

Optimierung einer partikulären Cytomegalovirus-Vakzine

Dissertation

zur Erlangung des Grades
„DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN“

am
FACHBEREICH BIOLOGIE
der
Johannes Gutenberg - Universität
in Mainz

Sabine Becke
geboren am 10. Oktober 1980
in Emsdetten

Mainz, 2010

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 17. November 2010

Zusammenfassung

Pränatale Infektionen mit dem humanen Cytomegalovirus (HCMV) sind die häufigste Ursache frühkindlicher Schädigung, noch vor dem Down-Syndrom oder dem fetalen Alkoholsyndrom. Reaktivierung dieses Herpesvirus ist darüber hinaus als lebensbedrohliche Komplikation in der Transplantationsmedizin gefürchtet. Von Experten wurde daher die Entwicklung einer Vakzine vielfach angemahnt. Trotz unterschiedlicher Ansätze zu ihrer Entwicklung ist bisher jedoch kein Impfstoff verfügbar. Die Verwendung von subviralen Dense Bodies (DB) des Virus als Vakzinegrundlage stellt eine vielversprechende Strategie zur HCMV-Impfstoffentwicklung dar. DB enthalten bereits in ihrer natürlichen Form wichtige Zielantigene der humoralen und zellulären Immunantwort gegen HCMV. Durch gezielte Mutation des 230.000 Basenpaare umfassenden Genoms des HCMV konnte in Vorarbeiten der Beweis erbracht werden, dass DB hinsichtlich ihres antigenen Repertoires optimierbar sind. Allerdings waren Immunogenität und erzielte Ausbeuten noch unbefriedigend. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Ansatz der Verwendung modifizierter DB als Impfstoff-Grundlage weiter zu entwickeln und Erkenntnisse über die für die Partikelbildung entscheidenden molekularen Mechanismen zu erarbeiten. In einem ersten Abschnitt wurde der Ansatz der Modifikation von DB durch Insertion heterologer Peptidantigene in das virale Tegumentprotein pp65 verfeinert. Das pp65 ist die mengenmäßig dominante Komponente von DB. Durch Herstellung und Austestung definierter HCMV Mutanten konnte die Position 175 des pp65 als geeignete Insertionsstelle für virale wie für nicht-virale Antigene identifiziert werden. In einem zweiten Schritt der Arbeit wurde die Rolle des pp65 im Verlauf der viralen Vermehrung und Morphogenese näher untersucht. Grundlage für diese Analysen war eine Virusmutante, die eine dominant-negative Variante des pp65 exprimiert. Vergleichende massenspektrometrische Untersuchungen unter Einbeziehung von pp65-kompetenten und pp65-negativen Virusmutanten zeigten, dass pp65 in der spät-infizierten Zelle mit dem viralen RNA-Exportfaktor pUL69 und der virale Kinase pUL97 komplexiert vorkommt. Das pp65 wurde als Substrat von pUL97 identifiziert. Daneben wurden essentielle Proteine des viralen Replikationsapparates, sowie zelluläre Proteine des RNA-Metabolismus und -Transports und virale DNA in diesen Komplexen gefunden. Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass pp65 zu späten Zeitpunkten der viralen Infektion zu Stellen viraler DNA rekrutiert wird und dort regulatorisch in posttranskriptionelle Vorgänge von RNA Prozessierung oder RNA Transport eingreift. Die Hypothese, dass pp65 einen regulatorischen Einfluss auf die RNA-Exportfunktion von pUL69 nimmt, liegt nahe und ist nun in weiteren Analysen prüfbar.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 Das Humane Cytomegalovirus	1
1.1.1 Morphologie.....	2
1.1.2 Replikation	3
1.1.3 Epidemiologie und Pathogenese.....	5
1.1.4 Latenz und Reaktivierung.....	6
1.2 Immunologische Kontrolle einer HCMV-Infektion	7
1.2.1 Die zelluläre Immunantwort.....	7
1.2.1.1 CD8 T-Zellen.....	7
1.2.1.2 CD4 T-Zellen.....	10
1.2.2 Die humorale Immunantwort	10
1.3 Antivirale Therapie.....	11
1.4 Impfstoffentwicklung.....	13
1.4.1 HCMV-Impfstoffe in klinischen Studien.....	13
1.4.1.1 Attenuierte Viren	13
1.4.1.2 <i>Subunit</i> Impfstoff.....	14
1.4.2 Impfstoffe in der präklinischen Entwicklungsphase.....	16
1.4.2.1 Alternative Expressionsstrategien für gB, pp65 und IE1	16
1.4.2.2 Dense Body Vakzine	17
1.5 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	17
2 Material und Methoden	19
2.1 Allgemeine Laborgeräte	19
2.2 Chemikalien.....	21
2.3 Kultivierung von Bakterien	21
2.3.1 Bakterienstämme.....	21
2.3.2 Medien und Medienzusätze.....	21
2.3.2.1 Medien	21
2.3.2.2 Medienzusätze.....	22
2.3.3 Kultivierung und Kryokonservierung.....	23
2.3.3.1 Flüssigkulturen.....	23

2.3.3.2	Kultivierung auf Agarplatten.....	23
2.3.3.3	Kryokonservierung (Glycerinkulturen)	23
2.3.3.4	Herstellung elektrokompetenter Bakterien	23
2.3.3.5	Herstellung elektrokompetenter SW102 Bakterien für die BAC- Mutagenese.....	24
2.3.3.6	Elektroporation kompetenter <i>E.coli</i>	24
2.3.3.7	Elektroporation kompetenter <i>E.coli</i> SW102.....	25
2.4	Kultivierung von Säugerzellen.....	25
2.4.1	Puffer und Lösungen	26
2.4.2	Medien und Medienzusätze.....	26
2.4.2.1	Antibiotika	27
2.4.2.2	Inhibitoren	27
2.4.2.3	Peptide.....	27
2.4.3	Bestimmung der Zellzahl und der Zellvitalität.....	27
2.4.4	Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen.....	28
2.4.5	Verwendete Zellen und Zelllinien	28
2.4.5.1	Suspensionszellen	28
2.4.5.2	Adhärente Zellen.....	29
2.4.5.3	Cytolytische T-Lymphozyten (CTL) Linie.....	30
2.4.6	Restimulierung peptidspezifischer CTL-Linien.....	30
2.4.7	Transfektion.....	31
2.5	Kultivierung von Viren.....	31
2.5.1	Virusstämme.....	31
2.5.2	Virus-Rekonstitution aus BACmiden	33
2.5.3	Infektion eukaryonter Zellen mit HCMV.....	33
2.5.4	Behandlung von Zellen mit aufgereinigten Dense Bodies	33
2.5.5	Herstellung virushaltiger Überstände	34
2.5.6	Bestimmung des Virustiters.....	34
2.5.7	Aufreinigung von Viruspartikeln aus Zellkultur-Überstand	35
2.6	Molekularbiologische Methoden.....	36
2.6.1	Verwendete Plasmide.....	36
2.6.2	Verwendete Bacterial Artificial Chromosomes (BACs)	38
2.6.3	Isolierung von DNA.....	39
2.6.3.1	Isolierung von BACmid-/Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	39
2.6.3.2	Isolierung von Virus-DNA aus Zellkulturüberstand infizierter HFF	40
2.6.4	Isolierung von RNA.....	40
2.6.5	Fällung von DNA mit Isopropanol.....	40

2.6.6	Agarose-Gelelektrophorese.....	41
2.6.7	DNA-Fragmentisolierung.....	41
2.6.8	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	41
2.6.8.1	Durchführung einer PCR.....	42
2.6.8.2	Kolonie-PCR.....	43
2.6.8.3	Oligonukleotide (Primer).....	43
2.6.8.4	Verwendete PCR-Programme.....	49
2.6.8.5	Aufreinigung von PCR-Produkten.....	50
2.6.8.6	<i>Template</i> -Eliminierung.....	50
2.6.9	Sequenzierung.....	50
2.6.10	Quantitative <i>Real-time</i> PCR (TaqMan™ PCR).....	50
2.6.11	Mutagenese.....	52
2.6.12	BAC-Mutagenese: Galk positive/negative Selektion.....	52
2.6.13	BAC DNA Restriktionsanalyse.....	55
2.6.14	Northern Blot.....	56
2.7	Biochemische Methoden.....	58
2.7.1	Verwendete Antikörper.....	58
2.7.1.1	Primärantikörper.....	58
2.7.1.2	Sekundärantikörper.....	59
2.7.2	Herstellung von Gesamtzellextrakten.....	60
2.7.3	Durchflusszytometrie/Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS).....	60
2.7.4	Gelelektrophorese.....	61
2.7.4.1	Herstellung der Gele.....	61
2.7.4.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	61
2.7.4.3	Coomassie-Färbung.....	62
2.7.4.4	Western-Blot (Odyssey-System).....	63
	Nachweis von immobilisierten Proteinen mittels Antikörpern.....	63
2.7.5	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	64
2.7.6	Fluoreszenzmarkierung zellulärer Proteine.....	64
2.7.6.1	Indirekter Nachweis.....	64
2.7.6.2	Direkter Nachweis.....	64
2.7.6.3	Immunfluoreszenz.....	64
2.7.6.4	Fluoreszenzdetektion mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie.....	65
2.7.7	Koimmunpräzipitation.....	66
2.7.8	Massenspektrometrie.....	67
2.7.9	<i>In vitro</i> Kinase Assay (IVKA).....	68

2.8	Immunologische Methoden	69
2.8.1	Tierversuche.....	69
2.8.1.1	Versuchstiere.....	69
2.8.1.2	Immunisierung von Mäusen.....	69
2.8.1.3	Isolierung von Lymphozyten aus der Milz.....	70
2.8.1.4	Immunomagnetische Anreicherung von CD8 T-Zellen.....	70
2.8.1.5	Anlage und Restimulierung Peptid-spezifischer CD8 T-Zellen.....	71
2.8.1.6	Anlage und Restimulierung von CD4 T-Zellen.....	71
2.8.2	Enzyme Linked Immuno Spot Assay.....	72
2.8.2.1	ELISpot Analysen von behandelten Zellen mit aufgereinigten DB.....	73
2.8.2.2	ELISpot Analysen zur Detektion von Peptid-spezifischen CD8 T-Zellen.....	74
2.8.3	Gewinnung von Serum.....	75
2.8.4	Neutralisationstest.....	75
3	Ergebnisse	77
3.1	Weiterentwicklung einer HCMV-Vakzine basierend auf modifizierten Dense Bodies	77
3.1.1	Herstellung der rekombinanten Viren <i>via</i> BAC-Mutagenese.....	78
3.1.1.1	Insertion der <i>galk</i> Kasette.....	78
3.1.1.2	Austausch der <i>galk</i> Kasette gegen das IE1 Peptid.....	78
3.1.2	Strukturelle Analysen der rekombinanten BACs.....	80
3.1.3	Subzelluläre Verteilung des pp65-IE1 _{TMY} Fusionsproteins und Synthese von recDB in infizierten HFF.....	81
3.1.4	Charakterisierung der rekombinanten Viren RV-SB3 und RV-SB6.....	83
3.1.4.1	Expression des pp65-IE1 _{TMY} Fusionsproteins.....	83
3.1.4.2	Vermehrungsverhalten von RV-SB3 und RV-SB6.....	83
3.1.4.3	Freisetzung von rekombinanten Dense Bodies.....	84
3.1.4.4	Verpackung des pp65-IE1 _{TMY} Fusionsproteins in virale Partikel.....	85
3.1.5	MHC-Klasse I Präsentation des pp65 _{NLV} - und IE1 _{TMY} -Peptides.....	86
3.1.6	Induktion einer IE1 _{TMY} spezifischen CD8 T-Zell Antwort nach Immunisierung mit recDB.....	88
3.1.7	Stimulation einer CD4 T-Zell Antwort nach Immunisierung mit recDB.....	90
3.1.8	<i>Priming</i> von neutralisierenden Antikörpern durch Immunisierung mit recDB.....	91
3.1.9	SIINFEKL als nicht-virales Modellpeptid.....	92
3.1.9.1	Strukturelle Analysen der rekombinanten BACs.....	94
3.1.9.2	Subzelluläre Verteilung des pp65-SIINFEKL Fusionsproteins und Produktion von recDB in infizierten HFF.....	95
3.1.9.3	Freisetzung von rekombinanten Dense Bodies.....	96
3.1.9.4	Induktion einer SIINFEKL spezifischen CD8 T-Zell Antwort.....	96

3.2	Analysen der molekularen Funktion von pp65 während der Partikelmorphogenese	98
3.2.1	Expression des pp65-IE1 _{TMY} Fusionsproteins.....	98
3.2.2	Virale Replikationskinetiken der rekombinanten Viren RV-VM1 und RV-VM4	99
3.2.3	Zelluläre Verteilung des pp65-IE1 _{TMY} Fusionsproteins in RV-VM1 infizierten HFF	100
3.2.4	Zelluläre Verteilung von viralen Proteinen in RV-VM1 infizierten HFF	101
3.2.5	Wechselwirkung von pp65 mit der viralen Kinase pUL97	104
3.2.5.1	Wachstumskinetiken von infizierten HFF	106
3.2.6	Analyse einer direkten pUL97 Hemmung durch pp65-VM1	107
3.2.7	Koimmunpräzipitation von viralen und zellulären Proteinen mit pp65	108
3.2.7.1	Koimmunpräzipitation in Kombination mit einem <i>in vitro</i> Kinase Assay	108
3.2.7.2	Identifikation von viralen Interaktionspartnern des pp65	112
3.2.7.3	Identifikation von zellulären Interaktionspartnern des pp65	114
3.2.7.4	Assoziation viraler DNA mit pp65-haltigen Komplexen	115
3.2.8	Expression verschiedener viraler Proteine in infizierten HFF	116
3.2.9	Synthese viraler RNA verschiedener Proteine	117
4	Diskussion	120
4.1	Entwicklung einer modifizierten Dense Body Vakzine	120
4.1.1	Immunogene Eigenschaften der modifizierten Dense Bodies DB-SB3 und DB-SB6.....	122
4.1.2	Modifizierte Dense Bodies als Träger für Fremdartigene.....	123
4.2	Analysen der molekularen Funktion von pp65 während der Partikelmorphogenese	124
4.2.1	Wechselwirkung von pp65 mit der viralen Kinase pUL97	124
4.2.2	Einfluss von pp65 auf die molekulare Funktion des viralen RNA-Exportfaktors pUL69	126
4.2.3	Interaktion von pp65 mit viralen und zellulären Proteinen	127
5	Literaturverzeichnis	129
	Abbildungsverzeichnis	150
	Lebenslauf	152
	Danksagung	153
	Erklärung	154

Abkürzungsverzeichnis

AEC	3-Amino-9-Ethyl-Carbazol
AIDS	erworbenes Immundefektsyndrom (<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>)
ALVAC	<i>Canarypox</i> -Vektor
APC	Antigenpräsentierende Zellen (<i>Antigen Presenting Cells</i>)
AS	Aminosäure
BAC/ BACmid	<i>Bacterial Artificial Chromosome</i>
BCA	Bizinchoninsäure
bFGF	<i>Basic Fibroblast Growth Factor</i>
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovines Serumalbumin</i>)
CDV	Cidofovir
CHO	Hamsterzellen (<i>Chinese Hamster Ovary</i>)
CPE	zytopathischer Effekt (<i>Cytopathic Effect</i>)
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten (<i>Cytotoxic T-Lymphocytes</i>)
DAPI	4,6-Diamidio-2-Phenyllindol
DB	Dense Bodies
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle</i> Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOG	2-desoxy-Galaktose
E	früh nach Infektion (<i>Early</i>)
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISpot	<i>Enzym Linked Immuno Spot Assay</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum

FOS	Foscarnet
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
<i>galK</i>	Galaktokinase
GCV	Ganciclovir
gp	Glykoprotein
GFP	grün-fluoreszierendes Protein (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
Gy	Gray
HCMV	Humanes Cytomegalovirus
HFF	Humane Vorhautfibroblasten (<i>Human Foreskin Fibroblasts</i>)
HLA	humanes Leukozyten-Antigen (<i>Human Leucocyte Antigen</i>)
hnRNP	heterogene nukleare Ribonukleoproteine
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>Horseradish Peroxidase</i>)
HSV	Herpes-Simplex-Virus
IC ₅₀	50% Inhibitor-Konzentration (<i>Inhibitory Concentration</i>)
IE	sehr früh nach Infektion (<i>Immediate Early</i>)
IFA	Indirekte Immunfluoreszenz
IFN- γ	Interferon- γ
IL-2	Interleukin-2
IVKA	<i>In vitro</i> Kinase Assay
KMT	Knochenmarkstransplantation
L	spät nach Infektion (<i>Late</i>)
LB	Luria-Bertani
LGS	große, globuläre Strukturen (<i>Large Globular Structures</i>)
MCMV	Murines Cytomegalovirus
MCP	Hauptkapsidprotein (<i>Major Capsid Protein</i>)
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
Mean, FL	<i>Mean Fluorescence Intensity</i>
MEM	<i>Minimum Essential</i> Medium
min	Minute(n)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)

mock	Negativkontrolle bei Infektionsexperimenten
<i>moi</i>	Infektionsdosis (<i>multiplicity of infection</i>)
MVA	modifiziertes Vaccina Virus Ankara
NEC	<i>Nuclear Egress Complex</i>
NIBs	nukleare Einschlusskörperchen (<i>Nuclear Inclusion Bodies</i>)
NIEPs	nicht infektiöse, umhüllte HCMV-Partikel (<i>Non Infectious Enveloped Particles</i>)
NLS	Kernlokalisierungssignal (<i>Nuclear Localisation Signal</i>)
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
OD	optische Dichte
OVA	Ovalbumin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
p.i.	nach Infektion (<i>post infection</i>)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PKC	Proteinkinase C
Plk-1	Polo-like Kinase 1
pp	Phosphoprotein
PVDF	Polyvinylidenfluorid
recDB	rekombinante Dense Bodies
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>Rounds per Minute</i>)
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
SPF	<i>Specified-pathogen-free</i>
SV	Simian Virus
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TRITC	Tetramethylisothiocyanat
U	Units
üN	über Nacht
UV	Ultraviolett

ValGCV	Valganciclovir
VEE	<i>Venezuelan Equine Encephalitis</i>
VRPs	<i>Virus-like-Replication Particles</i>
v/v	Volumen/Volumen (<i>volume/volume</i>)
VZV	Varizella-Zoster-Virus
wt	Wildtyp
w/o	<i>without</i>
w/v	Gewicht/Volumen (<i>weight/volume</i>)
β2m	β2-Mikroglobulin

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

1 Einleitung

1.1 Das Humane Cytomegalovirus

Das Humane Cytomegalovirus (HCMV) wurde erstmals im Jahre 1881 durch den Pathologen Hugo Ribbert beschrieben (Ribbert, 1904). Er bezeichnete die Erkrankung, die durch das Virus verursacht wird, als „Krankheit mit protozoenhaltigen Zellen“. Erst 53 Jahre später konnte die Virusätiologie definitiv aufgeklärt werden (Weller *et al.*, 1957). Der Name Cytomegalovirus leitet sich von der Eigenschaft ab, dass es durch eine Infektion mit HCMV zur Zellvergrößerung, der sogenannten Cytomegalie, mit typischen intranuklearen Einschlusskörpern (Eulenaugen-Zellen) kommt.

Systematisch ist das HCMV aufgrund seiner charakteristischen Morphologie der Viruspartikel der Familie der Herpesviren (*Herpesviridae*) zugeordnet. Neben HCMV zählen bislang weitere acht humanpathogene Vertreter zu dieser Familie. Zu ihnen gehören das Herpes-Simplex-Virus (HSV), das Varicella-Zoster-Virus (VZV) und das Epstein-Barr-Virus (EBV). Eine gemeinsame Eigenschaft dieser Vertreter ist die Fähigkeit zur Ausbildung einer lebenslangen Latenz im Wirtsorganismus. Sie unterscheiden sich jedoch in einigen biologischen Merkmalen, aufgrund derer sie in die drei Unterfamilien α -, β - und γ -Herpesviren eingeteilt werden (Roizman *et al.*, 1981; Roizman *et al.*, 1992; Roizman and Pellett, 2001). Die α -Herpesviren zeichnen sich durch ein breites Wirtsspektrum und einen kurzen Replikationszyklus aus. Sie persistieren überwiegend in den Nervenzellen sensorischer Ganglien. Im Gegensatz dazu weisen die β -Herpesviren ein enges Wirtsspektrum, einen in Zellkultur sehr langsamen Vermehrungszyklus und eine charakteristische Vergrößerung der infizierten Zelle auf. HCMV etabliert Latenz in unterschiedlichen Organen, darunter Lunge, Leber, Pankreas, Niere und Herz (Koffron *et al.*, 1997). Nach Infektion mit dem murinen Cytomegalovirus (MCMV) kann latentes Virus in Organen wie Lunge, Milz, Speicheldrüse, Niere, Nebenniere und Herz nachgewiesen werden (Baltesen *et al.*, 1993; Collins *et al.*, 1993; Klotman *et al.*, 1990; Reddehase *et al.*, 1994). Die γ -Herpesviren besitzen ebenfalls ein enges Wirtszellspektrum. Die Ausbildung der Latenz erfolgt überwiegend in lymphoidem Gewebe.

Aufgrund einer ausgeprägten Wirtsspezifität, einem langsamen Replikationszyklus in Zellkultur und der nach Infektion zu beobachtenden Cytomegalie wurde das HCMV der Familie der β -Herpesviren zugeordnet (zusammengefasst in (Mocarski *et al.*, 2007)).

1.1.1 Morphologie

Die Viruspartikel von HCMV besitzen einen Durchmesser von ungefähr 150-200 nm und zeigen die typische Morphologie der Herpesviren (Abbildung 1.1). Insgesamt sind 71 HCMV-kodierte und über 70 zelluläre Proteine bekannt, die im Viruspartikel enthalten sind (Varnum *et al.*, 2004). Das 229-240 kb große, doppelsträngige Genom kodiert für etwa 164-167 Gene (Davison *et al.*, 2003; Dolan *et al.*, 2004) und ist von einem ikosahedrischem Kapsid umgeben. Die äußere Begrenzung des Virus bildet eine Lipiddoppelschicht, die von intrazellulären Membranen abstammt. In diese sind viruskodierte Glykoproteine eingelagert, wobei das Glykoprotein gM und das Glykoprotein gB am häufigsten vertreten sind (Varnum *et al.*, 2004). Innerhalb der Familie der Herpesviren bilden diese Glykoproteine hoch konservierte Glykoproteinkomplexe aus, die bei der Adsorption und Penetration des Virus an die Wirtszelle eine wichtige Rolle spielen. Sie sind gleichzeitig wichtige Zielantigene der Antikörper-vermittelten, neutralisierenden Immunantwort des Wirtes gegen HCMV. Zwischen der Lipiddoppelschicht und dem Nukleokapsid befindet sich eine Proteinschicht, die als Tegument bezeichnet wird. Diese Matrix besteht aus 20-25 verschiedenen Proteinen, die zu einem Großteil phosphoryliert sind und immunogene Zielstrukturen darstellen. Hauptkomponenten des Teguments sind die fünf Phosphoproteine pp65 (pUL83), pp150 (pUL32), pp71 (pUL82), pUL48 und pUL25. Diese Proteine bilden 30% der Gesamt-Proteinmasse der Virionen (Varnum *et al.*, 2004) und beeinflussen unter anderem als Transaktivatoren die zelluläre und virale Genexpression (Baldick and Shenk, 1996; Baldick *et al.*, 1997; Roby and Gibson, 1986; van Zeijl *et al.*, 1997; Winkler *et al.*, 1994). Außerdem konnte gezeigt werden, dass sowohl virale als auch zelluläre mRNAs in viralen Partikeln eingebaut werden (Bresnahan and Shenk, 2000; Greijer *et al.*, 2000). Die zugrundeliegenden Mechanismen sind bisher jedoch nicht genauer bekannt.

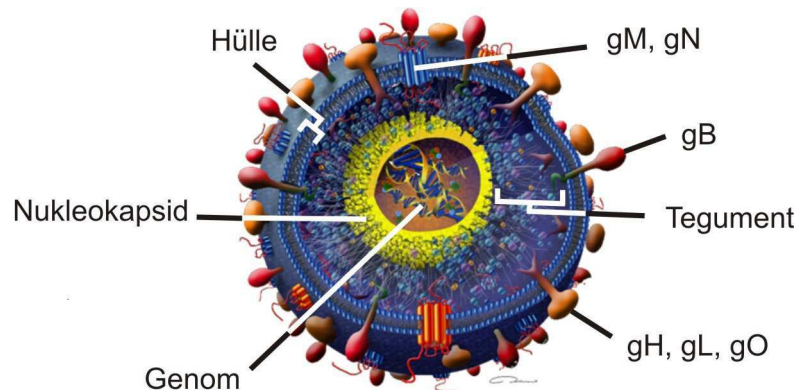


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung eines HCMV-Partikels
(verändert nach (Streblow *et al.*, 2006))

1.1.2 Replikation

Während HCMV *in vivo* eine Vielzahl von verschiedenen Zelltypen wie Fibroblasten, Makrophagen, glatten Muskelzellen, Epithel- und Endothelzellen (Sinzger *et al.*, 1995; Sinzger *et al.*, 2008) infizieren kann, weist es in Zellkultur ein deutlich engeres Wirtsspektrum auf. Dabei konnte gezeigt werden, dass primäre, humane Haut- und Lungen-Fibroblasten eine gute Penetration der Viruspartikel, aber auch eine produktive Replikation aufweisen (zusammengefasst in (Mocarski and Courcelle, 2001)).

Die initiale Interaktion des Virus mit seiner Zielzelle wird durch die Bindung der Glykoproteine in der Virusmembran an die Heparansulfat-Proteoglykane auf der Oberfläche der Wirtszelle ermöglicht (Compton *et al.*, 1993). Dabei scheinen das Glykoprotein gB sowie der Glykoproteinkomplex gCII, der aus den Glykoproteinen gM und gN besteht, eine wichtige Rolle zu spielen (Compton *et al.*, 1993; Kari and Gehrz, 1992). Der nächste Schritt der Replikation ist die Adsorption an die Zelloberfläche. Diese wird durch spezifische Rezeptoren vermittelt, die jedoch bisher weitestgehend unbekannt sind. Durch die Fusion der Virushülle mit der Zellmembran gelangt das Kapsid mit dem Tegument ins Zytoplasma der Zelle. Bei diesem Vorgang scheint der Glykoproteinkomplex gCIII, der aus gH und gL besteht, von Bedeutung zu sein (Huber and Compton, 1999; Li *et al.*, 1997). Neuere Studien weisen darauf hin, dass ein anderer Komplex, der aus den viralen Proteinen UL128, UL130 und UL131A und den Glykoproteinen gH und gL besteht, eine wichtige Rolle bei der Infektion von Endothel- und Epithelzellen spielt (Ryckman *et al.*, 2008; Wang and Shenk, 2005). Analog zum HSV 1 wird das Nukleokapsid im Zytoplasma mit hoher Wahrscheinlichkeit entlang eines Dynein-vermittelten retrograden Transports an Mikrotubuli entlang zu der

Kernmembran transportiert (Diefenbach *et al.*, 2002; Dohner *et al.*, 2002; Sodeik *et al.*, 1997). Die Einschleusung in den Zellkern erfolgt durch die Kernporen in das Nukleoplasma (Ogawa-Goto *et al.*, 2003). Das lineare HCMV-Genom zirkularisiert dort zu einem extrachromosomalen Episom (Nixon and McVoy, 2002). Zusätzlich zu dem Kapsid können auch virale Tegumentproteine mit einem Kernlokalisierungssignal (*nuclear localisation signal*, NLS) in das Nukleoplasma gelangen. Die virale Genexpression des HCMV verläuft wie bei allen Herpesviren in drei Stufen (Demarchi, 1981; McDonough and Spector, 1983; Wathen and Stinski, 1982). Während der initialen *immediate early* (IE) Phase kommt es zur Transkription viraler, regulatorischer Proteine wie IE1 und IE2. Virale Transaktivatoren des Teguments wie pp71 und pUL69 zusammen mit pUL35 und pUL26 sind in der Lage, die Expression der IE-Gene zu verstärken (Liu and Stinski, 1992; Schierling *et al.*, 2004; Stamminger *et al.*, 2002; Winkler *et al.*, 1994; Winkler and Stamminger, 1996). Die Synthese der viralen, regulatorischen Proteine IE1 und IE2 führt zur Expression der *early* (E) Gene. Diese Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der viralen DNA Replikation und der Einleitung der *late* (L) Phase der Infektion. Die Replikation des viralen Genoms beginnt am Ursprung der lytischen DNA Replikation auf dem Genom des HCMV, dem sogenannten *ori_{lyt}*. Sie erfolgt nach dem Prinzip des *rolling circles* (Anders *et al.*, 1992). Dabei konnten in der Zelle kurz nach der Infektion zirkuläre HCMV-Genome detektiert werden (LaFemina and Hayward, 1983). Die neu synthetisierte DNA wird als lineare Konkatemere von einer zirkulären Matrize aus gebildet (McVoy and Adler, 1994). Nach Beginn der viralen Replikation kommt es zur Initiierung der späten Phase der Genexpression. Diese Gene kodieren in erster Linie Strukturproteine des Virus (zusammengefasst in (Mocarski and Courcelle, 2001)). Nach dem Aufbau eines Kapsids aus 162 Kapsomeren kommt es zur Verpackung der DNA. Dazu muss diese an den Genomenden durch eine virale Endonuklease gespalten und in Einzelgenome überführt werden (Bogner *et al.*, 1998). Nach der Verpackung der viralen DNA wird das Kapsid durch eine lokale Modifizierung der nuklearen Lamina in den perinuklearen Raum eingeschleust. Dabei wird das Kapsid von einer Hülle umgeben. An diesem Prozess ist der sogenannte *nuclear egress complex* (NEC) beteiligt. Der NEC setzt sich aus dem zellulären Protein p32, dem Lamin-B-Rezeptor, der Proteinkinase C (PKC), den viralen Proteinen pUL50 und pUL53 sowie der viralen Kinase pUL97 zusammen (Marschall *et al.*, 2005; Milbradt *et al.*, 2009b). Durch Verschmelzung der Membran mit der äußeren Kernmembran werden die Kapside in das Zytoplasma freigesetzt. Durch Knospung in Vesikel erhalten die Kapside ihre Zellmembran im

Zytoplasma (Gibson, 1996; Tooze *et al.*, 1993) und reifen weiter heran. Der Ursprung der zellulären Membran ist bisher nicht genauer bekannt. An der Zellmembran werden die reifen Viruspartikel durch einen Exozytose-ähnlichen Prozess schließlich aus den Vesikeln in das extrazelluläre Kompartiment freigesetzt (Mettenleiter, 2002).

Während einer HCMV-Infektion in Fibroblasten werden drei verschiedene virale Partikel gebildet, die in den Zellkulturüberstand freigesetzt werden. Neben den infektiösen Virionen werden zusätzlich nicht infektiöse umhüllte Partikel (*non infectious enveloped particles*, NIEPs) und Dense Bodies (DB) produziert. NIEPs ähneln in ihrer Struktur und Proteinzusammensetzung den Virionen. Im Gegensatz zu diesen besitzen sie jedoch ein zusätzliches Protein, das *assembly* Protein, und sie enthalten keine DNA. DB unterscheiden sich hingegen deutlich. Sie besitzen weder DNA noch ein Kapsid, sondern bestehen überwiegend aus Tegument- und Glykoproteinen, die von einer Hüllmembran umgeben sind (Varnum *et al.*, 2004).

1.1.3 Epidemiologie und Pathogenese

HCMV ist ein ubiquitär vorkommendes, fakultativ-pathogenes Virus. Der Grad der Durchseuchung innerhalb der Bevölkerung variiert dabei in Abhängigkeit von der geographischen Lage und dem sozialen und ökonomischen Status. In Europa und den USA sind etwa 60% der Bevölkerung mit HCMV infiziert, wohingegen die Seroprävalenz in den Entwicklungsländern in Afrika und Asien bis zu 100% betragen kann (Mocarski *et al.*, 2007). Die Übertragung von HCMV kann sowohl horizontal als auch vertikal erfolgen. Der horizontale Transfer erfolgt durch direkten Schleimhautkontakt mit Körperflüssigkeiten infizierter Personen wie Speichel, Samenflüssigkeit, Urin, Zervikalsekret, Blut und Muttermilch. Aber auch die Transplantation von infizierten Organen, Geweben und Knochenmark und die Transfusion von kontaminierten Blutkonserven stellen Wege für einen horizontalen Transfer des Virus dar. Im Gegensatz dazu erfolgt der vertikale Transfer von der Mutter auf das Kind während der Schwangerschaft (diaplazentar) oder während der Geburt (perinatal) (Lang and Kummer, 1975; Reynolds *et al.*, 1973; Stagno *et al.*, 1981).

Aufgrund der sehr geringen Pathogenität von HCMV verläuft eine Primär- und Sekundärinfektion bei immunkompetenten Menschen meist asymptomatisch. Auch bei der Reaktivierung des Virus sind in der Regel keine Krankheitssymptome zu beobachten. In seltenen Fällen führt die Infektion bzw. Reaktivierung zu mononukleoseähnlichen Symptomen wie Müdigkeit und Fieber (Cohen and Corey,

1985; Jordan *et al.*, 1973). Selten ist bei Menschen mit einem intakten Immunsystem ein schwerer Krankheitsverlauf zu beobachten. Klinisch auffällig wird eine HCMV-Infektion, wenn das Immunsystem des Patienten geschwächt oder unausgereift ist. Risikogruppen stellen dabei zum einen Transplantatempfänger, zum anderen Patienten mit erworbenem Immundefektsyndrom (*Acquired immunodeficiency syndrome*, AIDS) dar. Bei ihnen kann die HCMV-Infektion bzw. –Reaktivierung zu lebensbedrohlichen Krankheiten wie Lungen-, Leber- oder Gehirnhautentzündung führen (Drew, 1992). Eine kongenitale Infektion tritt zumeist bei einer Primärinfektion der Mutter während der Schwangerschaft auf. Etwa 90% der pränatal infizierten Säuglinge sind zunächst klinisch unauffällig. In 7-25% der Fälle kann eine kongenitale Infektion jedoch zu neuronalen Spätfolgen wie geistige Retardierung oder Beeinträchtigungen des Gehörs führen. Weisen die Neugeborenen bereits bei der Geburt Symptome auf (5-10%), entwickeln diese in 90% der Fälle neuronale Störungen, die geistige Retardierung, Hörverlust und Beeinträchtigung des Sehvermögens zur Folge haben können. 10% der Säuglinge, die bei der Geburt Symptome zeigen, versterben innerhalb des ersten Lebensjahres (Landolfo *et al.*, 2003; Mocarski and Courcelle, 2001; Mocarski *et al.*, 2007). Die kongenitale HCMV-Infektion stellt die häufigste Ursache bleibender zentralnervöser Schädigungen dar (Cannon and Davis, 2005). Darüber hinaus wird diskutiert, ob HCMV auch eine Rolle bei der altersbedingten T-Zell Immunoseneszenz (Koch *et al.*, 2007) und bei Arteriosklerose (Adam *et al.*, 1997) spielt.

1.1.4 Latenz und Reaktivierung

In der Regel verläuft eine Primärinfektion mit HCMV asymptomatisch. Sie führt jedoch zu einer lebenslangen Latenz des Erregers im Wirtsorganismus. Die Latenz zeichnet sich durch das Fehlen von Virusproduktion aus. Durch sporadische Reaktivierung kann diese Phase jedoch unterbrochen werden. Das virale Genom liegt während der Persistenz im Wirtsorganismus als Episom vor und ist überwiegend in Vorläuferzellen myeloider Zellen nachzuweisen. Die Mechanismen, die zur Reaktivierung führen, sind bisher weitestgehend ungeklärt. Aufgrund der Induktion der während der Latenz stumm geschalteten IE-Genexpression kommt es zur Einleitung der Reaktivierung. Dabei spielt die Differenzierung der latent infizierten myeloiden Vorläuferzellen zu Makrophagen und reifen dendritischen Zellen eine wichtige Rolle (Sinclair and Sissons, 2006).

1.2 Immunologische Kontrolle einer HCMV-Infektion

Entscheidend für den Verlauf einer HCMV-Infektion ist die Immunkompetenz des Patienten. Bei der Prävention bzw. der Kontrolle der Infektion spielen sowohl das adaptive als auch das humorale Immunsystem eine wichtige Rolle. Dabei erfolgt die erste Abwehr des Virus hauptsächlich durch Natürliche Killerzellen (NK-Zellen). In verschiedenen Studien mit NK-Zell-defizienten oder –depletierten Mäusen konnte gezeigt werden, dass diese Zellen des angeborenen Immunsystems an der Eindämmung der viralen Replikation in unterschiedlichen Geweben beteiligt sind (Bukowski *et al.*, 1984; Welsh *et al.*, 1991). Bukowski und Kollegen konnten außerdem nachweisen, dass der adoptive Transfer von NK-Zellen aus Zellkultur sowohl immunsupprimierte adulte als auch neugeborene Tiere vor einer CMV-Erkrankung schützen kann (Bukowski *et al.*, 1985; Bukowski *et al.*, 1988). NK-Zellen stellen somit eine effiziente erste Abwehr gegen eine akute Infektion mit CMV dar. Für die Kontrolle der viralen Replikation und die damit verbundene Verhinderung einer HCMV-Erkrankung ist jedoch die adaptive, HCMV-spezifische Immunantwort von entscheidender Bedeutung (Reddehase, 2002). Dabei übernehmen sowohl humorale als auch zelluläre Abwehrmechanismen eine wichtige Rolle.

1.2.1 Die zelluläre Immunantwort

Das zelluläre Abwehrsystem ist hauptsächlich am Schutz vor den Folgen einer HCMV-Infektion beteiligt. Dabei spielen vor allem die zytotoxischen T-Zellen (*cytotoxic T-cells*, CTL) eine wichtige Rolle (Kapitel 1.2.1.1). Bei der Unterstützung der CD8 T-Zell Antwort kommt jedoch auch den CD4 T-Helferzellen eine entscheidende Bedeutung zu (Kapitel 1.2.1.2).

1.2.1.1 CD8 T-Zellen

Die Bedeutung der CD8 T-Zellen während einer Infektion mit MCMV bzw. einer HCMV-Infektion konnte sowohl im Tiermodell als auch in Studien an immunsupprimierten Patienten gezeigt werden. Mäuse, bei denen die Lymphozyten depletiert wurden, konnten vor einer Infektion mit MCMV geschützt werden, indem ihnen spezifische CD8 T-Zellen transferiert wurden (Reddehase *et al.*, 1985). Auch bei immunsupprimierten Knochenmarkstransplantations (KMT)- oder Stammzelltransplantations-Empfängern führte der adoptive Transfer CMV-spezifischer CD8 T-Zelllinien zur Rekonstitution der antiviralen zellulären Immunität und zum Schutz vor schweren HCMV-Erkrankungen

(Cobbold *et al.*, 2005; Einsele *et al.*, 2002; Hill *et al.*, 2010; Peggs *et al.*, 2003; Riddell *et al.*, 1992; Walter *et al.*, 1995).

Trotz der über 160 Gene von HCMV waren zunächst nur wenige CD8 T-Zell Antigene bekannt. Von besonderer Bedeutung war hierbei das Tegumentprotein pp65 (Boppana and Britt, 1996; Laughlin-Taylor *et al.*, 1994; Wills *et al.*, 1996). Dieses Protein stellt das mit Abstand am besten untersuchte CTL-Antigen von HCMV dar und viele CD8 T-Zell Epitope unterschiedlicher HLA-Restriktion innerhalb des Proteins konnten identifiziert werden (zusammengefasst in (Reddehase, 2002)). In neuesten Studien konnte ein weiteres CD8 und CD4 T-Zell Epitop charakterisiert werden (Provenzano *et al.*, 2009). Aufgrund seiner hohen Antigenität wären Mutation oder Deletion dieser Epitope für das Virus von Vorteil. Die Sequenz von pp65 ist jedoch in den Laborstämmen und in klinischen Isolaten konserviert (Dolan *et al.*, 2004; Pande *et al.*, 1991). pp65-negative Virusisolate sind bislang nicht beobachtet worden. Daher wird die Detektion von pp65 als diagnostischer Marker einer akuten HCMV-Infektion bei Transplantat-Empfängern verwendet (Grefte *et al.*, 1992a; Grefte *et al.*, 1992b).

Das Protein wird durch den Leserahmen UL83 kodiert. Es besitzt eine Masse von 65 kDa und bildet eines der Hauptbestandteile des Teguments sowohl in Virionen als auch in DB (Varnum *et al.*, 2004). Trotz seines abundanten Vorkommens in viralen Partikeln scheint das Fehlen von pp65 keinen Einfluss auf die virale Replikation in Fibroblastenkultur zu besitzen (Schmolke *et al.*, 1995b). In neuesten Studien konnte jedoch gezeigt werden, dass eine pp65 Stopmutante eine verminderte virale Replikation in Makrophagen aufweist (Chevillotte *et al.*, 2009). In einer weiteren Studie mit einem analogen Virus konnte außerdem nachgewiesen werden, dass diese Mutante eine verringerte Transkription des *major immediate-early* Promoters zeigt (Cristea *et al.*, 2010). Exprimiert wird das Protein, wie die meisten viralen Strukturproteine, im Verlauf der Infektion zu späten Zeitpunkten. Nach der Penetration der infizierten Zelle wird pp65 aufgrund seiner NLS in den Zellkern transportiert (Gallina *et al.*, 1996; Schmolke *et al.*, 1995a). Zu späten Zeitpunkten einer HCMV-Infektion findet sich pp65 jedoch im Wesentlichen im Zytoplasma und ist dort in kernnahen Strukturen nachweisbar (Sanchez *et al.*, 2000a). Frühere Studien zeigten, dass mit dem Tegumentprotein pp65 eine Serin-Threonin Kinase Aktivität verbunden ist (Britt and Auger, 1986; Somogyi *et al.*, 1990). Nachfolgende Untersuchungen konnten eine Interaktion zwischen pp65 und der zellulären Polo-like Kinase 1 (Plk-1) (Gallina *et al.*, 1999) und der viralen pUL97 Kinase (Kamil and Coen, 2007) aufzeigen. Bei beiden handelt es sich um Serin-Threonin Kinasen. Kürzlich konnte außerdem das

Tegumentprotein pUL69 als Interaktionspartner von pp65 identifiziert werden (Chevillotte *et al.*, 2009). pUL69 verfügt über Charakteristika viraler mRNA-Exportfaktoren und ist somit in der Lage, RNA zu binden, zwischen Kern und Zytoplasma zu wandern und so ungespaltete, virale RNA zu exportieren (Chevillotte *et al.*, 2009; Lischka *et al.*, 2001; Lischka *et al.*, 2006; Toth and Stamminger, 2008). In neuesten Studien wurden zusätzlich Mitglieder der ILI16 Familie als Interaktionspartner von pp65 bestimmt (Cristea *et al.*, 2010). Während einer HCMV-Infektion rekrutiert pp65 ILI16 zu dem IE-Promoter. Die Bindung von ILI16 an den Promotor ist dabei abhängig von der Gegenwart von pp65. Obwohl bereits einige Interaktionspartner von pp65 identifiziert werden konnten, ist die genaue Funktion von pp65 selbst während der HCMV-Infektion nicht bekannt. Es gibt lediglich Hinweise, dass pp65 die antivirale Immunantwort durch Hemmung der Induktion der antiviralen Interferon-Antwort unterdrückt (Browne and Shenk, 2003), die NK-Zell-Zytotoxizität inhibiert (Arnon *et al.*, 2005) und selektiv die IE1-Präsentation verhindert (Gilbert *et al.*, 1993; Gilbert *et al.*, 1996).

Neben dem Tegumentprotein pp65 stellt auch das regulatorische *major immediate early* Protein IE1 eine wichtige Zielstruktur der CTL-Antwort dar. In zahlreichen Studien konnten bei HCMV-seropositiven Spendern pp65- und/oder IE1-spezifische CTL-Antworten detektiert werden, die in Frequenz und Prävalenz miteinander vergleichbar waren (Gyulai *et al.*, 2000; Kern *et al.*, 1999; Khan *et al.*, 2002). Das IE1-Protein wird zu allen Zeitpunkten einer HCMV-Infektion exprimiert. Die stärkste Expression ist jedoch zu sehr frühen Phasen der Infektion zu detektieren (Stamminger *et al.*, 1991). Kodiert wird das nukleäre Phosphoprotein von den Exonen zwei bis vier der *major immediate early*-Region und besitzt eine Masse von 72 kDa. Neben IE2 stellt IE1 den wichtigsten viralen Transaktivator der frühen und späten viralen Genexpression dar (Greaves and Mocarski, 1998).

Aufgrund neuerer Analysen musste die Vorstellung, dass die CTL-Antwort gegen nur wenige der HCMV Proteine gerichtet ist, verlassen werden. Es konnte gezeigt werden, dass bei HCMV-seropositiven Spendern CD8 T-Zellen gegen ein breites Spektrum an viralen Proteinen nachweisbar sind (Elkington *et al.*, 2003; Sylwester *et al.*, 2005). Trotzdem stellen pp65 und IE1 nach wie vor die wichtigsten CTL-Zielstrukturen im Rahmen der HCMV-Infektion dar. Ein Indiz hierfür ist die Erkenntnis, dass durch den adoptiven Transfer von pp65- und IE1-spezifischen CTL die Viruslast im Blut infizierter Transplantatempfänger deutlich reduziert werden kann (Cobbold *et al.*, 2005; Nguyen *et al.*, 2010).

1.2.1.2 CD4 T-Zellen

Eine effiziente Erkennung infizierter Zellen durch CD8 T-Zellen benötigt CD4 T-Zellhilfe. Nur durch das Zusammenspiel beider Lymphozytenfraktionen ist eine effektivere Kontrolle einer HCMV-Infektion möglich (Reusser *et al.*, 1991; Walter *et al.*, 1995). Aufgrund einer verzögerten CD4 T-Zell Antwort kann es zum Auftreten klinischer Symptome einer HCMV-Erkrankung kommen (Gamadia *et al.*, 2004; Lilleri *et al.*, 2007). Als Antigene zur Induktion einer CD4 T-Zell Antwort konnten zunächst die Tegumentproteine pp65 und pUL69, die Glykoproteine gB und gH, sowie die regulatorischen Proteine IE1 und IE2 identifiziert werden (Beninga *et al.*, 1995). Aber auch bei der CD4 T-Zell Antwort konnten wie bei der CD8 T-Zell Antwort durch neuere Analysen weitere Antigene zur Induktion identifiziert werden (Sylwester *et al.*, 2005).

1.2.2 Die humorale Immunantwort

Die Induktion virusspezifischer Antikörper trägt zur Eindämmung der Virusausbreitung und zum Schutz vor Sekundärinfektionen bei. Im Tiermodell mit MCMV konnte dieses bereits nachgewiesen werden (Jonjic *et al.*, 1994; Rapp *et al.*, 1993; Reddehase *et al.*, 1994). Bei KMT-Patienten konnte gezeigt werden, dass hohe Titer neutralisierender Antikörper einen Schutz vor einer schweren HCMV-assoziierten Erkrankung bewirken können (Schoppel *et al.*, 1998). Außerdem reduzieren sie die Häufigkeit von Sekundärinfektionen bei Müttern im gebärfähigen Alter (Adler *et al.*, 1995). Yeager und Kollegen konnten bereits 1981 zeigen, dass Antikörper, die von seropositiven Müttern auf ihre Kinder übertragen worden waren, die Kinder vor über Bluttransfusionen vermittelte HCMV-Infektionen schützten (Yeager *et al.*, 1981). Auch in neueren Studien konnte beobachtet werden, dass das Risiko einer kongenitalen CMV-Infektion und -Erkrankung durch die Behandlung schwangerer Frauen mit HCMV-spezifischen Immunglobulinen reduziert werden kann (Nigro *et al.*, 2005).

Die antigenen Zielstrukturen für neutralisierende Antikörper sind bisher nur unzureichend charakterisiert. Bei der Verwendung von Fibroblasten bei der Identifizierung von Antigenen sind 40-70% der neutralisierenden Antikörper gegen das Glykoprotein gB gerichtet (Britt *et al.*, 1990). In anderen Studien konnten jedoch auch die Glykoproteine gH und gM/gN als Antigene neutralisierender Antikörper identifiziert werden (Funaro *et al.*, 2008; Kniess *et al.*, 1991; Masuho *et al.*, 1987; Rasmussen *et al.*, 1991; Shimamura *et al.*, 2006).

Gerna und Kollegen konnten in aktuellen Studien zeigen, dass neutralisierende Antikörper im Vergleich zu einer Infektion von Fibroblasten eine stärkere Wirkung auf den Schutz einer Infektion von Epithelzellen besitzen (Gerna *et al.*, 2008). Außerdem wurde beobachtet, dass CMV-Hyperimmunglobuline eine höhere neutralisierende Wirkung auf die Viruspenetration in Epithelzellen besitzt als in Fibroblasten (Cui *et al.*, 2008). Für diesen Vorgang spielt der Proteinkomplex gH/gL/UL128-131A eine wichtige Rolle (Kapitel 1.1.2).

1.3 Antivirale Therapie

Die derzeit verfügbaren Medikamente gegen HCMV-Infektionen sind nur eingeschränkt wirksam, gleichzeitig aber mit erheblichen Nebenwirkungen belastet. Derzeit stehen fünf zugelassene Wirkstoffe zur Behandlung einer akuten Infektion zur Verfügung: (i) Ganciclovir (GCV), (ii) Valganciclovir (ValGCV), (iii) Cidofovir (CDV), (iv) Foscarnet (FOS) und (v) Fomivirsen (Steininger, 2007).

Das Nukleosidanalogen GCV ist zusammen mit dem GCV Derivat ValGCV das Standardmedikament zur Behandlung einer HCMV-Erkrankung. Sowohl GCV als auch ValGCV hemmen die virale DNA Polymerase. Sie sind somit geeignet, die Replikation des Virus zu hemmen. Beide Wirkstoffe müssen für die kompetitive Inhibierung der viralen DNA Polymerase phosphoryliert werden. Bei der Modifikation spielt vor allem die virale Kinase pUL97 eine wichtige Rolle (Sullivan *et al.*, 1992).

Neben den Standardmedikamenten stehen noch weitere Präparate zur Behandlung einer HCMV-Infektion zur Verfügung. CDV ist ebenfalls ein Nukleosidanalogen, das die virale DNA Polymerase hemmt. Im Gegensatz dazu ist FOS in der Lage, direkt an Pyrophosphat-Bindungsstellen in pUL54 zu binden, die Eliminierung von Pyrophosphat Deoxynukleoside Triphosphate zu blockieren und somit die virale DNA Synthese zu inhibieren (Oberg, 1982; Oberg, 1989). Fomivirsen nutzt als einziger Wirkstoff als Zielstruktur die Translation der CMV IE-Proteine. Durch Bindung an komplementäre mRNA Sequenzen dieser Proteine ist Fomivirsen in der Lage, die Translation der IE-Produkte von HCMV zu inhibieren und somit einen Beginn der viralen Replikation zu unterbinden (Anderson *et al.*, 1996; Perry and Balfour, 1999). Aufgrund der erheblichen Nebenwirkungen ist eine Langzeit-Behandlung mit diesen Wirkstoffen jedoch nicht möglich.

