeschwindigkeit der Proteine. Bei der

hier eingesetzten diskontinuierlichen Gelelektrophorese laufen die Proteine durch ein zweiteiliges Polyacrylamid-Gel, bestehend aus Sammel- und Trenngel. Bei ihrem Lauf durch das Sammelgel werden die Proteine zunächst in einer schmalen Bande aufkonzentriert. Die eigentliche Auftrennung der Proteine erfolgt anschließend in einem Trenngel mit 8% Polyacrylamid.

Zur Analyse von Proteinen in infizierten HFF wurden Gesamtzellextrakte hergestellt. Dazu wurden die Zellen abgelöst und gezählt. Anschließend wurden die Zellen in SDS-Auftragspuffer aufgenommen, wobei eine Konzentration von 1×10^5 Zellen / 10 μ l eingestellt wurde. Nach Kochen der Suspension für 10 min im Wasserbad wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Auf das Gel wurden 10 μ l der Proben aufgetragen, was 1×10^5 Zellen entsprach. Vor dem Auftragen wurden die Proben erneut für 10 min im Wasserbad gekocht.

Sollten aufgereinigte Viruspartikel (siehe 2.5.7) untersucht werden, wurde zunächst die Proteinkonzentration der Partikelsuspension bestimmt (siehe 2.9.3). Anschließend wurde die gewünschte Menge an Suspension vor dem Auftragen 1:1 mit SDS-Auftragspuffer vermischt und für 10 min im Wasserbad gekocht. In der Regel wurde eine Proteinmenge von 2 μ g geladen.

Um die Größen der Proteine abschätzen zu können, wurde zusätzlich ein vorgefärbter Molekulargewichtsstandard auf das Gel geladen. Die Gelelektrophorese wurde bei 50 V über Nacht durchgeführt. Nach Abschluss der Elektrophorese wurde das Polyacrylamid-Gel zur Analyse der Proteine entweder mit Coomassie gefärbt oder in einen Western Blot eingesetzt.

Reagenzien

Sammelgel	2,1 ml Gel 30 (Acrylamid:Bisacrylamid-Verhältnis 37:1), 8,65 ml H ₂ O, 1,5 ml Tris 1,0 M (pH 6,8), 125 μ l 10% SDS, 125 μ l 10% APS und 15 μ l TEMED
Trenngel	6,7 ml Gel 30, 11,5 ml H ₂ O, 6,25 ml Tris 1,5 M (pH 8,8), 250 μ l 10% SDS, 250 μ l 10% APS und 15 μ l TEMED
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin und 0,1% SDS in H ₂ O

SDS-Auftragspuffer	125 mM Tris, 2% -Mercaptoethanol, 10% Glycerin, 1 mM EDTA, 0,005% Bromphenolblau und 2% SDS in H ₂ O
Molekulargewichtsstandard	„PeqGOLD Prestained Protein Marker IV“ von PeqLab (Erlangen)

2.9.5 Coomassie-Färbung

Die kolloidale Coomassie-Färbung wurde genutzt, um Proteine auf einem Polyacrylamid-Gel nach der Gelelektrophorese (siehe 2.9.4) anzufärben (Diezel *et al.*, 1972; Neuhoff *et al.*, 1988).

Das Polyacrylamid-Gel wurde zunächst für 30 bis 60 min in einer 12% TCA-Lösung inkubiert. Nach zwei Waschschritten in H₂O für jeweils 10 min wurde das Gel in der frisch angesetzten Färbelösung inkubiert, bis eine hinreichende Färbung erreicht war. Es folgten zwei Waschschrritte in H₂O für 10 min, ein Waschschrtritt in 25% Methanol für 1 h und erneut zwei Waschschrritte in H₂O für 10 min. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe des „Odyssey Imagers“ von LI-COR (Lincoln, NE, USA).

Reagenzien

Stammlösung 1	1 g Coomassie <i>Brilliant Blue</i> G-250 in 20 ml H ₂ O
Stammlösung 2	10 g 85% Phosphorsäure und 50 g Ammoniumsulfat mit H ₂ O ad 500 ml
Stammfärbelösung	0,1% Stammlösung 1 in Stammlösung 2
Färbelösung	80 ml Stammfärbelösung und 20 ml Methanol

2.9.6 Western Blot

Die Western Blot-Analyse ist eine Methode zum immunologischen Nachweis von Proteinen in einer Probe im Anschluss an eine Gelelektrophorese (siehe 2.9.4). Dabei werden die aufgetrennten Proteine zunächst von dem Polacrylamid-Gel mittels Elektroblothing auf eine PVDF-Membran transferiert. Anschließend werden die Proteine von Interesse durch gegen sie gerichtete Primärantikörper gebunden. Die Detektion der gebundenen Primärantikörper kann durch Fluoreszenz-markierte Sekundärantikörper erfolgen, deren Fluoreszenzsignal mittels des „Odyssey Imagers“ von LI-COR (Lincoln, NE, USA) sichtbar gemacht wird (Antikörper und verwendete Verdünnungen siehe 2.9.1). Die Intensität des Fluoreszenzsignals und damit die

Menge der gebundenen Sekundärantikörper sind von der Menge der gebundenen Primärantikörper abhängig. Diese ist wiederum abhängig von der Menge des an die Membran gebundenen, untersuchten Proteins. Somit lassen sich von der detektierten Fluoreszenzintensität Rückschlüsse auf die Menge des in der Probe enthaltenen Proteins ziehen. Außerdem ist es mit dem „Odyssey“-System möglich, in einer Probenspur zwei Proteine gleichzeitig spezifisch zu detektieren. Für die Markierung der Sekundärantikörper stehen zwei unterschiedliche Fluoreszenzmarker zur Verfügung, die von dem „Odyssey Imager“ in zwei getrennten Kanälen detektiert werden und denen bei der Analyse unterschiedliche Farben zugeordnet werden. Die Primärantikörper / Sekundärantikörper-Paare können dann so gewählt werden, dass die Proteinbanden bei der Analyse in unterschiedlichen Farben erscheinen.

Nach der Gelelektrophorese wurde das Polyacrylamid-Gel zunächst in H₂O gewaschen und zum Äquilibrieren für mindestens 10 min in Transferpuffer gelegt. Die auf Gelgröße zurechtgeschnittene Membran wurde für 5 min in Methanol inkubiert, in H₂O gespült und ebenfalls für mindestens 10 min in Transferpuffer äquilibriert. Anschließend wurde der Blot in einer Elektroblo-Apparatur aufgebaut. Dazu wurden auf die Kathodenplatte drei Lagen in Transferpuffer getränktes Whatman-Papier gelegt. Darauf wurden die Membran, das Gel und zum Abschluss drei Lagen in Transferpuffer getränktes Whatman-Papier geschichtet. Die Apparatur wurde durch Auflegen der Anodenplatte geschlossen. Der Proteintransfer erfolgte bei 400 mA für 1 h und 45 min. Nach Abbau des Blots wurde die Membran für 1 bis 2 h an der Luft trocknen gelassen. Nach der Reaktivierung der Membran durch Schwenken in Methanol, Spülen in H₂O und einer Inkubation in 1× PBS für 5 min wurden die freien Bindungsstellen auf der Membran durch eine Inkubation für 1 h in *Blocking*-Puffer blockiert. Danach wurde eine Verdünnung von maximal zwei Primärantikörpern gleichzeitig in Färbepuffer hergestellt und auf die Membran gegeben. Nach einer Inkubation über Nacht wurde die Membran dreimal für 10 min mit Waschpuffer gewaschen und eine Verdünnung von maximal zwei Sekundärantikörpern gleichzeitig in Färbepuffer, versetzt mit 0,01% SDS, auf die Membran gegeben. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln für 2 h. Sollten als Sekundärantikörper der IRDye 800 Esel-anti-Ziege-Antikörper und der Alexa Fluor 680 Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper zusammen eingesetzt werden, wurde für jeden Antikörper eine eigene Verdünnung hergestellt (Verdünnung des anti-Kaninchen-Antikörpers ohne SDS-Zusatz) und die Lösungen nacheinander auf die Membran gegeben. Zunächst wurde die Membran mit der Verdünnung des anti-Ziege-Antikörpers für 1 h im Dunkeln inkubiert. Nach drei Waschschritten mit Waschpuffer für

15 min im Dunkeln wurde dann die Verdünnung des anti-Kaninchen-Antikörpers auf die Membran gegeben und für 1 h im Dunkeln inkubiert. Dieser sequentielle Einsatz der Sekundärantikörper war nötig, da sonst der Esel-anti-Ziege-Sekundärantikörper nicht nur einen der Primärantikörper, sondern auch den Ziege-anti-Kaninchen-Sekundärantikörper gebunden hätte. Abschließend wurde die Membran zweimal in Waschpuffer und einmal in 1× PBS gewaschen und die Fluoreszenzsignale im „Odyssey Imager“ detektiert. Die Auswertung und gegebenenfalls eine Quantifizierung der Fluoreszenzsignale erfolgten mit Hilfe der zum Gerät gehörigen Software von LI-COR (Lincoln, NE, USA).

Materialien

PVDF-Membran Immobilon-FL	Millipore, Billerica, MA, USA
„Whatman Chromatography Paper“, 3 mm	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Reagenzien

5× PBS	40 g NaCl, 1 g KCl, 6,5 g Na ₂ HPO ₄ und 1 g KH ₂ PO ₄ mit H ₂ O ad 1 l
Transferpuffer	25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin und 10% Methanol in H ₂ O
<i>Blocking</i> -Puffer	5% Milchpulver in 1× PBS
Färbepuffer	5% Milchpulver und 0,1% Tween-20 in 1× PBS
Waschpuffer	0,2% Tween-20 in 1× PBS

3 Ergebnisse

3.1 Immunevasive Funktion von pp71 in infizierten HFF

Für pp71 wurde in der Literatur ein immunevasiver Effekt auf die MHC-I-vermittelte Antigenpräsentation in infizierten humanen Glioblastomzellen beschrieben (Trgovcich *et al.*, 2006). In diesem Teil der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob pp71 auch während der Infektion von HFF, die zu den für HCMV hoch permissiven Zelltypen gehören (Sinzger *et al.*, 1995), eine immunevasive Funktion aufweist.

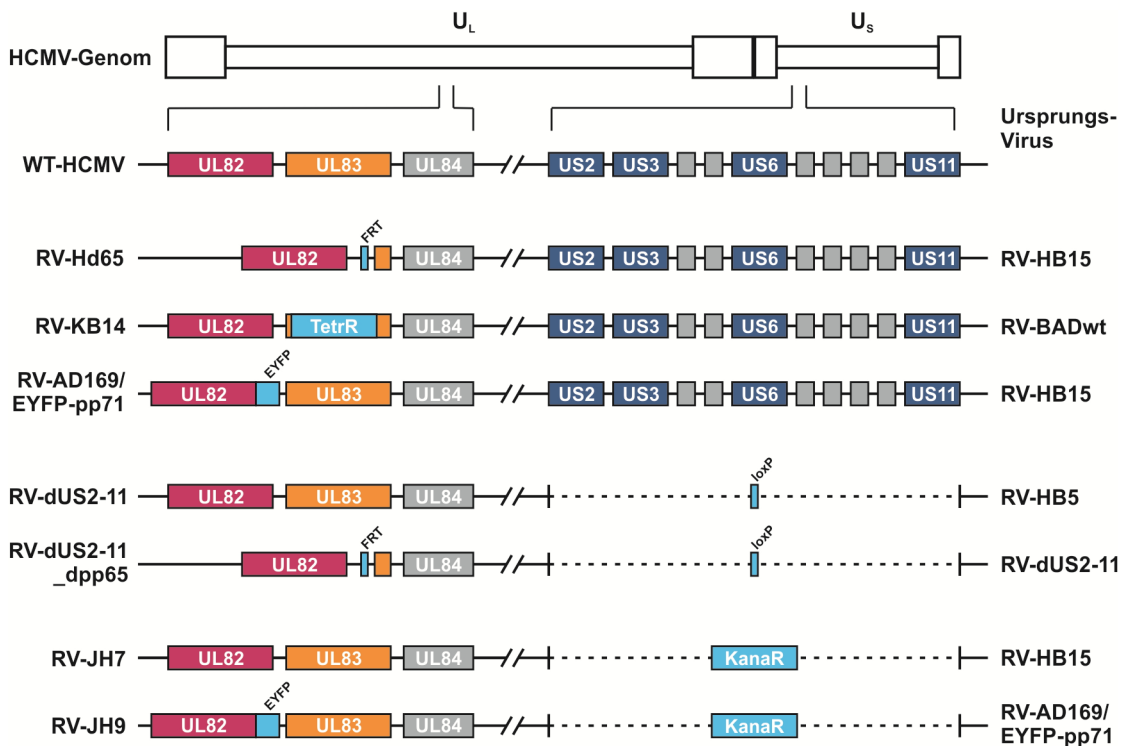


Abb. 7: Schematische Übersicht der zur Analyse der immunevasiven Funktion von pp71 verwendeten Virusmutanten

In der obersten Zeile ist das HCMV-Genom mit seinen *unique long* (UL)- und *unique short* (US)-Regionen zu sehen. In den Zeilen darunter sind die Bereiche der Gene von UL82 bis UL84 und US2 bis US11 der WT-Stämme und der verschiedenen Virusmutanten detaillierter dargestellt. UL82, das Gen von pp71, ist in rot eingefärbt, UL83, das Gen von pp65, in orange, die Gene der Immunevasine gpUS2, gpUS3, gpUS6 und gpUS11 in dunkelblau. Zusätzlich eingefügte DNA-Abschnitte sind in hellblau dargestellt. Rechts neben der Darstellung der Genombereiche sind die Ursprungsviren aufgelistet, aus deren Genomen die Virusmutanten hergestellt wurden. (EYFP: *enhanced yellow fluorescent protein*; FRT: Erkennungssequenz für Flp-Rekombinase; KanaR: Kanamycinresistenz-Kassette; loxP: Erkennungssequenz für Cre-Rekombinase; TetrR: Tetracyclinresistenz-Kassette)

3.1.1 Identifikation und Charakterisierung von HCMV-Mutanten zur Analyse der immunevasiven Funktion von pp71

Pp71 ist für eine effiziente HCMV-Replikation notwendig. HCMV-Mutanten mit einer Deletion von pp71 weisen in HFF einen Wachstumsdefekt auf (Bresnahan and Shenk, 2000). Bei dem Einsatz von pp71-Deletionsmutanten in der Untersuchung der immunevasiven Funktion von pp71 in infizierten HFF wäre ein immunevasiver Effekt von pp71 nur schwer von Effekten zu unterscheiden, die auf dem Wachstumsdefekt beruhen. Daher wurde für die Untersuchung eine Herangehensweise gewählt, die auf einer verstärkten Expression von pp71 durch HCMV-Mutanten basiert.

Grundlage dafür war unsere überraschende Beobachtung, dass Virusüberstände einer im Labor hergestellten Mutante [RV-Hd65 (Besold *et al.*, 2007); siehe Abb. 7] im Vergleich zum Ausgangsstamm [RV-HB15 (Besold *et al.*, 2007; Hobom *et al.*, 2000)] einen deutlich erhöhten, über die Anzahl an IE1-positiven Zellen bestimmten Virustiter zeigten (Abb. 8). In dieser Mutante war gezielt das dem pp71-Gen (UL82) benachbarte Gen für pp65 (UL83) deletiert worden.

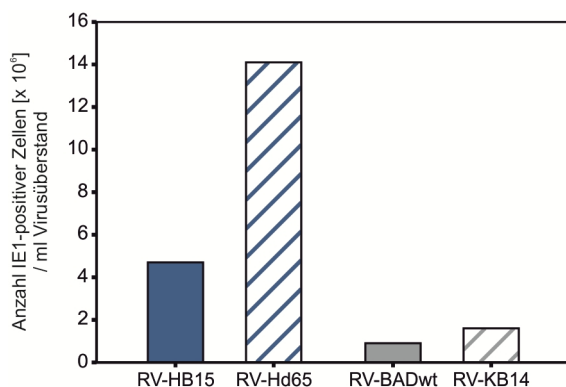


Abb. 8: Virustiter der pp65-Deletionsmutanten RV-Hd65 und RV-KB14 im Vergleich zu den Ausgangsstämmen

Zur Bestimmung der Virustiter wurden 5×10^3 HFF im Achtfachansatz mit einer 10^{-4} -Verdünnung der Virusüberstände von RV-HB15, RV-Hd65, RV-BADwt oder RV-KB14 infiziert. Nach 48 Stunden wurden IE1-positive Zellen mit Hilfe des IE1-spezifischen monoklonalen Antikörpers p63/27 angefärbt und gezählt. Für jedes Virus wurde die Anzahl an IE1-positiven Zellen aus den acht Ansätzen gemittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

Eine naheliegende Erklärung für den erhöhten Virustiter war, dass RV-Hd65-infizierte HFF mehr infektiöse Partikel freisetzen und dass dies zu mehr infizierten Zellen in den nachfolgenden Infektionsrunden führte. Diese Annahme konnte jedoch durch die Analyse viraler Genome im Überstand infizierter HFF mittels quantitativer PCR widerlegt werden (Abb. 9A).

Es war aber auch bekannt, dass pp71 eine wichtige Rolle in der Induktion der viralen IE-Genexpression spielt (Bresnahan and Shenk, 2000; Liu and Stinski, 1992). Durch eine verstärkte Expression von pp71 in RV-Hd65-infizierten Zellen könnte daher die IE-Expression in diesen Zellen stimuliert worden sein. Deswegen wurde beschlossen, RV-Hd65 näher zu charakterisieren.

Parallel zu RV-Hd65 wurde eine weitere pp65-Deletionsmutante (RV-KB14; generiert von K. Besold, Mainz) in die Analysen einbezogen. Diese Mutante zeigte den Phänotyp von RV-Hd65 nicht (Abb. 8 und Abb. 9B). Bei RV-KB14 war die Deletion von UL83 aus dem HCMV-Genom in anderer Weise erfolgt als bei RV-Hd65 (siehe Abb. 7). Diese Mutante wurde daher als negative Kontrolle vorgesehen.

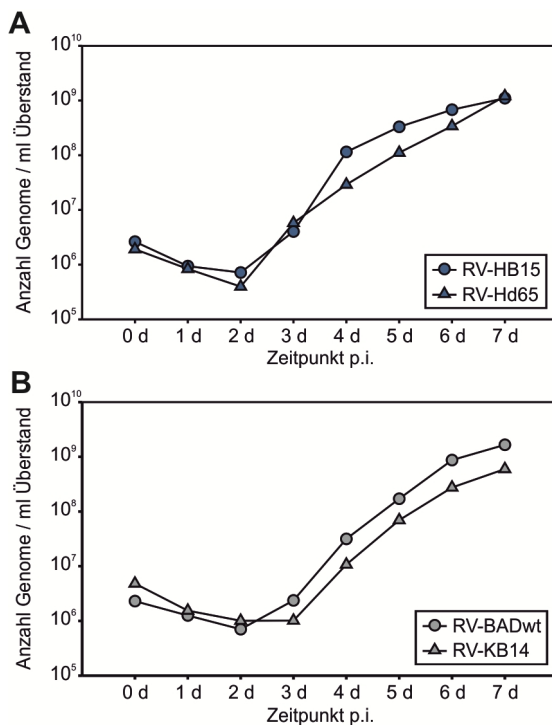


Abb. 9: Freisetzung viraler Genome in die Kulturüberstände RV-Hd65- und RV-KB14-infizierter HFF

HFF wurden mit einer pp65-Deletionsmutante oder dem dazugehörigen Ausgangsstamm infiziert. Die Infektionsstärke wurde dabei auf die Anzahl von viralen Genomen pro Zelle normiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben des Zellkulturmediums entnommen und die Anzahl der darin enthaltenen viralen Genome mittels quantitativer PCR ermittelt. Die gezeigten Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

A: Infektion mit RV-HB15 oder RV-Hd65 mit einer Infektionsstärke von 10 Genomen / Zelle. Die Titer der Virusstocks wurden über die Anzahl der im Stock enthaltenen viralen Genome bestimmt.

B: Infektion mit RV-BADwt oder RV-KB14 mit einer Infektionsstärke von 4 Genomen / Zelle. Die Titer der Virusstocks wurden über die Anzahl der viralen Genome in infizierten Zellen bestimmt.

2.1.1.1 pp71-Expression in HFF nach Infektion mit pp65-Deletionsmutanten

In einem ersten Ansatz wurden Western Blot-Analysen an Lysaten infizierter Zellen durchgeführt, um den Gehalt an pp71 zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion zu ermitteln. Dazu wurden HFF mit 125 Genomen / Zelle infiziert. Nach 24, 48, 72 und 96 Stunden Infektion wurden die infizierten Zellen gewonnen. Die Proteine der Zelllysate aus jeweils 1×10^5 Zellen pro Spur wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot unter Verwendung des „Odyssey“-Systems von LI-COR (Lincoln, NE, USA) auf den Gehalt an pp71 untersucht (Abb. 10). Als interner Standard wurde zusätzlich der Gehalt der Zelllysate an zellulärem -Aktin bestimmt. Zur relativen Quantifizierung wurde der pp71-Gehalt mit dem -Aktin-Gehalt in Beziehung gesetzt (Abb. 10B+D).

Wie erwartet war der pp71-Gehalt in RV-Hd65-infizierten Zellen im Vergleich zu RV-HB15-infizierten Zellen gesteigert (Abb. 10B). Hingegen war der pp71-Gehalt in

RV-KB14-infizierten Zellen im Vergleich zu RV-BADwt-infizierten Zellen nicht erhöht (Abb. 10D). Diese Ergebnisse unterstützten die Annahme, dass der erhöhte Virustiter von RV-Hd65 durch eine verstärkte pp71-Expression vermittelt wurde.

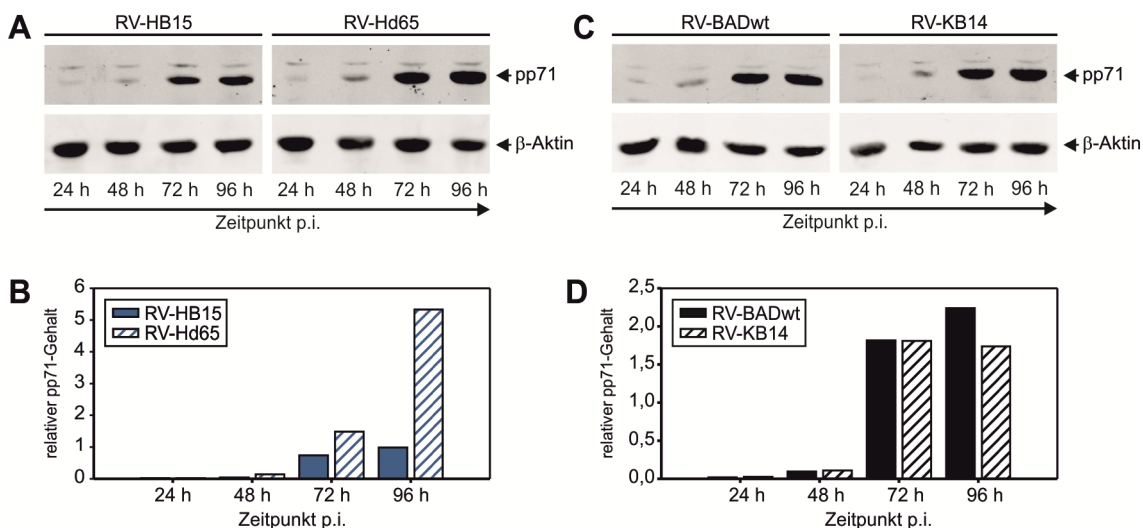


Abb. 10: Pp71-Gehalt in RV-Hd65- und RV-KB14-infizierten HFF im Verlauf der Infektion

HFF wurden mit (A+B) RV-HB15 und RV-Hd65 oder (C+D) RV-BADwt und RV-KB14 mit einer Infektionsstärke von 125 Genomen / Zelle infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Zelllysate der infizierten Zellen hergestellt. Diese wurden mittels Western Blot unter Verwendung des pp71-spezifischen polyklonalen Antikörpers vC-20 und des β -Aktin-spezifischen polyklonalen Antikörpers von Rockland (Gilbertsville, PA, USA) auf den Gehalt der Proteine pp71 und β -Aktin (als interner Standard) hin untersucht. Dazu wurde in die SDS-PAGE jeweils Zelllysate aus 1×10^5 Zellen pro Spur eingesetzt.

A+C: Detektion der Proteine auf der Western Blot-Membran mit Hilfe fluoreszierender Sekundäntikörper mittels des „Odyssey Imagers“ von LI-COR (Lincoln, NE, USA).

B+D: Quantifizierung der Signale mit Hilfe der „Odyssey Imager“-Software. Dargestellt ist der relative pp71-Gehalt, errechnet durch die Division der pp71-Fluoreszenzintensität durch die β -Aktin-Fluoreszenzintensität.

Die gezeigten Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Um zu überprüfen, ob der gesteigerte pp71-Gehalt auf eine verstärkte Expression von UL82 zurückzuführen war, wurde eine Northern Blot-Analyse durchgeführt. Hierzu wurden HFF mit 125 Genomen / Zelle infiziert. Gesamtzelluläre RNA wurde ein, zwei, drei und sechs Tage nach Infektion aus den Zellen aufgereinigt und in eine Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt. Um zu kontrollieren, ob die Lademenge an RNA zwischen den verschiedenen Proben vergleichbar war, wurde die Menge an ribosomaler RNA (rRNA) auf dem Agarose-Gel dokumentiert (Abb. 11A). Es zeigte sich, dass, bezogen auf den Zeitpunkt der RNA-Isolierung nach Infektion, vergleichbare Mengen an RNA geladen waren. Lediglich RNA-Proben aus RV-KB14-infizierten Zellen (2d, 3d) zeigten eine vermehrte Anfärbung von rRNA-Banden.