Durch die antivirale Therapie konnte bei vielen Transplantations- und AIDS-Patienten das Ausmaß an HCMV-bedingten Erkrankungen deutlich begrenzt werden (Biron,

2006). Bei kongenitalen HCMV-Erkrankungen konnte bisher jedoch kein Einfluss einer antiviralen Therapie auf den Verlauf der Erkrankung festgestellt werden (Ornoy and Diav-Citrin, 2006).

Aufgrund der verstärkt auftretenden Nebenwirkungen der lizenzierten Medikamente ist eine Entwicklung neuerer Wirkstoffe von größter Bedeutung. Ein Ansatz stellte der Wirkstoff Maribavir dar, der zu der Gruppe der Benzimidazole gehört. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass Maribavir in der Lage ist, die HCMV DNA Synthese und den *Nuclear egress* zu inhibieren (Krosky *et al.*, 2003). Maribavir wurde bereits in klinischen Studien der Phase I und Phase II getestet und zeigte vielversprechende Ergebnisse (Koszalka *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 2006; Selleseth *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003). Jedoch konnten in den klinischen Studien der Phase III diese Ergebnisse nicht erzielt werden. Bei Stammzelltransplantations-Patienten konnte durch die Behandlung mit Maribavir kein Unterschied in der Infektion mit HCMV im Vergleich zu der Placebo-Gruppe beobachtet werden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden klinische Studien der Phase III an Leber-Transplantat-Empfängern eingestellt (www.viropharma.com; www.drugs.com).

Ein weiterer Ansatzpunkt für die antivirale Therapie stellen Artesunate dar. Artesunat ist ein vom Artemisinin abgeleiteter halbsynthetischer Arzneistoff. Dieser wurde zunächst für die Behandlung der durch *Plasmodium falciparum* verursachten Malaria verwendet. Studien in den letzten Jahren konnten jedoch zeigen, dass Artesunat in der Lage ist, die virale Replikation einer Vielzahl von Viren, wie HCMV, HSV-1 und EBV, zu inhibieren (Efferth *et al.*, 2002; Jansen and Soomro, 2007; Kaptein *et al.*, 2006; Milbradt *et al.*, 2009a; Shapira *et al.*, 2008). Arav-Boger und Kollegen konnten außerdem zeigen, dass die Verwendung von Artesunat-Dimeren im Vergleich zu -Monomeren einen Vorteil bei der antiviralen Therapie von HCMV darstellen können (Arav-Boger *et al.*, 2010).

1.4 Impfstoffentwicklung

Die Entwicklung eines Impfstoffes zur Prävention kongenitaler HCMV-Infektionen wurde 1999 vom *Institut of Medicine* der *National Academy of Sciences* als Ziel mit höchster Priorität eingestuft (Stratton *et al.*, 2001). Bis heute steht jedoch noch kein zugelassener Impfstoff zur Verfügung. Eine erfolgreiche HCMV-Vakzine sollte in optimaler Weise sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunantwort des adaptiven Immunsystems ansprechen, da beide für die Prävention einer HCMV-

Infektion von entscheidender Bedeutung sind. Ein weiteres Problem bei der Etablierung eines Impfstoffes stellt die Tatsache dar, dass dieser die unterschiedlichen Situationen einer HCMV-Erkrankung nach Transplantation bzw. einer kongenitalen Infektion gleichermaßen berücksichtigen sollte. Dies erweist sich jedoch als überaus schwierig und komplex (Khanna and Diamond, 2006).

1.4.1 HCMV-Impfstoffe in klinischen Studien

1.4.1.1 Attenuierte Viren

Die ersten Versuche zur Entwicklung eines Impfstoffes gegen HCMV wurden in den 70er Jahren mit lebend attenuierten Viren durchgeführt (zusammengefasst in (Plotkin, 2001; Schleiss and Heineman, 2005)). Die Immunisierung von Erwachsenen mit dem Laborstamm Ad169 war geeignet, die Entwicklung von neutralisierenden Antikörpern sowie von virusspezifischen CD8 und CD4 T-Zellen zu stimulieren (Elek and Stern, 1974). Weitere Untersuchungen zur Bestimmung der Persistenz der induzierten Immunität sowie der Wirksamkeit der Vermeidung einer Erkrankung wurden jedoch nicht durchgeführt. Plotkin und Kollegen isolierten aus einem kongenital infizierten Kind den Stamm *Towne* und nutzten diesen für weitere Untersuchungen (Just *et al.*, 1975; Plotkin *et al.*, 1975; Plotkin *et al.*, 1976; Plotkin and Huygelen, 1977). Die *Towne*-Vakzine war ebenfalls geeignet, sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunantwort anzusprechen. Die Intensität der Immunantwort war jedoch schwächer als bei einer natürlichen Infektion (Starr *et al.*, 1981). Aufgrund von verschiedenen Studien an Nierentransplantat-Empfängern konnte gezeigt werden, dass durch eine Impfung mit dem *Towne*-Stamm eine Infektion des Patienten zwar nicht verhindert, jedoch die Schwere der Erkrankung positiv beeinflusst werden konnte (Plotkin *et al.*, 1994). Die Wirksamkeit der *Towne*-Vakzine wurde in einer weiteren Studie mit jungen Müttern untersucht. Dabei stellte sich in verschiedenen Versuchsreihen heraus, dass die Immunisierung von Müttern mit der *Towne*-Vakzine zu einer immunogenen, milden Infektion führt, jedoch nicht den gleichen Schutz wie natürlich erworbene Immunität vermitteln konnte (Plotkin, 1999).

Ein Ansatz zur Verbesserung der Immunogenität der *Towne*-Vakzine stellt die genetische Veränderung des Stammes dar. Der Impfstamm *Towne* besitzt im Vergleich zu dem Wildtypisolat *Toledo* eine genomische Deletion von 13 kB. Diese Region kodiert für 19 Proteine. Chimere aus den Stämmen *Towne* und *Toledo* wurden zunächst auf ihre Virulenz und Immunogenität im Vergleich zu den Ausgangsstämmen

untersucht (Mocarski and Kemble, 1996). Bisher wurden vier unabhängige chimere Vakzine generiert und in randomisierten, kontrollierten Doppelt-Blind-Studien getestet (Heineman *et al.*, 2006). Alle Chimere zeigten eine gute Verträglichkeit und der Impfstamm wurde von den Patienten nicht ausgeschieden.

1.4.1.2 **Subunit Impfstoff**

gB (gpUL55) Impfstoffe

Neutralisierende Antikörper sind im Rahmen der HCMV-Infektion insbesondere gegen Glykoproteine gerichtet. Diese befinden sich in der äußeren Membran des Viruspartikels. Der Glykoproteinkomplex I, der aus dem Glykoprotein gB besteht, ist dabei am besten charakterisiert und von großem Interesse bei der Entwicklung eines *Subunit* Impfstoffes gegen HCMV. In den Seren von seropositiven Patienten konnten bis zu 70% neutralisierende Antikörper nachgewiesen werden, die gegen gB gerichtet sind (Britt *et al.*, 1990).

Ein Ansatz für die Entwicklung eines *Subunit* Impfstoffes, basierend auf gB, ist die Expression von gB in Hamsterzellen (*Chinese Hamster Ovary*, CHO). In dem hierfür verwendeten Konstrukt wurde die Transmembrandomäne sowie die proteolytische Schnittstelle am 3'Ende von gB deletiert. Hierdurch wird die Freisetzung des rekombinanten Proteins in den Zellkulturüberstand erreicht (Spaete, 1991). Das aufgereinigte Protein wurde in verschiedenen Studien zusammen mit einem Adjuvans (MF59; Alaun) intramuskulär verabreicht und auf seine Verträglichkeit, Immunogenität und Wirksamkeit getestet (Frey *et al.*, 1999; Mitchell *et al.*, 2002; Pass *et al.*, 1999). In allen Analysen wurde der Impfstoff gut vertragen. Als Nebenwirkungen traten allenfalls Beschwerden an der Einstichstelle auf. In neuesten klinischen Studien der Phase II konnte gezeigt werden, dass durch eine Vakzine, basierend auf dem Glykoprotein gB, das Risiko der Infektion der Mutter um 50% reduziert werden konnte (Pass *et al.*, 2009). Dabei wiesen die Ergebnisse dieser Studie jedoch keine statistische Signifikanz auf. Eine vergleichbare Reduktion des Risikos einer HCMV-Infektion kann bereits durch intensiveres Händewaschen und weitere Hygienemaßnahmen erzielt werden (Cannon and Davis, 2005).

Eine andere Alternative stellt ein rekombinantes gB Protein dar, das mittels eines Kanarienvogel-Pockenvirus-Vektors (*Canarypox* Vektor, ALVAC) exprimiert wird. Jedoch wurden durch die Impfung mit dem *Canarypox*-gB nur geringe Antikörper-Titer induziert. In anschließenden Studien wurde getestet, ob durch ein *Priming* mit dem

Canarypox-gB und durch ein anschließendes *Boosting* mit dem attenuierten *Towne* Stamm eine verstärkte Induktion des Antikörpertiters erreicht werden kann (Adler *et al.*, 1999). Die untersuchten Patienten entwickelten hohe Titer an neutralisierenden Antikörpern, die vergleichbar mit denen von seropositiven Personen waren. Derzeit liegen jedoch keine Daten aus klinischen Studien vor.

Für die Expression von gB wurde außerdem ein α -Virus Replikationssystem verwendet. Mit Hilfe dieses Ansatzes werden virus-ähnliche Replikon-Partikel (*virus-like replicon particles*, VRPs) gebildet, die auf dem attenuierten Venezolanischen Pferdeenzephalomyelitis (*Venezuelan Equine Encephalitis*, VEE) Expressionssystem basieren. Zu den Vorteilen der VRPs zählen eine hohe Expressionsrate des heterologen Proteins und die Induktion sowohl der humoralen als auch der zellulären Immunantwort. In ersten Studien konnte bereits gezeigt werden, dass durch eine Immunisierung von Balb/c Mäusen mit VRPs, die gB exprimieren, ein hoher Titer an neutralisierenden Antikörpern erreicht werden kann (Reap *et al.*, 2007). Der Nachweis eines Schutzes vor einer HCMV-Erkrankung in klinischen Studien steht jedoch noch aus.

Eine weitere Möglichkeit zur Expression stellt eine DNA Vakzination dar. Im Tiermodell konnte bereits gezeigt werden, dass durch Verabreichung des HCMV-gB-DNA Impfstoffes neutralisierende Antikörper induziert werden konnten (Endresz *et al.*, 1999). Klinische Studien beim Menschen werden derzeit durchgeführt. Eine mögliche Gefahr durch Insertionsmutagenese stellt jedoch die Verwendung einer DNA Vakzine in Frage.

pp65 (ppUL83) Impfstoffe

Das Tegumentprotein pp65 stellt eines der Hauptantigene für die zelluläre Immunantwort gegen HCMV dar (Kapitel 1.2.1.1). Daher spielt es auch bei der Entwicklung eines Impfstoffes gegen HCMV eine entscheidende Rolle. Viele Strategien, die zur Expression von gB verwendet werden, kommen auch bei pp65 zum Einsatz. Durch die Immunisierung von seronegativen Erwachsenen mit ALVAC/pp65 konnte eine HCMV-spezifische CD8 T-Zell Antwort stimuliert werden (Berencsi *et al.*, 2001). Ein α -Virus/VRP Impfstoff, basierend auf pp65, wurde analog zu gB getestet (Reap *et al.*, 2007). Durch die Immunisierung mit diesem Impfstoff konnte ebenfalls eine CD8 T-Zell Antwort induziert werden. Vergleichbar zu gB werden auch DNA basierende DNA-Vakzine Kandidaten mit pp65 getestet. In einer klinischen Studie der

Phase I, bei der gB und pp65 für die Immunisierung verwendet wurden, konnte gezeigt werden, dass diese gut verträglich und sicher sind (Evans *et al.*, 2004).

1.4.2 Impfstoffe in der präklinischen Entwicklungsphase

1.4.2.1 Alternative Expressionsstrategien für gB, pp65 und IE1

Zusätzlich zu den in Kapitel 1.4.1.2 beschriebenen Möglichkeiten zur Expression von viralen Proteinen gibt es noch weitere Strategien, die in präklinischen Studien analysiert wurden. Ein Ansatz stellt die Expression von HCMV Proteinen durch das modifizierte Vaccinia Virus Ankara (MVA) dar. Ein MVA Konstrukt, welches eine lösliche Form von gB exprimiert, wurde an Mäusen getestet (Wang *et al.*, 2004). Die Immunisierung mit diesem MVA war geeignet, im Versuchstier gB spezifische, neutralisierende Antikörper zu induzieren. Wang und Kollegen haben ebenfalls ein rekombinantes MVA generiert, das gB, pp65 und IE1 exprimiert (Wang *et al.*, 2006). Sowohl die zelluläre als auch die humorale Immunantwort konnte durch die Immunisierung von Mäusen mit diesem Konstrukt stimuliert werden. Ein weiterer Ansatz stellte die Verwendung eines rekombinanten Adenovirus Vektors zur Expression viraler Proteine dar. In einer aktuellen Studie wurde ein Vektor verwendet, der für die extrazelluläre Domäne von gB kodiert sowie für viele HLA Klasse I und II Epitope von HCMV. Durch Immunisierung mit diesem Vektor konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass eine humorale und zelluläre Immunantwort induziert werden kann (Zhong *et al.*, 2008; Zhong and Khanna, 2009).

1.4.2.2 Dense Body Vakzine

Die Entwicklung eines Impfstoffes gegen HCMV, der auf subviralen DB basiert, stellt eine weitere Möglichkeit der Vakzineentwicklung dar (Mersseman, 2007; Mersseman *et al.*, 2008a; Mersseman *et al.*, 2008b; Pepperl *et al.*, 2000). Die genaue Funktion von DB, die während der viralen Replikation von HCMV in Zellkultur produziert werden, ist bisher nicht bekannt (Craighead *et al.*, 1972; Irmiere and Gibson, 1983). Sie werden in großer Anzahl in den Zellkulturüberstand freigesetzt und können daraus durch Gradienten-Ultrazentrifugation aufgereinigt werden. DB sind in der Lage über Membranfusion in verschiedene Zellen einzudringen (Bodaghi *et al.*, 1999; Pepperl *et al.*, 2000; Topilko and Michelson, 1994). Analysen der Zusammensetzung von DB zeigten, dass überwiegend Tegumentproteine wie pp65, pUL25, pp150 und pp71 in diesen Strukturen enthalten sind, wobei pp65 den Hauptbestandteil bildet (Varnum *et*

al., 2004). Außerdem konnten die Glykoproteine gM, gH und gB des HCMV in DB in diesen Analysen nachgewiesen werden. DB enthalten somit wichtige Zielantigene sowohl der zellulären als auch der humoralen Immunantwort gegen HCMV. Die Immunisierung von Mäusen mit DB führte zur Synthese von neutralisierenden Antikörpern, sowie zur Induktion einer deutlichen CD8 und CD4 T-Zell Antwort (Pepperl *et al.*, 2000). In einer neueren Studie konnte gezeigt werden, dass durch die Insertion eines IE1 Epitopes in den Leserahmen von pp65 ein heterologes Fusionsprotein entsteht, das in rekombinante DB verpackt werden kann und eine spezifische CD8 T-Zell Antwort in Mäusen induziert (Mersseman *et al.*, 2008a; Mersseman *et al.*, 2008b).

1.5 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Trotz der zahlreichen Versuche, eine Vakzine gegen HCMV zu entwickeln, steht bislang kein Impfstoff zur Verfügung. Die Verwendung von subviralen DB des Virus als Vakzinegrundlage stellt eine vielversprechende Alternative zu den bislang verfolgten Strategien zur HCMV-Impfstoffentwicklung dar (Kapitel 1.4.2.2). Die Partikel enthalten wichtige Antigene zur Induktion von Immunität gegen HCMV. Dazu gehören die viralen Hüllproteine sowie das Tegumentprotein pp65. Einzelne, als immundominant identifizierte Proteine des Virus, fehlen jedoch. Hierzu zählt das regulatorische IE1-Protein, eines der dominanten Antigene der CD8 T-Zell Antwort gegen HCMV. Aufgrund der Fokussierung auf pp65 als CTL Zielantigen wurde dem IE1 zunächst keine große Aufmerksamkeit geschenkt. In verschiedenen Studien konnte jedoch mittlerweile gezeigt werden, dass dieses Protein eine wichtige Rolle bei der HCMV-spezifischen Immunantwort spielt. Für die Entwicklung eines Impfstoffes gegen HCMV auf der Basis von DB wird es daher als wichtig erachtet, auch antigene Strukturen des IE1 in DB zu verpacken. Eine Strategie, dieses Ziel zu erreichen, stellt die Insertion von Teilen des IE1 in pp65 und die Expression dieses Fusionsproteins durch ein rekombinantes HCMV dar. In vorangegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe konnte der Beweis der Machbarkeit dieses Ansatzes erbracht werden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Ansatz der Verwendung modifizierter DB als Impfstoff-Grundlage weiterzuentwickeln und die für die Benennung eines Impfstoff-Kandidaten notwendigen Erkenntnisse zu erarbeiten. Hierzu sollten eine oder mehrere Insertionsstellen in pp65 definiert werden, die eine effiziente Synthese und Verpackung des resultierenden Fusionsproteins in infizierten Fibroblasten, sowie seine Verpackung in modifizierte DB und deren Freisetzung zuließen. Die daraus entwickelten, modifizierten DB sollten

hinsichtlich ihrer Immunogenität im Mausmodell getestet werden. Aus den Ergebnissen dieser Untersuchungen sollte eine Modellstrategie zur schlussendlichen Formulierung eines Vakzinekandidaten entwickelt werden.

Parallel hierzu sollte die Morphogenese von DB in der infizierten Zelle näher beleuchtet werden. Ziel war hier, Erkenntnisse zu sammeln, die zur Optimierung der Herstellungsprozedur von DB beitragen können. Die Expression des pp65 ist für die Bildung von DB unabdingbar. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher zunächst die Rolle von pp65 bei der Partikelmorphogenese analysiert werden. Grundlage für diese Untersuchungen war eine Virusmutante, deren Vermehrungsfähigkeit in Zellkultur aufgrund der Insertion des heterologen IE1-Peptids an Position Arg387 unerwartet stark eingeschränkt ist. Hypothese war es, dass die Untersuchung dieser Mutante Aufschlüsse über die Funktion des pp65 im Rahmen der Virusmorphogenese zulassen würde.

2 Material und Methoden

2.1 Allgemeine Laborgeräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Analysenwaage	BP61	Sartorius, Göttingen
Binokular	SZX-12	Olympus, Hamburg
Brutschrank	B12	Heraeus, Hanau
CO ₂ -Inkubator	Steri-Cult 200 Incubator	Forma Scientific, Egelsbach
Digitalkameras	Power Shot G5	Canon Deutschland, Krefeld
	Spot Flex	Diagnostic instruments. inc., Sterling Heights, Michigan (USA)
Elektroblot-Apparatur	Trocken-Blotter	Hülzel, Wörth/Hörlkofen
Elektroporations-Apparatur	Gene Pulser II	Bio-Rad, München
Fluoreszenzmikroskope	Axiophot	Zeiss, Jena
	DM IRB	Leitz, Wetzlar
Folienschweißgerät	Polystar 583	Rische & Herforth, Hamburg
Gelapparaturen	DNA-Gelelektrophorese	Keutz, Reiskirchen
	Protein-Gelelektrophorese	Hoefler/Pharmacia Biotech, Freiburg
Heizrührer	RCT BASIC	IKA-Labortechnik, Staufen
Heizschüttler	Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
	MAG HS7	IKA-Labortechnik, Staufen
Laborwaage	LP5200P	Sartorius, Göttingen
Laserscanning-Mikroskop	LSM-510	Zeiss, Jena
MACS <i>Multistand</i>		Miltenyi Biotech, Bergisch Galdbach
Mehrkanalpipetten	20-200 µl, Discovers	ABIMED, Langenfeld
	30-300 µl, Reasearch Plus	Eppendorf, Hamburg
Mikrowelle	M1712N	Samsung, Schwalbach/Ts.
Mikroskop	Axiovert 25	Zeiss, Jena

Netzgerät	Elektrophoresis Power Supply 600	Pharmacia Biotech, Freiburg
PCR-Cycler	<i>Tpersonal</i>	Biometra, Göttingen
pH-Meter	CG 842	Schott, Mainz
Photometer	Ultrospec III	Pharmacia Biotech, Freiburg
	Bio Photometer	Eppendorf, Hamburg
	Multiskan EX	Thermo, Vantaa (F)
	(96-Well-Platten Reader)	PeqLab, Erlangen
	Nanodrop ND-100	
Pipette, programmierbar	50-1000 µl, Research Pro	Eppendorf, Hamburg
Pipetten, verstellbar	10, 20, 200, 1000 µl	Gilson, Langenfeld
Pipettierhilfe	Pipetboy acu	Integra Biosciences, Fernwald
Real-Time PCR Cycler	Abi Prism 7700 Sequence Detector	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
Schüttelinkubator	Cellstar	Nunc, Wiesbaden
Schüttelwasserbad	OLS 200	Grant, Cambridge (GB)
Schüttler	HS501 digita	IKA-Labortechnik, Staufen
	MaxQ 4000I	Thermo Scientific, Schwerte
Sonificator	Branson Sonifier 250	Heinemann, Schwäbisch Gmünd
Sterilbank	Herasafe	Heraeus, Hanau
Ultrazentrifuge	Sorvall Combi Plus	Sorvall, Hanau
	Optima™ L-90K	Beckmann Coulter, Krefeld
	Ultrazentrifuge	
UV Lampe	NU-4 KL	Konrad Benda, Wiesloch
Vakuumpumpe		KNF Neuberger, Freiburg
Vortex	MS1 Minishaker	IKA-Labortechnik, Staufen
Wasserbad mit Thermostat		Memmert, Schwabach
Zentrifugen	Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
	Tischzentrifuge 5417C	Eppendorf, Hamburg
	Megafuge 2.0	Heraeus, Hanau
	RC5C Plus (Rotoren)	Sorvall, Hanau
	SLA1500, SS34)	

2.2 Chemikalien

Die eingesetzten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma (Deisenhofen) bezogen. Alle Lösungen und Puffer wurden in autoklaviertem, bidestilliertem Wasser angesetzt.

2.3 Kultivierung von Bakterien

2.3.1 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	T _{opt.}	Literatur
<i>E. coli</i> DH10B	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr</i> - <i>hsdRMS</i> - <i>mcrBC</i>) φ 80 <i>dlacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74</i> <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>araD139</i> Δ(<i>ara</i> , <i>leu</i>) 7649 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rspL</i> <i>nupG</i>	37°C	(Grant <i>et al.</i> , 1990)
XL10-Gold®	Tet ^R Δ(<i>mcrA</i>)183 Δ(<i>mcrCB</i> - <i>hsdSMR</i> - <i>mrr</i>)173 <i>endA1</i> <i>supE44</i> <i>thi-1</i> <i>recA1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i> <i>lac</i> Hte [F' <i>proAB</i> <i>lac</i> ^f Z ΔM15 Tn10 (Tet ^R) Amy Cam ^R]	37°C	Stratagene, Amsterdam (NL)
<i>E. coli</i> SW102	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr</i> - <i>hsdRMS</i> - <i>mcrBC</i>) Φ80 <i>dlacZ</i> DM15 Δ <i>lacX74</i> <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>araD139</i> Δ(<i>ara</i> , <i>leu</i>)7649 <i>gal</i> ⁺ <i>galU</i> Δ <i>galK</i> <i>rspL</i> <i>nupG</i> Δ <i>cl857</i> (<i>cro</i> - <i>bioA</i>) < > Tet (<i>cro</i> - <i>bioA</i>) < > Tet indicates substitution of <i>cro</i> - <i>bioA</i> with <i>tet</i> .	32°C	(Warming <i>et al.</i> , 2005)

2.3.2 Medien und Medienzusätze

2.3.2.1 Medien

Luria Bertani (LB) – Medium 1x

10 g Trypton; 5 g Hefe-Extrakt; 5 g NaCl in 1 Liter H₂O; pH-Wert mit NaOH auf 7,5 eingestellt und autoklaviert

LB - Agarplatten

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

Die Zugabe von Antibiotika erfolgte nach dem Autoklavieren und Abkühlen der Lösung auf 50 bis 60°C.

M9 – Medium 1x

6 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 3 g KH_2PO_4 , 1 g NH_4Cl , 0,5 g NaCl , in 1 Liter H_2O gelöst und autoklaviert

M63 - Minimalmedium 5x

10 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 68 g KH_2PO_4 , 2,5 mg $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, in 1 Liter H_2O gelöst, pH-Wert mit NaOH auf 7 eingestellt und unter Vacuum sterilfiltriert (0,2 μm).

M63 – Agarplatten

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

Die Zugabe von Antibiotika und der Kohlenstoffquelle erfolgte nach dem Autoklavieren und Abkühlen der Lösung auf 50 bis 60°C.

MacConkey Agar

Der MacConkey Agar wurde nach Angaben des Herstellers (Becton Dickinson, Heidelberg) hergestellt und verwendet.

Einfriermedium

LB-Medium mit 30% Glycerin

2.3.2.2 Medienzusätze**Ampicillin**

Stock 75 mg/ml in H_2O , sterilisiert, Endkonzentration 75 $\mu\text{g/ml}$

Chloramphenicol

Stock 25 mg/ml in 100% Ethanol, Endkonzentration 12,5 $\mu\text{g/ml}$

d-Biotin

Stock 0,2 mg/ml d-Biotin in H_2O , sterilfiltriert, Endkonzentration 1 mg/ml

Galactose

Stock 20% Galactose in H_2O , sterilfiltriert, Endkonzentration 0,2%

2-desoxy-Galactose (DOG)

Stock 20% 2-desoxy-Galactose in H₂O, sterilfiltriert, Endkonzentration 0,2%

Glycerin

Stock 20% Glycerin in H₂O, sterilfiltriert, Endkonzentration 0,2%

L-Leucin

Stock 10 mg/ml L-Leucin in H₂O, sterilfiltriert, Endkonzentration 45 mg/l

Magnesiumsulfat (MgSO₄)

Stock 1 M MgSO₄ in H₂O, autoklaviert, Endkonzentration 1 μM

2.3.3 Kultivierung und Kryokonservierung**2.3.3.1 Flüssigkulturen**

Zur Anzucht von Bakterien wurde steriles Medium in Abhängigkeit des verwendeten Plasmids mit den entsprechenden Antibiotika-Zusätzen supplementiert und mit einer Einzelkolonie angeimpft. Diese Flüssigkultur wurde über Nacht (üN) im Schüttelinkubator mit 200 Umdrehungen pro Minute (*rounds per minute*, rpm) bei 32°C bzw. 37°C inkubiert.

2.3.3.2 Kultivierung auf Agarplatten

Zur Kultivierung von Bakterien auf einer Agarplatte wurden die Bakterien aus einer Glycerinkultur mit einer sterilen Impföse auf einer Agarplatte mit entsprechenden Antibiotika- und Medienzusätzen ausgestrichen und üN bei 32°C bzw. 37°C inkubiert. Für die Herstellung eines Verdünnungsausstriches wurden Einzelkolonien mit einer sterilen Impföse gepickt und mittels Drei-Ösen Ausstrich ausplattiert.

2.3.3.3 Kryokonservierung (Glycerinkulturen)

Bakterien einer LB-Flüssigkultur wurden kurz vor dem Eintritt in die stationäre Wachstumsphase mit 30% sterilem Glycerin versetzt, gut gemischt und anschließend bei -80°C eingefroren.

2.3.3.4 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

200 ml LB-Medium wurde im Verhältnis 1:100 mit einer üN-Kultur der entsprechenden Bakterien angeimpft, bis zur logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600nm} = 0,6$) bei 32°C bzw. 37°C kultiviert und anschließend direkt auf Eis überführt. Nach einer

Inkubation von 15 min auf Eis wurden die Bakterien auf zwei Zentrifugen-Röhrchen aufgeteilt und für 10 min bei 6.000 rpm und 4°C in einer Megafuge 2.0 zentrifugiert. Die Pellets wurden jeweils in 250 µl eiskaltem H₂O resuspendiert, erneut zentrifugiert und anschließend in insgesamt 5 ml Glycerin (10%) resuspendiert und auf Eis zu je 30 µl aliquotiert. Die Aliquots wurden unmittelbar in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

2.3.3.5 Herstellung elektrokompetenter SW102 Bakterien für die BAC-Mutagenese

Zur Herstellung kompetenter *E.coli* SW102 Zellen wurden 50 ml LB-Medium im Verhältnis 1:50 mit einer Übernachtskultur des *E. coli*-Stammes SW102 pHB5 angeimpft und bis zur logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600nm} = 0,6$) bei 32°C kultiviert. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis bzw. bei 4°C durchgeführt. 25 ml der Kultur wurden 15 min einem Hitzeschock unterzogen. Der Rest der Kultur wurde zurück auf 32°C gestellt und geschüttelt. Nach der Inkubationszeit wurden beide Proben – induziert und nicht induziert – umgehend in ein Eiswasserbad gegeben, sorgfältig abgekühlt und jeweils in ein bereits vorgekühltes 50 ml Falcon überführt. Die Kulturen wurden 6 min bei 4.500 rpm und 0°C in einer Megafuge 2.0 zentrifugiert. Die sedimentierten Bakterienzellen wurden anschließend in 1 ml eiskaltem ddH₂O resuspendiert. Nach dem Lösen wurde zusätzlich 19 ml eiskaltes ddH₂O hinzugegeben und es folgte eine weitere Zentrifugation. Dieser Waschschrift wurde ein zweites Mal wiederholt. Nach dem zweiten Waschschrift wurde der Überstand möglichst vollständig entfernt. Das Pellet wurde in der zurückbleibenden Flüssigkeit resuspendiert. Zur Elektroporation wurden die kompetenten SW102 pHB5 Bakterien aliquotiert und auf Eis gelagert.

2.3.3.6 Elektroporation kompetenter *E.coli*

30 µl elektrokompetenter *E.coli* Zellen wurden mit 2 bis 5 µl DNA versetzt und in eine vorgekühlte Küvette überführt. Die Elektroporation wurde mit den Impulsbedingungen 200 Ω, 2,5 kV und 25 µF durchgeführt. Direkt nach der Transformation der DNA wurde 1 ml warmes LB-Medium zu den Bakterien gegeben und der Ansatz für eine Stunde bei 32 bzw. 37°C auf dem Schüttler inkubiert.

2.3.3.7 Elektroporation kompetenter *E.coli* SW102

25 µl elektrokompetente *E.coli* Zellen wurden mit 150 bzw. 300 ng DNA versetzt und in eine vorgekühlte 0,2 cm Küvette überführt. Die Elektroporation wurde mit den Pulsbedingungen 200 Ω, 1,75 kV und 25 µF durchgeführt. Unmittelbar nach der Transformation der DNA wurde 1 ml warmes LB-Medium zu den Bakterien gegeben und der Ansatz für ein bzw. viereinhalb Stunden bei 32°C auf dem Schüttler inkubiert.

2.4 Kultivierung von Säugerzellen

Zur Vermeidung von Kontaminationen mit Pilzsporen und Bakterien wurden sämtliche Arbeiten mit eukaryonten Zellkulturen an einer sterilen Werkbank unter Verwendung von sterilen Glas- und Plastikwaren durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C, einem CO₂-Gehalt von 5% und 95% relativer Luftfeuchtigkeit in der Brutraumatmosfera.

Die Zellen wurden in 25, 75 oder 175 cm² Zellkulturflaschen von BD Falcon (Heidelberg) bzw. Greiner (Frickenhausen) kultiviert. Die sterilen Zellkulturschalen und 6-, 24-, 48- und 96-Well-Platten wurden ebenfalls von BD Falcon bezogen. Zur Kultivierung der T-Zell Klone wurden 24-Well-Platten von Costar Corning (Wiesbaden) verwendet. Sterile Einmalplastikpipetten wurden von der Firma Sarstedt (Nürnbrecht) bezogen.

Soweit es nicht anders angegeben wurde, erfolgte das Pelletieren der Zellen durch Zentrifugation bei Raumtemperatur (RT) in der Megafuge 2.0 für 4 min bei 1.500 rpm.

In regelmäßigen Abständen wurden alle Zellkulturen mit Hilfe des Kits „Venor®GeM-Mykoplasmen-Detektionskit“ von Minerva Biolabs (Berlin) auf mögliche Mykoplasmenkontaminationen hin überprüft. Bei positivem Testergebnis wurden die befallenen Zellen mit der Antibiotika-Kombination BM Cyclin (Roche, Mannheim) nach Herstellerangaben behandelt.

2.4.1 Puffer und Lösungen

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

136 mM NaCl; 26 mM KCl; 8 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM KH₂PO₄

Trypanblau (Sigma, Deisenhofen)

0,4% in 85% Kochsalzlösung

→ 1:4 Verdünnung in PBS (Endkonzentration: 0,1%)

Trypsin/EDTA (PAA, Cölbe)

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

2.4.2 Medien und Medienzusätze

Alle Zellkulturmedien und Medienzusätze wurden, wenn nicht anders angegeben, von PAA (Cölbe) bezogen. Das verwendete fötale Kälberserum (FKS) stammte zu Beginn der vorliegenden Arbeit von der Firma Biochrom (Berlin) und wurde nachfolgend von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) bezogen. Die Hitzeinaktivierung des FKS erfolgte bei 56°C für 45 min.

Als pH-Indikatorfarbstoff enthielten sämtliche Zellkulturmedien Phenolrot.

MEM + 5% FKS	Minimum Essential Medium mit 5% Hitze-inaktiviertem FKS; 2 mM L-Glutamin; 50 mg/l Gentamycin, 0,5 ng/ml bFGF (<i>basic fibroblast growth factor</i>) (Invitrogen, Karlsruhe)
MEM + 10% FKS	Minimum Essential Medium mit 10% Hitze-inaktiviertem FKS; 2 mM L-Glutamin; 50 mg/l Gentamycin, 0,5 ng/ml bFGF (Invitrogen, Karlsruhe)
DMEM + 10% FKS	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i> mit 10% Hitze-inaktiviertem FKS; 2 mM L-Glutamin; 50 mg/l Gentamycin
RPMI + 10% FKS	RPMI 1640 Medium mit 10% Hitze-inaktiviertem FKS; 2 mM L-Glutamin; 50 mg/l Gentamycin; 5 µM β-Mercaptoethanol (Roth, Karlsruhe)
Einfriermedium	90% FKS; 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) (Roth, Karlsruhe)

2.4.2.1 Antibiotika

Antibiotikum	Wirkspektrum	Stammlösung	Endkonzentration
BM Cyclin (1)	Bakterien,	2,5 mg/ml	10 µg/ml
BM Cyclin (2) (Roche, Mannheim)	insbesondere Mykoplasmen	1,25 mg/ml	5 µg/ml
Gentamycin (PAA, Cölbe)	Bakterien, auch Mykoplasmen	50 mg/ml	50 µg/ml

2.4.2.2 Inhibitoren

Inhibitor	Wirkspektrum	Stammlösung	Endkonzentration
Gö6976 (Merck, Darmstadt)	pUL97 und Proteinkinase C (PKC)	500 µg/ml	1 µM
Gö7874 (Merck, Darmstadt)	Proteinkinase C (PKC)	500 µg/ml	1 µM
Ax7396 (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)	pUL97	10 mM	1 µM

2.4.2.3 Peptide

Protein	Aminosäureposition	Konzentration	Aminosäuresequenz
pp65	495-506	1 mg/ml	NLVPMVATV
IE1	297-305	10 mg/ml	TMYGGISLL

2.4.3 Bestimmung der Zellzahl und der Zellvitalität

Lebende Zellen sind für den Vitalfarbstoff Trypanblau undurchlässig. Im Gegensatz dazu dringt dieser Farbstoff bereits nach kurzzeitiger Inkubation durch die Zellmembran toter Zellen. Dies resultiert in einer deutlichen Blaufärbung der entsprechenden Zellen. Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurden die

Zellsuspensionen 1:2 mit Trypanblau verdünnt, in eine Neubauer-Zählkammer überführt und anschließend unter dem Mikroskop gezählt.

Milzzellen wurden vor dem Zählen in einem Verhältnis von 1:1:2 mit Trypanblau und 4% Essigsäure versetzt. Durch die Zugabe der Essigsäure werden Erythrozyten lysiert, die das Ergebnis der Zählung beeinflussen könnten.

Die Berechnung der Zellzahl/ml erfolgte nach folgender Formel:

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

N = Anzahl gezählter lebender Zellen

n = Anzahl ausgeählter Grossquadrate

V = Verdünnungsfaktor

10⁴ = Kammerfaktor

2.4.4 Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen

In einem speziellen Einfriermedium können Zellen in flüssigem Stickstoff bei -172°C über mehrere Jahre aufbewahrt werden. Bei Bedarf werden sie revitalisiert und kultiviert. Zur Lagerung wurden 1×10^6 bis 5×10^6 Zellen pelletiert, in 1,5 ml Einfriermedium resuspendiert und in Kryogefäße überführt. Diese wurden zunächst in einem Einfriergefäß üN bei -80°C langsam abgekühlt und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt. Die Verwendung des Einfriermediums ermöglicht ein gleichmäßiges Absinken der Temperatur um 1°C/min. Dadurch wird die Bildung von Eiskristallen beim Einfrieren vermindert. Der Zusatz von DMSO zum Einfriermedium soll zusätzlich Zellschädigungen durch entstehende Kristalle verhindern.

Zur Rekultivierung wurden die Zellen bei 37°C zügig aufgetaut, in vorgewärmtes Medium überführt, pelletiert und in frischem Medium ausgesät. Durch das schnelle Auftauen wird die Bildung von Kristallen reduziert.

2.4.5 Verwendete Zellen und Zelllinien

2.4.5.1 Suspensionszellen

Suspensionszellen wurden bei Farbumschlag des Kulturmediums von rot nach gelb gesplittet. Dabei wurden etwa 0,3 Mio Zellen/ml ausgesät.

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

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

Medium: RPMI + 10% FKS

RMA-S HHD

RMA-S Zellen sind stabile Transfektanten eines TAP defizienten murinen T-Zell Lymphoms; sie tragen das HLA-A2.1 (Pascolo *et al.*, 1997)

Medium: RPMI + 10% FKS

EL4

Murine EL4 Zellen wurden durch die Etablierung eines Lymphoms in C57BL/6 Mäusen generiert. Zur Induktion des Lymphoms wurde 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene verwendet. Die Zellen sind gegenüber 0,1 mM Cortisol resistent und gegenüber 20 mg/ml PHA sensitiv.

Die in dieser Arbeit verwendeten EL4 Zellen wurden von „American Type Culture Collection“ (Manassas, VA, USA) bezogen.

Medium: DMEM + 10% FKS

2.4.5.2 Adhärenz Zellen

Adhärenz wachsende Zellen wurden gesplittet, sobald Konfluenz erreicht war. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend zum Ablösen vom Boden des Kulturgefäßes 5 min mit Trypsin-EDTA Lösung bei 37°C inkubiert. Nach Pelletierung der Zellen wurden diese in einer Konzentration von 1,5-1,8 Mio Zellen/ml in eine 175 cm² Zellkulturflasche ausgesät.

Primäre humane Vorhautfibroblasten (*Human Foreskin Fibroblasts*, HFF)

Zur Isolierung von HFF wurden nach operativen Eingriffen zur Verfügung gestellte Vorhäute von Neugeborenen oder Kleinkindern mechanisch zerkleinert.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Isolierung von HFF nicht durchgeführt. Die verwendeten HFF stammten aus länger zurückliegenden Präparationen.

HFF sind in Zellkultur für HCMV permissiv.

Medium: MEM + 5% FKS;
MEM + 10% FKS; je nach Wachstum der Zellen

293T (ATCC: CRL-11268)

Bei der Zelllinie 293T handelt es sich um semi-adhärenente Epithelzellen aus der menschlichen Niere, die sich mit hoher Effizienz mit DNA transfizieren lassen. Die Zellen exprimieren das große T-Antigen des „Simian Virus (SV-) 40“. Plasmide, die den *origin of replication* des SV-40 kodieren, werden in 293T Zellen aufgrund der Expression des T-Antigens amplifiziert. Dadurch wird eine Verstärkung der transienten Expressionsrate heterologer, plasmidkodierter Proteine erreicht.

Medium: DMEM + 10% FKS

2.4.5.3 Cytotoxische T-Lymphozyten (CTL) Linie

Bei diesen CTL Linien handelt es sich um T-Lymphozyten, die gegen HLA-A0201 (A2) präsentierte Peptide von HCMV gerichtet sind (Besold *et al.*, 2007).

pp65_{NLV}-CTL: spezifisch für das pp65_{NLV} Peptid

IE1_{TMY}-CTL: spezifisch für das IE1_{TMY} Peptid

Medium: RPMI + 10% FKS

2.4.6 Restimulierung peptidspezifischer CTL-Linien

Für die Restimulierung einer CTL Kultur wurden die Zellen je nach Dichte 1:2 oder 1:3 gesplittet. Zur Erhaltung der Antigenpezifität wurden die CTL mit neuen Stimulatorzellen versorgt. Die Restimulierung von peptidspezifischen CTL-Linien erfolgte einmal pro Woche. Dazu wurden JA2-Zellen, die zuvor mit 200 Gy bestrahlt wurden, für 35 min mit 5 µg Peptid und 5 µg humanem β₂Mikroglobulin (β₂m) beladen. Es folgten zwei Waschschriffe. Die T-Lymphozyten wurden zusammen mit 5x10⁵ peptidbeladenen JA2-Zellen und 6x10⁶ mit 30 Gy bestrahlten C57BL/6-Milzzellen in einem Gesamtvolumen von 2 ml/Well in einer 24-Well-Platte ausgesät. Zusätzlich wurde den Ansätzen je nach Wachstum 5 bzw. 10% (v/v) Überstand aus dem Kulturmedium Concanavalin A (aus *Canavalia ensiformis*, Invitrogen, Karlsruhe) – aktivierter Milzzellen von Lewis-Ratten – zugesetzt (Irwin *et al.*, 1989).

2.4.7 Transfektion

Lipidtransfektion

Perfectin™

Perfectin™ Transfektionsreagenz (PeqLab, Erlangen) stellt eine auf kationischen und neutralen Lipiden basierende Komponente dar, die Komplexe mit DNA bildet und diese mittels Endocytose in die Zelle transportiert, wodurch eine hohe Transfektionseffizienz ermöglicht wird. Die Transfektion wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.5 Kultivierung von Viren

2.5.1 Virusstämme

Ad169

1956 wurde dieser HCMV-Laborstamm von Rowe isoliert (Rowe *et al.*, 1956). Dieser Stamm stellte die Grundlage für die erste Sequenzierung des HCMV-Genoms dar (Chee *et al.*, 1990).

RV-HB5

Dieses Virus wurde durch Rekonstitution aus dem *Bacterial Artificial Chromosome* (BACmid, BAC) pHB5 (Borst *et al.*, 1999; Besold *et al.*, 2007) gewonnen. BACmide ermöglichen die stabile Amplifizierung kompletter Genome großer DNA Viren in *E.coli*, aufgrund derer die DNA der genetischen Manipulation in den Bakterien zugänglich gemacht wird (Shizuya *et al.*, 1992) (Kapitel 2.6.12). Das pHB5 BACmid wurde durch Insertion des BAC-Vektors in den Stamm Ad169 konstruiert, wobei die Gene US2-US6 deletiert wurden.

RV-Hd65

Dieser rekombinante HCMV-Stamm wurde durch Rekonstitution des BACs pHB15_Δpp65 in HFF generiert (Besold *et al.*, 2007). Die UL83-Region, die das virale Tegumentprotein pp65 kodiert, wurde in diesem BAC deletiert. Dieses Virus ist nicht mehr in der Lage, DB zu produzieren.

RV-VM1

Dieses rekombinante Virus wurde durch Rekonstitution des BACs pHB5-R387-EP1 hergestellt (Mersseman, 2007). Durch homologe Rekombination wurde an der Stelle Arg387 im pp65 Leserahmen das IE1_{TMV} Epitop inseriert.

RV-VM4

Dieses rekombinante Virus wurde durch Rekonstitution des BACs pHB5-R387-Rvt-pp65 hergestellt (Mersseman, 2007). Durch homologe Rekombination wurde an der Stelle Arg387 im pp65 Leserahmen das IE1_{TMY} Epitop durch die pp65 Wildtyp (wt)-Sequenz ersetzt.

RV-SN7

Dieses rekombinante Virus wurde durch die Rekonstitution des BACs SN7 in HFF hergestellt. Durch homologe Rekombination wurde an der Stelle Ala534 im Leserahmen von pp65 das SIINFEKL Peptid inseriert.

RV-SN8

Dieses rekombinante Virus wurde durch die Rekonstitution des BACs SN8 in HFF hergestellt. Durch homologe Rekombination wurde an der Stelle Ala534 im Leserahmen von pp65 das SIINFEKA Peptid inseriert.

Rekombinante HCMV Stämme, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit generiert wurden, sind in der folgenden Übersicht dargestellt. Alle Stämme basieren auf dem pHB5 BAC.

Rekombinantes Virus	BAC Klone	Insertionsstelle	Fusionsprotein
RV-SB2	pHB5 S101 pp65-IE1	Ser101 von pp65	pp65-IE1 ₂₈₉₋₃₀₉
RV-SB3	pHB5 W175 pp65-IE1	Trp175 von pp65	pp65-IE1 ₂₈₉₋₃₀₉
RV-SB4	pHB5 D234 pp65-IE1	Asp234 von pp65	pp65-IE1 ₂₈₉₋₃₀₉
RV-SB5	pHB5 A480 pp65-IE1	Ala480 von pp65	pp65-IE1 ₂₈₉₋₃₀₉
RV-SB6	pHB5 A534 pp65-IE1	Ala534 von pp65	pp65-IE1 ₂₈₉₋₃₀₉
RV-SB7 SIINFEKL	BAC-SB7 SIINFEKL	Trp175 von pp65	pp65-SIINFEKL
RV-SB8 SIINFEKA	BAC-SB8 SIINFEKA	Trp 175 von pp65	pp65-SIINFEKA

2.5.2 Virus-Rekonstitution aus BACmiden

Zur Herstellung von Viren aus HCMV-BACmiden (Kapitel 2.6.2) wurden die BACmide in HFF transfiziert. Anschließend wurden diese so lange passagiert, bis genügend Plaques infizierter Zellen zu sehen waren. Die so erhaltenen virushaltigen Überstände wurden zur weiteren Passage auf nicht infizierte HFF überführt.

Die BAC-DNA wurde mit Hilfe des „Plasmid DNA Purification“-Kits der Firma Macherey&Nagel (Düren) aus *E.coli* isoliert und aufgereinigt. Die Transfektion von HFF wurde mittels der SuperFect-Methode von Qiagen (Hilden) durchgeführt. Einen Tag vor der Transfektion wurden 1×10^5 HFF pro *Well* in einer 6-*Well*-Platte ausgesät. Bei einer Konfluenz der Zellen von 40-80% erfolgte die Transfektion nach Herstellerangaben (Protokoll zur transienten Transfektion von adhärennten Zellen). Dabei wurden pro Ansatz verschiedene DNA-Mengen (2 μ l, 5 μ l, 10 μ l und 20 μ l) verwendet. In einigen Ansätzen wurde zur Entfernung des BAC-Vektors aus dem Virus-Genom 0,5 μ g des pBRep-cre Plasmides (Kapitel 2.6.1) kotransfiziert, das die *Cre*-Rekombinase exprimiert. Nach der Transfektion wurden die HFF unter den geeigneten Bedingungen kultiviert. Erste Plaques infizierter Zellen waren in der Regel nach zwei bis drei Wochen im Zellrasen zu erkennen.

2.5.3 Infektion eukaryonter Zellen mit HCMV

Zur Infektion mit HCMV wurde von subkonfluenten HFF das Medium entfernt. Nachfolgend wurde der Virusüberstand je nach gewünschter *multiplicity of infection* (*moi*) in einem geringen Volumen an Medium zugegeben. Nach einer Inkubation von eineinhalb Stunden bei 37°C zur Virus-Zell-Adsorption wurde Kulturmedium zugegeben. Die infizierten Zellen wurden bis zur Verwendung weiter bei 37°C inkubiert.

2.5.4 Behandlung von Zellen mit aufgereinigten Dense Bodies

Für die Behandlung von Zellen mit aufgereinigten DB wurden diese auf eine Konzentration von 10 μ g eingestellt. Das Volumen wurde auf 250 μ l mit MEM + 5% FKS aufgefüllt. Die Suspension wurde für 2 min bei einer Wellenlänge von 254 nm mit UV-Licht in einer Tüpfelplatte bestrahlt. Anschließend wurden die DB zusammen mit 8×10^5 Zellen inkubiert. Von diesen subkonfluent wachsenden Zellen wurde zuvor das Medium bis auf etwa 4 ml entfernt. Nach einer Inkubation von eineinhalb Stunden bei 37°C wurde Kulturmedium zugegeben. Die behandelten Zellen wurden bis zur Verwendung weiter bei 37°C inkubiert.

2.5.5 Herstellung virushaltiger Überstände

Für die Herstellung virushaltiger Überstände wurden subkonfluent wachsende HFF mit einer hohen *moi* infiziert und bei 37°C inkubiert. Nach einer Kultivierung von sechs bis acht Tagen wurden die virushaltigen Überstände entnommen. Zur Entfernung von Zelltrümmern wurden die Überstände 10 min bei 3.000 rpm in einer Megafuge 2.0 (Heraeus, Hanau) zentrifugiert. Die Überstände wurden anschließend in 1 bis 11 ml Aliquots bei -80°C eingefroren.