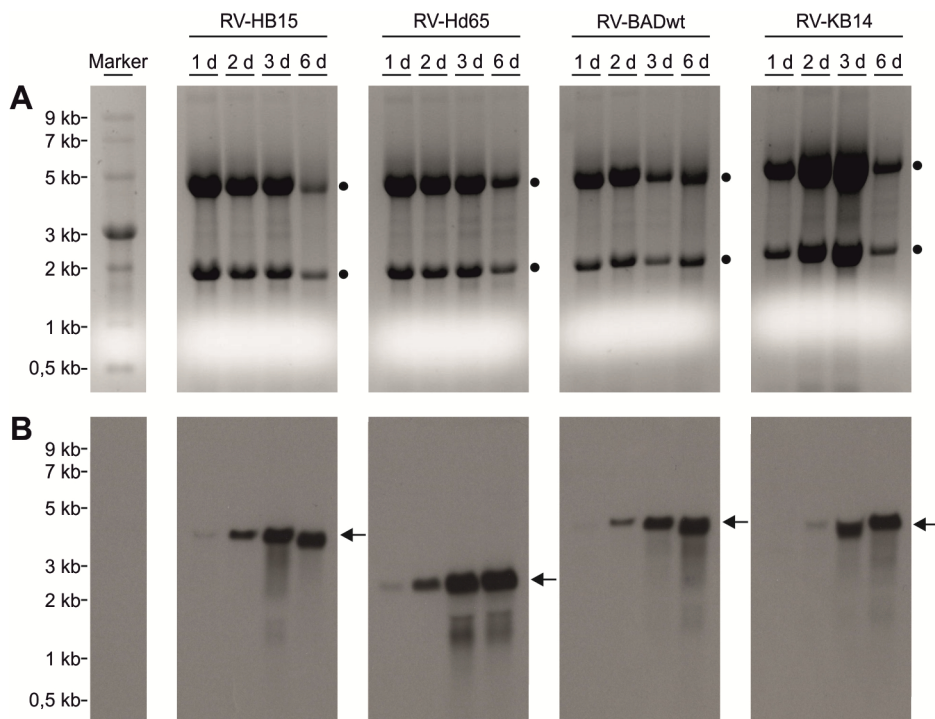


Abb. 11: Pp71-mRNA-Expression in RV-Hd65- und RV-KB14-infizierten HFF im Verlauf der Infektion

HFF wurden mit RV-HB15, RV-Hd65, RV-BADwt oder RV-KB14 mit einer Infektionsstärke von 125 Genomen / Zelle infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet und daraus gesamtzelluläre RNA isoliert. Für die Northern Blot-Analyse wurden von den Proben ein, zwei und drei Tage nach Infektion 10 µg RNA und von den Proben sechs Tage nach Infektion 5 µg in die Gelelektrophorese eingesetzt. Als Größenstandard wurde ein ssRNA-Marker (NEB, Ipswich, MA, USA) benutzt.

A: Dokumentation der aufgetragenen Menge an RNA unter UV-Licht. Die Banden der zellulären 18S- und 28S-rRNAs sind durch Punkte markiert.

B: Detektion von pp71-mRNA durch eine gegen die Sequenz von pp71 gerichtete DNA-Sonde. Gebundene Sonde wurde mittels Chemilumineszenz auf der Northern Blot-Membran sichtbar gemacht (5 min Belichtungszeit). Die Banden in der Größe der sowohl für pp71 als auch für pp65 kodierenden mRNAs sind durch Pfeile markiert. In mit den WT-Stämmen RV-HB15 und RV-BADwt infizierten Zellen beträgt die Größe 4 kb. In RV-Hd65-infizierten Zellen ist die Größe auf 2,6 kb reduziert, in RV-KB14-infizierten Zellen auf 3,9 kb.

Im anschließenden Northern Blot wurde die für pp71 kodierende mRNA mittels einer UL82-spezifischen DNA-Sonde detektiert (Abb. 11B). In RNA-Präparationen von Zellen, die mit den WT-Stämmen RV-HB15 und RV-BADwt infiziert worden waren, wurde erwartungsgemäß ein abundantes Transkript von etwa 4 kb detektiert. Dieses Transkript akkumulierte im Infektionsverlauf. Bei dem Transkript handelte es sich um eine bizistronische RNA, die für UL83 und UL82 kodiert (Rüger *et al.*, 1987). In RNA-Präparationen aus Zellen, die mit der pp65-Deletionsmutante RV-KB14 infiziert worden waren, konnte eine RNA von etwa 3,9 kb nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis war ebenfalls erwartet, da im Genom dieser Mutante anstelle des UL83 die für die BAC-Mutagenese nötige Selektionsmarker-Kassette stehen geblieben war (siehe Abb. 7). In

RNA-Präparationen aus RV-Hd65-infizierten Zellen konnte eine abundante RNA von etwa 2,6 kb detektiert werden, die, ähnlich wie bei den anderen Stämmen, im Infektionsverlauf akkumulierte. Auch dieses Ergebnis war erwartet, da bei RV-Hd65 im Gegensatz zu RV-KB14 das Resistenzgen aus dem HCMV-Genom entfernt worden war (siehe Abb. 7). Ein in der Literatur beschriebenes, kleineres Transkript von 1,9 kb (Rüger *et al.*, 1987) konnte in keiner der RNA-Präparationen nachgewiesen werden.

Im Vergleich zu RV-HB15-infizierten Zellen war in RV-Hd65-infizierten Zellen deutlich mehr UL82-spezifische RNA nachweisbar. Dies korrelierte mit dem erhöhten pp71-Gehalt in Zellen, die mit dieser Mutante infiziert worden waren (Abb. 10). Erwartungsgemäß war zwischen RV-KB14- und RV-BADwt-infizierten Zellen kein Unterschied in der Abundanz der UL82-spezifischen RNA sichtbar. Dies korrelierte ebenfalls mit den Ergebnissen aus der Western Blot-Analyse. Zusammengefasst wiesen die Ergebnisse der Northern Blot-Analyse darauf hin, dass die gesteigerte pp71-Menge in RV-Hd65-infizierten Zellen durch verstärkte Expression des pp71-Gens UL82 hervorgerufen wurde.

Um zu untersuchen, ob die verstärkte pp71-Expression die Verpackung des Tegumentproteins in die Viruspartikel beeinflusste, wurden Virionen aus Virusüberständen infizierter HFF mittels Ultrazentrifugation aufgereinigt und deren Proteinzusammensetzung nach einer SDS-PAGE mit Hilfe einer Coomassie-Färbung analysiert (Abb. 12).

In Virionen von RV-Hd65 war im Vergleich zum Ausgangsstamm RV-HB15 ein erhöhter Gehalt an pp71 zu beobachten. Dies entsprach zunächst der Erwartung. Jedoch wurde auch in RV-KB14-Virionen mehr pp71 gefunden als in RV-BADwt-Virionen. Dies war überraschend, da RV-KB14 keine verstärkte pp71-Expression gezeigt hatte. Eine Erklärung hierfür ergab sich aus der Beobachtung, dass bei beiden pp65-Deletionsmutanten im Vergleich zu den jeweiligen Ausgangsstämmen auch das Hauptkapsidprotein MCP und das Kapsid-assoziierte Protein pp150 verstärkt nachgewiesen wurden. Beide Mutanten synthetisieren aufgrund des Fehlens von pp65 keine DBs. Diese Partikel, die weder Kapsid noch DNA enthalten, können trotz Aufreinigung nicht vollständig aus Virionpräparationen entfernt werden. Da die Lademenge für die SDS-PAGE auf die Proteinmenge normiert war, ergab sich dadurch eine Verfälschung der Ergebnisse. In den Mutantenpräparationen waren Proteine wie MCP, pp150 und pp71 überrepräsentiert, die üblicherweise nicht oder nur in geringen Mengen in DBs vorkommen.

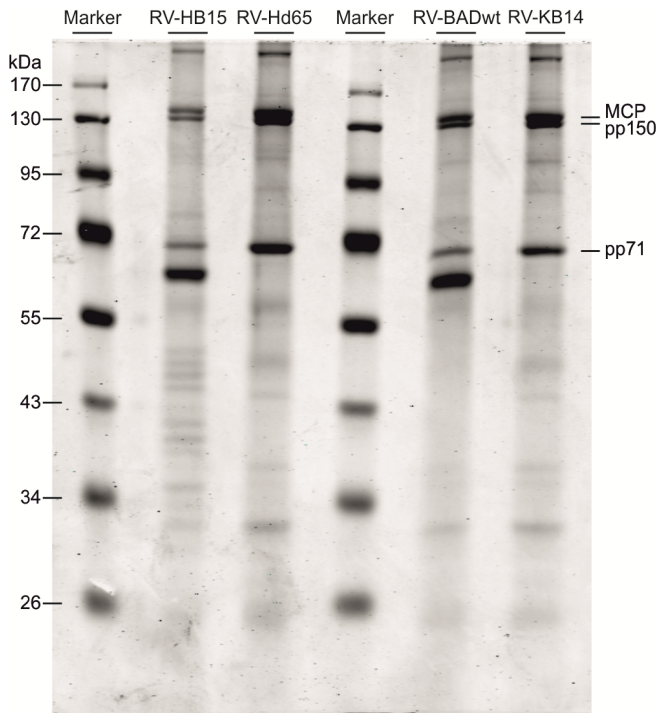


Abb. 12: Proteinzusammensetzung der Virionen von RV-Hd65 und RV-KB14

HFF wurden mit Virusüberständen von RV-HB15, RV-Hd65, RV-BADwt oder RV-KB14 infiziert (1 ml Überstand / $1,5 \times 10^6$ Zellen). Bei einem CPE von mindestens 90% wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und daraus die Virionen mittels Ultrazentrifugation aufgereinigt. Von den Virionen wurden 5 µg in eine SDS-PAGE eingesetzt. Als Größenstandard wurde ein Proteinmarker von PeqLab (Erlangen) benutzt. Die mittels der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine im Polyacrylamid-Gel wurden durch eine Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe des „Odyssey Imagers“ von LI-COR (Lincoln, NE, USA).

Dieses Problem wurde auch in der parallel durchgeführten Western Blot-Analyse sichtbar. Hierzu wurde pp71 in den aufgereinigten Virionen nach einer SDS-Page unter Verwendung des „Odyssey“-Systems von LI-COR (Lincoln, NE, USA) untersucht (Abb. 13).

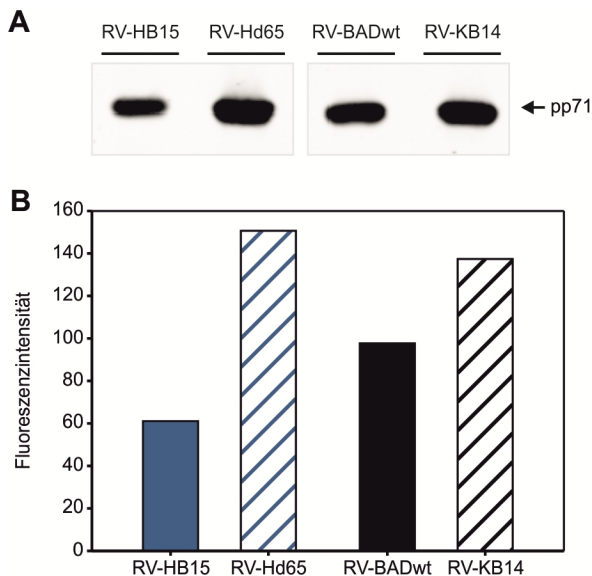


Abb. 13: Pp71-Gehalt der Virionen von RV-Hd65 und RV-KB14

HFF wurden mit 1 ml des Virusüberstands von RV-HB15, RV-Hd65, RV-BADwt oder RV-KB14 infiziert. Bei einem CPE von mindestens 90% wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und daraus die Virionen aufgereinigt. Der Gehalt von pp71 in den Virionen wurde im Western Blot unter Verwendung des pp71-spezifischen polyklonalen Antikörpers vC-20 untersucht. Dazu wurden in die SDS-PAGE jeweils 4 µg Virionen eingesetzt.

A: Detektion des pp71-Proteins auf der Western Blot-Membran über die gebundenen Antikörper mittels des „Odyssey Imagers“ von LI-COR (Lincoln, NE, USA).

B: Quantifizierung der Signale mit Hilfe der „Odyssey Imager“-Software.

Wie schon in der Coomassie-Färbung war in RV-Hd65-Virionen im Vergleich zu RV-HB15 eine erhöhte Menge an pp71 zu beobachten. Allerdings war auch in RV-KB14-Virionen erneut mehr pp71 festzustellen als beim Ausgangsstamm. Somit

fürte auch dieser Ansatz, wie es bereits aufgrund der Coomassie-Färbung der Proteine zu erwarten war, zu keiner schlüssigen Aussage bezüglich des pp71-Gehalts der Virionen von RV-Hd65 und RV-KB14.

Da ein direkter Nachweis einer veränderten Verpackung von pp71 in RV-Hd65-Virionen aufgrund von methodischen Einschränkungen nicht möglich war, wurde eine indirekte Herangehensweise gewählt. Aus der Literatur war bekannt, dass eine HCMV-Mutante, die eine EYFP-markierte Form des pp71 exprimiert, diese verstärkt in Virionen verpackte und dass dies zur stärkeren Induktion der viralen IE-Genexpression führte (Tavalai *et al.*, 2008). Aus diesem Grund wurde die Fähigkeit der pp65-Deletionsmutanten zur Induktion der IE-Genexpression bestimmt. HFF wurden mit einer Infektionsstärke von 0,15 Genomen / Zelle infiziert. Nach 48 Stunden wurden IE1-positive Zellen angefärbt und gezählt (Abb. 14).

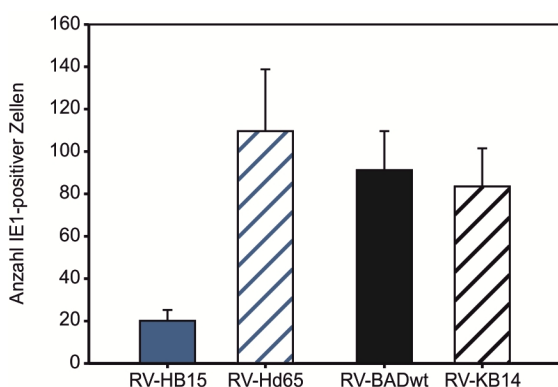


Abb. 14: IE1-Induktion durch RV-Hd65 oder RV-KB14 nach Infektion von HFF

5×10^3 HFF wurden im Achtfachansatz mit RV-HB15, RV-Hd65, RV-BADwt oder RV-KB14 mit einer Infektionsstärke von 0,15 Genomen / Zelle infiziert. Nach 48 Stunden wurden IE1-positive Zellen unter Verwendung des IE1-spezifischen monoklonalen Antikörpers p63/27 angefärbt und gezählt. Für jedes Virus sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus den acht Ansätzen dargestellt.

Nach Infektion mit RV-Hd65 war die Anzahl an IE1-positiven Zellen im Vergleich zur Infektion mit RV-HB15, bezogen auf die Aufnahme der gleichen Anzahl viraler Genome, deutlich erhöht. Im Vergleich der Infektionen mit RV-KB14 und RV-BADwt konnte keine solche Veränderung in der Anzahl der IE1-positiven Zellen beobachtet werden.

In Übereinstimmung mit der Literatur (Tavalai *et al.*, 2008) deuteten diese Ergebnisse darauf hin, dass die erhöhte pp71-Expression in RV-Hd65-infizierten Zellen zu einer verstärkten Verpackung von pp71 in die Viruspartikel führte, was wiederum mit der erhöhten Induktion der IE-Genexpression in der nachfolgenden Infektionsrunde einherging.

Die Aussagekraft dieses Verfahrens ist aufgrund des relativ groben Messwerts der Auszählung IE1-positiver Zellen eingeschränkt. Daher wurde zur Untermauerung der Ergebnisse die virale DNA-Replikation untersucht, die ebenfalls vom pp71-Gehalt in infizierten Zellen abhängig ist (Baldick, Jr. *et al.*, 1997; Bresnahan and Shenk, 2000;

Tavalai *et al.*, 2008). Dazu wurden HFF mit verschiedenen Infektionsstärken (4, 0,4 oder 0,04 Genome / Zelle) infiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion wurden die Zellen geerntet und die Anzahl an intrazellulären viralen Genomen pro Zelle mittels quantitativer PCR ermittelt (Abb. 15).

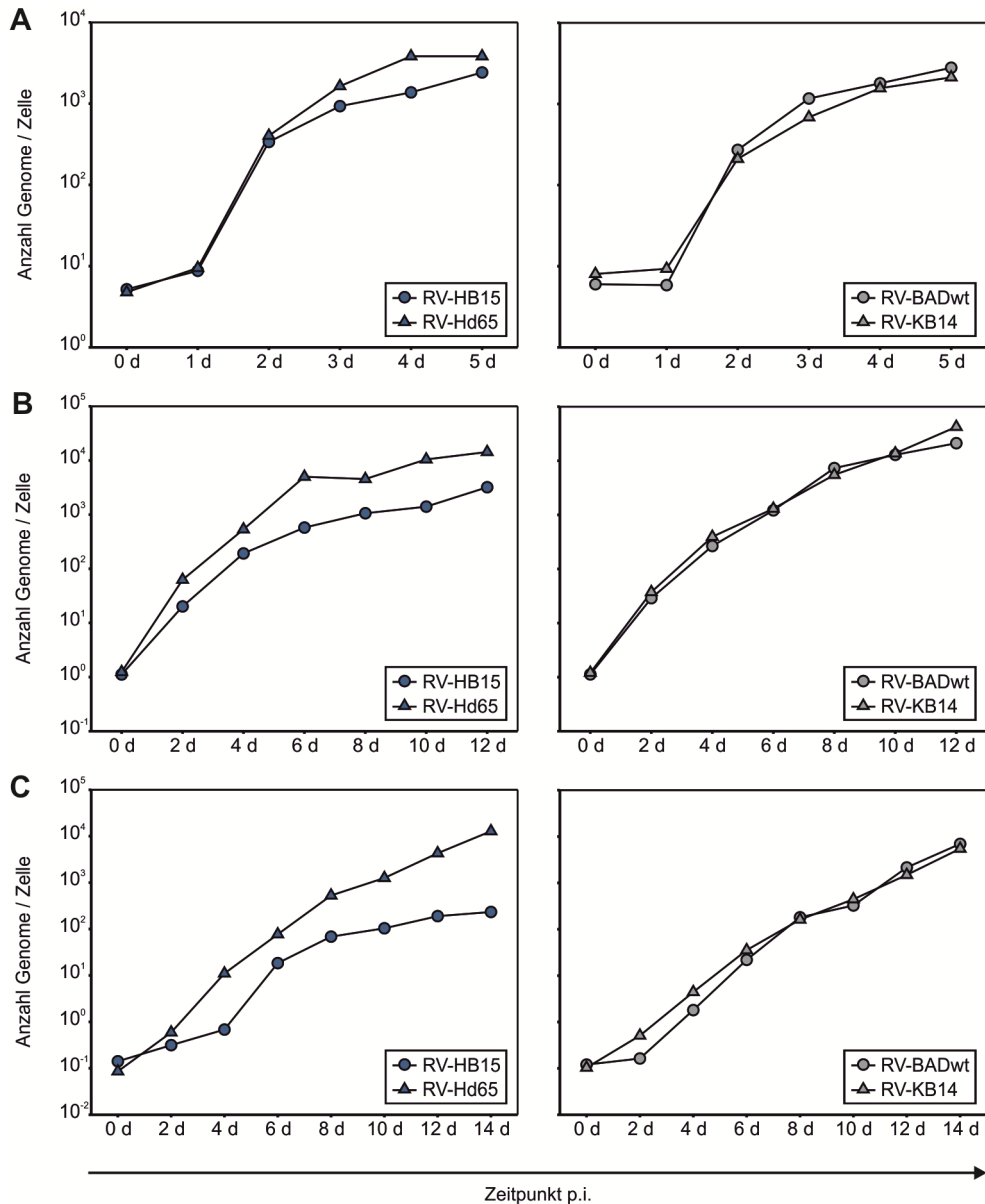


Abb. 15: Genomreplikation in RV-Hd65- und RV-KB14-infizierten HFF

HFF wurden mit RV-HB15, RV-Hd65, RV-BADwt oder RV-KB14 mit einer Infektionsstärke von (A) 4 Genomen / Zelle, (B) 0,4 Genomen / Zelle oder (C) 0,04 Genomen / Zelle infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet und daraus gesamtzelluläre DNA isoliert. Mittels quantitativer *Real-Time* PCR wurde die Anzahl der enthaltenen HCMV-Genome bestimmt. Für jede Probe wurden drei Reaktionsansätze analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus den Messwerten der drei Reaktionsansätze.

Nach Infektion mit hoher Infektionsstärke (4 Genome / Zelle; eine sogenannte *single cycle*-Infektion) waren keine Unterschiede in der Rate der Genomreplikation zwischen pp65-Deletionsmutanten und Ausgangsstämmen festzustellen (Abb. 15A). Bei Infektion mit niedriger Infektionsstärke (0,4 oder 0,04 Genome / Zelle; eine sogenannte *multiple cycle*-Infektion) war hingegen eine gesteigerte Genomreplikations-Rate in RV-Hd65-infizierten Zellen im Vergleich zu RV-HB15-infizierten Zellen detektierbar (Abb. 15B+C). Diese Ergebnisse entsprachen den Erwartungen, da auch andere die Abhängigkeit der viralen DNA-Replikation vom pp71-Gehalt insbesondere bei niedriger Infektionsstärke beobachten konnten (Tavalai *et al.*, 2008). In RV-KB14-infizierten Zellen war auch nach Infektion mit niedriger Infektionsstärke kein Unterschied zum Ausgangsstamm zu beobachten. Diese Ergebnisse unterstützten die Erkenntnisse aus dem vorangegangenen Experiment.

Somit konnte auf funktioneller Ebene gezeigt werden, dass die erhöhte pp71-Expression in RV-Hd65-infizierten Zellen in einer verstärkten Verpackung von pp71 in die Viruspartikel resultierte. Im Gegensatz dazu war im Kontrollvirus RV-KB14 kein derartiger Phänotyp zu sehen.

3.1.2 Etablierung der HCMV-Mutanten zur Analyse der immunevasiven Funktion von pp71

Die phänotypischen Analysen hatten gezeigt, dass die Modifikation des UL82/UL83-Bereichs im Genom von RV-Hd65 zu einer Steigerung der pp71-Expression geführt hatte. Mutanten mit einer solchen Modifikation waren somit prinzipiell verwendbar, um einen möglichen immunevasiven Effekt von pp71 auf die MHC-I-vermittelte Antigenpräsentation infizierter HFF zu prüfen. Die Verwendung von RV-Hd65 zu diesem Zweck wurde jedoch als problematisch gesehen, da diese Mutante die bekannten MHC-I-Immunevasine gpUS2-11 exprimiert. Diese Proteine unterdrücken die Antigenpräsentation merklich (Besold *et al.*, 2007; Besold *et al.*, 2009). Daher bestand die Möglichkeit, dass ein immunevasiver Effekt von pp71 in RV-Hd65-infizierten Zellen verschleiert sein könnte. Um dieser Problematik zu entgehen, wurde beschlossen, eine Mutante für die Versuche einzusetzen, die neben einer zu RV-Hd65 analogen Deletion von pp65 zusätzlich US2-11 negativ war. Eine solche Mutante (RV-dUS2-11_dpp65; siehe Abb. 7) war in Vorarbeiten etabliert worden (Besold, 2006) und stand für diese Untersuchung zur Verfügung. Als Kontrollstamm war die Mutante RV-dUS2-11 (Falk *et al.*, 2002) vorhanden.

Um die pp71-Expression von RV-dUS2-11_dpp65 zu kontrollieren, wurde der pp71-Gehalt in infizierten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion im Western Blot bestimmt. Dazu wurden HFF mit 125 Genomen / Zelle infiziert. Diese Zellen wurden nach 24, 48, 72 und 96 Stunden lysiert und mittels Western Blot auf den Gehalt an pp71 hin untersucht (Abb. 16). Die Normierung erfolgte wiederum auf zelluläres β -Aktin (Abb. 16B).

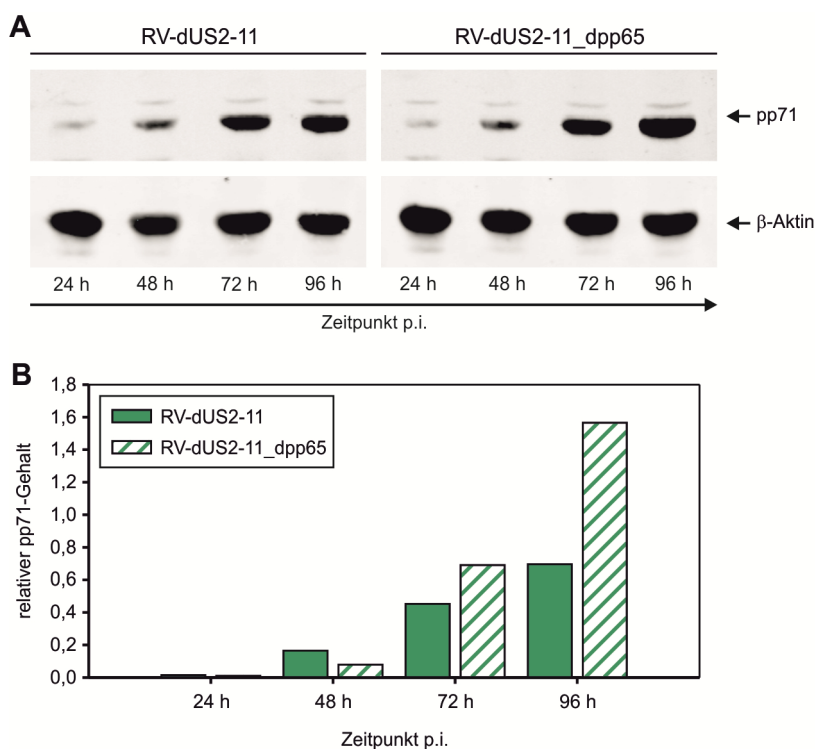


Abb. 16: Pp71-Gehalt in RV-dUS2-11_dpp65-infizierten HFF im Verlauf der Infektion

HFF wurden mit RV-dUS2-11 oder RV-dUS2-11_dpp65 mit einer Infektionsstärke von 125 Genomen / Zelle infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Zelllysate der infizierten Zellen hergestellt und im Western Blot auf den Gehalt der Proteine pp71 und β -Aktin (als interner Standard) hin untersucht. Dazu wurde in die SDS-PAGE jeweils Zelllysate aus 1×10^5 Zellen pro Spur eingesetzt.

A: Detektion der Proteine mittels des „Odyssey Imagers“.

B: Quantifizierung der Signale mit Hilfe der „Odyssey Imager“-Software. Dargestellt ist der relative pp71-Gehalt, errechnet durch die Division der pp71-Fluoreszenzintensität durch die β -Aktin-Fluoreszenzintensität.

Die gezeigten Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Wie erwartet war in RV-dUS2-11_dpp65-infizierten Zellen ein höherer Gehalt an pp71 zu finden als in RV-dUS2-11-infizierten Zellen. Die Differenz in der pp71-Menge entsprach dabei der Differenz zwischen RV-Hd65-infizierten Zellen und RV-HB15-infizierten Zellen (vgl. Abb. 10). RV-dUS2-11_dpp65 war also bezüglich seiner pp71-Expression mit RV-Hd65 vergleichbar und sollte somit für die Analyse der immunevasiven Funktion von pp71 geeignet sein.

Da pp65 selbst jedoch in der Literatur eine immunevasive Funktion zugeschrieben worden war (Gilbert *et al.*, 1996), wurde beschlossen, eine weitere Mutante auf der Grundlage der EYFP-pp71-Mutante RV-AD169/EYFP-pp71 (siehe Abb. 7) herzustellen. Dieses Virus war uns freundlicherweise von T. Stamminger, Erlangen, zur Verfügung gestellt worden. RV-AD169/EYFP-pp71 erzeugt aufgrund der Fusion von pp71 mit dem EYFP eine erhöhte Menge des Tegumentproteins in infizierten Zellen und verpackt das Fusionsprotein verstärkt in Viruspartikel (Tavalai *et al.*, 2008). Um diese Mutante für die geplanten Versuche einsetzen zu können, wurde auch hier, wie ebenso im Ausgangsstamm RV-HB15, die Genregion von US2 bis US11 deletiert.