2.5.6 Bestimmung des Virustiters

Reagenzien	Konzentrationen
AEC-Stammlösung	400 mg AEC (3-Amino-9-Ethyl-Carbazol; Sigma (Deisenhofen)) in 100 ml DMF (Dimethylformamid)
Acetat-Puffer	6,8 g Natriumacetat in 2,88 ml Eisessig, pH 4,7

Ein Maß für die Anzahl an infektiösen Partikeln in einem vorgegebenem Volumen Zellkulturüberstand ist der Virustiter eines virushaltigen Überstandes. Zur Ermittlung des Virustiters wurden 5×10^3 HFF pro *Well* in einer 96-*Well*-Platte ausgesät. Am darauf folgenden Tag wurden diese Zellen mit 100 µl des zu untersuchenden Virusüberstandes infiziert. Für die Achtfachansätze wurden Verdünnungen von 10^{-3} und 10^{-4} verwendet. Diese Verdünnungen wurden jeweils in MEM + 5% FKS angesetzt. 48 Stunden nach der Infektion wurden die Zellen für 20 min mit 96% Ethanol fixiert. Zur Detektion von IE1-exprimierenden Zellen wurde nach einem Waschschrift mit PBS 50 µl Hybridomüberstand des IE1 spezifischen, monoklonalen Antikörpers p63-27 pro *Well* zugegeben und eine Stunde bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Detektion erfolgte nach zweimaligem Waschen mit PBS mit Hilfe eines HRP (Meerrettichperoxidase, *horseradish peroxidase*)-gekoppelten Sekundärantikörpers (anti-Maus IgG). Zellen, die mittels des Zweitantikörpers markiert wurden, konnten durch eine AEC-Färbung sichtbar gemacht werden und wiesen eine deutliche Braunfärbung auf. Dazu wurde die AEC-Stammlösung 1:20 in Acetatpuffer verdünnt, filtriert und mit einem Volumen von 1:1.000 mit H₂O₂ (30%) versetzt. Pro *Well* wurde 100 µl Färbelösung eingesetzt. Nach einer einstündigen Inkubation der 96-*Well*-Platte im Dunkeln bei 37°C wurde die Farbreaktion durch Waschen mit PBS

abgestoppt. Die anschließende Auszählung der IE1-positiven Kerne pro *Well* erfolgte unter dem Mikroskop. Dabei entsprach die Zahl der IE1-positiven Kerne denen der infizierten Zellen. Pro Virus und Verdünnung wurden acht *Wells* ausgezählt und davon der Mittelwert gebildet. Der Virustiter ließ sich aus diesen Werten wie folgt berechnen:

Anzahl infektiöser Partikel pro ml Virusüberstand: $N \times V \times 10$

N = Anzahl an IE1-positiven Zellen pro *Well* (Mittelwert von acht *Wells*)

V = Verdünnungsfaktor des Überstandes

x 10 = Verdünnungsfaktor

(Der Virustiter wird für ein Volumen von 1 ml berechnet. Für die Virustitration wurde jedoch nur ein Volumen von 100 µl eingesetzt; Verdünnung 1:10)

2.5.7 Aufreinigung von Viruspartikeln aus Zellkultur-Überstand

Reagenzien	Konzentrationen
0,04 M Na-Phosphatpuffer	1,1 g NaH ₂ PO ₄ x 1 H ₂ O; 5,7 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O auf 1 l H ₂ O; pH 7,4
35% Na-Tartrat	207,5 g Na-Tartrat; 325 ml 0,04 M Na-Phosphatpuffer; autoklaviert
15% Na-Tartrat/ 30% Glycerin	88,9% Na-Tartrat; 150 ml Glycerin; 275 ml 0,04 M Na-Phosphatpuffer; autoklaviert

Zur Aufreinigung der viralen HCMV-Partikel (Virionen, DB und NIEPs) aus dem Zellkulturüberstand, die während einer Infektion entstehen, wird ein positiver Dichte-/negativer Viskositäts-Gradient-System verwendet (Talbot and Almeida, 1977; Irmiere and Gibson, 1983). Bei einem zytopathischen Effekt (CPE) von mindestens 90% wurde der Überstand der infizierten HFF durch zehnmünütige Zentrifugation bei 2.500 rpm in einer Megafuge 2.0 von Zellen und Zelltrümmern befreit. Anschließend wurden die Viruspartikel durch Ultrazentrifugation im SW28 Rotor (Sorvall Ultrazentrifuge) bzw. im SW 32 Ti Rotor (Beckman Ultrazentrifuge) für 70 min bei 23.000 rpm und 10°C pelletiert. Zur Auftrennung der unterschiedlichen viralen HCMV-Partikel wurde das Pellet zweimalig in 1 ml 1xPBS resuspendiert und in 1 ml Aliquots auf einen Gradienten geschichtet, der aus 4 ml 35% Na-Tartrat und 5 ml 15% Na-

Tartrat hergestellt wurde. Die Gradienten wurden für 60 min bei 23.000 rpm und 10°C ohne Bremse in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Die Auftrennung der Virionen, DB und NIEPs erfolgte dabei nach der unterschiedlichen Dichte der Partikel. Nach diesem Zentrifugationsschritt war im Durchlicht ein distinktes Bandenmuster zu erkennen: die DB wiesen eine breite, relativ diffuse Bande auf, darüber sammelten sich die Virionen in einer dünnen, sehr scharfen Bande an und darüber die NIEPs, ebenfalls in einer dünnen, klar abgegrenzten Bande. Mit Hilfe einer Kanüle wurden die Banden abgezogen und in einem Reaktionsgefäß gesammelt. Die DB wurden auf ein Volumen von 20 ml mit PBS aufgefüllt und in je 10 ml Aliquots in ein SW41 Röhrchen überführt. Die Virionen und NIEPs wurden jeweils auf ein Volumen von 10 ml mit PBS aufgefüllt und ebenfalls in SW41 Röhrchen gegeben. Es folgte ein Zentrifugationsschritt in der Ultrazentrifuge für 90 min bei 24.000 rpm und 10°C. Die Pellets wurden in unterschiedlichen Volumina PBS resuspendiert und bei -80°C gelagert. (DB: 300 µl PBS; Virionen: 120 µl PBS; NIEPs: 120 µl PBS)

2.6 Molekularbiologische Methoden

2.6.1 Verwendete Plasmide

pgalk

Dieses Plasmid wurde freundlicherweise von Prof. Neil Copeland, National Cancer Institute, Frederick, Maryland, zur Verfügung gestellt (Warming *et al.*, 2005). Dieser Klonierungsvektor, der auf dem Plasmid pBluescript basiert, enthält die Gene für die Galaktokinase *galk*, die unter der Kontrolle des bakteriellen *em7* Promotors stehen.

→ Dieses Plasmid diente als PCR Template für die Generierung eines PCR Produktes, welches nachfolgend mittels homologer Rekombination in pHB5-BAC inseriert wurde.

Resistenz: Ampicillin

- pBRep-Cre** Dieses Plasmid wurde von Dr. Wolfram Brune, Würzburg, kloniert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt (Hobom *et al.*, 2000). Es diente der Expression der Cre-Rekombinase nach Transfektion in HFF. Diese ist in der Lage, den BAC-Vektor aus dem HCMV-Genom durch ortsspezifische Rekombination an spezifischen Erkennungsstellen (*loxP-sites*) herauszuschneiden.
- pK65-1** Dieser Klonierungsvektor enthält die kodierende Sequenz für das IE1₍₂₈₈₋₃₀₉₎ Peptid und des c-myc Epitopstags unmittelbar vor dem Stopcodon von UL83.
- Dieses Plasmid diente als PCR Template für die Generierung des PCR Produktes, das mittels homologer Rekombination in pHB5-BAC inseriert wurde.
- Resistenz: Ampicillin und Kanamycin
- pSB1** Bei diesem Plasmid wurde mittels homologer Rekombination das PCR-Produkt aus dem pK65-1 Plasmid in das pp65-GFP-C1-Plasmid integriert. Die Insertion des IE1 + c-myc Tags erfolgte an der Position Arginin 387 von pp65.
- Resistenz: Kanamycin
- pcDNA UL97 FLAG** Dieses Plasmid wurde freundlicherweise von Prof. Manfred Marschall, Erlangen, zur Verfügung gestellt (Marschall *et al.*, 2001). Es basiert auf dem Expressionsvektor pcDNA3 und exprimiert die HCMV virale Kinase pUL97.
- Resistenz: Ampicillin
- pp65-GFP-C1** Dieses Plasmid exprimiert ein pp65-GFP Fusionsprotein. Als Ausgangsvektor diente für die Generierung der pEGFP C1 Vektor
- Resistenz: Kanamycin

2.6.2 Verwendete *Bacterial Artificial Chromosomes* (BACs)

pHB5	Dieses BAC enthält das Genom des HCMV Stammes Ad169. Der BAC-Vektor wurde zwischen US1 und US7 in das Virusgenom integriert; die dazwischen liegende Sequenzen (US2 bis US6) wurden dabei entfernt (Borst <i>et al.</i> , 1999)
pHB5 S101 pp65-IE1	Dieses BAC enthält das IE1 ₍₂₈₈₋₃₀₉₎ Epitope, das an der Position S101 von pp65 inseriert wurde.
pHB5 W175 pp65-IE1	Dieses BAC enthält das IE1 ₍₂₈₈₋₃₀₉₎ Epitope, das an der Position W175 von pp65 inseriert wurde.
pHB5 D234 pp65-IE1	Dieses BAC enthält das IE1 ₍₂₈₈₋₃₀₉₎ Epitope, das an der Position D234 von pp65 inseriert wurde.
pHB5 A480 pp65-IE1	Dieses BAC enthält das IE1 ₍₂₈₈₋₃₀₉₎ Epitope, das an der Position A480 von pp65 inseriert wurde.
pHB5 A534 pp65-IE1	Dieses BAC enthält das IE1 ₍₂₈₈₋₃₀₉₎ Epitope, das an der Position A534 von pp65 inseriert wurde.
BAC-SN7	Dieses BAC enthält das SIINFEKL Peptid (Peptid aus Hühner-Ovalbumin), das an der Position A534 von pp65 inseriert wurde.
BAC-SN8	Dieses BAC enthält das SIINFEKA Peptid (Peptid aus Hühner-Ovalbumin, bei dem die letzte Aminosäure mutiert wurde), das an der Position A534 von pp65 inseriert wurde.
BAC-SB7 SIINFEKL	Dieses BAC enthält das SIINFEKL Peptid, das an der Position W175 von pp65 inseriert wurde.
BAC-SB8 SIINFEKA	Dieses BAC enthält das SIINFEKA Peptid, das an der Position W175 von pp65 inseriert wurde.

2.6.3 Isolierung von DNA

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

Reagenzien	Konzentrationen
Zellsuspensions-Puffer (E1)	50 mM Tris-HCl (pH 8,0); 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A (für Plasmide) oder 400 µg/ml RNase A (für BACs)
Zelllysis-Puffer (E2)	200 mM NaOH; 1% SDS (w/v)
Neutralisations-Puffer (E3)	3,1 M Kaliumacetat (pH 5,5)
TE Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 8,0); 0,1 mM EDTA

Die Isolierung kleiner Mengen BACmid- bzw. Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte aus 2 ml Übernachtskultur nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Sambrook and Russel, 2001). Verwendet wurden die Puffer des „High Purity Purification“-Systems von Marligen Bioscience (bezogen über BioCat, Heidelberg).

Durch eine einminütige Zentrifugation bei 6.000 rpm in einer Eppendorfzentrifuge wurden die Bakterien zunächst pelletiert und anschließend in 200 µl Suspensions-Puffer (E1) resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl alkalischem Lysis-Puffer (E2) wurden die Gefäße mehrmals invertiert. Es erfolgte die Zugabe von 200 µl Neutralisations-Puffer (E3) und eine erneute vorsichtige Durchmischung. Die chromosomale DNA, die durch diese Behandlung ausgefallen war, wurde durch einen Zentrifugationsschritt bei 14.000 rpm in einer Eppendorfzentrifuge bei 4°C entfernt und die im Überstand enthaltene Plasmid-DNA mit Isopropanol gefällt. Es erfolgte ein weiterer Waschschrift in 70% Ethanol, bevor schließlich die DNA in einem geeignetem Volumen H₂O bzw. TE Puffer aufgenommen wurde.

Die Aufreinigung einer größeren Menge DNA von *high-copy-number*-Plasmiden erfolgte aus 100 ml üN-Kultur. Verwendet wurde dafür das „High Purity Plasmid Purification“-System von Marligen Bioscience (bezogen über BioCat, Heidelberg). Entsprechende DNA-Mengen von *low-copy-number*-BACmiden wurden aus 200 ml Übernachtskultur mit Hilfe des „Plasmid DNA Purification“-Kits von Macherey & Nagel (Düren) isoliert. Die Durchführung erfolgte nach den jeweiligen Angaben des Herstellers.

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren und der Grad der Verunreinigung durch Proteine wurden photometrisch mit Hilfe des Nanodrops (PeqLab, Erlangen) durchgeführt.

Dabei wurde die Absorption der Nukleinsäure-Lösung gegen Wasser bei 260 nm (Absorptionsmaxima der Purin- und Pyrimidinbasen) gemessen. Bei doppelsträngiger DNA entspricht eine Absorption von 1,0 einer Konzentration von 50 µg/ml bei einer Schichtdicke von 1 cm. Der Grad der Verunreinigung wird über das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm (Absorptionsmaxima aromatischer Aminosäuren) bestimmt. Der Quotient OD_{260nm}/OD_{280nm} liegt bei sehr reinen DNA-Lösungen zwischen 1,8 und 2,0. Durch Verunreinigungen mit Proteinen wird dieser Quotient zu kleineren Werten verschoben.

2.6.3.2 Isolierung von Virus-DNA aus Zellkulturüberstand infizierter HFF

Die Aufreinigung von HCMV-DNA aus Zellkulturüberstand wurde mittels des „High Pure Viral Nucleic Acid“-Kits von Roche (Mannheim) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die isolierte Virus-DNA wurde bei -20°C gelagert, bevor sie als *Template* zur Amplifikation von bestimmten Genombereichen eingesetzt wurde.

2.6.4 Isolierung von RNA

Zur Isolierung der Gesamt-RNA für die Northern-Blot Analysen (Kapitel 2.6.14) wurde das „RNeasy Mini“ Kit von Qiagen (Hilden) verwendet und nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.6.5 Fällung von DNA mit Isopropanol

Eine Erhöhung der DNA-Konzentration und eine Entfernung von Salzen wurden durch eine Fällung der DNA mit Isopropanol erreicht. Dazu wurde die DNA mit 1,5 M NaCl versetzt. Nach Zugabe von 0,8 Volumen Isopropanol erfolgte eine Inkubation für 20 min auf Eis. Die DNA wurde anschließend bei 14.000 rpm in einer Eppendorfszentrifuge für 10 min pelletiert. Zur Entfernung restlicher Salze erfolgte ein Waschschrift mit 70% Ethanol und ein weiterer Zentrifugationsschritt. Das getrocknete Pellet wurde in einem geeignetem Volumen H₂O resuspendiert.

2.6.6 Agarose-Gelelektrophorese

Reagenzien	Konzentrationen
TBE (Tris-Borat-EDTA-Puffer)	89 mM Tris-Borat; 2 mM EDTA (pH 8,0)
Auftragspuffer für DNA Gele	50 mg Bromphenolblau ; 100 mg Xylencyanol ; 1 mM EDTA ; 25 g Saccharose ; ad 50 ml mit H ₂ O

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten nutzt man ihre durch Phosphatgruppen hervorgerufene negative Ladung. Im elektrischen Feld bewegen sich die negativ geladenen DNA-Moleküle in der Matrix des Gels mit einer Geschwindigkeit, die umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Größe ist, zur Anode. Je nach Größe der zu analysierenden Nukleinsäurefragmente wurden 1-1,5%-ige Agarosegele in 0,5x TBE-Puffer eingesetzt. Pro Gel wurden 0,5 mg/ml Ethidiumbromidlösung verwendet. Die aufgetragenen DNA-Proben wurden mit 6x DNA-Probenpuffer versetzt und in die Taschen geladen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 80-120 V. Die Interkalation von Ethidiumbromid in die DNA-Doppel-Helix erlaubte die Detektion und photographische Dokumentation der DNA Fragmentmuster unter UV-Beleuchtung.

Als DNA-Größenmarker wurden 0,5 µg peqGOLD DNA-Lieter Mix von PeqLab (Erlangen) verwendet.

2.6.7 DNA-Fragmentisolierung

Das zu isolierende DNA-Fragment wurde nach der Agarose-Gelelektrophorese unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und im Anschluss mit Hilfe des „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen, Hilden) aufgereinigt. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben unter der Verwendung einer Mikrozentrifuge.

Mit Hilfe dieser Methode konnten DNA-Fragmente zwischen 70 bp und 10 kb aufgereinigt werden.

2.6.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Methode der PCR (Saiki *et al.*, 1988) wurde 1987 von Kary B. Mullis entwickelt. Bei dieser Methode wird eine exponentielle Amplifikation eines spezifischen DNA-Fragmentes mittels einer hitzestabilen DNA-Polymerase durch zyklische Wiederholung

von Hitzedenaturierung, Primerhybridisierung (*Annealing*) und DNA-Synthese erreicht. Durch das exponentielle Ansteigen der DNA-Amplifikate erhält man aus einer sehr geringen Menge an Ausgangsmaterial einen quantitativen Gehalt der gewünschten DNA. Durch Generierung von Primern mit Restriktionsschnittstellen, die in der *multiple cloning site* (MCS) des verwendeten Vektors liegen, bietet diese Methode die Möglichkeit, spezifische cDNA-Bereiche zu amplifizieren und in definierter Orientierung zu klonieren. Für analytische Zwecke wurde die *Taq*-DNA-Polymerase von Metabion (Martinsried) eingesetzt. Zur Herstellung von PCR-Produkten, die für die BAC-Mutagenese generiert wurden, wurde die „Expand High Fidelity Enzyme Mix“ von Roche (Mannheim) verwendet, die über eine 3'→5'-Exonukleaseaktivität verfügt und entsprechend eine geringere Fehlerrate während der Synthese aufweist. Die Qualität der PCR wurde durch Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 2.6.5) überprüft.

2.6.8.1 Durchführung einer PCR

Eine Standard-PCR wurde in einem Endvolumen von 50 µl durchgeführt und enthielt die unten angegebenen Bestandteile.

Reagenzien	Konzentrationen
Template DNA	1-200 ng
Primer	2-5 pmol
dNTPs (PeqLab, Erlangen)	2 mM pro dNTP
Taq DNA Polymerase (Metabion, Martinsried)	2,5 U
Expand High Fidelity Enzyme Mix (Roche, Mannheim)	2,6 U
MgCl₂	1,5 mM

Schritt	Zeit	Temperatur	
initiale Denaturierung	2 min	94°C	
Denaturierung	1 min	94°C	} 30-35 Zyklen
Hybridisierung	1 min	Richtwert: 5°C niedriger als Schmelztemperatur der Primer	
Elongation	Richtwert: 1 min pro 1.000 bp	72°C	
terminale Elongation		72°C	

2.6.8.2 Kolonie-PCR

Zur Überprüfung einer DNA-Modifikation in einer Vielzahl von *E.coli*-Kolonien, wurde eine Amplifikation der Region von Interesse mittels PCR durchgeführt. Dies stellt eine schnelle und effiziente Methode zur Überprüfung des Erfolges dar. Die benötigte *Template*-DNA wurde aus den zu untersuchenden Kolonien isoliert. Dazu wurden Einzelkolonien gepickt und in 10 µl sterilem H₂O gelöst. Durch fünfminütiges Aufkochen bei 100°C wurden die Zellen aufgebrochen und die Zelltrümmer anschließend durch Zentrifugation entfernt. 5 µl des DNA-enthaltenden Überstandes wurden als *Template* in einem 50 µl PCR-Ansatz eingesetzt.

2.6.8.3 Oligonukleotide (Primer)

Alle Primer, die in dieser Arbeit verwendet wurden, wurden von der Firma Metabion (Martensried) bezogen. Oligonukleotide mit mehr als 40 Basen wurden einer HPLC-Reinigung unterzogen.

Name	Orientierung	Amplifikation
pp65-Fwd	Forward	PCR Amplifizierung von UL83 Sequenzierung
pp65_rev	Reverse	PCR Amplifizierung von UL83
Bac-Rev	Reverse	PCR Amplifizierung von UL83 Sequenzierung

CMV fwd	Forward	Sequenzierung
pEGFP C1		Sequenzierung
UL54 fwd	Forward	Quantitative <i>Real-time</i> PCR
UL54 rev	Reverse	Quantitative <i>Real-time</i> PCR
SR35	Forward	Amplifizierung der kodierenden Sequenz des IE1 ₍₂₈₈₋₃₀₉₎ Peptides mit Homologien zu den der Insertionsstelle benachbarten DNA Abschnitten in UL83 (Insertion R387 von UL83)
SR36	Reverse	Amplifizierung der kodierenden Sequenz des IE1 ₍₂₈₈₋₃₀₉₎ Peptides mit Homologien zu den der Insertionsstelle benachbarten DNA Abschnitten in UL83 (Insertion R387 von UL83)
SR38	Forward	PCR Amplifizierung von UL83 Sequenzierung
SR40	Reverse	PCR Amplifizierung von UL83
SR41	Forward	Sequenzierung
SR42	Reverse	Sequenzierung
SB1	Reverse	Amplifizierung der kodierenden Sequenz des <i>galk</i> mit Homologien zu den der Insertionsstelle benachbarten DNA Abschnitten in UL83 (Insertion S101 von UL83)
SB3	Forward	Amplifizierung der kodierenden Sequenz des IE1 ₍₂₈₈₋₃₀₉₎ Peptides mit Homologien zu den der Insertionsstelle benachbarten DNA Abschnitten in UL83 (Insertion S101 von UL83)
SB4	Reverse	Amplifizierung der kodierenden Sequenz des IE1 ₍₂₈₈₋₃₀₉₎ Peptides mit Homologien zu den der Insertionsstelle benachbarten DNA Abschnitten in UL83 (Insertion S101 von UL83)

SB5	Reverse	Amplifizierung der kodierenden Sequenz des <i>galk</i> mit Homologien zu den der Insertionsstelle benachbarten DNA Abschnitten in UL83 (Insertion D234 von UL83)
SB7	Forward	Amplifizierung der kodierenden Sequenz des IE1 ₍₂₈₈₋₃₀₉₎ Peptides mit Homologien zu den der Insertionsstelle benachbarten DNA Abschnitten in UL83 (Insertion D234 von UL83)
SB8	Reverse	Amplifizierung der kodierenden Sequenz des IE1 ₍₂₈₈₋₃₀₉₎ Peptides mit Homologien zu den der Insertionsstelle benachbarten DNA Abschnitten in UL83 (Insertion D234 von UL83)
SB9	Reverse	Amplifizierung der kodierenden Sequenz des <i>galk</i> mit Homologien zu den der Insertionsstelle benachbarten DNA Abschnitten in UL83 (Insertion A480 von UL83)
SB11	Forward	Amplifizierung der kodierenden Sequenz des IE1 ₍₂₈₈₋₃₀₉₎ Peptides mit Homologien zu den der Insertionsstelle benachbarten DNA Abschnitten in UL83 (Insertion A480 von UL83)
SB12	Reverse	Amplifizierung der kodierenden Sequenz des IE1 ₍₂₈₈₋₃₀₉₎ Peptides mit Homologien zu den der Insertionsstelle benachbarten DNA Abschnitten in UL83 (Insertion A480 von UL83)
SB13	Reverse	Amplifizierung der kodierenden Sequenz des <i>galk</i> mit Homologien zu den der Insertionsstelle benachbarten DNA Abschnitten in UL83 (Insertion A534 von UL83)
SB15	Forward	Amplifizierung der kodierenden Sequenz des IE1 ₍₂₈₈₋₃₀₉₎ Peptides mit Homologien zu den der Insertionsstelle benachbarten DNA Abschnitten in UL83 (Insertion A534 von UL83)

SB16	Reverse	Amplifizierung der kodierenden Sequenz des IE1 ₍₂₈₈₋₃₀₉₎ Peptides mit Homologien zu den der Insertionsstelle benachbarten DNA Abschnitten in UL83 (Insertion A534 von UL83)
SB17	Reverse	Amplifizierung der kodierenden Sequenz des <i>galk</i> mit pp65 Homologien zu den der Insertionsstelle benachbarten DNA Abschnitten in UL83 (Insertion W175 von UL83)
SB19	Forward	Amplifizierung der kodierenden Sequenz des IE1 ₍₂₈₈₋₃₀₉₎ Peptides mit Homologien zu den der Insertionsstelle benachbarten DNA Abschnitten in UL83 (Insertion W175 von UL83)
SB20	Reverse	Amplifizierung der kodierenden Sequenz des IE1 ₍₂₈₈₋₃₀₉₎ Peptides mit Homologien zu den der Insertionsstelle benachbarten DNA Abschnitten in UL83 (Insertion W175 von UL83)
SB21	Forward	Amplifizierung der kodierenden Sequenz des <i>galk</i> mit pp65 Homologien zu den der Insertionsstelle benachbarten DNA Abschnitten in UL83 (Insertion S101 von UL83)
SB22	Forward	Amplifizierung der kodierenden Sequenz des <i>galk</i> mit Homologien zu den der Insertionsstelle benachbarten DNA Abschnitten in UL83 (Insertion D234 von UL83)
SB23	Forward	Amplifizierung der kodierenden Sequenz des <i>galk</i> mit Homologien zu den der Insertionsstelle benachbarten DNA Abschnitten in UL83 (Insertion A480 von UL83)
SB24	Forward	Amplifizierung der kodierenden Sequenz des <i>galk</i> mit Homologien zu den der Insertionsstelle benachbarten DNA Abschnitten in UL83 (Insertion A534 von UL83)

SB25	Forward	Amplifizierung der kodierenden Sequenz des <i>galk</i> mit Homologien zu den der Insertionsstelle benachbarten DNA Abschnitten in UL83 (Insertion W175 von UL83)
SB26	Reverse	Amplifizierung der kodierenden Sequenz des SIINFEKL Homologien zu den der Insertionsstelle benachbarten DNA Abschnitten in UL83 mit pp65 flankierenden Homologien (Insertion W175 von UL83)
SB27	Forward	Amplifizierung der kodierenden Sequenz des SIINFEKL Peptides mit Homologien zu den der Insertionsstelle benachbarten DNA Abschnitten in UL83 (Insertion W175 von UL83)
SB28	Reverse	Amplifizierung der kodierenden Sequenz des SIINFEKA Peptides mit Homologien zu den der Insertionsstelle benachbarten DNA Abschnitten in UL83 (Insertion W175 von UL83)
SB29	Forward	Amplifizierung der kodierenden Sequenz des SIINFEKA Peptides mit Homologien zu den der Insertionsstelle benachbarten DNA Abschnitten in UL83 (Insertion W175 von UL83)
SB32	Reverse	Generierung einer UL32 spezifischen Sonde für Northern Blot-Analysen, 1. PCR
SB33	Forward	Generierung einer UL32 spezifischen Sonde für Northern Blot-Analysen, 1. PCR
SB34	Reverse	Generierung einer UL32 spezifischen Sonde für Northern Blot-Analysen, 2. PCR
SB35	Forward	Generierung einer UL32 spezifischen Sonde für Northern Blot-Analysen, 2. PCR
SB36	Reverse	Generierung einer UL69 spezifischen Sonde für Northern Blot-Analysen, 1. PCR

SB37	Forward	Generierung einer UL69 spezifischen Sonde für Northern Blot-Analysen, 1. PCR
SB38	Reverse	Generierung einer UL69 spezifischen Sonde für Northern Blot-Analysen, 2. PCR
SB39	Forward	Generierung einer UL69 spezifischen Sonde für Northern Blot-Analysen, 2. PCR
SB40	Reverse	Generierung einer UL86 spezifischen Sonde für Northern Blot-Analysen, 1. PCR
SB41	Forward	Generierung einer UL86 spezifischen Sonde für Northern Blot-Analysen, 1. PCR
SB42	Reverse	Generierung einer UL86 spezifischen Sonde für Northern Blot-Analysen, 2. PCR
SB43	Forward	Generierung einer UL86 spezifischen Sonde für Northern Blot-Analysen, 2. PCR
SB44	Reverse	Generierung einer GAPDH spezifischen Sonde für Northern Blot-Analysen, 1. PCR
SB45	Forward	Generierung einer GAPDH spezifischen Sonde für Northern Blot-Analysen, 1. PCR
SB46	Reverse	Generierung einer GAPDH spezifischen Sonde für Northern Blot-Analysen, 2. PCR
SB47	Forward	Generierung einer GAPDH spezifischen Sonde für Northern Blot-Analysen, 2. PCR

2.6.8.4 Verwendete PCR-Programme

Programm 1: -Amplifizierung des IE1_{TMY}-c-myc Peptides mit pp65 flankierenden Homologien (Insertion Arg387 von UL83)
-Amplifizierung des IE1_{TMY} Peptides mit pp65 flankierenden Homologien (negative Selektion)

Hot start	2 min	94°C	
Denaturierung	30 sec	94°C	} 30 Zyklen
Annealing	30 sec	58°C	
DNA-Synthese	45 sec	72°C	
DNA-Synthese	10 min	72°C	

Programm 2: -Kolonie-PCR zur Überprüfung des IE1_{TMY}-c-myc-pp65-GFP

Hot start	3 min	94°C	
Denaturierung	1 min	94°C	} 30 Zyklen
Annealing	1 min	60°C	
DNA-Synthese	2 min	72°C	
DNA-Synthese	10 min	72°C	

Programm 3: -Mutagenese mittels des QuickChange[®] II Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene (Amsterdam, NL), (Kapitel 2.6.11)

Hot start	4 min	95°C	
Denaturierung	50 sec	95°C	} 18 Zyklen
Annealing	50 sec	60°C	
DNA-Synthese	6 min 30 sec	68°C	
DNA-Synthese	7 min	60°C	

Programm 4: -Amplifizierung von *galK* mit pp65 flankierenden Homologien (positive Selektion)
-Kolonie-PCR der positiven und negativen Selektion

Hot start	2 min	94°C	} 30 Zyklen
Denaturierung	45-60 sec	94°C	
Annealing	45 sec	58°C	
DNA-Synthese	90 sec	72°C	
DNA-Synthese	10 min	72°C	

2.6.8.5 Aufreinigung von PCR-Produkten

Zur Aufreinigung von doppelsträngigen PCR-Produkten in der Größe von 100 bp bis 10 kb wurde das „QIAquick PCR Purification Kit“ von Qiagen (Hilden) verwendet. Die PCR-Produkte wurden nach Herstellerangaben unter Benutzung einer Mikrozentrifuge durchgeführt.

2.6.8.6 *Template*-Eliminierung

Das PCR-Produkt wurde zur Entfernung der *Template*-DNA einer Restriktion mit dem Enzym *DpnI* unterzogen. Dieses Enzym ist in der Lage, methylierte *Template*-DNA zu zerschneiden, dabei die nicht methylierten PCR-Produkte jedoch unversehrt zu lassen. Die Reaktion wurde nach Herstellerangaben (New England Biolabs, Frankfurt am Main) bei 37°C für vier Stunden durchgeführt.

2.6.9 Sequenzierung

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Sequenzierungen wurden von der Firma GENTERprise GENOMICS (Mainz) durchgeführt.

2.6.10 Quantitative *Real-time* PCR (TaqMan™ PCR)

Zur Quantifizierung von HCMV Genomen wurde im Rahmen dieser Arbeit eine *Real-Time* PCR mit TaqMan™-Sonden durchgeführt (Livak *et al.*, 1995). TaqMan™-Sonden sind kurze Oligonukleotide, die an ihrem 5' bzw. 3' Ende jeweils ein Fluorochrom (6-FAM als Reporter am 5'-Ende bzw. TAMRA als Quencher am 3'-Ende) tragen. Dabei handelt es sich um Farbstoffe mit überlappenden Emissions- bzw.

Absorptionsspektren. Durch diese Überlappung der Spektren tritt der so genannte Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) auf, wodurch die Fluoreszenz des Reporters unterdrückt wird, so lange er sich in enger räumlicher Nähe zum Quencher befindet. Das vom Fluorochrom emittierte Licht wird vollständig vom Quencher absorbiert, der dadurch selbst zur Fluoreszenz angeregt wird. Das Oligonukleotid ist komplementär zu einem Sequenzabschnitt, der zwischen den verwendeten Primern liegt, so dass die Polymerase während des Amplifikationsschritts die TaqMan™ Sonde verdrängen muss. Da die Polymerase über eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität verfügt, wird die TaqMan™ Sonde nicht nur verdrängt, sondern dabei auch hydrolysiert. Dadurch werden die Fluorochrome freigesetzt, was dazu führt, dass die Fluoreszenz des Reporters nicht länger durch den Quencher unterdrückt werden kann. Mit jedem Amplifikationszyklus steigt daher die detektierte Fluoreszenz des Reporters direkt proportional zur Anzahl der amplifizierten Zielsequenzen an.

Durchführung:

Als Standard diente für die Quantifizierung eine Verdünnungsreihe des Cosmids pCM1049 (Fleckenstein *et al.*, 1982). Dieses Cosmid kodiert unter anderem für das UL54 Gen von HCMV, gegen das die verwendete Sonde gerichtet war. Dieses Cosmid wurde für die TaqMan™-Analyse in Verdünnungen von 10^5 - 10^1 Kopien verwendet. Der *Real time* PCR Ansatz wurde in einem Volumen von 50 µl angesetzt und enthielt die folgenden Bestandteile:

Template- oder Standard-DNA	5 µl
Hot Star Taq (Qiagen, Hilden)	2,5 U
Primer: CMV-FP	15 pmol
CMV-RP	
Sonde	5 pmol

Initiationsschritt	2 min	50°C	} 45 Zyklen
Aktivierung der Hot Star Taq	5 min	95°C	
Denaturierung	15 sec	94°C	
Annealing, Elongation	1 min	60°C	

Die Messung und Auswertung erfolgte mit Hilfe des ABI Prism[®]7700sequence detector (PE Applied Biosystems, Weiterstadt). Jede zu untersuchende Probe wurde in einer Dreifachbestimmung angesetzt.

2.6.11 Mutagenese

Zur Klonierung eines IE1 Epitopes in den Leserahmen von UL83 wurde das QuickChange[®] II Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene (Amsterdam, NL) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Dabei wurde die Epitopsequenz, die in pp65 inseriert werden sollte, mittels PCR amplifiziert und anschließend die parentale Plasmid-DNA durch einen *DpnI*-Verdau entfernt.

2.6.12 BAC-Mutagenese: Galk positive/negative Selektion

Bei der Klonierung von großen DNA-Fragmenten werden BACmide verwendet. Dabei handelt es sich um *E.coli*-F-Plasmid basierende Vektoren, die über 300 kb große Fragmente eukaryotischer DNA stabil enthalten können (Shizuya *et al.*, 1992). Mit Hilfe dieser BACmide ist es möglich, das Genom großer DNA-Viren in *E.coli* zu vermehren und zu manipulieren. In der Literatur wurden bereits einige BACs beschrieben, die das HCMV-Genom enthalten (Borst *et al.*, 1999; Hobom *et al.*, 2000).

Zur Herstellung rekombinanter Viren wurde das in einem BAC enthaltene HCMV-Genom mittels einer von Warming und Kollegen veröffentlichten Methode gezielt modifiziert (Warming *et al.*, 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode zur Insertion des IE1_{TMY}⁻, SIINFEKL- bzw. SIINFEKA Peptides in das UL83-Gen verwendet. Für die Rekombination zwischen BACmid und linearem PCR-Produkt in *E.coli* wurde der Bakterienstamm SW102 genutzt. Dieser Stamm enthält neben den Genen des Phagen λ auch ein inkomplettes *E.coli* Galaktose Operon. Das Rekombinationssystem des Phagen Lambda besteht aus der 5'-3'

Exodeoxyribonuklease Exo, dem ssDNA bindenden Protein Bet und dem Inhibitor des *E.coli* RecBCD-Komplexes Gam. Exo und Bet prozessieren lineare dsDNA und der gebildete DNA-Protein Komplex kann mit homologer ssDNA rekombinieren. Gam inhibiert die Exonukleaseaktivität des RecBCD-Komplexes, wodurch der Abbau der linearen dsDNA verhindert wird. Die Produktion dieser drei Phagenproteine in *E.coli* ermöglicht es, synthetische lineare DNA (z.B. PCR-Produkte) in episomale und chromosomale DNA zu integrieren. Das *gal*-Operon kodiert vier Proteine- *GalE*, *GalT*, *GalK* und *GalM*. Diese Proteine ermöglichen Bakterien das Wachstum auf Medium, das nur Galaktose als Kohlenstoffquelle enthält. Der Bakterienstamm SW102 besitzt ein *gal*-Operon, bei dem das Gen, das für die Galaktokinase (*GalK*) kodiert, fehlt. Daher sind diese Bakterien nicht in der Lage auf Medium mit Galaktose als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen. In einem ersten Schritt wurde die Sequenz für das *galK*-Gen an der gewünschten Insertionsstelle im BAC durch homologe Rekombination eingeführt. Diese Insertion ermöglicht es den Bakterien auf Minimalmedium, das mit Galaktose supplementiert wurde, zu wachsen (positive Selektion). In einem zweiten Schritt wurde das *galK*-Gen im BAC mittels homologer Rekombination durch die Sequenz des zu inserierenden Peptides ersetzt. Zur Negativselektion wurden die Bakterien auf Minimalmedium ausplattiert, das neben Glycerin auch DOG als Kohlenstoffquelle enthält. Das *galK*-Gen katalysiert unter normalen Bedingungen die Phosphorylierung von Galaktose zu Galaktose-1-Phosphat. Aber es ist auch in der Lage, DOG zu phosphorylieren. Dadurch entsteht das Produkt 2-Desoxy-Galaktose-1-Phosphat, das nicht weiter umgewandelt werden kann. Aufgrund der Toxizität dieses Produktes sterben Bakterien, die das *galK*-Gen besitzen, auf dem entsprechenden Minimalmedium ab (negative Selektion).

Durchführung:

Zur Insertion des *galK* an die gewünschte Stelle in der Zielsequenz wurde zunächst die *galK* Kasette amplifiziert. Dazu wurden speziell konstruierte Primer verwendet, die am 5'Ende 50 Basen lange Überhänge aufwiesen. Diese Überhänge enthielten DNA-Abschnitte, die zu den die Insertionsstelle flankierenden Bereichen in UL83 homolog waren. Als *Template* dienten 2 ng des *galK* Plasmides. Zur Entfernung restlicher *Template* DNA wurde das PCR Produkt mittels *DpnI* verdaut, mittels eines 1,5%igem Agarosegels elektrophoretisch aufgetrennt und eluiert. Das extrahierte PCR Produkt wurde anschließend über eine Qiagen Säule (Qiagen, Hilden) aufgereinigt, in einem

möglichst geringen Volumen H₂O aufgenommen und die Konzentration mittels NanoDrop bestimmt.

Für die positive Selektion wurde 50 ml LB-Medium (12,5 µg/ml Chloramphenicol) mit 1-1,5 ml einer üN-Kultur des *E.coli* SW102 Stammes versetzt, der das pHB5 BACmid enthält, und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bei 32°C kultiviert. 25 ml der Kultur wurden einem Hitzeschock bei 42°C für 15 Minuten unterzogen. Der Rest der Kultur wurde weiterhin bei 32°C inkubiert. Nach 15 Minuten wurden beide Proben - induziert und nicht induziert – unverzüglich in ein Eiswasserbad überführt, sorgfältig abgekühlt und jeweils in ein bereits vorgekühltes 50 ml Reaktionsgefäß transferiert. Die Bakterien wurden im Folgenden für 6 min bei 4.500 rpm und 0°C in einer Megafuge 2.0 pelletiert und das Pellet in 1 ml eiskaltem ddH₂O gelöst. Bei diesem Schritt war es wichtig, das Pellet nicht durch pipettieren sondern durch Schwenken im Eiswasserbad zu resuspendieren. Nach dem Lösen wurden 19 ml eiskaltes ddH₂O hinzugegeben und die Bakterien erneut zentrifugiert. Nach einem zweiten Waschschrift wurde der Überstand komplett abgenommen und das Pellet in der zurückbleibenden Flüssigkeit durch schwenken resuspendiert. Für die Transformation wurden 25 µl der elektrokompetenten SW102 mit dem pHB5 BACmid verwendet. Die Elektroporation wurde in einer 0,2 cm Küvette der Firma Biorad (München) bei 25 µF, 1,75 kV und 200 Ω durchgeführt. Nach der Transformation von 150 ng des PCR Produktes wurden die Bakterien in 1 ml LB-Medium für eine Stunde unter moderatem Schütteln weiter inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Bakterien dreimalig in 1 ml 1 x M9 Medium gewaschen. Dazu wurden die Bakterien für 20 sec bei 13.200 rpm in einer Eppendorfszentrifuge pelletiert, der Überstand mit einer Pipette abgenommen und das Pellet wieder in 1 ml 1 x M9 Medium aufgenommen. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Nach dem dritten Waschschrift wurde das Pellet in 500 µl M9 Medium aufgenommen und die Bakterien in verschiedenen Verdünnungsstufen ausplattiert (100 µl unverdünnt, 100 µl 1:10 und 100 µl 1:100). Hierbei wurden M63 Minimalmedium Platten verwendet, die Galaktose, Leucin, Biotin und Chloramphenicol enthielten. Die Platten wurden für drei bis vier Tage bei 32°C inkubiert. Nach dieser Zeit wurde ein Verdünnungsausstrich von 20 Kolonien auf MacConkey Indikator Platten (Becton Dickinson, Heidelberg) mit Galaktose und Chloramphenicol durchgeführt und für einen weiteren Tag bei 32°C inkubiert. Zur Überprüfung der erfolgreichen Selektion wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt (Kapitel 2.6.7.2).

Zum Austausch der *galk* Kasette gegen die gewünschte Zielsequenz wurde eine negative Selektion durchgeführt. Zur Amplifizierung des PCR-Produktes wurden auch

hier speziell konstruierte Primer verwendet, die 50-70 bp lange Überhänge aufwiesen, die homolog zu den der Insertionsstelle benachbarten DNA-Abschnitten in UL83 waren. Als *Template* diente das Plasmid pK65-1. Nach der PCR wurde die restliche *Template* DNA mittels *DpnI* Verdau entfernt und das PCR-Produkt für die Transformation aufgereinigt (s.o.).

Für die negative Selektion wurde 50 ml LB-Medium (12,5 µg/ml Chloramphenicol) mit 1-1,5 ml einer Übernachtskultur des *E.coli* SW102 Stammes versetzt, der das pHB5 + galK enthielt, und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bei 32°C kultiviert. Der anschließende Hitzeschock und die Waschschriffe wurden analog zur positiven Selektion bei gleichen Elektroporations-Bedingungen durchgeführt. Lediglich die Konzentration des verwendeten PCR-Produktes für die Transformation war unterschiedlich. Im Gegensatz zur positiven Selektion wurden bei der negativen Selektion 300 ng DNA verwendet. Die Bakterien wurden zunächst für eine Stunde bei 32°C in 1 ml Antibiotika-freiem LB-Medium inkubiert. Anschließend wurde dieser Ansatz in 10 ml vorgewärmtes Antibiotika-freies LB-Medium überführt und für weitere viereinhalb Stunden bei 32°C geschüttelt. Danach wurden die Bakterien analog wie bei der positiven Selektion gewaschen. Nach dem dritten Waschschriff wurde das Pellet in 500 µl M9 Medium resuspendiert und die Bakterien in verschiedenen Verdünnungen ausplattiert (100 µl unverdünnt, 100 µl 1:10 und 100 µl 1:100). Dabei wurden M63 Minimalmedium Agar-Platten verwendet, die mit Glycerol, Biotin, Leucin, DOG und Chloramphenicol supplementiert waren. Die Platten wurden für drei bis vier Tage bei 32°C inkubiert. Nach dieser Zeit wurden wiederum Verdünnungsausstriche von 20 Kolonien auf LB-Platten mit Chloramphenicol hergestellt und für weitere 24 Stunden bei 32°C inkubiert. Zur Überprüfung der erfolgreichen homologen Rekombination wurden 15 bis 20 Kolonien mittels Kolonie-PCR getestet (Kapitel 2.6.7.2). Drei der positiven Klone wurden im Folgenden mittels BAC DNA Restriktionsanalyse (Kapitel 2.6.13) und DNA Sequenzierung (Kapitel 2.6.9) weiter analysiert.

2.6.13 BAC DNA Restriktionsanalyse

Zur Spaltung von Nukleinsäuren wurden Typ I Restriktionsendonukleasen verwendet. Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Enzyme von NEB (Ipswich, MA, USA) bezogen und nach Angaben des Herstellers eingesetzt.

2.6.14 Northern Blot**RNA-Gel**

Reagenzien	Konzentrationen
10 x FA-Puffer	41,86 g MOPS; 4,1 g Na-Acetat; 3,72 g EDTA; 800 ml H ₂ O _{DEPC} mit 10 M NaOH auf pH 7 eingestellt add 1.000 ml H ₂ O _{DEPC} ; autoklaviert
1 x Laufpuffer	Für jedes Gel frisch!!! 200 ml 10 x FA-Puffer; 40 ml 37% Formaldehyd; 1760 ml H ₂ O _{DEPC}
RNA-Auftragspuffer	80 µl 0,5 M EDTA, pH 8; 720 µl 37% Formaldehyd; 2 ml Glycerin (steril); 3 ml Formamid; 4 ml 10 x FA-Puffer; 100 µl H ₂ O _{DEPC} ; 1 Spatelspitze Bromphenolblau

Blot

Reagenzien	Konzentrationen
20 x SSC_{DEPC}	3 M NaCL; 0,3 M Na-Citrat mit HCl 8,3% auf pH 7 eingestellt 0,1% DEPC; üN gerührt; autoklaviert
10 x SSC_{DEPC}	1,5 M NaCL; 0,15 M Na-Citrat mit HCl 8,3% auf pH 7 eingestellt 0,1% DEPC; üN gerührt; autoklaviert

Hybridisierung

Reagenzien	Konzentrationen
Church-Buffer	35 g SDS; 124,5 ml 20 x SSC _{DEPC} ; 100 ml 10 x Blockingreagens _{DEPC} ; 5 ml 10% N-L-Sarkosyl; 25 ml 1 M NaHPO ₄ , pH 7; 250 ml Formamid deionisiert, add 500 ml H ₂ O _{DEPC}

Detektion

Reagenzien	Konzentrationen
Wash I	100 ml 20 x SSC; 10 ml 10% SDS add 1.000 ml H ₂ O
Wash II	25 ml 20 x SSC; 10 ml 10% SDS; add 1.000 ml H ₂ O
Wash III	1 l Puffer 1; 3 ml Tween 20
Puffer 1 (Maleinsäure Puffer)	0,1 M Maleinsäure; 0,15 M NaCl; mit 10 M NaOH auf pH 7,5 eingestellt add 1.000 ml H ₂ O
Puffer 2	10 ml 10 x Blocking _{DEPC} ; 90 ml Puffer 1
Puffer 3 (pH 9,5)	25 ml 2 M Tris-HCl; 50 ml 1 M NaCl add 1.000 ml H ₂ O; mit 1 M NaOH auf pH 9,5 eingestellt autoklaviert
CSPD-Lösung	CSPD Reagenz (Roche) 1:100 in Puffer 3 verdünnt

Northern Blot Analysen wurden mit DIG markierten DNA-Sonden nach Angaben des Roche „DIG Application Manual for Filter Hybridization“ durchgeführt. Die zur Detektion verwendeten, DIG-markierten DNA Fragmente wurden mit Hilfe des „PCR DIG Probe Synthesis Kit“ (Roche, Mannheim) hergestellt. Dabei wurde bei Verwendung von DNA-Sonden bei 50°C in Church-Puffer hybridisiert. Alle Lösungen wurden zur Inaktivierung

von RNAsen entweder direkt mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt (mind. 30 min bei RT gerührt, autoklaviert) oder mit DEPC-behandeltem Wasser angesetzt.

2.7 Biochemische Methoden

2.7.1 Verwendete Antikörper

2.7.1.1 Primärantikörper

Antigen	Name	Quelle	Herkunft	Art	Verdünnung
Aktin		Biotrend, Köln	Kanninchen	polyklonal	WB: 1:2.000
CD4-FITC	GK 1.5	BD Biosciences, Heidelberg	Maus	monoklonal	FACS: 1:200
CD62L- Phycoery thrin	MEL-14	Immunotools, Friesoythe	Maus	monoklonal	FACS: 1:400
Flag Tag	M2	Sigma, München	Maus	monoklonal	IF: 1:500
gB	27-287	Dr. W. Britt, Birmingham, USA (Utz <i>et al.</i> , 1989)	Maus	monoklonal	WB: unverdünnt
hnRNPU	3G6	Santa Cruz, Heidelberg	Maus	monoklonal	WB: 1:100- 1:1.000
IE1	p63-27	(Andreoni <i>et al.</i> , 1989)	Maus	monoklonal	IF: unverdünnt
MCP	28-4	Dr. W. Britt, Birmingham, USA	Maus	monoklonal	IF: unverdünnt WB: 1:2
pp28	41-18	Dr. W. Britt, Birmingham, USA	Maus	monoklonal	IF:

(Meyer <i>et al.</i> , 1988)					unverdünnt
pp65	65-33	Dr. W. Britt, Birmingham, USA	Maus	monoklonal	IF: 1:10 WB: 1:500
pp71	CMV 355	Prof. T. Shenk, New Jersey, USA	Maus	monoklonal	IF: unverdünnt
	vC-20	Santa Cruz, Heidelberg	Ziege	polyklonal	WB: 1:200
pp150	XP1	Siemens Health Care; Marburg (Jahn <i>et al.</i> , 1990)	Maus	monoklonal	IF: 1:500 WB: 1:500
UL69	69-66	Dr. W. Britt, Birmingham, USA	Maus	monoklonal	IF: unverdünnt WB: 1:5

2.7.1.2 Sekundärantikörper

Antigen	Modifikation	Organismus	Quelle	Verdünnung
Maus IgG	FITC	Kanninchen	Dako, Hamburg	IF: 1:50
Maus IgG	TRITC	Kanninchen	Sigma, Taufkirchen	IF: 1:100
Kanninchen Immunglobuline	FITC	Schwein	Dako, Hamburg	IF: 1:20

Maus IgG	IR800	Kanninchen	Biotrend, Köln	WB: 1:5.000- 1:10.000
Kanninchen Immunglobuline	IR600	Ziege	Biotrend, Köln	WB: 1:10.000
Ziegen Immunglobuline	IR800	Affe	Biotrend, Köln	WB: 1:5.000

2.7.2 Herstellung von Gesamtzellextrakten

Für die Herstellung von Gesamtzellextrakten wurden die Zellen am Vortag in einer mittleren Zellkulturflasche (75 cm²) mit einer Zellzahl von 8×10^5 Zellen ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Infektion der Zellen mit einer *moi* von zwei. Nach zwei bzw. vier Tagen Inkubation wurde das Medium durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt und die Zellen durch eine Trypsin/EDTA-Lösung von der Oberfläche abgelöst. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe des doppelten Volumens an MEM-Medium mit FKS abgestoppt, nachdem sich 80% der Zellen abgerundet hatten. Es folgte die Zellzahlbestimmung mit der Neubauer Zählkammer. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 3.500 rpm in einer Eppendorfszentrifuge für 3 min bei 4°C pelletiert. Das Zellpellet wurde in einem definierten Volumen an SDS-Probenpuffer aufgenommen, so dass eine Zellsuspension mit einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/10 µl entstand. Die Zellextrakte konnten anschließend für Analysen mittels SDS-PAGE und Western Blot verwendet werden.

2.7.3 Durchflusszytometrie/Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie ist es möglich, Partikel in einem Flüssigkeitsstrom zu zählen und sie gleichzeitig auf physikalische und molekulare Eigenschaften zu untersuchen. Durch die Verwendung von Antikörpern, die mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, können Oberflächenmoleküle und intrazelluläre Proteine quantitativ nachgewiesen werden.

Die Durchflusszytometrie wurde angewendet, um den Anteil bestimmter Lymphozyten-Populationen in Organen von Versuchstieren zu bestimmen. Dazu wurden 1×10^6 Zellen in PBS gewaschen und anschließend für 15 min in 100 µl Antikörperlösung bei 4°C inkubiert. Zur Entfernung des Antikörpers wurden die Zellen im Anschluss einmalig mit PBS gewaschen und das Zellpellet in 100 µl PBS

resuspendiert. Alle durchflusszytometrischen Analysen erfolgten mit dem Durchflusszytometer *FacsCanto* (BD Bioscience, Heidelberg). Zur Auswertung der Daten wurde die *Software Cellquest Pro* (BD Biosciences, Heidelberg) verwendet.