Hierzu wurden zunächst die Genom-haltigen BACmide der jeweiligen Ursprungsviren in *E. coli* EL250 transformiert. Anschließend wurde der Genombereich von US2 bis US11 über homologe Rekombination durch Insertion einer Kanamycinresistenz-Kassette deletiert. Zur Auswahl der Bakterienkolonien, in denen die Mutagenese der BACmid-DNA erfolgreich war, wurde eine qualitative PCR durchgeführt, in der einer der beiden Übergangsbereiche von viralem Genom und inserierter Kanamycinresistenz-Kassette amplifiziert wurde (Daten nicht gezeigt). Weiterhin wurde die korrekte Modifikation der viralen Genome in den BACmiden mittels Restriktionsanalyse der BACmide und Sequenzierung der beiden Übergangsbereiche von Genom und Resistenzkassette bestätigt (Daten nicht gezeigt). Die daraus resultierenden Mutanten wurden mit RV-JH9 und RV-JH7 bezeichnet (siehe Abb. 7). RV-JH7 wurde dabei in allen folgenden Experimenten als Kontrolle für RV-JH9 eingesetzt.

Zur Analyse der pp71-Expression von RV-JH9 und RV-JH7 im Vergleich zu den Ursprungsviren RV-AD169/EYFP-pp71 und RV-HB15 wurde der Gehalt an pp71 in infizierten Zellen mittels Western Blot bestimmt. HFF wurden mit einer *moi* von eins infiziert. Diese Infektionsstärke wurde gewählt, da sie auch von Tavalai und Kollegen bei der ursprünglichen Charakterisierung von RV-AD169/EYFP-pp71 eingesetzt wurde (Tavalai *et al.*, 2008). Nach 96 Stunden Infektion wurde der pp71-Gehalt wie oben beschrieben im „Odyssey“-System ermittelt (Abb. 17).

Wie erwartet konnte in RV-JH9- und RV-AD169/EYFP-pp71-infizierten Zellen das EYFP-pp71-Fusionsprotein, erkennbar durch das im Vergleich zu pp71 erhöhte Molekulargewicht, detektiert werden. Zudem war in diesen Zellen der pp71-Gehalt im Vergleich zu Zellen mit WT-pp71-Expression erhöht, wobei das Ausmaß der Steigerung in RV-JH9- und RV-AD169/EYFP-pp71-infizierten Zellen vergleichbar war.

RV-JH9 entsprach also in Bezug auf seine pp71-Expression RV-AD169/EYFP-pp71 und sollte daher für die Analyse der immunevasiven Funktion von pp71 geeignet sein.

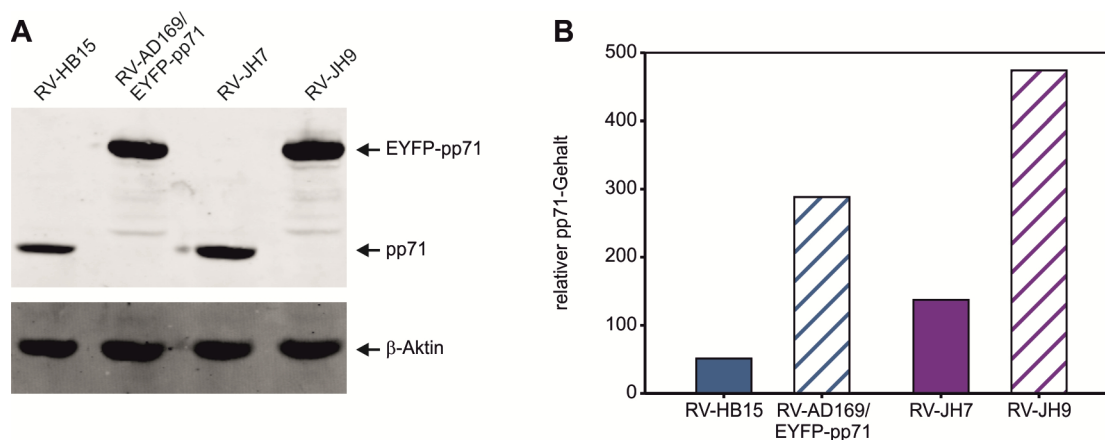


Abb. 17: Pp71-Gehalt in RV-AD169/EYFP-pp71- und RV-JH9-infizierten HFF

HFF wurden mit RV-HB15, RV-AD169/EYFP-pp71, RV-JH7 oder RV-JH9 mit einer *moi* von eins infiziert. Nach 96 Stunden wurden Zelllysate der infizierten Zellen hergestellt und im Western Blot auf den Gehalt der Proteine pp71 und β -Aktin (als interner Standard) hin untersucht. Dazu wurde in die SDS-PAGE jeweils Zelllysate aus 1×10^5 Zellen pro Spur eingesetzt.

A: Detektion der Proteine mittels des „Odyssey Imagers“.

B: Quantifizierung der Signale mit Hilfe der „Odyssey Imager“-Software. Dargestellt ist der relative pp71-Gehalt, errechnet durch die Division der pp71-Fluoreszenzintensität durch die β -Aktin-Fluoreszenzintensität.

3.1.3 Einfluss von pp71 auf die MHC-I-vermittelte Antigenpräsentation

Eine Möglichkeit, die Immunevasion in HCMV-infizierten Zellen zu analysieren, ist die Untersuchung der MHC-I-vermittelten Antigenpräsentation der Zellen mittels IFN- γ -ELISpot. Bei diesem Verfahren wird als Maß für die Antigenpräsentation der infizierten Zellen die Aktivierung von CTLs, die virale, über MHC-I präsentierte Peptide erkennen, anhand der Sezernierung von IFN- γ bestimmt.

Zur Untersuchung des Einflusses von pp71 auf die Antigenpräsentation wurden HLA-A2-positive HFF mit den verschiedenen Virusstämmen mit einer Infektionsstärke von 125 Genomen / Zelle infiziert. Nach 24 und 96 Stunden wurden die Zellen geerntet und in den ELISpot eingesetzt (Abb. 18). Als CTLs wurden HLA-A2-restringierte IE1- oder pp65-spezifische CTL-Linien verwendet (Besold *et al.*, 2007; Pepperl-Klindworth *et al.*, 2006).

In dieser Analyse war weder zwischen RV-dUS2-11_dpp65 und RV-dUS2-11 noch zwischen RV-JH9 und RV-JH7 ein Unterschied in der IE1-Antigenpräsentation in Abhängigkeit von der pp71-Expression feststellbar (Abb. 18A+B). Auch die pp65-Antigenpräsentation war im Vergleich von RV-JH9 und RV-JH7 nicht verändert

(Abb. 18C). RV-dUS2-11_dpp65-infizierte Zellen konnten aufgrund des Fehlens des pp65-Proteins zur Untersuchung der pp65-Antigenpräsentation nicht eingesetzt werden. Eine immunevasive Funktion von pp71 in HFF konnte in dieser Analyse also nicht nachgewiesen werden. Allerdings war sowohl mit RV-dUS2-11_dpp65 als auch mit RV-JH9 96 Stunden nach Infektion ein Trend zu einer schwachen Reduktion der IE1-Antigenpräsentation zu erkennen.

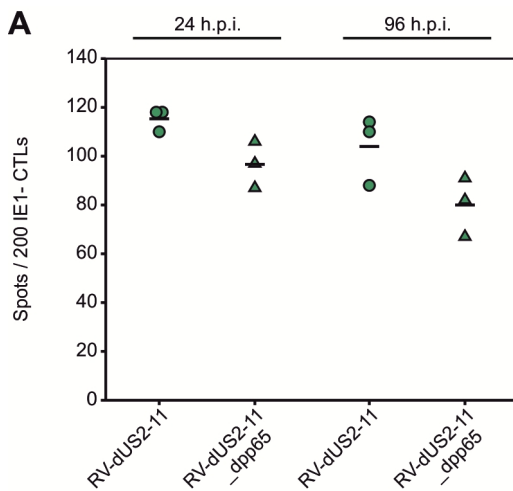
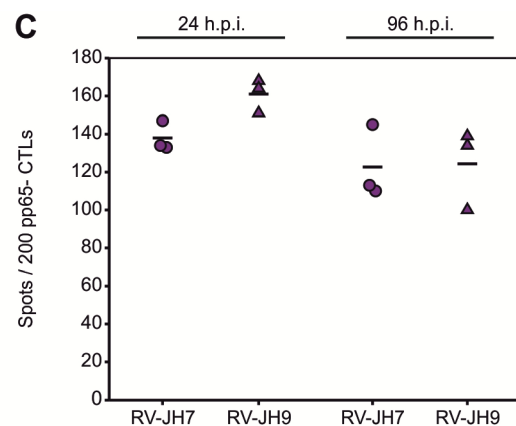
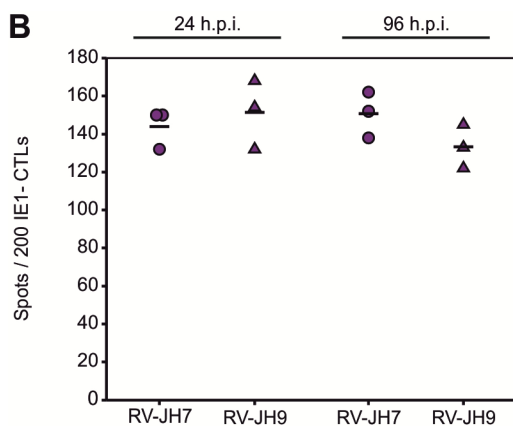


Abb. 18: MHC-I-vermittelte Antigenpräsentation RV-dUS2-11_dpp65- und RV-JH9-infizierter HFF

HFF wurden mit (A) RV-dUS2-11 oder RV-dUS2-11_dpp65 bzw. (B+C) RV-JH7 oder RV-JH9 mit einer Infektionsstärke von 125 Genomen / Zelle infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die infizierten Zellen geerntet und in eine ELISpot-Analyse entweder mit (A+B) IE1-spezifischen CTLs oder (C) pp65-spezifischen CTLs eingesetzt. Dabei wurde jede Probe in drei Ansätzen analysiert. Für jede Probe sind die Spotzahlen der einzelnen Ansätze als Punkte und der Mittelwert aus den Spotzahlen der drei Ansätze als horizontaler Strich dargestellt.



Eine weitere Methode, die Immunevasion in HCMV-infizierten Zellen zu untersuchen, ist die durchflusszytometrische Bestimmung der Expression von MHC-I-Molekülen auf der Oberfläche der infizierten Zellen. Dazu wurden HFF mit den verschiedenen Virusstämmen mit einer Infektionsstärke von 125 Genomen / Zelle infiziert. Nach 24, 48, 72 und 96 Stunden wurde die Expression von MHC-I-Molekülen auf der Oberfläche der Zellen mit einem HLA-ABC-spezifischen Primärantikörper und einem FITC-konjugierten Sekundärantikörper bestimmt (Abb. 19).

Wie erwartet zeigten Zellen, die mit RV-HB15 infiziert wurden, eine deutliche Reduktion der MHC-I-Oberflächenexpression in Abhängigkeit von der Infektionsdauer. Dieser

Effekt war auf die bekanntermaßen hohe Wirksamkeit der Immunevasine gpUS2-11 zurückzuführen. Im Gegensatz hierzu hatte die Infektion mit allen gpUS2-11-negativen Stämmen keinen eindeutigen Effekt auf die MHC-I-Oberflächenexpression. Insbesondere konnte keine Abhängigkeit der MHC-I-Oberflächenexpression von der Stärke der pp71-Expression festgestellt werden.

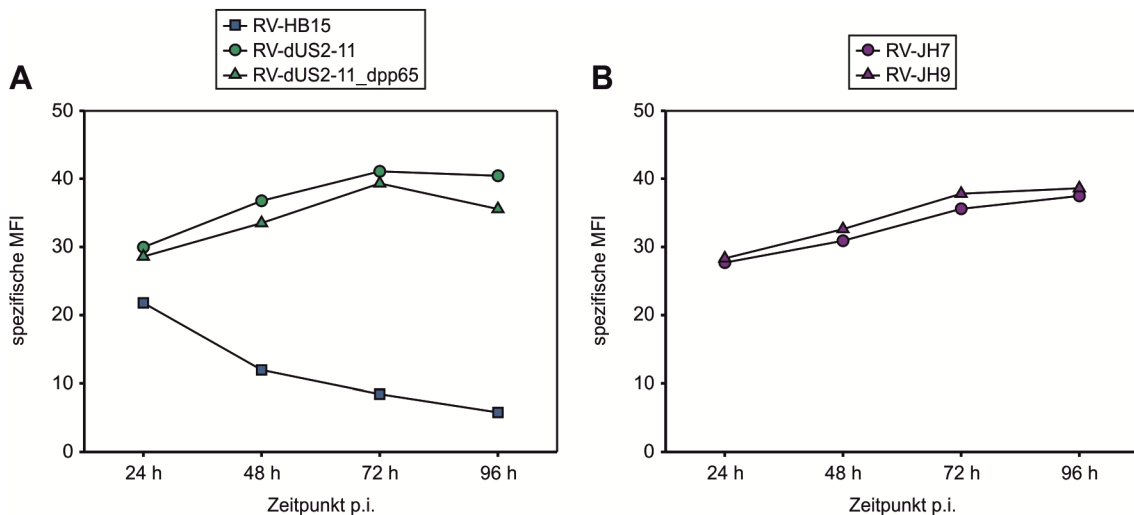


Abb. 19: MHC-I-Oberflächenexpression RV-dUS2-11_dpp65- und RV-JH9-infizierter HFF im Verlauf der Infektion

HFF wurden mit RV-HB15 sowie (A) RV-dUS2-11 und RV-dUS2-11_dpp65 oder (B) RV-JH7 und RV-JH9 mit einer Infektionsstärke von 125 Genomen / Zelle infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet und durchflusszytometrisch mit Hilfe des HLA-ABC-spezifischen monoklonalen Antikörpers W6/32 auf die Oberflächenexpression von MHC-I-Molekülen hin untersucht. Die Detektion des gebundenen Primäntikörpers erfolgte über einen FITC-gekoppelten Sekundäntikörper. Zur Bestimmung der unspezifischen Färbung der Zellen durch den fluoreszierenden Sekundäntikörper wurde ein Teil der Zellen der Proben nur mit Sekundäntikörper inkubiert. Für jede Probe wurde die MFI dieser Zellen von der MFI der Zellen abgezogen, die sowohl mit Primär- als auch mit Sekundäntikörper gefärbt wurden. Das Ergebnis ist als spezifische MFI dargestellt.

Da bekannt war, dass die HCMV-vermittelte Immunevasion vom Allel des betrachteten MHC-I-Moleküls abhing (siehe 1.4.1.1), sollte in einem weiteren Ansatz der Einfluss von pp71 auf die Expression von HLA-A2 auf infizierten Zellen untersucht werden. Dazu wurden HLA-A2-positive HFF mit den verschiedenen Viren infiziert und die HLA-A2-Oberflächenexpression bestimmt (Abb. 20).

In RV-HB15-infizierten Zellen konnte wiederum wie erwartet eine deutliche Reduktion der HLA-A2-Oberflächenexpression aufgrund der Expression der Immunevasine gpUS2-11 beobachtet werden. Im Gegensatz dazu zeigte keine der gpUS2-11-negativen Viren eine Verminderung der Ausgangsstärke der HLA-A2-Oberflächenexpression. Es war sogar ein Anstieg des HLA-A2-Levels sichtbar, der nach dem aktuellen Wissensstand wohl auf die Induktion der IFN-Antwort durch

infizierte Zellen zurückzuführen ist (Steinmassl and Hamprecht, 1994). Wie bei der Betrachtung von Gesamt-MHC-I hatte die unterschiedliche pp71-Expression hier keinen Einfluss auf die Oberflächenexpression.

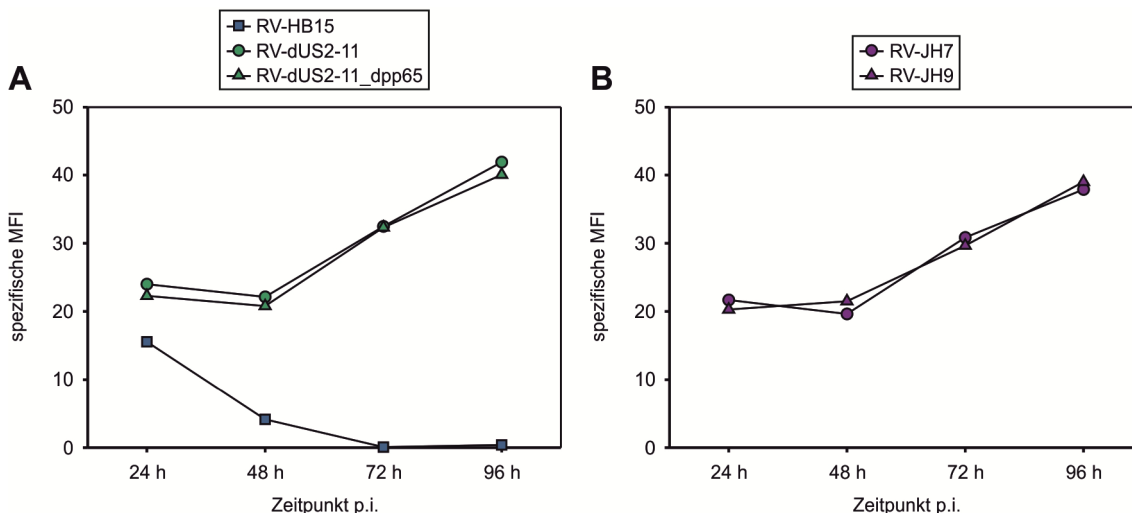


Abb. 20: HLA-A2-Oberflächenexpression RV-dUS2-11_dpp65- und RV-JH9-infizierter HFF im Verlauf der Infektion

HFF wurden mit RV-HB15 sowie (A) mit RV-dUS2-11 und RV-dUS2-11_dpp65 oder (B) mit RV-JH7 und RV-JH9 mit einer Infektionsstärke von 125 Genomen / Zelle infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet und durchflusszytometrisch mit Hilfe des HLA-A2-spezifischen monoklonalen Antikörpers BB7.2 auf die HLA-A2-Oberflächenexpression hin untersucht. Die Detektion des gebundenen Primäntikörpers erfolgte über einen PE-gekoppelten Sekundäntikörper. Für jede Probe ist jeweils die spezifische MFI dargestellt.

Zusammengefasst konnte mit diesen Untersuchungen kein Effekt von pp71 auf die MHC-I-vermittelte Antigenpräsentation in einem Zeitraum von 24 bis 96 Stunden nach Infektion von HFF festgestellt werden.

2.1.1.2 Einfluss von Partikel-assoziiertem pp71 auf die MHC-I-vermittelte Antigenpräsentation

Bis zu diesem Punkt wurde der immunevasive Effekt von pp71 in einem Zeitraum nach Infektion untersucht, in dem pp71 von den infizierten Zellen bereits synthetisiert wird. Da pp71 aber auch im Tegument von Virionen mit in die Zellen eingebracht wird, wäre auch schon sehr früh nach Infektion ein Einfluss von pp71 auf die MHC-I-Antigenpräsentation denkbar gewesen. Um dies zu untersuchen, wurde die Virusmutante RV-AD169/EYFP-pp71 verwendet, deren Virionen bekanntermaßen einen erhöhten pp71-Gehalt aufweisen (Tavalai *et al.*, 2008). Zusätzlich wurde die auf RV-AD169/EYFP-pp71 basierende, US2-11-negative Mutante RV-JH9 eingesetzt, um den Einfluss der US2-11-Immunevasine auf den möglichen pp71-Effekt zu überprüfen.

Zur Analyse der Antigenpräsentation mittels ELISpot wurden die infizierten Zellen in der IE-Phase der Infektion arretiert. Zunächst wurde die zelluläre Proteinbiosynthese mit dem reversiblen Translationshemmer Cycloheximid (CH) blockiert. Dies führte zur Akkumulation von mRNAs der sehr frühen, viralen Gene. Danach wurde CH ausgewaschen und die weitere Transkription mit Actinomycin D (ActD) irreversibel gehemmt. Dies erlaubte nun die Translation der akkumulierten IE-mRNAs. Somit wurden in den infizierten Zellen nur die Proteine der IE-Phase, wie zum Beispiel IE1, exprimiert. Dadurch war es möglich, den immunevasiven Effekt von pp71 unter Bedingungen zu untersuchen, wie sie in der IE-Phase herrschen, ohne auf den kurzen Zeitraum dieser Phase während eines natürlichen Infektionsverlaufs beschränkt zu sein. Die CH/ActD-Behandlung erhöhte zudem durch die Anhäufung von IE-mRNAs und IE-Proteinen in den infizierten Zellen die Sensitivität der Analyse. Die Antigenpräsentation der infizierten Zellen wurde mit Hilfe von IE1-spezifischen CTLs detektiert (Abb. 21).

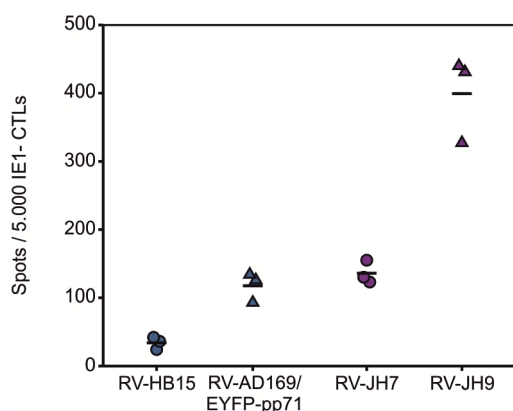


Abb. 21: MHC-I-vermittelte Antigenpräsentation RV-AD169/EYFP-pp71- und RV-JH9-infizierter HFF unter CH/ActD-Behandlung

HFF wurden mit RV-HB15, RV-AD169/EYFP-pp71, RV-JH7 oder RV-JH9 mit einer Infektionsstärke von 125 Genomen / Zelle infiziert. Um den Infektionszyklus in der IE-Phase zu halten, wurden die Zellen für 10 Stunden mit 250 µg / ml Cycloheximid und anschließend für 13,5 Stunden mit 10 µg / ml Actinomycin D behandelt. Vor dem Einsetzen in die ELISpot-Analyse wurden die Zellen mit 0,5% PFA fixiert, um den Zustand der Antigenpräsentation nach der CH/ActD-Behandlung

während der Dauer der Analyse aufrecht zu erhalten. Die ELISpot-Analyse wurde mit IE1-spezifischen CTLs vorgenommen, die aus ihrer Kultur immunomagnetisch angereichert worden waren. Jede Probe wurde in drei Ansätzen analysiert. Für jede Probe sind die Spotzahlen der einzelnen Ansätze als Punkte und der Mittelwert aus den Spotzahlen der drei Ansätze als horizontaler Strich dargestellt.

Überraschenderweise war die IE1-Antigenpräsentation von Zellen, die mit den Virusmutanten mit erhöhtem pp71-Gehalt der Virionen infiziert worden waren, nicht vermindert, sondern sogar erhöht. Besonders deutlich war dies mit der US2-11-negativen Mutante RV-JH9 zu beobachten. Ein immunevasiver Effekt von pp71 in infizierten HFF war somit auch in dieser Analyse nicht zu beobachten. Die Ergebnisse wiesen vielmehr darauf hin, dass pp71 in der IE-Phase einer HCMV-Infektion auf die Antigenpräsentation von IE-Proteinen einen steigernden Einfluss ausübt.

2.1.1.3 Modulation der pp71-Expression durch Zellstress

Das Ausmaß der pp71-Expression in infizierten Zellen hatte einen deutlichen Einfluss auf die Replikationsfähigkeit der verschiedenen Virusstämme. Allerdings waren die Unterschiede in der Expression durch gezielte, genetische Modifikationen des HCMV-Genoms hervorgerufen worden, die in dieser Form in der Natur nicht vorkommen. So konnte bislang kein klinisches HCMV-Isolat gefunden werden, das pp65 nicht exprimiert. Um die biologische Relevanz der hier beschriebenen Effekte nachzuweisen, musste also gezeigt werden, dass die pp71-Expression während der natürlichen HCMV-Infektion einer Regulation unterliegt. Wir verfolgten hier die Hypothese, dass die pp71-Expression durch den physiologischen Zustand der infizierten Zellen beeinflusst wird. Grundlage für diese Annahme war die bekanntermaßen regulierte Expression eines anderen HCMV-Proteins, pUL138. Die Expression dieses Proteins wird durch Zellstress, zum Beispiel mittels Serumentzug, induziert (Grainger *et al.*, 2010). Die Translation von pUL138 erfolgt von einer polyzistronischen RNA, auf der das Gen UL138 3'-terminal liegt. Auf ähnliche Weise ist auch das pp71-Gen UL82 auf der gemeinsamen mRNA mit dem pp65-Gen UL83 angeordnet (Rüger *et al.*, 1987). Wir prüften daher, ob auch pp71 bei Serumentzug verstärkt exprimiert wird.

Hierzu wurden HFF mit RV-HB15 mit einer Infektionsstärke von 125 Genomen / Zelle infiziert und für 48, 72 und 96 Stunden inkubiert. Jeweils in einem Ansatz wurde das serumhaltige Kulturmedium 48 Stunden vor Ende der Inkubation durch serumfreies Medium ersetzt. Zum Vergleich wurden parallel Ansätze mitgeführt, bei denen 48 Stunden vor Ende der Inkubation das serumhaltige Kulturmedium lediglich gegen frisches, ebenfalls serumhaltiges Medium ausgetauscht wurde. Der Gehalt an pp71, pp65 und pUL44 von Lysaten der Zellen wurde in einer Western Blot-Analyse bestimmt und auf den Gehalt an β -Aktin normiert (Abb. 22). Der relative Proteingehalt in infizierten, unbehandelten Zellen nach 96-stündiger Infektion wurde dabei als 100% definiert.

Die Ergebnisse zeigten einen zweiphasigen Verlauf des Einflusses von Serumentzug auf die Proteinexpression von HCMV. Zu den Zeitpunkten 48 und 72 Stunden nach Infektion führte der Serumentzug zu einer deutlich verminderten Expression von pp65 und pp71, aber auch von pUL44, das zur Kontrolle mitgeführt wurde. Dies war nicht unerwartet, da bekannt war, dass Zellstress allgemein die *Cap*-abhängige Translation vermindert (Holcik and Sonenberg, 2005). Die Reduktion der Expression war für pp65 und pUL44 auch nach 96-stündiger Infektion, wenn auch in abgeschwächter Form,

noch sichtbar. Im Gegensatz hierzu übertraf zu diesem Zeitpunkt die pp71-Expression nach Serumentzug deutlich die Expression in nicht gestressten Zellen.