2.7.4 Gelelektrophorese

2.7.4.1 Herstellung der Gele

Reagenzien	8% Trenngel	10% Trenngel	Sammelgel
Gel 30 (Acrylamid)	6,7 ml	8,3 ml	2,1 ml
Tris 1,5 M pH 8,8	6,25 ml	6,25 ml	
Tris 1,0 M pH 6,8			1,5 ml
10% SDS	250 μ l	250 μ l	125 μ l
10% APS	250 μ l	250 μ l	125 μ l
H₂O	11,6 ml	10 ml	8,65 ml
TEMED	15 μ l	15 μ l	15 μ l

2.7.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Reagenzien	Konzentrationen
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1% (w/v) SDS
SDS-Probenpuffer	125 mM Tris; 2% (v/v) β -Mercaptoethanol; 10% (v/v) Glycerin; 1 mM EDTA; 0,005% (w/v) Bromphenolblau; 2% (w/v) SDS

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurden Polyacrylamid-Gele verwendet. Durch Zugabe von SDS (Sodium-Dodecylsulfat), einem anionischen Detergenz, welches an hydrophobe Aminosäuren (AS) bindet, werden die zu trennenden Proteine negativ maskiert. Die Eigenladung kann somit vernachlässigt werden und die Proteine wandern, aufgrund der angelegten Spannung, zur positiv geladenen Anode. Eine Auftrennung erfolgt nur nach Größe, wobei Proteine mit hohem

Molekulargewicht langsamer wandern als Proteine mit geringem Molekulargewicht. Es wurde ein System verwendet, bei welchem zunächst alle Proteine ein Sammelgel durchlaufen und synchron durch einen Konzentrations- und pH-Sprung in das darunter liegende Trenngel einlaufen (Laemmli, 1970). Die Prozentigkeit der Trenngele richtete sich nach dem Molekulargewicht der zu analysierenden Proteine und lag bei 8-10%. Vor dem Auftrag wurden die Proben 1:2 mit SDS-Probenpuffer (+2% β -Mercaptoethanol) versetzt, der zur Denaturierung der Proteine und Reduktion aller Disulfidbrücken der Proteine führt. Alle Proben wurden anschließend für 10 min bei 95°C aufgeköcht. Zum Abgleich der Proteingröße wurde der „Protein Marker IV“ (PeqLab, Erlangen) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 50 V \ddot{u} N. Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine zur weiteren Analyse mittels Coomassie Brilliant Blue (Kapitel 2.4.7.3) angefärbt oder auf eine PVDF Membran transferiert (Western Blot; Kapitel 2.7.4.4).

2.7.4.3 Coomassie-Färbung

Reagenzien	Konzentrationen
Stammlösung 1	5% Coomassie Brilliant Blue G-250 (1 g/20 ml) in H ₂ O
Stammlösung 2	2% (w/v) Phosphorsäure (10 g/500 ml); 10% Ammoniumsulfat (50 g/500 ml)
Stammfärbelösung	0,1% Stammlösung 1 in Stammlösung 2 (0,5 ml/500 ml)
TCA Lösung	12% TCA (24 g/200 ml) in H ₂ O
Färbelösung (frisch hergestellt)	80 ml Stammfärbelösung + 20 ml Methanol

Die Proteinbanden wurden nach der Auftrennung durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Dazu wurden die Gele zunächst für 30 bis 60 min in einer 12%igen TCA-Lösung fixiert. Es folgten zwei Waschschriffe für je 10 min in H₂O. Die Färbung erfolgte in der jeweils frisch angesetzten Färbelösung, bis eine intensive Anfärbung der Banden zu erkennen war. Die Gele wurden wiederum zweimal für 10 min in H₂O gewaschen und anschließend für eine Stunde in 25% Methanol entfärbt. Zur Entfernung von Methanol wurden die Gele wiederum zweimal für 10 min in H₂O gewaschen. Das

Proteinmuster der Gele wurde in ausgewählten Fällen mittels des Odyssey Scanners eingelesen.

2.7.4.4 Western-Blot (Odyssey-System)

Reagenzien	Konzentrationen
Western Blot Transferpuffer	25 mM Tris; 192 mM Glycin; 10% (v/v) Methanol
PBS Tween	PBS + 0,2% (v/v) Tween-20
Blocking Puffer	PBS + 5% Milchpulver

Zum Nachweis von Proteinen mit spezifischen Antikörpern wurde das Verfahren des Western-Blots eingesetzt. Zum Transfer der in der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Trägermembran wurde ein „Semi-Dry-Verfahren“ angewendet. Die Gele wurden nach der Gelelektrophorese kurz in Wasser gewaschen und anschließend für 10-20 min in Transferpuffer equilibriert. Die PVDF Membran wurde für 5 min in Methanol aktiviert, danach kurz in Wasser geschwenkt und für mindestens 10 min in Transferpuffer equilibriert. Die Gele wurden anschließend eindreiviertel Stunde bei 400 mA geblottet. Während des Vorgangs befanden sich die Nitrozellulose-Membran und das SDS-Gel zwischen je drei Lagen Whatman-Filterpapier.

Nachweis von immobilisierten Proteinen mittels Antikörpern

Zum Nachweis von auf Nitrozellulose-Trägermembranen immobilisierten Proteinen wurden Primärantikörper eingesetzt, die mit Hilfe von Fluoreszenz-markierten, polyklonalen Sekundärantikörpern dargestellt werden konnten.

Die Nitrozellulose-Membran wurde zunächst für ein bis zwei Stunden bei RT getrocknet. Vor der Blockierung wurde die Membran kurz in Methanol geschwenkt, mit H₂O gespült und einige Minuten in PBS equilibriert. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte eine Inkubation für eine Stunde bei RT in PBS mit 5% Milchpulver. Es folgte die Inkubation mit dem in Blocking Puffer + 0,1% Tween verdünnten Erstantikörper μ N bei RT. Nicht gebundene Primärantikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit PBS + 0,2% Tween für jeweils 10 min entfernt, bevor der (verdünnt in Blocking Reagenz + 0,1% Tween + 0,01% SDS) Fluoreszenz-markierte, polyklonale Sekundärantikörper für zwei Stunden bei RT zugegeben wurde. Die

Membran wurde erneut dreimal mit PBS + 0,2% Tween und einmal für 10 min mit PBS gewaschen.

Der Nachweis der Fluoreszenz-markierten Zweitantikörper erfolgte mit dem Odyssey Scanner.

2.7.5 Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinmenge in Lösungen wurde das BCA-Assay Kit (Pierce, IL, USA) verwendet. Der Nachweis basiert dabei auf der Biuret-Reaktion, bei der Cu^{2+} in Cu^{1+} umgewandelt wird. Die entstehenden Cu^{1+} -Ionen bilden mit Bizinchoninsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex, dessen Absorption bei 540 nm mit Hilfe eines Photometers quantifiziert werden kann. Je 10 μl Proteinlösung wurde in einer 96-Well-Platte mit 200 μl Reagenz-Lösung versetzt und nach 30 min Inkubation bei 37°C bei 540 nm photometrisch mittels eines ELISA-Lesegerätes gemessen. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt. Anhand einer Eichgerade mit Rinderserumalbumin (BSA-Konzentration zwischen 0,025-2 mg/ml) wurde die Proteinkonzentration der Proben ermittelt.

2.7.6 Fluoreszenzmarkierung zellulärer Proteine

2.7.6.1 Indirekter Nachweis

Mit der indirekten Immunfluoreszenz (IFA) lassen sich strukturegebundene Proteine in Zellpräparaten spezifisch und mit einer hohen Auflösung darstellen. Die Verwendung eines spezifischen Primärantikörpers und eines Fluorochrom-markierten Spezies-spezifischen Sekundärantikörpers bewirken eine Verstärkung der Fluoreszenzintensität.

2.7.6.2 Direkter Nachweis

Bei der direkten Fluoreszenz wurden Proteine über ihren EGFP- Fusionsanteil direkt nachgewiesen.

Die Darstellung des Zellkerns erfolgte mit Hoechst-Farbstoff DAPI (4,6-Diamidio-2-Phenylindol), der spezifisch DNA anfärbt (Tanious *et al.*, 1992).

2.7.6.3 Immunfluoreszenz

Zur Untersuchung von infizierten bzw. transfizierten Zellen wurden die Zellen einen Tag vor der Behandlung auf Deckgläschen ausgesät. Die Deckgläschen wurden zuvor

mit Aceton behandelt, um eine gute Adhäsion der Zellen zu gewährleisten. Nach der Fixierung und Permeabilisierung der Zellen mit 90% Aceton üN bei 4°C wurden für die fluoreszenzmikroskopische Darstellung der zu untersuchenden Proteine die Zellen zunächst dreimal mit PBS + 0,1% Triton gewaschen. Die Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper erfolgte für eine Stunde bei 37°C in einer feuchten Kammer. Anschließend wurden die Deckgläschen erneut dreimal mit PBS + 0,1% Triton gewaschen. Die Inkubation mit dem Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper erfolgte für 30 bis 60 min bei 37°C in einer feuchten Kammer. Unmittelbar anschließend wurden die Präparate für 10 min mit dem Kernfarbstoff DAPI im Dunkeln inkubiert und nach dreimaligem Waschen mit PBS + 0,1% Triton und einmaligem Waschen mit H₂O in Mowiol + Bleichschutz eingebettet.

2.7.6.4 Fluoreszenzdetektion mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie

Zur Analyse der subzellulären Verteilung einzelner Proteine in der virusinfizierten Zelle wurde die konfokale Laser Scanning Mikroskopie eingesetzt. Im Gegensatz zur konventionellen Epifluoreszenzmikroskopie erreicht man mit der Fluoreszenzdetektion mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie eine höhere optische Auflösung und es besteht die Möglichkeit, optische Schnitte und Serienschnitte (*Stacks*) anzufertigen. Unter Einsatz eines Laserstrahls wird monochromatisches Licht in die Probe fokussiert. Der Scanner tastet die Probe in X-Y Richtung Punkt für Punkt ab, wodurch ein optischer Schnitt des Objekts erzeugt wird. Durch Verschiebung des Scanners in Z-Richtung können Serienschnitte aufgenommen werden, die eine dreidimensionale Abbildung des Objekts ermöglichen. Das emittierte Fluoreszenzlicht wird gesammelt und nach Passage verschiedener Filtersysteme und einer konfokalen Blende an den Detektor (Photomultiplier) weitergeleitet. Die konfokale Blende, die dem Detektor direkt vorgeschaltet ist, verhindert die Detektion von Streulicht aus anderen Objektebenen.

2.7.7 Koimmunpräzipitation

Reagenzien	Konzentrationen
SDS-Probenpuffer	125 mM Tris; 2% (v/v) β -Mercaptoethanol; 10% (v/v) Glycerin; 1 mM EDTA; 0,005% (w/v) Bromphenolblau; 2% (w/v) SDS
KoIP-Lysispuffer	50 mM Tris HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 0,5% NP40; add 10 ml bidest H ₂ O; frisch zugeben: 1 Complete, Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablette und 1 PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets (Roche, Mannheim)

Protein-G Dynabeads

Zur Analyse intermolekularer Wechselwirkungen unter physiologischen Bedingungen können Proteinkomplexe aus Zellen mittels spezifischer Antikörper immunpräzipitiert werden. Potenzielle Interaktionspartner des präzipitierten Proteins können anschließenden mittels Massenspektrometrie spezifisch nachgewiesen und als Komponente dieses zellulären Proteinkomplexes identifiziert werden. Zur Analyse des Gehaltes der DNA, die mit dem Proteinkomplex kopräzipitiert werden konnte, wurde dieser mit Hilfe einer anschließenden TaqManTM PCR (Kapitel 2.6.10) bestimmt.

Durchführung:

HFF wurden in einer Zellkulturflasche (175 cm²) ausgesät, nach 24 Stunden mit einer *moi* von eins infiziert und weitere 96 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und abtrypsinisiert. Für die Koimmunpräzipitation wurde eine Zellzahl von 3x10⁶ Zellen (Massenspektrometrie) bzw. 0,5 und 1 Mio Zellen (TaqManTM PCR) verwendet. Die Zellen wurden bei 3.000 rpm für 5 min bei 4°C in einer Eppendorfzentrifuge pelletiert und das Pellet in 500 μ l kaltem KoIP-Lysispuffer resuspendiert. Durch eine Inkubation für 20 bis 30 min auf einer Wippe bei 4°C wurden die Zellen permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen durch Ultraschallbehandlung (1 min, *Output control*: 30%) vollständig aufgeschlossen und Zelltrümmer bei 4°C pelletiert (14.000 rpm, 10 min, in einer Eppendorfzentrifuge).

Für die Immunpräzipitation wurde der Überstand mit dem entsprechenden Antikörper für 90 min bei 4°C unter Drehen inkubiert. Dabei wurde bei Verwendung des monoklonalen pp65-33 Antikörpers ein Volumen von 100 µl eingesetzt. Der Ansatz wurde nach dieser Inkubation für 10 min bei 14.000 rpm und 4°C in einer Eppendorffzentrifuge zentrifugiert, um unspezifische Aggregate zu pelletieren. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Zur Ausbildung präzipitierbarer Antikörperkomplexe wurden 50 µl Protein-G-*Dynabeads* zugegeben und für mindestens eine Stunde bei 4°C invertierend inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze dreimal mit KolP-Lysispuffer und dreimal mit PBS gewaschen.

Je nach Fragestellung wurden die präzipitierten Komplexe mittels Massenspektrometrie oder mit TaqMan™ PCR analysiert.

2.7.8 Massenspektrometrie

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten massenspektrometischen Analysen wurden mit freundlicher Unterstützung von Dr. Stefan Tenzer am Institut für Immunologie an der Universitätsmedizin Mainz anhand eines publizierten Protokolls durchgeführt (Krämer-Albers *et al.*, 2007). Kurz zusammengefasst wurden die *Beads* aus der Koimmunpräzipitation zunächst üN bei 37°C mit Trypsin behandelt. Die Auftrennung der mit Trypsin verdauten Peptide erfolgte mit Hilfe eines *Waters NanoAcquity UPLC* Systems, das mit 75 µm x 150 mm BEH C18 RPRP Säulen und einer 2,6 µl PEEKSIL-*sample loop* (SGE, Darmstadt, Germany) ausgestattet war. Alle Analysen der Proben erfolgten in Dreifach-Bestimmung.

Die massenspektrometische Analyse der Peptide erfolgte mit Hilfe eines *Waters Q-TOF Premier API* Systems unter Verwendung eines Massenaufklärungsvermögens von 10000. Der *lock mass* Kanal wurde alle 30 sec abgetastet. Das Massenspektrometer wurde mit einer [Glu¹] Fibrinopeptid Lösung (300 fmol/ml) kalibriert. Die Datenbank-Analyse und Identifizierung der Proteine erfolgte mit Hilfe der „*Identity Search Engine of PLGS 2.3*“ Software. Alle Messergebnisse, die eine Häufigkeit von über 1% bezogen auf die Gesamtmeßgröße erreichten, wurden als signifikant bewertet. Die Auswertung basierte auf einer umgekehrten Datenbankanalyse, die automatisch durch die Verwendung von PLGS 2.3 generiert wurde.

2.7.9 *In vitro* Kinase Assay (IVKA)

Reagenzien	Konzentrationen
RIPA-Lysispuffer	10 mM Tris/Cl pH 7,5; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1% Triton X-100; 1% Na-Desoxycholat; 0,1% SDS vor der Lyse komplementiert mit: Inhibitor-Mix (10 mM NaF; 2 mM Na-Ortho-Vanadat; 1 mM PMSF; 10 µg/ml Aprotinin)
HNTG Waschpuffer	50 mM HEPES pH 7,5; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 10% Glycerin, 0,1% Triton
Kinase-Basispuffer	20 mM Tris pH 7,5; 0,5 mM MnCl ₂
Kinase-Assaypuffer	= Kinase-Basispuffer mit 1 µM ATP; 1 mM DTT; 1-5 µl Ci [γ- ³³ P]-ATP
Protein-A Sepharose Beads	50 mg/ml in RIPA-Lysispuffer

Zur Untersuchung potentieller Unterschiede in der Phosphorylierung von Proteinen in infizierten Zellen durch die virale Kinase pUL97 wurden HFF mit einer *moi* von 0,25 mit verschiedenen Virusstämmen infiziert. Dabei erfolgte bei einzelnen Ansätzen die Zugabe von 2 µM spezifischer Inhibitoren (Kapitel 2.4.2.2). Vier Tage nach der Infektion wurden 50 mg/ml Protein-A Sepharose *Beads* für zwei Stunden bei 4°C in RIPA-Lysispuffer aufgequollen. Am darauf folgenden Tag (5 d p.i.) wurde das Medium von den Zellen entfernt und die Zellen mit frischem Medium resuspendiert und somit vom Boden des Kulturgefäßes gelöst. Es folgte ein Waschschrift mit PBS und anschließender Zentrifugation. Das Zellpellet wurde in 500 µl RIPA-Lysispuffer, der zuvor mit dem Inhibitormix frisch komplementiert wurde, resuspendiert. Zur Lyse der Zellen wurde der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Das Zelllysate wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für 30 min bei 14.000 rpm bei 4°C in einer Eppendorfszentrifuge zentrifugiert. Das Lysat wurde vorsichtig abgenommen und für die Koimmunpräzipitation verwendet. Für die Präzipitation wurde das Lysat mit 100 µl Protein-A Sepharose *Beads* und mit dem spezifischen Antikörper versetzt und für mindestens zweieinhalb Stunden auf einem Drehrad bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die *Beads* für 2 min bei 10.000 rpm und 4°C in einer Eppendorfszentrifuge

pelletiert. Es folgten zwei Waschschrirte mit je 500 μl HNTG Waschpuffer und zwei Waschschrirte mit je 500 μl Kinase-Basispuffer. Zur nachfolgenden Analyse der Kinaseaktivität wurden zu den zuvor gewaschenen *Beads* 40 μl Kinase-Assaypuffer und 2.5 μCi Probe [γ - ^{33}P] ATP zugegeben. Der Ansatz wurde für 30 min bei 30°C im Schüttler inkubiert. Die Reaktion wurde nach 30 min durch Zugabe von 15 μl SDS-Probenpuffer (4x) abgestoppt und für 10 min bei 100°C erhitzt. Die Analyse der Proben erfolgte mittels SDS-PAGE und Western-Blot Analysen. Die Detektion der radioaktiven Signale erfolgte mittels Autoradiographie auf Biomax MR-Filmen oder per Phosphoimager. Als positive Kontrolle für die Aktivität der viralen Kinase pUL97 wurden zu dem Kinase-Reaktionsansatz 0,5 μl eines Histonemixes zugegeben (Roche, Mannheim).

2.8 Immunologische Methoden

2.8.1 Tierversuche

2.8.1.1 Versuchstiere

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingesetzten Versuchstiere wurden in der Zentralen Versuchstiereinrichtung der Universitätsmedizin Mainz und der Johannes Gutenberg-Universität Mainz unter *specified-pathogen-free* (SPF)-Bedingungen gezüchtet. Alle Tierversuche wurden im Rahmen des Tierversuchsvorhabens (AZ 1.5 177-07-04/051-61) durchgeführt. Für alle Tierversuche wurden ausschließlich weibliche Tiere im Alter zwischen acht und zwölf Wochen verwendet.

Versuchstierstamm	Versuche
Balb/c-Mäuse (Haplotyp H-2 ^d)	Neutralisierende Antikörper; Anlage und Restimulierung von CD4 T-Zellen
C57BL/6-Mäuse	Anlage und Restimulierung Peptid-spezifischer CD8 T-Zellen (SIINFEKL-Peptid)
C57BL/6 HHD Mäuse	Anlage und Restimulierung Peptid-spezifischer CD8 T-Zellen (pp65- und IE1-Peptid)

2.8.1.2 Immunisierung von Mäusen

Zur Durchführung einer intraperitonealen Immunisierung wurden jeweils 6 μg DB (zur Analyse der CD8 T-Zellantworten) bzw. 20 μg DB (zur Analyse der CD4 T-Zell- bzw.

Neutralisierenden Antikörper-Antworten) in 500 µl PBS gelöst. Dieses Gemisch wurde vor der Verwendung für 2 min mit UV-Licht einer Wellenlänge von 254 nm in einer Tüpfelplatte bestrahlt. Alle Immunisierungen erfolgten ohne Narkose und die Antigene wurden ohne die Zugabe von Adjuvantien verabreicht.

2.8.1.3 Isolierung von Lymphozyten aus der Milz

Zur Isolierung von Lymphozyten wurden die Versuchstiere am Tag acht nach Immunisierung getötet und die Milzen entnommen. Die Entnahme der Milzzellen erfolgte unter sterilen Bedingungen. Die Milzen wurden in ein mit RPMI gefülltes Röhrchen überführt und anschließend mit dem Stempel einer Einmalspritze auf einem sterilen Metallsieb zerrieben. Dieses Zellhomogenat wurde in einer Petrischale (Ø 6 cm), in die bereits RPMI Medium vorgelegt worden war, aufgefangen. Durch sukzessive Passage des Zellhomogenats durch zwei Zellsiebe (100 µm, 40µm) wurden verbleibende Gewebepartikel entfernt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 5 min bei 1.500 rpm in einer Megafuge 2.0. Die Zellen wurden erneut in 10 ml RPMI-Medium aufgenommen und wiederum bei 1.500 rpm für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 10 ml RPMI-Medium pro Milz resuspendiert, die Zellzahl bestimmt und die Zellen auf die benötigte Konzentration eingestellt.

Für den Nachweis der CD4 T-Zell Antwort wurden die Zellen einer Einzelzellsuspension in Erythrozyten-Lysepuffer (2 ml/Milz) aufgenommen und für 90 sec unter stetiger Bewegung inkubiert. Dabei werden die Erythrozyten durch osmotische Lyse zerstört, während andere Zellen überleben. Anschließend wurden die Zellen 2x mit Medium gewaschen, um den Lysepuffer aus der Zellsuspension zu entfernen.

2.8.1.4 Immunomagnetische Anreicherung von CD8 T-Zellen

Reagenzien	Konzentrationen
MACS-Puffer	0,5% PBS; 2 mM EDTA in 1 Liter PBS gelöst und anschließend sterilfiltriert

Zur Analyse der CD8 T-Zell Antwort wurde die CD8⁺ Fraktion aus Gesamt-Milzzellen immunomagnetisch angereichert. Hierzu wurden jeweils 3×10^8 Zellen aus dem Zellhomogenat eingesetzt. Diese wurden in 90 µl MACS-Puffer pro 10^7 Zellen resuspendiert. Die Zellen wurden zunächst mit paramagnetischen, an CD8α-spezifische Antikörper gekoppelte MACS *Micro Beads* (10 µl *Beads*/ 90 µl MACS-

Puffer/ 10^7 Zellen) für 15 min bei 4°C inkubiert. Eine gute Durchmischung von *Beads* und Zellen wurde durch eine kontinuierliche Bewegung der Proben während der Inkubation erreicht. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 1-2 ml MACS-Puffer pro 10^7 Zellen gewaschen. Die Zellen wurden dabei bei 1.200 rpm für 10 min in einer Megafuge 2.0 pelletiert. Nach diesen Waschschritten wurde der Überstand vollständig entfernt, die Zellen in 500 µl MACS-Puffer pro 10^8 Zellen aufgenommen und auf eine bereits zuvor äquilibrierte *LS Column* Säule (Miltenyi Biotec Systems, Bergisch-Gladbach) gegeben. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.8.1.5 Anlage und Restimulierung Peptid-spezifischer CD8 T-Zellen

Die Kultivierung isolierter T-Zellen erfolgte für einen Zeitraum von ein bis zwei Wochen in Kulturmedium unter Zusatz von Interleukin-2 (IL-2) und unter Zugabe von synthetischen HCMV-Peptiden zur Stimulation der Zellen. Im Anschluss daran wurden die Zellen als Effektoren im ELISpot-Assay (*Enzyme Linked Immuno Spot Assay*) eingesetzt.

Lymphozyten wurden wie unter Punkt 2.8.1.3 beschrieben gewonnen und aufgearbeitet. Nach der Bestimmung der Zellzahl wurden 15×10^6 Milzzellen in einem Volumen von 1,5 ml 10% RPMI-Medium in einer 24-Well-Platte (Costar Corning, Wiesbaden) ausgesät. Es folgte eine Zugabe von 1×10^{-9} M des entsprechenden Peptides. Nach vier Tagen Kultivierung wurden pro Well 0,5 ml frisches 10% RPMI-Medium mit 0,4 ng/ml IL-2 hinzugefügt. Eine Woche nach der Anlage der Milzzellen erfolgte eine erneute Stimulation mit dem jeweiligen synthetischen Peptid. Die Restimulierung erfolgte durch Zugabe von Peptid-beladenen antigen-präsentierenden Zellen (APC). Dabei wurden RMA-S HHD Zellen als APC verwendet. Diese waren zuvor mit 90 Gy bestrahlt worden, um eine Vermehrung in der Kultur zu verhindern. Die APC wurden auf eine Dichte von 5×10^5 Zellen eingestellt und in einem Volumen von 1 ml in einer 24-Well-Platte ausgesät. Die Peptidbeladung der Zellen erfolgte zuvor für 35 min bei 37°. Die polyklonalen CD8 T-Zellen wurden 1:2 gesplittet und in einem Volumen von 1 ml zu den vorgelegten APC gegeben. Dabei wurde das verwendete RPMI-Medium mit 0,1 ng/ml IL-2 ergänzt.

2.8.1.6 Anlage und Restimulierung von CD4 T-Zellen

CD4 T-Zellen wurden aus den Milzzellen von drei Versuchstieren/Gruppe gewonnen. Die Aufarbeitung der Milzen erfolgte wie in Kapitel 2.8.1.3 beschrieben. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Lymphozyten einer Gruppe in einer Konzentration

von 1×10^6 Zellen/ml in RPMI-Medium ausgesät. Die Restimulierung erfolgte unmittelbar mit Kultivierung der Zellen. Hierzu wurden 20 µg der entsprechenden DB oder 50 µl PBS zu den Zellen gegeben. Zur Überprüfung der maximalen Stimulation der isolierten Zellen wurde in Parallelansätzen zusätzlich eine Restimulation mit anti-CD3/anti-CD28 durchgeführt. Dazu wurden die verwendeten 24-Well-Platte für 30 min mit dem anti-CD3 Antikörper bei 37°C inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Platten 3x mit PBS gewaschen. Es erfolgte eine weitere Inkubation von 30 min bis zwei Stunden mit dem anti-CD28 Antikörper bei 37°C. Dieser wurde vor der Zugabe der Zellen durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. 24 Stunden nach Beginn der Restimulierung wurden die Lymphozyten auf die Expression verschiedener spezifischer Oberflächenmarker mittels FACS (Kapitel 2.7.3) analysiert.

2.8.2 Enzyme Linked Immuno Spot Assay

Zur Messung von MHC-Klasse I vermittelter Antigenpräsentation und vom *Priming* einer CD8 T-Zell Antwort im Versuchstier durch rekombinante DB wurde das ELISpot-Verfahren eingesetzt. Dieses Testformat erlaubt die Quantifizierung von T-Zell Aktivierung nach Antigenkontakt über die Messung freigesetzter Zytokine. Dabei dient die Anzahl an Spots im Ansatz als Maß für die Stärke der T-Zell Aktivierung. Im hier eingesetzten ELISpot diente Interferon-γ (IFN-γ) Freisetzung als Messgröße.

Zur Analyse wurden Effektor- und Zielzellen in einer 96-Well-Platte mit Nylonmembranboden kokultiviert, die zuvor mit einem spezifischen IFN-γ-Antikörper beschichtet wurde. Die Freisetzung von IFN-γ durch die Effektorzellen wurde mittels einer Farbreaktion detektiert. Dabei entsprach die Anzahl der Spots der Anzahl der IFN-γ-sezernierenden T-Zellen (Taguchi *et al.*, 1990; Miyahira *et al.*, 1995).

2.8.2.1 ELISpot Analysen von behandelten Zellen mit aufgereinigten DB

Puffer	Konzentrationen
Waschpuffer	PBS + 0,25% (v/v) Tween-20
Puffer für Primärantikörper	Stammlösung A: 1,59 g Na ₂ CO ₃ auf 100 ml H ₂ O Stammlösung B: NaHCO ₃ auf 100 ml H ₂ O Vor dem Versuch wurde je 1 ml beider Stammlösungen mit H ₂ O auf 10 ml aufgefüllt. Der pH-Wert wurde mit Stammlösung B auf 9,6 eingestellt
Puffer für Sekundärantikörper	PBS + 1% (v/v) BSA- Lösung (23,3%; Ortho Diagnostic Systems, Neckargemünd))
Na-Acetatpuffer, 50 mM, pH 5,0	74 ml 0,2 M Essigsäure (11,55 ml Eisessig/l) + 176 ml 0,2 M Na Acetat (27,2 g NaAcetat x 3 H ₂ O/l) auf 1 l H ₂ O

Antikörper	Bezeichnung	Quelle	Endkonzentration
Primärantikörper	Ratte α-Maus- IFN-γ	Biosource	10 µg/ml
	Klon RMMG-1	Europe, Solingen	
Sekundärantikörper	Biotin-gekoppelter	Becton	1 µg/ml
	Ratte α-Maus- IFN-γ Klon XMG 1.2	Dickinson, Heidelberg	

Für das Beschichten einer 96-Well-Nylonmembran-Platte von der Firma Nunc (Wiesbaden) wurde diese mit 50 µl pro Well einer 10 µg/ml Primärantikörperlösung beschichtet und üN bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Platte viermal mit destilliertem Wasser für 15 min gewaschen und anschließend mit 200 µl 10% RPMI-Medium pro Well für mindestens eine Stunde inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. In dieser Zeit wurden die APC gewaschen und auf eine Zellzahl von 1×10^5 Zellen pro Well eingestellt. Die Effektorzellen wurden ebenfalls

gewaschen und auf eine Konzentration von $4,3 \times 10^3$ /ml eingestellt. Bei der Verwendung von 50 μ l Effektorzellen pro *Well* entsprachen diese Konzentration einer Zellzahl von 200 CTL pro *Well*. Nach der Blockierung wurde das Medium entfernt und 50 μ l 10% RPMI-Medium pro *Well* vorgelegt. Jeweils 50 μ l der APC und der Effektorzellen wurde hinzugegeben und für 18 bis 22 Stunden bei 37°C kokultiviert. Dabei wurden alle Ansätze in Triplikaten angesetzt. Nach der Inkubationszeit wurden die Platten zehnmal mit Waschpuffer gewaschen, um die Zellen zu entfernen. Es folgte die Zugabe von 50 μ l des Zweitantikörpers pro *Well* und eine Inkubation für zwei Stunden bei RT. Anschließend wurden die Platten sechsmal gewaschen und mit 50 μ l pro *Well* mit einem HRP-Streptavidin-Konjugate von Dionova (Hamburg) versetzt. Dieses wurde zuvor 1:250 in Waschpuffer mit 5% (v/v) FKS verdünnt. Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden bei RT erfolgte die Färbung der Spots durch Zugabe des HRP-Substrates AEC. Zur Herstellung dieses Substrates wurden 20 mg AEC in 2,5 ml DMF gelöst, mit 47,5 ml 50 mM Na-Acetat-Puffer, pH 5,0, gemischt, filtriert und mit 25 μ l 30%igem H₂O₂ versetzt. Pro *Well* wurden 50 μ l verwendet. Zum Abstoppen der Farbreaktion wurde die Platte unter fließendem Wasser gespült. Anschließend wurde die Membran von der Platte abgezogen und üN getrocknet. Die Auswertung erfolgte bei sechzehnfacher Vergrößerung unter einem Binokular.

2.8.2.2 ELISpot Analysen zur Detektion von Peptid-spezifischen CD8 T-Zellen

Puffer	Konzentrationen		
Waschpuffer	PBS + 0,01% (v/v) Tween-20		
Puffer für Sekundärantikörper	PBS + 0,5% BSA, zuvor sterilfiltriert		

Antikörper	Bezeichnung	Quelle	Endkonzentration
Primärantikörper	Ratte α -Maus- IFN- γ	Biosource	10 μ g/ml
	Klon RMMG-1	Europe, Solingen	
Sekundärantikörper	Biotin-gekoppelter	Becton	1 μ g/ml
	Ratte α -Maus- IFN- γ Klon XMG 1.2	Dickinson, Heidelberg	

In der vorliegenden Versuchsserie wurden die ELISpot Platten von der Firma Millipore (Schwalbach/Ts.) verwendet. Die Anfärbung der Spots erfolgte mit Hilfe des Enzyms Streptavidin-Alkalin Phosphat (MABTECH, Hamburg) und dem Substrat BCIP/NBT^{PLUS} (MABTECH, Hamburg). Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben (Millipore, Schwalbach/Ts.).

Im Gegensatz zu den ELISpot Analysen DB behandelter Zellen (Kapitel 2.8.2.1) wurden in diesen Versuchsserien unterschiedliche Konzentrationen an Effektorzellen verwendet. Dabei wurden die Zellen auf Konzentrationen von 2×10^6 /ml, 1×10^6 /ml, 5×10^5 /ml und $2,5 \times 10^5$ /ml eingestellt. Bei der Verwendung von 50 μ l Effektorzellen pro *Well* entsprachen diese Konzentrationen einer Zellzahl von 1×10^5 , 5×10^4 , $2,5 \times 10^4$ und $1,25 \times 10^4$ pro *Well*.

2.8.3 Gewinnung von Serum

Die Gewinnung von murinem Serum erfolgte durch die Entnahme des Blutes aus den großen retrobulbären venösen Gefäßen. Das Blut wurde anschließend $\bar{u}N$ bei 4°C zur Agglutination inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Proben 10 min bei 8.700 rpm in einer Eppendorffzentrifuge und 4°C abzentrifugiert und der klare Überstand, das Serum, in frische, sterile Eppendorff-Gefäße überführt. Die Seren wurden in kleinen Aliquots bei -20°C gelagert.

2.8.4 Neutralisationstest

Reagenzien	Konzentrationen
AEC-Stammlösung	400 mg Aminoethylcarbazol (AEC) in 100 ml Dimethylformamid (DMF)
Acetat-Puffer	6,8 g Na-Acetat; 2,88 ml Eisessig, pH 4,7
Gelatine	0,1%

Der Neutralisationstest dient zur Quantifizierung des Titers an HCMV-neutralisierenden Antikörpern in einem Serum und wurde in Anlehnung an die von Andreoni und Kollegen publizierte Methode (Andreoni *et al.*, 1989) durchgeführt. Zunächst wurden alle zu testenden Seren 1:3 in PBS vorverdünnt und in zehn seriellen 1:2 Verdünnungen weiterverdünnt. Jede Verdünnung lag in einem Volumen von 250 μ l vor. Der zwölfte Ansatz bestand aus 250 μ l Medium ohne Serum und diente als Positivkontrolle für die Virusinfektion sowie als Referenz für die Berechnung des

Neutralisationstiter. Für die Bestimmung der Konzentration an neutralisierenden Antikörpern in den zu untersuchenden Seren gegen den wt RV-HB5, wurde anschließend zu jedem Ansatz ein gleiches Volumen (250 µl) einer 1:1.000 Virusverdünnung von RV-HB5 hinzu pipettiert. Virus- und Serumverdünnungen wurden gut gemischt und für vier bis fünf Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf von dreieinhalb bis viereinhalb Stunden wurden je $1,5 \times 10^4$ HFF in 25 µl Medium pro Vertiefung einer 96-Well-Platte ausgesät. Die verwendete 96-Well-Platte wurde zuvor mit 0,1% Gelatine üN bei 37°C beschichtet. Nach vier bis fünf Stunden Inkubationszeit wurden je 100 µl des Serum-Virus-Gemisches in Vierfachansätzen zu den Zellen gegeben und 24 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen in 96% Ethanol 20 min bei RT fixiert, zweimal in PBS gewaschen und eine Stunde mit einem IE1-spezifischen Antikörper (p63-27) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut zweimal mit PBS gewaschen und IE1-exprimierende Zellen durch Inkubation für eine Stunde bei 37°C mit einem 1:500 verdünnten HRP-konjugierten anti-Maus IgG Sekundärantikörpers (Dako, Hamburg) markiert. Die IE1-positiven Zellkerne wurden anschließend mittels AEC-Färbung sichtbar gemacht. Dazu wurde die AEC Stammlösung 1:20 in AEC-Puffer verdünnt. Diese Lösung wurde filtriert und mit 1/1.000 Volumen H₂O₂ (30%) versetzt. Von diesem Substrat wurden 100 µl pro Vertiefung zugegeben und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen in PBS gewaschen, um die Farbreaktion zu stoppen. Die Anzahl der IE1-positiven Zellkerne pro Vertiefung wurde unter dem Mikroskop ausgezählt.

3 Ergebnisse

3.1 Weiterentwicklung einer HCMV-Vakzine basierend auf modifizierten Dense Bodies

Trotz vielversprechender Ansätze ist bislang kein Impfstoff gegen HCMV zugelassen. Eine Strategie zur Bereitstellung einer Vakzine fokussiert auf die Verwendung von subviralen DB. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen solchen DB-basierten Impfstoff-Kandidaten hinsichtlich Ausbeute und Antigenität zu optimieren. Zur Ergänzung der antigenen Zusammensetzung von DB wurde die in Vorarbeiten etablierte Strategie der Insertion heterologer Peptide in den Leserahmen des pp65 gewählt. Dabei war bekannt, dass die Position der Insertion eines heterologen Peptids in den Leserahmen von pp65 einen Einfluss auf die Produktion und Freisetzung von rekombinanten DB (recDB) hat. Bis dato getestete Konstrukte waren hinsichtlich Antigenität und Ausbeute unbefriedigend gewesen (Mersseman *et al.*, 2008a; Mersseman *et al.*, 2008b; Pepperl-Klindworth *et al.*, 2003). In einer ersten Versuchsreihe wurden zunächst fünf verschiedene Positionen innerhalb des Leserahmens von pp65 ausgewählt (Abbildung 3.2), um eine geeignete Insertionsstelle für ein heterologes Peptid zu identifizieren. Bei der Auswahl der Insertionsstellen in pp65 wurden konservierte Bereiche des Tegumentproteins vermieden. Außerdem wurden mögliche α -Helices und β -Faltblattstrukturen nicht angetastet.

Das inserierte Modellpeptid IE1 bestand aus 20 AS und umfasste das während der natürlichen Infektion immundominante, HLA-A2-präsentierte Nonapeptid TMYGGISLL (IE1_{TMY}) (Gallez-Hawkins *et al.*, 2003). Rekombinante HCMVs, die die verschiedenen Fusionsproteine exprimierten, wurden durch die Modifizierung des HCMV BAC pHB5 etabliert (Borst *et al.*, 1999). Für die Modifizierung wurde die galk-Methode verwendet (Mersseman *et al.*, 2008a; Mersseman *et al.*, 2008b) (Kapitel 2.6.12 und Abbildung 3.1).

3.1.1 Herstellung der rekombinanten Viren *via* BAC-Mutagenese

3.1.1.1 Insertion der *galK* Kassette

Im ersten Schritt der Zwei-Schritt-Rekombination zur Herstellung der pp65-IE1_{TMV} Mutanten sollte die *galK* Kassette an der gewünschten Position innerhalb der pp65-Sequenz eingefügt werden (Abbildung 3.1). Die genaue Vorgehensweise ist in Kapitel 2.6.12 beschrieben.

Zunächst wurde die *galK* Kassette mit Hilfe spezifischer Primer aus dem *galK* Plasmid amplifiziert. Die verwendeten Primer wiesen dabei an ihren 5'- Enden etwa 50 Basen lange Überhänge auf. Diese Überhänge waren zu den DNA-Sequenzen homolog, die die Insertionsstelle im HCMV-Genom unmittelbar flankierten. Das PCR-Produkt wurde in *E.coli* SW102 transformiert und das λ -Rekombinationssystem durch eine Temperaturerhöhung auf 42°C induziert. Durch die daraus resultierende homologe Rekombination zwischen PCR-Produkt und BAC-pHB5 wurde die *galK* Kassette an der gewünschten Position inseriert. Die Selektion der gewünschten Klone erfolgte auf Minimalmedium, das mit Galaktose angereichert wurde. Die Verifikation der Insertion erfolgte mittels Kolonie-PCR (Kapitel 2.6.8.2).

3.1.1.2 Austausch der *galK* Kassette gegen das IE1_{TMV} Peptid

Die *galK* Kassette im intermediären BAC wurde in einem zweiten Schritt durch das IE1_{TMV} Peptid, erneut durch homologe Rekombination, ersetzt (Abbildung 3.1). Das hierfür eingesetzte PCR-Produkt enthielt an seinen Enden 50 bis 70 bp lange Abschnitte, die homolog zu den der Insertionsstelle benachbarten DNA-Sequenzen in UL83 waren. Als *Template* diente das Plasmid pK65-1. Nach der homologen Rekombination wurden die Bakterien zur Selektion auf Minimalmedium, das neben Glycerin auch DOG als Kohlenstoffquelle enthielt, ausplattiert. Ausgewählte Klone wurden durch Kolonie-PCR verifiziert.

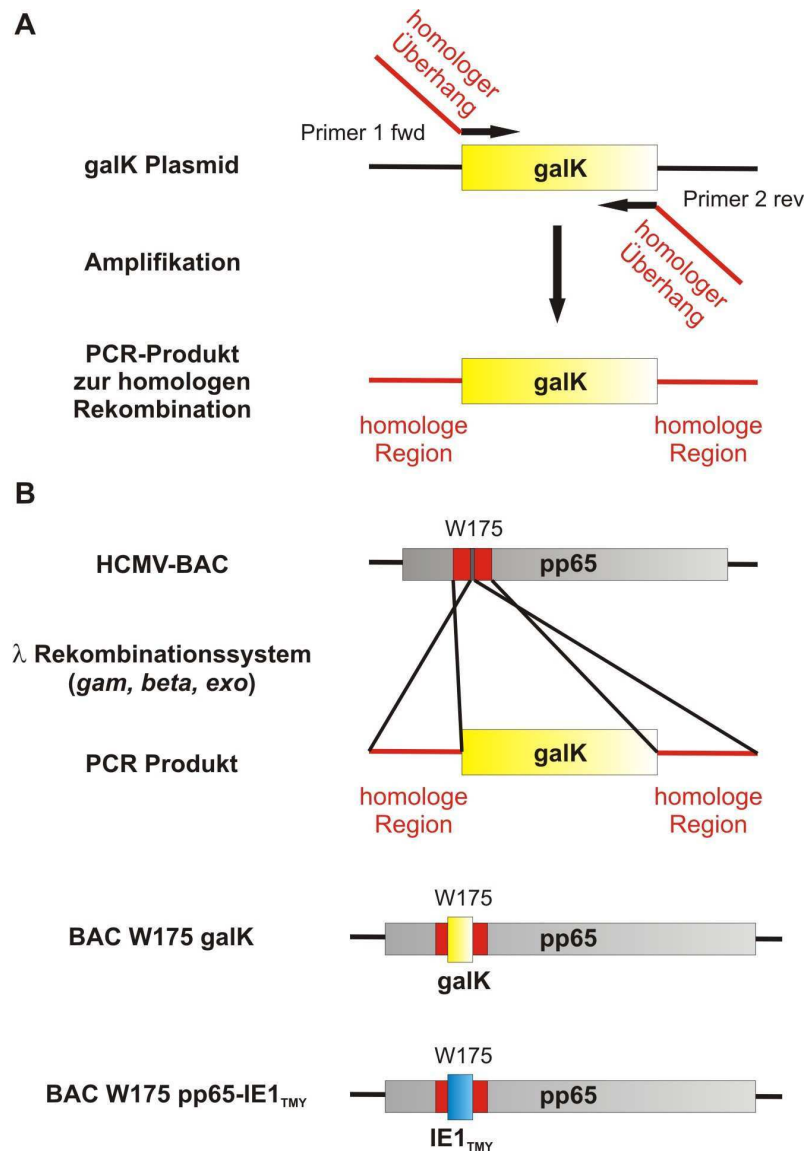


Abbildung 3.1: Herstellung der rekombinanten BACs mittels BAC Mutagenese

(A) Amplifikation der *galk* Kasette aus dem *galk* Plasmid mit Hilfe spezifischer Primer. Die schwarzen Pfeile repräsentieren die an die *Template*-DNA bindenden Bereiche, die roten Striche die homologen Überhänge an den 5'-Enden der Primer. (B) Zwei-Schritt Rekombination zur Insertion des gewünschten IE1_{TMY} Peptides an spezifische Positionen innerhalb der pp65-Sequenz im BAC-pHB5. Als Beispiel in der vorliegenden Abbildung wurde die Position W175 von pp65 gewählt. Zunächst wurde die *galk* Kasette an der gewünschten Position mittels Induktion des λ-Rekombinationssystem inseriert (BAC W175 *galk*). In einem zweiten Schritt erfolgte der Austausch dieser Kasette durch das IE1_{TMY} Peptid in analoger Weise (BAC W175 pp65-IE1_{TMY}).

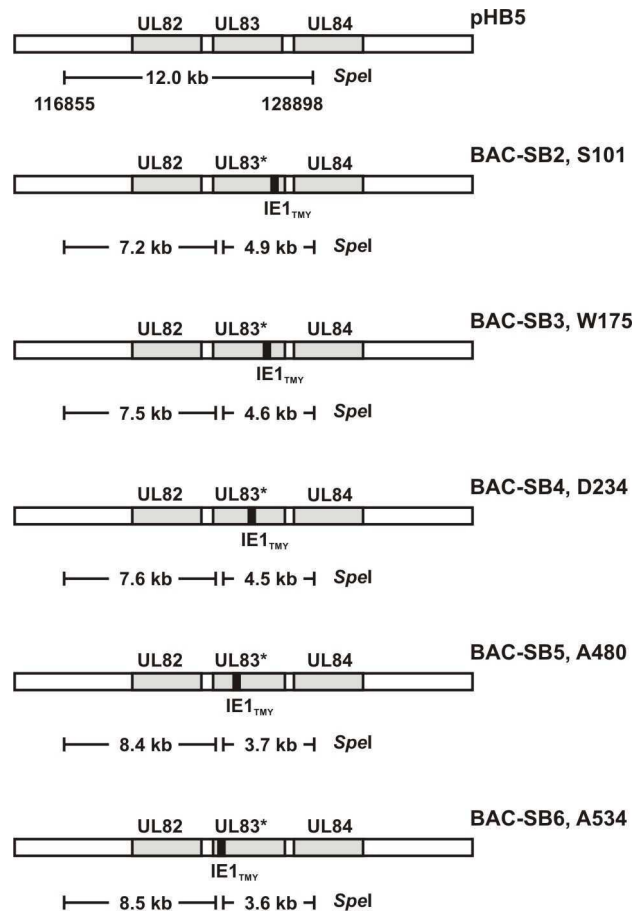


Abbildung 3.2: Übersicht von BAC pHB5 und den rekombinanten BACs

Schematische Darstellung der UL83 (pp65) Region im BAC pHB5 und in den rekombinanten BACs. Die HCMV Gene UL82, UL83 und UL84 sind als graue Boxen dargestellt. Die Insertionsstellen des IE1_{TMY} Peptides sind durch schwarze Boxen gezeigt. Die Position der Insertion ist hinter den jeweiligen Bezeichnungen der rekombinanten BACs angegeben. Dabei ist die N-terminale AS von pp65, die die Insertion flankiert, bezeichnet. Die Modifikation von UL83 in diesen BACs ist durch ein Sternchen (*) angedeutet. Unter dem Ausgangskonstrukt pHB5 sind die Positionen der Schnittstellen für die Spaltung mit *SpeI* angegeben, bei denen ein Fragment entsteht, das das Gen für UL83 enthält. Die Größe der erwarteten Fragmente ist angegeben.

3.1.2 Strukturelle Analysen der rekombinanten BACs

Bei der Klonierung großer DNA-Fragmente in BACs besteht die Gefahr der Deletion größerer Bereiche während der Vermehrungsphase in *E. coli* (Horsburgh *et al.*, 1999). Zur groben Analyse der hier etablierten HCMV-BACs vor Rekonstitution der Viren wurden Restriktionsanalysen mit dem Enzym *SpeI* durchgeführt (Abbildung 3.3).

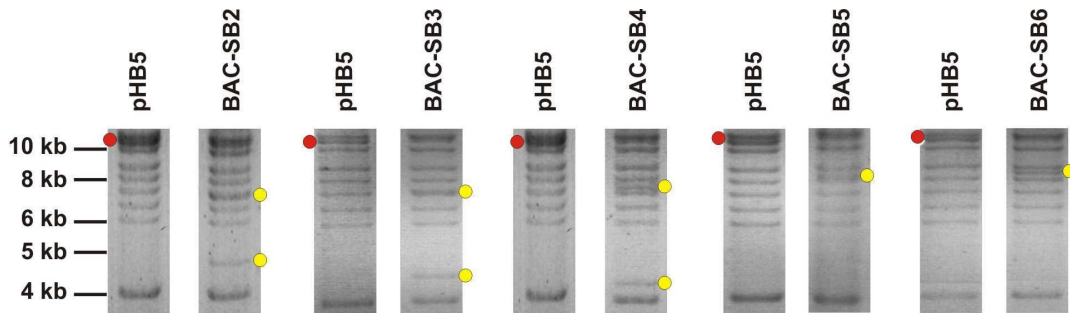


Abbildung 3.3: Restriktionsanalyse der rekombinanten BACs

Die DNAs der verschiedenen BAC-Konstrukte wurden mit 50 Units des Enzyms *SpeI* verdaut. Ein Restriktionsfragment mit einer Größe von 12 kb, welches das Gen für pp65 (UL83) enthält und bei Verdau von BAC pHB5 entsteht, ist mit einem roten Punkt gekennzeichnet. Die Restriktionsfragmente, die bei dem Verdau der rekombinanten BACs entstehen und den modifizierten UL83-Abschnitt umfassen, sind mit einem gelben Punkt markiert. Auf der linken Seite der Gele sind die Größen des verwendeten Standards (peqGOLD DNA-Leiter Mix) angegeben.

Bei dem Restriktionsverdau des parentalen BACs pHB5 mit *SpeI* war ein Fragment mit einer Größe von 12 kb zu erkennen, welches das Gen für pp65 (UL83) enthielt. Durch die Insertion des IE1_{TMY} Peptides in den Leserahmen von pp65 entstand eine zusätzliche Schnittstelle für dieses Enzym. Dadurch wurde bei den rekombinanten BACs das 12 kb große Fragment in zwei kleinere Fragmente geteilt. In Abhängigkeit von der Position der Insertion wiesen die neuen Fragmente Größen von 7,2-8,5 kb und 3,6-4,9 kb auf. Aufgrund der Spaltung mit dem Restriktionsenzym *SpeI* konnten einzelne Klone ermittelt werden, die nicht das erwartete Spaltungsmuster aufwiesen. Diese Klone wurden von den weiteren Analysen ausgeschlossen.

Zur weiteren Kontrolle der erfolgreichen Insertion des IE1_{TMY} Peptides in pp65 wurden zusätzlich Sequenzierungen der Bereiche der Insertion durchgeführt (Ergebnisse nicht dargestellt). Alle Untersuchungen wiesen die erwarteten Ergebnisse auf. Die Rekonstitution der rekombinanten Viren erfolgte durch Transfektion der BACs in HFF. Dazu wurde jeweils ein Klon pro Konstrukt verwendet.