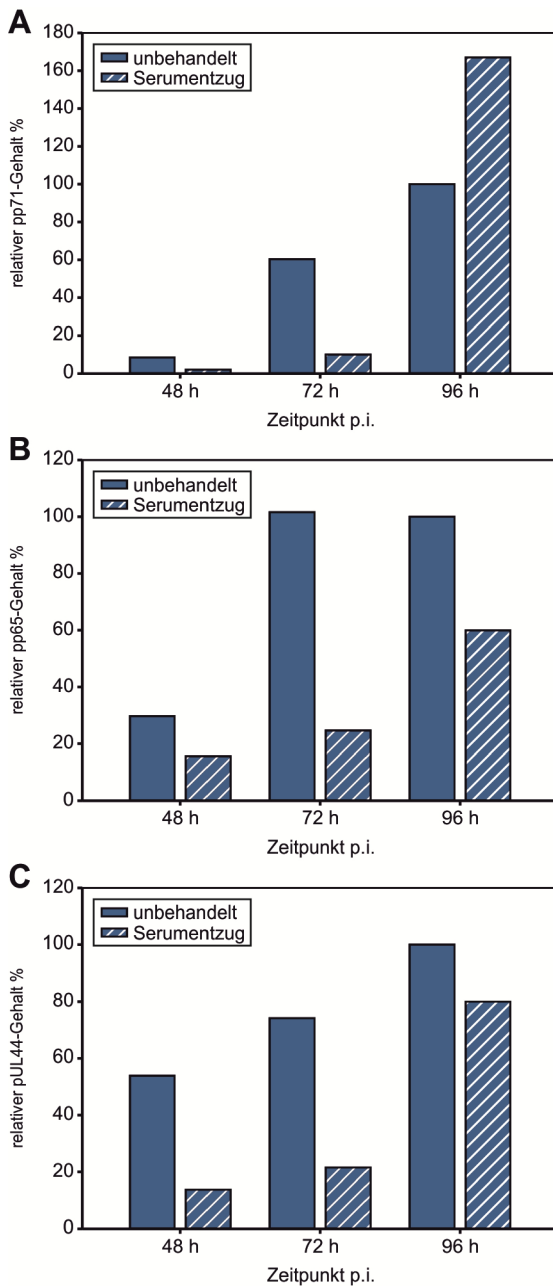


Abb. 22: Pp71-Gehalt in infizierten Zellen nach Induktion von Zellstress durch Serumentzug

HFF wurden mit RV-HB15 mit einer Infektionsstärke von 125 Genomen / Zelle infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet und Zelllysate hergestellt. Das FKS-haltige Zellkulturmedium wurde 48 Stunden vor dem Ernten gegen FKS-freies Medium (Ansätze „Serumentzug“) oder gegen frisches Medium mit FKS (Ansätze „unbehandelt“) ausgetauscht. Die Zelllysate wurden mittels Western Blot auf den Gehalt von (A) pp71 und -Aktin, (B) pp65 und -Aktin sowie (C) pUL44 und -Aktin untersucht. Dazu wurden der pp71-spezifische polyklonale Antikörper vC-20, der pp65-spezifische monoklonale Antikörper 65-33, der pUL44-spezifische monoklonale Antikörper BS510 und der -Aktin-spezifische polyklonale Antikörper von Rockland (Gilbertsville, PA, USA) verwendet. Für jede Probe wurde Zelllysate aus 1×10^5 Zellen pro Spur in die SDS-PAGE eingesetzt. Die Detektion der Proteine und die Quantifizierung der Signale erfolgten mittels des „Odyssey Imagers“ von LI-COR. Dargestellt ist der relative Proteingehalt an pp71, pp65 oder pUL44 im Verhältnis zu -Aktin. Dabei wurde der relative Proteingehalt in infizierten unbehandelten Zellen 96 h nach Infektion jeweils als 100% definiert. Die gezeigten Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

Diese Ergebnisse zeigten, dass die pp71-Expression einer Regulation unterliegt, die in der Tat vom zellulären Umfeld abhängt. Sie wiesen darüber hinaus darauf hin, dass diese Regulation durch die *Cap*-unabhängige Translation von pp71 von seiner bizistronischen mRNA vermittelt wird.

3.2 Immunevasive Funktionen von gpUS3 in infizierten HFF

Die koordinierte Expression der von US2-11 kodierten Immunevasine gpUS2, gpUS3, gpUS6 und gpUS11 in HCMV-infizierten Zellen führt zu einer deutlichen Reduktion der MHC-I-vermittelten Antigenpräsentation. Die Wirkung der einzelnen Evasine im Verlauf der HCMV-Infektion ist jedoch unzureichend aufgeklärt. In Voruntersuchungen wurden HCMV-Mutanten hergestellt, die jeweils nur eines der vier Proteine exprimieren (Abb. 23).

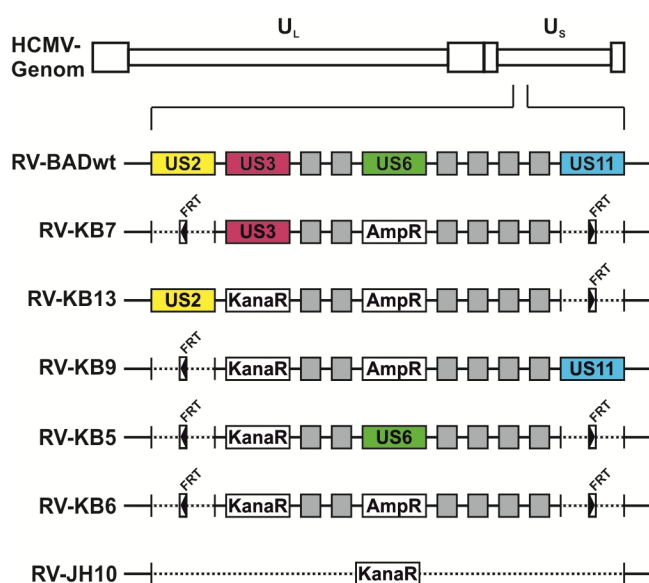


Abb. 23: Schematische Übersicht der zur Analyse der immunevasiven Funktionen von gpUS3 verwendeten Virusmutanten

Alle Mutanten basieren auf dem WT-Stamm RV-BADwt und wurden bis auf RV-JH10 durch BAC-Mutagenese von K. Besold (Mainz) hergestellt. Bei der Konstruktion der entsprechenden BACmide war darauf geachtet worden, dass ausschließlich die Leserahmen der Evasine, nicht jedoch die dazwischen liegenden Genomabschnitte deletiert wurden. RV-JH10 wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch Deletion der gesamten US2-11-Region hergestellt. (AmpR: Ampicillinresistenz-Kassette; FRT: Erkennungssequenz für Flp-Rekombinase; KanaR: Kanamycinresistenz-Kassette; U_L : unique long-Region, U_S : unique short-Region)

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle von gpUS3 alleine und im Zusammenspiel mit den drei anderen Immunevasinen unter Einsatz dieser Mutanten zu untersuchen. Insbesondere sollte ermittelt werden, welchen Einfluss gpUS3 auf die Antigenpräsentation unmittelbar nach Infektion ausübt. Hintergrund für diese Fragestellung war die sehr starke Expression des US3-Gens unmittelbar nach Infektion und seine streng regulierte Abschaltung nach bereits wenigen Stunden (Biegalka, 1995; Liu *et al.*, 2002).

3.2.1 Einfluss von gpUS3 auf die MHC-I-vermittelte Antigenpräsentation

In einem ersten Ansatz sollte der immunevasive Effekt von gpUS3 bei fehlender Expression von gpUS2, gpUS6 und gpUS11 in infizierten HFF untersucht werden. Dazu wurde RV-KB7 (siehe Abb. 23) eingesetzt. Als Vergleichsstandard wurde der gpUS2-11-positive Ausgangsstamm RV-BADwt gewählt. Zur Normierung wurden die

MHC-I-Oberflächenexpression und die Antigenpräsentation von Zellen, die mit dem gpUS2-11-negativen Stamm RV-KB6 infiziert worden waren, als 100% angenommen.

Zunächst wurde der Einfluss von gpUS3 auf die MHC-I-Oberflächenexpression infizierter HFF mit Durchflusszytometrie untersucht. Da gpUS3 als IE-Protein sehr schnell nach Infektion exprimiert wird, wurden zunächst HFF analysiert, die nur kurz infiziert worden waren. Diese Zellen wurden bei einer *moi* von fünf mit RV-BADwt, RV-KB7 oder RV-KB6 infiziert. Nach einer, drei und sechs Stunden wurden die Zellen geerntet und die Expression von MHC-I-Molekülen auf ihrer Oberfläche im Durchflusszytometer ermittelt (Abb. 24A).

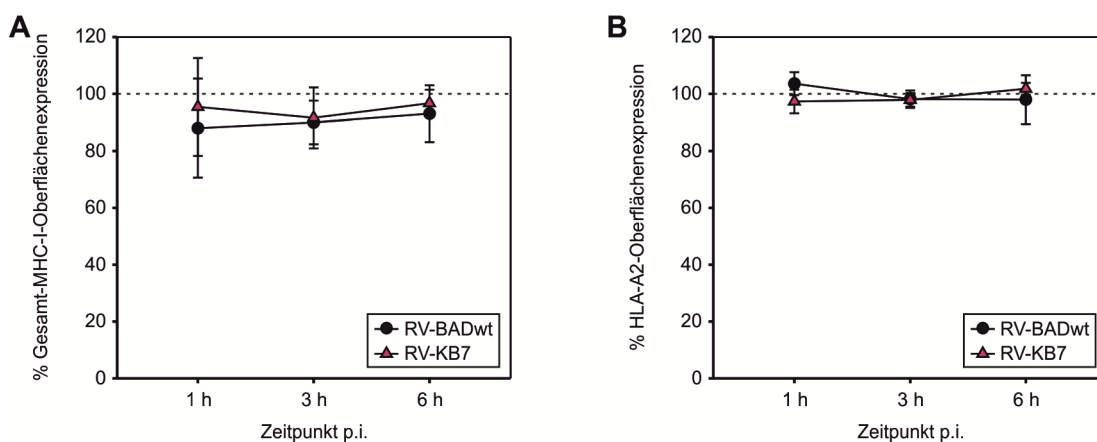


Abb. 24: Einfluss von gpUS3 auf die MHC-I- und HLA-A2-Oberflächenexpression infizierter HFF zu sehr frühen Zeitpunkten nach Infektion

HFF wurden mit RV-BADwt, RV-KB7 (US3+) oder RV-KB6 (US2/3/6/11-) mit einer *moi* von fünf infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet und durchflusszytometrisch unter Verwendung des HLA-ABC-spezifischen monoklonalen Antikörpers W6/32 und des HLA-A2-spezifischen monoklonalen Antikörpers BB7.2 auf die Oberflächenexpression (A) aller MHC-I-Moleküle oder (B) nur der HLA-A2-Moleküle hin untersucht. Für jeden Zeitpunkt wurde die spezifische MFI der RV-KB6-Proben als 100% MHC-I- bzw. HLA-A2-Oberflächenexpression definiert (dargestellt als gestrichelte Linie). Die spezifischen MFIs der RV-BADwt- und RV-KB7-Proben wurden in Relation dazu gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

In diesem Ansatz konnte kein Einfluss von gpUS3 auf die Expression von MHC-I-Molekülen auf der Oberfläche infizierter Zellen gefunden werden. Allerdings zeigte sich zu so kurzen Zeitpunkten nach Infektion auch keine Reduktion von Gesamt-MHC-I auf der Oberfläche von Zellen, die mit gpUS2-11-positivem Virus infiziert worden waren.

Da sich die Bestimmung der Oberflächenexpression des MHC-I-Allels HLA-A2 bereits in der Vergangenheit für die Detektion von Immunevasin-vermittelten Effekten als empfindlicher erwiesen hatte (Besold *et al.*, 2009), wurde der Versuch wiederholt und ein HLA-A2-spezifischer Antikörper für die durchflusszytometrische Analyse verwendet (Abb. 24B).

Ähnlich wie für Gesamt-MHC-I zeigte sich auch für HLA-A2 nach kurzer Infektionsdauer kein Effekt von gpUS3 alleine oder von gpUS2-11 in Kombination.

Um zu untersuchen, ob gpUS3 möglicherweise über seinen Expressionszeitraum hinaus einen immunevasiven Effekt auf die MHC-I-Präsentation infizierter HFF ausübte, wurden infizierte Zellen zu späteren Infektionszeitpunkten im Durchflusszytometer auf die MHC-I-Oberflächenexpression hin untersucht (Abb. 25).

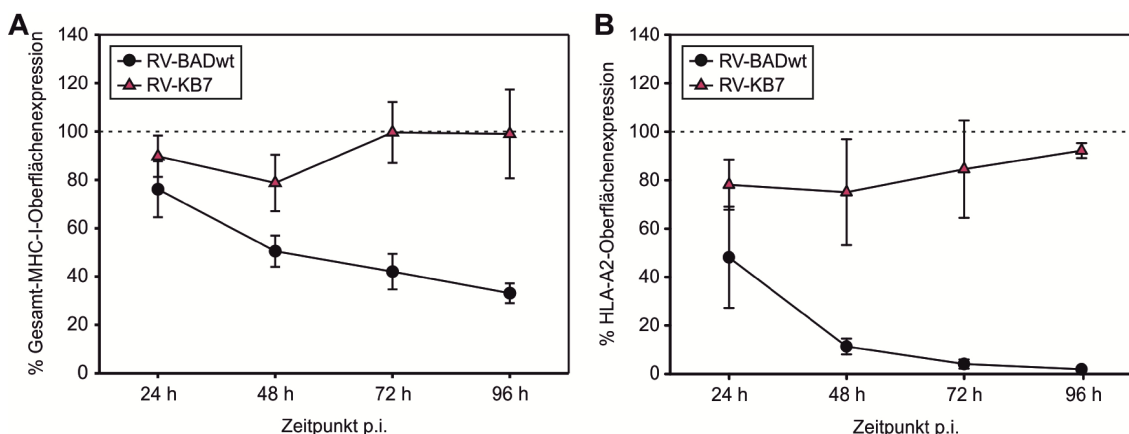


Abb. 25: Einfluss von gpUS3 auf die MHC-I- und HLA-A2-Oberflächenexpression infizierter HFF zu späten Zeitpunkten nach Infektion

HFF wurden mit RV-BADwt, RV-KB7 (US3+) oder RV-KB6 (US2/3/6/11-) mit einer *moi* von fünf infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet und durchflusszytometrisch unter Verwendung des HLA-ABC-spezifischen monoklonalen Antikörpers W6/32 und des HLA-A2-spezifischen monoklonalen Antikörpers BB7.2 auf die Oberflächenexpression (A) aller MHC-I-Moleküle oder (B) nur der HLA-A2-Moleküle hin untersucht. Für jeden Zeitpunkt wurde die spezifische MFI der RV-KB6-Proben als 100% definiert (dargestellt als gestrichelte Linie). Die spezifischen MFIs der RV-BADwt- und RV-KB7-Proben wurden in Relation dazu gesetzt. In A sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus sieben unabhängigen Experimenten dargestellt, in B aus vier unabhängigen Experimenten.

Wie erwartet führte die Expression von gpUS2-11 nach Infektion mit RV-BADwt zu einer deutlichen und im zeitlichen Verlauf zunehmenden Reduktion der MHC-I-Oberflächenexpression. Dies betraf sowohl Gesamt-MHC-I (Abb. 25A) als auch HLA-A2 (Abb. 25B). In RV-KB7-infizierten Zellen war die Oberflächenexpression von MHC-I-Molekülen 24 und 48 Stunden nach Infektion leicht vermindert. Die Reduktion war jedoch geringer als die, die nach Infektion mit dem gpUS2-11-positiven Virus RV-BADwt gesehen wurde. Nach 72 und 96 Stunden Infektion mit dem gpUS3-exprimierenden RV-KB7 konnte kein Effekt mehr beobachtet werden. In analoger Weise war auch HLA-A2 auf RV-KB7-infizierten Zellen nach 24 und 48 Stunden vermindert exprimiert. Im Gegensatz zu Gesamt-MHC-I war dieser Effekt aber auch noch 72 Stunden und, geringgradig, auch nach 96 Stunden noch sichtbar. Insgesamt

war aber die Reduktion der HLA-A2-Oberflächenexpression in RV-KB7-infizierten Zellen wiederum deutlich schwächer ausgeprägt als in RV-BADwt-infizierten Zellen.

Diese Ergebnisse zeigten, dass die gpUS3-Expression in späteren Infektionsphasen die Oberflächenexpression von MHC-I-Molekülen behinderte. Jedoch schienen auch andere Evasine notwendig zu sein, um das Niveau der Reduktion von WT-HCMV zu erreichen. Dieser späte Effekt von gpUS3 war bemerkenswert, da er mit deutlicher Verzögerung zur maximalen Transkription von US3 auftrat und sogar noch lange nach dem Abschalten des Gens wirksam war.

Eine Voraussetzung für eine detektierbare Veränderung der Anzahl an MHC-I-Molekülen auf der Oberfläche HCMV-infizierter Zellen durch Immunevasine ist eine ausreichend lange Expression dieser viralen Proteine. Dies war für die Untersuchung der späteren Infektionszeitpunkte erfüllt. Bei kürzerer Infektionsdauer bestand jedoch die Gefahr, dass mögliche Effekte auf die funktionelle Präsentation viraler Peptide durch die metabolische Stabilität von denjenigen MHC-I-Molekülen, die sich zum Infektionszeitpunkt bereits auf der Zelloberfläche befanden, verdeckt wurden. Um dies auszuschließen und gleichzeitig einen möglichen, immunevasiven Effekt von gpUS3 funktionell zu beleuchten, wurden ELISpot-Analysen durchgeführt. Zusätzlich wurden die infizierten Zellen in der IE-Phase der viralen Infektion durch eine CH/ActD-Behandlung arretiert. Diese Behandlung erlaubte aufgrund des verlängerten Zeitraums der IE-Transkription und -Translation die verstärkte Expression von IE-Genen, zu denen bekanntermaßen auch US3 gehört. Durch die verstärkte Expression von gpUS3 und die verlängerte Zeitspanne, in der gpUS3 auf den MHC-I-Präsentationsweg einwirken konnte, sollte ein möglicher Effekt von gpUS3 in der ELISpot-Analyse sichtbar gemacht werden. Als CTLs wurden in dieser Analyse IE1-spezifische CTLs eingesetzt (Abb. 26A).

Überraschenderweise war die IE1-Antigenpräsentation RV-KB7-infizierter Zellen, in denen gpUS3 alleine exprimiert wurde, deutlich höher als die von RV-BADwt-infizierten Zellen. Dies deutete darauf hin, dass die sehr frühe Immunevasion nicht durch gpUS3 vermittelt wurde. Gleichzeitig war trotz des Fehlens der vier Immunevasine gpUS2, gpUS3, gpUS6 und gpUS11 die Antigenpräsentation RV-KB6-infizierter Zellen auf das Niveau RV-BADwt-infizierter Zellen reduziert. Dies wies darauf hin, dass in der sehr frühen Immunevasion neben den bekannten Immunevasinen ein weiterer, noch nicht identifizierter immunevasiver Faktor eine Rolle spielte. GpUS3 schien die immunevasive Wirkung dieses Faktors aufzuheben, da die Antigenpräsentation

RV-KB7-infizierter Zellen auf deutlich höherem Niveau war als die von RV-KB6-infizierten Zellen. Dieser anti-immunevasive Effekt von gpUS3 war in RV-BADwt-infizierten Zellen nicht zu beobachten, was darauf hindeutete, dass die drei restlichen Immunevasine den Effekt inhibierten oder selbst aktiv zur Reduktion der Antigenpräsentation beitrugen.

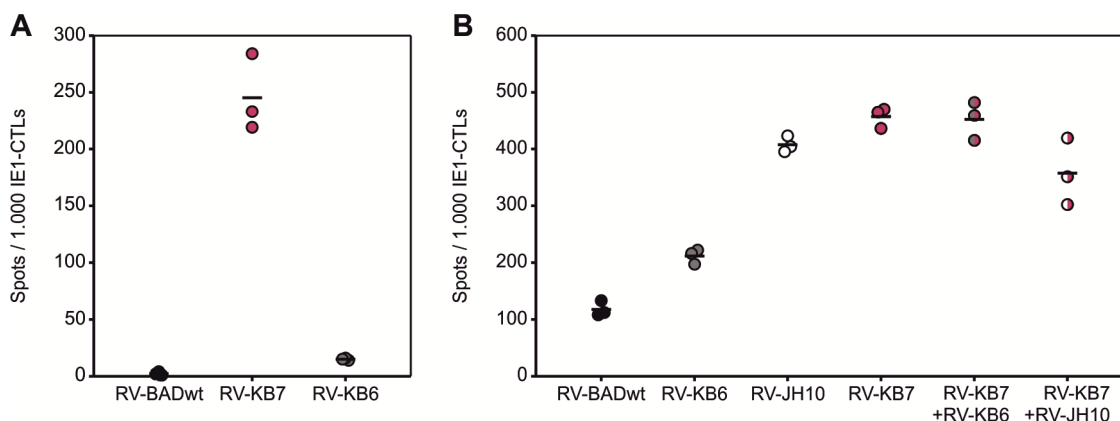


Abb. 26: Einfluss von gpUS3 auf die MHC-I-vermittelte Antigenpräsentation infizierter HFF unter CH/ActD-Behandlung

HFF wurden (A) mit RV-BADwt, RV-KB7 (US3+) und RV-KB6 (US2/3/6/11-) oder (B) zusätzlich noch mit RV-JH10 (US2-11), RV-KB7+RV-KB6 und RV-KB7+RV-JH10 mit einer *moi* von fünf infiziert. Nach der Behandlung mit 250 µg / ml Cycloheximid für 10 Stunden und mit 10 µg / ml Actinomycin D für 13,5 Stunden wurden die Zellen mit 0,5% PFA fixiert. Die ELISpot-Analyse wurde mit IE1-spezifischen CTLs vorgenommen. Jede Probe wurde in drei Ansätzen analysiert. Für jede Probe sind die Spotzahlen der einzelnen Ansätze als Punkte und der Mittelwert aus den Spotzahlen der drei Ansätze als horizontaler Strich dargestellt.

Da für einige der zwischen den vier Immunevasinen gpUS2, gpUS3, gpUS6 und gpUS11 kodierten Proteine und microRNAs bereits immunevasive Funktionen vermutet und beschrieben worden waren (siehe 1.4.1.2), sollte in einer weiteren ELISpot-Analyse mit CH/ActD-Behandlung getestet werden, ob einer dieser Faktoren für die sehr frühe Immunevasion verantwortlich ist. Dafür wurden die Zellen zusätzlich mit einer Virusmutante infiziert, in der die gesamte Genregion US2-11 deletiert war (RV-JH10; siehe Abb. 23). Außerdem wurden Koinfektionen von RV-KB7 mit RV-KB6 oder RV-JH10 vorgenommen, um den Effekt von gpUS3 auf die sehr frühe Immunevasion näher zu untersuchen (Abb. 26B).

Die IE1-Antigenpräsentation RV-JH10-infizierter Zellen war deutlich höher als die von RV-KB6-infizierten Zellen. Zur sehr frühen Immunevasion schien also wirklich ein Faktor beizutragen, der in der US2-11-Genregion zwischen den vier bekannten Immunevasinen kodiert ist. Wurde in RV-KB6-infizierten Zellen durch die Koinfektion mit RV-KB7 gpUS3 exprimiert, so wurde die Antigenpräsentation auf das Niveau von

RV-JH10-infizierten Zellen angehoben. Auch die Antigenpräsentation von Zellen, die mit RV-KB7 alleine infiziert worden waren, war mit der von RV-JH10-infizierten Zellen vergleichbar. Die Antigenpräsentation RV-JH10/RV-KB7-koinfizierter Zellen war im Vergleich zu Zellen, die mit einer dieser Mutanten alleine infiziert worden waren, nicht verändert. Diese Ergebnisse unterstützten die Vermutung, dass gpUS3 auf die immenevasive Funktion eines noch nicht identifizierten Faktors im Rahmen der sehr frühen Immunevasion einen inhibitorischen Effekt ausübt.

Um den Effekt von gpUS3 auf die Antigenpräsentation zu späteren Zeitpunkten nach Infektion zu untersuchen, wurden infizierte HFF 24 bis 96 Stunden nach Infektion in eine ELISpot-Analyse mit pp65- und IE1-spezifischen CTLs eingesetzt (Abb. 27).

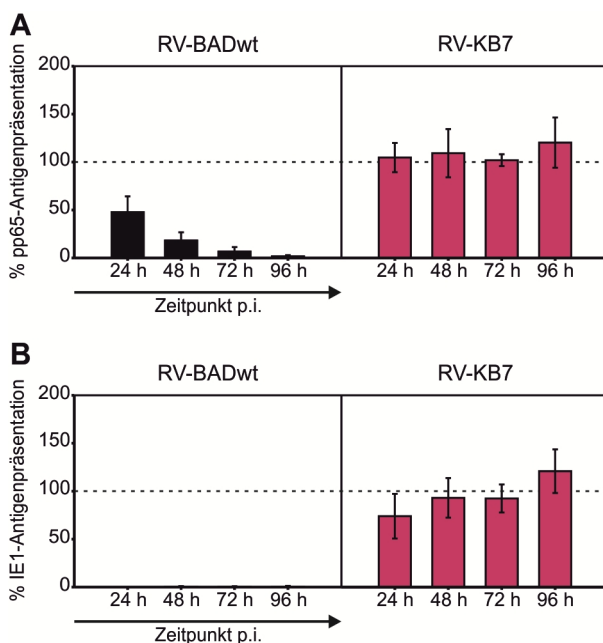


Abb. 27: Einfluss von gpUS3 auf die MHC-I-vermittelte Antigenpräsentation infizierter HFF zu späteren Zeitpunkten nach Infektion

HFF wurden mit RV-BADwt, RV-KB7 (US3+) oder RV-KB6 (US2/3/6/11-) mit einer *moi* von fünf infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die infizierten Zellen geerntet und in eine ELISpot-Analyse entweder mit **(A)** pp65-spezifischen CTLs oder **(B)** IE1-spezifischen CTLs eingesetzt. Jede Probe wurde in drei Ansätzen analysiert. Aus den Spotzahlen der drei Ansätze wurde der Mittelwert gebildet. Für jeden Zeitpunkt wurde der Mittelwert der RV-KB6-Proben als 100% definiert (dargestellt als gestrichelte Linie). Die Mittelwerte der RV-BADwt- und RV-KB7-Proben wurden in Relation dazu gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus sechs unabhängigen Experimenten.

Wie in der durchflusszytometrischen Analyse dieser Infektionszeitpunkte konnte eine begrenzte immunevasive Wirkung von gpUS3 festgestellt werden. Eine anti-immunevasive Wirkung wie im Zeitraum sehr früh nach Infektion konnte nicht beobachtet werden. Nach Infektion mit dem gpUS3-exprimierenden RV-KB7 war die Präsentation des IE1-Testpeptids nach 24-stündiger Infektion leicht reduziert (Abb. 27B). Zu späteren Zeitpunkten hingegen war keine Reduktion der Präsentation zu finden. Auf die Präsentation des pp65-Peptids schien gpUS3 alleine keinerlei Einfluss zu nehmen (Abb. 27A). Demgegenüber war in RV-BADwt-infizierten Zellen sowohl die pp65-Antigenpräsentation als auch die IE1-Antigenpräsentation im Vergleich zu RV-KB6-infizierten Zellen deutlich reduziert. Ein Einfluss der Expression

von gpUS3 als einziges Immunevasin auf die MHC-I-vermittelte Antigenpräsentation zu späten Zeitpunkten nach Infektion konnte also nur für die IE1-Präsentation beobachtet werden.

Zusammengefasst konnte für gpUS3 sowohl eine steigernde als auch eine reduzierende Wirkung auf die MHC-I-vermittelte Antigenpräsentation infizierter HFF beobachtet werden. Sehr früh nach Infektion war eine deutliche Steigerung der Antigenpräsentation sichtbar, was der Rolle von gpUS3 als Immunevasin widerspricht. Zu späteren Zeitpunkten konnte eine relativ geringe Reduktion der Antigenpräsentation festgestellt werden. Dabei war auffällig, dass sowohl die Oberflächenexpression von MHC-I-Molekülen als auch die funktionelle Antigenpräsentation über den eigentlichen Expressionszeitraum von US3 hinaus (Ahn *et al.*, 1996) beeinträchtigt war.

3.2.2 Wechselwirkung von gpUS3 mit den E-Proteinen gpUS2 oder gpUS11

Die ELISpot-Analyse des Effekts von gpUS3 auf die MHC-I-vermittelte Antigenpräsentation sehr früh nach Infektion ließ vermuten, dass in WT-infizierten Zellen eines der drei Immunevasine gpUS2, gpUS6 oder gpUS11 dem anti-immunevasiven Effekt von gpUS3 in dieser Infektionsphase entgegenwirkt (siehe Abb. 26A). Dieser Annahme widersprachen jedoch publizierte Daten, die die Expression von US2 und US11 der frühen, von US6 der späten Infektionsphase zuordneten (Jones and Muzithras, 1991; Jones and Sun, 1997). Es sollte daher geprüft werden, ob US2 und US11 in unseren Händen bereits sehr früh nachweisbar war. Hierzu wurden Northern Blot-Analysen durchgeführt. Es wurde gesamtzelluläre RNA aus RV-BADwt-infizierten HFF, die mit CH behandelt worden waren, gewonnen. Neben US2- und US11-spezifischen Sonden wurden für die Northern Blot-Analyse auch Sonden gegen US3 und das pp71-Gen UL82 als Beispiele für IE- bzw. E-L-exprimierte Gene eingesetzt. Als Ladekontrolle wurde außerdem eine Sonde gegen das zelluläre Haushaltsgen GAPDH mitgeführt (Abb. 28).

Wie erwartet waren in CH-behandelten Zellen große Mengen von US3-mRNA nachweisbar. Überraschenderweise waren aber auch mRNAs von US2 und US11 unter dem CH-Block detektierbar. Dabei war die Expression der US2-mRNA in CH-behandelten Zellen etwas stärker als in unbehandelten Zellen. Auch US11-mRNA konnte unter dem CH-Block nachgewiesen werden, jedoch in diesem Fall im Vergleich zu unbehandelten Zellen in geringerer Menge. Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass entgegen der bisherigen Annahme sowohl gpUS2 als auch gpUS11 in der IE-Phase der Infektion exprimiert werden.

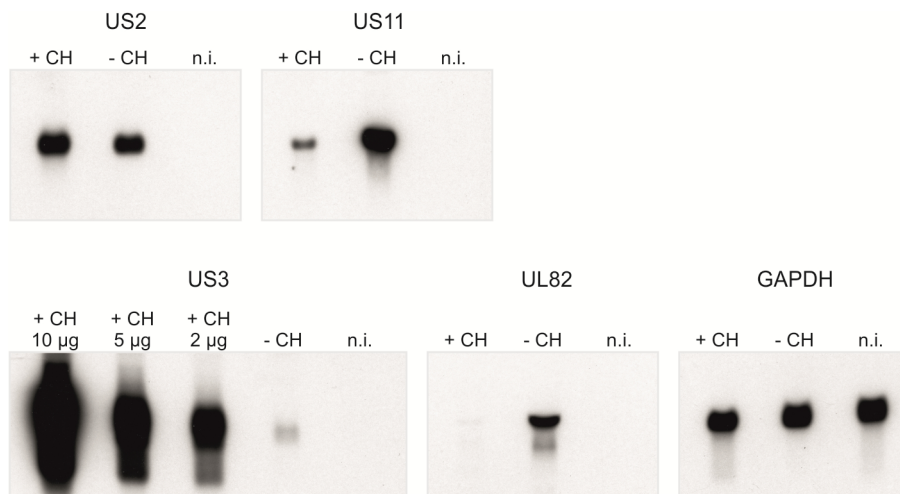


Abb. 28: mRNA-Expression von US2 und US11 in RV-BADwt-infizierten Zellen unter CH-Behandlung

HFF wurden mit RV-BADwt mit einer *moi* von fünf infiziert. Um IE-mRNA zu akkumulieren wurden die Zellen für 10 Stunden mit 250 µg / ml Cycloheximid behandelt (+CH-Ansätze). Als Kontrolle wurden zusätzlich unbehandelte infizierte Zellen (-CH-Ansätze) und unbehandelte nicht infizierte Zellen (n.i.) mitgeführt. Anschließend wurde gesamtzelluläre RNA isoliert. Für die Northern Blot-Analyse wurde, wenn nicht anders angegeben, 10 µg RNA in die Gelelektrophorese eingesetzt. Als Größenstandard wurde ein ssRNA-Marker (NEB, Ipswich, MA, USA) benutzt. Zur Detektion der mRNAs der angegebenen Gene wurden spezifische DNA-Sonden verwendet, die mittels Chemilumineszenz auf der Northern Blot-Membran sichtbar gemacht wurden (20 min Belichtungszeit).

In der Folge sollte eine mögliche Wechselwirkung von gpUS3 mit gpUS2 oder gpUS11 untersucht werden. Hierzu wurden erneut ELISpot-Analysen mit CH/ActD-behandelten Zellen durchgeführt. Dafür standen uns eine gpUS2-exprimierende Mutante und eine gpUS11-exprimierende Mutante zur Verfügung [RV-KB13 und RV-KB9 (Besold *et al.*, 2009); Abb. 23], die in Koinfektions-Ansätzen mit dem gpUS3-exprimierenden RV-KB7 eingesetzt wurden (Abb. 29).

Die Antigenpräsentation RV-KB13-infizierter Zellen, in denen gpUS2 alleine exprimiert wurde, war mit der von RV-BADwt- oder RV-KB6-infizierten Zellen vergleichbar. Die Antigenpräsentation RV-KB9-infizierter Zellen, in denen gpUS11 alleine exprimiert wurde, war hingegen leicht erhöht. Dennoch war die Antigenpräsentation RV-KB9-infizierter Zellen deutlich geringer als die von RV-KB7-infizierten Zellen. Sowohl in RV-KB7/RV-KB13- als auch in RV-KB7/RV-KB9-koinfizierten Zellen war im Vergleich zu RV-KB13- bzw. RV-KB9-infizierten Zellen trotz der zusätzlichen Expression von gpUS3 keine Erhöhung der Antigenpräsentation festzustellen. Dies wies darauf hin, dass sowohl gpUS2 als auch gpUS11 sehr früh nach Infektion tatsächlich einen immunevasiven Effekt ausüben und dem anti-immunevasiven Effekt von gpUS3 entgegenwirken.

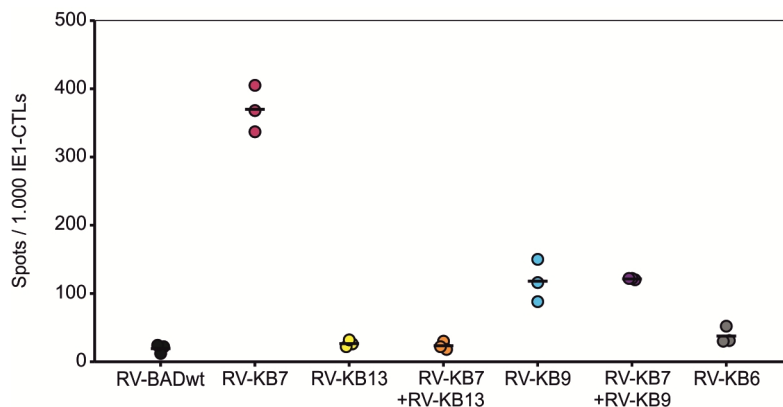


Abb. 29: Einfluss der Koexpression von gpUS3 und gpUS2 oder gpUS11 auf die MHC-I-vermittelte Antigenpräsentation infizierter HFF unter CH/ActD-Behandlung

HFF wurden mit RV-BADwt, RV-KB7 (US3+), RV-KB13 (US2+), RV-KB7+RV-KB13 (US3+/US2+), RV-KB9 (US11+), RV-KB7+RV-KB9 (US3+/US11+) oder RV-KB6 (US2/3/6/11-) mit einer *moi* von fünf infiziert. Nach der Behandlung mit 250 µg / ml Cycloheximid für 10 Stunden und mit 10 µg / ml Actinomycin D für 13,5 Stunden wurden die Zellen mit 0,5% PFA fixiert. Die ELISpot-Analyse wurde mit IE1-spezifischen CTLs vorgenommen. Jede Probe wurde in drei Ansätzen analysiert. Für jede Probe sind die Spotzahlen der einzelnen Ansätze als Punkte und der Mittelwert aus den Spotzahlen der drei Ansätze als horizontaler Strich dargestellt.

Auch die HCMV-Immunevasion zu späteren Zeitpunkten sollte hinsichtlich einer Wechselwirkung von gpUS3 mit gpUS2 oder gpUS11 untersucht werden. Dafür wurde zunächst der Einfluss dieser Proteine auf die MHC-I-vermittelte Antigenpräsentation anhand der MHC-I-Oberflächenexpression infizierter HFF 24 bis 96 Stunden nach Infektion analysiert (Abb. 30).

Nach Koinfektion von RV-KB7 und RV-KB13 zeigte sich ein deutlich kooperativer Effekt von gpUS3 und gpUS2 (Abb. 30A). An allen untersuchten Zeitpunkten war die Oberflächenexpression von MHC-I-Molekülen in ähnlichem Ausmaß wie nach Infektion mit dem gpUS2-11-positiven Ausgangsstamm RV-BADwt vermindert. Die Expression von gpUS3 und gpUS2 war somit in diesem Ansatz bereits ausreichend, um eine vollständige MHC-I-Immunevasion zu induzieren. Darüber hinaus konnte für gpUS2 alleine eine deutlich stärkere Reduktion der Oberflächenexpression von MHC-I-Molekülen beobachtet werden als für gpUS3. Auch für gpUS3 und gpUS11 war ein deutlicher kooperativer Effekt auf die Expression von Gesamt-MHC-I auf der Oberfläche koinfizierter Zellen feststellbar (Abb. 30B). Die Expression von gpUS3 und gpUS11 führte zu einer Reduktion der Oberflächenexpression von MHC-I-Molekülen, die nahezu WT-Niveau erreichte. Lediglich nach 96 Stunden Infektion war Gesamt-MHC-I in mit RV-KB7 und RV-KB9 koinfizierten Zellen im Vergleich zum gpUS2-11-positiven Ausgangsstamm RV-BADwt leicht erhöht. Im Gegensatz dazu führte die Infektion mit RV-KB9 alleine zu einer mit RV-KB7 vergleichbar geringen Reduktion von

Gesamt-MHC-I, die lediglich nach 96 Stunden deutlicher wurde. Somit konnte in dieser Analyse für gpUS3 sowohl im Zusammenspiel mit gpUS2 als auch mit gpUS11 eine immunevasive Wirkung zu späteren Zeitpunkten nach Infektion beobachtet werden.

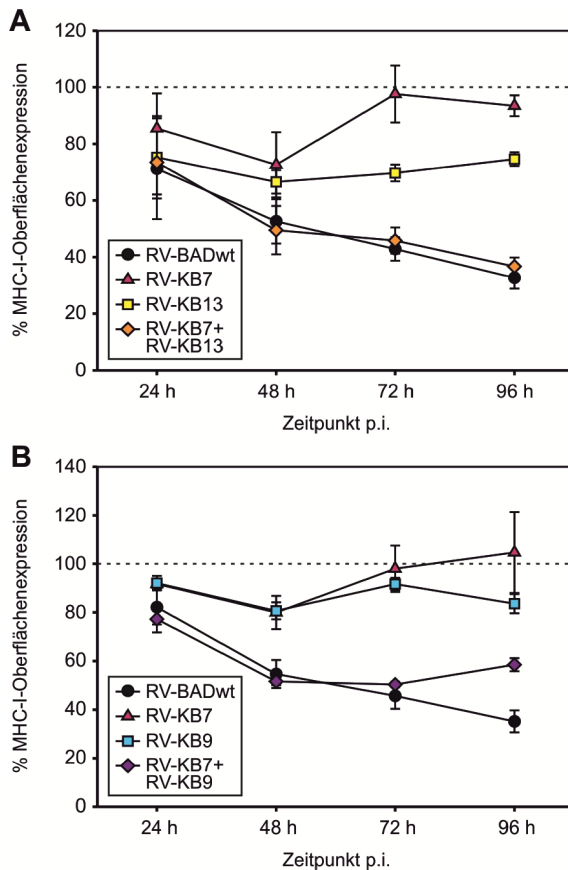


Abb. 30: Einfluss der Koexpression von gpUS3 und gpUS2 oder gpUS11 auf die MHC-I-Oberflächenexpression infizierter HFF im Verlauf der Infektion

HFF wurden mit RV-BADwt, RV-KB7 (US3+), RV-KB6 (US2/3/6/11-) sowie (A) RV-KB13 (US2+) und RV-KB7+RV-KB13 (US3+/US2+) oder (B) RV-KB9 (US11+) und RV-KB7+RV-KB9 (US3+/US11+) mit einer *moi* von fünf infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet und unter Verwendung des HLA-ABC-spezifischen monoklonalen Antikörpers W6/32 durchflusszytometrisch auf die MHC-I-Oberflächenexpression hin untersucht. Für jeden Zeitpunkt wurde die spezifische MFI der RV-KB6-Proben als 100% definiert (dargestellt als gestrichelte Linie). Die spezifischen MFIs der Proben der anderen Virusmutanten wurden in Relation dazu gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

Um die beobachteten Wechselwirkungen auch auf funktioneller Ebene zu untersuchen, wurde die Einschränkung der Erkennung infizierter Zellen durch CTLs im ELISpot analysiert. HLA-A2-positive HFF wurden mit RV-KB7 und RV-KB13 oder RV-KB9 koinfiziert und die Erkennung der so infizierten Zellen mit pp65- oder IE1-spezifischen CTLs bestimmt (Abb. 31).

Die Koinfektion mit RV-KB7 und RV-KB13 führte zu einer deutlichen Einschränkung der Erkennung durch pp65-CTLs (Abb. 31A). Allerdings wurde das WT-Niveau nicht vollständig erreicht. Demgegenüber hatte die Infektion mit RV-KB13 alleine wie die Infektion mit RV-KB7 alleine kaum einen Einfluss auf die pp65-spezifische Erkennung. Die Erkennung RV-KB7/RV-KB9-koinfizierter Zellen durch pp65-spezifische CTLs war nur schwach reduziert. Das Ausmaß dieser Reduktion überstieg nicht die Evasion, die durch den gpUS11-exprimierenden RV-KB9 alleine induziert wurde.

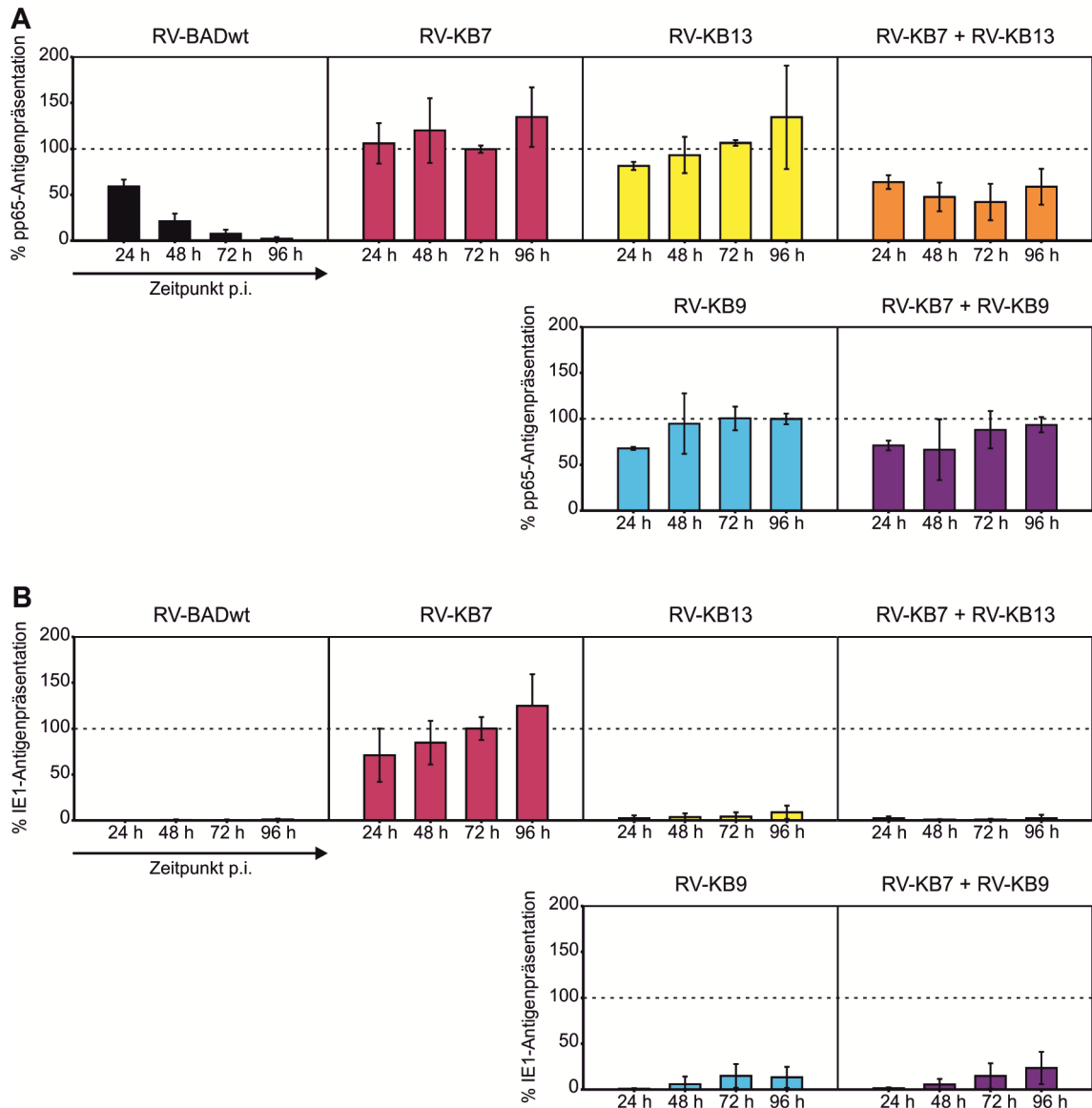


Abb. 31: Einfluss der Koexpression von gpUS3 und gpUS2 oder gpUS11 auf die MHC-I-vermittelte Antigenpräsentation infizierter HFF im Verlauf der Infektion

HFF wurden mit RV-BADwt, RV-KB7 (US3+), RV-KB13 (US2+), RV-KB7+RV-KB13 (US3+/US2+), RV-KB9 (US11+), RV-KB7+RV-KB9 (US3+/US11+) oder RV-KB6 (US2/3/6/11-) mit einer *moi* von fünf infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die infizierten Zellen geerntet und in eine ELISpot-Analyse entweder mit (A) pp65-spezifischen CTLs oder (B) IE1-spezifischen CTLs eingesetzt. Jede Probe wurde in drei Ansätzen analysiert. Aus den Spotzahlen der drei Ansätze wurde der Mittelwert gebildet. Für jeden Zeitpunkt wurde der Mittelwert der RV-KB6-Proben als 100% definiert (dargestellt als gestrichelte Linie). Die Mittelwerte der mit den anderen Viren infizierten Proben wurden dazu ins Verhältnis gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

Für IE1-spezifische CTLs reichte die Expression von gpUS2 alleine nach Infektion mit RV-KB13 bereits aus, um die Erkennung infizierter Zellen fast vollständig zu unterdrücken (Abb. 31B). Dennoch konnte nach Koinfektion von RV-KB7 und RV-KB13 noch eine weitere Reduktion beobachtet werden. Trotzdem wurde hier, wie bei

pp65-CTLs, das WT-Niveau nicht vollständig erreicht. Die IE1-spezifische Erkennung wurde auch durch gpUS11 alleine bereits erheblich beeinträchtigt. Allerdings wurde das WT-Niveau der Evasion hier ebenfalls nicht erreicht. Die zusätzliche Infektion mit RV-KB7 steigerte die RV-KB9-vermittelte Evasion der IE1-Erkennung nicht weiter.

Zusammengefasst zeigten diese Experimente, dass es nach HCMV-Infektion von HFF eine deutlich kooperative Wirkung von gpUS3 und gpUS2 in Bezug auf die Reduktion der MHC-I-Oberflächenexpression und auf die Erkennung durch virusspezifische CTLs gibt. Im Gegensatz dazu konnte für gpUS3 und gpUS11 lediglich eine kooperative Wirkung bei der Reduktion der MHC-I-Oberflächenexpression beobachtet werden, aber kein kooperativer Effekt in Bezug auf die Evasion der MHC-I-vermittelten Erkennung HCMV-infizierter Zellen.

3.2.3 Wechselwirkung von gpUS3 mit gpUS6

Während die Gene für gpUS2 und gpUS11 zu frühen Phasen der HCMV-Infektion exprimiert werden, handelt es sich laut Literaturangaben bei US6 um ein spätes Gen (Jones and Muzithras, 1991). Ein kooperativer Effekt von gpUS6 und gpUS3 erschien daher unwahrscheinlich. Zum Ausschluss eines solchen Effekts wurden auch hier zu späteren Zeitpunkten nach Infektion Koinfektionsexperimente durchgeführt. Eine gpUS6-exprimierende Mutante (RV-KB5, siehe Abb. 23) stand auch hier zur Verfügung.

Nach Koinfektion mit RV-KB7 und RV-KB5 konnte, verglichen mit der Infektion mit RV-KB5 alleine, ein zusätzlicher, aber nur sehr geringer Einfluss von gpUS3 auf die Expression von MHC-I-Molekülen auf der Oberfläche infizierter Zellen beobachtet werden (Abb. 32A).

Zur Bestätigung des Einflusses von gpUS3 wurde hier zusätzlich HLA-A2 im Durchflusszytometer analysiert (Abb. 32B). Dies war an dieser Stelle im Gegensatz zu den Koinfektionen mit RV-KB13 und RV-KB9 möglich, da gpUS6 im Gegensatz zu gpUS2 und gpUS11 (Besold *et al.*, 2009) nicht bereits alleine eine vollständige HLA-A2-Evasion vermittelte. Tatsächlich konnte hier ein etwas stärkerer, kooperativer Effekt von gpUS3 und gpUS6 als in der MHC-I-Analyse beobachtet werden. Der Effekt war insbesondere nach 24 und 48 Stunden deutlich sichtbar.

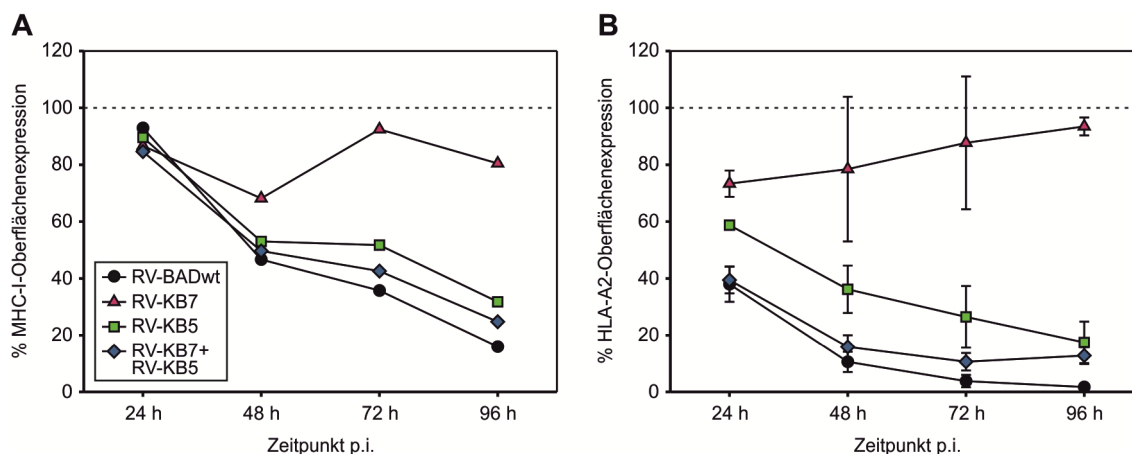


Abb. 32: Einfluss der Koexpression von gpUS3 und gpUS6 auf die MHC-I- und HLA-A2-Oberflächenexpression infizierter HFF im Verlauf der Infektion

HFF wurden mit RV-BADwt, RV-KB7 (US3+), RV-KB5 (US6+), RV-KB7+RV-KB5 (US3+/US6+) oder RV-KB6 (US2/3/6/11-) mit einer *moi* von fünf infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet und durchflusszytometrisch unter Verwendung des HLA-ABC-spezifischen monoklonalen Antikörpers W6/32 und des HLA-A2-spezifischen monoklonalen Antikörpers BB7.2 auf die Oberflächenexpression (A) aller MHC-I-Moleküle oder (B) nur der HLA-A2-Moleküle hin untersucht. Für jeden Zeitpunkt wurde die spezifische MFI der RV-KB6-Proben als 100% definiert (dargestellt als gestrichelte Linie). Die spezifischen MFIs der Proben der anderen Virusmutanten wurden in Relation dazu gesetzt. In A sind die Daten aus einem Experiment dargestellt. In B sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

Um dies weiter abzuklären und auf funktioneller Ebene Hinweise auf eine mögliche Kooperation von gpUS3 und gpUS6 zu erhalten, wurden wiederum ELISpot-Analysen durchgeführt (Abb. 33).

Auch hier hatte, ähnlich wie für gpUS11 beobachtet, die Koexpression von gpUS3 und gpUS6 keine zusätzliche immunevasive Wirkung, weder auf die Erkennung der Zellen durch pp65-spezifische CTLs (Abb. 33A) noch auf die Erkennung durch IE1-spezifische CTLs (Abb. 33B). In der Tat zeigte bereits die alleinige Expression von gpUS6 nach Infektion mit RV-KB5 einen deutlichen Effekt auf die pp65- bzw. IE1-spezifische Erkennung. Diese gpUS6-vermittelte Immunevasion konnte durch die zusätzliche Expression von gpUS3 nicht weiter gesteigert werden.