3.1.3 Subzelluläre Verteilung des pp65-IE1_{TMY} Fusionsproteins und Synthese von recDB in infizierten HFF

Ein wichtiges Merkmal der späten Infektionsphase des HCMV in HFF ist die zytoplasmatische Anhäufung von pp65. Sie ist mit der Bildung von DB in diesem Kompartiment vergesellschaftet. Die Bildung und Freisetzung von DB und die korrekte zelluläre Verteilung von pp65 korrelieren (Mersseman, 2007). Somit liefert die Überprüfung der subzellulären Verteilung von pp65 einen ersten Hinweis auf die

Synthese von DB. Hierzu wurden HFF mit dem wt Virus und den rekombinanten Viren infiziert und vier Tage nach der Infektion mittels IFA analysiert (Abbildung 3.4).

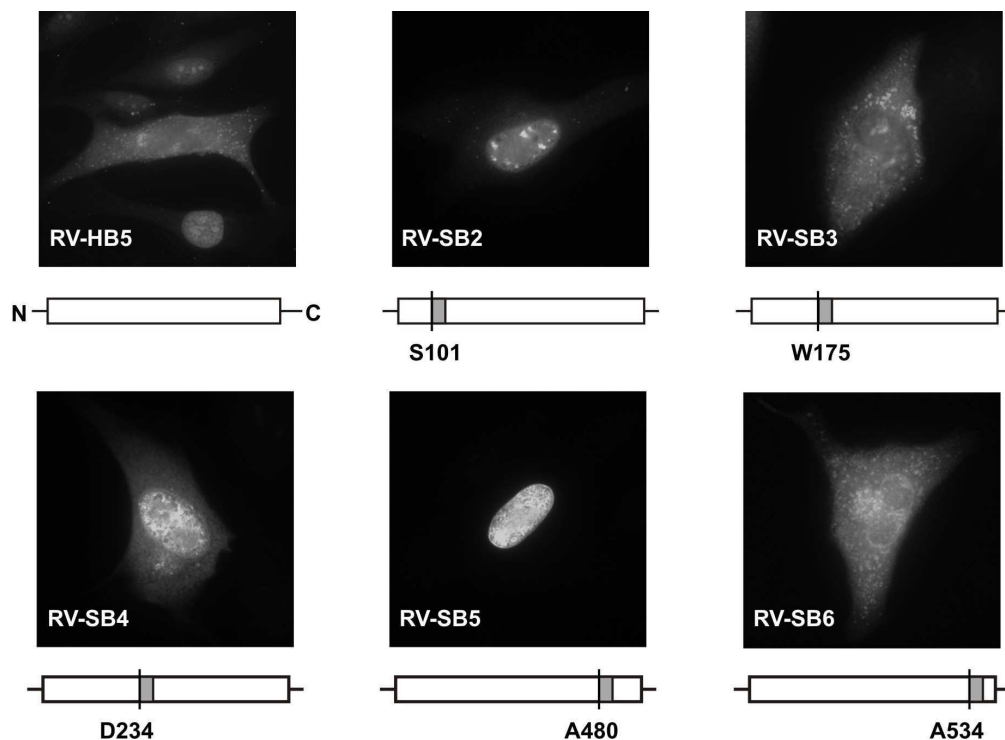


Abbildung 3.4: Indirekte Immunfluoreszenzanalysen von infizierten HFF

Zellen wurden für vier Tage infiziert und anschließend mittels IFA analysiert. Für die Überprüfung der zellulären Verteilung von wt-pp65 und pp65-IE1_{TMY} wurde ein pp65-spezifischer, monoklonaler Antikörper verwendet. Die Position der Insertion von IE1_{TMY} in pp65 ist unter den jeweiligen Immunfluoreszenzen schematisch dargestellt. Dabei ist die N-terminale AS von pp65, die die Insertion flankiert, angegeben.

In HFF, die mit dem wt RV-HB5 infiziert worden waren, wurde die typische zytoplasmatische Lokalisation von pp65 zu späten Zeitpunkten der Infektion gesehen. Im Zytoplasma waren zu diesen Zeitpunkten partikuläre Strukturen zu erkennen, die mit großer Wahrscheinlichkeit DB darstellen. Vergleichbare Ergebnisse wurden erzielt, wenn HFF mit den rekombinanten Viren RV-SB3 und RV-SB6 infiziert worden waren. Das pp65-IE1_{TMY} Fusionsprotein, das durch die rekombinanten Viren exprimiert wurde, war vier Tage nach der Infektion hauptsächlich im Zytoplasma nachweisbar. Außerdem produzierten beide Viren eine signifikante Menge an DB. Im Gegensatz dazu zeigte das Fusionsprotein, das von den rekombinanten Viren RV-SB2, RV-SB4 und RV-SB5 exprimiert wurde, eine überwiegend nukleare Lokalisation. Außerdem wurden im Zytoplasma der infizierten Zellen keine oder nur sehr wenige DB gefunden.

Basierend auf den Ergebnissen der IFA konzentrierten sich die weiteren Arbeiten ausschließlich auf die Viren RV-SB3 und RV-SB6.

3.1.4 Charakterisierung der rekombinanten Viren RV-SB3 und RV-SB6

3.1.4.1 Expression des pp65-IE1_{TMY} Fusionsproteins

Zur Analyse der Expressionsrate des pp65-IE1_{TMY} Fusionsproteins in infizierten HFF wurden Western-Blot Analysen von Gesamtzellextrakten durchgeführt. Die Zellen wurden mit dem wt-Stamm RV-HB5 und den beiden rekombinanten Viren mit einer *moi* von zwei infiziert. Die Zellextrakte wurden zwei und vier Tage nach der Infektion der Zellen gewonnen und mittels Odyssey Western quantitativ analysiert. Als interner Standard wurde zelluläres Aktin verwendet (Abbildung 3.5).

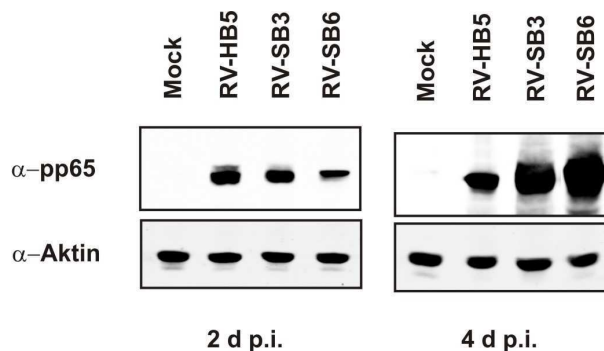


Abbildung 3.5: Western-Blot Analysen von Gesamtzellextrakten infizierter HFF

HFF wurden mit einer *moi* von zwei infiziert. Für den Nachweis von pp65 wurde ein pp65-spezifischer, monoklonaler Antikörper verwendet. Die Proteinmenge in jeder Spur wurde anhand einer internen Aktin-Kontrolle normiert.

Die Expressionsrate des pp65-IE1_{TMY} Fusionsproteins in Zellen, die mit RV-SB3 und RV-SB6 infiziert wurden, war im Vergleich zu Zellen, die mit dem wt RV-HB5 infiziert wurden, zwei Tage nach der Infektion leicht vermindert. Jedoch war die Menge an Fusionsprotein, die vier Tage nach Infektion von RV-SB3 und RV-SB6 infizierten Zellen gebildet wurde, im Vergleich zu wt-infizierten Zellen erhöht.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Insertion des heterologen Peptids in RV-SB3 und RV-SB6 die Spiegel des pp65 in der infizierten Zelle nicht wesentlich beeinträchtigte.

3.1.4.2 Vermehrungsverhalten von RV-SB3 und RV-SB6

Das Fehlen von pp65 hat keinen Einfluss auf die virale Replikation in HFF (Schmolke *et al.*, 1995b). Wir erwarteten daher auch keine hemmenden Effekte durch die Insertion eines Peptids von 30 AS. Gleichwohl galt es, dies zu zeigen. Hierzu wurden HFF mit

zehn Genomen pro Zelle infiziert. Nachfolgend wurden täglich Proben aus den Kulturüberständen entnommen und die virale DNA daraus isoliert. Die Quantifizierung dieser DNA erfolgte mittels TaqMan™ PCR (Abbildung 3.6).

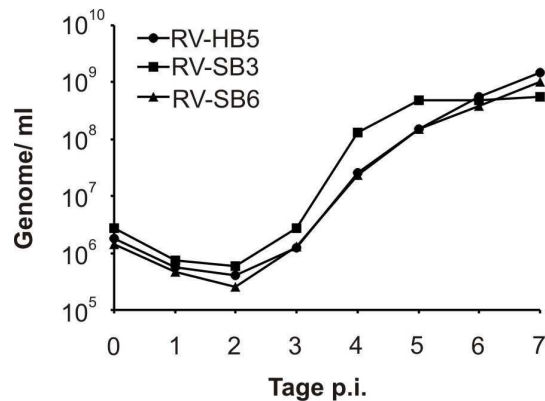


Abbildung 3.6: Freisetzung viraler DNA in den Kulturüberstand infizierter HFF

Quantitative TaqMan™ PCR Analysen der Anzahl viraler Genome, die in den Zellkulturüberstand von infizierten HFF freigesetzt werden. Zellen wurden mit zehn Genomen pro Zelle infiziert. Zellkulturüberstände wurden zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen und eingefroren. Die virale DNA wurde anschließend aus den Zellkulturüberständen isoliert.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Raten der Freisetzung von viralen Partikeln von RV-SB3 und RV-SB6 in ihrer Kinetik mit dem wt-Stamm vergleichbar waren .

3.1.4.3 Freisetzung von rekombinanten Dense Bodies

Für die Verwendung von recDB als Basis für eine Impfstoffentwicklung ist es wichtig, dass diese in signifikanten Mengen von infizierten Zellen in den Zellkulturüberstand freigesetzt werden. Zur Überprüfung wurden Zellen mit RV-HB5, RV-SB3 und RV-SB6 infiziert, die Kulturüberstände wurden sechs Tage nach der Infektion gewonnen und die Viruspartikel durch Ultrazentrifugation gereinigt (Irmiere and Gibson, 1983; Talbot and Almeida, 1977) (Abbildung 3.7).

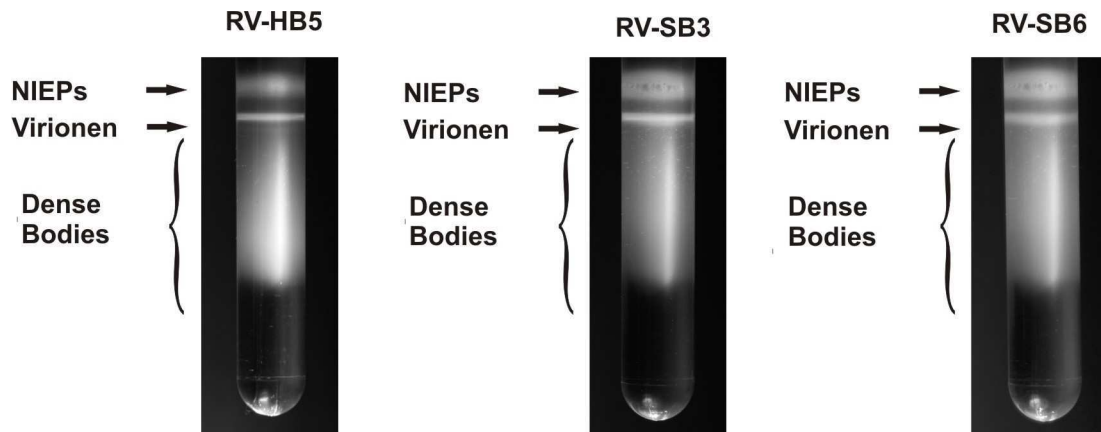


Abbildung 3.7: Fraktionierung von extrazellulären, viralen Partikeln der Viren RV-HB5, RV-SB3 und RV-SB6 mittels Natriumtartrat-Gradientenultrazentrifugation

Die Gradienten der viralen Partikel von RV-HB5 wiesen das erwartete Bandenspektrum auf. Die NIEPs und Virionen waren als diskrete Banden im oberen Bereich des Gradienten zu finden, während DB aufgrund ihrer heterogenen Größe in einer breiten Zone im unteren Bereich bandierten. Ein vergleichbares Bild fand sich nach Ultrazentrifugation von Partikeln von RV-SB3 und RV-SB6. Dies zeigt, dass die Infektion mit beiden Viren zur Bildung von DB führte. Auffällig war, dass die Ausbeute von DB-SB6 reproduzierbar geringer war als die von DB-SB3. Die mittlere Menge an Protein aus drei unabhängigen Präparationen betrug für DB-SB3 1,35 µg/ml Zellkulturüberstand, bei DB-SB6 0,77 µg/ml Zellkulturüberstand (Ergebnisse nicht dargestellt). Somit konnte durch die Infektion mit RV-SB3 eine fast doppelt so hohe Ausbeute an DB erzielt werden.

3.1.4.4 Verpackung des pp65-IE1_{TMV} Fusionsproteins in virale Partikel

Zur Überprüfung der Verpackung des pp65-IE1_{TMV} Fusionsproteins in virale Partikel wurden Western-Blot Analysen von Virionen und DB durchgeführt. Zur Normierung wurde die Menge des viralen Glykoproteins gB als interner Standard verwendet (Abbildung 3.8).

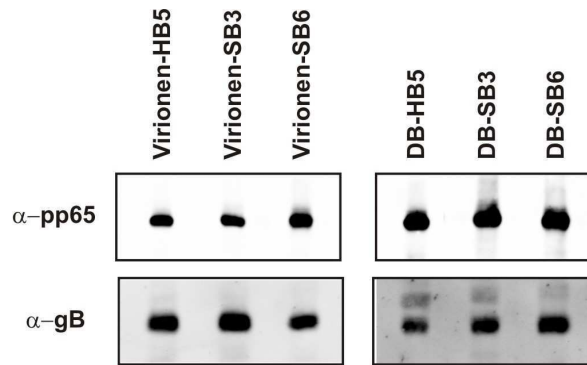


Abbildung 3.8: Western-Blot Analysen der Verpackung des pp65-IE1_{TMY} Fusionsproteins in virale Partikel

Gradienten-gereinigte Virionen und DB wurden mittels Odyssey-Westernblot analysiert. Für die Detektion von pp65 wurde ein pp65-spezifischer, monoklonaler Antikörper verwendet. Die Proteinmenge in jeder Spur wurde durch die interne Kontrolle anhand der Menge des viralen Hüllproteins gB normiert.

Zellen, die mit den rekombinanten Viren RV-SB3 und RV-SB6 infiziert worden waren, verpackten das pp65-IE1_{TMY} Fusionsprotein sowohl in Virionen als auch in DB. Dabei wurde relativ zum viralen Hüllprotein gB kein Unterschied in der Effizienz der Verpackung im Vergleich zum wt gefunden.

3.1.5 MHC-Klasse I Präsentation des pp65_{NLV}- und IE1_{TMY}-Peptides

Ein Ziel, das durch die Verwendung von recDB als Impfstoff erreicht werden soll, ist die Verbesserung der Breite der CD8 T-Zell Antwort gegen HCMV, sodass Menschen mit verschiedenem HLA-Hintergrund eine hinreichend protektive T-Zell Antwort aufbauen können. Zum Nachweis, dass das heterologe IE1_{TMY} Peptid nach Behandlung von HFF mit DB-SB3 und DB-SB6 in den MHC Klasse I Weg eingeschleust wird, wurden IFN- γ ELISpot Analysen durchgeführt (Abbildung 3.9). Als APC dienten HLA-A2 positive HFF. Zur Reduktion der verbleibenden Restinfektivität im DB-Inokulum wurde dieses zuvor für 2 min mit UV-Licht einer Wellenlänge von 254 nm bestrahlt.

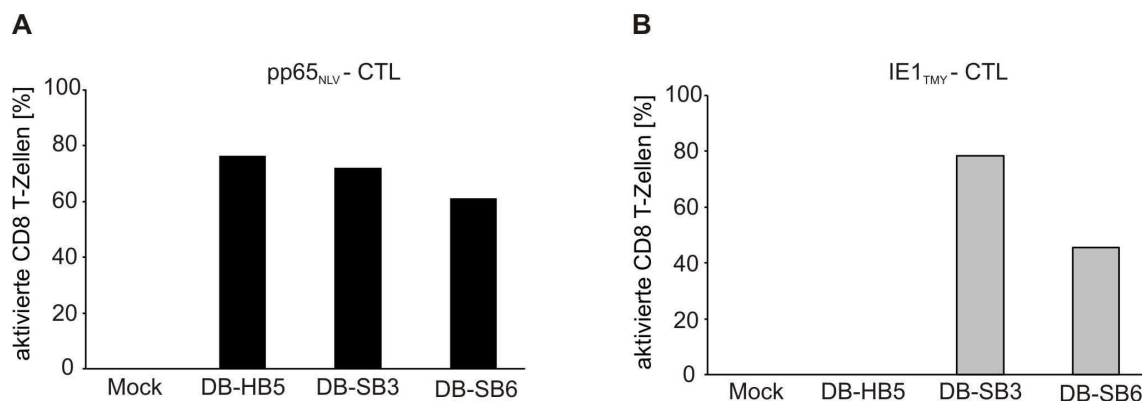


Abbildung 3.9: IFN- γ ELISpot Analysen der Einschleusung von Peptiden in den MHC-I Präsentationsweg durch rekombinante DB

Zellen wurden mit DB für 24 Stunden inkubiert und anschließend als APC im IFN- γ ELISpot eingesetzt. Als Effektorzellen wurden pp65_{NLV}-CTL (A) und IE1_{TMY}-CTL (B) verwendet. Als 100% wurde die Anzahl an Spots gesetzt, die mittels einer positiv Kontrolle unter Verwendung von Peptid-beladenen Zellen als APC und den entsprechenden Effektorzellen ermittelt werden konnte. Die Balken repräsentieren den Mittelwert der ausgezählten Spots aus einer Dreifachbestimmung. Die gezeigten Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

Die Ergebnisse des IFN- γ ELISpot Assays zeigten, dass Zellen, die mit den DB-SB3 oder SB-SB6 behandelt worden waren, sowohl das pp65_{NLV} Peptid als auch das IE1_{TMY} Peptid auf der Oberfläche präsentierten. Wie erwartet präsentierten Zellen, die mit den wt-DB behandelt wurden, das IE1_{TMY} Peptid nicht auf ihrer Oberfläche. Die Präsentation des pp65_{NLV} Peptides war bei Zellen, die mit den recDB behandelt wurden, vergleichbar mit den Zellen, die mit den wt-DB behandelt wurden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Präsentation von pp65 nicht durch die Insertion eines weiteren immunodominanten Peptides, das durch die gleichen HLA-Moleküle präsentiert wird, unterdrückt wird. Die Behandlung von Zellen mit DB-SB3 führte zur Stimulation von IE1_{TMY} spezifischen CTL, die in ihrer Intensität vergleichbar mit der Antwort gegen das pp65_{NLV} Peptid war. Im Gegensatz dazu resultierte die Behandlung von Zellen mit DB-SB6 in einer deutlich niedrigeren Zahl an Spots nach Behandlung mit IE1_{TMY} spezifischen CTL, verglichen mit pp65_{NLV} spezifischen CTL. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Position der Insertion des IE1_{TMY} Peptides in pp65 einen Einfluss auf seine Präsentation durch MHC-Klasse I hat.

3.1.6 Induktion einer IE1_{TMY} spezifischen CD8 T-Zell Antwort nach Immunisierung mit recDB

Die Immunisierung von Mäusen mit recDB der ersten Generation war geeignet, eine IE1_{TMY} spezifische CD8 T-Zell Antwort zu induzieren (Mersseman *et al.*, 2008a). Allerdings konnten solche Zellen nur nach Restimulation in Kultur, nicht jedoch direkt *ex vivo* nachgewiesen werden. Zur Analyse, ob DB-SB3 und DB-SB6 hinsichtlich ihrer Immunogenität den recDB der ersten Generation überlegen waren, wurden HLA-A2 transgene Mäuse des Stammes C57/BL6 immunisiert. Diese Mäuse exprimieren ein chimäres MHC-Klasse I Molekül, das sich aus den α 1- und α 2-Domänen des humanen HLA-A2 Proteins und der α 3-Domäne des murinen H-2D^b Proteins zusammensetzt (Pascolo *et al.*, 1997). Die Induktion einer IE1_{TMY} spezifischen CD8 T-Zell Antwort nach Immunisierung mit recDB und anschließender Stimulation mit IL-2 und dem entsprechendem HCMV-Peptid wurde mittels IFN- γ ELISpot analysiert (Abbildung 3.10).

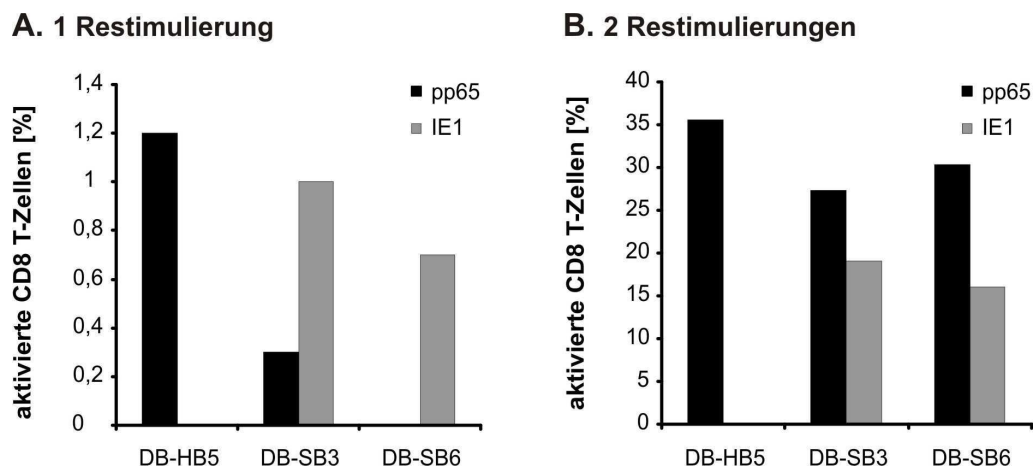


Abbildung 3.10: IFN- γ ELISpot Analysen der CD8 T-Zell Antwort nach Immunisierung mit recDB und anschließender *in vitro* Stimulation

HLA-A2 transgene Mäuse wurden mit den angegebenen DB immunisiert. Acht Tage nach der Immunisierung wurden die Versuchstiere getötet und die Milzen entnommen. Die Lymphozyten aus den Gesamt-Milzzellen wurden für ein bis zwei Wochen mit IL-2 und dem entsprechendem HCMV-Peptid stimuliert. Die Zellen wurden anschließend im IFN- γ ELISpot Assay als Effektorzellen verwendet. Als APC dienten RMA-S HHD Zellen, die mit dem entsprechendem Peptid beladen wurden. Die Balken repräsentieren den Mittelwert der ausgezählten Spots einer Dreifachbestimmung. Die gezeigten Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

Nach ein- und zweiwöchiger Restimulation konnten IE1_{TMY} spezifische T-Zellen sowohl in den Ansätzen mit DB-SB3 als auch in den Ansätzen mit DB-SB6 nachgewiesen werden. T-Zellen gegen pp65_{NLV} konnten nach DB-SB3 Immunisierung nach einer und

zwei Wochen gefunden werden. Auffällig war aber, dass T-Zellen mit pp65_{NLV} Spezifität nach DB-SB6 Immunisierung erst nach zwei Wochen nachgewiesen werden konnten. Dies deutet darauf hin, dass eine intensive Antigenstimulation notwendig war, um die Vermehrung einer signifikanten Anzahl an pp65_{NLV} spezifischen T-Zellen in diesem Ansatz zu erreichen. Im Umkehrschluss lag nahe, dass die durch Immunisierung mit DB-SB6 induzierte CD8 T-Zell Antwort gegen das pp65_{NLV}-Peptid in seiner Effizienz deutlich hinter DB-SB3 oder etwa wt-DB zurückblieb. Zur genaueren Analyse der Immunogenität von DB-SB3 und DB-SB6 wurde die CD8 T-Zell Antwort in einem zweiten Schritt direkt *ex vivo* ohne zusätzliche Amplifikation in Zellkultur bestimmt. Aus den Milzen immunisierter Tiere wurden CD8⁺ T-Zellen immunomagnetisch angereichert und direkt als Effektorzellen im IFN- γ ELISpot eingesetzt. Als APC wurden RMA-S HHD- und T2 Zellen verwendet (Abbildung 3.11).

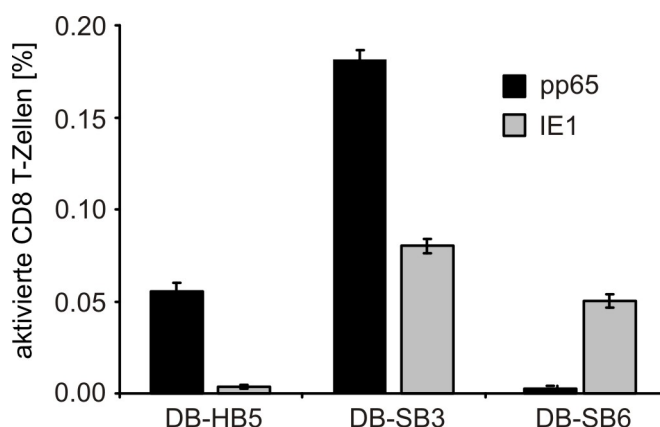


Abbildung 3.11: *Ex vivo* IFN- γ ELISpot der CD8 T-Zell Antwort nach Immunisierung mit recDB

HLA-A2 transgene Mäuse wurden mit den angegebenen DB immunisiert. Acht Tage nach der Immunisierung wurden die Versuchstiere getötet und die Milzen entnommen. Die CD8⁺ Zellen wurden aus den Gesamt-Milzzellen immunomagnetisch angereichert. Als APC im nachfolgenden IFN- γ ELISpot dienten peptidbeladene RMA-S HHD Zellen. Die Frequenzen IFN- γ -produzierender CTL wurden mittels linearer Regressionsanalyse mit Hilfe der Statistik-Software Mathematica V6.0.1.0 Statistics "Linear Regression" ermittelt. Die Fehlerbalken geben das 95% Konfidenz-Intervall an. Die gezeigten Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

IE1_{TMY}-spezifische CD8 T-Lymphozyten konnten *ex vivo* sowohl nach Immunisierung mit DB-SB3 als auch nach Immunisierung mit DB-SB6 nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass beide Formen von recDB hinsichtlich der Effizienz des *Primings* der IE1_{TMY}-spezifischen T-Zell Antwort vergleichbar waren. Nach Immunisierung mit DB-SB3 fand sich darüber hinaus eine deutliche, pp65_{NLV}-spezifische Antwort, die sogar die der wt-Kontrolle überstieg. Bemerkenswert war jedoch, dass pp65_{NLV} CD8 T-Zellen nach der Immunisierung mit DB-SB6 nicht über Hintergrund zu detektieren waren.

Vergleichbare Ergebnisse wurden auch erzielt, wenn T2 Zellen als APC verwendet wurden (Ergebnisse nicht dargestellt). Dies legt die Vermutung nahe, dass die zusätzliche Expression eines HLA-A2 präsentierten, immundominanten Peptids an der Position 534 von pp65 das *Priming* gegen das ebenfalls durch HLA-A2 präsentierte pp65_{NLV}-Peptids beeinträchtigt.

Zusammengefasst konnte die Position 175 von pp65 als geeignete Insertionsstelle für heterologe Peptidantigene identifiziert werden. Demgegenüber war, unerwartet, Interferenz in der Immunogenität von immundominanten Peptiden bei Insertion an Position 534 nachgewiesen worden.

3.1.7 Stimulation einer CD4 T-Zell Antwort nach Immunisierung mit recDB

In früheren Studien an KMT Patienten konnte die zentrale Stellung von CD4 T-Zellen bei der längerfristigen Etablierung der HCMV-spezifischen CTL Antwort gezeigt werden (Reusser *et al.*, 1991; Walter *et al.*, 1995). Neben der Induktion einer CD8 T-Zell Antwort sollte somit ein Impfstoff gegen HCMV, basierend auf recDB, auch die CD4 T-Zell Antwort stimulieren. Native DB induzieren CD4 T-Zell Antworten in Versuchstieren (Pepperl *et al.*, 2000). In der Konsequenz sollte die Induktion einer CD4 T-Zell Antwort durch recDB verifiziert werden. Dazu wurden Balb/c Mäuse mit wt-DB bzw. DB-SB3 intraperitoneal immunisiert. Die Lymphozyten wurden acht Tage nach der Immunisierung aus den Milzen gewonnen. Die Restimulierung der Zellen mit den entsprechenden DB erfolgte zeitgleich mit der Kultivierung der Zellen. 24 Stunden nach Beginn der Restimulierung wurden die Lymphozyten auf die Expression des Oberflächenmarkers CD62L mittels FACS analysiert (Abbildung 3.12). Eine verringerte Expression von CD62L dient als Marker für die Aktivierung von T-Zellen.

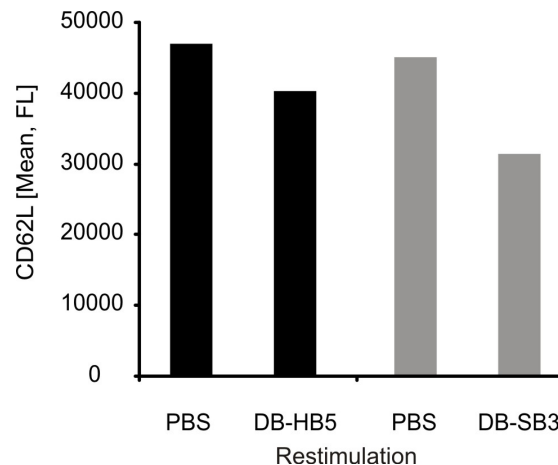


Abbildung 3.12: FACS Analysen der CD4 T-Zell Antwort nach Immunisierung mit recDB

Balb/c Mäuse wurden mit den angegebenen DB immunisiert. Acht Tage nach der Immunisierung wurden die Versuchstiere getötet und die Milzen entnommen. Die Lymphozyten wurden unmittelbar nach in Kulturnahme mit 20 µg der entsprechenden DB oder, zur Kontrolle, mit PBS stimuliert. 24 Stunden nach Beginn der Restimulierung wurden die Zellen auf die Expression des Oberflächenmarkers CD62L mittels FACS analysiert.

Ein signifikanter Anteil an CD4 T-Zellen von Mäusen, die mit wt-DB oder DB-SB3 immunisiert wurden, wiesen eine erniedrigte Expression von CD62L auf. Mit diesem Experiment kann damit bestätigt werden, dass DB-SB3 die CD4 T-Zell Antwort stimulieren.

3.1.8 **Priming von neutralisierenden Antikörpern durch Immunisierung mit recDB**

Aufgrund der Bedeutung von neutralisierenden Antikörpern für die Prävention einer HCMV-Infektion und ihrer Rolle beim Schutz gegen HCMV-Übertragung in der Schwangerschaft sollten DB-SB3 hinsichtlich der Induktion neutralisierender Antikörper untersucht werden. Balb/c Mäuse wurden hierzu mit den entsprechenden DB intraperitoneal immunisiert. Eine zweite Applikation erfolgte zwei Wochen danach. Nach weiteren zwei Wochen wurde Blut entnommen und die Seren auf ihren Gehalt an HCMV-neutralisierenden Antikörpern in einem Mikroneutralisationstest analysiert (modifiziert nach (Andreoni *et al.*, 1989)) (Abbildung 3.13).

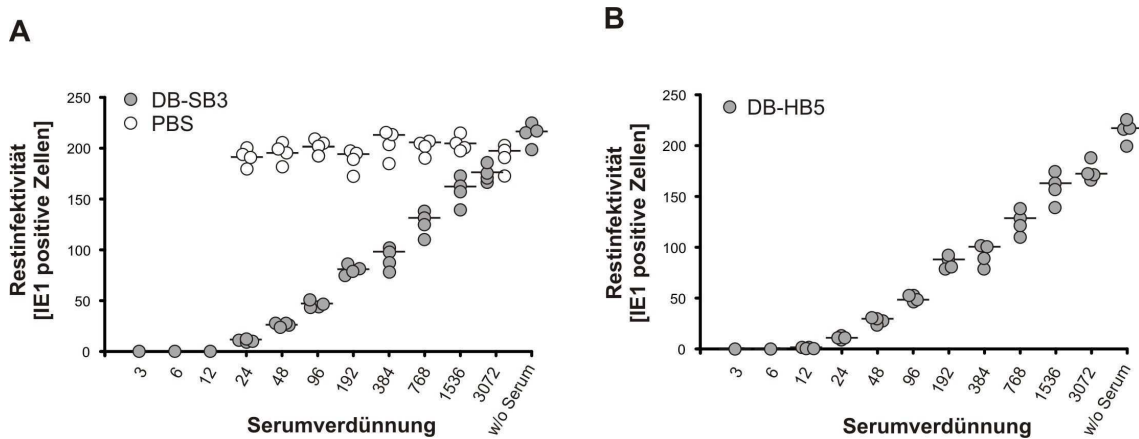


Abbildung 3.13: Mikroneutralisationstest zur Analyse neutralisierender Antikörper nach Immunisierung mit recDB

Balb/c Mäuse wurden zweimal im Abstand von zwei Wochen mit den angegebenen DB immunisiert. Die Seren wurden im Mikroneutralisationstest untersucht. Dabei wurden die Seren zweier Versuchstiere pro Gruppe vereinigt. Die Neutralisationskapazität der Seren wurde über die Auszählung der IE1-positiven Zellen bestimmt. Der Ansatz pro Verdünnungsstufe erfolgte in Vierfach-Bestimmung.

Die Analysen zeigen, dass Immunisierung mit DB-SB3 deutliche Spiegel neutralisierender Antikörper gegen HCMV induzierte. Die damit erzielte Antwort war von der, die nach Immunisierung mit der wt-Kontrolle erzielt wurde, nicht zu unterscheiden.

3.1.9 SIINFEKL als nicht-virales Modellpeptid

In einem nächsten Schritt sollte der Beweis erbracht werden, dass DB geeignet sind, Immunantworten gegen Peptide zu induzieren, die natürlicherweise nicht im Virus vorkommen. Hierzu wurde das SIINFEKL Peptid des Ovalbumins (OVA) ausgewählt. SIINFEKL ist ein H2-K^b restringiertes Peptid, welches vielfach als Modellpeptid in der immunologischen Forschung eingesetzt wird (Moore *et al.*, 1988; Sigal *et al.*, 1999).

Aufgrund der Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit wurden für die Insertion des SIINFEKL Peptides die Positionen 175 und 534 des Leserahmens von pp65 ausgewählt (Abbildung 3.14). Die Insertion des Peptides erfolgte passgenau ohne zusätzliche AS. Für die Insertion von SIINFEKL an der Position 175 wurden drei AS von pp65 an der C-terminalen Insertionsstelle deletiert, da die AS Prolin an dieser Stelle im Hinblick auf die proteasomale Prozessierung des inserierten Peptides als problematisch erachtet wurde (Tenzer *et al.*, 2005). Neben SIINFEKL wurden außerdem rekombinante Viren hergestellt, die eine *loss of function* Mutante des integrierten Peptides exprimierten. In diesen wurde die C-terminale Ankeraminosäure

Leuzin des SIINFEKL durch Alanin ersetzt (SIINFEKL→SIINFEKA), so dass sowohl der proteasomale Schnitt als auch die Bindung an das MHC-Klasse I Molekül verhindert werden (Simon *et al.*, 2006). Die Modifizierung erfolgte wie in Kapitel 2.6.12 und 3.1.1 beschrieben anhand der galk Methode (Mersseman *et al.*, 2008a; Mersseman *et al.*, 2008b).

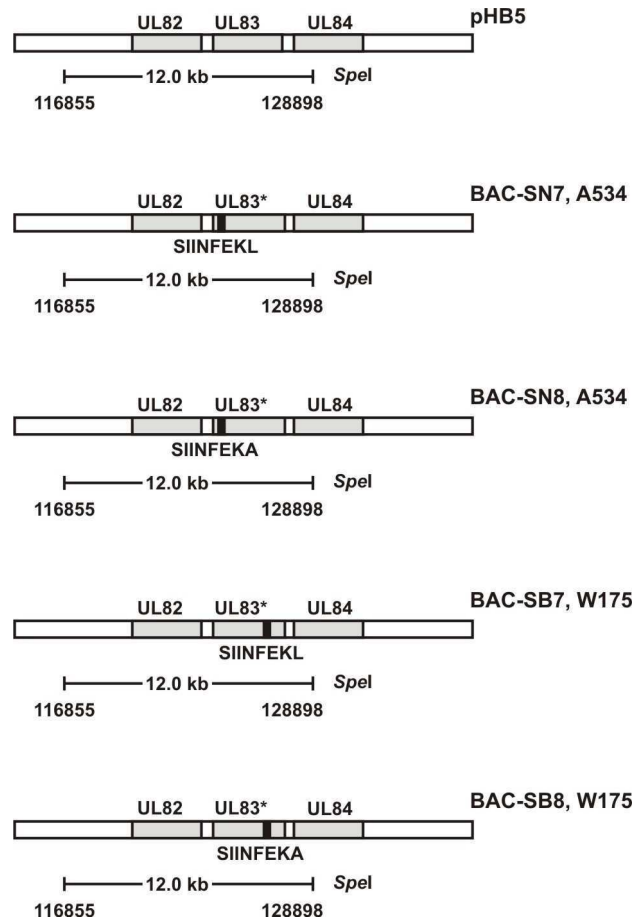


Abbildung 3.14: Schematische Darstellung der rekombinanten SIINFEKL- und SIINFEKA-exprimierenden Viren

Schematische Darstellung der UL83 (pp65) Region im Genom von BAC pHB5 und den rekombinanten BACs. Dabei sind die Gene für UL82, UL83 und UL84 als graue Boxen dargestellt. Die Insertion des SIINFEKL bzw. SIINFEKA Peptides ist in den rekombinanten BACs als schwarze Box abgebildet. Die Position der Insertion ist hinter den jeweiligen Bezeichnungen der rekombinanten BACs angegeben. Dabei ist die N-terminale AS von pp65, die die Insertion flankiert, bezeichnet. Die Modifikation von UL83 in diesen BACs ist durch ein Sternchen (*) angedeutet. Unter dem Ausgangskonstrukt pHB5 sind die Positionen der Schnittstellen für die Spaltung mit Spel angegeben. Die Balken zwischen den Schnittstellen repräsentieren die Größe der Fragmente, die bei der Restriktionsanalyse erwartet werden.

3.1.9.1 Strukturelle Analysen der rekombinanten BACs

Die BAC-Konstrukte wurden zunächst auf die korrekte Insertion des SIINFKEL Peptides mittels Restriktionsanalysen mit dem Enzym *SpeI* analysiert (Abbildung 3.15).

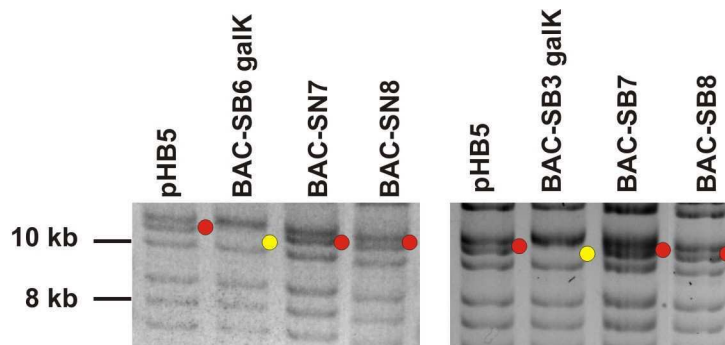


Abbildung 3.15: Restriktionsanalyse der rekombinanten BACs

BAC-DNAs wurden mit 50 Units des Enzyms *SpeI* verdaut. Ein Restriktionsfragment mit einer Größe von 12043 bp, welches das Gen für pp65 (UL83) enthält und bei Verdau von BAC pHB5, BAC-SB7, BAC-SB8, BAC-SN7 und BAC-SN8 entsteht, ist mit einem roten Punkt gekennzeichnet. Dieses Fragment fehlt aufgrund der Insertion der *galK* Kasette bei dem Verdau von BAC-SB3 *galK* und BAC-SB6 *galK* (gelber Punkt). Auf der linken Seite der Gele sind die molekularen Größen des verwendeten peqGOLD DNA-Leiter Mix angegeben.

Bei dem Restriktionsverdau des parentalen BACs pHB5 mit dem Enzym *SpeI* war ein Fragment mit einer Größe von 12043 bp zu erkennen. Durch die Insertion des SIINFKEL bzw. SIINFKA Peptides in pp65 kommt es zu keiner Veränderung des Schnittstellenmusters, so dass keine Unterschiede in den entstehenden Fragmentgrößen zu erkennen waren. Im Gegensatz dazu kommt es durch die Insertion des *galK* in den pp65 Leserahmen zu einer Änderung der Schnittstellen. Diese führt dazu, dass bei dem Verdau der beiden BACs BAC-SB6 *galK* und BAC-SB3 *galK* das Fragment mit einer Größe von 12043 bp nicht mehr entsteht. Aufgrund der Spaltung mit dem Restriktionsenzym *SpeI* konnten einzelne Klone ermittelt werden, die nicht das erwartete Spaltungsmuster aufwiesen. Diese Klone wurden von den weiteren Analysen ausgeschlossen.

Die korrekte Insertion des SIINFKEL bzw. SIINFKA Peptides in pp65 wurde zusätzlich durch Sequenzierungen der Bereiche der Insertion kontrolliert (Ergebnisse nicht dargestellt). Alle Analysen zeigten die erwarteten Ergebnisse. Die Rekonstitution der rekombinanten Viren erfolgte durch Transfektion der BACs in HFF. Dabei wurde jeweils ein Klon pro Konstrukt verwendet.

3.1.9.2 Subzelluläre Verteilung des pp65-SIINFEKL Fusionsproteins und Produktion von recDB in infizierten HFF

In einer ersten Analyse der rekombinanten Viren wurden infizierte Zellen mittels IFA hinsichtlich der subzellulären Verteilung der Fusionsproteine und der Bildung von DB untersucht (Abbildung 3.16).

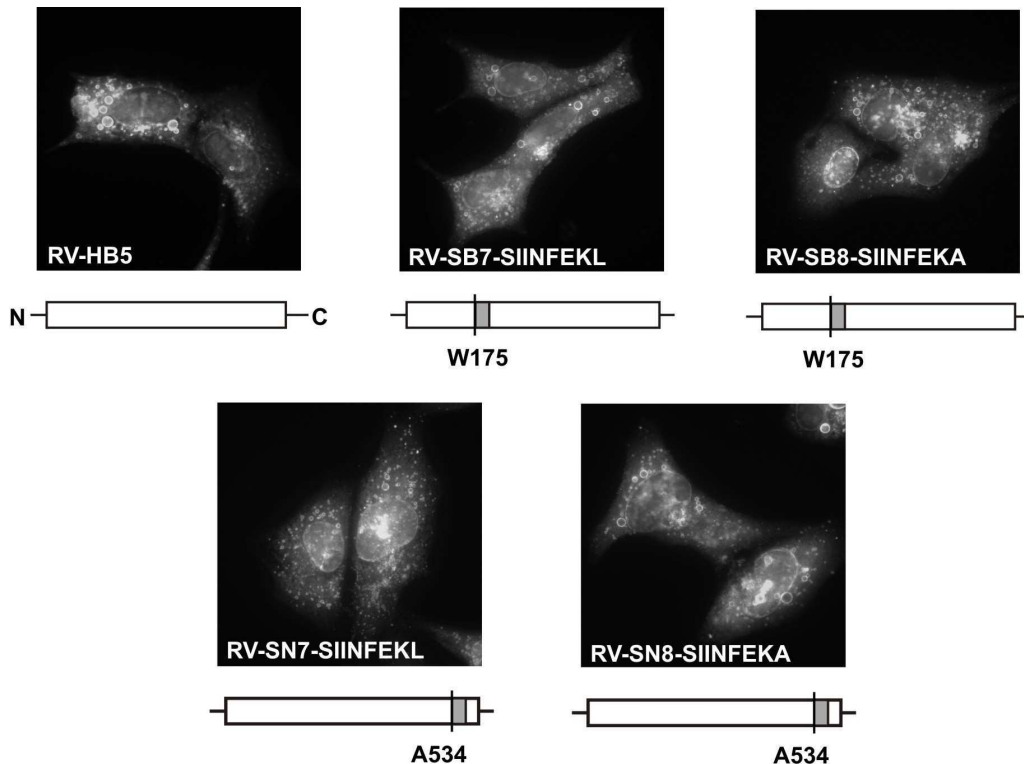


Abbildung 3.16: Indirekte Immunfluoreszenzanalysen von infizierten HFF

Zellen wurden für vier Tage infiziert und anschließend mittels IFA analysiert. Für die Überprüfung der zellulären Verteilung von pp65 wurde ein pp65-spezifischer, monoklonaler Antikörper verwendet. Die Position der Insertion von SIINFEKL bzw. SIINFEKA in pp65 ist unter den jeweiligen Immunfluoreszenzen angegeben. Dabei ist die N-terminale AS von pp65, die die Insertion flankiert, bezeichnet.

HFF, die mit den rekombinanten Viren infiziert worden waren, zeigten nach vier Tagen eine zytoplasmatische Lokalisation von pp65 und Anhäufung von partikulären Strukturen in diesem Kompartiment. Diese Ergebnisse waren von der wt-Kontrolle nicht zu unterscheiden. Sie weisen darauf hin, dass die Insertion eines nicht-viralen Peptides an verschiedene Positionen des pp65 Leserahmens keinen Einfluss auf die Expression und die Lokalisation des Fusionsproteins während der Infektion hat.

3.1.9.3 Freisetzung von rekombinanten Dense Bodies

Zur Analyse der Freisetzung viraler Partikel wurden die Kulturüberstände infizierter HFF mittels Ultrazentrifugation analysiert (Irmiere and Gibson, 1983; Talbot and Almeida, 1977) (Abbildung 3.17).

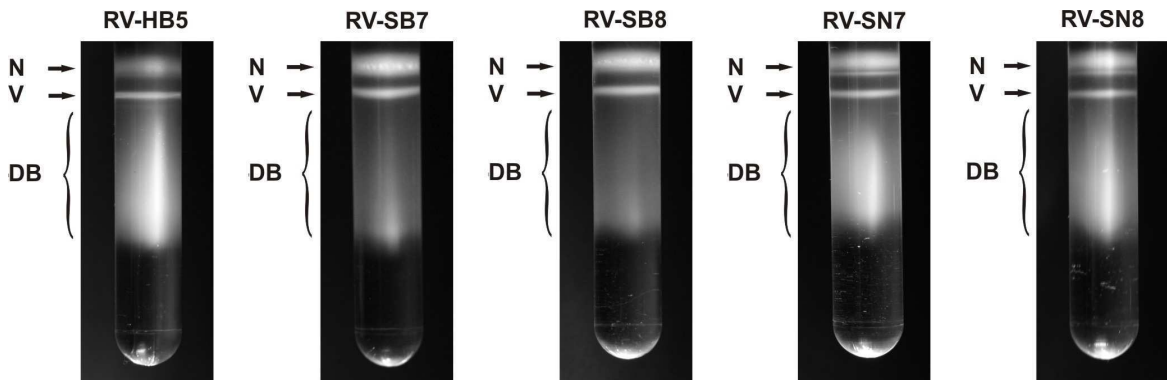


Abbildung 3.17: Auftrennung viraler Partikel mittels Gradienten-Ultrazentrifugation
Banden für NIEPs (N), Virionen (V) und DB sind durch Pfeile oder Klammern dargestellt.

Partikel aus dem Überstand aller rekombinanten Viren zeigten ein zur wt-Situation vergleichbares Bandierungsmuster in Lokalisation und Intensität. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Freisetzung der recDB nicht durch die Insertion von SIINFEKL bzw. SIINFEKA inhibiert wird.

3.1.9.4 Induktion einer SIINFEKL spezifischen CD8 T-Zell Antwort

Zur Untersuchung der Immunogenität der SIINFEKL-DB wurde die CTL-Antwort nach Immunisierung mit recDB in einem Tiermodell getestet (Kapitel 3.1.5 und Abbildung 3.18). Hierzu wurden C57/BL6 Mäuse immunisiert und die CD8 T-Zell Antwort direkt *ex vivo* analysiert.

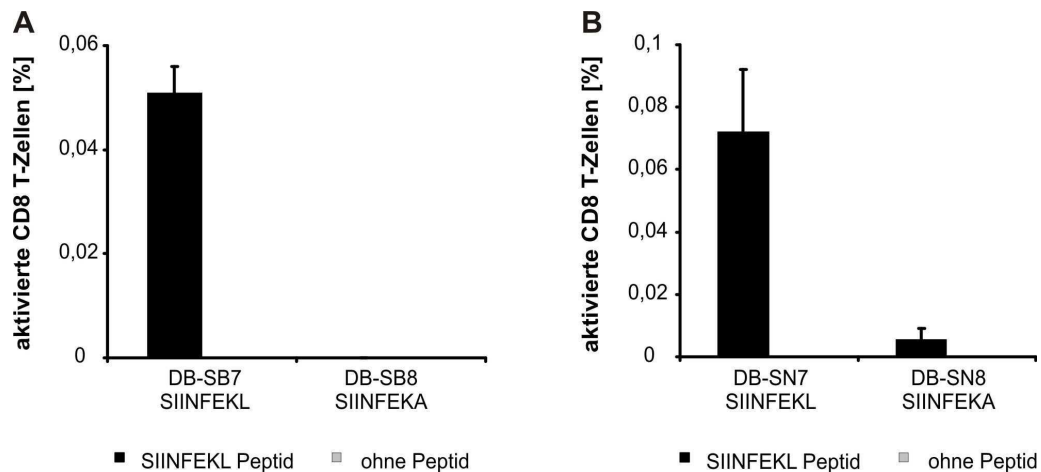


Abbildung 3.18: IFN- γ ELISpot Analysen ex vivo der CD8 T-Zell Antwort nach Immunisierung mit recDB

C57/BL6 Mäuse wurden mit den angegebenen DB immunisiert. Acht Tage nach der Immunisierung wurden die Versuchstiere getötet und die Milzen entnommen. Die CD8⁺ Zellen wurden aus den Gesamt-Milzzellen immunomagnetisch angereichert. Die Zellen wurden anschließend im IFN- γ ELISpot als Effektorzellen verwendet. Als APC dienten EL4 Zellen, die mit dem SIINFEKL Peptid beladen wurden. Die Frequenzen IFN- γ -produzierender CTL wurden mittels linearer Regressionsanalyse mit Hilfe der Statistik-Software Mathematica V6.0.1.0 Statistics "Linear Regression" ermittelt. Die Fehlerbalken geben das 95% Konfidenz-Intervall an.