Zusammengefasst konnte also für gpUS3 und gpUS6 zwar ein kooperativer Effekt bezüglich der MHC-I- und auch der HLA-A2-Oberflächenexpression infizierter Zellen beobachtet werden. Hinsichtlich der MHC-I-vermittelten Antigenpräsentation war aber, ähnlich wie für gpUS11, keine Kooperation feststellbar.

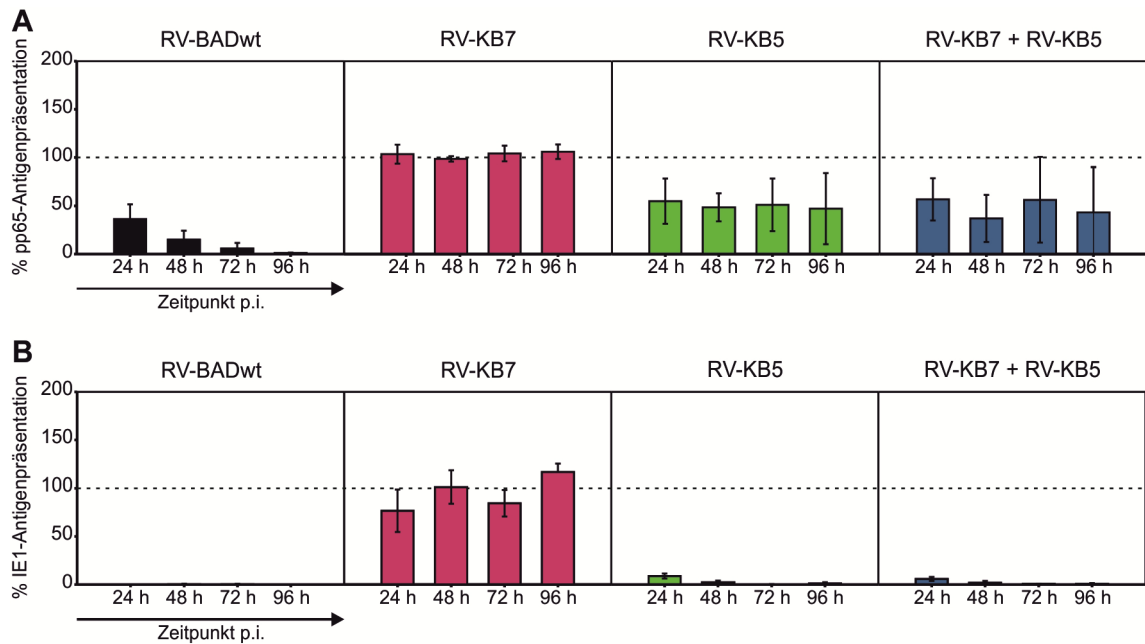


Abb. 33: Einfluss der Koexpression von gpUS3 und gpUS6 auf die MHC-I-vermittelte Antigenpräsentation infizierter HFF im Verlauf der Infektion

HFF wurden mit RV-BADwt, RV-KB7 (US3+), RV-KB5 (US6+), RV-KB7+RV-KB5 (US3+/US6+) oder RV-KB6 (US2/3/6/11-) mit einer *moi* von fünf infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die infizierten Zellen geerntet und in eine ELISpot-Analyse entweder mit (A) pp65-spezifischen CTLs oder (B) IE1-spezifischen CTLs eingesetzt. Jede Probe wurde in drei Ansätzen analysiert. Aus den Spotzahlen der drei Ansätze wurde der Mittelwert gebildet. Für jeden Zeitpunkt wurde der Mittelwert der RV-KB6-Proben als 100% definiert (dargestellt als gestrichelte Linie). Die Mittelwerte der mit den anderen Viren infizierten Proben wurden dazu ins Verhältnis gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

4 Diskussion

4.1 Immunevasive Funktion von pp71 in infizierten HFF

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Einflusses des Tegumentproteins pp71 auf die MHC-I-vermittelte Antigenpräsentation HCMV-infizierter Fibroblasten. Dazu wurden verschiedene HCMV-Mutanten eingesetzt, die pp71 verstärkt exprimierten (Abb. 7). Zum einen wurden Mutanten verwendet, in denen die verstärkte Expression von pp71 auf der Deletion des pp65-Gens beruhte. Zum anderen wurden Mutanten genutzt, in denen die gesteigerte pp71-Expression durch eine Fusion von pp71 mit EYFP hervorgerufen wurde.

Für die Analysen hatten pp65-Deletionsmutanten gegenüber EYFP-pp71-Mutanten den Vorteil, dass sie ein unverändertes pp71-Protein exprimieren. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Fusion von EYFP an pp71 die Funktion von pp71 beeinträchtigt, obwohl es bei der Charakterisierung der originalen EYFP-pp71-Mutante von Tavalai und Kollegen keinen Hinweis auf eine Einschränkung der pp71-Funktionsfähigkeit gab (Tavalai et al., 2008). EYFP-pp71-Mutanten hatten wiederum gegenüber pp65-Deletionsmutanten den Vorteil, dass sie pp65 exprimieren. Pp65 wurde in der Vergangenheit ein immunevasiver Effekt in Form einer Reduktion der MHC-I-Präsentation eines IE1-Peptids zugeschrieben (Gilbert et al., 1996). Daher bestand bei der Verwendung der pp65-Deletionsmutanten die Möglichkeit, dass in infizierten Zellen die MHC-I-Präsentation durch das Fehlen von pp65 erhöht ist. Dies wäre für den Nachweis einer möglichen pp71-vermittelten Reduktion der MHC-I-Präsentation hinderlich.

Der Mechanismus der Verstärkung der pp71-Expression ist sowohl bei den pp65-Deletionsmutanten als auch bei den EYFP-pp71-Mutanten nicht aufgeklärt. Für die pp65-Deletionsmutante RV-Hd65 konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Steigerung der pp71-Proteinmenge in infizierten Zellen (Abb. 10) mit einem erhöhten Spiegel der pp71-kodierenden mRNA einhergeht (Abb. 11). Dies deutet darauf hin, dass die erhöhte pp71-Expression auf eine verstärkte Transkription des pp71-Gens UL82 zurückzuführen ist, die vermutlich aus der veränderten Genomorganisation im Bereich der Deletion des pp65-Gens UL83 resultiert. Diese Annahme steht im Einklang

mit Ergebnissen aus Experimenten mit einer anderen pp65-Deletionsmutante von Taylor und Bresnahan, die nach Infektion mit ihrer pp65-Deletionsmutante eine Verminderung der pp71-Expression feststellten und daraufhin ebenfalls einen Einfluss der pp65-Deletion auf die pp71-Expression vermuteten (Taylor and Bresnahan, 2006b). Zusätzlich konnte in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden, dass nach Infektion mit der pp65-Deletionsmutante RV-KB14 die pp71-Expression nicht verändert war (Abb. 10). Somit konnte bei drei verschiedenen pp65-Deletionsmutanten ein jeweils unterschiedlicher Einfluss der pp65-Deletion auf die pp71-Expression festgestellt werden (eine Erhöhung, eine Verminderung oder keine Veränderung der Expression). Bei der Herstellung dieser Mutanten ist der Genombereich um UL82 und UL83 durch die Deletion von UL83 auf unterschiedliche Weise verändert worden. Dabei könnten auch Sequenzelemente modifiziert worden sein, die der Regulation pp71-Expression dienen. Daher liegt die Vermutung nahe, dass das Ausmaß der pp71-Expression der Mutanten die jeweilige Modifikation der regulatorischen Elemente durch die UL83-Deletion widerspiegelt.

Die verstärkte pp71-Expression in RV-Hd65-infizierten Zellen führte zu einem erhöhten pp71-Gehalt der RV-Hd65-Virionen. Dies konnte in einer indirekten Herangehensweise über die Aktivierung der IE1-Expression (Abb. 14) und über die Induktion der viralen DNA-Replikation (Abb. 15) gezeigt werden. Der erhöhte pp71-Gehalt korreliert mit den Ergebnissen der Charakterisierung von RV-AD169/EYFP-pp71 durch Tavalai und Kollegen. Hier wurde mittels Western Blot-Analyse ein gesteigerter Einbau von pp71 in die Virionen nachgewiesen (Tavalai et al., 2008). Eine vergleichende Western Blot-Analyse des pp71-Gehalts von RV-Hd65-Virionen zu WT-Virionen war nicht möglich, weil auch bei intensiver Reinigung der WT-Virionen eine Kontamination mit DBs nicht ganz zu verhindern war. Da sich DBs in ihrer Proteinzusammensetzung deutlich von Virionen unterscheiden, war eine Verfälschung der Ergebnisse nicht auszuschließen (Abb. 12 und Abb. 13).

Zur Untersuchung des Einflusses von pp71 auf die MHC-I-Antigenpräsentation wurden HCMV-Mutanten verwendet, die eine gesteigerte pp71-Expression aufwiesen und denen gleichzeitig die bekannten Immunevasine gpUS2-11 fehlten (Abb. 7). Zunächst wurde diese Untersuchung in einem Zeitraum von 24 bis 96 Stunden nach Infektion vorgenommen, in dem pp71 von infizierten Zellen neu synthetisiert wird. In der ELISpot-Analyse mit IE1- oder pp65-spezifischen CTLs konnte keine Einschränkung der Erkennung durch die erhöhte pp71-Expression in RV-dUS2-11_dpp65- und RV-JH9-infizierten Zellen beobachtet werden (Abb. 18). Allenfalls war 96 Stunden nach

Infektion ein Trend zu einer reduzierten Erkennung dieser Zellen durch IE1-spezifische CTLs bemerkbar. Mit pp65-CTLs konnte eine derartige Veränderung allerdings nicht beobachtet werden. Auch die durchflusszytometrische Analyse der infizierten Zellen zeigte keinen Einfluss der erhöhten pp71-Expression auf die Menge an MHC-I-Molekülen auf der Zelloberfläche (Abb. 19 und Abb. 20).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass pp71 im Zeitraum von 24 bis 96 Stunden nach Infektion in infizierten HFF keinen immunevasiven Effekt vermittelt. In infizierten humanen Glioblastomzellen hingegen konnte von Trgovcich und Kollegen 48 Stunden nach Infektion ein leichter immunevasiver Effekt nachgewiesen werden (Trgovcich *et al.*, 2006). Allerdings vermuteten Trgovcich und Kollegen dabei bereits, dass der immunevasive Effekt in HFF nicht vorhanden sein könnte. Die von ihnen verwendete IRS1-US12-Deletionsmutante zeigte nur bei der Infektion humaner Glioblastomzellen im Vergleich zu nicht infizierten Zellen eine MHC-I-Reduktion, nicht aber bei der Infektion von HFF (Jones *et al.*, 1995). Unabhängig davon wäre es vorstellbar, dass Trgovcich und Kollegen in ihrem Infektionsexperiment keinen pp71- sondern einen pp65-abhängigen Effekt beobachtet haben könnten. Sie analysierten infizierte Zellen, in denen die pp71-Expression durch *small interfering* RNAs (siRNAs) inhibiert worden war. Da pp65 und pp71 von einer polyzistronischen mRNA kodiert werden (Rüger *et al.*, 1987), inhibieren pp71-spezifische siRNAs auch immer die pp65-Expression. Gegen diese Erklärung spricht allerdings, dass der immunevasive Effekt auch nach Transfektion von Glioblastomzellen mit einem pp71-Expressionsplasmid beobachtet wurde.

Es sind aber noch weitere Erklärungen dafür möglich, dass in der vorliegenden Arbeit kein immunevasiver Effekt von pp71 in infizierten HFF zu späten Infektionszeitpunkten nachweisbar war. In dieser Arbeit wurde nur die Antigenpräsentation über das MHC-I-Allel HLA-A2 untersucht. Es ist denkbar, dass die HLA-A2-vermittelte Antigenpräsentation gegenüber einem immunevasiven Effekt von pp71 unempfindlich ist, während die Antigenpräsentation über andere MHC-I-Allele durch pp71 eingeschränkt wird. Eine solche selektive immunevasive Wirkung auf bestimmte MHC-I-Allele wurde auch für die gpUS2-11-Immunevasine beschrieben (siehe 1.4.1.1). Gegen diese Erklärung spricht, dass auch bei der durchflusszytometrischen Analyse der MHC-I-Oberflächenexpression, bei der die Moleküle verschiedener MHC-I-Allele erfasst wurden, kein pp71-vermittelter Effekt festzustellen war. Eine alternative Erklärung für einen fehlenden Effekt in den frühen und späten Infektionsphasen wäre, dass eine hypothetische, pp71-vermittelte Immunevasion in HFF in gpUS2-11-

abhängiger Weise erfolgt. Obwohl ein solcher Effekt von gpUS2-11 in Glioblastomzellen nicht gefunden wurde (Trgovcich *et al.*, 2006), kann er formal aufgrund der Verwendung von US2-11-negativen Mutanten in der vorliegenden Arbeit nicht ausgeschlossen werden. Schließlich wäre theoretisch möglich, dass die Steigerung der pp71-Expression in den infizierten Zellen nicht hinreichend war, um einen pp71-vermittelten Effekt mit den in dieser Arbeit eingesetzten Methoden detektieren zu können.

Im Gegensatz zum Zeitraum von 24 bis 96 Stunden nach Infektion konnte in der sehr frühen Infektionsphase ein Effekt von Partikel-assoziiertem pp71 auf die MHC-I-vermittelte Antigenpräsentation beobachtet werden (Abb. 21). Allerdings konnte, im Widerspruch zu der für pp71 vermuteten immunevasiven Funktion, in RV-AD169/EYFP-pp71- oder RV-JH9-infizierten Zellen keine Reduktion der Präsentation beobachtet werden. Vielmehr war eine Verstärkung der Antigenpräsentation feststellbar. Besonders deutlich war die Steigerung beim gpUS2-11-negativen Viruspaar RV-JH7 und RV-JH9 zu erkennen. Das Ausmaß der Steigerung wurde durch das Fehlen von gpUS2-11 aber nicht beeinflusst. Dies ergab sich aus dem Vergleich mit dem gpUS2-11-positiven Viruspaar RV-HB15 und RV-AD169/EYFP-pp71. Bei beiden Viruspaaren war die Antigenpräsentation durch die erhöhte pp71-Expression etwa dreifach verstärkt. Daher kann ein inhibierender Effekt von pp71 auf die immunevasive Funktion der gpUS2-11-Proteine als Ursache für die Steigerung der Antigenpräsentation ausgeschlossen werden.

Für die Untersuchung der sehr frühen Antigenpräsentation wurden IE1-spezifische CTLs eingesetzt. IE1 wird in der sehr frühen Phase der Infektion abundant exprimiert. Da pp71 ein Transaktivator für IE-Gene ist (siehe 1.4.2), liegt die Vermutung nahe, dass sich in der gesteigerten Präsentation von IE1 sehr früh nach Infektion die Erhöhung der IE1-Expression durch Partikel-assoziiertes pp71 widerspiegelt. Dieser präsentationsfördernde Effekt von pp71 würde es für das HCMV-Virus notwendig machen, die pp71-Expression auszubalancieren. Direkt nach Infektion muss gewährleistet sein, dass genügend pp71 zur Verfügung steht, um die virale Replikation zu initiieren. Gleichzeitig darf aber die IE1-Expression nicht so stark gefördert werden, dass infizierte Zellen in der sehr frühen Infektionsphase von IE1-spezifischen CTLs erkannt und eliminiert werden.

Ältere Daten wiesen darauf hin, dass pp71 und pp65 von einer bizistronischen mRNA translatiert werden (DalMonte *et al.*, 1996; Rüter *et al.*, 1987). Diese Annahme konnte

durch die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse untermauert werden. So war in der Northern Blot-Analyse nur die bizistronische mRNA detektierbar (Abb. 11). Sie lag in RV-Hd65-infizierten Zellen analog zur erhöhten pp71-Expression in gesteigerter Menge vor, was darauf hinweist, dass das pp71-Protein in den infizierten Zellen von dieser mRNA translatiert wurde. Zum anderen konnte in einer Western Blot-Analyse HCMV-infizierter Zellen eine besondere Regulation der Expression von pp71 nach Zellstress durch Serumentzug beobachtet werden (Abb. 22). Nach 96 Stunden Infektion war die pp71-Expression in gestressten Zellen gesteigert, während die Expression der anderen untersuchten viralen Proteine, pp65 und pUL44, reduziert war. Bei Zellstress treten *Cap*-unabhängige Translationsmechanismen in den Vordergrund, die bei polyzistronischen mRNAs für die Expression der 3'-angeordneten Leserahmen benötigt werden (siehe 1.4.2) Daher weist die durch Stress induzierbare Expression von pp71 ebenfalls auf eine Translation von der bizistronischen mRNA hin. Eine solche Stress-induzierbare Expression wurde auch schon für ein anderes HCMV-Protein, pUL138, gezeigt. Das Protein wird von einer polyzistronischen mRNA translatiert (Grainger et al., 2010).

Während einer natürlichen HCMV-Infektion kann es aus mindestens zwei Gründen in den infizierten Zellen zu einer Blockade der *Cap*-abhängigen Proteinsynthese kommen. Die Blockade kann durch die Aktivierung der antiviralen IFN-Antwort im Rahmen der angeborenen Immunreaktion (siehe 1.3.1) oder durch die Induktion von Zellstress im Falle einer lytischen Infektion (siehe 1.4.2) ausgelöst werden. Sowohl IFN-induzierte Signalwege als auch die verschiedenen Stress-Signalwege vermitteln die Phosphorylierung einer Untereinheit des Translationsfaktors eIF-2, wodurch die *Cap*-abhängige Translation inhibiert wird. Viren sind während ihrer Replikation auf den zellulären Proteinsynthese-Apparat angewiesen. Daher wäre es für die Viren in Hinblick auf ihre Vermehrung von Vorteil, wenn replikationsfördernde Proteine in den Zellen mit eingeschränkter *Cap*-abhängiger Translation in erhöhter Menge vorhanden wären. Für HCMV stellt pp71 ein solches Protein dar. Die in der vorliegenden Arbeit demonstrierte Stress-Induzierbarkeit der pp71-Expression könnte ein Mechanismus von HCMV sein, um der Behinderung der viralen Replikation durch die Hemmung der *Cap*-abhängigen Proteinsynthese entgegenzuwirken. Dabei ist folgendes Modell vorstellbar (Abb. 34): Durch die Infektion von Zellen eines Gewebes mit HCMV wird die IFN-Antwort ausgelöst und gegebenenfalls auch Zellstress induziert. Dadurch werden sowohl in den infizierten Zellen als auch in den uninfizierten Zellen der Umgebung Signalwege induziert, die zur Einschränkung der *Cap*-abhängigen Proteinsynthese

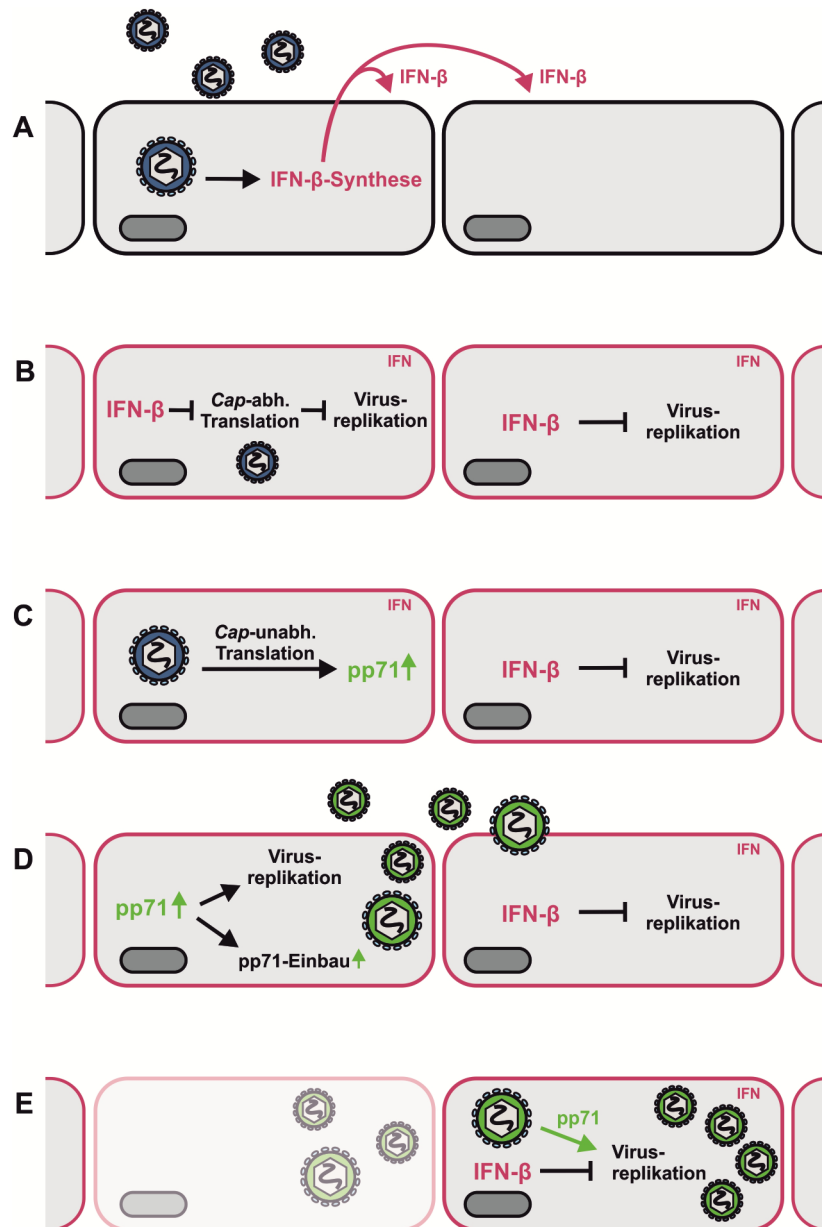


Abb. 34: Modell zur pp71-vermittelten Evasion der IFN-Antwort

A: In Zellen wird durch die Infektion mit HCMV die Synthese von IFN- induziert. Sezerniertes IFN- aktiviert sowohl in den infizierten Zellen als auch in den Zellen der Umgebung das IFN-Signalling.

B: Die Aktivierung des IFN-Signalling hat unter anderem die Expression von Proteinen zur Folge, die die Cap-abhängige Translation hemmen. Dadurch wird in den Zellen die Synthese von viralen Proteinen und somit die Virusreplikation eingeschränkt.

C: Durch die Hemmung der Cap-abhängigen Translation tritt in den Zellen die Cap-unabhängige Translation in den Vordergrund. In den infizierten Zellen führt dies zu einer verstärkten Expression des bizistronisch kodierten HCMV-Proteins pp71.

D: In den infizierten Zellen wird durch die Steigerung der pp71-Expression die Virusreplikation gefördert. Gleichzeitig wird aufgrund der erhöhten pp71-Proteinmenge in den Zellen mehr pp71 in das Tegument der neu gebildeten Virionen verpackt.

E: Mit den neu gebildeten Virionen werden Zellen in der Umgebung infiziert. Aufgrund der erhöhten eingebrachten Menge an pp71 findet trotz der IFN-vermittelten Einschränkungen eine effiziente Virusreplikation statt.

führen. In den infizierten Zellen bewirkt dies eine verstärkte Expression von pp71. Diese verstärkte pp71-Expression ist mit einer erhöhten Verpackung von pp71 ins Tegument der neu produzierten Virionen verbunden, wie es in Experimenten mit pp71-überexprimierenden HCMV-Mutanten zu beobachten ist (s.o.). Der erhöhte pp71-Gehalt der Virionen kann nun bei der Infektion der Zellen der Umgebung, in denen ja ebenfalls die *Cap*-abgängige Proteinsynthese gehemmt ist, dazu beitragen, dass trotz der ungünstigen Bedingungen der HCMV-Replikationszyklus effizient ablaufen kann. Mit einer solchen IFN- bzw. Stress-abhängigen Regulation von pp71 könnte HCMV also in der Lage sein, den pp71-Gehalt der Virionen an die Stärke der IFN-Antwort bzw. Stress-Induktion innerhalb eines Gewebes anzupassen, um diesen so angemessen entgegenwirken zu können. Es bleibt zukünftigen Studien vorbehalten, die Induzierbarkeit der pp71-Expression durch IFN in HCMV-infizierten Zellen zu testen und die Bedeutung der besonderen Regulation der pp71-Expression für eine natürliche HCMV-Infektion zu ergründen.

4.2 Immunevasive Funktionen von gpUS3 in infizierten HFF

Um den immunevasiven Effekt des IE-Proteins gpUS3 in infizierten HFF zu untersuchen, wurde die HCMV-Mutante RV-KB7 verwendet, die von den vier bekannten Immunevasinen der US2-11-Region nur gpUS3 exprimiert (Abb. 23). Zunächst wurde die Immunevasion in RV-KB7-infizierten Zellen sehr früh nach Infektion anhand der Oberflächenexpression von MHC-I-Molekülen im Durchflusszytometer analysiert (Abb. 24). Nach einer bis sechs Stunden Infektion konnte kein Effekt von gpUS3 festgestellt werden. Allerdings war auch in Zellen, die mit dem WT-Stamm RV-BADwt infiziert worden waren, keine Reduktion der MHC-I-Oberflächenexpression detektierbar. Möglicherweise reichte die Zeitspanne von wenigen Stunden nicht aus, damit sich eine Behinderung des MHC-I-Präsentationswegs durch die HCMV-Immunevasine im ER in einer detektierbaren Reduktion der MHC-I-Expression auf der Zelloberfläche manifestieren konnte. Um dieser zeitlichen Problematik zu entgehen, wurde mittels ELISpot-Analyse die MHC-I-Antigenpräsentation von RV-KB7-infizierten Zellen nach einer CH/ActD-Behandlung untersucht (Abb. 26). Hier zeigten sich einige überraschende Ergebnisse, die der Rolle von gpUS3 als Immunevasin in infizierten HFF widersprechen. RV-KB7-infizierte Zellen zeigten eine deutliche Antigenpräsentation (Abb. 26A). Im Vergleich dazu war die Antigenpräsentation von RV-BADwt-infizierten Zellen oder von Zellen, die mit der

gpUS2-, gpUS3-, gpUS6- und gpUS11-negativen Mutante RV-KB6 infiziert worden waren, deutlich reduziert.