In der CD8 T-Zell Fraktion von Mäusen, die mit den SIINFEKL-DB DB-SB7 und DB-SN7 immunisiert wurden, konnten SIINFEKL spezifische CD8 T-Zellen nachgewiesen werden. Ein Vergleich der Frequenzen der beiden Ansätze war jedoch nicht möglich, da diese in unterschiedlichen Experimenten ermittelt wurden. Wie erwartet konnten keine SIINFEKL spezifischen CD8 T-Zellen detektiert werden, wenn die Mäuse mit den SIINFEKA-DB DB-SB8 und DB-SN8 immunisiert worden waren.

Zusammengefasst kann durch die Experimente gezeigt werden, dass durch die Immunisierung von Mäusen mit recDB, die das nicht-virale SIINFEKL Peptid beinhalten, eine CD8 T-Zell Antwort gegen dieses Peptid induziert werden kann.

Somit sind die Stellen 175 und 534 des pp65 für die Insertion von Fremdantigenen geeignet. Die Immunogenität des Peptides wird durch die Insertion nicht verändert bzw. beeinträchtigt.

3.2 Analysen der molekularen Funktion von pp65 während der Partikelmorphogenese

Das pp65 wird in HCMV-infizierten Zellen in großer Menge synthetisiert und in Virionen und DB verpackt. Die Rolle, die pp65 bei der viralen Partikelmorphogenese spielt, ist jedoch unklar. In der vorliegenden Arbeit sollte diese Rolle näher untersucht werden. Ziel war es, hieraus Erkenntnisse zur Optimierung der Herstellungsprozedur von DB zu erhalten. Grundlage hierfür war eine Virusmutante (RV-VM1), bei der bereits im Rahmen von Vorarbeiten an der Position pp65-Arg387 das auch in dieser Arbeit verwendetete IE1_{TMV}-Testpeptid inseriert worden war (pp65-VM1) (Mersseman, 2007). Die Mutante RV-VM1 hatte, unerwartet, eine starke Einschränkung ihrer Vermehrungsfähigkeit in Zellkultur gezeigt. Da pp65 bekanntermaßen für die virale Replikation in HFF verzichtbar ist (Schmolke *et al.*, 1995b), lag die Vermutung nahe, dass pp65-VM1 einen dominant-negativen Einfluss auf die Virusvermehrung ausübte. Aus dem Studium der Virusmutante RV-VM1 erhofften wir uns daher Aufschlüsse, auf die bislang schlecht definierten Funktionen des abundantesten Tegumentproteins von HCMV zu erhalten.

Zur Überprüfung, dass der veränderte Phänotyp von RV-VM1 im Vergleich zum wt durch die Insertion des IE1_{TMV} Peptides in pp65 und nicht durch eine andere Mutation im rekombinanten BAC entsteht, wurde in Vorarbeiten eine RV-VM1 Revertante, RV-VM4, generiert (Mersseman, 2007).

3.2.1 Expression des pp65-IE1_{TMV} Fusionsproteins

Zum Nachweis, dass die Insertion des IE1_{TMV}-Peptids an Position pp65 Arg387 keinen Einfluss auf das Expressionsniveau von pp65 in der Zelle hatte, wurden Western-Blot Analysen von Gesamtzellextrakten durchgeführt (Abbildung 3.19). Die Zellen wurden hierfür mit dem wt RV-HB5 und der Mutante RV-VM1 mit einer *moi* von zwei infiziert. Gesamtzellextrakte wurden vier Tage nach Infektion gewonnen und mit dem Odyssey Immunoblot System analysiert.

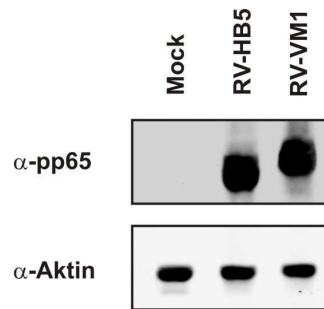


Abbildung 3.19: Western-Blot Analysen von Gesamtzellextrakten infizierter HFF

HFF wurden mit einer *moi* von zwei infiziert und für vier Tage kultiviert. Zellysate wurden anschließend im Odyssey Immunoblot System analysiert. Für den Nachweis von pp65 wurde ein pp65-spezifischer, monoklonaler Antikörper verwendet. Die Proteinmenge in jeder Spur wurde auf eine interne Aktin-Kontrolle normiert.

Es zeigte sich, dass die Mengen an wt-pp65 und pp65-VM1 in Zellen, die mit den entsprechenden Viren infiziert wurden, vergleichbar waren. Dadurch kann verifiziert werden, dass die Mutation in RV-VM1 die Expression von pp65 nicht beeinflusste.

3.2.2 Virale Replikationskinetiken der rekombinanten Viren RV-VM1 und RV-VM4

Ein wesentlicher Abschnitt im Lebenszyklus des HCMV ist die Initiation der viralen DNA Replikation. Es sollte daher in einem nächsten Schritt untersucht werden, ob die eingeschränkte Freisetzung von viralen Partikeln von RV-VM1-infizierten HFF mit verminderter viraler Replikation korrelierte. Dies hätte eine Rolle von pp65 in dieser Phase der Virusvermehrung nahegelegt. HFF wurden mit wt-HCMV, RV-VM1 oder der Revertante RV-VM4 infiziert (Abbildung 3.20). Um vergleichbare Ausgangsbedingungen für die quantitative Messung der viralen DNA-Replikation sicherzustellen, wurden die Zellen mit einer gleichen Anzahl an Genomen (vier Genome pro Zelle, gemessen nach sechstündiger Infektion) infiziert. Aus den infizierten Zellen wurde in 24-stündigen Intervallen DNA isoliert. Die Mengen an viraler DNA wurden mittels quantitative TaqManTM PCR bestimmt.

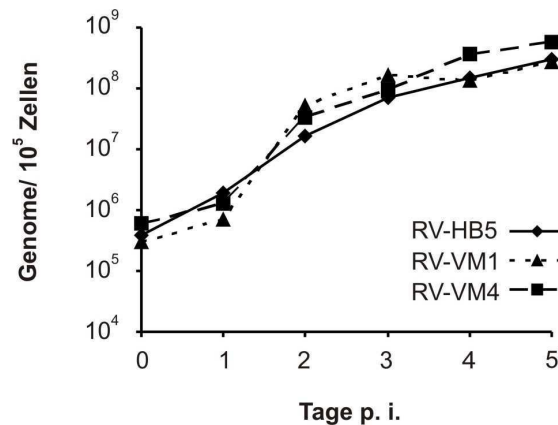


Abbildung 3.20: Taq-Man™ PCR Analyse der viralen DNA-Replikation von RV-HB5, RV-VM1 und RV-VM4

HFF wurden mit vier Genomen pro Zelle mit den angegebenen Viren infiziert. Zur Quantifizierung der viralen DNA pro Zelle wurden die infizierten Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Infektion geerntet, auf eine Zellzahl von 1×10^5 aliquotiert und bis zur Analyse eingefroren. Anschließend wurde die DNA isoliert und die Konzentration viraler DNA mittels TaqMan™ PCR Analyse bestimmt.

In diesen Analysen fanden sich keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Viren. Diese Ergebnisse zeigen, dass die virale Replikation in Zellen, die mit RV-VM1 infiziert wurden, nicht beeinträchtigt ist. Daraus lässt sich die Vermutung ableiten, dass pp65 für die Abläufe in nachfolgenden Phasen des viralen Lebenszyklus wichtig ist.

3.2.3 Zelluläre Verteilung des pp65-IE1_{TMY} Fusionsproteins in RV-VM1 infizierten HFF

Ein wichtiges Merkmal der späten Zeitpunkte einer HCMV Infektion in HFF ist die Translokation von pp65 vom Zellkern in das Zytoplasma (Mersseman *et al.*, 2008a; Schmolke *et al.*, 1995a). Diese zelluläre Verteilung von pp65 überschneidet sich mit der Formation von zytoplasmatischen *Assembly Sites* (Sanchez *et al.*, 2000a; Sanchez *et al.*, 2000b). In diesen Strukturen laufen nach derzeitiger Auffassung wichtige Prozesse der viralen Genexpression und der Partikelreifung ab. Auch das pp65 findet sich zu späten Replikationsphasen in der Nähe dieser Region. Um zu prüfen, ob dieser Phänotyp bei pp65-VM1 erhalten war, wurden IFA von RV-VM1 infizierten HFF durchgeführt (Abbildung 3.21).

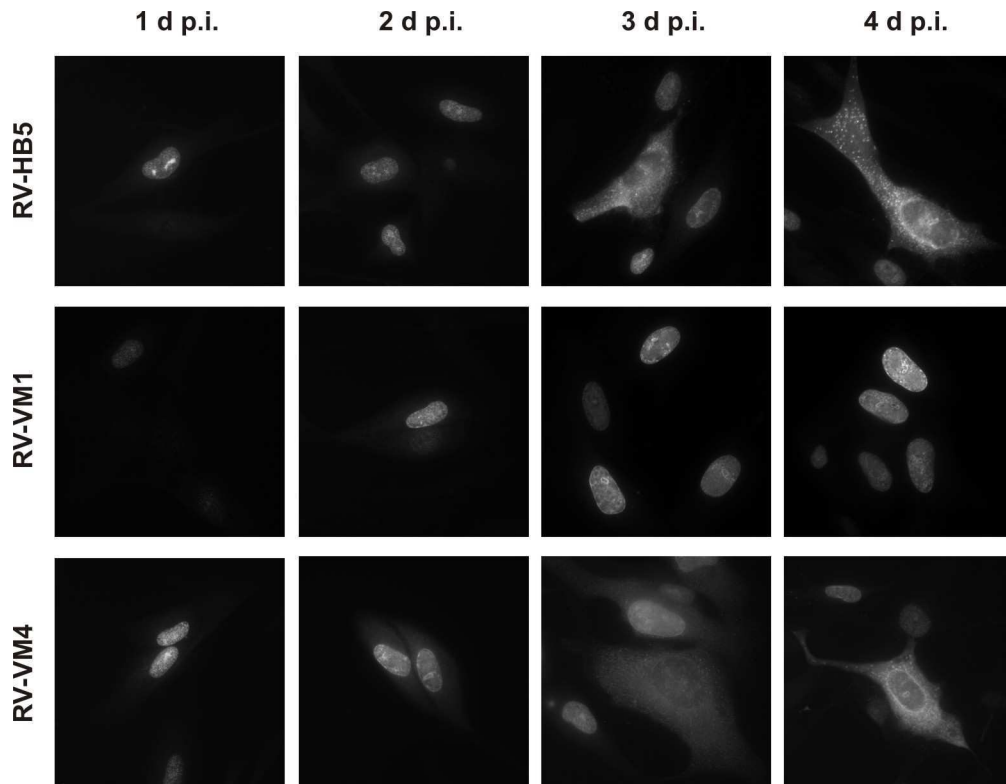


Abbildung 3.21: Indirekte Immunfluoreszenzanalysen von infizierten HFF

HFF wurden für ein bis vier Tage infiziert und zu den angegebenen Zeitpunkten mittels IFA analysiert. Zur Überprüfung der zellulären Verteilung von pp65 wurde ein pp65-spezifischer, monoklonaler Antikörper verwendet.

Die Analysen zeigten den überraschenden Befund, dass pp65-VM1 in infizierten Zellen seine Fähigkeit zur zytoplasmatischen Anhäufung, im Vergleich zu wt-pp65, verloren hatte. In RV-VM1 infizierten HFF fand sich pp65-VM1 ausschließlich im Zellkern. Demgegenüber fanden sich in wt-HCMV- und RV-VM4-infizierten Zellen die typischen nukleozytoplasmatischen Verteilungsmuster des pp65 im Verlauf der Infektion. Diese Ergebnisse zeigen, dass die phänotypischen Veränderungen von RV-VM1 mit einem gestörten Wanderverhalten des pp65-VM1 in infizierten HFF korreliert.

3.2.4 Zelluläre Verteilung von viralen Proteinen in RV-VM1 infizierten HFF

Im Verlauf der Vermehrung des HCMV kommt es zu vielfältigen Wechselwirkungen zwischen viralen Proteinen. Diese Prozesse werden als entscheidend für den geregelten Ablauf der Virusinfektion angesehen. Es wird angenommen, dass pp65 an diesen Vorgängen in herausragender Weise beteiligt ist, ohne dass jedoch Erkenntnisse über die funktionelle Bedeutung des Tegumentproteins vorlagen. So interagiert das pp65 beispielsweise mit dem viralen RNA-Exportprotein pUL69

(Chevillotte *et al.*, 2009) und ist, wie erwähnt, mit zytoplasmatischen *Assembly Sites* assoziiert (Sanchez *et al.*, 2000a). Zur Überprüfung, ob die Veränderung in der subzellulären Verteilung von pp65-VM1 einen Einfluss auf die Lokalisation von anderen, viralen Proteinen hat, wurden Zellen, die mit RV-VM1 infiziert wurden, vier Tage nach der Infektion mittels IFA und konfokaler Mikroskopie analysiert (Abbildungen 3.22 und 3.23). Als Kontrolle der Lokalisation der viralen Proteine in der infizierten Zelle wurden die Zellen zusätzlich mit dem pp65-negativen Stamm RV-Hd65 infiziert. In einem ersten Ansatz wurde geprüft, ob die Lokalisation weiterer, viraler Tegumentproteine in RV-VM1 infizierten Zellen verändert war. Hierzu wurde eine konventionelle IFA durchgeführt (Abbildung 3.22). Es zeigten sich in diesem Ansatz jedoch keine Unterschiede in der Lokalisation der für diese Analyse ausgewählten Proteine pp150, pp71 und pp28 zwischen den verschiedenen Virusstämmen.

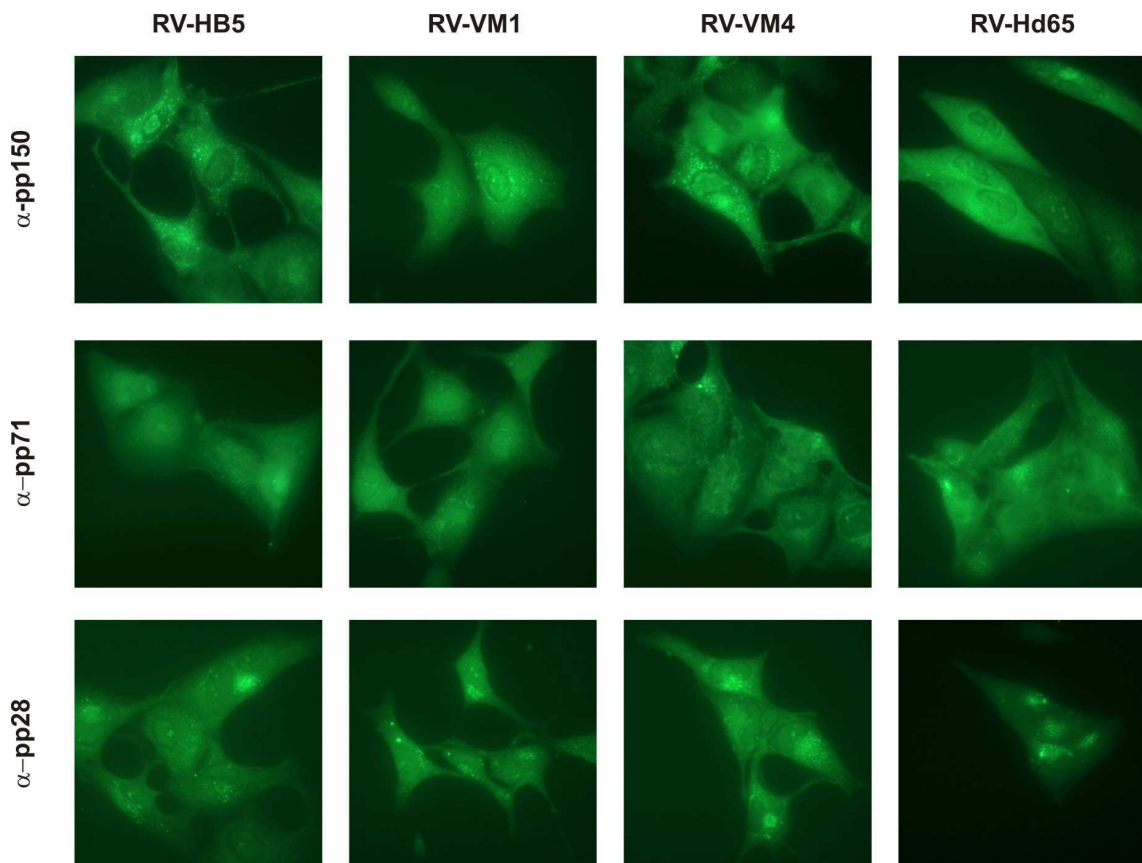


Abbildung 3.22: Indirekte Immunfluoreszenzanalysen von infizierten HFF

Zellen wurden für vier Tage infiziert und mittels IFA analysiert. Zur Überprüfung der zellulären Lokalisation der viralen Proteine wurden spezifische, monoklonale Antikörper gegen die viralen Tegumentproteinen pp150, pp71 und pp28 verwendet.

Im zweiten Schritt wurde die subzelluläre Verteilung des pUL69, eines bekannten Interaktionspartners von pp65 und des Hauptkapsidproteins MCP mit Phasenkontrast- und konfokaler Mikroskopie untersucht (Abbildung 3.23).

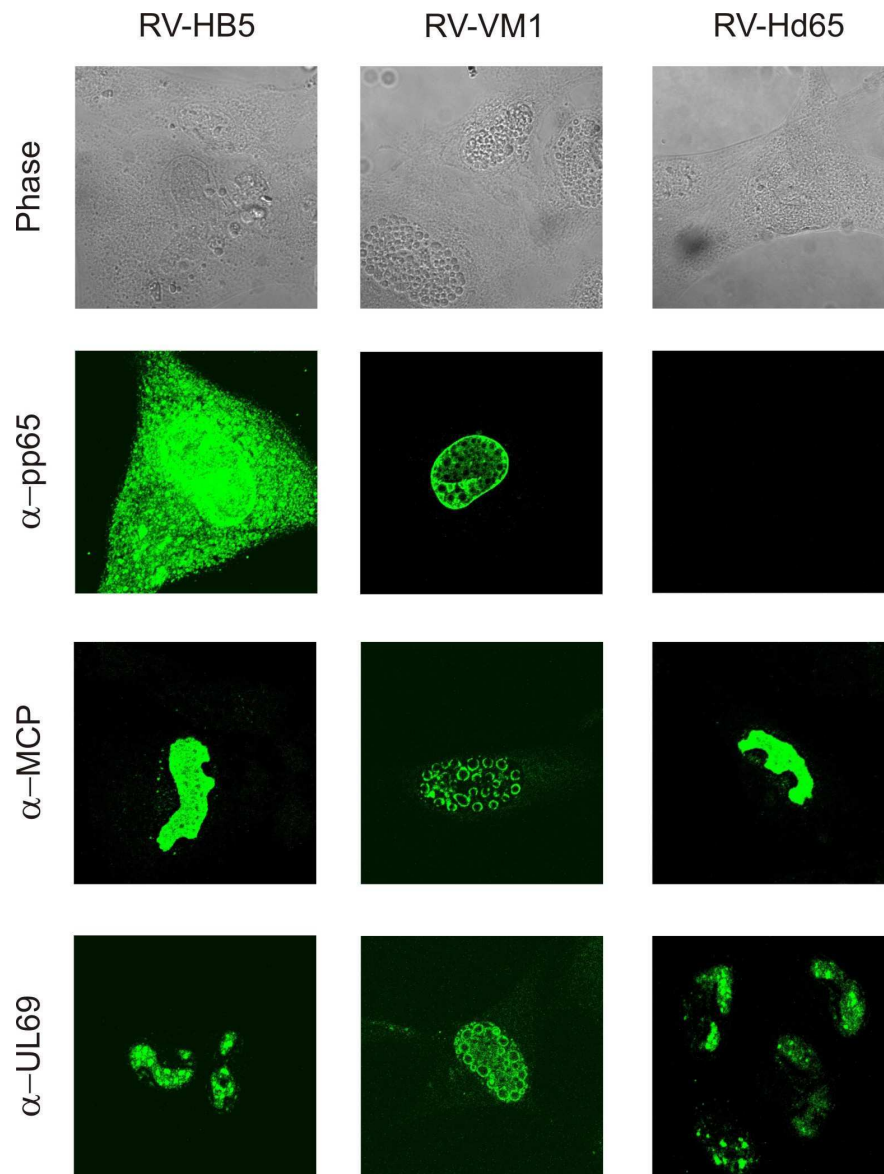


Abbildung 3.23: Phasenkontrastmikroskopie und konfokale Mikroskopie von infizierten HFF

Zellen wurden für vier Tage infiziert. Zur Überprüfung der zellulären Verteilung der viralen Proteine wurden spezifische, monoklonale Antikörper gegen das Hauptkapsidprotein (MCP) und das RNA-Exportprotein (pUL69) verwendet. (Phasenkontrastaufnahmen (Phase))

Im Phasenkontrastbild fanden sich in RV-HB5 oder RV-Hd65 infizierten Zellen die für HCMV typischen retikulär-nuklearen Einschlusskörperchen (*nuclear inclusion bodies*, NIBs) (Gilloteaux and Nassiri, 2000; Maeda *et al.*, 1979), die als Stellen für die virale Replikation, Transkription und Kapsid-Morphogenese angesehen werden. In RV-VM1

infizierten Zellen fanden sich hingegen anstelle der NIBs große globuläre Strukturen (*large globular structures*, LGS), die den gesamten Kern der infizierten Zelle ausfüllten. Interessanterweise wurden diese LGS sowohl mit dem pUL69-spezifischen als auch mit dem MCP-spezifischen Antikörper ringförmig angefärbt. Auch mit dem pp65-spezifischen Antikörper fand sich eine periphere Anfärbung der LGS, gleichzeitig aber auch die bereits bekannte Anfärbung der inneren Kernmembran (Sanchez *et al.*, 1998). Zusammengefasst konnte durch diese Analysen gezeigt werden, dass die Infektion von Zellen mit RV-VM1 zur Auflösung von NIBs, zur Bildung von LGS und zu einer Akkumulation von pp65, pUL69 und MCP in diesen Strukturen führt.

3.2.5 Wechselwirkung von pp65 mit der viralen Kinase pUL97

Ein bekannter Interaktionspartner des pp65 ist die virale Kinase pUL97 (Chevillotte *et al.*, 2009; Cui *et al.*, 2009; Kamil and Coen, 2007). Dieses Protein ist ein Schlüsselenzym im Lebenszyklus des HCMV und, in der Konsequenz, eine wichtige Zielstruktur neuerer, antiviraler Medikamente (Hamirally *et al.*, 2009; Krosky *et al.*, 2003; Marschall *et al.*, 2005; Milbradt *et al.*, 2010; Wolf *et al.*, 2001). Es lag nahe anzunehmen, dass der Phänotyp des RV-VM1 durch eine funktionelle Beeinträchtigung dieses Enzyms begründet ist.

In einem ersten Schritt wurde daher geprüft, ob es möglich ist, durch die Hemmung der Kinasefunktion des pUL97 in wt-HCMV infizierten Zellen die nukleare Retention des pp65 in RV-VM1 zu reproduzieren. Zur Hemmung von pUL97 wurde zunächst das Carbazol Gö6976 eingesetzt (Marschall *et al.*, 2001; Marschall *et al.*, 2002). Da diese Substanz bekannter Maßen auch zelluläre Kinasen in ihrer Funktion beeinträchtigt, wurde zur Kontrolle der chemisch verwandte Inhibitor Gö7874 mitgeführt, der pUL97 nicht hemmt. Die infizierten Zellen wurden vier Tage nach der Infektion mittels IFA analysiert (Abbildung 3.24 A).

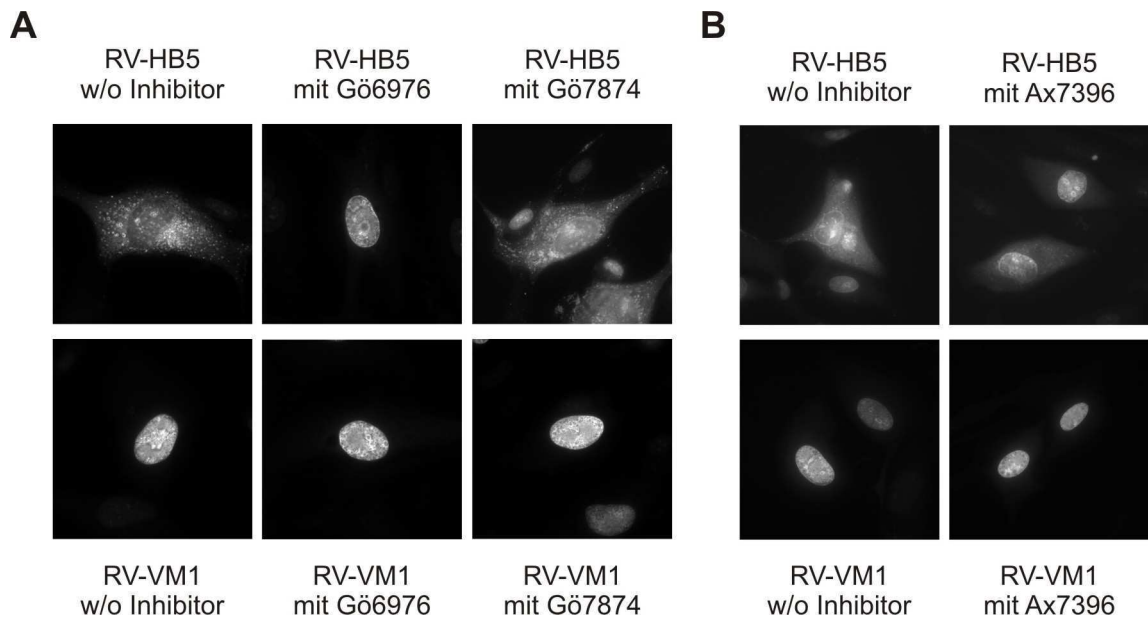


Abbildung 3.24: Indirekte Immunfluoreszenzanalysen von infizierten HFF nach Zugabe verschiedener Inhibitoren

Zellen wurden für vier Tage infiziert und anschließend mittels IFA analysiert. Die Inhibitoren Gö6976, Gö7874 (A) oder Ax7396 (B) wurden in einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ zu bestimmten Ansätzen während der Infektion gegeben. Zu den anderen Ansätzen (without [w/o] Inhibitor) wurde die entsprechende Menge DMSO zugefügt. Zur Überprüfung der zellulären Verteilung von pp65 wurde ein spezifischer, monoklonaler Antikörper verwendet.

In der Tat führte, wie vermutet, die Hemmung von pUL97 in wt-HCMV infizierten Zellen zu einer vollständigen Retention von pp65. Dieser Effekt war pUL97 spezifisch, da Gö7874 diese Effekte nicht zeigte. Die zur Kontrolle mitgeführten, RV-VM1 infizierten Zellen, zeigten mit und ohne Zugabe der Inhibitoren das gleiche, nukleare pp65-Verteilungsmuster.

Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurde pUL97 zusätzlich durch das Quiazolin Ax7396 gehemmt (Herget *et al.*, 2004). Auch in diesen Ansätzen führte die Inhibition von pUL97 zur nuklearen Retention von pp65 in der wt-infizierten Zelle. Dieser Effekt war bei diesen Ansätzen jedoch nur unvollständig, was auf eine eingeschränkte Hemmung von pUL97 durch diese Substanz hindeutet. Diese Ergebnisse zeigen, dass pUL97 an der zytoplasmatischen Translokation von pp65 zu späten Zeitpunkten einer HCMV Infektion beteiligt ist. Die Untersuchungen weisen außerdem darauf hin, dass die Wechselwirkung von pUL97 mit pp65 in Bezug auf die zytoplasmatische Translokation des Tegumentproteins in RV-VM1 infizierten Zellen funktionell beeinträchtigt ist.

3.2.5.1 Wachstumskinetiken von infizierten HFF

In einem nächsten Schritt sollte die Hypothese geprüft werden, ob die Interaktion von pUL97 mit pp65-VM1 die Funktion der Kinase beeinträchtigt. Sollte dies der Fall sein, sollte RV-VM1 gegenüber der Hemmung der pUL97-Kinase resistent sein. Zur Bestätigung dieser Vermutung wurden Zellen mit dem wt RV-HB5 oder der Mutante RV-VM1 mit und ohne Zugabe des pUL97 Inhibitors Gö6976 infiziert. Für die folgenden sechs Tage nach der Infektion wurden täglich Proben der Zellkulturüberstände entnommen. Hieraus wurde DNA isoliert und die virale DNA mittels TaqManTM PCR quantifiziert (Abbildung 3.25).

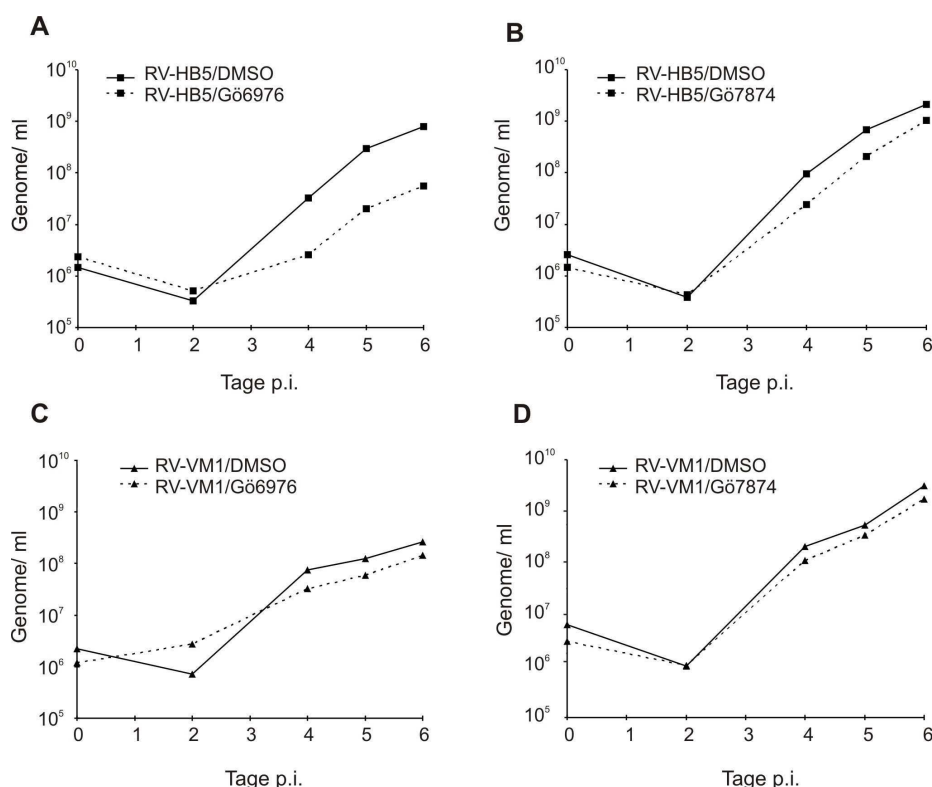


Abbildung 3.25: Virusfreisetzung von infizierten HFF nach Zugabe verschiedener Inhibitoren

Quantitative TaqManTM PCR Analysen der viralen Genome, die in den Zellkulturüberstand von infizierten Zellen freigesetzt werden. Zellen wurden mit RV-HB5 (A, B) oder RV-VM1 (C, D) unter Zugabe von 1 μ M des Inhibitors Gö6976 (A, C) oder des Inhibitors Gö7874 (B, D) mit zehn Genomen pro Zelle infiziert. Zellkulturüberstände wurden zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen und eingefroren. Die virale DNA wurde anschließend aus den Zellkulturüberständen isoliert.

Die Resultate zeigten, dass sich die Virusfreisetzung aus RV-VM1-infizierten Zellen durch die pUL97-Hemmung kaum gegenüber der Kontrolle veränderte. Erwartungsgemäß wurde der parentale RV-HB5 durch Gö6976 signifikant gehemmt,

nicht jedoch durch die Kontrolle Gö7874. Diese Ergebnisse deuten in der Tat darauf hin, dass RV-VM1 gegenüber pUL97-Hemmung resistent ist.

Zur Bestätigung wurde die mittlere inhibitorische Konzentration (50% *inhibitory concentration*, IC₅₀) des Inhibitors Gö6976 für das Wachstum von RV-HB5 und RV-VM1 in HFF bestimmt. Dazu wurden verschiedene Konzentrationen von Gö6976 zum Zeitpunkt der Infektion zu dem Kulturmedium gegeben. Der Gehalt an viraler DNA, die fünf Tage nach der Infektion in den Zellkulturüberstand freigesetzt wurde, wurde mittels quantitativer TaqManTM PCR bestimmt. Der Mittelwert zweier unabhängiger Untersuchungen ergab einen IC₅₀ von 74,5 ± 44,9 nM für RV-VM1 und einen IC₅₀ von 3,1 ± 1,5 nM für RV-HB5. Somit ist RV-HB5 24fach sensitiver gegenüber dem Inhibitor Gö6976 als RV-VM1. Der ermittelte IC₅₀ Wert für RV-HB5 stimmt mit publizierten Daten überein (Marschall *et al.*, 2002). Dies ist erwähnenswert, da diese Arbeiten mit einer anderen Methode durchgeführt wurden.

Zusammengefasst verifizieren diese Ergebnisse die Resistenz von RV-VM1 gegenüber Inhibitoren der viralen Kinase pUL97.

3.2.6 Analyse einer direkten pUL97 Hemmung durch pp65-VM1

Die bis dato erhaltenen Ergebnisse deuteten darauf hin, dass pp65-VM1 pUL97 hemmt. Unklar war hierbei, ob das Fusionsprotein hierfür hinreichend war, oder ob indirekte Effekte in der infizierten Zelle dabei eine Rolle spielten. Um sich dieser Frage zu nähern, wurde ein von Prichard und Kollegen vorgestellter, experimenteller Ansatz gewählt (Prichard *et al.*, 2005). Diese Autoren konnten zeigen, dass eine mit GFP fusionierte Version von pp65 nach transienter Expression nukleare Aggregate bildet, die durch Kotransfektion mit einem pUL97-Expressionsplasmid aufgelöst werden. Unsere Vorstellung war es, dass, sollte pUL97 direkt durch pp65-VM1 gehemmt werden, die Auflösung der nuklearen pp65-Aggregate gehemmt werden sollte. Daher wurde ein Plamid kloniert, welches ein GFP *getagtes* pp65-VM1 Fusionsprotein exprimiert. Dieses Plasmid wurde mit einem pUL97 Expressionsplasmid kotransfiziert (Abbildung 3.26). Die transfizierten Zellen wurden mittels direkter und indirekter Immunfluoreszenz analysiert.

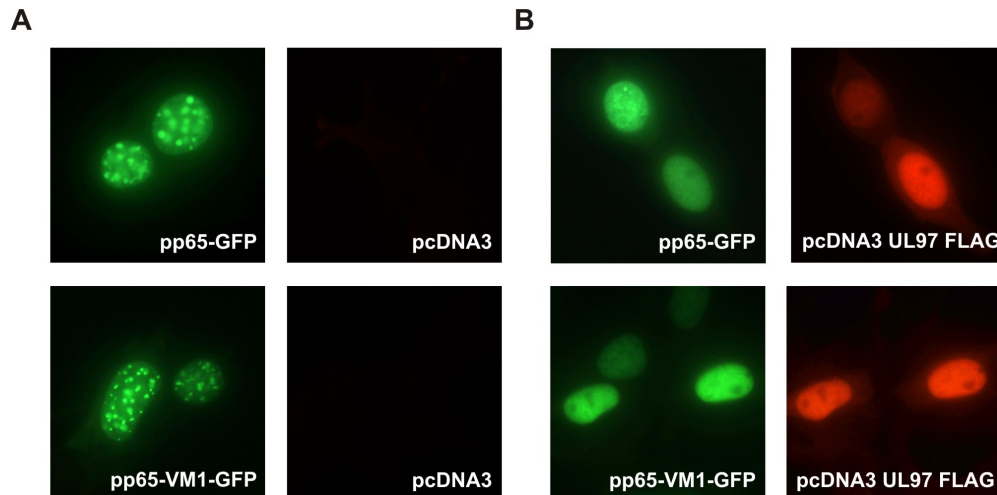


Abbildung 3.26: Immunfluoreszenzanalysen von kotransfizierten 293T Zellen

293T Zellen wurden mit einem pUL97-FLAG Expressionsplasmid und einem GFP *getagtem* pp65 bzw. pp65-VM1 Expressionsplasmid kotransfiziert. Der Nachweis der Proteine erfolgte über den GFP-Fusionsanteil (pp65, grün) bzw. über die Verwendung eines FLAG-spezifischen, monoklonalen Antikörpers (rot).

Erwartungsgemäß führte die Transfektion der pp65-GFP- bzw. pp65-VM1-GFP Expressionsplasmide zur Bildung nuklearer Aggregate. Nach Kotransfektion eines UL97 FLAG Expressionsplasmids verschwanden diese Aggregate sowohl aus pp65-GFP- als auch aus pp65-VM1-GFP transfizierten Zellen. Das pUL97 genauso wie pp65-GFP oder pp65-VM1-GFP zeigten nun eine gleichmäßig nukleare Verteilung. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass pp65-VM1 die Kinaseaktivität von pUL97 nicht direkt beeinflusst, sondern über Interaktion mit anderen viralen oder zellulären Proteinen in der infizierten Zelle Einfluss auf pUL97 nimmt.

3.2.7 Koimmunpräzipitation von viralen und zellulären Proteinen mit pp65

3.2.7.1 Koimmunpräzipitation in Kombination mit einem *in vitro* Kinase Assay

RV-VM1 infizierte Zellen zeigten Kolo-kalisation von pp65-VM1 und pUL69 in nuklearen LGS. Sowohl pp65 als auch pUL69 interagieren mit pUL97 (Chevillotte *et al.*, 2009; Thomas *et al.*, 2009). pUL69 wird überdies von pUL97 phosphoryliert. Es lag nahe anzunehmen, dass es in der infizierten Zelle zur Bildung eines Komplexes kommt, der diese drei Proteine enthält. Um sich dieser Frage zu nähern, wurde ein Koimmunpräzipitations-Experiment in Kombination mit einem IVKA mit Lysaten infizierter Zellen durchgeführt. Hierzu wurden HFF mit wt-HCMV und verschiedenen Mutanten mit einer *moi* von 0,25 infiziert (Marschall *et al.*, 2001) (Abbildung 3.27). Bei

einzelnen Ansätzen erfolgte die Zugabe von 2 μ M der Kinaseinhibitoren. Die Zellen wurden fünf Tage nach der Infektion lysiert. Für die Präzipitation wurde ein pUL97- oder ein pp65-spezifischer Antikörper verwendet.

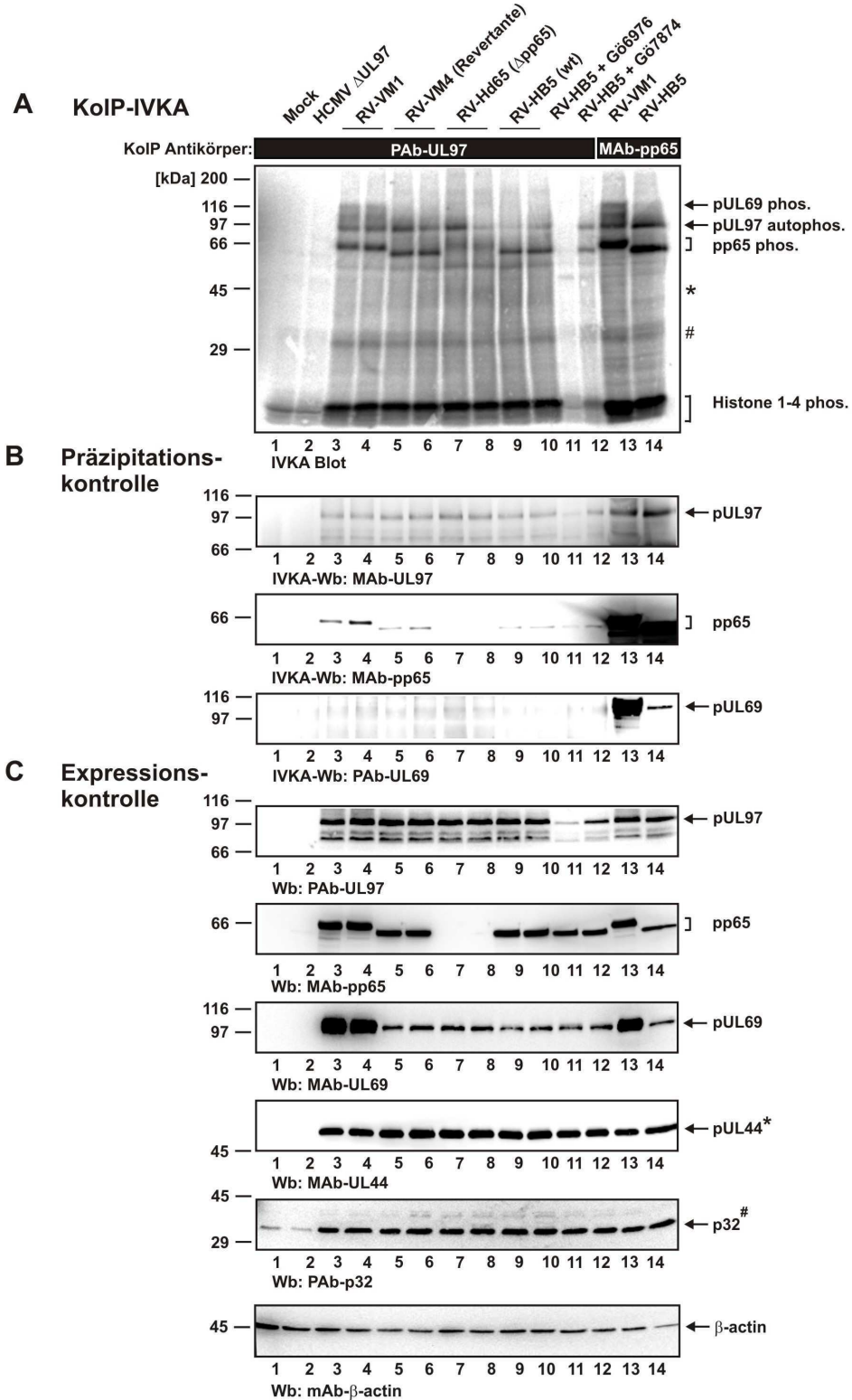


Abbildung 3.27: *In vitro* Kinase Assay von infizierten HFF

Gesamtzelllysate von HCMV-infizierten HFF wurden mittels einer Kombination aus Koimmunpräzipitation und anschließender IVKA analysiert. HFF wurden mit einer *moi* von 0,25 infiziert und für fünf Tage kultiviert. Kinaseinhibitoren wurden 15 Stunden vor der Gewinnung der Zellen zu den RV-HB5 infizierten HFF gegeben (Spur 11 und 12). Die Zellen wurden lysiert und anschließend mittels Koimmunpräzipitation analysiert. Für die Präzipitation wurde ein pUL97- oder ein pp65-spezifischer Antikörper verwendet. (A) Die präzipitierten Proteinkomplexe wurden für eine pUL97-spezifische IVKA verwendet. Die phosphorylierten Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mittels Autoradiographie ausgewertet. Die Phosphorylierungssignale sind auf der rechten Seite des Gels mit Pfeilen und Klammern angegeben. Zusätzliche schwache Banden repräsentieren die nur geringen Mengen an pUL44 (*) und p32 (#), die kopräzipitiert werden konnten. Als Standardsubstrat von pUL97 wurde ein Histongemisch (Histone H1-H4) zum Versuchsansatz zugegeben. (B) Zur Kontrolle der Koimmunpräzipitation wurden die Zelllysate mittels Western-Blot untersucht (Präzipitationskontrolle). Für die Detektion der Proteine wurden monoklonale UL97-Antikörper, monoklonale Antikörper 28-77 (Detektion von pp65) und monoklonale UL69-Antikörper verwendet. (C) Zur Kontrolle der Expression der Proteine in der infizierten Zelle wurden die Gesamtzelllysate mittels Western Blot analysiert (Expressionskontrolle). Die Zellen wurden vor der Zugabe der Präzipitationsantikörper gewonnen. Die Proteinmenge in jeder Spur wurde durch die interne Aktin-Kontrolle normiert.

Mit dem pUL97-spezifischen Antikörper konnte in allen Ansätzen, die mit den Zelllysaten von RV-HB5, RV-VM1, RV-VM4 und RV-Hd65 infizierten HFF durchgeführt wurden, wie erwartet pUL97 präzipitiert werden (Abbildung 3.27 B). Wurden die Zellen mit RV-HB5, RV-VM1 und RV-VM4 infiziert, konnte pp65 und pUL69 kopräzipitiert werden. Jedoch war die Konzentration an pUL69 im Vergleich zu pp65 deutlich geringer.

Mit dem pp65-spezifischen Antikörper konnten sowohl pUL97 als auch pUL69 kopräzipitiert werden. Dabei fiel auf, dass aus Lysaten RV-VM1-infizierter Zellen deutlich mehr pUL69 präzipitierbar war, als aus Zellen, die mit RV-HB5 infiziert worden waren. In den zur Kontrolle durchgeführten Immunoblots der infizierten Zellen vor Präzipitation (Abbildung 3.27, C) fand sich in RV-VM1 infizierten Zellen deutlich mehr pUL69 als in allen anderen Ansätzen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass pp65 in der Tat mit pUL69 und pUL97 in einem Komplex in der Zelle vorliegt und dass pUL69 in RV-VM1 infizierten Zellen in größerer Menge vorkommt als in Zellen, die wt-pp65 oder kein pp65 exprimieren.

Zur Analyse, ob Komponenten des präzipitierten Komplexes durch pUL97 phosphoryliert wurden, wurde ein IVKA durchgeführt. Erwartungsgemäß konnte sowohl nach Fällung mit dem pUL97-spezifischen Antikörper als auch mit dem pp65-spezifischen Antikörper Phosphorylierung des pUL69 nachgewiesen werden. In RV-VM1 infizierten Zellen fand sich dabei ein deutlich stärkeres Signal, was durch die verstärkte Expression des Proteins in diesen Zellen erklärbar war (Abbildung 3.27, A). In ähnlicher Weise konnte in allen Ansätzen mit Ausnahme von Zellen, die mit dem

pp65-negativen Stamm RV-Hd65 infiziert worden waren, eine deutliche Phosphorylierung von pp65 nachgewiesen werden. Die Phosphorylierung von pp65 und pUL69 konnte durch Inhibition von pUL97 aufgehoben werden und war somit klar der Aktivität der viralen Kinase zu zuschreiben.

Als Kontrollsubstrate wurden zelluläre Histone (Histone H1-H4) zu den verschiedenen Ansätzen gegeben. Dabei konnte bei allen Ansätzen ein konstantes Phosphorylierungssignal detektiert werden (Abbildung 3.27 A, Spur 3-10, 13-14). In der Negativkontrolle nach Infektion mit einer pUL97 Deletionsmutante (HCMV Δ UL97) war die Histonphosphorylierung deutlich eingeschränkt (Spur 2). Die Autophosphorylierung von pUL97 konnte ebenso in allen Ansätzen nachgewiesen werden. Dabei konnten keine Unterschiede in der Intensität detektiert werden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Funktion der viralen Kinase in dem präzipitierten Komplex nicht beeinträchtigt ist. Durch die Zugabe des Inhibitors Gö6976 konnte sowohl die Autophosphorylierung als auch die Substratphosphorylierung von den Histonen H1-H4 fast vollständig blockiert werden (Spur 11).

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse erstmalig, dass pp65 ein Substrat von pUL97 darstellt. Durch die Kombination der Koimmunpräzipitation und der IVKA konnte eine direkte *in vitro* Phosphorylierung von wt-pp65, pp65-VM1 und pp65-VM4 nachgewiesen werden. Dabei traten keine Unterschiede in der Intensität der Phosphorylierung auf. Dies weist darauf hin, dass die Insertion von IE1_{TMY} in pp65 keinen direkten Einfluss auf die Phosphorylierung von pp65 durch pUL97 ausübt. Jedoch kann durch diese Experimente nicht belegt werden, dass wt-pp65 und pp65-VM1 an derselben Position phosphoryliert werden.

Phosphorylierung des viralen Polymerase-Prozessivitätsfaktors pUL44 (Marschall *et al.*, 2003) und des zellulären p32 (Marschall *et al.*, 2005) durch pUL97, die hier zur Kontrolle mit analysiert wurde, konnte bestätigt werden, wobei in diesen Fällen in unseren Händen die Nachweisgrenze erreicht wurde. Interessanterweise konnte durchgängig eine vermehrte Expression des zellulären p32 in der HCMV-infizierten Zelle detektiert werden (Abbildung 3.27 C, [Spur 3-14], vergleiche mock-infizierten Zellen [Spur 1] und HCMV Δ UL97 infizierte Zellen [Spur 2]). Die verstärkte Expression von p32 konnte auch in RV-VM1 infizierten Zellen beobachtet werden (Spur 3-4, 13).

Durch diese Ergebnisse wurde somit gezeigt: (i) pp65, pUL69 und pUL97 kommen in der infizierten Zelle in einem oder mehreren Proteinkomplexen gemeinsam vor. Der Anteil an diesen Proteinkomplexen ist in RV-VM1 infizierten Zellen deutlich verstärkt.

(ii) Sowohl pp65-VM1 und wt-pp65, als auch pUL69 werden in Kopräzipitaten von infizierten Zellen durch die virale Kinase pUL97 phosphoryliert. (iii) Das *steady state* Level an pUL69 ist in Zellen, die mit RV-VM1 infiziert wurden, im Vergleich zu wt-infizierten Zellen deutlich erhöht.

3.2.7.2 Identifikation von viralen Interaktionspartnern des pp65

Die Aufklärung der Funktionen des pp65 wurde bislang durch die fehlende, phänotypische Veränderung von pp65-negativen Stämmen des HCMV behindert (Schmolke *et al.*, 1995b). Aktuelle Erkenntnisse zur Molekularbiologie verwandter Herpesviren deuten darauf hin, dass eine *loss-of-function* nach Mutation oder Deletion einzelner Schlüsselproteine dieser Viren durch eine *compensation-of-function* durch andere, virale Proteine ausgeglichen werden kann. Dies macht funktionelle Analysen schwierig. Der dominant-negative Phänotyp von RV-VM1 ermöglichte die vergleichende, funktionelle Untersuchung. Hypothese war es, dass aus der vergleichenden Analyse der Proteinzusammensetzung von intrazellulären Komplexen, die wt-pp65 oder pp65-VM1 enthalten, Hinweise auf die Funktion des Tegumentproteins erhalten werden. In einem ersten Schritt sollten daher weitere Komponenten der in der IVKA nachgewiesenen Komplexe definiert werden. Hierzu wurden Koimmunpräzipitationen von Zelllysaten infizierter Zellen durchgeführt. Die präzipitierten Proteinkomplexe wurden anschließend massenspektrometisch analysiert (Abbildung 3.28 und 3.29). Zur Kontrolle der Präzipitation der Proteinkomplexe wurden diese zunächst mittels Coomassie-Färbung analysiert (Ergebnisse nicht dargestellt). Die Zellen wurden mit einer *moi* von eins infiziert und für vier Tage kultiviert. Für die Koimmunpräzipitation wurde ein pp65-spezifischer monoklonaler Antikörper verwendet.