Die Reduktion der Antigenpräsentation der RV-KB6-infizierten Zellen auf WT-Niveau weist darauf hin, dass neben den bekannten Immunevasinen ein weiterer immunevasiver Faktor zur Reduktion der Antigenpräsentation zu sehr frühen Zeitpunkten nach Infektion beiträgt (Abb. 35). Als Kandidaten für einen solchen Faktor boten sich Proteine bzw. microRNAs aus der US2-11-Region an, da einigen von ihnen bereits immunevasive Funktionen zugeschrieben wurden. Dies konnte durch den Einsatz der Virusmutante RV-JH10 bestätigt werden, in der die komplette US2-11-Genregion deletiert ist. In RV-JH10-infizierten Zellen war unter den in dieser Arbeit verwendeten Versuchsbedingungen keine Reduktion der Antigenpräsentation festzustellen (Abb. 26B). Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen aus der Untersuchung des Einflusses von Partikel-assoziiertem pp71 auf die sehr frühe MHC-I-vermittelte Antigenpräsentation: Hier war im Vergleich zwischen der US2-11-Deletionsmutante RV-JH7 und dem WT-Stamm RV-HB15 ein ähnlicher Unterschied in der Antigenpräsentation zu beobachten (Abb. 21). Die zur US6-Familie gehörenden Proteine gpUS8 und gpUS10 stechen als Kandidaten für den unbekanntes immunevasiven Faktor besonders hervor, da bereits gezeigt werden konnte, dass sie mit den schweren Ketten von MHC-I interagieren (Furman *et al.*, 2002; Tirabassi and Ploegh, 2002). Eine Reduktion der MHC-I-vermittelten Antigenpräsentation konnte ihnen aber bisher noch nicht nachgewiesen werden. Gegen eine Rolle von gpUS8 oder gpUS10 in der Immunevasion sehr früh nach Infektion spricht allerdings, dass sie laut ihrer veröffentlichten Expressionskinetiken in dieser Infektionsphase noch nicht exprimiert werden (Jones and Muzithras, 1991). Als Wirkungsmechanismus für den unbekanntes immunevasiven Faktor ist eine Retention von MHC-I-Molekülen im ER wahrscheinlich, da Ahn und Kollegen bereits in HCMV-infizierten, CH/ActD-behandelten HFF eine solche Retention beobachten konnten (Ahn *et al.*, 1996). Ahn und Kollegen schrieben diese Inhibition der MHC-I-Prozessierung allerdings gpUS3 zu, da der Zeitraum der Retention mit der Expression von gpUS3 zusammentraf und eine Retention der MHC-I-Moleküle auch nach Transfektion von US3 in HeLa-Zellen feststellbar war. Es bleibt zukünftigen Untersuchungen vorbehalten, den für die sehr frühe Immunevasion verantwortlichen Faktor zu identifizieren und dessen Wirkungsmechanismus zu bestimmen.

Die im Vergleich zu RV-KB6 (US2/3/6/11-) -infizierten Zellen deutlich höhere Antigenpräsentation der RV-KB7 (US3+) -infizierten Zellen deutet auf einen anti-

immunevasiven Effekt von gpUS3 sehr früh nach Infektion hin. Der einzige Unterschied zwischen beiden Viren ist die Expression von gpUS3 in RV-KB7-infizierten Zellen. GpUS3 scheint den immunevasiven Effekt des unbekanntes immunevasiven Faktors zu inhibieren (Abb. 35). Unterstützt wird diese Annahme durch die Beobachtung, dass das Niveau der Antigenpräsentation RV-KB7-infizierter Zellen dem RV-JH10 (US2-11)-infizierter Zellen entsprach, in denen die Expression des unbekanntes Immunevasiven Faktors fehlte (Abb. 26B). Zusätzlich konnte die Reduktion der Antigenpräsentation von RV-KB6-infizierten Zellen durch die Koexpression von gpUS3 aufgehoben werden, wie es in RV-KB7/RV-KB6-koinfizierten Zellen zu erkennen war (Abb. 26B). Ob die hier sichtbare anti-immunevasive Wirkung von gpUS3 ein beabsichtigter Effekt ist oder nur ein Nebeneffekt einer anderen, bisher unbekanntes Funktion von gpUS3, bleibt zu untersuchen. Auch der zugrunde liegende molekulare Mechanismus muss noch aufgeklärt werden. Generell widerspricht die anti-immunevasive Wirkung von gpUS3 den bisherigen Veröffentlichungen, in denen dem Protein die Rolle eines Immunevasins zugewiesen wurde (siehe 1.4.1.1). Eine mögliche Erklärung für diesen Widerspruch liegt in den unterschiedlichen Methoden, die zur Untersuchung des Effekts von gpUS3 auf die MHC-I-vermittelte Antigenpräsentation verwendet wurden. Die Rolle von gpUS3 als Immunevasin wurde hauptsächlich durch Transfektion von US3 in geeignete Zellen untersucht. Die Situation in diesen Zellen spiegelt aber aufgrund der unregulierten gpUS3-Expression und dem Fehlen von anderen, möglicherweise mit gpUS3 interagierenden viralen Proteinen die Situation in infizierten Zellen nur eingeschränkt wider. Daher ist es wahrscheinlich, dass nicht alle so gewonnenen Erkenntnisse auch auf die tatsächlichen Abläufe in infizierten Zellen in den verschiedenen Phasen der Infektion zutreffen.

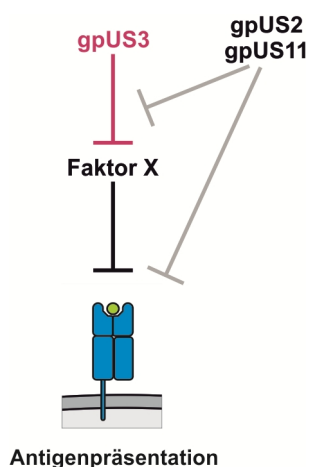


Abb. 35: Modell zum Einfluss von gpUS3 auf die MHC-I-vermittelte Antigenpräsentation zu sehr frühen Zeitpunkten nach Infektion

GpUS3 wirkt in der sehr frühen Infektionsphase anti-immunevasiv, indem es die Reduktion der Antigenpräsentation durch einen noch zu identifizierenden Faktor aufhebt. Zusätzlich spielen die bekannten Immunevasine gpUS2 und gpUS11 sehr früh nach Infektion eine Rolle. Sie wirken der anti-immunevasiven Wirkung von gpUS3 entgegen. Dies könnte über eine direkte Inhibition der gpUS3-Funktion oder über eine eigenständige Reduktion der Antigenpräsentation geschehen.

Die trotz der gpUS3-Expression reduzierte Antigenpräsentation der RV-BADwt-infizierten Zellen weist darauf hin, dass Produkte der in diesen Zellen zusätzlich zu US3 vorhandenen Immunevasions-Gene US2, US6 und US11 dem anti-immunevasiven Effekt von gpUS3 in der sehr frühen Infektionsphase entgegenwirken. Die Expression von US2 und US11 in dieser Infektionsphase konnte durch eine Northern Blot-Analyse infizierter, CH-behandelter Zellen bestätigt werden (Abb. 28). In Koinfektions-Experimenten von RV-KB7 (US3+) mit den Virusmutanten RV-KB13 oder RV-KB9, die jeweils gpUS2 bzw. gpUS11 als einziges der vier bekannten Immunevasine exprimieren, war eine Reduktion der Antigenpräsentation trotz der Expression von gpUS3 festzustellen (Abb. 29). Dies deutet darauf hin, dass sowohl gpUS2 als auch gpUS11 sehr früh nach Infektion dem anti-immunevasiven gpUS3-Effekt entgegenwirken können. Auf welche Weise gpUS2 und gpUS11 dies bewerkstelligen, bleibt zu erforschen. Zum einen erscheint es möglich, dass gpUS2 und gpUS11 den gpUS3-Effekt direkt hemmen. Dies würde in den infizierten Zellen die Reduktion der Antigenpräsentation durch den unbekanntes immunevasiven Faktor erlauben. Zum anderen könnten gpUS2 und gpUS11 auch selbst die Antigenpräsentation in der sehr frühen Infektionsphase einschränken (siehe Abb. 35). Bei den Experimenten fiel zusätzlich auf, dass die Antigenpräsentation von RV-KB9 (US11+) -infizierten Zellen nicht so stark reduziert war wie die von RV-KB13 (US2+) -infizierten Zellen (Abb. 29). In der Northern Blot-Analyse war nur eine geringe Menge an gpUS11-mRNA sehr früh nach Infektion detektierbar (Abb. 28). Die höhere Antigenpräsentation RV-KB9-infizierter Zellen beruht daher vermutlich darauf, dass gpUS11 zu sehr frühen Infektionszeitpunkten schwächer exprimiert wird als gpUS2.

Zu späteren Zeitpunkten, 24 bis 96 Stunden nach Infektion, konnte eine deutliche Reduktion der MHC-I-Oberflächenexpression in RV-BADwt-infizierten Zellen im Vergleich zu RV-KB6 (US2/3/6/11-) -infizierten Zellen beobachtet werden (Abb. 25), wie sie aufgrund der Expression der bekannten Immunevasine zu erwarten war. Die gpUS3-Expression in RV-KB7-infizierten Zellen hatte hier, im Gegensatz zur sehr frühen Phase der Infektion, ebenfalls eine Verminderung der MHC-I-Oberflächenexpression zur Folge. Diese war im Einklang mit Beobachtungen aus Experimenten mit US3-transfizierten Zellen aber nur schwach ausgeprägt: Im ER US3-transfizierter Zellen war zwar eine deutliche Retention von MHC-I-Molekülen feststellbar, auf der Oberfläche der Zellen konnte aber nur eine leichte Reduktion der MHC-I-Expression beobachtet werden (Jones *et al.*, 1996; Noriega and Tortorella, 2009; Park *et al.*, 2004). Ein schwacher immunevasiver Effekt von gpUS3 zu späteren

Zeitpunkten nach Infektion war ebenfalls in der funktionellen Untersuchung der MHC-I-Antigenpräsentation im ELISpot festzustellen (Abb. 27).

Auch in Kooperation mit den drei anderen bekannten Immunevasinen gpUS2, gpUS6 und gpUS11 konnten für gpUS3 immunevasive Effekte zu späteren Zeitpunkten nach Infektion beobachtet werden. Nach Koinfektion von RV-KB7 (US3+) mit den Virusmutanten, die jeweils eines der anderen Immunevasine exprimieren, war für jede der getesteten Kombinationen im Vergleich zu den Einzelinfektionen eine verstärkte Reduktion der Oberflächenexpression von MHC-I-Molekülen 24 bis 96 Stunden nach Infektion feststellbar (Abb. 30 und Abb. 32). Dabei ging das Ausmaß der kooperativen Reduktion über eine einfache Addition der Einzeleffekte hinaus. Für gpUS3 und gpUS2 war bereits aus Experimenten mit transfizierten Zellen ein kooperativer Effekt bekannt (Noriega and Tortorella, 2009), während die Kombinationen von gpUS3 mit gpUS6 oder gpUS11 bisher noch nicht untersucht worden waren. In Zellen, die mit der gpUS2-exprimierenden Mutante RV-KB13 oder der gpUS11-exprimierenden Mutante RV-KB9 alleine infiziert worden waren, konnte 24 bis 96 Stunden nach Infektion eine leichte Reduktion der Antigenpräsentation festgestellt werden (Abb. 30). Dies stimmt mit bereits veröffentlichten Ergebnissen zu diesen Mutanten überein (Besold *et al.*, 2009). Auch in Zellen, die alleine mit der gpUS6-exprimierenden Mutante RV-KB5 infiziert worden waren, konnte zu diesen späteren Zeitpunkten nach Infektion eine Reduktion der MHC-I-Oberflächenexpression beobachtet werden (Abb. 32). Dies steht in Einklang mit der Reduktion der MHC-I-Expression auf der Oberfläche von HeLa-Zellen, in die US6 transfiziert worden war (Hengel *et al.*, 1997). In einer funktionellen Analyse der MHC-I-Antigenpräsentation mittels ELISpot konnte allerdings nur die Kooperation von gpUS3 mit gpUS2 in RV-KB7/RV-KB13-koinfizierten Zellen 24 bis 96 Stunden nach Infektion bestätigt werden (Abb. 31). Sowohl in RV-KB7/RV-KB9 (US3+/US11+) - als auch in RV-KB7/RV-KB5 (US3+/US6+) -koinfizierten Zellen war keine Reduktion der Erkennung im Vergleich zu Zellen zu beobachten, die nur mit RV-KB9 (US11+) bzw. RV-KB5 (US6+) infiziert worden waren (Abb. 31 und Abb. 33). Allgemein war 24 bis 96 Stunden nach Infektion der Einfluss der drei Immunevasine gpUS2, gpUS6 und gpUS11 auf die Erkennung infizierter Zellen durch CTLs, insbesondere durch IE1-spezifische CTLs, deutlich stärker ausgeprägt als der von gpUS3. In RV-KB13- und RV-KB9-infizierten Zellen war durch gpUS2 bzw. gpUS11 alleine jeweils eine deutliche Reduktion der IE1-Antigenpräsentation festzustellen, während die pp65-Antigenpräsentation kaum beeinflusst war (Abb. 31). Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Besold und Kollegen zu diesen Virusmutanten (Besold *et al.*, 2009).

In RV-KB5-infizierten Zellen konnte für gpUS6 ein deutlicher reduzierender Effekt sowohl auf die IE1-Antigenpräsentation als auch auf die pp65-Antigenpräsentation beobachtet werden (Abb. 33).

Im Vergleich der Ergebnisse zur MHC-I-vermittelten Antigenpräsentation zwischen der Analyse der Expression von MHC-I-Molekülen auf den infizierten HFF und der Analyse der Erkennung der infizierten HFF durch CTLs im ELISpot waren immer wieder Unterschiede festzustellen. Selbst innerhalb der ELISpot-Analyse waren zwischen der Erkennung der pp65-Antigenpräsentation und der Erkennung der IE1-Antigenpräsentation Unterschiede bemerkbar. Zum einen variierte das Ausmaß der beobachteten immunevasiven Effekte. So erreichte zum Beispiel der kooperative Effekt von gpUS3 und gpUS2 zwar bezüglich der Reduktion der MHC-I-Oberflächenexpression (Abb. 30A) und der IE1-Antigenpräsentation (Abb. 31B) WT-Niveau, nicht aber bei der pp65-Antigenpräsentation (Abb. 31A). Zum anderen waren manche Effekte nicht in allen Experimenten detektierbar. Kooperative Effekte von gpUS3 mit gpUS11 oder gpUS6 24 bis 96 Stunden nach Infektion waren zum Beispiel nur bei der Untersuchung der MHC-I-Oberflächenexpression zu sehen (Abb. 30 und Abb. 32), nicht aber in der ELISpot-Analyse (Abb. 31 und Abb. 33). Des Weiteren war 24 bis 48 Stunden nach Infektion sowohl bei der MHC-I-Oberflächenexpression (Abb. 25) als auch bei der IE1-Antigenpräsentation (Abb. 27B) ein leichter reduzierender Effekt von gpUS3 festzustellen, nicht aber bei der pp65-Antigenpräsentation (Abb. 27A). Diese scheinbaren Widersprüche in den Beobachtungen bezüglich der MHC-I-vermittelten Antigenpräsentation infizierter Zellen sind wohl auf die Unterschiede zwischen den in dieser Arbeit verwendeten Analysemethoden zurückzuführen. Während in den durchflusszytometrischen Experimenten entweder die Gesamtanzahl aller MHC-I-Moleküle oder auch nur die Anzahl aller Moleküle des MHC-I-Allels HLA-A2 auf den infizierten Zellen betrachtet wurden, war in den ELISpot-Experimenten nur der Anteil an HLA-A2-Molekülen ausschlaggebend, der entweder das NLV-Peptid von pp65 oder das TMY-Peptid von IE1 trug. Diese Unterschiede machen sich nicht nur in der Sensitivität der Methoden für eine Änderung in der MHC-I-vermittelten Antigenpräsentation bemerkbar. Die Funktionen der Immunevasine sind sowohl vom präsentierenden MHC-I-Allel als auch vom präsentierten viralen Peptid abhängig (siehe 1.4.1.1). Daher können die oben erwähnten Unterschiede auch maßgeblich sein, ob und in welchem Ausmaß die Effekte der verschiedenen Immunevasine mit der jeweiligen Analysemethode detektiert werden.

Zusammengefasst zeigte gpUS3, alleine oder in Kooperation mit den anderen Immunevasinen, 24 bis 96 Stunden nach Infektion im Vergleich zu sehr frühen Infektionszeitpunkten (siehe Abb. 35) einen entgegengesetzten Einfluss auf die MHC-I-vermittelte Antigenpräsentation (Abb. 36). Bemerkenswert war dabei vor dem Hintergrund der kurzen Halbwertszeit von gpUS3 von 60 Minuten (Ahn *et al.*, 1996; Jones *et al.*, 1996) die deutliche Verzögerung zwischen der gpUS3-Expression sehr früh nach Infektion und der Detektion der immunevasiven Effekte zu späteren Zeitpunkten.

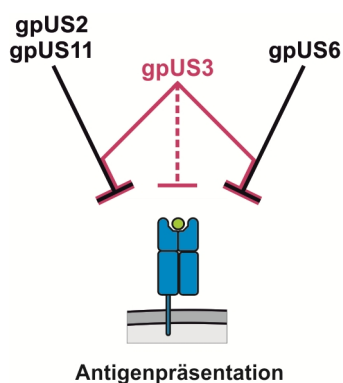


Abb. 36: Modell zum Einfluss von gpUS3 auf die MHC-I-vermittelte Antigenpräsentation zu späten Zeitpunkten nach Infektion

GpUS3 wirkt in der späten Infektionsphase immunevasiv. Es steigert die Reduktion der Antigenpräsentation durch die anderen bekannten Immunevasine gpUS2, gpUS6 und gpUS11. Alleine beeinträchtigt gpUS3 die Antigenpräsentation nur schwach.

Es ist vorstellbar, dass die in der sehr frühen Infektionsphase produzierte Menge an gpUS3 ausreicht, damit trotz seiner geringen Halbwertszeit auch noch später in den infizierten Zellen genügend gpUS3 vorliegt, um einen Effekt auszuüben. Allerdings ist mittels Western Blot-Analyse in infizierten HFF ab sechs Stunden nach Infektion kein gpUS3 mehr nachweisbar (Ahn *et al.*, 1996). Es besteht auch die Möglichkeit, dass die Verminderung der MHC-I-vermittelten Antigenpräsentation RV-KB7 (US3+)-infizierter Zellen durch einen indirekten Effekt von gpUS3 hervorgerufen wurde. GpUS3 könnte zum Beispiel ein anderes Protein aktivieren, dessen immunevasive Aktivität auch noch nach Ende der US3-Expression anhält. Als Kandidat dafür kommt hier ebenfalls ein noch nicht identifiziertes immunevasives Protein aus dem US2-11-Genbereich in Frage. In RV-KB6 (US2/3/6/11-) -infizierten Zellen ist 24 bis 96 Stunden nach Infektion im Vergleich zu RV-JH10 (US2-11) -infizierten Zellen die MHC-I-Oberflächenexpression leicht vermindert (Daten nicht gezeigt). Dies weist auf eine immunevasive Wirkung der zwischen den bekannten Immunevasinen kodierten Proteine bzw. microRNAs der US2-11-Region auch zu diesen Infektionszeitpunkten hin. Daher ist es denkbar, dass in RV-KB7-infizierten Zellen 24 bis 48 Stunden nach Infektion tatsächlich eine Steigerung der immunevasiven Wirkung eines dieser Faktoren durch gpUS3 zu beobachten war. Diese Steigerung stände im Einklang mit der in dieser Arbeit noch bis 96 Stunden nach Infektion beobachteten kooperativen

Wirkung von gpUS3 mit den bekannten Immunevasinen. Dass diese kooperative Wirkung von gpUS3 mit gpUS2, gpUS6 und gpUS11 ebenfalls auf einem indirekten Effekt über einen unbekanntem Faktor beruht, erscheint unwahrscheinlich, da eine kooperative Wirkung von gpUS3 mit gpUS2 auch in transfizierten Zellen ohne weitere virale Proteine oder microRNAs gezeigt werden konnte (Noriega and Tortorella, 2009). Für zukünftige Untersuchungen zur Aufklärung der Wirkungsmechanismen von gpUS3 im Verlauf einer HCMV-Infektion wäre die Herstellung von HCMV-Mutanten sinnvoll, die jeweils nur die Expression eines der Proteine bzw. microRNAs aus der US2-11-Region zulassen. Mittels Koinfektions-Experimenten in HFF könnten mit diesen Mutanten die Wechselwirkungen von gpUS3 sowohl mit den bekannten Immunevasinen als auch mit den übrigen US2-11-Proteinen oder microRNAs in den verschiedenen Infektionsphasen näher beleuchtet werden. Außerdem könnte durch die Infektion von HFF mit den einzelnen Mutanten die Identifikation der Faktoren, die zur sehr frühen Immunevasion beitragen, vorangetrieben werden.

Für die Aufgabe von gpUS3 im Verlauf einer HCMV-Infektion deuten die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Resultate eher auf eine regulatorische Rolle als auf eine eigenständige immunevasive Funktion hin. Während gpUS3 sehr früh nach Infektion die Immunevasion in infizierten HFF behinderte (siehe Abb. 35), leistete es zu späteren Infektionszeitpunkten, wenn auch nur in Kooperation mit den anderen bekannten Immunevasinen, einen deutlichen Beitrag zur HCMV-Immunevasion in infizierten HFF (siehe Abb. 36). GpUS3 schien hier die immunevasiven Effekte von gpUS2, gpUS6 und gpUS11 zu verstärken. Noriega und Tortorella konnten in Transfektionsexperimenten bereits beobachten, dass gpUS3 die gpUS2-vermittelte Degradation von MHC-I-Molekülen steigerte, indem es MHC-I-Moleküle im ER ansammelte und gleichzeitig die Bindung von gpUS2 an MHC-I-HCs intensivierte (Noriega and Tortorella, 2009). Ob sich dadurch tatsächlich unsere Beobachtungen einer Kooperation von gpUS3 und gpUS2 in infizierten HFF erklären lassen und ob ein ähnlicher Mechanismus auch bei der Kooperation von gpUS3 mit gpUS6 oder gpUS11 abläuft, bleibt zu testen.

Die Wirkung der MHC-I-Immunevasion von HCMV hängt entscheidend davon ab, ob die Antigenpräsentation in verschiedenen Wirtszell-Typen unterdrückt und ob die Vielzahl verschiedener MHC-I-Allele erfolgreich angegriffen werden kann. Die in der vorliegenden Arbeit beobachteten kooperativen Effekte einiger Immunevasine deuten auf die Fähigkeit von HCMV hin, die unterschiedlichen Wirkungsmechanismen und Spezifitäten der verschiedenen Immunevasine zu kombinieren. Dies könnte bei der

Anpassung der HCMV-Immunevasion an die unterschiedlichen Verhältnisse im Rahmen einer Infektion eine wichtige Rolle spielen und wesentlich zur Effizienz der Immunevasion beitragen. Aufgrund der augenscheinlichen Komplexität sowohl der MHC-I-Antigenpräsentation als auch der HCMV-Immunevasion bleibt es, bis zum vollständigen Verständnis der während einer Infektion ablaufenden Mechanismen, noch ein weiter Weg.

5 Literaturverzeichnis

- Abate, D. A., Watanabe, S., and Mocarski, E. S. (2004).** Major human cytomegalovirus structural protein pp65 (ppUL83) prevents interferon response factor 3 activation in the interferon response. *J Virol* **78**, 10995-11006.
- Ahn, K., Angulo, A., Ghazal, P., Peterson, P. A., Yang, Y., and Fruh, K. (1996).** Human cytomegalovirus inhibits antigen presentation by a sequential multistep process. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 10990-10995.
- Ahn, K., Gruhler, A., Galocha, B., Jones, T. R., Wiertz, E. J., Ploegh, H. L., Peterson, P. A., Yang, Y., and Fruh, K. (1997).** The ER-luminal domain of the HCMV glycoprotein US6 inhibits peptide translocation by TAP. *Immunity* **6**, 613-621.
- Anders, D. G., Kerry, J. A., and Pari, G. S. (2007).** DNA synthesis and late viral gene expression. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, chapter 19. Edited by Arvin, A., Campadelli-Fiume, G., and Mocarski, E. S.; Cambridge: Cambridge University Press.
- 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.
- Arnon, T. I., Achdout, H., Levi, O., Markel, G., Saleh, N., Katz, G., Gazit, R., Gonen-Gross, T., Hanna, J., Nahari, E., Porgador, A., Honigman, A., Plachter, B., Mevorach, D., Wolf, D. G., and Mandelboim, O. (2005).** Inhibition of the NKp30 activating receptor by pp65 of human cytomegalovirus. *Nat Immunol* **6**, 515-523.
- Baldick, C. J., Jr., Marchini, A., Patterson, C. E., and Shenk, T. (1997).** Human cytomegalovirus tegument protein pp71 (ppUL82) enhances the infectivity of viral DNA and accelerates the infectious cycle. *J Virol* **71**, 4400-4408.
- Barel, M. T., Pizzato, N., van, L. D., Bouteiller, P. L., Wiertz, E. J., and Lenfant, F. (2003).** Amino acid composition of alpha1/alpha2 domains and cytoplasmic tail of MHC class I molecules determine their susceptibility to human cytomegalovirus US11-mediated down-regulation. *Eur J Immunol* **33**, 1707-1716.
- Becke, S., Fabre-Mersseman, V., Aue, S., Auerochs, S., Sedmak, T., Wolfrum, U., Strand, D., Marschall, M., Plachter, B., and Reyda, S. (2010).** 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.

- Benz, C., Reusch, U., Muranyi, W., Brune, W., Atalay, R., and Hengel, H. (2001).** Efficient downregulation of major histocompatibility complex class I molecules in human epithelial cells infected with cytomegalovirus. *J Gen Virol* **82**, 2061-2070.
- Besold, K. (2006).** Einfluss immunevasiver Strategien des Humanen Cytomegalovirus auf die MHC-Klasse-I-Präsentation der viralen Antigene pp65 und IE1. *Dissertation am Institut für Virologie, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz*
- 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.
- Besold, K., Wills, M., and Plachter, B. (2009).** Immune evasion proteins gpUS2 and gpUS11 of human cytomegalovirus incompletely protect infected cells from CD8 T cell recognition. *Virology* **391**, 5-19.
- Biegelke, B. J. (1995).** Regulation of human cytomegalovirus US3 gene transcription by a cis-repressive sequence. *J Virol* **69**, 5362-5367.
- Boppana, S. B. and Fowler, K. B. (2007).** Persistence in the population: epidemiology and transmission. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, chapter 44. Edited by Arvin, A., Campadelli-Fiume, G., and Mocarski, E. S.; Cambridge: Cambridge University Press.
- 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.
- Bresnahan, W. A. and Shenk, T. E. (2000).** UL82 virion protein activates expression of immediate early viral genes in human cytomegalovirus-infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 14506-14511.
- Britt, W. J. (2007a).** Maturation and egress. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, chapter 20. Edited by Arvin, A., Campadelli-Fiume, G., and Mocarski, E. S.; Cambridge: Cambridge University Press.
- Britt, W. J. (2007b).** Virus entry into host, establishment of infection, spread in host, mechanisms of tissue damage. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, chapter 41. Edited by Arvin, A., Campadelli-Fiume, G., and Mocarski, E. S.; Cambridge: Cambridge University Press.
- Browne, E. P. and Shenk, T. (2003).** Human cytomegalovirus UL83-coded pp65 virion protein inhibits antiviral gene expression in infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 11439-11444.
- Browne, E. P., Wing, B., Coleman, D., and Shenk, T. (2001).** Altered cellular mRNA levels in human cytomegalovirus-infected fibroblasts: viral block to the accumulation of antiviral mRNAs. *J Virol* **75**, 12319-12330.

- Buchkovich, N. J., Yu, Y., Zampieri, C. A., and Alwine, J. C. (2008).** The TORrid affairs of viruses: effects of mammalian DNA viruses on the PI3K-Akt-mTOR signalling pathway. *Nat Rev Microbiol* **6**, 266-275.
- 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.
- Cherepanov, P. P. and Wackernagel, W. (1995).** Gene disruption in Escherichia coli: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* **158**, 9-14.
- Child, S. J., Hakki, M., De Niro, K. L., and Geballe, A. P. (2004).** Evasion of cellular antiviral responses by human cytomegalovirus TRS1 and IRS1. *J Virol* **78**, 197-205.
- Colberg-Poley, A. M., Santomenna, L. D., Harlow, P. P., Benfield, P. A., and Tenney, D. J. (1992).** Human cytomegalovirus US3 and UL36-38 immediate-early proteins regulate gene expression. *J Virol* **66**, 95-105.
- 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.
- Compton, T., Nowlin, D. M., and Cooper, N. R. (1993).** Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology* **193**, 834-841.
- Crough, T. and Khanna, R. (2009).** Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin Microbiol Rev* **22**, 76-98, Table.
- DalMonte, P., Bessia, C., Ripalti, A., Landini, M. P., Topilko, A., Plachter, B., Virelizier, J. L., and Michelson, S. (1996).** Stably expressed antisense RNA to cytomegalovirus UL83 inhibits viral replication. *Journal of Virology* **70**, 2086-2094.
- Davison, A. J. (2007).** Comparative analysis of the genomes. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, chapter 2. Edited by Arvin, A., Campadelli-Fiume, G., and Mocarski, E. S.; Cambridge: Cambridge University Press.
- Davison, A. J. and Bhella, D. (2007).** Comparative genome and virion structure. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, chapter 14. Edited by Arvin, A., Campadelli-Fiume, G., and Mocarski, E. S.; Cambridge: Cambridge University Press.
- Diamond, D. J., York, J., Sun, J. Y., Wright, C. L., and Forman, S. J. (1997).** Development of a candidate HLA A*0201 restricted peptide-based vaccine against human cytomegalovirus infection. *Blood* **90**, 1751-1767.

- Diezel, W., Kopperschlager, G., and Hofmann, E. (1972).** An improved procedure for protein staining in polyacrylamide gels with a new type of Coomassie Brilliant Blue. *Anal Biochem* **48**, 617-620.
- Falk, C. S., Mach, M., Schendel, D. J., Weiss, E. H., Hilgert, I., and Hahn, G. (2002).** NK cell activity during human cytomegalovirus infection is dominated by US2-11-mediated HLA class I down-regulation. *J Immunol* **169**, 3257-3266.
- Fleckenstein, B., Muller, I., and Collins, J. (1982).** Cloning of the complete human cytomegalovirus genome in cosmids. *Gene* **18**, 39-46.
- Furman, M. H., Dey, N., Tortorella, D., and Ploegh, H. L. (2002).** The human cytomegalovirus US10 gene product delays trafficking of major histocompatibility complex class I molecules. *J Virol* **76**, 11753-11756.
- Gallez-Hawkins, G., Villacres, M. C., Li, X., Sanborn, M. C., Lomeli, N. A., and Zaia, J. A. (2003).** Use of transgenic HLA A*0201/Kb and HHD II mice to evaluate frequency of cytomegalovirus IE1-derived peptide usage in eliciting human CD8 cytokine response. *J Virol* **77**, 4457-4462.
- Gewurz, B. E., Gaudet, R., Tortorella, D., Wang, E. W., Ploegh, H. L., and Wiley, D. C. (2001).** Antigen presentation subverted: Structure of the human cytomegalovirus protein US2 bound to the class I molecule HLA-A2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 6794-6799.
- Gewurz, B. E., Vyas, J. M., and Ploegh, H. L. (2007).** Herpesvirus evasion of T-cell immunity. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, chapter 62. Edited by Arvin, A., Campadelli-Fiume, G., and Mocarski, E. S.; Cambridge: Cambridge University Press.
- Gilbert, M. J., Riddell, S. R., Plachter, B., and Greenberg, P. D. (1996).** Cytomegalovirus selectively blocks antigen processing and presentation of its immediate-early gene product. *Nature* **383**, 720-722.
- Gorbulev, S., Abele, R., and Tampe, R. (2001).** Allosteric crosstalk between peptide-binding, transport, and ATP hydrolysis of the ABC transporter TAP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 3732-3737.
- Grainger, L., Cicchini, L., Rak, M., Petrucelli, A., Fitzgerald, K. D., Semler, B. L., and Goodrum, F. (2010).** Stress-inducible alternative translation initiation of human cytomegalovirus latency protein pUL138. *J Virol* **84**, 9472-9486.
- 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.
- Griffiths, P. D. and Boeckh, M. (2007).** Antiviral therapy for human cytomegalovirus. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, chapter 66. Edited by Arvin, A., Campadelli-Fiume, G., and Mocarski, E. S.; Cambridge: Cambridge University Press.

- Hagemeier, C., Walker, S. M., Sissons, P. J., and Sinclair, J. H. (1992).** The 72K IE1 and 80K IE2 proteins of human cytomegalovirus independently trans-activate the c-fos, c-myc and hsp70 promoters via basal promoter elements. *J Gen Virol* **73 (Pt 9)**, 2385-2393.
- Heineman, T. C. (2007).** Human cytomegalovirus vaccines. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, chapter 71. Edited by Arvin, A., Campadelli-Fiume, G., and Mocarski, E. S.; Cambridge: Cambridge University Press.
- Hengel, H., Koopmann, J. O., Flohr, T., Muranyi, W., Goulmy, E., Hammerling, G. J., Koszinowski, U. H., and Momburg, F. (1997).** A viral ER-resident glycoprotein inactivates the MHC-encoded peptide transporter. *Immunity* **6**, 623-632.
- Hewitt, E. W., Gupta, S. S., and Lehner, P. J. (2001).** The human cytomegalovirus gene product US6 inhibits ATP binding by TAP. *EMBO J* **20**, 387-396.
- 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.
- Holcik, M. and Sonenberg, N. (2005).** Translational control in stress and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 318-327.
- Huber, M. T., Tomazin, R., Wisner, T., Boname, J., and Johnson, D. C. (2002).** Human cytomegalovirus US7, US8, US9, and US10 are cytoplasmic glycoproteins, not found at cell surfaces, and US9 does not mediate cell-to-cell spread. *J Virol* **76**, 5748-5758.
- 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.
- Irwin, M. J., Heath, W. R., and Sherman, L. A. (1989).** Species-restricted interactions between CD8 and the alpha 3 domain of class I influence the magnitude of the xenogeneic response. *J Exp Med* **170**, 1091-1101.
- Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., and Shlomchik, M. J. (2005).** Antigen Presentation to T Lymphocytes. In *Immunobiology*, 6th edition, 169-201. New York: Garland Science Publishing.
- Jones, T. R., Hanson, L. K., Sun, L., Slater, J. S., Stenberg, R. M., and Campbell, A. E. (1995).** Multiple independent loci within the human cytomegalovirus unique short region down-regulate expression of major histocompatibility complex class I heavy chains. *J Virol* **69**, 4830-4841.
- Jones, T. R. and Muzithras, V. P. (1991).** Fine mapping of transcripts expressed from the US6 gene family of human cytomegalovirus strain AD169. *J Virol* **65**, 2024-2036.

- Jones, T. R. and Sun, L. (1997).** Human cytomegalovirus US2 destabilizes major histocompatibility complex class I heavy chains. *J Virol* **71**, 2970-2979.
- Jones, T. R., Wiertz, E. J., Sun, L., Fish, K. N., Nelson, J. A., and Ploegh, H. L. (1996).** Human cytomegalovirus US3 impairs transport and maturation of major histocompatibility complex class I heavy chains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 11327-11333.
- Kalejta, R. F. (2008).** Tegument proteins of human cytomegalovirus. *Microbiol Mol Biol Rev* **72**, 249-265.
- Kim, S., Lee, S., Shin, J., Kim, Y., Evnouchidou, I., Kim, D., Kim, Y. K., Kim, Y. E., Ahn, J. H., Riddell, S. R., Stratikos, E., Kim, V. N., and Ahn, K. (2011).** Human cytomegalovirus microRNA miR-US4-1 inhibits CD8(+) T cell responses by targeting the aminopeptidase ERAP1. *Nat Immunol* **12**, 984-991.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Landolfo, S., Gariglio, M., Gribaudo, G., and Lembo, D. (2003).** The human cytomegalovirus. *Pharmacol Ther* **98**, 269-297.
- Lee, E. C., Yu, D. G., de Velasco, J. M., Tessarollo, L., Swing, D. A., Court, D. L., 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.
- Lilley, B. N. and Ploegh, H. L. (2004).** A membrane protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER. *Nature* **429**, 834-840.
- Lin, A., Xu, H., and Yan, W. (2007).** Modulation of HLA expression in human cytomegalovirus immune evasion. *Cell Mol Immunol* **4**, 91-98.
- Liu, B. and Stinski, M. F. (1992).** Human cytomegalovirus contains a tegument protein that enhances transcription from promoters with upstream ATF and AP-1 cis-acting elements. *J Virol* **66**, 4434-4444.
- Liu, F. and Zhou, Z. H. (2007).** Comparative virion structures of human herpesviruses. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, chapter 3. Edited by Arvin, A., Campadelli-Fiume, G., and Mocarski, E. S.; Cambridge: Cambridge University Press.
- Liu, W., Zhao, Y., and Biegelke, B. (2002).** Analysis of human cytomegalovirus US3 gene products. *Virology* **301**, 32-42.
- Liu, Z., Winkler, M., and Biegelke, B. (2009).** Human cytomegalovirus: host immune modulation by the viral US3 gene. *Int J Biochem Cell Biol* **41**, 503-506.
- 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.

- Loureiro, J., Lilley, B. N., Spooner, E., Noriega, V., Tortorella, D., and Ploegh, H. L. (2006).** Signal peptide peptidase is required for dislocation from the endoplasmic reticulum. *Nature* **441**, 894-897.
- Maidji, E., Tugizov, S., Jones, T., Zheng, Z., and Pereira, L. (1996).** Accessory human cytomegalovirus glycoprotein US9 in the unique short component of the viral genome promotes cell-to-cell transmission of virus in polarized epithelial cells. *J Virol* **70**, 8402-8410.
- Malone, C. L., Vesole, D. H., and Stinski, M. F. (1990).** Transactivation of a human cytomegalovirus early promoter by gene products from the immediate-early gene IE2 and augmentation by IE1: mutational analysis of the viral proteins. *J Virol* **64**, 1498-1506.
- Mandic, L., Miller, M. S., Coulter, C., Munshaw, B., and Hertel, L. (2009).** Human cytomegalovirus US9 protein contains an N-terminal signal sequence and a C-terminal mitochondrial localization domain, and does not alter cellular sensitivity to apoptosis. *J Gen Virol* **90**, 1172-1182.
- Marshall, E. E., Bierle, C. J., Brune, W., and Geballe, A. P. (2009).** Essential role for either TRS1 or IRS1 in human cytomegalovirus replication. *J Virol* **83**, 4112-4120.
- Marshall, E. E. and Geballe, A. P. (2009).** Multifaceted evasion of the interferon response by cytomegalovirus. *J Interferon Cytokine Res* **29**, 609-619.
- Mettenleiter, T. C., Klupp, B. G., and Granzow, H. (2006).** Herpesvirus assembly: a tale of two membranes. *Curr Opin Microbiol* **9**, 423-429.
- Mueller, B., Lilley, B. N., and Ploegh, H. L. (2006).** SEL1L, the homologue of yeast Hrd3p, is involved in protein dislocation from the mammalian ER. *J Cell Biol* **175**, 261-270.
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., and Ehrhardt, W. (1988).** Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **9**, 255-262.
- Noriega, V. M. and Tortorella, D. (2009).** Human cytomegalovirus-encoded immune modulators partner to downregulate major histocompatibility complex class I molecules. *J Virol* **83**, 1359-1367.
- Odeberg, J., Plachter, B., Branden, L., and Soderberg-Naucler, C. (2003).** Human cytomegalovirus protein pp65 mediates accumulation of HLA-DR in lysosomes and destruction of the HLA-DR alpha-chain. *Blood* **101**, 4870-4877.

- Park, B., Kim, Y., Shin, J., Lee, S., Cho, K., Fruh, K., Lee, S., and Ahn, K. (2004).** Human cytomegalovirus inhibits tapasin-dependent peptide loading and optimization of the MHC class I peptide cargo for immune evasion. *Immunity* **20**, 71-85.
- Park, B., Lee, S., Kim, E., Cho, K., Riddell, S. R., Cho, S., and Ahn, K. (2006).** Redox regulation facilitates optimal peptide selection by MHC class I during antigen processing. *Cell* **127**, 369-382.
- Park, B., Spooner, E., Houser, B. L., Strominger, J. L., and Ploegh, H. L. (2010).** The HCMV membrane glycoprotein US10 selectively targets HLA-G for degradation. *J Exp Med* **207**, 2033-2041.
- Pepperl-Klindworth, S., Besold, K., Frankenberg, N., Farkas, M., Kuball, J., Theobald, M., and Plachter, B. (2006).** Cytomegalovirus interleukin-10 expression in infected cells does not impair MHC class I restricted peptide presentation on bystanding antigen-presenting cells. *Viral Immunol* **19**, 92-101.
- Pereira, L., Maidji, E., Tugizov, S., and Jones, T. (1995).** Deletion mutants in human cytomegalovirus glycoprotein US9 are impaired in cell-cell transmission and in altering tight junctions of polarized human retinal pigment epithelial cells. *Scand J Infect Dis Suppl* **99**, 82-87.
- Pizzorno, M. C., O'Hare, P., Sha, L., LaFemina, R. L., and Hayward, G. S. (1988).** trans-activation and autoregulation of gene expression by the immediate-early region 2 gene products of human cytomegalovirus. *J Virol* **62**, 1167-1179.
- Reddehase, M. J. (2002).** Antigens and immunoevasins: Opponents in cytomegalovirus immune surveillance. *Nature Reviews Immunology* **2**, 831-844.
- Rehm, A., Engelsberg, A., Tortorella, D., Korner, I. J., Lehmann, I., Ploegh, H. L., and Hopken, U. E. (2002).** Human cytomegalovirus gene products US2 and US11 differ in their ability to attack major histocompatibility class I heavy chains in dendritic cells. *J Virol* **76**, 5043-5050.
- Reits, E., Neijssen, J., Herberts, C., Benckhuijsen, W., Janssen, L., Drijfhout, J. W., and Neefjes, J. (2004).** A major role for TPPII in trimming proteasomal degradation products for MHC class I antigen presentation. *Immunity* **20**, 495-506.
- Riddell, S. R., Rabin, M., Geballe, A. P., Britt, W. J., and Greenberg, P. D. (1991).** Class I MHC-restricted cytotoxic T lymphocyte recognition of cells infected with human cytomegalovirus does not require endogenous viral gene expression. *J Immunol* **146**, 2795-2804.
- Roizman, B. and Pellett, E. P. (2001).** The Family Herpesviridae: A Brief Introduction. In *Fields Virology*, 4th edition, 2381-2397. Edited by Knipe, D. M. and Howley, P. M.; Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

- 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.
- Rüger, B., Klages, S., Walla, B., Albrecht, J., Fleckenstein, B., Tomlinson, P., and Barrell, B. (1987).** Primary structure and transcription of the genes coding for the two virion phosphoproteins pp65 and pp71 of human cytomegalovirus. *J Virol* **61**, 446-453.
- 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.
- Sadler, A. J. and Williams, B. R. (2008).** Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat Rev Immunol* **8**, 559-568.
- Saffert, R. T. and Kalejta, R. F. (2006).** Inactivating a cellular intrinsic immune defense mediated by Daxx is the mechanism through which the human cytomegalovirus pp71 protein stimulates viral immediate-early gene expression. *J Virol* **80**, 3863-3871.
- 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.
- Salter, R. D., Howell, D. N., and Cresswell, P. (1985).** Genes regulating HLA class I antigen expression in T-B lymphoblast hybrids. *Immunogenetics* **21**, 235-246.
- Sambrook, J. and Russel, D. W. (2001).** *Molecular Cloning - A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA
- Saric, T., Chang, S. C., Hattori, A., York, I. A., Markant, S., Rock, K. L., Tsujimoto, M., and Goldberg, A. L. (2002).** An IFN-gamma-induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides. *Nat Immunol* **3**, 1169-1176.
- Saunders, L. R. and Barber, G. N. (2003).** The dsRNA binding protein family: critical roles, diverse cellular functions. *FASEB J* **17**, 961-983.
- Saveanu, L., Carroll, O., Lindo, V., Del, V. M., Lopez, D., Lepelletier, Y., Greer, F., Schomburg, L., Fruci, D., Niedermann, G., and van Endert, P. M. (2005).** Concerted peptide trimming by human ERAP1 and ERAP2 aminopeptidase complexes in the endoplasmic reticulum. *Nat Immunol* **6**, 689-697.
- 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.

- 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.
- Schneider, U., Schwenk, H. U., and Bornkamm, G. (1977).** Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer* **19**, 621-626.
- Serwold, T., Gonzalez, F., Kim, J., Jacob, R., and Shastri, N. (2002).** ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature* **419**, 480-483.
- Shin, J., Park, B., Lee, S., Kim, Y., Biegelke, B. J., Kang, S., and Ahn, K. (2006).** A short isoform of human cytomegalovirus US3 functions as a dominant negative inhibitor of the full-length form. *J Virol* **80**, 5397-5404.
- 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.
- 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.
- Smith, M. G. (1956).** Propagation in tissue cultures of a cytopathogenic virus from salivary gland virus (SGV) disease. *Proc Soc Exp Biol Med* **92**, 424-430.
- Spriggs, K. A., Stoneley, M., Bushell, M., and Willis, A. E. (2008).** Re-programming of translation following cell stress allows IRES-mediated translation to predominate. *Biol Cell* **100**, 27-38.
- Steffens, H. P., Kurz, S., Holtappels, R., and Reddehase, M. J. (1998).** Preemptive CD8 T-cell immunotherapy of acute cytomegalovirus infection prevents lethal disease, limits the burden of latent viral genomes, and reduces the risk of virus recurrence. *J Virol* **72**, 1797-1804.
- Steinmassl, M. and Hamprecht, K. (1994).** Double fluorescence analysis of human cytomegalovirus (HCMV) infected human fibroblast cultures by flow cytometry: increase of class I MHC expression on uninfected cells and decrease on infected cells. *Arch Virol* **135**, 75-87.
- Stoltze, L., Schirle, M., Schwarz, G., Schroter, C., Thompson, M. W., Hersh, L. B., Kalbacher, H., Stevanovic, S., Rammensee, H. G., and Schild, H. (2000).** Two new proteases in the MHC class I processing pathway. *Nat Immunol* **1**, 413-418.
- Talbot, P. and Almeida, J. D. (1977).** Human cytomegalovirus: purification of enveloped virions and dense bodies. *J Gen Virol* **36**, 345-349.

- Tavalai, N., Kraiger, M., Kaiser, N., and Stamminger, T. (2008).** Insertion of an EYFP-pp71 (UL82) Coding Sequence into the Human Cytomegalovirus Genome Results in a Recombinant Virus with Enhanced Viral Growth. *Journal of Virology* **82**, 10543-10555.
- Taylor, R. T. and Bresnahan, W. A. (2006a).** Human cytomegalovirus IE86 attenuates virus- and tumor necrosis factor alpha-induced NFkappaB-dependent gene expression. *J Virol* **80**, 10763-10771.
- Taylor, R. T. and Bresnahan, W. A. (2006b).** Human cytomegalovirus immediate-early 2 protein IE86 blocks virus-induced chemokine expression. *J Virol* **80**, 920-928.
- Tirabassi, R., Hook, L., Landais, I., Grey, F., Meyers, H., Hewitt, H., and Nelson, J. (2011).** Human cytomegalovirus US7 is regulated synergistically by two virally encoded microRNAs and by two distinct mechanisms. *J Virol* **85**, 11938-11944.
- Tirabassi, R. S. and Ploegh, H. L. (2002).** The human cytomegalovirus US8 glycoprotein binds to major histocompatibility complex class I products. *J Virol* **76**, 6832-6835.
- Trgovcich, J., Cebulla, C., Zimmerman, P., and Sedmak, D. D. (2006).** Human cytomegalovirus protein pp71 disrupts major histocompatibility complex class I cell surface expression. *J Virol* **80**, 951-963.
- Weller, T. H., Macauley, J. C., Craig, J. M., and Wirth, P. (1957).** Isolation of intranuclear inclusion producing agents from infants with illnesses resembling cytomegalic inclusion disease. *Proc Soc Exp Biol Med* **94**, 4-12.
- Weston, K. and Barrell, B. G. (1986).** Sequence of the short unique region, short repeats, and part of the long repeats of human cytomegalovirus. *J Mol Biol* **192**, 177-208.
- White, E. A. and Spector, D. H. (2007).** Early viral gene expression and function. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, chapter 18. Edited by Arvin, A., Campadelli-Fiume, G., and Mocarski, E. S.; Cambridge: Cambridge University Press.
- Wiertz, E. J., Jones, T. R., Sun, L., Bogyo, M., Geuze, H. J., and Ploegh, H. L. (1996a).** The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Cell* **84**, 769-779.
- Wiertz, E. J., Tortorella, D., Bogyo, M., Yu, J., Mothes, W., Jones, T. R., Rapoport, T. A., and Ploegh, H. L. (1996b).** Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature* **384**, 432-438.
- Wills, M. R., Carmichael, A. J., Mynard, K., Jin, X., Weekes, M. P., Plachter, B., and Sissons, J. G. (1996).** The human cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to cytomegalovirus is dominated by structural protein pp65: frequency, specificity, and T-cell receptor usage of pp65-specific CTL. *J Virol* **70**, 7569-7579.

- Yewdell, J. W., Bennink, J. R., and Hosaka, Y. (1988).** Cells process exogenous proteins for recognition by cytotoxic T lymphocytes. *Science* **239**, 637-640.
- 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.

6 Abkürzungsverzeichnis

ActD	Actinomycin D
AEC	3-Amino-9-Ethyl-Carbazol
AmpR	Ampicillinresistenz-Kassette
APCs	antigenpräsentierende Zellen (<i>antigen presenting cells</i>)
ATP	Adenosintriphosphat
BACmid	<i>bacterial artificial chromosome</i>
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
α_2m	α_2 -Mikroglobulin
BSA	bovines Serumalbumin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CH	Cycloheximid
CPE	zytopathischer Effekt (<i>cytopathic effect</i>)
CTLs	zytotoxische T-Zellen (<i>cytotoxic T lymphocytes</i>)
d	Tag(e)
DBs	<i>dense bodies</i>
DCs	dendritische Zellen (<i>dendritic cells</i>)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
E	früh nach Infektion (<i>early</i>)
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ELISpot	<i>enzyme-linked immunosorbent spot assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum

ERAD	ER-assoziierte Proteindegradation (<i>ER-associated degradation</i>)
ERAP1	ER-Aminopeptidase 1
EYFP	<i>enhanced yellow fluorescent protein</i>
FA	Formaldehyd
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
FRT	Erkennungssequenz für Flp-Rekombinase (<i>flippase recognition target</i>)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
gp	Glykoprotein
h	Stunde(n)
HCMV	Humanes Cytomegalovirus
HCS	schwere Ketten (<i>heavy chains</i>)
HDACs	Histon-Deacetylasen
HFF	humane Vorhautfibroblasten (<i>human foreskin fibroblasts</i>)
HLA	humanes Leukozyten-Antigen (<i>human leukocyte antigen</i>)
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
IE	sehr früh nach Infektion (<i>immediate early</i>)
IFN	Interferon
IRF	<i>interferon regulatory factor</i>
IR _L	<i>internal repeat long</i>
IR _S	<i>internal repeat short</i>
KanaR	Kanamycinresistenz-Kassette
L	spät nach Infektion (<i>late</i>)
LB	Luria Bertani
loxP	Erkennungssequenz für Cre-Rekombinase (<i>locus of X-over P1</i>)
MACS	<i>magnetic-activated cell sorting</i>

MCP	<i>major capsid protein</i>
MEM	<i>minimum essential medium</i>
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC-I	Haupthistokompatibilitätskomplex-Klasse-I (<i>major histocompatibility complex class I</i>)
MIEP	Haupt-IE-Promotor (<i>major IE promoter</i>)
min	Minute(n)
<i>moi</i>	Infektionsdosis (<i>multiplicity of infection</i>)
n.i.	nicht infiziert
NF B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NIEPs	nicht-infektiöse, umhüllte Partikel (<i>non-infectious enveloped particles</i>)
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
OD	optische Dichte
p.i.	nach Infektion (<i>post infection</i>)
PAMPs	Pathogen-assoziierte molekulare Muster (<i>pathogen-associated molecular patterns</i>)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDI	Protein-Disulfid-Isomerase
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PKR	Proteinkinase RNA
PLC	Peptidladekomplex (<i>peptide loading complex</i>)
pp	Phosphoprotein
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
rRNA	ribosomale RNA

RT	Raumtemperatur
RV	rekombinantes Virus
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
siRNAs	<i>small interfering RNAs</i>
SPF	<i>specified pathogen free</i>
TAP	Antigenpeptid-Transporter (<i>transporter associated with antigen processing</i>)
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure (<i>trichloroacetic acid</i>)
TCRs	T-Zell-Rezeptoren (<i>T cell receptors</i>)
TetrR	Tetracyclinresistenz-Kassette
TLRs	<i>Toll-like</i> Rezeptoren
TR _L	<i>terminal repeat long</i>
TR _S	<i>terminal repeat short</i>
U _L	<i>unique long</i>
U _S	<i>unique short</i>
UV	Ultraviolett
w / v	Gewicht / Volumen (<i>weight / volume</i>)
WT	Wildtyp
ZVTE	Zentrale Versuchstiereinrichtung

International übliche Terminologie in Englisch wurde beibehalten und zur Kennzeichnung *kursiv* gesetzt.

Danksagung

Erklärung

Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Experimente wurden in der Zeit von November 2007 bis Juni 2011 am Institut für Virologie der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz durchgeführt.

Die Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 490 „Invasion und Persistenz bei Infektionen“ unterstützt.

Teilaspekte der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Noriega, V. M., Hesse, J., Gardner, T. J., Besold, K., Plachter, B., and Tortorella, D. (2012). Human cytomegalovirus US3 modulates destruction of MHC class I molecules. *Mol Immunol* **51**, 245-253.

Lebenslauf