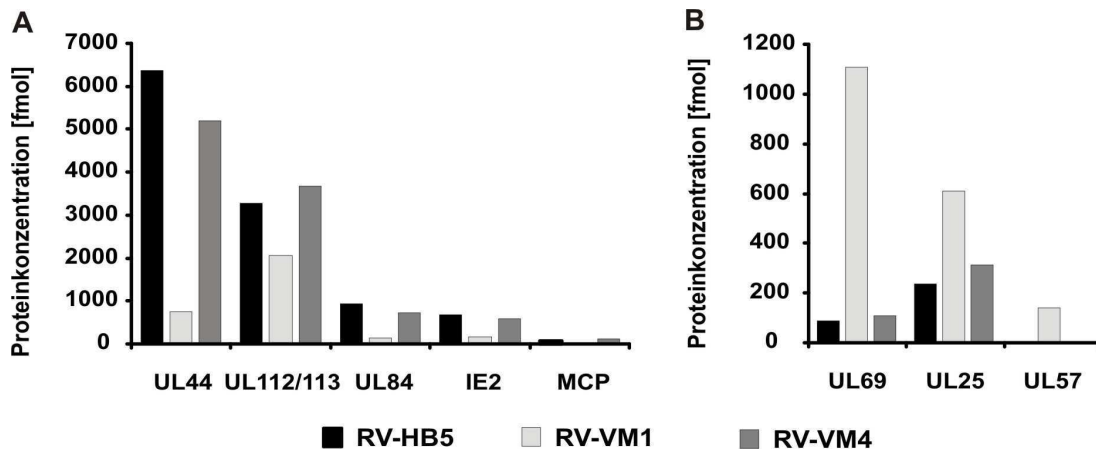


Abbildung 3.28: Massenspektrometrische Analysen der kopräzipitierten, viralen Proteine

Zellen wurden mit einer *moi* von eins infiziert. Die Zelllysate wurden vier Tage nach der Infektion gewonnen. Für die Präzipitation wurde ein pp65-spezifischer, monoklonaler Antikörper verwendet. Die präzipitierten Proteinkomplexe wurden anschließend massenspektrometrisch analysiert. Für die Auswertung wurden nur Proteine mit einbezogen, die in mindestens zwei Durchläufen der Dreifachbestimmung nachgewiesen werden konnten. Proteine, die mit pp65-VM1 in verminderter Konzentration kopräzipitiert werden konnten, sind in Abbildung A dargestellt. In Abbildung B sind die Proteine, die bei RV-VM1 verstärkt präzipitiert wurden, angegeben.

Die massenspektrometrischen Analysen der präzipitierten Proteinkomplexe zeigte überraschender Weise eine Anhäufung von viralen Proteinen, die für die DNA-Replikation von HCMV essentiell sind (pUL44, pUL112/113, pUL84, IE2 und pUL57). Ebenso überraschend war, dass sich diese Proteine bevorzugt aus Zellen präzipitieren ließen, die mit wt-HCMV oder der Revertante RV-VM4 infiziert worden waren. Dies deutete darauf hin, dass wt-pp65 zum untersuchten Zeitpunkt (vier Tage p.i.) zur viralen DNA rekrutiert wurde. Aus RV-VM1 infizierten Zellen konnten die erwähnten Proteine zwar ebenso präzipitiert werden, hier jedoch, mit Ausnahme von pUL57, in deutlich geringerer Menge.

Erwartungsgemäß konnte aus RV-VM1 infizierten Zellen pUL69 in deutlich größerer Menge präzipitiert werden als aus RV-HB5 oder RV-VM4 infizierten Zellen. Bemerkenswert erschien schließlich, dass auch pUL25 in deutlichen Mengen in Präzipitaten aus allen drei Ansätzen nachweisbar war. Dieses Protein ist nach pp65 der zweithäufigste Bestandteil von DB (Varnum *et al.*, 2004). Zusammengefasst lässt sich aus diesen Untersuchungen schließen, dass wt-pp65 in späteren Phasen der HCMV-Vermehrung zu den Orten der DNA-Replikation rekrutiert wird. Da wir aus den bislang vorliegenden Erkenntnissen keinen Anhalt auf einen Einfluss des Tegumentproteins auf die DNA-Replikation *per se* haben, ergibt sich die Hypothese,

dass es an Prozessen beteiligt ist, die unmittelbar nach Vermehrung des viralen Genoms ablaufen. Das pp65-VM1 scheint in dieser Funktion gestört zu sein, was mit einer Verdrängung replikativer Proteine aus dem Komplex und einer Anhäufung des RNA-Exportproteins pUL69 einhergeht.

3.2.7.3 Identifikation von zellulären Interaktionspartnern des pp65

In einem nächsten Analyseschritt erfolgte die Auswertung der massenspektrometrischen Daten hinsichtlich der Nachweisbarkeit zellulärer Proteine in den mit pp65-Antikörpern präzipitierten Komplexen. In den Komplexen, die wt-pp65 enthielten, fanden sich die Histone H2A und H2B, H3 und H4, sowie Tubulin, Nukleolin, Nukleophosmin und hnRNP U. Überraschend war, dass auch diese zellulären Proteine in pp65-VM1 Komplexen entweder überhaupt nicht nachweisbar waren oder in deutlich niedrigeren Mengen vorkamen als in Komplexen mit wt-pp65.

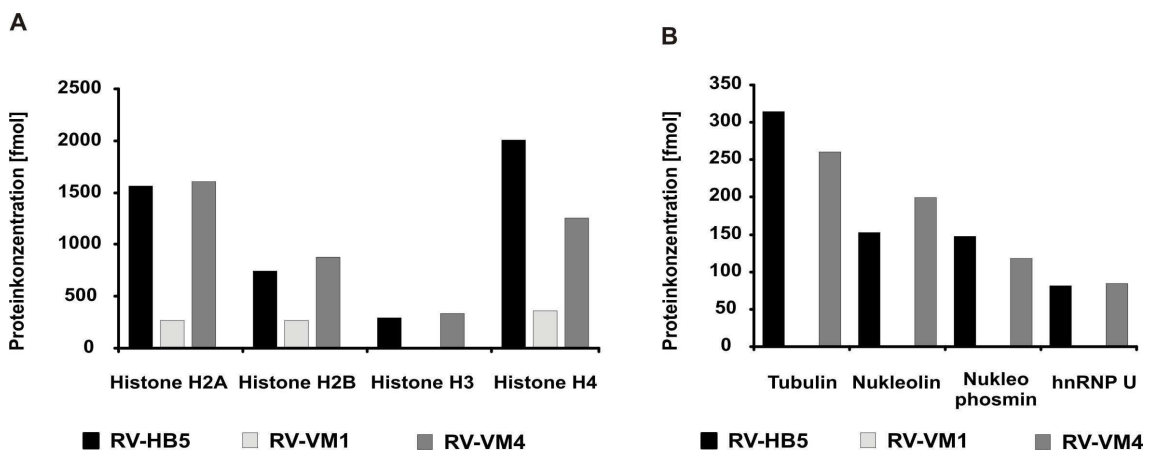


Abbildung 3.29: Massenspektrometrische Analysen der kopräzipitierten, zellulären Proteine

Zellen wurden mit einer *moi* von eins infiziert. Die Zelllysate wurden vier Tage nach der Infektion gewonnen. Für die Präzipitation wurde ein pp65-spezifischer, monoklonaler Antikörper verwendet. Die präzipitierten Proteinkomplexe wurden massenspektrometrisch analysiert. Für die Auswertung wurden nur Proteine mit einbezogen, die in mindestens zwei Durchläufen der Dreifachbestimmung nachgewiesen werden konnten. In Abbildung A ist der Vergleich der Proteinkonzentration der verschiedenen Histone in den Komplexen angegeben, in Abbildung B der Gehalt an Tubulin, Nukleolin, Nukleophosmin und hnRNP U.

Die Histone dienen in der Zelle der Verpackung der DNA. Im Gegensatz dazu besitzt Nukleolin eine Funktion bei der Synthese und der Reifung von Ribosomen. Nukleophosmin spielt eine Rolle bei der Zusammenlagerung und dem Transport von Ribosomen. Das Protein hnRNP U gehört zur Familie der Heterogenen nuklearen Ribonukleoproteinen (hnRNP). Diese Familie besteht aus RNA bindenden Proteinen, die die Prozessierung von pre-mRNA beeinflussen und andere Aspekte des mRNA

Metabolismus und Transportes. Somit konnten neben Histonen vorwiegend solche zellulären Proteine als Interaktionspartner des wt-pp65 identifiziert werden, die in den Metabolismus und den Transport von RNA eingreifen. Wird statt wt-pp65 pp65-VM1 in der infizierten Zelle exprimiert, scheinen diese Proteine, möglicher Weise durch pUL69, aus diesem Komplex verdrängt zu werden.

3.2.7.4 Assoziation viraler DNA mit pp65-haltigen Komplexen

Die massenspektrometrischen Analysen hatten gezeigt, dass pp65 mit zellulären Histonen in einem oder mehreren Komplexen in der infizierten Zelle vorkommt. Histone spielen eine wichtige Rolle bei der Verpackung zellulärer und viraler DNA. Es lag die Vermutung nahe, dass pp65 zu Orten in der Zelle rekrutiert wird, in denen virale DNA angehäuft wird. Es sollte daher geprüft werden, ob sich in den Präzipitaten aus infizierten Zellen virale DNA nachweisen ließ. Die Hypothese war, dass die verminderte Bindung von Histonen an den pp65-VM1 Komplex mit deutlich reduzierten Mengen des viralen Genoms korreliert. Bei einer zufälligen Assoziation viraler Genome mit präzipitierten Komplexen sollte sich demgegenüber kein wesentlicher Unterschied zeigen.

Der Gehalt viraler DNA in wt-pp65- und pp65-VM1-haltigen Komplexen wurde mittels quantitativer TaqMan™ PCR analysiert (Abbildung 3.30). Die Zellen wurden hierzu mit einer *moi* von eins infiziert. Zelllysate wurden vier Tage nach der Infektion gewonnen. Für die Präzipitation wurde ein pp65-spezifischer, monoklonaler Antikörper verwendet.

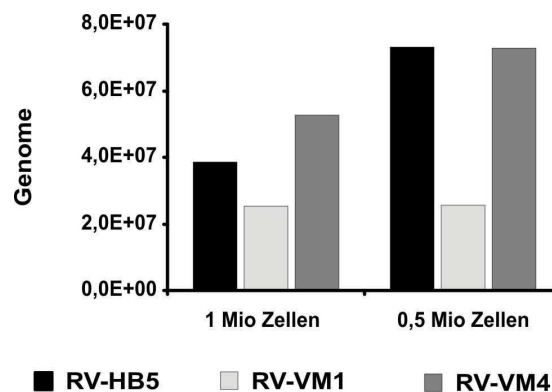


Abbildung 3.30: Untersuchung des Gehaltes an viraler DNA in den präzipitierten Proteinkomplexen

Quantitative TaqMan™ PCR Analysen der viralen Genome, die in den präzipitierten Proteinkomplexen enthalten sind. Zellen wurden mit einer *moi* von eins infiziert. Vier Tage nach der Infektion wurden die Zelllysate gewonnen. Für die Präzipitation wurde ein pp65-spezifischer, monoklonaler Antikörper verwendet. Die DNA wurde anschließend aus den Proteinkomplexen isoliert.

Die Analysen zeigten in der Tat, dass virale DNA in wt-pp65-haltigen Komplexen enthalten war und dass der Gehalt an viraler DNA in diesen Komplexen, analog dem Histongehalt, deutlich höher war als in pp65-VM1 Komplexen. Somit korreliert der DNA Gehalt in den Komplexen mit dem Gehalt an Histonen, aber auch mit dem Gehalt an viralen Replikationsproteinen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass pp65 tatsächlich zu Orten im Zellkern geleitet wird, an denen virale Genome akkumulieren.

3.2.8 Expression verschiedener viraler Proteine in infizierten HFF

Die bisherigen Analysen hatten gezeigt, dass die Expression des dominant-negativen pp65-VM1 den viralen Vermehrungszyklus in einer Phase der Infektion beeinflusst, der zeitlich nach der viralen DNA Synthese, also während der späten viralen Genexpression zu suchen war. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass pp65 zu Orten im Zellkern transportiert wird, in denen auch virale DNA angehäuft ist. Es lag daher nahe anzunehmen, dass pp65 Einfluss auf die späte Genexpression nimmt. In der Konsequenz sollte die Expression später Gene in RV-VM1 infizierten Zellen beeinträchtigt sein. Zur Analyse der Proteinexpression wurden Western-Blot Analysen von Gesamtzellextrakten durchgeführt. Dazu wurden die Zellen mit wt-HCMV und verschiedenen Mutanten mit einer *moi* von zwei infiziert. Die Gesamtzellextrakte wurden vier Tage nach der Infektion der Zellen geerntet und mittels Odyssey Western analysiert (Abbildung 3.31). Als interner Standard wurde das zelluläre Aktin verwendet.

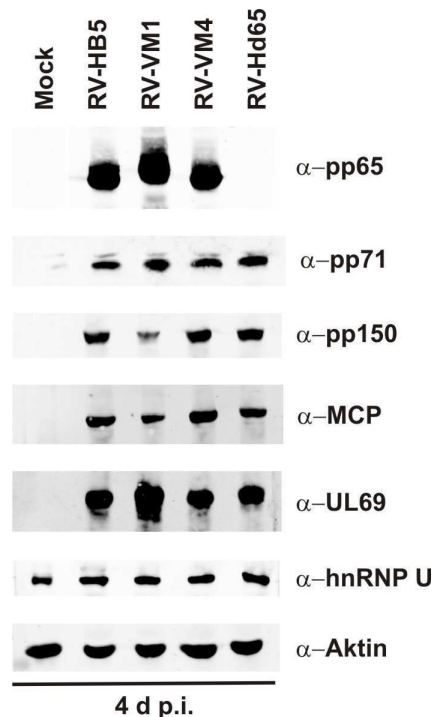


Abbildung 3.31.: Western-Blot Analysen von Gesamtzellextrakten von infizierten HFF

Odyssey Western Analysen von Gesamtzellextrakten, die nach vier Tagen nach der Infektion gewonnen wurden. Die Zellen wurden mit einer *moi* von zwei infiziert. Die für den Nachweis eingesetzten Antikörper sind im rechten Teil gezeigt. Die Proteinmenge in jeder Spur wurde durch die interne Aktin-Kontrolle normiert.

Die Expressionsrate von pp65-VM1 war in infizierten Zellen wie bereits gezeigt nicht verändert (Abbildung 3.19). Auch das Expressionsniveau des Tegumentproteins pp71 und des zellulären hnRNP U war in RV-VM1 infizierten Zellen nicht beeinträchtigt. Im Gegensatz dazu konnten in der Tat die späten viralen Proteine pp150 und MCP in den Gesamtzellextrakten von RV-VM1 infizierten Zellen im Vergleich zur wt-Situation nur in deutlich verringerten Mengen gefunden werden. Erwartungsgemäß ließ sich pUL69 erneut in RV-VM1 Lysaten verstärkt nachweisen. Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass RV-VM1 einen deutlichen Defekt in der Expression später viraler Proteine aufweist.

3.2.9 Synthese viraler RNA verschiedener Proteine

In einem nächsten Schritt wurde geprüft, inwieweit die verminderte Expression später, viraler Proteine mit einer Reduktion der kodierenden RNAs korreliert. Hierzu wurden Northern Blot Analysen durchgeführt. HFF wurden mit einer *moi* von fünf infiziert. Am vierten Tag nach der Infektion wurde gesamtzelluläre RNA aus den infizierten Zellen isoliert, elektrophoretisch aufgetrennt und mit spezifischen DIG-markierten DNA-

Sonden hybridisiert (Abbildung 3.32). Als interner Standard wurde eine spezifische Sonde gegen die zelluläre GAPDH verwendet.

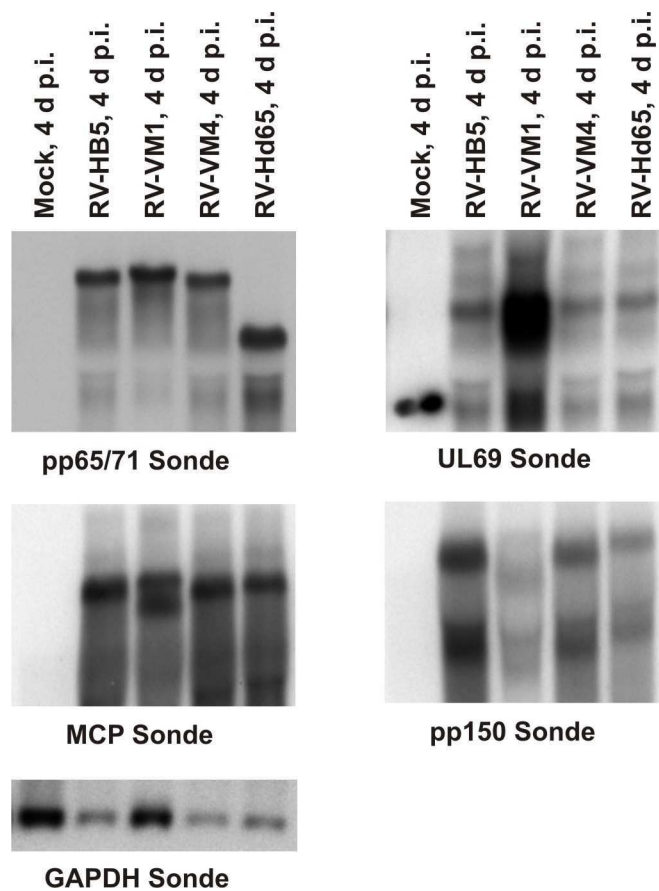


Abbildung 3.32: Northern Blot Analysen von Gesamt-RNA aus infizierten HFF

Zellen wurden mit einer *moi* von fünf infiziert. Am vierten Tag nach der Infektion wurde die gesamtzelluläre RNA aus den Zellen isoliert. Pro Spur wurden 15 µg RNA aufgetragen. Zur Detektion wurden spezifische DIG-markierte DNA-Sonden verwendet. Als interner Standard wurde eine spezifische GAPDH-Sonde verwendet.

Diese Analysen zeigten das erstaunliche Ergebnis, dass die Überexpression des pUL69 in RV-VM1 infizierten Zellen in der Tat mit deutlich erhöhten Mengen der kodierenden RNA korreliert. Dies lässt sich entweder durch eine verstärkte Transkriptionsrate oder, wahrscheinlicher, durch eine Stabilisierung der UL69-mRNA erklären. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um dies näher zu untersuchen.

Ein wichtiges Ergebnis aus diesen Analysen war es, dass RNAs, die für späte virale Proteine kodieren (pp150 und MCP), tatsächlich deutlich vermindert bzw. in aberranter Form nachweisbar waren. Dies korrelierte mit der verminderten Protein-Expressionsrate von pp150 und MCP in RV-VM1 infizierten Zellen. Der Befund erscheint insofern interessant, da pUL69, welches verstärkt in pp65-VM1 Komplexen

rekrutiert wird, als *Shuttle*-Protein essentiell am Export später, ungesplicerter, viraler RNAs beteiligt ist. Es liegt nahe anzunehmen, dass pp65-VM1 pUL69 in seiner RNA-Exportfunktion behindert und RNAs später Gene des HCMV daher vermindert exportiert und translatiert werden. Dies wiederum impliziert, dass wt-pp65 an diesem Prozess regulatorisch beteiligt ist.

4 Diskussion

4.1 Entwicklung einer modifizierten Dense Body Vakzine

HCMV ist ein ubiquitär vorkommendes, fakultativ-pathogenes Virus, das insbesondere bei Menschen mit eingeschränkten oder unausgereiften Immunabwehrfunktionen schwere Krankheiten verursacht. Die Entwicklung eines Impfstoffes zur Prävention kongenitaler HCMV-Infektionen wurde in der Konsequenz 1999 vom *Institut of Medicine* der US-amerikanischen *National Academy of Science* als Ziel mit höchster Priorität eingestuft (Stratton *et al.*, 2001). Bis jetzt steht jedoch trotz vielfältiger, experimenteller Ansätze noch kein zugelassener Impfstoff zur Verfügung. Nach aktuellem Wissensstand muss ein wirksamer Impfstoff gegen HCMV sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunantwort ansprechen (zur Übersicht siehe (Pass *et al.*, 2009; Pepperl-Klindworth and Plachter, 2006; Schleiss, 2008)). Ein Ansatz stellt die Expression von HCMV Proteinen durch *Replikons* von α -Herpesviren dar. Diese weisen eine gute Verträglichkeit auf und führen zur Induktion zellulärer und humoraler Immunantworten gegen HCMV (Bernstein *et al.*, 2009). Vielversprechende Resultate erhielt man auch aus Studien, in denen aufgereinigtes gB des HCMV eingesetzt wurde (Pass *et al.*, 2009). Die Immunisierung mit diesem Protein war geeignet, signifikante Spiegel HCMV neutralisierender Antikörper im Probanden zu induzieren.

Ein von vielen Experten genannter Schwachpunkt vieler HCMV-Impfstoffkandidaten ist jedoch deren enge antigenetische Bandbreite. Nach aktueller Lehrmeinung muss ein erfolgreicher Impfstoff die Diversitäten der HLA-Expressionsmuster in der Bevölkerung berücksichtigen. In der Konsequenz sollte die antigene Zusammensetzung eines solchen Impfstoffes möglichst breit angelegt werden und möglichst viele der relevanten viralen Antigene enthalten.

DB erfüllen diese Voraussetzung und stellen daher eine hervorragende Grundlage für die HCMV-Impfstoffentwicklung dar. Sie tragen wichtige Zielantigene der HCMV-neutralisierenden Antikörperantwort auf ihrer Oberfläche und induzieren im Versuchstier dementsprechend hohe Spiegel dieser Antikörper (Pepperl *et al.*, 2000). Sie enthalten bereits in ihrer natürlichen Form dominante T-Zellantigene. Schließlich sind sie der antigenetischen Manipulation zugänglich und können somit hinsichtlich ihrer Proteinzusammensetzung „ergänzt“ werden (Mersseman *et al.*, 2008a;

Mersseman *et al.*, 2008b). Dies ist ein wichtiges Merkmal, da einzelne Antigene der HCMV-spezifischen T-Zell Antwort in natürlichen DB fehlen (Kern *et al.*, 1999; Sylwester *et al.*, 2005; Varnum *et al.*, 2004).

Bei der Entwicklung eines Impfstoffes zur Anwendung am Menschen ist es von herausragender Bedeutung, bereits vor der Konzeption von klinischen Studien den optimalen Impfstoff-Kandidaten zu definieren. Es ist weder ethisch vertretbar noch finanzierbar, mehrere Kandidaten nacheinander oder gleichzeitig am Menschen zu „testen“. In Vorarbeiten zu dieser Studie konnte nachgewiesen werden, dass einzelne, antigene Peptide zusätzlich in DB verpackt werden können und dass diese Peptide sowohl in Zellkultur als auch im Versuchstier prozessiert und präsentiert werden können (Mersseman *et al.*, 2008a; Mersseman *et al.*, 2008b). Diese erste Generation von modifizierten DB zeigte jedoch Schwächen hinsichtlich der zu erzielenden Ausbeute und der Immunogenität.

Ziel der vorliegenden Arbeit war somit, modifizierte DB zu definieren, die im Hinblick auf einen späteren, industriellen *Upscaling*-Prozess und auf ihre Immunogenität optimiert waren. Strategie zur Herstellung modifizierter DB ist die Insertion heterologer Peptide in die Primärstruktur des viralen pp65 und Expression dieses Fusionsproteins im Kontext der Infektion mit rekombinanten Viren. In vorhergehenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Position der Insertion eines heterologen Peptides in den Leserahmen von pp65 einen Einfluss auf die Bildung von DB in und ihre Freisetzung aus infizierten Zellen beeinflusst (Mersseman *et al.*, 2008a; Mersseman *et al.*, 2008b; Pepperl-Klindworth *et al.*, 2003). Diese Beobachtung konnte hier bestätigt werden. Trotz der Bemühungen, konservierte Bereiche oder potentielle α -Helices oder β -Faltblattstrukturen als Insertionsstellen zu meiden, wiesen auch die meisten der im Rahmen der vorliegenden Arbeit generierten Mutanten eine fehlende oder deutlich reduzierte Synthese von recDB auf. Gleichwohl gelang es, mit den beiden rekombinanten Viren RV-SB3 und RV-SB6 zwei Insertionsstellen in pp65 zu definieren, die zur Verpackung heterologer Antigene geeignet erscheinen.

Beide Viren unterschieden sich jedoch in der Ausbeute an modifizierten DB die mittels Gradientenzentrifugation des Kulturüberstandes erzielt werden konnte. Die mit RV-SB3 erzielte Menge modifizierter DB war deutlich höher als die, die nach Infektion mit RV-SB6 erreicht wurde. Die Gründe für diese Unterschiede wurden nicht näher analysiert, da mit Position 175 eine Stelle in pp65 identifiziert wurde, die für die Insertion geeignet ist.

In mehreren unabhängigen Reinigungen wurden Mengen an DB-SB3 gewonnen, die 40-50% der Mengen entsprachen, die bei der Reinigung von wt-DB erzielt wurden. Dieses Maß an Effizienz erscheint hinreichend, da im *Upscaling* Prozess die Ausbeute noch deutlich gesteigert werden kann. Aus diesem Grunde wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch keine weiteren Versuche zur Optimierung der Ausbeute unternommen.

4.1.1 Immunogene Eigenschaften der modifizierten Dense Bodies DB-SB3 und DB-SB6

HFF präsentierten nach Inkubation mit DB-SB3 und DB-SB6 sowohl das pp65_{NLV}- als auch das IE_{TMY}-Peptid im Kontext von HLA-A2. Durch die Immunisierung von HLA-A2 transgenen Mäusen mit diesen recDB wurde eine CD8 T-Zell Antwort induziert, die nach *in vitro* Restimulierung der T-Zellen mit dem entsprechenden Peptid und der Zugabe von IL-2 sichtbar wurde. Ähnliche Ergebnisse waren bereits mit der ersten Generation modifizierter DB erzielt worden. Im Gegensatz dazu waren pp65_{NLV}- und IE_{1TMY}-spezifische CD8 T-Zellen nach Immunisierung mit DB-SB3 bereits ohne Restimulierung, d.h. direkt *ex vivo*, nachweisbar. Dies beweist die deutliche Verbesserung der immunogenen Eigenschaften von DB-SB3 im Vergleich zu den bisher verwendeten DB.

Immunisierung mit DB-SB6 führte zum *Priming* einer CD8 T-Zell Antwort gegen das IE_{TMY}-Peptid. Die Frequenz an aktivierten Zellen war im Vergleich zur Immunisierung mit DB-SB3 jedoch geringer. Bemerkenswert war, dass in wiederholten Experimenten eine Induktion von pp65_{NLV}-spezifischen CD8 T-Zellen direkt *ex vivo* nicht nachgewiesen werden konnte. Im Einklang hiermit konnten diese Zellen erst nach einer verlängerten Phase der *in vitro* Stimulation detektiert werden. All dies lässt auf ein ineffizientes *Priming* einer T-Zell Antwort gegen pp65_{NLV} nach Immunisierung mit DB-SB6 schließen. Dies war ein überraschendes Ergebnis, da das pp65_{NLV}-Peptid nach natürlicher Infektion ausgesprochen immundominant ist. Die Gründe für das verminderte *Priming* einer Immunantwort gegen das pp65_{NLV}-Peptid durch die Immunisierung mit DB-SB6 sind bisher unklar. Eine Mutation der Peptidsequenz konnte durch Nukleotidsequenzierung des kodierenden Bereiches ausgeschlossen werden (Ergebnisse nicht dargestellt). Ebenso erscheint Konkurrenz von pp65_{NLV} durch IE_{TMY} um das gleiche HLA-Molekül beim *Priming* unwahrscheinlich, da sowohl pp65_{NLV}-CTL als auch IE_{TMY}-CTL nach einer Immunisierung mit DB-SB3 nachgewiesen werden konnten. Eine weitere mögliche Erklärung der Ergebnisse wäre die

Beeinträchtigung der proteasomalen Prozessierung von pp65_{NLV} durch das zusätzlich inserierte IE_{TMY}-Peptid. Jedoch ist auch dieser Effekt eher unwahrscheinlich, da Veränderungen in der Effizienz der proteasomalen Prozessierung von Peptiden nur nach Modifikation der unmittelbar flankierenden AS beobachtet wurden (Draenert *et al.*, 2004; Milicic *et al.*, 2005; Le *et al.*, 2007). In der Primärstruktur von pp65-SB6 sind die Peptide von pp65_{NLV} und IE1_{TMY} jedoch durch 43 AS voneinander getrennt. Eine hypothetische Erklärung könnte sich aus möglichen, strukturellen Veränderungen des pp65 durch die Insertion eines heterologen Peptids an der Position 534 ergeben. Der Zugang des Tegumentproteins in das Proteasom könnte durch Variationen in seiner Struktur erschwert und das IE1_{TMY}-Peptid, das C-terminal zum pp65_{NLV} gelegen ist, bevorzugt prozessiert werden. Jedoch ist auch diese Erklärung sehr spekulativ und muss durch weiterführende Analysen näher untersucht werden.

Für die Induktion einer anhaltenden, HCMV-spezifischen CD8 T-Zell Antwort sind CD4 T-Zellen von entscheidender Bedeutung (Reusser *et al.*, 1991; Walter *et al.*, 1995). In der Tat führte die Immunisierung mit DB-SB3 zur Stimulation der CD4 T-Zell Antwort. Gleichzeitig stimulierten DB-SB3 Spiegel neutralisierender Antikörper gegen HCMV, die mit den nach Immunisierung mit wt-DB vergleichbar waren. Obwohl beide Ergebnisse aufgrund der Vorarbeiten an wt-DB erwartet wurden, war es wichtig, den Nachweis für DB-SB3 zu führen und somit die breiten, immunogenen Eigenschaften dieser Partikel nachzuweisen.

4.1.2 Modifizierte Dense Bodies als Träger für Fremdartigene

DB sind aufgrund ihrer immunogenen Eigenschaften attraktive Träger für „Fremdartigene“. Beispiele hierfür sind antigene Fragmente aus Proteinen anderer Erreger oder Peptide aus Tumorantigenen. Voraussetzung zur Verwendung von DB als Basis für derartige Impfstoffe ist es jedoch, dass solche HCMV-fremden Peptide erfolgreich prozessiert und präsentiert werden. Die vorliegende Arbeit hat in der Tat anhand des Modellpeptids SIINFEKL den *Proof-of-Principle* erbracht, dass fremde Peptide in immunologisch wirksamer Form in DB verpackt werden können. Mit der Etablierung von DB-SIINFEKL konnte darüber hinaus die Basis für aktuelle Arbeiten geschaffen werden, deren Ziel es ist, anhand SIINFEKL-exprimierender, muriner Cytomegaloviren die protektive Wirkung der DB-Immunisierung anhand eines in der immunologischen Grundlagenforschung wohldefinierten Mausmodells zu prüfen.

4.2 Analysen der molekularen Funktion von pp65 während der Partikelmorphogenese

HCMV-pp65 Deletionsmutanten zeigen in Fibroblastenkultur im Vergleich zum wt keine phänotypischen Auffälligkeiten (Besold *et al.*, 2007; Schmolke *et al.*, 1995b). Demgegenüber sind pp65-Deletionsmutanten in Makrophagenkulturen deutlich in ihrer Vermehrungsfähigkeit eingeschränkt (Chevillotte *et al.*, 2009). Es wird angenommen, dass die Funktionen des pp65 bei dessen Fehlen in HFF von anderen viralen Proteinen wahrgenommen werden können, dass dies aber in Makrophagen nicht in diesem Maße möglich ist. Analysen der molekularen Funktion einzelner Virusproteine sind in humanen Makrophagen aufgrund ihrer kurzen Lebensdauer schwierig. Eine alternative Möglichkeit, sich der Funktion eines Proteins zu nähern ist die Analyse von dominant-negativen Mutanten. Die phänotypischen Veränderungen der HCMV-Mutante RV-VM1 bot eine hervorragende Möglichkeit, einzelne Schritte der Virusvermehrung hinsichtlich eines Einflusses von pp65 anhand des negativen Effekts von pp65-VM1 zu beleuchten.

Der Grund für die phänotypischen Veränderungen von RV-VM1 lag einzig in der Insertion eines Peptids von 30 AS an der Position Arg387 des pp65-Leserahmens. Es konnte gezeigt werden, dass die Insertion für die phänotypischen Veränderungen verantwortlich war, da der Phänotyp im revertanten Stamm verschwand. Die Insertion derselben Peptidsequenz an andere Positionen innerhalb des Leserahmens von pp65 führte zu keiner Veränderung des Phänotyps der resultierenden Viren (Mersseman *et al.*, 2008a; Mersseman *et al.*, 2008b).

4.2.1 Wechselwirkung von pp65 mit der viralen Kinase pUL97

Ein wichtiges Kennzeichen für eine Infektion mit RV-VM1 ist die Auflösung der für HCMV Infektion charakteristischen NIBs, die als Orte der viralen DNA-Replikation, Genexpression und des Kapsidzusammenbaus angesehen werden. Diese Einschlüsse werden durch LGS ersetzt. Vergleichbare Strukturen konnten in Zellen nachgewiesen werden, bei denen die virale Kinase pUL97 nach Infektion durch den Wirkstoff Maribavir inhibiert oder die mit einer pUL97-Deletionsmutante infiziert wurden (Prichard *et al.*, 2005; Prichard *et al.*, 2008). In allen Fällen sind diese morphologischen Veränderungen mit Einschränkungen in der viralen Vermehrung vergesellschaftet. Es liegt nahe anzunehmen, dass die strukturelle Integrität der NIBs für den viralen Lebenszyklus wichtig ist. Die Ergebnisse mit RV-VM1 deuten darauf hin, dass pp65 an

Prozessen beteiligt ist, die in diesen NIBs ablaufen und dass die Mutation des pp65-VM1 in diese Vorgänge hemmend eingreift, was wiederum in der Folge zur Umstrukturierung der NIBs führt.

Das pp65 ist ein nukleozytoplasmatisches *Shuttle*-Protein, das in späten Phasen der Virusvermehrung weitestgehend zytoplasmatisch vorkommt. Eine auffällige Veränderung in RV-VM1 infizierten Zellen war die ausschließlich nukleare Lokalisation von pp65-VM1 zu späten Zeitpunkten der Infektion. Ein ähnlicher Phänotyp konnte auch in wt-infizierten Zellen beobachtet werden, die mit einem Hemmstoff der viralen Kinase pUL97 behandelt worden waren. Diese Ergebnisse legen einen Zusammenhang nahe. Sie weisen daraufhin, dass pp65 entweder für den Transport unzugänglich ist oder dass eine Interaktion zwischen pUL97 und pp65, die für den Export des Tegumentproteins nötig ist, in RV-VM1 infizierten Zellen blockiert wird.

Das Wissen, dass Hemmung von pUL97 oder die Deletion des UL97-Gens im HCMV-Genom zu einer deutlichen Einschränkung der viralen Vermehrungsfähigkeit führt, legt die Vermutung nahe, dass auch bei RV-VM1 Infektion pUL97 in seiner Funktion beeinträchtigt ist und dass dies den Phänotyp des Virus erklärt. Eine direkte Hemmung der Kinase durch pp65-VM1 konnte in transienten Transfektionsexperimenten nicht bestätigt werden. Außerdem war die Aktivität von pUL97 nach Koimmunpräzitationen aus RV-VM1 infizierten Zellen erhalten. Aus diesen experimentellen Ansätzen lässt sich jedoch nicht ausschließen, dass pUL97 in RV-VM1-infizierten Zellen in einem Proteinkomplex sequestriert wird. Die Bildung von Komplexen, in denen die beiden Proteine zurückgehalten werden, könnte eine mögliche Erklärung für die Resistenz von RV-VM1 gegenüber den pUL97 Inhibitoren sein.

Interessant erscheint in diesem Zusammenhang, dass pUL69 in RV-VM1 infizierten Zellen in deutlich höheren Mengen als in wt-HCMV infizierten Zellen vorkommt und dass das RNA-Exportprotein in deutlich größeren Mengen mit pp65- und pUL97-spezifischen Antikörpern präzipitierbar ist. Auch dies deutet darauf hin, dass während der HCMV Infektion transient nukleare Proteinkomplexe gebildet werden, die u.a. pp65, pUL97 und pUL69 enthalten, und die in RV-VM1 infizierten Zellen unphysiologisch stabilisiert werden. Dies wäre im Einklang mit der Bildung der LGS als mögliche Konsequenz der reduzierten oder fehlenden physiologischen Dissoziation des Komplexes.

4.2.2 Einfluss von pp65 auf die molekulare Funktion des viralen RNA-Exportfaktors pUL69

Interessant erscheinen die Veränderungen in der subzellulären Lokalisation und dem *steady-state* Level von pUL69 in der RV-VM1 infizierten Zelle. Dieses Protein ist ein multifunktionelles Polypeptid, das als transkriptioneller Transaktivator (Winkler *et al.*, 1994) und als Exportfaktor für ungespaltene, virale RNA beschrieben wurde (Lischka *et al.*, 2001; Lischka *et al.*, 2006; Toth and Stamminger, 2008). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass pUL69 mit pUL97 interagiert und ein Substrat dieser Kinase darstellt (Chevillotte *et al.*, 2009; Thomas *et al.*, 2009). Von besonderem Interesse erscheint im Rahmen der vorliegenden Arbeit das Ergebnis, dass späte, ungespaltene virale RNAs in RV-VM1 infizierten Zellen mengenmäßig deutlich unterrepräsentiert sind. Dies deutet auf einen Defekt bei der Transkription oder/und dem Transport dieser RNAs hin. Das pUL69 wird als essentiell für den Transport später RNAs angesehen. Träfe es zu, dass pUL69 in einem Komplex mit pp65-VM1 und pUL97 sequestriert wird, dann stünde es für seine RNA-Exportfunktion nur eingeschränkt zur Verfügung, die Translation später RNAs wäre gestört. Bemerkenswerter Weise zeigen sich in RV-VM1 infizierten Zellen in der Tat die späten Proteine pp150 und MCP deutlich vermindert, verglichen mit der Situation in wt-HCMV infizierten Zellen.

Obwohl zu diesem Zeitpunkt spekulativ, wäre eine mögliche Funktion von pp65, die sich aus diesen Ergebnissen ableiten ließe die, dass dieses Protein an der Regulation der *Shuttle*- und RNA-Export Funktion von pUL69 beteiligt ist. pp65 ist ein direkter Interaktionspartner des pUL69 (Chevillotte *et al.*, 2009). Es wäre denkbar, dass pp65 an pUL97 bindet, dadurch die virale Kinase in eine räumliche Nähe zu pUL69 bringt und pUL69 phosphoryliert. Diese Phosphorylierung ist für die Funktion von pUL69 als nuklearer Export-Faktor von entscheidender Bedeutung (Thomas *et al.*, 2009). In Abwesenheit von pp65 besitzt pUL97 eine geringere Affinität zu pUL69. Jedoch sind andere zelluläre Kinasen in der Lage, die Funktion von der viralen Kinase zu kompensieren (Rechter *et al.*, 2009). Dadurch wäre die Tatsache erklärbar, dass die Deletion von pp65 keinen Einfluss auf die HCMV Genexpression und virale Vermehrung hat. Im Gegensatz dazu ist in RV-VM1 infizierten Zellen die Abspaltung von pUL69 von dem Proteinkomplex und somit der virale mRNA Export beeinträchtigt. Das wiederum würde die verminderte Expression später RNAs und deren Genprodukte erklären. Die Prüfung dieser Hypothese ist weiterführenden Untersuchungen vorbehalten.

4.2.3 Interaktion von pp65 mit viralen und zellulären Proteinen

Mit Hilfe von pp65-spezifischen Antikörpern konnten aus RV-VM1 infizierten Zellen Proteinkomplexe präzipitiert werden, deren Zusammensetzung jedoch mit dem verwendeten experimentellen Ansatz nicht weiter aufgeklärt werden konnte. Sollte unsere Hypothese zutreffen, dass die Expression von pp65-VM1 einen (oder mehrere) funktionelle Proteinkomplexe der HCMV-infizierten Zelle quasi arretiert, dann kam der Kenntnis der anderen Bestandteile des Komplexes herausragende Bedeutung zu. Aus diesem Grund wurden die Komplexe mit Hilfe der Massenspektrometrie genauer analysiert.

Überraschender Weise konnte aus wt-HCMV infizierten Zellen mit pp65-spezifischen Antikörpern eine Reihe von viralen Proteinen präzipitiert werden, die für die DNA-Replikation von HCMV essentiell sind (pUL44, pUL112/113, pUL84, IE2, pUL57). Diese Proteine waren mit Ausnahme von pUL57 in Komplexen aus RV-VM1 infizierten Zellen zwar vorhanden aber mengenmäßig deutlich unterrepräsentiert. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass wt-pp65 in späteren Phasen der HCMV-Vermehrung zu den Orten der DNA-Replikation rekrutiert wird. Allerdings haben unsere Arbeiten keinen Hinweis ergeben, dass pp65 einen Einfluss auf die DNA-Replikation *per se* ausübt. Somit liegt nahe, dass es an Prozessen beteiligt ist, die unmittelbar nach Vermehrung des viralen Genoms ablaufen. Diese Funktion scheint bei pp65-VM1 beeinträchtigt zu sein, wodurch es zu einer Verdrängung replikativer Proteine aus dem Komplex und einer Anhäufung des RNA-Exportproteins pUL69 kommt.

Neben den viralen Proteinen konnten Histone H2A und H2B, H3 und H4 und Tubulin, Nukleolin, Nukleophosmin und hnRNP U mit pp65-spezifischen Antikörpern präzipitiert werden. Auch diese Proteine waren in Komplexen mit pp65-VM1 mengenmäßig verringert. All diese Proteine spielen eine wichtige Rolle bei dem Metabolismus und dem Transport von RNA. Eine mögliche Erklärung für die verminderte Konzentration an Histonen und zellulären Proteinen in den präzipitierten Proteinkomplexen könnte sein, dass diese Proteine in Zellen, die mit RV-VM1 infiziert wurden, durch pUL69 aus diesen Komplexen verdrängt werden. Außerdem korreliert der verminderte Gehalt an Histonen in den Komplexen mit dem verringerten DNA Gehalt in den Komplexen. Die Insertion von IE1_{TMV} an Position Arg387 von pp65 scheint somit die Interaktion der viralen DNA mit pp65 durch einen bislang unbekanntem Mechanismus zu inhibieren. Aufgrund der im Rahmen der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse kann jedoch keine Aussage darüber getroffen werden, ob es sich bei der Wechselwirkung der

viralen DNA und pp65 um eine direkte Interaktion handelt oder ob andere virale oder zelluläre Proteine an diesem Prozess beteiligt sind.

Zusammengefasst konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestätigt werden, dass pp65 mit pUL69 interagiert. Die Ergebnisse legen weiter einen Zusammenhang mit der Regulation der RNA-Exportfunktion von pUL69 durch pp65 nahe. Die Interaktion von pp65 mit viralen Replikationsproteinen und zellulären Proteinen des RNA-Metabolismus und -Transports deuten darauf hin, dass pp65 zu späten Phasen der viralen Infektion zu Stellen replizierter viraler DNA rekrutiert wird und dort regulatorisch auf posttranskriptionelle Vorgänge von RNA-Prozessierung oder -Transport eingreift. Eine genauere Analyse dieser Vorgänge muss weiterführenden Arbeiten vorbehalten bleiben.

5 Literaturverzeichnis

- Adam, E., Melnick, J. L., and DeBakey, M. E. (1997).** Cytomegalovirus infection and atherosclerosis. *Cent Eur J Public Health* **5**, 99-106.
- Adler, S. P., Starr, S. E., Plotkin, S. A., Hempfling, S. H., Buis, J., Manning, M. L., and Best, A. M. (1995).** Immunity induced by primary human cytomegalovirus infection protects against secondary infection among women of childbearing age. *J Infect Dis* **171**, 26-32.
- Adler, S. P., Plotkin, S. A., Gonczol, E., Cadoz, M., Meric, C., Wang, J. B., Dellamonica, P., Best, A. M., Zahradnik, J., Pincus, S., Berencsi, K., Cox, W. I., and Gyulai, Z. (1999).** A canarypox vector expressing cytomegalovirus (CMV) glycoprotein B primes for antibody responses to a live attenuated CMV vaccine (Towne). *J Infect Dis* **180**, 843-846.
- Anders, D. G., Kacica, M. A., Pari, G., and Punturieri, S. M. (1992).** Boundaries and structure of human cytomegalovirus oriLyt, a complex origin for lytic-phase DNA replication. *J Virol* **66**, 3373-3384.
- Anderson, K. P., Fox, M. C., Brown-Driver, V., Martin, M. J., and Azad, R. F. (1996).** Inhibition of human cytomegalovirus immediate-early gene expression by an antisense oligonucleotide complementary to immediate-early RNA. *Antimicrob Agents Chemother* **40**, 2004-2011.
- 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.
- Arav-Boger, R., He, R., Chiou, C. J., Liu, J., Woodard, L., Rosenthal, A., Jones-Brando, L., Forman, M., and Posner, G. (2010).** Artemisinin-derived dimers have greatly improved anti-cytomegalovirus activity compared to artemisinin monomers. *PLoS One* **5**, 10370
- 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. and Shenk, T. (1996).** Proteins associated with purified human cytomegalovirus particles. *J Virol* **70**, 6097-6105.
- 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.

- Balthesen, M., Messerle, M., and Reddehase, M. J. (1993).** Lungs are a major organ site of cytomegalovirus latency and recurrence. *J Virol* **67**, 5360-5366.
- Beninga, J., Kropff, B., and Mach, M. (1995).** Comparative analysis of fourteen individual human cytomegalovirus proteins for helper T cell response. *J Gen Virol* **76 (Pt 1)**, 153-160.
- Berencsi, K., Gyulai, Z., Gonczol, E., Pincus, S., Cox, W. I., Michelson, S., Kari, L., Meric, C., Cadoz, M., Zahradnik, J., Starr, S., and Plotkin, S. (2001).** A canarypox vector-expressing cytomegalovirus (CMV) phosphoprotein 65 induces long-lasting cytotoxic T cell responses in human CMV-seronegative subjects. *J Infect Dis* **183**, 1171-1179.
- Bernstein, D. I., Reap, E. A., Katen, K., Watson, A., Smith, K., Norberg, P., Olmsted, R. A., Hoeper, A., Morris, J., Negri, S., Maughan, M. F., and Chulay, J. D. (2009).** Randomized, double-blind, Phase 1 trial of an alphavirus replicon vaccine for cytomegalovirus in CMV seronegative adult volunteers. *Vaccine* **28**, 484-493.
- 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.
- Biron, K. K. (2006).** Antiviral drugs for cytomegalovirus diseases. *Antiviral Res* **71**, 154-163.
- Bodaghi, B., Slobbe-van Drunen, M. E., Topilko, A., Perret, E., Vossen, R. C., van Dam-Mieras, M. C., Zipeto, D., Virelizier, J. L., LeHoang, P., Bruggeman, C. A., and Michelson, S. (1999).** Entry of human cytomegalovirus into retinal pigment epithelial and endothelial cells by endocytosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40**, 2598-2607.
- Bogner, E., Radsak, K., and Stinski, M. F. (1998).** The gene product of human cytomegalovirus open reading frame UL56 binds the pac motif and has specific nuclease activity. *J Virol* **72**, 2259-2264.
- Boppana, S. B. and Britt, W. J. (1996).** Recognition of human cytomegalovirus gene products by HCMV-specific cytotoxic T cells. *Virology* **222**, 293-296.
- 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. and Auger, D. (1986).** Human cytomegalovirus virion-associated protein with kinase activity. *J Virol* **59**, 185-188.

- Britt, W. J., Vugler, L., Butfiloski, E. J., and Stephens, E. B. (1990).** Cell surface expression of human cytomegalovirus (HCMV) gp55-116 (gB): use of HCMV-recombinant vaccinia virus-infected cells in analysis of the human neutralizing antibody response. *J Virol* **64**, 1079-1085.
- 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.
- Bukowski, J. F., Woda, B. A., and Welsh, R. M. (1984).** Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection in natural killer cell-depleted mice. *J Virol* **52**, 119-128.
- Bukowski, J. F., Warner, J. F., Dennert, G., and Welsh, R. M. (1985).** Adoptive transfer studies demonstrating the antiviral effect of natural killer cells in vivo. *J Exp Med* **161**, 40-52.
- Bukowski, J. F., Yang, H., and Welsh, R. M. (1988).** Antiviral effect of lymphokine-activated killer cells: characterization of effector cells mediating prophylaxis. *J Virol* **62**, 3642-3648.
- Cannon, M. J. and Davis, K. F. (2005).** Washing our hands of the congenital cytomegalovirus disease epidemic. *BMC Public Health* **5**, 70
- 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.
- Chevillotte, M., Landwehr, S., Linta, L., Frascaroli, G., Luske, A., Buser, C., Mertens, T., and von, E. J. (2009).** Major tegument protein pp65 of human cytomegalovirus is required for the incorporation of pUL69 and pUL97 into the virus particle and for viral growth in macrophages. *J Virol* **83**, 2480-2490.
- Cobbold, M., Khan, N., Pourgheysari, B., Tauro, S., McDonald, D., Osman, H., Assenmacher, M., Billingham, L., Steward, C., Crawley, C., Olavarria, E., Goldman, J., Chakraverty, R., Mahendra, P., Craddock, C., and Moss, P. A. (2005).** Adoptive transfer of cytomegalovirus-specific CTL to stem cell transplant patients after selection by HLA-peptide tetramers. *J Exp Med* **202**, 379-386.
- Cohen, J. I. and Corey, G. R. (1985).** Cytomegalovirus infection in the normal host. *Medicine (Baltimore)* **64**, 100-114.
- Collins, T., Pomeroy, C., and Jordan, M. C. (1993).** Detection of latent cytomegalovirus DNA in diverse organs of mice. *J Infect Dis* **168**, 725-729.
- 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.

- Craighead, J. E., Kanich, R. E., and Almeida, J. D. (1972).** Nonviral microbodies with viral antigenicity produced in cytomegalovirus-infected cells. *J Virol* **10**, 766-775.
- Cristea, I. M., Moorman, N. J., Terhune, S. S., Cuevas, C. D., O'Keefe, E. S., Rout, M. P., Chait, B. T., and Shenk, T. (2010).** Human cytomegalovirus pUL83 stimulates activity of the viral immediate-early promoter through its interaction with the cellular IFI16 protein. *J Virol* **84**, 7803-7814.
- Cui, X., Meza, B. P., Adler, S. P., and McVoy, M. A. (2008).** Cytomegalovirus vaccines fail to induce epithelial entry neutralizing antibodies comparable to natural infection. *Vaccine* **26**, 5760-5766.
- Cui, Z., Zhang, K., Zhang, Z., Liu, Y., Zhou, Y., Wei, H., and Zhang, X. E. (2009).** Visualization of the dynamic multimerization of human Cytomegalovirus pp65 in punctuate nuclear foci. *Virology* **392**, 169-177.
- Davison, A. J., Dolan, A., Akter, P., Addison, C., Dargan, D. J., Alcendor, D. J., McGeoch, D. J., and Hayward, G. S. (2003).** The human cytomegalovirus genome revisited: comparison with the chimpanzee cytomegalovirus genome. *J Gen Virol* **84**, 17-28.
- Demarchi, J. M. (1981).** Human cytomegalovirus DNA: restriction enzyme cleavage maps and map locations for immediate-early, early, and late RNAs. *Virology* **114**, 23-38.
- Diefenbach, R. J., Miranda-Saksena, M., Diefenbach, E., Holland, D. J., Boadle, R. A., Armati, P. J., and Cunningham, A. L. (2002).** Herpes simplex virus tegument protein US11 interacts with conventional kinesin heavy chain. *J Virol* **76**, 3282-3291.
- Dohner, K., Wolfstein, A., Prank, U., Echeverri, C., Dujardin, D., Vallee, R., and Sodeik, B. (2002).** Function of dynein and dynactin in herpes simplex virus capsid transport. *Mol Biol Cell* **13**, 2795-2809.
- Dolan, A., Cunningham, C., Hector, R. D., Hassan-Walker, A. F., Lee, L., Addison, C., Dargan, D. J., McGeoch, D. J., Gatherer, D., Emery, V. C., Griffiths, P. D., Sinzger, C., McSharry, B. P., Wilkinson, G. W., and Davison, A. J. (2004).** Genetic content of wild-type human cytomegalovirus. *J Gen Virol* **85**, 1301-1312.
- Draenert, R., Le, G. S., Pfafferott, K. J., Leslie, A. J., Chetty, P., Brander, C., Holmes, E. C., Chang, S. C., Feeney, M. E., Addo, M. M., Ruiz, L., Ramduth, D., Jeena, P., Altfeld, M., Thomas, S., Tang, Y., Verrill, C. L., Dixon, C., Prado, J. G., Kiepiela, P., Martinez-Picado, J., Walker, B. D., and Goulder, P. J. (2004).** Immune selection for altered antigen processing leads to cytotoxic T lymphocyte escape in chronic HIV-1 infection. *J Exp Med* **199**, 905-915.
- Drew, W. L. (1992).** Nonpulmonary manifestations of cytomegalovirus infection in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev* **5**, 204-210.

- Efferth, T., Marschall, M., Wang, X., Huong, S. M., Hauber, I., Olbrich, A., Kronschnabl, M., Stamminger, T., and Huang, E. S. (2002).** Antiviral activity of artesunate towards wild-type, recombinant, and ganciclovir-resistant human cytomegaloviruses. *J Mol Med* **80**, 233-242.
- Einsele, H., Roosnek, E., Rufer, N., Sinzger, C., Riegler, S., Loffler, J., Grigoleit, U., Moris, A., Rammensee, H. G., Kanz, L., Kleihauer, A., Frank, F., Jahn, G., and Hebart, H. (2002).** Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy. *Blood* **99**, 3916-3922.
- Elek, S. D. and Stern, H. (1974).** Development of a vaccine against mental retardation caused by cytomegalovirus infection in utero. *Lancet* **1**, 1-5.
- Elkington, R., Walker, S., Crough, T., Menzies, M., Tellam, J., Bharadwaj, M., and Khanna, R. (2003).** Ex vivo profiling of CD8+T-cell responses to human cytomegalovirus reveals broad and multispecific reactivities in healthy virus carriers. *J Virol* **77**, 5226-5240.
- Endresz, V., Kari, L., Berencsi, K., Kari, C., Gyulai, Z., Jeney, C., Pincus, S., Rodeck, U., MERIC, C., Plotkin, S. A., and Gonczol, E. (1999).** Induction of human cytomegalovirus (HCMV)-glycoprotein B (gB)-specific neutralizing antibody and phosphoprotein 65 (pp65)-specific cytotoxic T lymphocyte responses by naked DNA immunization. *Vaccine* **17**, 50-58.
- Evans, T. G., Wloch, M., Hermanson, G., Selinsky, C., Geall, A., and Kaslow, D. (2004).** Phase 1 trials of a bivalent formulated plasmid DNA CMV vaccine for use in the transplant population. *Abstract of the 44th ICAAC* **G-543**
- Fleckenstein, B., Muller, I., and Collins, J. (1982).** Cloning of the complete human cytomegalovirus genome in cosmids. *Gene* **18**, 39-46.
- Frey, S. E., Harrison, C., Pass, R. F., Yang, E., Boken, D., Sekulovich, R. E., Percell, S., Izu, A. E., Hirabayashi, S., Burke, R. L., and Duliege, A. M. (1999).** Effects of antigen dose and immunization regimens on antibody responses to a cytomegalovirus glycoprotein B subunit vaccine. *J Infect Dis* **180**, 1700-1703.
- Funaro, A., Gribaudo, G., Luganini, A., Ortolan, E., Lo, B. N., Vicenzi, E., Cassetta, L., Landolfo, S., Buick, R., Falcicola, L., Murphy, M., Garotta, G., and Malavasi, F. (2008).** Generation of potent neutralizing human monoclonal antibodies against cytomegalovirus infection from immune B cells. *BMC Biotechnol* **8**, 85
- 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.

- Gallina, A., Percivalle, E., Simoncini, L., Revello, M. G., Gerna, G., and Milanesi, G. (1996).** Human cytomegalovirus pp65 lower matrix phosphoprotein harbours two transplantable nuclear localization signals. *J Gen Virol* **77 (Pt 6)**, 1151-1157.
- Gallina, A., Simoncini, L., Garbelli, S., Percivalle, E., Pedrali-Noy, G., Lee, K. S., Erikson, R. L., Plachter, B., Gerna, G., and Milanesi, G. (1999).** Polo-like kinase 1 as a target for human cytomegalovirus pp65 lower matrix protein. *J Virol* **73**, 1468-1478.
- Gamadia, L. E., Rentenaar, R. J., van Lier, R. A., and ten, B., I (2004).** Properties of CD4(+) T cells in human cytomegalovirus infection. *Hum Immunol* **65**, 486-492.
- Gerna, G., Sarasini, A., Patrone, M., Percivalle, E., Fiorina, L., Campanini, G., Gallina, A., Baldanti, F., and Revello, M. G. (2008).** Human cytomegalovirus serum neutralizing antibodies block virus infection of endothelial/epithelial cells, but not fibroblasts, early during primary infection. *J Gen Virol* **89**, 853-865.
- Gibson, W. (1996).** Structure and assembly of the virion. *Intervirology* **39**, 389-400.
- Gilbert, M. J., Riddell, S. R., Li, C. R., and Greenberg, P. D. (1993).** Selective interference with class I major histocompatibility complex presentation of the major immediate-early protein following infection with human cytomegalovirus. *J Virol* **67**, 3461-3469.
- 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.
- Gilloteaux, J. and Nassiri, M. R. (2000).** Human bone marrow fibroblasts infected by cytomegalovirus: ultrastructural observations. *J Submicrosc Cytol Pathol* **32**, 17-45.
- 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.
- Greaves, R. F. and Mocarski, E. S. (1998).** Defective growth correlates with reduced accumulation of a viral DNA replication protein after low-multiplicity infection by a human cytomegalovirus ie1 mutant. *J Virol* **72**, 366-379.
- Grefte, J. M., van der Gun, B. T., Schmolke, S., van der, G. M., van Son, W. J., Plachter, B., Jahn, G., and The, T. H. (1992a).** Cytomegalovirus antigenemia assay: identification of the viral antigen as the lower matrix protein pp65. *J Infect Dis* **166**, 683-684.
- Grefte, J. M., van der Gun, B. T., Schmolke, S., van der, G. M., van Son, W. J., Plachter, B., Jahn, G., and The, T. H. (1992b).** The lower matrix protein pp65 is the principal viral antigen present in peripheral blood leukocytes during an active cytomegalovirus infection. *J Gen Virol* **73 (Pt 11)**, 2923-2932.

- Greijer, A. E., Dekkers, C. A., and Middeldorp, J. M. (2000).** Human cytomegalovirus virions differentially incorporate viral and host cell RNA during the assembly process. *J Virol* **74**, 9078-9082.
- Gyulai, Z., Endresz, V., Burian, K., Pincus, S., Toldy, J., Cox, W. I., Meric, C., Plotkin, S., Gonczol, E., and Berencsi, K. (2000).** Cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses to human cytomegalovirus pp65, IE1-Exon4, gB, pp150, and pp28 in healthy individuals: reevaluation of prevalence of IE1-specific CTLs. *J Infect Dis* **181**, 1537-1546.
- Hamirally, S., Kamil, J. P., Ndassa-Colday, Y. M., Lin, A. J., Jahng, W. J., Baek, M. C., Noton, S., Silva, L. A., Simpson-Holley, M., Knipe, D. M., Golan, D. E., Marto, J. A., and Coen, D. M. (2009).** Viral mimicry of Cdc2/cyclin-dependent kinase 1 mediates disruption of nuclear lamina during human cytomegalovirus nuclear egress. *PLoS Pathog* **5**, 1000275
- Heineman, T. C., Schleiss, M., Bernstein, D. I., Spaete, R. R., Yan, L., Duke, G., Prichard, M., Wang, Z., Yan, Q., Sharp, M. A., Klein, N., Arvin, A. M., and Kemble, G. (2006).** A phase 1 study of 4 live, recombinant human cytomegalovirus Towne/Toledo chimeric vaccines. *J Infect Dis* **193**, 1350-1360.
- Herget, T., Freitag, M., Morbitzer, M., Kupfer, R., Stamminger, T., and Marschall, M. (2004).** Novel chemical class of pUL97 protein kinase-specific inhibitors with strong anticytomegaloviral activity. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 4154-4162.
- Hill, G. R., Tey, S. K., Beagley, L., Crough, T., Morton, J. A., Clouston, A. D., Whiting, P., and Khanna, R. (2010).** Successful immunotherapy of HCMV disease using virus-specific T cells expanded from an allogeneic stem cell transplant recipient. *Am J Transplant* **10**, 173-179.
- 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.
- Horsburgh, B. C., Hubinette, M. M., Qiang, D., MacDonald, M. L., and Tufaro, F. (1999).** Allele replacement: an application that permits rapid manipulation of herpes simplex virus type 1 genomes. *Gene Ther* **6**, 922-930.
- Huber, M. T. and Compton, T. (1999).** Intracellular formation and processing of the heterotrimeric gH-gL-gO (gCIII) glycoprotein envelope complex of human cytomegalovirus. *J Virol* **73**, 3886-3892.
- 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.

- Jahn, G., Harthus, H. P., Broker, M., Borisch, B., Platzer, B., and Plachter, B. (1990).** Generation and application of a monoclonal antibody raised against a recombinant cytomegalovirus-specific polypeptide. *Klin Wochenschr* **68**, 1003-1007.
- Jansen, F. H. and Soomro, S. A. (2007).** Chemical instability determines the biological action of the artemisinins. *Curr Med Chem* **14**, 3243-3259.
- Jonjic, S., Pavic, I., Polic, B., Crnkovic, I., Lucin, P., and Koszinowski, U. H. (1994).** Antibodies are not essential for the resolution of primary cytomegalovirus infection but limit dissemination of recurrent virus. *J Exp Med* **179**, 1713-1717.
- Jordan, M. C., Rousseau, W., Stewart, J. A., Noble, G. R., and Chin, T. D. (1973).** Spontaneous cytomegalovirus mononucleosis. Clinical and laboratory observations in nine cases. *Ann Intern Med* **79**, 153-160.
- Just, M., Buergin-Wolff, A., Emoedi, G., and Hernandez, R. (1975).** Immunisation trials with live attenuated cytomegalovirus TOWNE 125. *Infection* **3**, 111-114.
- Kamil, J. P. and Coen, D. M. (2007).** Human cytomegalovirus protein kinase UL97 forms a complex with the tegument phosphoprotein pp65. *J Virol* **81**, 10659-10668.
- Kaptein, S. J., Efferth, T., Leis, M., Auerochs, S., Kalmer, M., Bruggeman, C. A., Vink, C., Stamminger, C., and Marschall, M. (2006).** The anti-malaria drug artesunate inhibits replication of cytomegalovirus in vitro and in vivo. *Antiviral Res* **69**, 60-69.
- Kari, B. and Gehrz, R. (1992).** A human cytomegalovirus glycoprotein complex designated gC-II is a major heparin-binding component of the envelope. *J Virol* **66**, 1761-1764.
- Kern, F., Surel, I. P., Faulhaber, N., Frommel, C., Schneider-Mergener, J., Schonemann, C., Reinke, P., and Volk, H. D. (1999).** Target structures of the CD8(+)-T-cell response to human cytomegalovirus: the 72-kilodalton major immediate-early protein revisited. *J Virol* **73**, 8179-8184.
- Khan, N., Cobbold, M., Keenan, R., and Moss, P. A. (2002).** Comparative analysis of CD8+ T cell responses against human cytomegalovirus proteins pp65 and immediate early 1 shows similarities in precursor frequency, oligoclonality, and phenotype. *J Infect Dis* **185**, 1025-1034.
- Khanna, R. and Diamond, D. J. (2006).** Human cytomegalovirus vaccine: time to look for alternative options. *Trends Mol Med* **12**, 26-33.
- Klotman, M. E., Henry, S. C., Greene, R. C., Brazy, P. C., Klotman, P. E., and Hamilton, J. D. (1990).** Detection of mouse cytomegalovirus nucleic acid in latently infected mice by in vitro enzymatic amplification. *J Infect Dis* **161**, 220-225.

- Kniess, N., Mach, M., Fay, J., and Britt, W. J. (1991).** Distribution of linear antigenic sites on glycoprotein gp55 of human cytomegalovirus. *J Virol* **65**, 138-146.
- Koch, S., Larbi, A., Ozelik, D., Solana, R., Gouttefangeas, C., Attig, S., Wikby, A., Strindhall, J., Franceschi, C., and Pawelec, G. (2007).** Cytomegalovirus infection: a driving force in human T cell immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci* **1114**, 23-35.
- Koffron, A. J., Patterson, B. K., Yan, S., Kaufman, D. B., Fryer, J. P., Stuart, F. P., and Abecassis, M. I. (1997).** Latent human cytomegalovirus: a functional study. *Transplant Proc* **29**, 793-795.
- Koszalka, G. W., Johnson, N. W., Good, S. S., Boyd, L., Chamberlain, S. C., Townsend, L. B., Drach, J. C., and Biron, K. K. (2002).** Preclinical and toxicology studies of 1263W94, a potent and selective inhibitor of human cytomegalovirus replication. *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 2373-2380.
- Krämer-Albers, E.-M., Bretz, N., Tenzer, S., Möbius, W., Berger, H., Nave, K.-A., Schild, H., and Trotter, J. (2007).** Oligodendrocytes secrete exosomes containing major myelin and stress-protective proteins: Trophic support for axons. *PROTEOMICS - Clinical Applications* **1**, 1446-1461.
- Krosky, P. M., Baek, M. C., and Coen, D. M. (2003).** The human cytomegalovirus UL97 protein kinase, an antiviral drug target, is required at the stage of nuclear egress. *J Virol* **77**, 905-914.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- LaFemina, R. L. and Hayward, G. S. (1983).** Replicative forms of human cytomegalovirus DNA with joined termini are found in permissively infected human cells but not in non-permissive Balb/c-3T3 mouse cells. *J Gen Virol* **64** (Pt 2), 373-389.
- Landolfo, S., Gariglio, M., Gribaudo, G., and Lembo, D. (2003).** The human cytomegalovirus. *Pharmacol Ther* **98**, 269-297.
- Lang, D. J. and Kummer, J. F. (1975).** Cytomegalovirus in semen: observations in selected populations. *J Infect Dis* **132**, 472-473.
- Laughlin-Taylor, E., Pande, H., Forman, S. J., Tanamachi, B., Li, C. R., Zaia, J. A., Greenberg, P. D., and Riddell, S. R. (1994).** Identification of the major late human cytomegalovirus matrix protein pp65 as a target antigen for CD8+ virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Med Virol* **43**, 103-110.
- Le, G. S., Stamegna, P., and Walker, B. D. (2007).** Portable flanking sequences modulate CTL epitope processing. *J Clin Invest* **117**, 3563-3575.

- Li, L., Nelson, J. A., and Britt, W. J. (1997).** Glycoprotein H-related complexes of human cytomegalovirus: identification of a third protein in the gCIII complex. *J Virol* **71**, 3090-3097.
- Lilleri, D., Fornara, C., Furione, M., Zavattoni, M., Revello, M. G., and Gerna, G. (2007).** Development of human cytomegalovirus-specific T cell immunity during primary infection of pregnant women and its correlation with virus transmission to the fetus. *J Infect Dis* **195**, 1062-1070.
- Lischka, P., Rosorius, O., Trommer, E., and Stamminger, T. (2001).** A novel transferable nuclear export signal mediates CRM1-independent nucleocytoplasmic shuttling of the human cytomegalovirus transactivator protein pUL69. *EMBO J* **20**, 7271-7283.
- Lischka, P., Toth, Z., Thomas, M., Mueller, R., and Stamminger, T. (2006).** The UL69 transactivator protein of human cytomegalovirus interacts with DEXD/H-Box RNA helicase UAP56 to promote cytoplasmic accumulation of unspliced RNA. *Mol Cell Biol* **26**, 1631-1643.
- 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.
- 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.
- Ma, J. D., Nafziger, A. N., Villano, S. A., Gaedigk, A., and Bertino, J. S., Jr. (2006).** Maribavir pharmacokinetics and the effects of multiple-dose maribavir on cytochrome P450 (CYP) 1A2, CYP 2C9, CYP 2C19, CYP 2D6, CYP 3A, N-acetyltransferase-2, and xanthine oxidase activities in healthy adults. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 1130-1135.
- Maeda, F., Ihara, S., and Watanabe, Y. (1979).** Morphogenesis of nuclear inclusions and virus capsids in HEL cells infected with temperature-sensitive mutants of human cytomegalovirus. *J Gen Virol* **44**, 419-432.
- Marschall, M., Stein-Gerlach, M., Freitag, M., Kupfer, R., van Den, B. M., and Stamminger, T. (2001).** Inhibitors of human cytomegalovirus replication drastically reduce the activity of the viral protein kinase pUL97. *J Gen Virol* **82**, 1439-1450.
- Marschall, M., Stein-Gerlach, M., Freitag, M., Kupfer, R., van Den, B. M., and Stamminger, T. (2002).** Direct targeting of human cytomegalovirus protein kinase pUL97 by kinase inhibitors is a novel principle for antiviral therapy. *J Gen Virol* **83**, 1013-1023.

- Marschall, M., Freitag, M., Suchy, P., Romaker, D., Kupfer, R., Hanke, M., and Stamminger, T. (2003).** The protein kinase pUL97 of human cytomegalovirus interacts with and phosphorylates the DNA polymerase processivity factor pUL44. *Virology* **311**, 60-71.
- Marschall, M., Marzi, A., aus dem, S. P., Jochmann, R., Kalmer, M., Auerochs, S., Lischka, P., Leis, M., and Stamminger, T. (2005).** Cellular p32 recruits cytomegalovirus kinase pUL97 to redistribute the nuclear lamina. *J Biol Chem* **280**, 33357-33367.
- Masuho, Y., Matsumoto, Y., Sugano, T., Fujinaga, S., and Minamishima, Y. (1987).** Human monoclonal antibodies neutralizing human cytomegalovirus. *J Gen Virol* **68 (Pt 5)**, 1457-1461.
- McDonough, S. H. and Spector, D. H. (1983).** Transcription in human fibroblasts permissively infected by human cytomegalovirus strain AD169. *Virology* **125**, 31-46.
- McVoy, M. A. and Adler, S. P. (1994).** Human cytomegalovirus DNA replicates after early circularization by concatemer formation, and inversion occurs within the concatemer. *J Virol* **68**, 1040-1051.
- Mersseman, V. (2007).** Generation of human cytomegalovirus mutants for the development of an optimized sub-viral particle vaccine. *Dissertation am Institut für Virologie, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz*
- Mersseman, V., Besold, K., Reddehase, M. J., Wolfrum, U., Strand, D., Plachter, B., and Reyda, S. (2008a).** Exogenous introduction of an immunodominant peptide from the non-structural IE1 protein of human cytomegalovirus into the MHC class I presentation pathway by recombinant dense bodies. *J Gen Virol* **89**, 369-379.
- Mersseman, V., Bohm, V., Holtappels, R., Deegen, P., Wolfrum, U., Plachter, B., and Reyda, S. (2008b).** Refinement of strategies for the development of a human cytomegalovirus dense body vaccine. *Med Microbiol Immunol* **197**, 97-107.
- Mettenleiter, T. C. (2002).** Herpesvirus assembly and egress. *J Virol* **76**, 1537-1547.
- Meyer, H., Bankier, A. T., Landini, M. P., Brown, C. M., Barrell, B. G., Ruger, B., and Mach, M. (1988).** Identification and procaryotic expression of the gene coding for the highly immunogenic 28-kilodalton structural phosphoprotein (pp28) of human cytomegalovirus. *J Virol* **62**, 2243-2250.
- Milbradt, J., Auerochs, S., Korn, K., and Marschall, M. (2009a).** Sensitivity of human herpesvirus 6 and other human herpesviruses to the broad-spectrum anti-infective drug artesunate. *J Clin Virol* **46**, 24-28.
- Milbradt, J., Auerochs, S., Sticht, H., and Marschall, M. (2009b).** Cytomegaloviral proteins that associate with the nuclear lamina: components of a postulated nuclear egress complex. *J Gen Virol* **90**, 579-590.

- Milbradt, J., Webel, R., Auerochs, S., Sticht, H., and Marschall, M. (2010).** Novel mode of phosphorylation-triggered reorganization of the nuclear lamina during nuclear egress of human cytomegalovirus. *J Biol Chem* **285**, 13979-13989.
- Milicic, A., Price, D. A., Zimbwa, P., Booth, B. L., Brown, H. L., Easterbrook, P. J., Olsen, K., Robinson, N., Gileadi, U., Sewell, A. K., Cerundolo, V., and Phillips, R. E. (2005).** CD8+ T cell epitope-flanking mutations disrupt proteasomal processing of HIV-1 Nef. *J Immunol* **175**, 4618-4626.
- Mitchell, D. K., Holmes, S. J., Burke, R. L., Duliege, A. M., and Adler, S. P. (2002).** Immunogenicity of a recombinant human cytomegalovirus gB vaccine in seronegative toddlers. *Pediatr Infect Dis J* **21**, 133-138.
- Miyahira, Y., Murata, K., Rodriguez, D., Rodriguez, J. R., Esteban, M., Rodrigues, M. M., and Zavala, F. (1995).** Quantification of antigen specific CD8+ T cells using an ELISPOT assay. *J Immunol Methods* **181**, 45-54.
- Mocarski, E. S., Jr. and Kemble, G. W. (1996).** Recombinant cytomegaloviruses for study of replication and pathogenesis. *Intervirology* **39**, 320-330.
- Mocarski E.S. and Courcelle C.T. (2001).** Cytomegaloviruses and Their Replication. In *Fields Virology*, 4 edn, 2629-2673. Edited by Knipe, D. M. & Howley, P. M. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Mocarski, E. S., Shenk T., and Pass R.F. (2007).** Cytomegaloviruses. In *Fields Virology*, 5 edn, 2701-2772. Edited by Knipe, D. M. & Howley, P. M. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Moore, M. W., Carbone, F. R., and Bevan, M. J. (1988).** Introduction of soluble protein into the class I pathway of antigen processing and presentation. *Cell* **54**, 777-785.
- Nguyen, T. H., Sullivan, L. C., Kotsimbos, T. C., Schwarzer, A. P., and Mifsud, N. A. (2010).** Cross-presentation of HCMV chimeric protein enables generation and measurement of polyclonal T cells. *Immunol Cell Biol* **88**, 676-684.
- Nigro, G., Adler, S. P., La, T. R., and Best, A. M. (2005).** Passive immunization during pregnancy for congenital cytomegalovirus infection. *N Engl J Med* **353**, 1350-1362.
- Nixon, D. E. and McVoy, M. A. (2002).** Terminally repeated sequences on a herpesvirus genome are deleted following circularization but are reconstituted by duplication during cleavage and packaging of concatemeric DNA. *J Virol* **76**, 2009-2013.
- Oberg, B. (1982).** Antiviral effects of phosphonoformate (PFA, foscarnet sodium). *Pharmacol Ther* **19**, 387-415.
- Oberg, B. (1989).** Antiviral effects of phosphonoformate (PFA, foscarnet sodium). *Pharmacol Ther* **40**, 213-285.

- Ogawa-Goto, K., Tanaka, K., Gibson, W., Moriishi, E., Miura, Y., Kurata, T., Irie, S., and Sata, T. (2003).** Microtubule network facilitates nuclear targeting of human cytomegalovirus capsid. *J Virol* **77**, 8541-8547.
- Ornoy, A. and Diav-Citrin, O. (2006).** Fetal effects of primary and secondary cytomegalovirus infection in pregnancy. *Reprod Toxicol* **21**, 399-409.
- Pande, H., Campo, K., Tanamachi, B., and Zaia, J. A. (1991).** Human cytomegalovirus strain Towne pp65 gene: nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli*. *Virology* **182**, 220-228.
- Pascolo, S., Bervas, N., Ure, J. M., Smith, A. G., Lemonnier, F. A., and Perarnau, B. (1997).** HLA-A2.1-restricted education and cytolytic activity of CD8(+) T lymphocytes from beta2 microglobulin (beta2m) HLA-A2.1 monochain transgenic H-2Db beta2m double knockout mice. *J Exp Med* **185**, 2043-2051.
- Pass, R. F., Duliege, A. M., Boppana, S., Sekulovich, R., Percell, S., Britt, W., and Burke, R. L. (1999).** A subunit cytomegalovirus vaccine based on recombinant envelope glycoprotein B and a new adjuvant. *J Infect Dis* **180**, 970-975.
- Pass, R. F., Zhang, C., Evans, A., Simpson, T., Andrews, W., Huang, M. L., Corey, L., Hill, J., Davis, E., Flanigan, C., and Cloud, G. (2009).** Vaccine prevention of maternal cytomegalovirus infection. *N Engl J Med* **360**, 1191-1199.
- Peggs, K. S., Verfuether, S., Pizzey, A., Khan, N., Guiver, M., Moss, P. A., and Mackinnon, S. (2003).** Adoptive cellular therapy for early cytomegalovirus infection after allogeneic stem-cell transplantation with virus-specific T-cell lines. *Lancet* **362**, 1375-1377.
- Pepperl, S., Munster, J., Mach, M., Harris, J. R., and Plachter, B. (2000).** Dense bodies of human cytomegalovirus induce both humoral and cellular immune responses in the absence of viral gene expression. *J Virol* **74**, 6132-6146.
- Pepperl-Klindworth, S., Frankenberg, N., Riegler, S., and Plachter, B. (2003).** Protein delivery by subviral particles of human cytomegalovirus. *Gene Ther* **10**, 278-284.
- Pepperl-Klindworth, S. and Plachter, B. (2006).** Current perspectives in vaccine development. In: *Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology*, Edited by Reddehase MJ, 551-72.
- Perry, C. M. and Balfour, J. A. (1999).** Fomivirsen. *Drugs* **57**, 375-380.
- Plotkin, S. A., Furukawa, T., Zygraich, N., and Huygelen, C. (1975).** Candidate cytomegalovirus strain for human vaccination. *Infect Immun* **12**, 521-527.
- Plotkin, S. A., J.Farquar, and E.Hornberger (1976).** Clinical trials of immunization with the Towne 125 strain of human cytomegalovirus. *J Inf Dis* **134**, 470-472.

- Plotkin, S. A. and Huygelen, D. (1977).** Cytomegalovirus vaccine prepared in WI-38. *Dev Biol Stand* **37**, 301-305.
- Plotkin, S. A., Higgins, R., Kurtz, J. B., Morris, P. J., Campbell, D. A., Jr., Shope, T. C., Spector, S. A., and Dankner, W. M. (1994).** Multicenter trial of Towne strain attenuated virus vaccine in seronegative renal transplant recipients. *Transplantation* **58**, 1176-1178.
- Plotkin, S. A. (1999).** Vaccination against cytomegalovirus, the changeling demon. *Pediatr Infect Dis J* **18**, 313-325.
- Plotkin, S. A. (2001).** Vaccination against cytomegalovirus. *Arch Virol Suppl* 121-134.
- Prichard, M. N., Britt, W. J., Daily, S. L., Hartline, C. B., and Kern, E. R. (2005).** Human cytomegalovirus UL97 Kinase is required for the normal intranuclear distribution of pp65 and virion morphogenesis. *J Virol* **79**, 15494-15502.
- Prichard, M. N., Sztul, E., Daily, S. L., Perry, A. L., Frederick, S. L., Gill, R. B., Hartline, C. B., Streblow, D. N., Varnum, S. M., Smith, R. D., and Kern, E. R. (2008).** Human cytomegalovirus UL97 kinase activity is required for the hyperphosphorylation of retinoblastoma protein and inhibits the formation of nuclear aggresomes. *J Virol* **82**, 5054-5067.
- Provenzano, M., Sais, G., Bracci, L., Egli, A., Anselmi, M., Viehl, C. T., Schaub, S., Hirsch, H. H., Stroncek, D. F., Marincola, F. M., and Spagnoli, G. C. (2009).** A HCMV pp65 polypeptide promotes the expansion of CD4+ and CD8+ T cells across a wide range of HLA specificities. *J Cell Mol Med* **13**, 2131-2147.
- Rapp, M., Messerle, M., Lucin, P., and Koszinowski, U. H. (1993).** In vivo protection studies with MCMV glycoproteins gB and gH expressed by vaccinia virus. In *Multidisciplinary Approach to understanding Cytomegalovirus Disease*. (Proceedings of the fourth International Cytomegalovirus Workshop, Paris, France, 19-21 April, 1993) 327-332 Edited by Michelson, S & Plotkin S A : Excerpta Medica
- Rasmussen, L., Matkin, C., Spaete, R., Pachi, C., and Merigan, T. C. (1991).** Antibody response to human cytomegalovirus glycoproteins gB and gH after natural infection in humans. *J Infect Dis* **164**, 835-842.
- Reap, E. A., Dryga, S. A., Morris, J., Rivers, B., Norberg, P. K., Olmsted, R. A., and Chulay, J. D. (2007).** Cellular and humoral immune responses to alphavirus replicon vaccines expressing cytomegalovirus pp65, IE1, and gB proteins. *Clin Vaccine Immunol* **14**, 748-755.
- Rechter, S., Scott, G. M., Eickhoff, J., Zielke, K., Auerochs, S., Muller, R., Stamminger, T., Rawlinson, W. D., and Marschall, M. (2009).** Cyclin-dependent Kinases Phosphorylate the Cytomegalovirus RNA Export Protein pUL69 and Modulate Its Nuclear Localization and Activity. *J Biol Chem* **284**, 8605-8613.

- Reddehase, M. J., Weiland, F., Munch, K., Jonjic, S., Luske, A., and Koszinowski, U. H. (1985).** Interstitial murine cytomegalovirus pneumonia after irradiation: characterization of cells that limit viral replication during established infection of the lungs. *J Virol* **55**, 264-273.
- Reddehase, M. J., Balthesen, M., Rapp, M., Jonjic, S., Pavic, I., and Koszinowski, U. H. (1994).** The conditions of primary infection define the load of latent viral genome in organs and the risk of recurrent cytomegalovirus disease. *J Exp Med* **179**, 185-193.
- Reddehase, M. J. (2002).** Antigens and immunoevasins: opponents in cytomegalovirus immune surveillance. *Nat Rev Immunol* **2**, 831-844.
- Reusser, P., Riddell, S. R., Meyers, J. D., and Greenberg, P. D. (1991).** Cytotoxic T-lymphocyte response to cytomegalovirus after human allogeneic bone marrow transplantation: pattern of recovery and correlation with cytomegalovirus infection and disease. *Blood* **78**, 1373-1380.
- Reynolds, D. W., Stagno, S., Hosty, T. S., Tiller, M., and Alford, C. A., Jr. (1973).** Maternal cytomegalovirus excretion and perinatal infection. *N Engl J Med* **289**, 1-5.
- Ribbert, H. (1904).** Über protozoenhaltige Zellen in der Niere eines syphilitischen Neugeborenen und in der Parotis von Kindern. *Zentralbl Allg Pathol* **15**, 945-948.
- Riddell, S. R., Watanabe, K. S., Goodrich, J. M., Li, C. R., Agha, M. E., and Greenberg, P. D. (1992).** Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science* **257**, 238-241.
- Roby, C. and Gibson, W. (1986).** Characterization of phosphoproteins and protein kinase activity of virions, noninfectious enveloped particles, and dense bodies of human cytomegalovirus. *J Virol* **59**, 714-727.
- Roizman, B., Carmichael, L. E., Deinhardt, F., de-The, G., Nahmias, A. J., Plowright, W., Rapp, F., Sheldrick, P., Takahashi, M., and Wolf, K. (1981).** Herpesviridae. Definition, provisional nomenclature, and taxonomy. The Herpesvirus Study Group, the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Intervirology* **16**, 201-217.
- Roizmann, B., Desrosiers, R. C., Fleckenstein, B., Lopez, C., Minson, A. C., and Studdert, M. J. (1992).** The family Herpesviridae: an update. The Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Virol* **123**, 425-449.
- Roizman B. and Pellett E.P. (2001).** The Family Herpesviridae: A Brief Introduction. In *Fields Virology*, 4 edn, 2629-2673. Edited by Knipe, D. M. & 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.
- Ryckman, B. J., Chase, M. C., and Johnson, D. C. (2008).** HCMV gH/gL/UL128-131 interferes with virus entry into epithelial cells: evidence for cell type-specific receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 14118-14123.
- 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
- Sanchez, V., Angeletti, P. C., Engler, J. A., and Britt, W. J. (1998).** Localization of human cytomegalovirus structural proteins to the nuclear matrix of infected human fibroblasts. *J Virol* **72**, 3321-3329.
- Sanchez, V., Greis, K. D., Sztul, E., and Britt, W. J. (2000a).** Accumulation of virion tegument and envelope proteins in a stable cytoplasmic compartment during human cytomegalovirus replication: characterization of a potential site of virus assembly. *J Virol* **74**, 975-986.
- Sanchez, V., Sztul, E., and Britt, W. J. (2000b).** Human cytomegalovirus pp28 (UL99) localizes to a cytoplasmic compartment which overlaps the endoplasmic reticulum-golgi-intermediate compartment. *J Virol* **74**, 3842-3851.
- Schierling, K., Stamminger, T., Mertens, T., and Winkler, M. (2004).** Human cytomegalovirus tegument proteins ppUL82 (pp71) and ppUL35 interact and cooperatively activate the major immediate-early enhancer. *J Virol* **78**, 9512-9523.
- Schleiss, M. R. and Heineman, T. C. (2005).** Progress toward an elusive goal: current status of cytomegalovirus vaccines. *Expert Rev Vaccines* **4**, 381-406.
- Schleiss, M. R. (2008).** Cytomegalovirus vaccine development. *Curr Top Microbiol Immunol* **325**, 361-382.
- Schmolke, S., Drescher, P., Jahn, G., and Plachter, B. (1995a).** Nuclear targeting of the tegument protein pp65 (UL83) of human cytomegalovirus: an unusual bipartite nuclear localization signal functions with other portions of the protein to mediate its efficient nuclear transport. *J Virol* **69**, 1071-1078.
- Schmolke, S., Kern, H. F., Drescher, P., Jahn, G., and Plachter, B. (1995b).** The dominant phosphoprotein pp65 (UL83) of human cytomegalovirus is dispensable for growth in cell culture. *J Virol* **69**, 5959-5968.

- Schoppel, K., Schmidt, C., Einsele, H., Hebart, H., and Mach, M. (1998).** Kinetics of the antibody response against human cytomegalovirus-specific proteins in allogeneic bone marrow transplant recipients. *J Infect Dis* **178**, 1233-1243.
- Selleseth, D. W., Talarico, C. L., Miller, T., Lutz, M. W., Biron, K. K., and Harvey, R. J. (2003).** Interactions of 1263W94 with other antiviral agents in inhibition of human cytomegalovirus replication. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 1468-1471.
- Shapira, M. Y., Resnick, I. B., Chou, S., Neumann, A. U., Lurain, N. S., Stamminger, T., Caplan, O., Saleh, N., Efferth, T., Marschall, M., and Wolf, D. G. (2008).** Artesunate as a potent antiviral agent in a patient with late drug-resistant cytomegalovirus infection after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis* **46**, 1455-1457.
- Shimamura, M., Mach, M., and Britt, W. J. (2006).** Human cytomegalovirus infection elicits a glycoprotein M (gM)/gN-specific virus-neutralizing antibody response. *J Virol* **80**, 4591-4600.
- Shizuya, H., Birren, B., Kim, U. J., Mancino, V., Slepak, T., Tachiiri, Y., and Simon, M. (1992).** Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 8794-8797.
- Sigal, L. J., Crotty, S., Andino, R., and Rock, K. L. (1999).** Cytotoxic T-cell immunity to virus-infected non-haematopoietic cells requires presentation of exogenous antigen. *Nature* **398**, 77-80.
- Simon, C. O., Holtappels, R., Tervo, H. M., Bohm, V., Daubner, T., Oehrlein-Karpi, S. A., Kuhnappel, B., Renzaho, A., Strand, D., Podlech, J., Reddehase, M. J., and Grzimek, N. K. (2006).** CD8 T cells control cytomegalovirus latency by epitope-specific sensing of transcriptional reactivation. *J Virol* **80**, 10436-10456.
- Sinclair, J. and Sissons, P. (2006).** Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *J Gen Virol* **87**, 1763-1779.
- Sinzger, C., Grefte, A., Plachter, B., Gouw, A. S., The, T. H., and Jahn, G. (1995).** Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues. *J Gen Virol* **76 (Pt 4)**, 741-750.
- Sinzger, C., Digel, M., and Jahn, G. (2008).** Cytomegalovirus cell tropism. *Curr Top Microbiol Immunol* **325**, 63-83.
- Sodeik, B., Ebersold, M. W., and Helenius, A. (1997).** Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J Cell Biol* **136**, 1007-1021.
- Somogyi, T., Michelson, S., and Masse, M. J. (1990).** Genomic location of a human cytomegalovirus protein with protein kinase activity (PK68). *Virology* **174**, 276-285.

- Spaete, R. R. (1991).** A recombinant subunit vaccine approach to HCMV vaccine development. *Transplant Proc* **23**, 90-96.
- Stagno, S., Brasfield, D. M., Brown, M. B., Cassell, G. H., Pifer, L. L., Whitley, R. J., and Tiller, R. E. (1981).** Infant pneumonitis associated with cytomegalovirus, Chlamydia, Pneumocystis, and Ureaplasma: a prospective study. *Pediatrics* **68**, 322-329.
- Stamminger, T., Puchtler, E., and Fleckenstein, B. (1991).** Discordant expression of the immediate-early 1 and 2 gene regions of human cytomegalovirus at early times after infection involves posttranscriptional processing events. *J Virol* **65**, 2273-2282.
- Stamminger, T., Gstaiger, M., Weinzierl, K., Lorz, K., Winkler, M., and Schaffner, W. (2002).** Open reading frame UL26 of human cytomegalovirus encodes a novel tegument protein that contains a strong transcriptional activation domain. *J Virol* **76**, 4836-4847.
- Starr, S. E., Glazer, J. P., Friedman, H. M., Farquhar, J. D., and Plotkin, S. A. (1981).** Specific cellular and humoral immunity after immunization with live Towne strain cytomegalovirus vaccine. *J Infect Dis* **143**, 585-589.
- Steininger, C. (2007).** Novel therapies for cytomegalovirus disease. *Recent Pat Antiinfect DrugDiscov* **2**, 53-72.
- Stratton, K. R., Durch, J. S., and Lawrence, R. S. (2001).** Vaccines for the 21st Century. A Tool for Decisionmaking. *National Academy press*
- Streblow, D. N., Varnum, S. M., Smith, R. D., and Nelson, J. A. (2006).** A proteomics analysis of human cytomegalovirus particles. In *M J Reddehase (ed), Cytomegaloviruses:molecular biology and immunology Caister Academic Press, Wymondham,Norfolk, United Kingdom* 63-89.
- Sullivan, V., Talarico, C. L., Stanat, S. C., Davis, M., Coen, D. M., and Biron, K. K. (1992).** A protein kinase homologue controls phosphorylation of ganciclovir in human cytomegalovirus-infected cells. *Nature* **359**, 85
- Sylwester, A. W., Mitchell, B. L., Edgar, J. B., Taormina, C., Pelte, C., Ruchti, F., Sleath, P. R., Grabstein, K. H., Hosken, N. A., Kern, F., Nelson, J. A., and Picker, L. J. (2005).** Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *J Exp Med* **202**, 673-685.
- Taguchi, T., McGhee, J. R., Coffman, R. L., Beagley, K. W., Eldridge, J. H., Takatsu, K., and Kiyono, H. (1990).** Detection of individual mouse splenic T cells producing IFN-gamma and IL-5 using the enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay. *J Immunol Methods* **128**, 65-73.
- Talbot, P. and Almeida, J. D. (1977).** Human cytomegalovirus: purification of enveloped virions and dense bodies. *J Gen Virol* **36**, 345-349.

- Tanious, F. A., Veal, J. M., Buczak, H., Ratmeyer, L. S., and Wilson, W. D. (1992).** DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) binds differently to DNA and RNA: minor-groove binding at AT sites and intercalation at AU sites. *Biochemistry* **31**, 3103-3112.
- Tenzer, S., Peters, B., Bulik, S., Schoor, O., Lemmel, C., Schatz, M. M., Kloetzel, P. M., Rammensee, H. G., Schild, H., and Holzhutter, H. G. (2005).** Modeling the MHC class I pathway by combining predictions of proteasomal cleavage, TAP transport and MHC class I binding. *Cell Mol Life Sci* **62**, 1025-1037.
- Thomas, M., Rechter, S., Milbradt, J., Auerochs, S., Muller, R., Stamminger, T., and Marschall, M. (2009).** Cytomegaloviral protein kinase pUL97 interacts with the nuclear mRNA export factor pUL69 to modulate its intranuclear localization and activity. *J Gen Virol* **90**, 567-578.
- Tooze, J., Hollinshead, M., Reis, B., Radsak, K., and Kern, H. (1993).** Progeny vaccinia and human cytomegalovirus particles utilize early endosomal cisternae for their envelopes. *Eur J Cell Biol* **60**, 163-178.
- Topilko, A. and Michelson, S. (1994).** Hyperimmediate entry of human cytomegalovirus virions and dense bodies into human fibroblasts. *Res Virol* **145**, 75-82.
- Toth Z. and Stamminger T. (2008).** The human cytomegalovirus regulatory protein UL69 and its effect on mRNA export. *Front Biosci* **13**, 2939-2949.
- Utz, U., Britt, W., Vugler, L., and Mach, M. (1989).** Identification of a neutralizing epitope on glycoprotein gp58 of human cytomegalovirus. *J Virol* **63**, 1995-2001.
- van Zeijl M., Fairhurst, J., Baum, E. Z., Sun, L., and Jones, T. R. (1997).** The human cytomegalovirus UL97 protein is phosphorylated and a component of virions. *Virology* **231**, 72-80.
- Varnum, S. M., Streblow, D. N., Monroe, M. E., Smith, P., Auberry, K. J., Pasatolic, L., Wang, D., Camp, D. G., Rodland, K., Wiley, S., Britt, W., Shenk, T., Smith, R. D., and Nelson, J. A. (2004).** Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome. *J Virol* **78**, 10960-10966.
- Walter, E. A., Greenberg, P. D., Gilbert, M. J., Finch, R. J., Watanabe, K. S., Thomas, E. D., and Riddell, S. R. (1995).** Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N Engl J Med* **333**, 1038-1044.
- Wang, D. and Shenk, T. (2005).** Human cytomegalovirus virion protein complex required for epithelial and endothelial cell tropism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 18153-18158.

- Wang, L. H., Peck, R. W., Yin, Y., Allanson, J., Wiggs, R., and Wire, M. B. (2003).** Phase I safety and pharmacokinetic trials of 1263W94, a novel oral anti-human cytomegalovirus agent, in healthy and human immunodeficiency virus-infected subjects. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 1334-1342.
- Wang, Z., La, R. C., Maas, R., Ly, H., Brewer, J., Mekhoubad, S., Daftarian, P., Longmate, J., Britt, W. J., and Diamond, D. J. (2004).** Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing a soluble form of glycoprotein B causes durable immunity and neutralizing antibodies against multiple strains of human cytomegalovirus. *J Virol* **78**, 3965-3976.
- Wang, Z., La, R. C., Lacey, S. F., Maas, R., Mekhoubad, S., Britt, W. J., and Diamond, D. J. (2006).** Attenuated poxvirus expressing three immunodominant CMV antigens as a vaccine strategy for CMV infection. *J Clin Virol* **35**, 324-331.
- Warming, S., Costantino, N., Court, D. L., Jenkins, N. A., and Copeland, N. G. (2005).** Simple and highly efficient BAC recombineering using galK selection. *Nucleic Acids Research* **33**, 36
- Wathen, M. W. and Stinski, M. F. (1982).** Temporal patterns of human cytomegalovirus transcription: mapping the viral RNAs synthesized at immediate early, early, and late times after infection. *J Virol* **41**, 462-477.
- Weller, T. H., Macauley, J. C., Craig, J. M., and Wirth, P. (1957).** Isolation of intranuclear inclusion producing agents from infants with illness resembling cytomegalic inclusion disease. *Proc Coc Exp Biol Med* **94**, 4-12.
- Welsh, R. M., Brubaker, J. O., Vargas-Cortes, M., and O'Donnell, C. L. (1991).** Natural killer (NK) cell response to virus infections in mice with severe combined immunodeficiency. The stimulation of NK cells and the NK cell-dependent control of virus infections occur independently of T and B cell function. *J Exp Med* **173**, 1053-1063.
- 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.
- Winkler, M., Rice, S. A., and Stamminger, T. (1994).** UL69 of human cytomegalovirus, an open reading frame with homology to ICP27 of herpes simplex virus, encodes a transactivator of gene expression. *J Virol* **68**, 3943-3954.
- Winkler, M. and Stamminger, T. (1996).** A specific subform of the human cytomegalovirus transactivator protein pUL69 is contained within the tegument of virus particles. *J Virol* **70**, 8984-8987.
- Wolf, D. G., Courcelle, C. T., Prichard, M. N., and Mocarski, E. S. (2001).** Distinct and separate roles for herpesvirus-conserved UL97 kinase in cytomegalovirus DNA synthesis and encapsidation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 1895-1900.

- Yeager, A. S., Grumet, F. C., Hafleigh, E. B., Arvin, A. M., Bradley, J. S., and Prober, C. G. (1981).** Prevention of transfusion-acquired cytomegalovirus infections in newborn infants. *J Pediatr* **98**, 281-287.
- Zhong, J., Rist, M., Cooper, L., Smith, C., and Khanna, R. (2008).** Induction of pluripotent protective immunity following immunisation with a chimeric vaccine against human cytomegalovirus. *PLoS One* **3**, 3256
- Zhong, J. and Khanna, R. (2009).** Ad-gBCMVpoly: A novel chimeric vaccine strategy for human cytomegalovirus-associated diseases. *J Clin Virol* **46 Suppl 4**, 68-72.

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1.1:** Schematische Darstellung eines HCMV-Partikels
- Abbildung 3.1:** Herstellung der rekombinanten BACs mittels BAC Mutagenese
- Abbildung 3.2:** Übersicht von BAC pHB5 und den rekombinanten BACs
- Abbildung 3.3:** Restriktionsanalyse der rekombinanten BACs
- Abbildung 3.4:** Indirekte Immunfluoreszenzanalysen von infizierten HFF
- Abbildung 3.5:** Western-Blot Analysen von Gesamtzellextrakten infizierter HFF
- Abbildung 3.6:** Freisetzung viraler DNA in den Kulturüberstand infizierter HFF
- Abbildung 3.7:** Fraktionierung von extrazellulären, viralen Partikeln der Viren RV-HB5, RV-SB3 und RV-SB6 mittels Natriumtartrat-Gradientenultrazentrifugation
- Abbildung 3.8:** Western-Blot Analysen der Verpackung des pp65-IE1_{TMV} Fusionsproteins in virale Partikel
- Abbildung 3.9:** IFN- γ ELISpot Analysen der Einschleusung von Peptiden in den MHC-I Präsentationsweg durch rekombinante DB
- Abbildung 3.10:** IFN- γ ELISpot Analysen der CD8 T-Zell Antwort nach Immunisierung mit recDB und anschließender *in vitro* Stimulierung
- Abbildung 3.11:** *Ex vivo* IFN- γ ELISpot der CD8 T-Zell Antwort nach Immunisierung mit recDB
- Abbildung 3.12:** FACS Analysen der CD4 T-Zell Antwort nach Immunisierung mit recDB
- Abbildung 3.13:** Mikroneutralisationstest zur Analyse neutralisierender Antikörper nach Immunisierung mit recDB
- Abbildung 3.14:** Schematische Darstellung der rekombinanten SIINFEKL- und SIINFEKA-exprimierenden Viren
- Abbildung 3.15:** Restriktionsanalyse der rekombinanten BACs
- Abbildung 3.16:** Indirekte Immunfluoreszenzanalysen von infizierten HFF

- Abbildung 3.17:** Auftrennung viraler Partikel mittels Gradienten-Ultrazentrifugation
- Abbildung 3.18:** IFN- γ ELISpot *ex vivo* der CD8 T-Zell Antwort nach Immunisierung mit recDB
- Abbildung 3.19:** Western-Blot Analysen von Gesamtzellextrakten infizierter HFF
- Abbildung 3.20:** TaqManTM PCR Analysen der viralen DNA-Replikation von RV-HB5, RV-VM1 und RV-VM4
- Abbildung 3.21:** Indirekte Immunfluoreszenzen von infizierten HFF
- Abbildung 3.22:** Indirekte Immunfluoreszenzen von infizierten HFF
- Abbildung 3.23:** Phasenkontrastmikroskopie und konfokale Mikroskopie von infizierten HFF
- Abbildung 3.24:** Indirekte Immunfluoreszenzanalysen von infizierten HFF nach Zugabe verschiedener Inhibitoren
- Abbildung 3.25:** Virusfreisetzung von infizierten HFF nach Zugabe verschiedener Inhibitoren
- Abbildung 3.26:** Immunfluoreszenzanalysen von kotransfizierten 293T Zellen
- Abbildung 3.27:** *In vitro* Kinase Assay von infizierten HFF
- Abbildung 3.28:** Massenspektrometrische Analysen der kopräzipitierten, viralen Proteine
- Abbildung 3.29:** Massenspektrometrische Analysen der kopräzipitierten, zellulären Proteine
- Abbildung 3.30:** Untersuchung des Gehaltes an viraler DNA in den präzipitierten Proteinkomplexen
- Abbildung 3.31:** Western-Blot Analysen von Gesamtzellextrakten infizierter HFF
- Abbildung 3.32:** Northern Blot Analysen von Gesamt-RNA aus infizierten HFF

Lebenslauf

Danksagung

Erklärung

Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Experimente wurden in der Zeit von November 2007 bis Oktober 2010 am Institut für Virologie an der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt.

Die Arbeit wurde von dem Graduierten Kolleg „Immunotherapy“ unterstützt.

Teilaspekte der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht: