

Identifizierung und Charakterisierung immunmodulatorischer Gene des Maus-Cytomegalievirus (MCMV)

Dissertation



Zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Frau Andrea Loewendorf

geboren am 9. August 1976 in Berlin

Gutachterin bzw. Gutachter

1. Prof. Dr. Elmar Wahle
2. Prof. Dr. Ulf Dittmer

Halle (Saale), dem
15.10.2005

urn:nbn:de:gbv:3-000009265

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000009265>]

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	3
1.1 Das humane Cytomegalievirus (HCMV)	3
1.2 Das Maus-Cytomegalievirus (MCMV)	4
1.3 Die Mutagenese des Maus-Cytomegalievirus als Basis für die Identifikation von viralen Genen.....	7
1.4 Immunmodulation durch CMV.....	9
1.5 Die Rolle von Antigen-präsentierenden Zellen bei der Initiation einer Immunantwort	11
1.6 Die Manipulation von Antigen-präsentierenden Zellen durch Cytomegalieviren ..	14
1.7 Zielstellung	15
2. Material und Methoden.....	16
2.1 Materialien und Lösungen.....	16
2.2 Methoden	18
2.2.1 Zellkultur und Viren.....	18
2.2.2 Molekularbiologische Methoden	20
2.3 Spezieller Methodenteil.....	30
2.3.1 Herstellung von Virusmutanten.....	31
2.3.2 Die Durchflusszytometrie (FACS-Analyse).....	38
3. Ergebnisse.....	42
3.1 Etablierung eines Screeningsystems zur Identifizierung immunmodulatorischer Gene von MCMV	42
3.1.1 Vorversuche zur Etablierung eines Screeningsystems.....	42
3.1.2 Screening der MCMV-Mutanten	48
3.2 Die Identifikation von immunmodulatorischen Genen in MCMV	51
3.2.1 Die Identifizierung des für die Herunterregulierung von CD86 verantwortlichen Gens.....	52
3.2.2 Die Identifizierung des für die Herunterregulierung von CD40 verantwortlichen Gens.....	68
3.3 Untersuchungen zu Effekt und Wirkungsmechanismus von modB7-2 und dem innerhalb der Region von m155 kodierten Protein	74

1. Einleitung

1.1 Das humane Cytomegalievirus (HCMV)

„Die medizinische Forschung hat so enorme Fortschritte gemacht, daß es überhaupt keine gesunden Menschen mehr gibt“. Aldous Huxley (1894-1963), engl. Schriftsteller.

Mit der Verbesserung der medizinischen Diagnostik in den letzten Dekaden ist die Anzahl der festgestellten Krankheiten und identifizierten Pathogene stark gestiegen. Dass eine Infektion durch ein Pathogen nicht unbedingt mit der Ausbildung eines Krankheitsbildes einhergeht, wird besonders eindrucksvoll durch die verschiedenen Vertreter der Herpesvirusfamilie demonstriert. Eine Infektion mit dem Herpes-Simplex-Virus führt z.B., mit von Mensch zu Mensch sehr unterschiedlicher Regelmäßigkeit, zur Entstehung von Lippenbläschen. In der asymptomatischen Phase der Infektion treten diese Bläschen nicht auf. Während dieser Zeit ist das Virus jedoch keineswegs aus dem Körper verschwunden, sondern liegt persistent in den Nervenzellen der Ganglien vor. Der „Patient“ durchlebt die asymptomatische Phase einer „Erkrankung“. Das Hervorrufen einer lebenslangen Persistenz im Wirtsorganismus ist eine wichtige Eigenschaft, die allen Herpesviren gemein ist.

Das humane Cytomegalievirus ist als weiterer Vertreter dieser Familie weit verbreitet (Durchseuchung westliche Länder 50-80%, Entwicklungsländer 90-100%). Die Infektion eines gesunden, erwachsenen Menschen mit HCMV verläuft meist asymptomatisch, wobei jedoch auch hier keine vollständige Eliminierung des Virus erfolgt, sondern ein Übergang in eine persistente Infektionsphase stattfindet. Während dieses Zeitraumes erfolgt die Etablierung eines „Gleichgewichts“, welches auf einem funktionierenden Immunsystem des Wirts basiert. Eine Schwächung des Immunsystems verschiebt das Gleichgewicht zu Gunsten des Virus und als Folge können ernsthafte Erkrankungen entstehen (Pass, 2001). Da eine solches, schwaches Immunsystem vor allem als unreifes Immunsystem bei ungeborenen Kindern oder bei AIDS-Patienten oder Transplantatempfängern vorliegt, bezieht sich die klinische Bedeutung von HCMV-Infektionen vor allem auf die genannten Gruppen. Die Primärinfektion einer werdenden Mutter kann eine intrauterine Infektion des Kindes zur Folge haben und stellt mit 0.2% bis 2.2% die häufigste kongenitale virale Infektion dar (Pass, 2001). Diese kann eine Thrombozytopenie, Hepatosplenomegalie, Hörschäden und Entwicklungsstörungen des Zentralen Nervensystems des Kindes hervorrufen; 10-15% der infizierten Neugeborenen tragen bleibende neurologische Schäden davon (Fowler *et al.*, 1992; Stagno *et al.*, 1982). Bei erwachsenen Patienten ist vor allem die Gruppe der HIV-Infizierten und der als Transplantatempfänger immunsupprimierten Patienten durch

HCMV gefährdet. Für AIDS-Patienten stellt das Cytomegalievirus die Ursache für eine Chorioretinitis, die zur Erblindung führen kann, oder eine interstitielle Cytomegalievirus-Pneumonie dar, die in 20-30% der Fälle tödlich verläuft. Bei der Transplantation von Knochenmark spielt HCMV wahrscheinlich eine wichtige Rolle beim Auslösen der Abstoßungsreaktion (GVHD, *Graft-versus-Host*-Erkrankung) (Gibson *et al.*, 1996); (Broers *et al.*, 2000).

Ein wichtiger Faktor bei der Etablierung eines Gleichgewichts zwischen Wirt und Virus ist die gezielte Beeinflussung des wirtseigenen Immunsystems durch das Virus, ein Prozess der als Immunmodulation bezeichnet wird. Genauere Kenntnisse über die Mechanismen der Immunmodulation durch Cytomegalieviren ermöglichen ein besseres Verständnis der HCMV-Pathogenese, was bei der Entwicklung von neuen Therapiekonzepten hilfreich sein kann. Weiterhin bietet die Untersuchung von immunmodulatorischen Funktionen des Virus die Möglichkeit, einen Einblick in die Bedeutung der einzelnen, vom Virus manipulierten Mechanismen des Immunsystems bzw. der Zelle zu erhalten. Um dies genauer untersuchen zu können, ist die Arbeit mit einem *in vivo*-Modell unerlässlich, die mit dem humanen Cytomegalievirus aufgrund der Speziespezifität nicht möglich ist. Daher wurde für die vorliegenden Untersuchungen auf das Maus-Cytomegalievirus zurückgegriffen, welches mit dem humanen Cytomegalievirus eng verwandt ist und für die Infektion von Mäusen als Modellorganismus genutzt werden kann (Brune *et al.*, 1999b; Hudson, 1979).

1.2 Das Maus-Cytomegalievirus (MCMV)

Das MCMV-Maus Modellsystem bietet eine ideale Möglichkeit, mit Hilfe von experimentellen Infektionen den Verlauf einer CMV-Erkrankung zu verfolgen und die Faktoren, die dabei eine Rolle spielen, zu untersuchen bzw. zu manipulieren.

Der Infektionsweg für die Verbreitung von CMV unter Freilandbedingungen ist nicht vollständig geklärt, jedoch gelten die Übertragung durch Speichel, in dem bei chronisch infizierten Mäusen Virus nachgewiesen werden kann sowie die sexuelle Übertragung als die wahrscheinlichsten Formen der Virusausbreitung. In beiden Fällen erfolgt der Viruseintritt über Epithelien (im ersten Fall des respiratorischen Traktes und im letzteren Fall durch den Genitaltrakt) und die folgende weitere Verbreitung hämatogen. Für den Verlauf einer experimentellen Infektion sind neben der Infektionsdosis und der Applikationsmethode (intraperitoneal oder intraplantar), die Herkunft des Virus (in Zellkultur vermehrt oder aus Speicheldrüsen isoliertes Virus) sowie das Alter, der

1. Einleitung

Immunstatus und der genetische Hintergrund der infizierten Maus von entscheidender Bedeutung (Krmptotic *et al.*, 2003). Die Verabreichung einer Dosis von 1×10^5 infektiöser Partikel von aus Zellkultur gewonnenem Virus in eine immunkompetente, adulte Maus verläuft unabhängig vom Infektionsweg asymptomatisch. Es kann in den verschiedenen Organen nur wenig Virus nachgewiesen werden; eine Ausnahme bildet hierbei nur die Speicheldrüse, in der eine länger anhaltende Virusreplikation stattfindet. Auch hier ist die produktive Phase der Infektion jedoch nach 3-4 Wochen beendet.

Eine Infektion von immundefizienten Mäusen ruft hingegen eine massive Manifestation verschiedenster Krankheitsbilder hervor. Die Infektion von Knochenmarksstromazellen unterbindet die Bereitstellung der für die Hämatopoese notwendigen Cytokine und Wachstumsfaktoren durch diese Zellen, was zum Knochenmarkschwund führt (Mayer *et al.*, 1997; Mutter *et al.*, 1988; Steffens *et al.*, 1998). Bei Mäusen, die durch eine subletale γ -Bestrahlung künstlich immunsupprimiert werden, ruft eine MCMV-Infektion eine interstitielle Pneumonie und Nekrosen in der Nebennierenrinde hervor (Reddehase *et al.*, 1985; Reddehase *et al.*, 1988).

Die Infektion von neugeborenen Mäusen ist ein Modellsystem für die Untersuchung der kongenitalen Infektion von Menschen mit HCMV, auch wenn bei Mäusen eine intrauterine Infektion nicht vorkommt. Eine Infektion neugeborener Mäuse in die Bauchhöhle mit 1×10^3 infektiösen Partikeln von aus Zellkultur gewonnenem Virus führt zu einer signifikanten Morbidität und Mortalität (Polic *et al.*, 1998). Es ist eine Schädigung des Zentralnervensystems, der Leber, des blutbildenden Systems, der Haut und anderer Organen zu beobachten. Die überlebenden Mäuse erleiden eine monatelang anhaltende produktive Infektionsphase, in der sie Virus im Speichel ausscheiden, bevor die latente Phase der Infektion beginnt (Reddehase *et al.*, 1994).

Die Kontrolle des Maus-Cytomegalievirus in immunkompetenten Mäusen erfolgt in den verschiedenen Stadien der Infektion durch unterschiedliche Komponenten des Immunsystems. Während der ersten Tage nach Infektion sind die Natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen) als Effektorzellen der angeborenen Immunität entscheidend, zu einem späteren Zeitpunkt wird die Kontrolle durch Zellen der adaptiven Immunantwort erreicht.

Die Bedeutung der NK-Zellen in der frühen Phase der Infektion wird besonders durch die Erkenntnis verdeutlicht, dass der Unterschied zwischen MCMV-suszeptiblen BALB/c-Mäusen und MCMV-resistenten C57BL/6-Mäusen durch eine schwache NK-

1. Einleitung

Zell-Antwort der BALB/c-Mäuse bedingt ist (Scalzo, 2002). Eine Aktivierung von NK-Zellen findet durch das Verschieben der Balance von aktivierenden und inhibierenden Signalen statt, einmal aktivierte NK-Zellen lösen in den jeweiligen Zielzellen Apoptose aus. Das für die MCMV-Resistenz verantwortliche Allel der C57BL/6-Mäuse liegt innerhalb des NK-Lokus und wird als *Cmv1*-Region bezeichnet. Das dominante (*Cmv1^R*)-Allel kodiert für den aktivierenden NK-Zell-Rezeptor Ly49H (Brown *et al.*, 2001; Daniels *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2001). Der Ligand für den Ly49H-Rezeptor ist das virale Genprodukt des m157 ORFs, welches auf der Oberfläche von MCMV-infizierten Zellen präsentiert und durch NK-Zellen erkannt wird, und somit das Auslösen der Apoptose in diesen Zellen ermöglicht (Arase *et al.*, 2002). Die Bedeutung von NK-Zellen für die Kontrolle einer MCMV-Infektion wird weiterhin dadurch unterstrichen, dass drei virale Gene identifiziert wurden, welche die Expression von je einem Liganden für den aktivierenden NK-Zell-Rezeptor NKG2D in infizierten Zellen verhindern (Hasan *et al.*, 2005; Krmpotic *et al.*, 2002; Krmpotic *et al.*, 2005; Lodoen *et al.*, 2004).

Zu einem späteren Zeitpunkt der Infektion ist die adaptive Immunantwort von entscheidender Bedeutung, die in erster Linie durch CD8⁺ cytotoxische T-Zellen vermittelt wird. Diese Zellen tragen T-Zell-Rezeptoren auf der Zelloberfläche, welche an MHC I-Moleküle des passenden Haplotyps binden können und jeweils für ein auf diesen MHC I-Molekülen präsentiertes Peptid spezifisch sind. Die auf allen Körperzellen vorhandenen MHC I-Moleküle präsentieren Peptide der in der Zelle produzierten Proteine, zu denen im Falle einer Virusinfektion auch virale Peptide zählen. Erfolgt eine Bindung durch eine CD8⁺ cytotoxische T-Zelle, die einen für das präsentierte virale Peptid spezifischen T-Zell-Rezeptor trägt, wird sie aktiviert und führt den Tod der betreffenden Zelle herbei. CD4⁺ T-Zellen hingegen erkennen auf MHC II-Molekülen präsentierte Peptide auf Makrophagen, dendritischen Zellen oder den antikörper produzierenden B-Zellen. Auch hier führt eine Übereinstimmung des T-Zell-Rezeptors zu einer Aktivierung der Makrophagen (durch T_H1-Zellen) oder der B-Zellen (durch T_H2-Zellen). CD4⁺ T-Zellen sind somit für die Regulierung der zellulären oder humoralen Immunantwort wichtig.

Die Bedeutung der einzelnen T-Zell-Populationen für die Kontrolle der Infektion kann untersucht werden, indem die Zellen der adaptiven Immunantwort durch γ -Bestrahlung der Mäuse entfernt und die Mäuse mit CMV infiziert werden. Danach werden verschiedene, reine Populationen von T-Zellen aus CMV-infizierten Spendertieren isoliert und in die bestrahlten Mäuse transferiert (adoptiver Transfer). Eine Population

aus CD4⁺ T-Zellen vermittelt in einem solchen Versuch keine Immunität, während die CD8⁺ cytotoxischen T-Zellen zur Kontrolle der Infektion in der Lage sind (Reddehase *et al.*, 1985; Reddehase *et al.*, 1988). Die CD8⁺ T-Zellen sind zum großen Teil für Peptide der Genprodukte von m123 (IE1-Peptid) und m164 spezifisch, können die Virusreplikation und Schäden in den Geweben eindämmen und immunsupprimierte Empfängertiere so vor dem sonst tödlichen Verlauf der Infektion bewahren (Holtappels *et al.*, 2001; Holtappels *et al.*, 2002). Im Laufe der Infektion bilden sich aus den IE1-spezifischen CD8⁺ T-Zellen CD8⁺ Memory T-Zellen, die in den lymphatischen Geweben während der latenten Phase der Infektion nachgewiesen werden können und nach Transfer ebenfalls in der Lage sind, eine CMV-Infektion zu kontrollieren (Holtappels *et al.*, 2000; Podlech *et al.*, 2000). Ferner wird vermutet, dass sie während der latenten Phase regelmäßig wieder resensitiviert werden und für die Kontrolle des Virus verantwortlich sind (Holtappels *et al.*, 2002; Kurz and Reddehase, 1999).

Ein anderes Bild ergibt sich, wenn die CD8⁺T-Zellen *in vivo* durch Depletion entfernt werden. In diesem Falle sind die verbleibenden Zellen dennoch in der Lage, die CMV-Infektion zu kontrollieren (Jonjic *et al.*, 1990). Folglich sind in diesen Mäusen die verbleibenden Populationen in der Lage, den Verlust zu kompensieren. Das sich in diesen Mäusen bildende Antikörperspektrum unterscheidet sich von dem in Gegenwart der CD8⁺ T-Zellen ausgebildeten. Antikörper selbst sind für die Terminierung einer Primärinfektion nicht essentiell, spielen jedoch eine Rolle bei der Kontrolle einer Reaktivierung (Lucin *et al.*, 1994).

1.3 Die Mutagenese des Maus-Cytomegalievirus als Basis für die Identifikation von viralen Genen

Die Cytomegalieviren gehören zu den viralen Pathogenen mit der höchsten Kodierungskapazität. Die Sequenzierung des HCMV-Laborstamms AD169 zeigt, dass das Virusgenom aus 229354 Basenpaaren besteht und für etwa 200 Genprodukte kodiert (Chee *et al.*, 1990). Das Maus-Cytomegalievirus besteht aus 230278 Basenpaaren und es wurden 170 offene Leserahmen (ORF) vorhergesagt (Rawlinson *et al.*, 1996). Ein Vergleich der beiden Genome miteinander zeigt auf, dass für 78 der im zentralen Bereich von HCMV kodierten ORFs ein homologes Gen bei MCMV existiert. Viele dieser Gene kodieren für Proteine, die für die Replikation oder Verpackung des Virus in Zellkultur essentiell sind. An den Termini des MCMV-Genoms befinden sich Gene, zu denen kein homologes Gen bei HCMV oder anderen Herpesviren identifiziert

1. Einleitung

werden konnte, und die meist nicht essentiell sind. Die beiden Genome werden als Karten dargestellt, in der die vorhergesagten offenen Leserahmen auf beiden Strängen fortlaufend nummeriert werden (Abb.1). Für das Maus-Cytomegalievirus wird mit Hilfe des Indikators „M“ angegeben, ob für den ORF ein homologes Gen beim HCMV-Virus nachgewiesen wurde. Ist dies der Fall, wird das M als Großbuchstabe dargestellt, ist dies nicht der Fall, wird es als Kleinbuchstabe dargestellt.

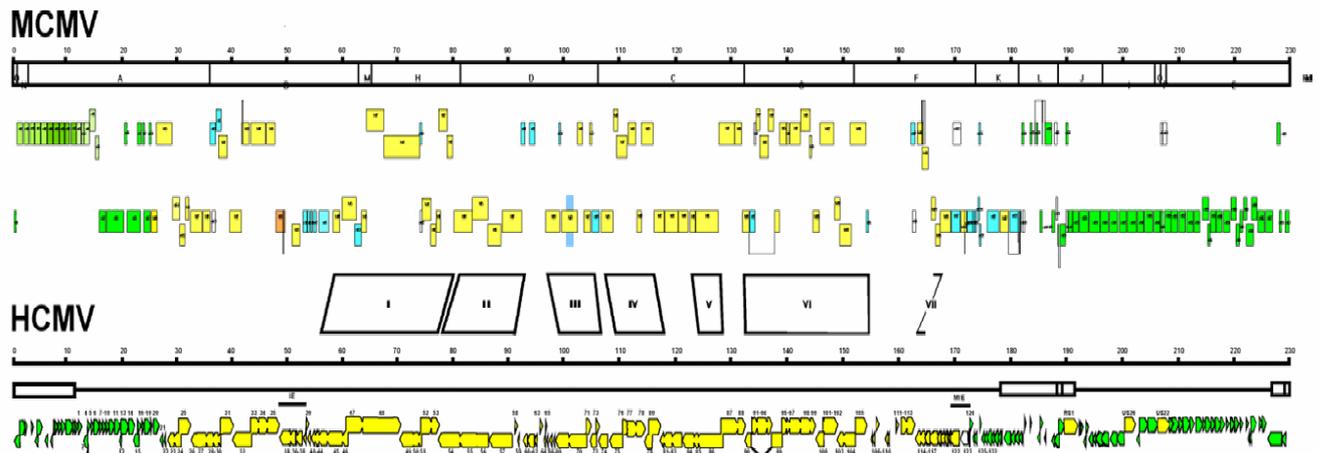


Abb. 1: Vorhergesagte ORFs des HCMV- (unten) und MCMV-Genoms (oben) und Darstellung der homologen Bereiche

Für MCMV sind die vorhergesagten ORFs mit Leserichtung von links nach rechts in der oberen Reihe dargestellt und diejenigen mit Leserichtung von rechts nach links in der unteren Reihe. Bei dem HCMV-Genom ist die Leserichtung der ORFs durch die Pfeile angegeben. Die grünen ORFs im MCMV-Genom kennzeichnen Genfamilien (z.B. die m02-Genfamilie links und die m144-Genfamilie im rechten Teil). Gelbe ORFs beider Genome weisen eine Homologie zueinander auf. Die mit den Zahlen I bis VII durchnummerierten Rauten markieren konservierte Genblöcke. Die Genome sind in Abschnitte zu je 10 kbp unterteilt, für das MCMV-Genom wurde weiterhin die Unterteilung in HindIII-Fragmente vorgenommen, die dann nach ihrer Größe mit Buchstaben des Alphabets versehen sind.

Über die Expression oder gar Funktion vieler der vorhergesagten ORFs ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt wenig bekannt. Einige Rückschlüsse können durch eine vorhandene Homologie mit Genen bekannter Funktion von HCMV oder anderen Vertretern der Herpesvirusfamilie gezogen werden. Weiterhin sind in manchen Fällen Proteindomänen oder Homologien vorhanden, die einen Anhaltspunkt auf die Funktion bieten. Einer großen Zahl von ORFs ist gegenwärtig jedoch keine Zuordnung einer Funktion möglich. Dies ist eine Aufgabe für die Forschung und für die Bearbeitung dieser Aufgabe ist die Möglichkeit zur gezielten Manipulation des CMV-Genoms eine Voraussetzung. Zunächst war eine Mutagenese des Virusgenoms nur mit Hilfe der ineffizienten homologen Rekombination in eukaryotischen Zellen möglich (Spaete *et al.*, 1987). Dies wurde durch die Klonierung des MCMV-Genoms als artifizielles

Bakterienchromosom (*Bacterial Artificial Chromosome*, BAC) durch Messerle et al. im Jahre 1997 stark erleichtert (Messerle *et al.*, 1997). Die BAC-Klonierung ermöglicht eine Vermehrung und Manipulation des als BAC vorliegenden MCMV-Genoms in *E.coli* mit Hilfe von molekularbiologischen Techniken. Als Mutagenesemethoden steht unter anderem die sogenannte ET-Mutagenese zur Verfügung, bei der die Rekombinationsenzyme des Bakteriophagen λ für eine homologe Rekombination genutzt werden. Die Transfektion der manipulierten BAC-Plasmide in permissive eukaryotische Zellen erlaubt die Herstellung von replikationsfähigen Viren. Eine Voraussetzung hierfür ist, dass keine essentiellen Gene von der Mutagenese beeinflusst wurden. Sollte dies der Fall sein, können die betroffenen Gene in einigen Fällen *in trans* in den Zellen zur Verfügung gestellt werden und so die Produktion von Viren ermöglichen (Brune *et al.*, 1999b).

Die Möglichkeit der Propagierung des MCMV-Genoms in *E.coli* und damit der Zugriff auf die breite Palette der molekularbiologischen Methoden hat die Identifizierung verschiedener viraler Gene ermöglicht, die bei der CMV-Pathogenese eine Rolle spielen.

1.4 Immunmodulation durch CMV

Eine Virusinfektion löst in den betroffenen Zellen eine Reihe von Abwehrmechanismen aus, welche die Replikation des Virus verhindern bzw. eindämmen. Diese Phase bedeutet aus der Sicht des Virus einen Wettlauf mit der Zeit, denn eine erfolgreiche Ausbreitung der Infektion ist nur möglich, wenn zumindest in einem gewissen Anteil der infizierten Zellen erfolgreich Virennachkommenschaft produziert und freigesetzt wird. Einige Viren haben eine sehr kurze Replikationsdauer und können so eine genügende Anzahl an Nachkommenviren produzieren, bevor die in der infizierten Zelle ausgelösten Prozesse ausreichend greifen. Andere Viren hingegen manipulieren die infizierten Zellen gezielt, um die eigene Vermehrung zu sichern.

Ein wirksamer, in infizierten Zellen ausgelöster Mechanismus, der die Produktion von Nachkommenviren eindämmt, ist der programmierte Zelltod der infizierten Zelle (Apoptose). Da das Cytomegalievirus als Vertreter der β -Herpesviren den für diese Gruppe typischen langen Replikationszyklus aufweist, ist es dafür besonders anfällig und eine Virusvermehrung ist nur mit Hilfe von verschiedenen antiapoptotischen viralen Genen möglich. Einige Genprodukte fungieren hierbei unmittelbar als Apoptoseinhibitoren, indem sie die bei der Apoptose ausgelöste Caspasekaskade

stören (Skaletskaya *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 1995). Andere virale Genprodukte verhindern das Auslösen der Apoptose durch Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems. Hierzu gehört das Unterbinden der Expression von aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren durch infizierte Zellen sowie die Inhibierung der Präsentation von Virusproteinen auf MHC I Molekülen, welches die Erkennung durch cytotoxische T-Zellen unterbindet.

Zu den aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren gehören die Proteine Ly49H und NKG2D. Während Ly49H an ein virales Protein (m157) bindet und von diesem aktiviert wird, bindet der Rezeptor NKG2D an drei verschiedene zelluläre Liganden: H60, *Murine UL-16 binding protein-like transcript -1* (MULT-1) und *retinoic acid early inducible gene 1* (RAE-1), deren Expression in den Zellen durch Stress induziert wird. Mittlerweile wurden drei verschiedene MCMV-Gene identifiziert, welche die Zelloberflächenexpression dieser Rezeptoren verhindern (MULT-1: m145, H60: m155, RAE-1: m152) (Krpmotic *et al.*, 2002; Krmpotic *et al.*, 2005; Lodoen *et al.*, 2004).

Für das Abtöten von virusinfizierten Zellen CD8+ Cytotoxische T-Zellen der adaptiven Immunantwort ist die Erkennung dieser Zellen anhand der auf MHC I präsentierten Peptide durch die CD8+T-Zellen notwendig, die durch mehrere MCMV-Gene gestört wird. Das Protein gp40, welches durch das MCMV-Gen m152 kodiert wird, bewirkt ein Zurückhalten der MHC I-Moleküle im ERGIC/cis-Golgi Kompartiment. Diese MHC I-Moleküle binden das β 2-Mikroglobulin, werden nicht mit Peptid beladen und zeigen eine verlängerte Halbwertszeit. Das virale Protein selbst wird jedoch in das endosomale/lysosomale Kompartiment transportiert und dort abgebaut (Ziegler *et al.*, 2000). Das Gen m152 hat demnach eine duale Funktion: einerseits die Zurückhaltung von MHC I im Endoplasmatischen Retikulum (ER) infizierter Zellen und andererseits verhindert es die Expression des NK-Zell-Rezeptors RAE-1. Das gp48/ m06 bindet die β 2-Mikroglobulin-assoziierten MHC I-Moleküle im ER. Der entstandene Komplex wird aus dem ER in endozytische Kompartimente transportiert und dort degradiert (Reusch *et al.*, 1999). Eine Interaktion mit auf der Zelloberfläche exprimiertem MHC I wurde für das virale Genprodukt gp34, welches vom m04-Gen kodiert wird, nachgewiesen (Kleijnen *et al.*, 1997). Das Protein beeinträchtigt eine Erkennung infizierter Zellen durch CD8+ T-Zellen, indem es die direkte Interaktion von MHC I mit dem T-Zell-Rezeptor verhindert.

Die Bindung von MHC I an die inhibierenden NK-Zell-Rezeptoren der Ly49-Familie ist ein sehr wichtiger Bestandteil und ein Fehlen von MHC I auf virusinfizierten oder

entarteten Zellen zieht gemäß der missing-self-Hypothese die Aktivierung von NK-Zellen nach sich (Ljunggren and Karre, 1985). Dies wird durch die Expression viralen Proteinen auf der Oberfläche von infizierten Zellen verhindert, die eine Homologie zum zellulären MHC I-Molekül aufweisen (Browne *et al.*, 1992; Farrell *et al.*, 1997)

1.5 Die Rolle von Antigen-präsentierenden Zellen bei der Initiation einer Immunantwort

Im Gegensatz zu den Zellen der angeborenen Immunantwort müssen die Zellen der adaptiven Immunantwort spezifisch aktiviert werden, um ihre Aufgaben erfüllen zu können. Diese Aktivierung wird durch professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APC) wie dendritische Zellen (DC) und Makrophagen vorgenommen und ermöglicht die Ausbildung eines für das jeweilige Pathogen spezifischen T-Zell-Repertoires.

Als professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APC) nehmen die dendritischen Zellen eine Schlüsselstellung bei der Initiation einer Immunantwort ein (Banchereau and Steinman, 1998). Um diese Aufgabe erfüllen zu können, halten sich unreife dendritische Zellen in peripheren Geweben wie der Haut, der Lunge und im Darm auf (Austyn, 1996; De Smedt *et al.*, 1996). Es können hierbei mehrere verschiedene, zum Teil gewebsspezifische DCs unterschieden werden (Shortman and Liu, 2002). Die wichtigste Differenzierung unterscheidet plasmazytoide DCs, die von lymphoiden Vorläuferzellen abstammen und myeloide DCs, die aus der myeloiden Reihe stammen. Im Falle einer Stimulierung durch Fremd-Antigene (konservierte pathogen-assoziierte molekulare Muster wie z.B. bakterielles Lipopolysaccharid) oder Gefahrensignale (von anderen Zellen des Organismus ausgeschüttete Zytokine), beginnen die DC mit ihrer Wanderung in den nächsten Lymphknoten (Janeway, Jr., 1989; Mailliard *et al.*, 2002; Reis e Sousa, 2004; Ruedl *et al.*, 1999). Während der Wanderung nehmen die DCs durch Endozytose Material aus der Umgebung auf, verstärken die Expression von Zelloberflächenmolekülen und beginnen, Zytokine auszuschütten. Diese Veränderungen sind notwendig, um bei der im Lymphknoten erfolgenden Interaktion der DC mit naiven T-Zellen eine Stimulation dieser T-Zellen zu erreichen. Diese Interaktion erfolgt über eine Reihe von Molekülen, die in der Abb. 2 dargestellt sind. Auf der Seite der dendritischen Zelle bindet der mit antigenem-Peptid beladene MHC-Komplex (MHC I oder MHC II) und das akzessorische Molekül CD4 oder CD8 mit dem T-Zell-Rezeptor/CD3-Komplex auf der naiven T-Zelle. Die Voraussetzung für eine längere Interaktion ist, dass der T-Zellrezeptor für das auf dem jeweiligen MHC-Komplex

präsentierte Peptid spezifisch ist. Eine nachhaltige Stimulierung der T-Zelle wird jedoch nur erreicht, wenn noch ein zweites Signal übermittelt wird. Dieses Signal wird ggf. durch die Bindung der kostimulatorischen Moleküle an ihre Rezeptoren ausgelöst

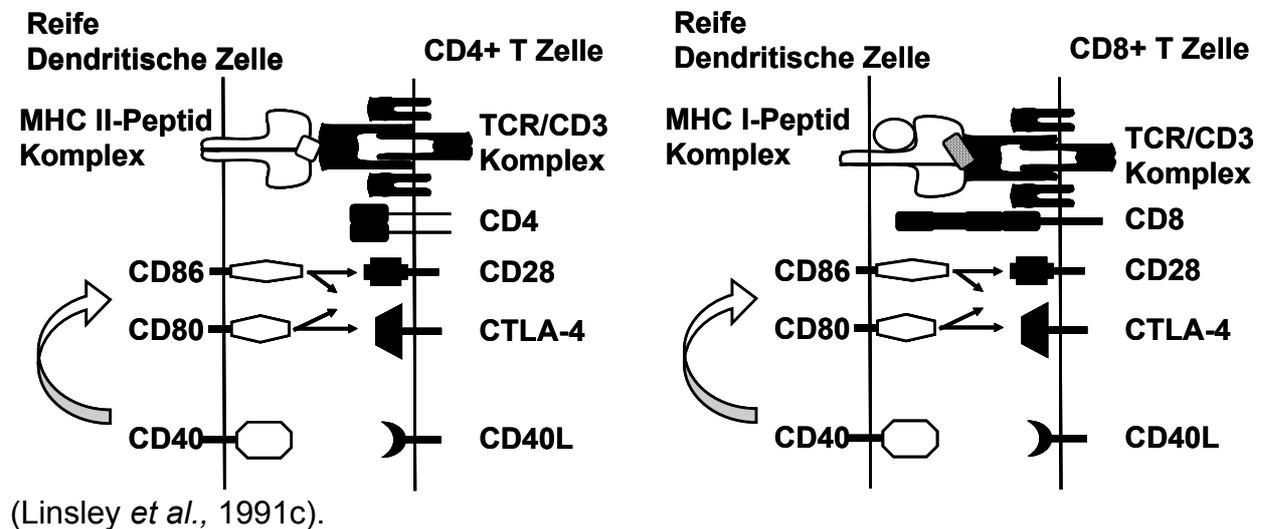


Abb. 2: Proteine auf der Oberfläche von reifen dendritischen Zellen und T-Zellen

Die erste Interaktion zwischen reifer dendritischer Zelle und T-Zelle erfolgt über den Peptid-MHC-Komplex und den T Zell-Rezeptor mit seinen akzessorischen Molekülen CD4 bzw. CD8. Weiterhin wird ein kostimulatorisches Signal über CD80 und CD86 auf die Rezeptoren CD28 und CTLA-4 übertragen. Die Expression der kostimulatorischen Moleküle wird durch die Bindung von CD40 durch den Liganden CD40L verstärkt. Der Rezeptor CD28 ist konstitutiv auf T-Zellen exprimiert, während die Expression von CTLA-4 erst einige Zeit nach Aktivierung der T-Zelle induziert wird.

Zu Beginn der Interaktion zwischen T-Zelle und DC wird das zweite Signal durch die Bindung des kostimulatorischen Moleküls CD86 an den Liganden CD28 erzeugt, beide Moleküle werden zu diesem Zeitpunkt in großer Menge exprimiert (Linsley *et al.*, 1991c). Die Expression von CD86 wird während der Reifung der DC schnell induziert und erreicht den Maximalwert 48 Stunden nach Stimulation, während der Rezeptor CD28 auf den T-Zellen konstitutiv exprimiert wird (Grewal *et al.*, 1995; Linsley *et al.*, 1991c; Schoenberger *et al.*, 1998; van der Merwe *et al.*, 1997). Die Interaktion induziert die Proliferation der T-Zelle, die Expression antiapoptotischer Gene und die Zytokinsekretion (Chambers *et al.*, 1999; Lenschow *et al.*, 1996; Orabona *et al.*, 2004). Im Laufe der Interaktion steigt die Menge des kostimulatorischen Moleküls CD80 an (Ikemizu *et al.*, 2000; van der Merwe *et al.*, 1997). Dieses Protein ist ebenfalls ein Ligand von CD28 und erreicht seine maximale Expression erst 4-5 Tage nach Stimulation der dendritischen Zelle. Weiterhin wird die Expression des zweiten

Rezeptors der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 induziert, das CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4) (Linsley *et al.*, 1991a; Linsley *et al.*, 1991b). Die Bindung von CTLA-4 dämmt die weitere Proliferation der T-Zellen und somit die Immunantwort ein (Krummel and Allison, 1995; Linsley *et al.*, 1994; Walunas *et al.*, 1994). Die Bedeutung dieser Immuninhibition wurde durch Versuche mit CTLA-4-Knockout Mäusen unterstrichen, in denen die Tiere tödliche lymphoproliferative Erkrankungen entwickelten (Tivol *et al.*, 1995). Falls das kostimulatorische Signal fehlt oder eine zu starkes koinhibitorisches Signal durch CTLA-4 vermittelt wird, wird in den T-Zellen ein Status der funktionellen Inaktivierung in Gegenwart des Antigens (Anergie) induziert (Bachmann *et al.*, 1997; Chai *et al.*, 1999). Das Auslösen des zweiten Signals durch CD80/CD86 und CD28/CTLA-4 spielt ferner eine sehr wichtige Rolle bei der Induktion von peripherer Toleranz und der Kontrolle von Immunantworten durch regulatorische T-Zellen (Dittmer *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2004).

Auf antigen-präsentierenden Zellen führt die Bindung des Rezeptormoleküls CD40 zu einer vermehrten Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 (Grewal *et al.*, 1995; Schoenberger *et al.*, 1998). Die Verabreichung von aktivierenden CD40-Antikörpern an Mäuse, bewirkt eine Stimulation von DCs, die dann in der Lage sind, eine wirkungsvolle Immunantwort gegen Tumore zu induzieren (van Mierlo *et al.*, 2004). Weiterhin wird CD40 unter anderem auf ruhenden B-Zellen exprimiert. Eine Bindung von CD40 auf diesen Zellen durch den CD40-Liganden auf TH₂ T-Helfer-Zellen führt zu einer Aktivierung der Zellen und ist für die Formierung von *Germinal Centers* sowie die Bildung und den Klassenwechsel von Antikörpern essentiell (Foy and Waldschmidt, 1993).

Die auf den Zellen des Immunsystems exprimierten Liganden und Rezeptoren bilden ein Signalnetzwerk, das optimal und sensitiv auf die unterschiedlichen Anforderungen reagiert, und Infektionen in den allermeisten Fällen kontrollieren kann. Einige Pathogene, darunter auch die Cytomegalieviren, greifen zur Sicherung des eigenen „Überlebens“ aktiv in dieses Signalnetzwerk ein und unterbinden bzw. verzögern möglicherweise die Ausprägung einer effektiven Immunantwort. Die Cytomegalieviren verhindern nicht nur, wie bereits unter 1.4 beschrieben, die Erkennung infizierter Zellen durch das Immunsystem, sondern sie greifen auch direkt in die Initiierung einer Immunantwort ein, indem sie die Zellen manipulieren, die die zentrale Schaltstelle der Immunantwort bilden: die dendritischen Zellen.

1.6 Die Manipulation von Antigen-präsentierenden Zellen durch Cytomegalieviren

Aufgrund ihrer essentiellen Funktion bei der Initiation einer Immunantwort sind Antigen-präsentierende Zellen ein potentielles Ziel für Manipulationen durch Viren. Für verschiedene Viren wie HIV, Masern und das Herpes Simplex Virus konnte dies bereits nachgewiesen werden (Fugier-Vivier *et al.*, 1997; Knight and Patterson, 1997; Salio *et al.*, 1999). Die Infektion von dendritischen Zellen der Maus und des Menschen durch Cytomegalieviren wurde erstmals in den Jahren 2001 und 2002 dokumentiert und die resultierenden Veränderungen untersucht (Andrews *et al.*, 2001; Mathys *et al.*, 2003; Moutaftsi *et al.*, 2002). Für die DCs beider Spezies wurde eine Herunterregulierung der Oberflächenmoleküle MHC Klasse I und II sowie der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 beobachtet, wobei der Effekt auf CD86 und MHC II in den humanen DCs schwach ausgeprägt war. Die Sekretion des Cytokins IL-12 ist in beiden Fällen vermindert und die Zugabe von Reifungsstimuli wie LPS hat keine vermehrte Expression der Zelloberflächenproteine zur Folge. Ferner wird die Expression von Chemokinrezeptoren blockiert, wodurch die DC an der Migration gehindert werden (Moutaftsi *et al.*, 2004). Eine HCMV-Infektion unterband ferner die Differenzierung von Monozyten in dendritische Zellen sowie eine Reifung der dendritischen Zellen der Haut (Langerhans-Zellen) unterbunden (Gredmark and Soderberg-Naucler, 2003; Hertel *et al.*, 2003). In reifen Langerhans-Zellen wurde, ähnlich wie bei reifen DC, eine Herunterregulierung von CD80, CD86 und MHC Klasse I und II beobachtet.

Die beschriebenen Beobachtungen werfen die Frage auf, ob die gravierenden phänotypischen Veränderungen der DC auch eine funktionelle Konsequenz haben. Eine Möglichkeit zur Analyse der Funktionalität von DC ist die Untersuchung der T-Zell-Stimulation in einem T-Zell-Stimulations-Assay. Hierfür werden dendritische Zellen eines Haplotyps mit T-Zellen eines anderen Haplotyps gemischt und die Proliferation der T-Zellen durch den Einbau von H^3 -Thymidin nachgewiesen. Die Gesamtheit von Peptid und MHC-Komplex eines anderen Haplotyps bewirkt eine ähnliche Stimulation, wie der Kontakt mit einem MHC-Komplex des gleichen Haplotyps, der ein Fremd-Antigen präsentiert. Folglich reagieren viele T-Zellen bei einem Kontakt mit DCs eines anderen Haplotyps mit Aktivierung und Wachstum. Für eine erfolgreiche Stimulation ist jedoch auch hier die Kostimulation und Sekretion von Cytokinen notwendig, die durch eine CMV-Infektion unterbunden wird. Während nicht-infizierte DC die Proliferation der T-Zellen induzierten, waren MCMV-infizierte DC dazu nicht in der Lage. Folglich führte

die Infektion von dendritischen Zellen mit CMV zu einer funktionellen Lähmung dieser Zellen, die ihre wichtigste Aufgabe, die Stimulierung von T-Zellen, nicht mehr ausführen konnten.

1.7 Zielstellung

Die durch Cytomegalieviren hervorgerufene Manipulation von infizierten Zellen ist vielfältig und hat weitreichende Konsequenzen. Sie bezieht sich einerseits auf die Zellen, in denen ein Großteil der Virusreplikation stattfindet und verhindert deren Eliminierung durch das Immunsystem. Andererseits wird jedoch auch in die Initiation der Immunantwort selbst eingegriffen, indem die hierfür essentiellen Antigen-präsentierenden Zellen in Mitleidenschaft gezogen werden. Eine MCMV-Infektion von Antigen-präsentierenden Zellen beeinträchtigt diese in der Ausführung ihrer wichtigsten Funktion: der Stimulation von T-Zellen. Ferner kann eine starke Reduktion der für die Interaktion von Antigen-präsentierenden Zellen mit T-Zellen wichtigen Moleküle wie kostimulatorische- und MHC-Proteine beobachtet werden, die direkt durch die MCMV-Infektion hervorgerufen wird. Zu Beginn der Arbeiten waren das Gen oder die Gene, welche mit der Expression der Zelloberflächenproteine interferieren, noch nicht bekannt. Ziel dieser Arbeit war daher die Identifizierung von viralen Genen, die die Expression von Zelloberflächenmolekülen in Antigen-präsentierenden Zellen reduzieren.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien und Lösungen

Chemikalien (soweit nicht anders angegeben)

Sigma (München), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt)

Geräte und Plastikmaterialien (soweit nicht anders angegeben)

Standard Laborprodukte. Für die Zentrifugation von Zellen wurde die Heraeus Megafuge 1,0R mit entsprechenden Einsätzen verwendet, die Zentrifugation von Eppendorf-Reaktionsgefäßen wurde mit der Eppendorf Centrifuge 5415 D oder 5415 R mit dem entsprechenden Rotor durchgeführt.

Enzyme (soweit nicht anders angegeben)

Roth (Karlsruhe), New England Biolabs (Frankfurt am Main)

Zellkulturmedien

Die Serenzusätze wurden vor Gebrauch für eine Stunde bei 65°C inaktiviert. Der Einsatz von Penicillin/Streptomycin erfolgte in einer Verdünnung von 1:100 der Stammlösung (Penicillin 10000 IE/ Streptomycin 10000µg/ml, Biochrom, Berlin)

DC2.4-Zellen (mit freundl. Genehmigung von Prof. Rock)

RPMI 1640-Medium (Biochrom, Berlin)

10% FCS (Foetales Kälberserum, Biochrom, Berlin)

Penicillin/Streptomycin

Monozyten-Makrophagenzelllinie RAW264.7 (ATCC TIB-71)

DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Sigma-Aldrich, München oder PAA, Pasching)

10% FCS (Foetales Kälberserum, Biochrom, Berlin)

Penicillin/Streptomycin

2. Material und Methoden

MEF (Embryonale Mausfibroblasten aus BALB/c-Mäusen)

DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Sigma-Aldrich, München oder PAA, Pasching)

10% FCS (Foetales Kälberserum, Biochrom, Berlin)

Penicillin/Streptomycin

NIH 3T3 (ATCC CRL-1658)

DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Sigma-Aldrich, München oder PAA, Pasching)

5% NCS (neugeborenen Kälberserum, Biochrom, Berlin)

Penicillin/Streptomycin

Lösungen

Benzonase-Puffer: 50mM TRIS-HCL pH 8.0/1mM MgCl₂/100µg/ml BSA

Blauer Probenpuffer: 200mM Tris pH 8,8; 0,5M Sucrose, 5mM EDTA; 0,1% Bromphenolblau

DNA-Probenpuffer: 50% Glycerin, 0,25% Bromphenolblaulösung, 10 mM EDTA

Minipräp-Lösung I: 50mM Tris-HCl pH 8,0; 10mM EDTA; 100µg/ml RNase A

Minipräp-Lösung II: 200mM NaOH; 1% SDS

Minipräp-Lösung III: 3M K Ac pH 5,5

Methylzellulose: 3,75g Carboxymethyl-cellulose, 5% FCS, 10% MEM, Penicillin/Streptomycin, 1% Glutamin (100x), 1% nicht-essentielle Aminosäuren (100x), 5% Natrium-Bicarbonat (7,5%)

MOPS-Puffer (10x, pH 7,0): 200mM MOPS, 50mM NaOAc; 10mM EDTA (pH8,0)

Proteinprobenpuffer: 83% blauer Probenpuffer, 0,3% SDS, 0,02% β-Mercaptoethanol

PBS: 137mM NaCl; 3 mM KCl, 8,5 mM Na₂HPO₂ 2H₂O; 1,5 mM KH₂PO₄

PBS-T: 1xPBS; 0,1 % Tween.

RNA-Gel: 0,6 g Agarose; 5ml 10x MOPS; 0.9 ml Formaldehydlösung, ad 50 ml DEPC-Wasser

RIPA-Puffer: 50mM Tris-HCl (pH7.4), 150mM NaCl, 1mM PMSF, 1mM EDTA, 5µg/ml Aprotinin, 5µg/ml Leupeptin, 1% Triton x-100, 1% Sodium Deoxycholat, 0,1% SDS.

RNA-Laufpuffer: 10% MOPS 10x, 2% Formaldehyd (37%ig), 88% DEPC-Wasser

2. Material und Methoden

RNA-Probenpuffer: 0,25 % Bromphenolblaulösung; 0,8 % 500mM EDTA; 7,2 % Formaldehyd (37%ig), 20 % Glycerol, 30% Formamid, 40% 10xMOPS-Puffer

RNA-Reinigungslösung: 0,3M NaOH, 5 mM EDTA

SDS-Probenpuffer (2x): 100 mM Tris, 25% Glycerol, 2% SDS, 0,01% Bromphenolblau, 10% β -Mercaptoethanol, pH 6,8

SEP-Puffer (2x): 0,75 M Tris (pH 8,8), 0,2% SDS

Spacerpuffer: 0,25 M Tris (pH6,8), 0,1% SDS

SSC-Puffer (10x, pH 7,2): 3 M NaCl; 300 mM Natriumcitrat

Standard Viruspuffer: 50mM Tris; 12mM KCl; 5mM EDTA

Sucroselösung (15%): 15% Sucrose (w/v), 10% Standard Viruspuffer

TAE-Puffer: 40mM Tris (pH 7,8), 0,5 mM Na-Acetat; 0,01mM 2Na EDTA.

TBE- Puffer: 90mM Tris- Borat, 2mM EDTA, pH 8,3

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0)

Towbin-Puffer: 25mM Tris-HCl, 150 mM Glyzerol, 20% Methanol

Western-Blot Laufpuffer: Tris-Glycin (Für 1L 10x Stammlösung 30,32g Tris; 144g Glycin); 0,1% SDS.

Denaturierende Polyacrylamid-Gele:

Sammelgel (5%): 2,5ml Spacerpuffer; 625 μ l 40% Acrylamid, 1,9ml Wasser; 5 μ l TEMED; 25 μ l APS.

Tabelle 1: Zusammensetzung von SDS-PAGE-Trenngelen

	8%	10%	12%	15%
2x SEP-Puffer	5	5	5	5
40% Acrylamid	2	2,5	3	4
Wasser	3	2,5	2	1
TEMED	7,5 μ l	7,5 μ l	7,5 μ l	7,5 μ l
APS 10%	40 μ l	40 μ l	40 μ l	40 μ l

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur und Viren

Zelllinien

Die Haltung der Zelllinien erfolgte in Flaschen (RAW264.7-Zellen) oder Zellkulturschalen (TPP-Schweiz; Falcon BD Biosciences, Heidelberg; Greiner Bio-one, Frickenhausen).

2. Material und Methoden

Die Zellen wurden in Standardinkubatoren bei 5%CO₂, 37°C und 95% Luftfeuchtigkeit gehalten. Die Abwesenheit von Mykoplasmen wurde in sämtlichen Zellkulturen regelmäßig mit Hilfe des ELISA-mykoplasma detection kit (Roche, Mannheim) geprüft.

Die Passagierung von semiadhärenten Zellen (DC2.4-Zellen und RAW164.7-Zellen) erfolgte bei DC2.4-Zellen alle 2-3 Tage im Verhältnis 1:3 und für die RAW264.7-Zellen alle 3 ½ Tage im Verhältnis 1:8. Hierfür wurde das Medium vollständig abgesaugt und die Zellen abgespatelt (RAW264.7-Zellen) bzw. mit der Pipette abgespritzt (DC), wie angegeben mit dem entsprechenden, vorgewärmten Medium verdünnt und auf neue Schalen bzw. Flaschen ausplattiert.

Die Passagierung der adhärenen Zellen (NIH 3T3 und MEF) erfolgte alle drei Tage, wobei MEF vor ihrer Verwendung nur 2-3x passagiert wurden. Hierfür wurde das Medium vollständig entfernt, die Zellen mit Zellkultur-PBS (Dulbecco, ohne Ca²⁺ und Mg²⁺, Biochrom, Berlin) gewaschen, für ca. 2 min Trypsiniert (Gibco-BRL), in neuem Medium resuspendiert und entsprechend verdünnt auf neue Schalen ausplattiert.

Transfektion von Eukaryotischen Zellen mit BAC-Plasmiden

Für die Herstellung von Viren aus BAC-Plasmiden wurden diese in die Zelllinie NIH 3T3 elektroporiert. Es wurden 10⁶ im Wachstum befindliche Zellen pro Elektroporation geerntet, mit PBS gewaschen, in 700µl Optimem resuspendiert und 2-3µg BAC-DNA in einer 4mm-Küvette bei Raumtemperatur mit dem Easyject Optima Elektroporator (Peqlab, Erlangen) bei 250 V und 1500 µF in die Zellen elektroporiert. Die Zellen wurden in vorgewärmtes Kultivierungsmedium gegeben, über Nacht inkubiert und ggf. am nächsten Tag passagiert. Das Entstehen von Plaques und GFP-Expression von MCMV-GFP-Viren konnte nach 3-4 Tagen beobachtet werden.

Viruskultivierung

Die verwendeten Viren und Virusmutanten wurden aus dem MCMV-GFP-BAC pSM3fr-GFP hergestellt, der auf die Wildtypstämme Smith und K181 zurück geht und eine BAC-Insertion sowie ein eGFP-Gen trägt (Wagner *et al.*, 1999). In einigen Fällen kam auch der BAC pSM3fr zur Anwendung, der kein eGFP-Gen trägt.

Für die Herstellung von Virusstocks wurden MEF infiziert und der Überstand nach vollständiger Ablösung der Zellen abgenommen (5-8 Tage). Das Protokoll folgte im Wesentlichen dem bereits veröffentlichten Vorgehen (Brune *et al.*, 1999a). Der

2. Material und Methoden

Zellkulturüberstand wurde zum Entfernen der Zellbestandteile in 100ml-Nalgene-Becher gefüllt und bei 6000 rpm für 20min zentrifugiert (Beckman Coulter, Krefeld, Avanti J-25, Rotor JLA16.250). Der Überstand wurde in neue Becher gefüllt und die Viruspartikel drei Stunden bei 13000 rpm pelletiert. Nachdem das Viruspellet über Nacht bei 4°C in ca. 4ml Medium gelöst wurde, wurde es mit einem Douncer resuspendiert (B.Braun Größe S). Die Suspension wurde in SW28-Tubes (Beckman Coulter, Krefeld) über ein 15%iges Sucrosekissen geschichtet und eine Stunde bei 20000 rpm abzentrifugiert (Beckman Coulter, Krefeld, Optima L 90K Ultrazentrifuge). Der Überstand wurde entfernt, das Viruspellet in 15% Sucroselösung homogenisiert (200µl Sucroselösung je Überstand von einer 15-cm-Zellkulturschale), und in 100µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70°C. Der Titer der Virusstocks wurde mit Hilfe eines *Standard plaque assays* auf MEF bestimmt.

Standard Plaque assay

In einer 48-Well-Platte werden MEF ausgesät und inkubiert, bis sie ca. 70% konfluent sind. Von dem zu untersuchenden Virusstock wird eine Verdünnungsreihe angelegt, die in Triplikaten zu den Zellen zugegeben wird. Die Zellen werden bei 37°C eine Stunde im Brutschrank inkubiert und dann mit Methylzellulose überschichtet. Das Auszählen der Plaques erfolgt nach ca. 5-6 Tagen.

Infektion von Zellen

Die in 6-Well-Platten kultivierten Zellen wurden mit Virusstock mit definierter MOI (*Multiplicity of infection*) oder mit Zellkulturüberstand gewonnen aus der Kultur von durchinfizierten NIH 3T3 Zellen infiziert. Für die Ermittlung der MOI wurde der Virustiter auf die verwendete Anzahl Zellen umgerechnet. Für eine Zentrifugalinfection wurden die Platten bei 1700 rpm für 5 Minuten zentrifugiert, gedreht und für weitere 25 Minuten zentrifugiert.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

Verwendete Vektoren

Eine Tabelle mit den in dieser Arbeit verwendeten Vektoren ist im Anhang enthalten (Tabelle 2).

Bakterienkultur

Die BAC-Plasmide und sonstige Plasmide wurden in Bakterien des Stammes *E.coli* Dh10mB propagiert. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte soweit nicht anders angegeben bei 37°C in LB-Medium (Becton Dickinson, Heidelberg) oder auf LB-Agar-Platten (Becton Dickinson, Heidelberg). Die Antibiotika wurden für High-copy-Plasmide in der Konzentration Ampizillin 100µg/ml und Kanamycin 50µg/ml hinzugegeben (beides AppliChem, Darmstadt). Die Low-Copy-Plasmide (BACs ua) wurden mit 17µg/ml Chloramphenicol (Q Bio Gene, Darmstadt) und 30 µg/ml Kanamycin selektiert. Für die blau-weiß Selektion von Bakterien, die rekombinante pGEM-T-Plasmide oder das pBluescript-derivat pMUT37 tragen wurde zusätzlich X-Gal auf die Platten aufgetragen (20mg/ml).

Herstellung elektrokompenter *E. coli*

Kompetente *E. coli* DH 10B-Zellen wurden nach folgendem Protokoll hergestellt. Es wurde eine Bakterienkolonie in 5 ml LB-Medium mit den jeweiligen Antibiotika angeimpft und bei 30°C bzw. 37°C üN geschüttelt. Am nächsten Tag wurden 200ml LB-Medium, welches die jeweiligen Antibiotika enthielt, mit 1 ml der üN-Kultur angeimpft und für ca. 4 Stunden bei der jeweiligen Temperatur geschüttelt bis die OD 600 ca. 0,5 betrug. Dann wurden die Zellen 15min auf Eis inkubiert, pelletiert, zwei mal mit eiskaltem destilliertem Wasser gewaschen, einmal in eiskaltem 10%igem Glycerol (in dest.) gewaschen und schließlich das Zellpellet in einem Volumen 10%igem Glycerol resuspendiert und in 50µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Elektroporation von *E. coli*

Für die Elektroporation wurden die Elektrokompenten *E.coli*-Bakterien auf Eis aufgetaut und in eine eiskalte 2mm-Elektroporationsküvette (Peqlab, Erlangen) gegeben. Nach Zugabe der DNA (ca. 0,5 µg) wurde die Elektroporation im EasyjecT Optima elektroporator (Peqlab, Erlangen) bei 2500V und 15µF durchgeführt, warmes LB-Medium hinzugegeben und die Bakterien unter leichtem Schütteln für eine Stunde bei 30°C oder 37°C inkubiert. Anschließend wurden sie auf LB-Agar-Platten, die mit den jeweiligen Antibiotika versehen waren, ausplattiert und bei 30°C, 37°C oder 43°C üN inkubiert.

DNA-Isolierung aus Bakterien

Die Mini-Präparation von Plasmid-DNA erfolgte nach der Methode der Alkalischen Lyse (Birnboim and Doly, 1979). Für High-Copy-Plasmide wurden 1,5ml üN-Kultur verwendet und für Low-Copy-Plasmide 10 ml. Die Bakterien wurden in 200µl der Lösung I resuspendiert, 300µl Lösung II für 5min hinzugefügt und dann 300µl Lösung III hinzugefügt und für 5min auf Eis inkubiert. Nach 20min Zentrifugation bei 14000 rpm und 4°C wurde der Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die darin enthaltene DNA mit 0,7 Vol Isopropanol gefällt. Nach einer weiteren Zentrifugation von 20min bei 14000 rpm und 4°C wurde der Überstand abgegossen, das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in der jeweiligen Menge TE oder dest. Wasser resuspendiert.

Für die Midi-Präparationen von BAC-Plasmiden wurden 100ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika mit 1ml Bakterien-Übernachtskultur angeimpft und 16 Stunden bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Für die Midipräparation von High-Copy-Plasmiden wurde eine Bakterienkolonie zum Animpfen von 50ml LB-Medium mit den jeweiligen Antibiotika genutzt, wobei für die Präparation nur 30ml eingesetzt wurden. Die Präparation erfolgte unter Verwendung des Midi-Kits (Nucleobond AX 100, Macherey Nagel, Düren) nach Herstellerangaben. Die Bestimmung der DNA-Konzentration und Reinheit erfolgte mit dem Photometer bei 260 und 280 nm.

DNA-Isolierung aus Viren

Hierfür wurden NIH3T3 oder MEF-Zellen infiziert und der Überstand der durchinfizierten Zellen bei 2000 rpm 10min abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf SW41 Tubes (Beckman Coulter, Krefeld) überführt und die Viruspartikel in der Ultrazentrifuge (Beckman Coulter, Krefeld, Optima L 90K Ultrazentrifuge) eine Stunde bei 25000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt, das Pellet in 500µl Benzonase-Puffer resuspendiert, 100 Units Benzonase zugegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 20µl 0.5 M EDTA (pH 8.0) hinzugefügt, gemischt, 500µl 1% SDS hinzugefügt, gemischt und 40µl Proteinase K (20mg/ml) hinzugefügt und gemischt. Dieser Ansatz wurde zwei Stunden bei 56°C inkubiert und einer Phenol/Chloroform-Extraktion unterzogen. Nach der Zugabe von 2µl Glykogen (35mg/ml Stock) und 1/10 vol Na-acetat pH 5.2 wurde der Ansatz vermengt, 0.7 Vol

2. Material und Methoden

Isopropanol hinzugefügt und 30min bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 500µl 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100µl TE für zwei bis drei Stunden bei 37°C oder über Nacht bei 4°C gelöst. Es wurden ca. 1/8 des Volumens für eine Spaltung mit Restriktionsendonukleasen eingesetzt.

Phenol/Chloroform-Extraktion

Der zu extrahierenden wässrigen Lösung wird das gleiche Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) hinzugegeben und ca. zwei Minuten lang gemischt. Danach wird der Ansatz bei 14000 U bei 4°C für 20 Minuten zentrifugiert und die obere, wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt, ohne von der Interphase etwas mitzupipettieren.

RNA-Präparation

Die Isolation der cytoplasmatischen RNA aus RAW264.7-Zellen wurde 24h nach Infektion mit wtMCMV-GFP-Virus aus je 1×10^7 infizierten und mock-infizierten Zellen mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) gemäß dem Protokoll für die Isolation von cytoplasmatischer RNA aus tierischen Zellen durchgeführt. Die Konzentration der erhaltenen RNA wurde bei 260nm mit dem Photometer bestimmt. Eine Analyse der RNA-Qualität erfolgte mit Hilfe eines RNA-Gels. Hierbei wurde die Elektrophoresekammer vor Benutzung mit RNA-Reinigungslösung gespült. Die Zutaten für das RNA-Gel wurden gemischt und gekocht, bis die Agarose geschmolzen war. Nachdem die Lösung etwas abgekühlt war, wurden 0,9 ml Formaldehyd hinzugegeben und das Gel gegossen. Nach dem Erhärten des Gels wurde dieses 30min im RNA-Laufpuffer äquilibriert. 5µg RNA wurden mit RNA-Ladepuffer gemischt, 5min bei 65°C erwärmt, auf Eis abgekühlt und aufgetragen.

RT-PCR

Für die reverse Transkription mit dem Thermoscript RT-PCR-System (Invitrogen) wurden 2µg cytoplasmatische RNA eingesetzt. Die reverse Transkription wurde mit Random Hexamer-Primern gemäß Herstellerangaben durchgeführt.

Für die nachfolgende PCR-Reaktion wurde 1/10 des Produktes eingesetzt, als PCR-Programm wurde eine Touchdown-PCR genutzt. Das PCR-Produkt wurde auf einem Agarosegel aufgetrennt und die DNA-Fragmente mit Hilfe von Ethidium Bromidfärbung und UV-Licht sichtbar gemacht.

RACE-Analyse (*Rapid amplification of cDNA ends*)

Bei der Amplifizierung der 3' und 5'-Enden der mRNA wird die genaue Ausdehnung einer mRNA untersucht und somit die Transkriptionsstart- und Terminationspunkte ermittelt. Dies wurde mit Hilfe des 5'/3'RACE Kit, 2nd Generation (Roche) nach Herstellerangaben durchgeführt. Hierfür wurde die RNA zunächst dephosphoryliert und das mRNA-Cap entfernt. Diese RNA wurde von hier ausgehend für das 5'-RACE und das 3'-RACE separat behandelt.

Für die Amplifizierung des 5'-Endes wurde die cDNA-Synthese mit einem genspezifischen Primer durchgeführt. Im nächsten Schritt wurde an das 3'-Ende der RNA ein polyA-Schwanz synthetisiert, der die Spezifität der nachfolgenden Schritte erhöht. Mit Hilfe eines Oligo dT-Primers und des zweiten genspezifischen Primers wurde mit einem Touchdown-PCR-Programm ein PCR-Produkt generiert, mit dem Qiaquick PCR Purification Kit aufgereinigt, und in den pGEM-T Vektor kloniert.

Für die Amplifizierung des 3'-Endes wurde die cDNA-Synthese ebenfalls mit einem genspezifischen Primer durchgeführt. Anschließend wurde mit Hilfe eines Oligo dT-Primers und demselben genspezifischen Primer mit einem Touchdown-PCR-Programm ein PCR-Produkt hergestellt, mit dem QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt und in den pGEM-T Vektor kloniert (Promega, nach Herstellerangaben).

Northern Blot-Analysen

Für die Durchführung von Northern Blots wurden alle Geräte mit RNA-Reinigungslösung gereinigt. Auf einem 1-2%igen RNA-Gel wurden 5 µg cytoplasmatische RNA (Kontroll-RNA und Probe) sowie eine RNA-Leiter aufgetragen und das Gel unter Spannung gesetzt, bis die Proben 2/3 des Gels überbrückt. Die Spur mit der RNA-Leiter und einer Kontroll-RNA wurden abgeschnitten, mit Ethidiumbromid gefärbt und mit einem Lineal im UV-Licht fotografiert, um die Größen der detektierten Fragmente zuordnen zu können.

Für das Blotting der RNA wurde das Gel mit DEPC-Wasser gespült und 15 min geschwenkt. Danach wurde es in 50mM NaOH 10 min gewaschen und in 10x SSC 15 min neutralisiert. Das Blotting erfolgte UN mit einem Kapillarblot auf eine Nylonmembran (Hybond XL).

Für die Hybridisierung wurde die Nylonmembran mit 10xSSC gespült und mit Prähybridisierungslösung (Boeringer, Mannheim) 1h bei 65°C inkubiert. Die radioaktiven Sonden wurden mit Hilfe der DNA-labelling Beads (Amersham, Freiburg)

2. Material und Methoden

hergestellt, indem mit P^{32} radioaktiv markiertes dCTP zu der Klenov-Reaktion zugegeben wurde. Die Inkubation mit den Sonden erfolgte ∞ N bei 65°C. Dann wurden die Nylonmembranen folgendermaßen bei 65°C gewaschen: zwei mal für 10 min in 3xSSC 0,1% SDS. Zwei mal für 10 min in 1xSSC 0,1% SDS und zwei mal für 10 min in 0,3xSSC 0,1% SDS. Die Detektion des radioaktiven Signals erfolgte bei -80°C in einer Filmkassette mit Amplifying Screen mit einem BioMax MR-Film (Kodak, Stuttgart).

Restriktionsspaltung, Dephosphorylierung, Agarosegel-Elektrophorese und DNA-Elution

Die Ansätze für Restriktionsspaltungen erfolgten je nach Anwendung in 10-30 μ l Volumen. Die verwendeten Enzyme der Firmen MBI Fermentas oder Gibco BRL wurden gemäß den Herstellerangaben appliziert. Bei Kontrollverdaus von Minipräparationen wurde RNase zugesetzt. Zur Verhinderung der Selbstligation fand eine Dephosphorylierung der für Klonierungen vorgesehenen Vektoren statt. Hierzu wurde eine Inkubation mit 1 Unit alkalischer Phosphatase für eine Stunde bei RT durchgeführt (Calf intestinal alkaline phosphatase, MBI Fermentas). Die Inaktivierung der Enzyme erfolgte bei hitzeinaktivierbaren Enzymen nach Herstellerangaben im Heizblock. Falls die Enzyme nicht hitzeinaktivierbar waren, wurde die DNA mit einer Säule gereinigt (QIAquick PCR purification kit, Qiagen, gemäß Herstellerangaben).

Für die Agarosegele wurde eine Agarosekonzentration von 0.5% bis 2% verwendet. Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten mit einer Größe von bis zu 300Bp wurde die LMA-Agarose zu 1/3 mit Agarose gemischt. Die Färbung der Gele erfolgte mit Ethidiumbromid (1 μ g/ml). Als Laufpuffer für große Gele, die eine lange Laufzeit hatten wurde 1xTBE verwendet, für kleinere Gele oder LMA-Agarosegele wurde 1xTAE verwendet. Zu eluierende DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem Ultraclean 15-Kit (MoBio, Carlsbad, California, USA) gemäß den Herstellerangaben eluiert.

Um die Integrität von BAC-Plasmiden oder Plasmiden zu kontrollieren, wurden diese mit Restriktionsendonukleasen gespalten und mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese die Größe der entstandenen Fragmente kontrolliert.

Bei der Herstellung von Virusmutanten wurde die DNA der BAC-Minipräparation verdaut (1/2 der Präparation) und die für die Elektroporation der Fibroblasten verwendete BAC-Midipräparation ebenfalls. Aus den fertig gestellten Viren wurde mit Hilfe der Viruspräparation Virus-DNA isoliert und diese ebenfalls mit Hilfe von

2. Material und Methoden

Restriktionsendonukleasen gespalten. Für die Spaltung wurde ca. 1µg BAC-DNA mit 10U Enzym für drei Stunden gespalten. Die Agaroselektrophorese erfolgte in Peqlab-Kammern (Nr. 41-325) in einem 0,6-1,2%igen Agarosegel für 12-20 Stunden.

DNA-Ligation

Die DNA-Ligation erfolgte mit Hilfe des T4 DNA Ligaseenzym (MBI Fermentas). Die Ligation wurde entsprechend den Herstellerangaben über Nacht bei 18 °C durchgeführt. Für die Klonierung von PCR-Produkten wurden diese zuerst mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) gereinigt und dann mit dem pGEM-T Vektor System I (Promega) kloniert.

PCR an Viraler oder Plasmid-DNA

Für die PCR-Reaktionen wurden die Zutaten nach folgendem Schema zusammengefügt und dann in einem T1 Thermocycler (Bometra, Göttingen) eine PCR nach einem der folgenden Programme durchgeführt. Für die PCR-Reaktionen, deren Produkte für Klonierungen genutzt werden sollten, wurde die Pfu-Polymerase (Roche) verwendet, Nachweis- oder Orientierungs-PCR-Reaktionen wurden mit der Taq-Polymerase (Roche) gemäß Herstellerangaben durchgeführt.

PCR-Programm

Denaturierung des Templates

95°C 2–5 min

Syntheszyklen (20–40)

95°C 30 sec Denaturierung

40–65 °C 30 sec Primer-Annealing

72°C oder 75°C 30 sec–7 min DNA-Synthese

Nachsynthese

72–75 °C 10min

Touchdown-PCR

1. 95°C 10 min
2. 95°C 20 sek
3. 65 °C 45 sek (je Zyklus wird die Annealingtemperatur in Schritt drei um 1°C verringert)

4. 72 °C 30 sek (zurück zu Schritt zwei, 23 Zyklen)
5. 95°C 20 sek
6. 55°C 45 sek
7. 72°C 30 sek (zurück zu Schritt fünf, zehn Zyklen)
8. 72°C 5 min

Die Synthesezeiten richteten sich nach der Größe der erwarteten Produkte, die Synthesegeschwindigkeiten der genutzten Enzyme wurden hier als Grundlage für die Berechnungen genutzt (Taq-Polymerase 4 kbp/min; Pfu-Polymerase 2 kbp/min). Bei zu klonierenden PCR-Produkten wurde die Zyklenzahl so gering wie möglich gewählt, bei Nachweis-PCR-Reaktionen erfolgten 30 Syntheszyklen. Die Annealingtemperaturen der Primer wurden folgendermaßen ermittelt: für jede G+C-Base wurden 4°C gerechnet und für A+T-Basen 2°C je Base, höchstens jedoch 58-60°C.

Pipettierschema PCR-Reaktionen

Ca. 20 ng Template
2µl Primer 1 (10pm)
2µl Primer 2 (10pm)
5µl 10xPCR-Puffer
5µl DNTP's (je 50µM)
1 Unit Polymerase
ad 50 µl dest

Für PCR-Reaktionen, bei denen Virale oder BAC-DNA als Template genutzt wurde, wurden zusätzlich 2µl DMSO zum PCR-Ansatz gegeben. Von dem Template wurden ca. 100ng DNA eingesetzt.

Färbung von intrazellulären Proteinen mit fluoreszierenden Antikörpern

Am Tag vor der Aufarbeitung wurden die Zellen auf sterilisierten Deckgläschen ausgesät und ggf. infiziert. Bei der Aufarbeitung wurden die Zellen zuerst 3x mit PBS gewaschen und dann mit 3%igem Paraformaldehyd 20min fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde die Quenching-Lösung (20mM Glycin/ 50mM NH₄Cl) für 10min zugegeben und anschließend die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Fixierte Zellen wurden bei 4°C maximal 3 Tage gelagert. Die Permeabilisierung erfolgte bei

2. Material und Methoden

RAW264.7-Zellen mit 0,2% Triton-X 100 in PBS für 5 min und bei DC2.4-Zellen mit 0,4% Triton-X 100 in PBS für 5min. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Blockierung mit 2% Pferdeserum in PBS für 10 min. Die Inkubation mit den in 2% Pferdeserum verdünnten ersten Antikörpern erfolgte bei RT für 45min in der feuchten Kammer. Anschließend wurden die Zellen 4x je 5 min mit PBS gewaschen. Der in 2% Pferdeserum verdünnte zweite Antikörper wurde ebenfalls in der feuchten Kammer für 45 Minuten in Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläschen viermal je 5 Minuten mit PBS gewaschen und mit Aqua-Poly/Mount (Polysciences, Eppelheim) eingebettet. Die Lagerung erfolgte bei 4°C im Dunkeln.

Als Kontrollfärbungen wurden Zellen mit den zweiten Antikörpern inkubiert. Auf diese Weise wurde klar, dass der Ziege anti-Maus Antikörper von Molecular Probes eine Kreuzreaktivität aufwies. Der daraufhin verwendete kreuzabsorbierte Ziege anti-Maus Antikörper zeigte bei der verwendeten Verdünnung keine Kreuzreaktion. Die Verdünnungen sind im Anhang in Tabelle 3 aufgelistet. Zur Testung der Spezifität wurden die sekundären Antikörper mit primären Antikörpern inkubiert, gegen die die sekundären keine Spezifität aufwiesen. Ferner wurde eine eventuelle Kreuzreaktion mit nicht-infizierten Zellen untersucht.

Färbung von Zelloberflächenmolekülen mit fluoreszierenden Antikörpern

Am Tag vor der Aufarbeitung wurden die Zellen auf sterilisierten Deckgläschen Ausgesät und ggf. Infiziert. Bis nach der Fixierung der Zellen wurden alle Lösungen eiskalt angewendet und die Arbeiten wurden in der Kühlzelle bei 4°C durchgeführt.

Zuerst wurden die Zellen einmal mit eiskaltem, 2%igen Pferdeserum in PBS gewaschen. Die gemeinsame Inkubation mit den in 2% Pferdeserum verdünnten Antikörpern (erster und zweiter) erfolgte für 45min in der feuchten Kammer. Anschließend wurden die Zellen 4x je 5min mit PBS gewaschen und dann mit 3%igem Paraformaldehyd 20min fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde die Quenching-Lösung (20mM Glycin/ 50mM NH₄Cl) für 10 min zugegeben und anschließend die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Deckgläschen mit Aqua-Poly/Mount (Polysciences, Eppelheim) eingebettet. Die Lagerung erfolgte bei 4°C im Dunkeln.

Analyse von Immunfluoreszenzen

Die Analyse erfolgte mit Hilfe eines LSM510 META-Mikroskops (Zeiss, Jena), ausgestattet mit einem UV-Laser (351 und 364 nm) "Coherent" der Firma Enterprise (Taiwan), einem Argon-Laser (458, 477, 488, 513 nm) und zwei He/Ne-Lasern (543 und 633 nm). Die Schichtdicke der Analyse betrug zwischen 0,0µm und 1µm, das Objektiv war ein C-Apochromat 63X/1.2 W corr. Die Filtereinstellung für den Kanal 2 war ein Bandpassfilter 505-530 und für den Kanal 3 Bandpass 560-650. Die Anregung erfolgte mit einem 488nm-Laser.

Western Blot-Analysen

Für die Gewinnung von Lysaten für Western Blot Analysen wurden die Zellen in 6-Well Platten oder 10-er Schalen ausgesät und ggf. 24 Stunden vor der Aufarbeitung infiziert. Semiadhärente Zellen (RAW, DC) wurden 24 Stunden p.i. mit dem Überstand geerntet und die darin befindlichen Zellen bei 1300 rpm 3 min abzentrifugiert. Das Pellet und/oder die in dem Kulturgefäß befindlichen Zellen wurden mit 100-300µl Proteinprobenpuffer aufgenommen und resuspendiert. Die DNA wurde mit Hilfe einer Spritze geschert, die Probe 5 min gekocht und bei -20°C gelagert. Der RIPA-Puffer wurde vor dem Kochen mit 2x SDS/Probenpuffer versetzt.

Auftrennung der Proteine

Die SDS-PAGE-Gele wurden nach Rezept gegossen, die Gelkammer zusammengebaut und mit Laufpuffer gefüllt. Es wurden je 10-30µl Proben aufgetragen und die empfohlene Menge des Proteinmarkers (SDS-PAGE Broad range Proteinmarker 10µl, SDS-PAGE Kaleidoscope Prestained Proteinmarker 5µl, beide Biorad). Das Gel wurde bei 50 V laufen gelassen, bis die Proben die Grenze zwischen Sammelgel und Trenngel erreicht haben. Dann wurde die Spannung auf 100 V erhöht und das Gel bis zur gewünschten Auftrennung laufen gelassen.

Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran und Inkubation mit Antikörpern
Der Transfer erfolgt mit dem Bio-Rad semi dry blotter bei 15V für für 10-30 min auf eine PVDF-Membran (Hybond ECL, Amersham, Buckinghamshire, UK). Als Transferpuffer wurden die Roti-Blot Puffer A (Anode) und K (Kathode) gemäß Herstellerangaben (Roth, Karlsruhe) verwendet. Nach dem Transfer wurde die Anwesenheit von Proteinen auf der Membran durch eine Färbung mit Ponceau-Färbelösung (Fluka) kontrolliert.

2. Material und Methoden

Zum Blockieren wurde die Membran in Blocking-Lösung (ECL, mit NaNH_3) über Nacht bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Dann wurde der Filter 1x mit PBS-T gewaschen und mit dem ersten AK 1 ½ Stunden bei RT inkubiert. Dann wurde die Membran 2x mit PBS-T gespült sowie 1x 15min und 2x 5min mit PBS-T gewaschen. Der Sekundäre Antikörper wurde eine Stunde inkubiert. Die Membran wurde 2x mit PBS-T gespült, 1x 15 min und 4x 5 min gewaschen und das ECL-Western-Blot Färbesubstrat (Amersham, Buckinghamshire, UK) gemäß Herstellerangaben angewendet. Die Detektion des Signals erfolgte in einer Filmkassette mit einem BioMax MR-Film (Kodak, Stuttgart). Die Inkubationszeiten betragen zwischen 30 Sekunden und 10 Minuten.

2.3 Spezieller Methodenteil

RNA-Analysen

Für die Durchführung der RT-PCR wurden die im Anhang in der Tabelle 4 aufgelisteten Primer verwendet. Bei den RACE-Analysen zur Identifizierung des modB7-2-ORF kamen die folgenden Primer zur Anwendung. 5' RACE: Hierfür wurde als erster genspezifischer Primer der Primer Pr-AL 11 und als zweiter genspezifischer Primer der Primer Pr-AL 12 verwendet. Beim 3'RACE kam der genspezifische Primer m147/m148RT.rev zur Anwendung. Die Sequenzen der genannten Primer sind im Anhang in der Tabelle 5 aufgelistet. Für die Herstellung der Northern-Blot-Sonden wurden die in der Tabelle 6 aufgeführten Primer verwendet.

Western Blot-Analysen von modB7-2HA

Zur Gewinnung der Proben für die Analyse der Kinetik der Proteinexpression von modB7-2 und der Zugehörigkeit zur Proteinklasse wurde wie folgt verfahren. Für die Bestimmung der Immediate early Proteinklasse wurden 1×10^6 RAW264.7-Zellen 30min vor Infektion mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Cycloheximid (Sigma) inkubiert. Drei Stunden nach Infektion mit dem MCMV-GFPm147HA-Virus wurde das Cycloheximid durch waschen entfernt und dem Medium 2,5 $\mu\text{g/ml}$ Actinomycin D (Sigma) zugegeben. Nach einer weiteren Inkubation von 6 Stunden erfolgt die Probennahme. Für die Untersuchung auf Zugehörigkeit zur Klasse der späten Proteine wurden 1×10^6 RAW264.7-Zellen 30 min vor Infektion mit MCMV-GFPm147HA mit 250 $\mu\text{g/ml}$ Phosphono Acetic Acid (PAA, Sigma) inkubiert. Die Probennahme erfolgte 12 Stunden nach Infektion.

2. Material und Methoden

Für die Auftrennung von modB7-2 und modB7-2HA wurden 12%ige, denaturierende Polyacrylamid-Gele verwendet. Für den Proteinnachweis wurden die Antikörper in der folgenden Verdünnung verwendet: anti HA-Antikörper (Kaninchen, Sigma-Aldrich) 1:2000, Kaninchenantiserum gegen modB7-2 1:100. Als sekundärer Antikörper wurde der anti-Kaninchen-Antikörper von ECL bei einer Verdünnung von 1:4000 verwendet.

2.3.1 Herstellung von Virusmutanten

Herstellung von Virusmutanten mit der ET-Mutagenese

Die ET-Mutagenese basiert auf dem Prinzip der homologen Rekombination unter Nutzung der Rekombinationsproteine des Bakteriophagen λ . Hierfür wurden Sequenzen des CMV-Genoms an das 5'-Ende von Primern integriert, die direkt an die zu deletierenden Bereiche angrenzen (Abb. 3A, H1 und H2). Der 3'-Bereich der Primer wies eine Homologie zu einem als Template für die PCR-Reaktion (Polymerasekettenreaktion) genutzten Plasmid (Abbildung 3B) auf. Dieses kodiert ein Protein, das eine Antibiotikaresistenz vermittelt und ggf. auch zwei Flp-Rekombinase Erkennungsstellen (Flp recombinase recognition target sites, FRT). Die linearen DNA-Fragmente (Abb. 3C) wurden in *E.coli*-Bakterien eingebracht, die sowohl den MCMV-BAC als auch das pKD46-Plasmid enthalten, welches eine Ampicillinresistenz vermittelt und auf dem die Rekombinationsgene des Bakteriophagen λ (*red* α , $-\beta$ und $-\gamma$) kodiert sind (Datsenko and Wanner, 2000). Die Rekombinationsproteine des Bakteriophagen λ ermöglichen über die in den Primern enthaltenen, zum BAC homologen Sequenzen eine homologe Rekombination, die eine Insertion des Resistenzgens in den CMV-BAC zur Folge hatte (Abb. 3, D). Die in das CMV-Genom inserierten BAC-Sequenzen vermittelten gleichzeitig eine Chloramphenicol-Resistenz und auf diese Weise konnte eine Selektion auf die Anwesenheit des BAC's durch die Zugabe von Chloramphenicol zum Wachstumsmedium durchgeführt werden. Die Identifizierung der Bakterien, die einen rekombinanten BAC enthielten, war durch deren Antibiotikaresistenz möglich, die nun sowohl gegen Chloramphenicol als auch gegen ein weiteres Antibiotikum eine Resistenz aufwies. Die Transfektion der BAC-DNA in eukaryotische Zellen ermöglichte die Herstellung von Viren aus dem mutagenisierten BAC.

Im Laufe der Untersuchungen wurden weitere MCMV-Mutanten hergestellt, in denen das zwischen den FRT-Stellen liegende Antibiotikaresistenzgen entfernt wurde (Abb. 3 F). Hierfür wurde durch Elektroporation des pCP20-Plasmids, welches in den *E.coli*-Bakterien das Flp-Rekombinaseenzym zur Verfügung gestellt (Adler *et al.*, 2000;

2. Material und Methoden

Cherepanov and Wackernagel, 1995; Wagner *et al.*, 2002). Das erfolgreiche Entfernen des Resistenzgens konnte durch die Antibiotikasensitivität der Bakterien nachgewiesen werden. In diesem Fall blieb eine FRT-Stelle zurück, die für eine weitere Rekombination und damit eine ortsspezifische Integration von DNA-Sequenzen zur Verfügung stand (Abb. 3G und H). Hierfür wurden die Sequenzen, die in den CMV-BAC reinseriert werden sollten, in ein Plasmid kloniert, welches ein Antibiotikaresistenzgen und eine FRT-Erkennungsstelle trug. Das Plasmid wurde in *E.coli*-Bakterien transfiziert, die einen CMV-BAC mit FRT-Stelle und ein Plasmid, welches das FLP-Rekombinaseenzym kodiert, enthielten. Durch die FLP-Rekombinasereaktion wurde die Sequenz zwischen die FRT-Stellen in den CMV-BAC integriert, wodurch die Bakterien gegen das jeweilige Antibiotikum resistent wurden. Mit dieser Methode war es möglich, Bereiche des CMV-Genoms zu entfernen und gezielt Gene zu reintegrieren.

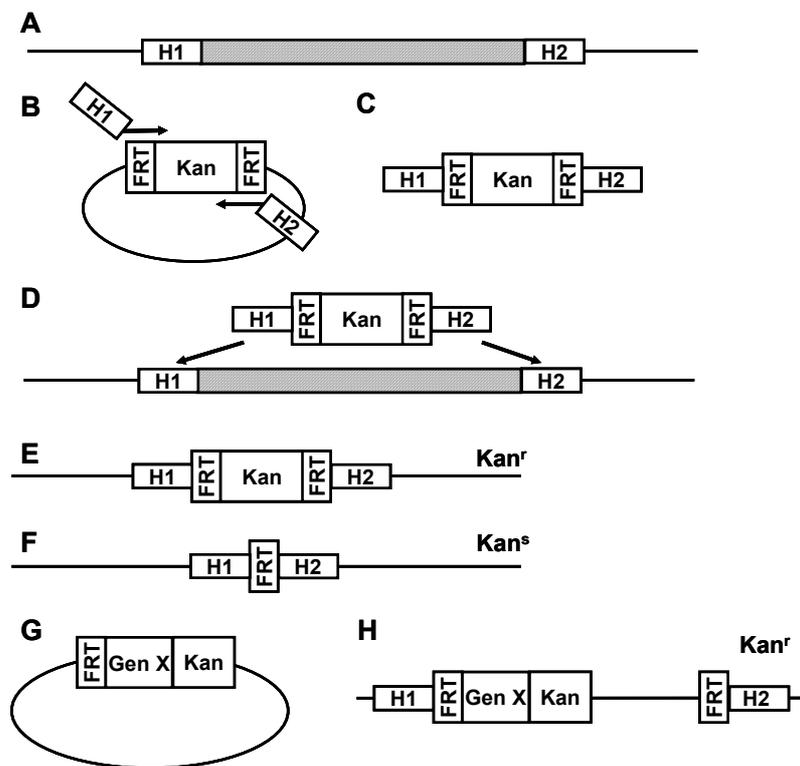


Abb. 3: Herstellung von MCMV-Mutanten mit der ET-Mutagenesemethode

Um die vorgesehene Deletion (schraffiertes Rechteck) im MCMV-Genom vorzunehmen, werden flankierende Sequenzen (H1 und H2) in Primer integriert (A). Mit den Primern wird eine PCR durchgeführt, bei der das pGP704-Kan-Plasmid als Template dient (B) und auf diese Weise ein PCR-Produkt mit einer Kanamycin-Resistenz, die von zwei zu Sequenzen im MCMV-Genom homologen Bereichen (H1 und H2) flankiert werden (C) hergestellt. Weiterhin befinden sich neben der Kanamycin-Resistenz FRT-Stellen. Das PCR-Produkt von C) wird in *E.coli*-Bakterien eingebracht, die den MCMV-BAC tragen und die Rekombinaseenzyme des Bakteriophagen λ exprimieren (D). In diesen Bakterien findet eine homologe Rekombination über die Bereiche H1 und H2 statt, die dazu führt, dass der schraffierte Bereich deletiert wird und stattdessen die Kanamycinkassette an dieser Stelle eingebaut wird. Folglich sind die Bakterien, die den resultierenden BAC tragen gegen das Antibiotikum Kanamycin

2. Material und Methoden

resistent (E). Das Exprimieren der FLP-Rekombinase in den Bakterien aus E) führt zu einer Rekombination zwischen den FRT-sites, wodurch die Kanamycin-Resistenz entfernt wird. Die Bakterien aus F) sind folglich wieder Kanamycin sensitiv. In auf diese Weise vorbereitete Bakterien kann das Plasmid Ori6K eingebracht werden (G), welches Sequenzen trägt, die an die Stelle der FRT-Stelle integriert werden sollen. Dies wird ebenfalls durch eine FLP-Rekombinasereaktion ermöglicht und vermittelt erneut Kanamycin-Resistenz für die Bakterien (H).

Herstellung von Mutanten mit großen Deletionen

Mit Hilfe der beschriebenen ET-Mutagenese wurden Mutanten hergestellt, die Deletionen von 4-23kb in verschiedenen Teilen des Genoms tragen. Die Tabelle 7 des Anhangs listet die für die Herstellung der Mutanten verwendeten Primer auf und in Tabelle 8 sind die deletierten Sequenzen und ORFs aufgeführt.

Für die weitergehenden Analysen wurden mit Hilfe der ET-Mutagenese MCMV-GFP-Mutanten hergestellt, in denen zunächst Gruppen von ORFs (Mutanten MCMV-GFP Δ 6S1, MCMV-GFP Δ 6S2 und MCMV-GFP Δ 6S3), einzelne ORFs entfernt und Insertionen in die ORFs m147, m148, m149 und m150 vorgenommen (Hierfür verwendete Primer siehe Anhang Tabelle 9 und Positionen der Deletionen im Anhang in Tabelle 10). Bei den letztgenannten Mutanten wurde das eingebrachte Kanamycin-Resistenzvermittelnde Gen entfernt (siehe Abb. 3 F).

Protokoll für die Durchführung einer ET-Mutagenese

Insertion des Kanamycinresistenzvermittelnden Gens

- Bakterien, die das MCMV-BAC-Plasmid enthalten wurden elektrokompent gemacht, das Plasmid pKD46 hinein elektroporiert und die Bakterien bei 30°C üN auf einer Chloramphenicol- und Ampicillinhaltigen Platte kultiviert.
- Von diesen Bakterien wurden unter den gleichen Selektionsbedingungen 200 ml LB-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 angezogen, mit 10% (w/v) frisch angesetzter Arabinose versetzt und eine Stunde geschüttelt. Von diesen Bakterien wurden erneut elektrokompente Zellen hergestellt
- In diese Zellen wurde das nach dem oben beschriebenen Prinzip hergestellte PCR-Produkt elektroporiert und die Zellen bei 30°C für eine Stunde geschüttelt
- Die Bakterien wurden auf Agarplatten ausgestrichen, die Chloramphenicol und Kanamycin enthalten und ü. N. bei 43°C inkubiert
- Die erhaltenen BACs wurden isoliert und mit Hilfe von DNA-Restriktionsverdau auf ihre Konstitution untersucht

Ausschneiden des Kanamycinresistenzvermittelnden Gens

- Bakterien, die den gewünschten BAC-Klon enthielten, wurden in Chloramphenicol- und Kanamycinhaltigem Medium angezogen und elektrokompent gemacht
- Dann wurden 2-5 ng pCP20 in diese Zellen elektroporiert und sie für eine Stunde bei 30°C geschüttelt
- Die Bakterien wurden auf chloramphenicolhaltige Platten ausgestrichen und ü. N. bei 43°C inkubiert
- Von den erhaltenen Kolonien wurde unter den gleichen Selektionsbedingungen ein Verdünnungsausstrich gemacht
- Die erhaltenen Einzelkolonien werden parallel auf Platten gepickt, die zum Einen nur Chloramphenicol und zum Anderen Chloramphenicol und Kanamycin enthielten. Die Inkubation erfolgte ü. N. bei 37°C
- Die BACs aus Kanamycin-sensitiven Bakterien wurden isoliert und mit Hilfe von DNA-Restriktionsverdau auf ihre Konstitution untersucht

Herstellung der $\Delta 6$ -Insertionsmutanten

Für die Insertion von Sequenzen in die $\Delta 6$ -Deletion wurde aus dem MCMV-GFP $\Delta 6$ -BAC die Kanamycin-Kassette entfernt und mit Hilfe der FLP-Rekombinasereaktion eine Sequenz reinseriert (Menard *et al.*, 2003). Hierfür wurde das zu inserierende Stück in den Ori6k-Vektor, der die FRT-sites und die Kan-Kassette enthält, kloniert.

Mit den in Tabelle 11 im Anhang angegebenen Primern wurde für die Klonierung der Plasmide eine PCR-Reaktion an DNA vom MCMV-GFP-BAC durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden gereinigt, in das Ori6K-Plasmid kloniert und sequenziert. Schließlich wurden die Plasmide aufgereinigt und in *E.coli*-Bakterien, die den MCMV-GFP $\Delta 6$ -BAC ohne Kanamycin-Resistenz-Kassette und das FLP-Rekombinaseenzym enthalten, elektroporiert. Die Insertion der klonierten Sequenzen in die Deletion $\Delta 6$ wurde wie unter der Beschreibung für die ET-Mutagenese (Abb. 3 G und H) angegeben durchgeführt. Die hergestellten Viren sind im Anhang unter Tabelle 12 zusammengefasst.

2. Material und Methoden

Protokoll für die Herstellung von Insertionsmutanten

- Bakterien mit einem mutagenisierten BAC aus dem das resistenzvermittelnde Gen entfernt wurde, wurden in Chloramphenicolhaltigem LB-Medium angezogen und elektrokompotent gemacht
- In diese Bakterien werden 2-5 ng pCP20 elektroporiert, die Zellen bei 30°C geschüttelt und schließlich ü. N. bei der gleichen Temperatur auf Agarplatten inkubiert, die Chloramphenicol und Ampicillin enthielten
- Diese Bakterien wurden unter den gleichen Selektionsbedingungen elektrokompotent gemacht, das vorbereitete Ori6K-Plasmid reinelektroporiert und bei 30°C für eine Stunde geschüttelt
- Die Zellen wurden auf eine Chloramphenicol- und Kanamycinhaltige Agarplatte ausplattiert und bei 43°C über Nacht inkubiert
- Aus den erhaltenen Bakterien wurde die DNA isoliert und die BACs mit Hilfe von DNA-Restriktionsverdau auf ihre Konstitution untersucht

Für die Klonierung der Plasmide der Tabelle 11 (Ori6Km147, Ori6Km148, Ori6Km149 und Ori6KAL1) wurden die Restriktionsschnittstellen von *Bam*HI und *Not*I verwendet. Die entstandenen Konstrukte enthalten einen unterschiedlich großen 5'-Bereich von 301bp (Ori6Km147), 232bp (Ori6Km148), 233bp (Ori6Km149) und 232bp (Ori6KAL1). Für die Klonierung des Ori6Km155MIEP-Plasmids wurde eine PCR-Reaktion mit den in Tabelle 11 angegebenen Primern durchgeführt, mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Not*I gespalten und in den ebenso gespaltenen Vektor Ori6kcDNA-MIEPpA kloniert.

Die Klonierung des Plasmids Ori6kcDNA-MIEPpA erfolgte folgendermaßen:

Die Grundlage bildete das Plasmid Ori6Km147, in das zunächst der MIEP-Promotor inkloniert wurde. Danach wurde der Mittelteil des Gens, in dem sich das Intron befindet, durch Sequenzen ohne Intron ersetzt. Als letztes wurde das endogene 3'-Ende des Gens eingefügt.

Für die Klonierung des MIEP-Promotors wurde eine PCR-Reaktion mit den Primern *Sac*I-MIEP.for (5'-gaggagctccgggggtcattagttcatagccca) und *Not*I-MIEP.rev (5'-gaggcggccgcccgcgtagcgttagcggatc) mit dem Plasmid pEGFP-C1 als Template durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde aufgereinigt, mit den Restriktionsendonukleasen *Not*I und *Sac*I gespalten und in den ebenso gespaltenen Vektor Ori6km147 kloniert.

2. Material und Methoden

Dann wurde der Mittelteil des Gens durch das cDNA-Fragment ersetzt, indem ein PCR-Produkt mit den Primern Not-mod(B7-2)s (5'-gaggcggccgctttggcaagctttccacctc) und RT11f.for (5'-aacacgccgataacgaag) mit den Restriktionsendonukleasen *NotI* und *SacII* gespalten und in den ebenso gespaltenen Vektor Ori6km147MIEP kloniert wurde. Als letztes wurde der 3'-Bereich des Gens erweitert, indem das bestehende *SacII/BamHI*-Fragment durch ein PCR-Fragment ersetzt wurde, welches mit den Primern Ori6Km148Bam.for (5'-atcggatcccacgtagcccacccaaagcgaga) und M147/m148RT.rev (5'-tggaataagatgcaacgaagac) gewonnen wurde.

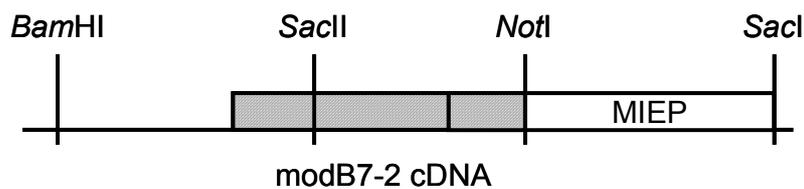


Abb. 4: Struktur des Plasmids Ori6kcDNA-MIEPpA

Die schraffierten Boxen stellen die cDNA von modB7-2 mit der Spleißstelle dar. Die leere Box stellt den MIEP-Promotor da, der an das 5'-Ende des modB7-2-Gens angefügt wurde. Die senkrechten Striche kennzeichnen die Lage der angegebenen Restriktionsschnittstellen.

Markierung von Virusproteinen mit einem Epitoptag

Für den Nachweis des Proteins modB7-2 im Western Blot wurden MCMV-Mutanten hergestellt, in denen ein die Sequenzen, die für ein HA-Epitoptag kodieren an das 3'-Ende der kodierenden Sequenz angefügt wurde. Dies erfolgte durch eine ET-Mutagenese bei der die Sequenz, die für das HA-Tag kodiert mit dem Mutageneseprimer vor dem Stopcodon in die Sequenz eingebracht wurde. Die verwendeten Primer sind in der Tabelle 13 im Anhang aufgeführt. Danach wurde die Kanamycin-Resistenz-Kassette entfernt und die Integrität des Virusgenoms durch Restriktionsspaltung und Sequenzierung untersucht.

Herstellung der Δ modB7-2-Mutante durch Shuttle-Mutagenese

Für die selektive Zerstörung des ModB7-2-ORFs wurde das Protokoll von Borst et al, 2004 angewendet (Borst *et al.*, 2004). Hierfür wurde zunächst die genomische Region des modB7-2 ORF (4,7 kbp *PstI*-Fragment, nt 204956 bis nt 209647) in ein pBluescript-Derivat kloniert, welches Erkennungsstellen für die Restriktionsendonukleasen *BamHI*, *PstI* und *SmaI* trug (pMut37-AL) (Rawlinson, 1996). Ein innerhalb des ORF lokalisiertes *KpnI*-Fragment (nt 207143 bis 207462) wurde ausgeschnitten und durch ein PCR-generiertes *KpnI*-Fragment ersetzt (Primer: Pr-AL17 und m147/m148 RT.rev, siehe

2. Material und Methoden

Anhang Tabelle 14). Der für diese PCR verwendete Primer Pr-AL17 enthielt die eingebrachten Mutationen (Kleinbuchstaben). Neben das einklonierte Fragment wurde in die *Sma*I-Restriktionsschnittstelle ein Tetrazyklin-resistenz-vermittelndes Gen einkloniert und das gesamte Fragment (4,7 kbp MCMV-sequenz und Tet-Gen) wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Pme*I ausgeschnitten und in einen ebenso geschnittenen pST76-KSR-Shuttlevektor einkloniert. Das resultierende Plasmid hieß pST76-KSR-AL1.

Für die Shuttle-Mutagenese des MCMV-GFP-BAC wurde zunächst mit ET-Mutagenese in die genomische Region von modB7-2 ein Tetrazyklin-resistenz-vermittelndes Gen eingebracht, welches dann durch Bereitstellung der FLP-Rekombinase wieder entfernt wurde (Primer siehe Anhang Tabelle 14). Die Zweischnitt-Mutagenese wurde in Abb. 5 skizziert. Durch die in den Ausgangs-BAC eingebrachte Deletion war eine Differenzierung zwischen Wildtyp-BAC und mutagenisiertem BAC durch Restriktionsanalyse möglich (Schritt D Abb. 5). Mit dieser Methode wurde die MCMV-Mutante MCMV-GFP Δ modB7-2 hergestellt.

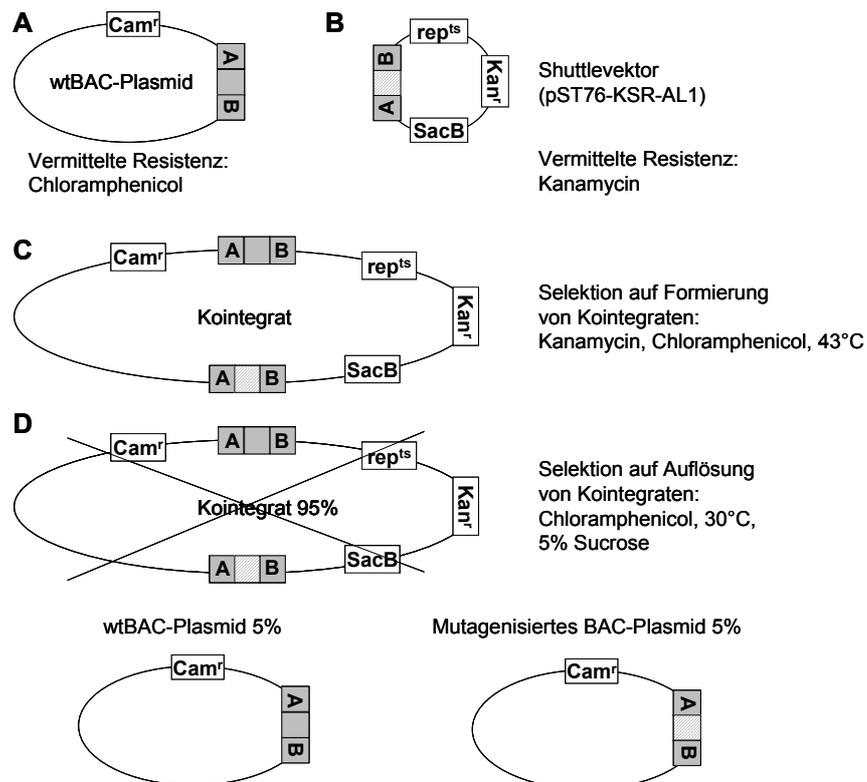


Abb. 5: BAC-Mutagenese mit der Zweischnitt-Shuttle-Mutagenesemethode

Bei der Zweischnitt-Shuttle-Mutagenese wurde der Bereich zwischen den Homologien A und B durch eine mutagenisierte Sequenz ersetzt, in diesem Fall durch eine Sequenz des modB7-2-Gens, in die Stopcodons eingefügt wurden. Hierfür wurde das Plasmid pST76-KSR-AL1, welches ein genomisches Fragment von MCMV (A und B) sowie die mutagenisierte Sequenz (schraffierte Box zwischen A und B)

2. Material und Methoden

enthält (B), in Bakterien elektroporiert, die das wt-BAC-Plasmid tragen (A). In diesem Fall wurde in dem Wildtyp-BAC zunächst eine Deletion in der Region von modB7-2 vorgenommen. Durch die Selektion mit Kanamycin, Chloramphenicol und die Inkubation bei 43°C können nur Bakterien wachsen, in denen ein Kointegrat von Plasmid A) und B) entstanden ist (C). Da das Plasmid pST76-KSR-AL1 bei 43°C nicht in der Lage ist, zu replizieren, geht es in Bakterien ohne Kointegrat verloren und diese sind nicht mehr in der Lage, auf kanamycinhaltigem LB-Agar zu wachsen. Im nächsten Schritt wird auf die Auflösung der Kointegrate selektiert, indem dem LB-Agar nur Chloramphenicol und Sucrose hinzugegeben wird. Die Bakterien, die noch Kointegrate enthalten, sind aufgrund des SacB-Gens vom Plasmid pST76-KSR-AL1 Sucrose-sensitiv und können nicht wachsen. Die Auflösung erfolgt über die homologen Bereiche A oder B und folglich entstehen sowohl das Ausgangs-BAC-Molekül als auch ein mutagenisiertes BAC-Molekül (D unten). Die Differenzierung zwischen den beiden Möglichkeiten erfolgt mit Hilfe von Restriktionsspaltung und Sequenzierung.

2.3.2 Die Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Für die Analyse von Zelloberflächenproteinen mit der Durchflusszytometrie (FACS) erfolgte zunächst eine Färbung dieser Zellen mit Fluoreszenzmarkierten Antikörpern nach dem folgenden Protokoll und dann die Einstellung der Parameter im Gerät sowie die Analyse der Proben. Für die Auswertung wurden die Ergebnisse mit der WinMDI-Software graphisch dargestellt.

Für die Färbung wurden die Zellen zunächst aus den Kulturgefäßen geerntet und pelletiert. Für das Ernten von 3T3-Zellen war eine Trypsinbehandlung der Zellen notwendig, RAW und DC wurden gespaltet und abpipettiert. Für FACS-Analysen von MCMV-infizierten Zellen wurden, soweit nicht anders angegeben, durch Zentrifugalinfection infizierte Zellen 24 h p.i. verwendet. Die gewonnenen Zellen wurden in PBS/2%FCS-Puffer mit 0,5 µg Fc-Block pro 1×10^6 Zellen bzw. 2% Horse Serum (HS) für 5min die unspezifischen Bindungsstellen blockiert. Die Bedingungen für die Blockierung wurden ausgetestet und das Blockieren mit Horse Serum erwies sich als ebenso effizient wie die Kombination aus BSA und Fc-Block. Für die Färbung wurden die Zellen auf eine 48-Well-Platte verteilt. Der erste Antikörper (0,5-1µg/ 1×10^6 Zellen) und ggf. der Sekundäre Antikörper bzw. das Streptavidin-Allophycocyanin (SAV-APC) Konjugat (0,5 µg/ 1×10^6 Zellen) wurde zu den Zellen gegeben und 20min lang bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen in PBS/2%FCS plus 2 µl Propidiumidodid (50mg/ml) pro 1×10^6 Zellen resuspendiert, auf die FACS-Röhrchen verteilt und mit Hilfe des Becton Dickinson FACS Calibur analysiert. Als Kontrollen für eine unspezifische Bindung des sekundären Antikörpers wurden die Zellen nur mit dem sekundären Antikörper gefärbt (infizierte und nicht-infizierte Zellen), um die Spezifität der primären Antikörper zu überprüfen wurden die Zellen mit einem Anti-IgG- Antikörper der jeweiligen Subklasse (Isotypkontrolle) plus sekundärem Antikörper gefärbt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der WinMDI-Software. Die Einstellungen der

2. Material und Methoden

Messparameter für die Analyse von RAW264.7-Zellen sind im Folgenden beispielhaft dargestellt:

In dem verwendeten Durchflusszytometer (FACS Calibur, Becton Dickinson) werden die Proben mit zwei Lasern (488 nm und 635 nm) angeregt und über eine Kombination von Filtern wird die Bestimmung von mehreren Parametern für jede Zelle in einer Messung ermöglicht. Diese Parameter sind:

Forwärtsstreuung (*Forward scatter*, FSC): Größe

Seitwärtsstreuung (*Sidescatter*, SSC): Granularität

FL1: Emission von 530 nm (grün: FITC, GFP)

FL2: Emission von 585 nm (orange: PE)

FL3: Emission von 670 nm (rot/orange: Propidium Iodid)

FL4: Emission von 661 nm (rot: APC)

Um die Zellen von eventuellen Verunreinigungen wie im Kultivierungsmedium enthaltene Proteinaggregate abzutrennen, wurde die Population der Zellen in einem FSC/SSC-Dot Plot so eingestellt, dass die Hauptpopulation im linken unteren Drittel zu liegen kam. Das Gate wurde dann um diese Hauptpopulation herum gelegt und definierte somit die Zellpopulation, die die jeweilig Vorwärts- und Seitwärtsstreuung (Größe und Granularität) aufwiesen und in die Auswertung eingingen.

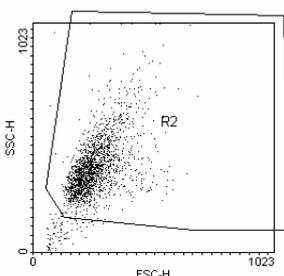


Abb. 6: Definition der Zellpopulation und Einstellung des Gates für Vorwärts- und Seitwärtsstreuung

Die Einstellung des Durchflusszytometers wird so vorgenommen, dass die Hauptpopulation in der Forwärtsstreuung (FSC, *Forward Scatter*) und der Seitwärtsstreuung (SSC, *Sidescatter*) im unteren linken Drittel des Dot Plots zu liegen kommt.

Die Färbung der Zellen mit Propidium Iodid (2 μ l einer 50 μ g/ml-Lösung für 1×10^6 Zellen) ist nur bei toten Zellen positiv, lebende Zellen mit einer intakten Zellwand werden nicht angefärbt. Bei der Analyse der Rotfärbung (FL3) konnten die toten Zellen anhand ihrer Rotfärbung identifiziert und abgegrenzt werden. Dies wurde in dem untenstehenden Histogramm dargestellt.

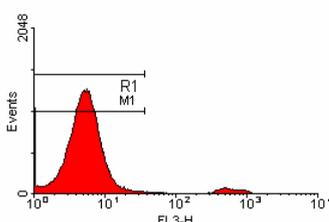


Abb. 7: Identifizierung von toten Zellen

Die lebenden Zellen werden mit Hilfe eines Gates im Histogramm der Roten Fluoreszenz FL3 abgegrenzt in der die PI-Färbung dargestellt wird. Tote Zellen sind hierbei rot angefärbt und können mit Hilfe des Gates markiert werden.

2. Material und Methoden

Durch die Region R1 wurde die Hauptpopulation der Zellen markiert, die in diesem Fall nicht rot gefärbt und somit vital ist. Die so definierte Population konnte in den folgenden Auswertungen selektiv betrachtet werden und somit gingen tote Zellen nicht mit in die Analysen ein.

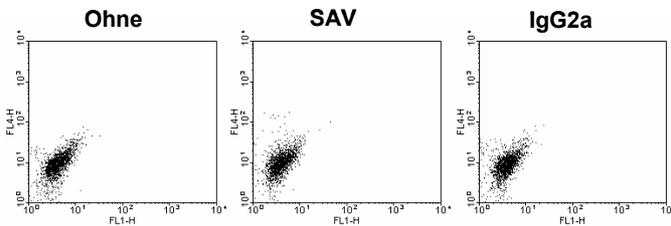


Abb. 8: Identifizierung von unspezifischen Färbungen

Die Zellen werden mit dem sekundären Farbstoff SAV-APC (Mitte) oder einem Isotypkontrollantikörper (IgG2a) und dem sekundären Farbstoff gefärbt (rechts).

Um die unspezifische Bindung des sekundären Antikörpers bzw. der primären Antikörper untersuchen zu können, wurden die RAW264.7-Zellen mit SAV-APC und IgG2a plus SAV-APC gefärbt. Auf die im Folgenden dargestellten Dot Blots wurden die Gates 1 und 2 (FSC/SSC und lebend/tot) angewendet. Die Populationen wiesen keine Fluoreszenz im Kanal FL4, was auf eine mangelnde Bindung des sekundären Farbstoffs und des Isotypkontrollantikörper zurückging.

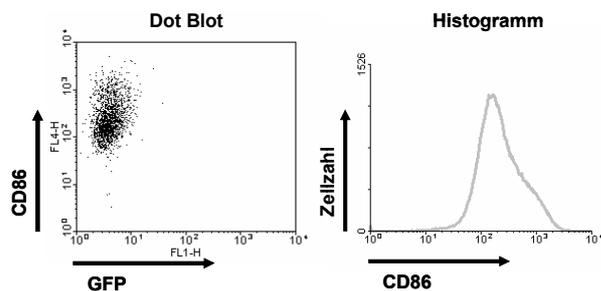


Abb. 9: Darstellung der Ergebnisse

In der linken Abbildung (Dot Blot) wurde die Emission von rotem Licht (FL4, Y-Achse) und grünem Licht (FL1, X-Achse) für jede einzelne Zelle dargestellt. Die rechte Abbildung stellt die Rotfluoreszenz (FL4) für die jeweilige Anzahl Zellen dar, die in diesem Fall die Färbung mit dem Anti-CD86-Antikörper repräsentiert.

dem Anti-CD86-Antikörper repräsentiert.

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt als FL1/FL4-Dot Blot oder als Histogramm. In beiden Fällen werden die Gates 1 und 2 (lebend/tot und FSC/SSC) angewandt und somit nur lebende Zellen der richtigen Größe dargestellt. Die FL4-Darstellung bezieht sich auf das jeweilige durch einen primären und einen sekundären Antikörper, der mit APC gekoppelt war, visualisierte Protein (in diesem Fall CD86). FL1 stellte die grüne Fluoreszenz dar, bei den Untersuchungen in dieser Arbeit handelt es sich hierbei meist um die GFP-Expression von virusinfizierten Zellen.

Für die Unterscheidung von infizierten und nicht-infizierten Zellen wurde ein weiteres Gate in den FL1/FL4-Dot Blot gelegt, das GFP-positive Zellen einschloss. Dieses Gate für die Unterscheidung von GFP-positiven und GFP-negativen Zellen wurde so gelegt,

2. Material und Methoden

dass die nicht-infizierte Population außerhalb des Gates lag. Für die Darstellung im Histogramm wurden zunächst die beiden Gates 1 und 2 zur Abgrenzung von toten Zellen und Zelltrümmern festgelegt mit „NOT“ angewendet, dementsprechend wurden die FL1-positiven und damit GFP positiven Zellen von dieser Darstellung ausgenommen. Die so abgegrenzte Population wurde als schwarze Kurve dargestellt. Die GFP-positiven Zellen wurden als Gate 1 und 2 positiv und dann durch ein „AND“ für Gate 3 ausgewählt. Jetzt wurden alle Zellen die lebend und der Größe dementsprechend sind und GFP-positiv sind dargestellt. Die so ausgewählte Population wurde als grüne Kurve über die schwarze Kurve gelegt.

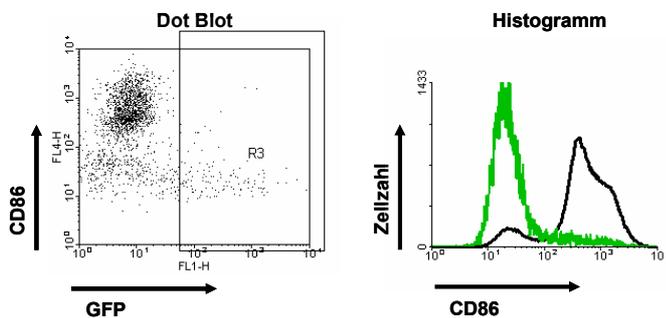


Abb. 10: Unterscheidung von GFP-positiven und GFP-negativen Zellen

In der linken Abbildung (Dot Blot) wurde die Grün- und Rotfluoreszenz der dargestellten Zellen verglichen. Das rechte Histogramm stellt eine getrennte Analyse der beiden Populationen des linken Dot Blots dar. Die Rotfluoreszenz des Kanals 4 (in diesem Fall die Färbung mit Anti-CD86-Antikörpern) wurde für zwei verschiedene Populationen

dargestellt. Die schwarze Kurve stellt die Zellen dar, die nicht innerhalb der Region R3 liegen (Grün/GFP-negativ) und die graue Kurve stellt die Zellen dar, die innerhalb der Region R3 liegen und somit GFP-positiv sind. Die Höhe der Kurve richtet sich nach der Anzahl der Zellen, die die jeweilige Fluoreszenz aufweisen.

Für die Durchführung der FACS-Analysen, die die Kinetik der Reduktion von Zelloberflächenproteinen durch MCMV-Infektion untersucht (Ergebnisteil 4, Abb. 40), wurden 2×10^6 RAW264.7-Zellen mit einer MOI 1 in Abständen von einer Stunde infiziert und bis zu einer Maximaldauer von 10 Stunden bei 37°C inkubiert. Eine weitere Probe wurde am Abend vor der Untersuchung infiziert und wies folglich eine Infektionsdauer von 24 Stunden auf. Die Färbung der Zellen erfolgte gemeinsam auf Eis.

Die Analyse der Auswirkung von Cycloheximid auf die Expression von Zelloberflächenmolekülen erfolgte durch Zugabe von $100\mu\text{g/ml}$ Cycloheximid zu je 1×10^6 RAW264.7-Zellen für eine Dauer von neun Stunden. Bei der graphischen Darstellung im Ergebnisteil 4, Abb. 41 wurden lediglich die lebenden Zellen berücksichtigt.

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung eines Screeningsystems zur Identifizierung immunmodulatorischer Gene von MCMV

3.1.1 Vorversuche zur Etablierung eines Screeningsystems

Das Ziel dieser Untersuchungen war die Identifikation von immunmodulatorischen Genen des Maus-Cytomegalievirus. Für die Bearbeitung wurde eine genetische Strategie gewählt, die darauf basierte, dass die Infektion von Antigen-präsentierenden Zellen mit dem aus dem mit den BAC- und GFP-Insertionen versehenen Wildtypvirus (wtMCMV-GFP) zu einer Reduktion der Oberflächenexpression verschiedener Moleküle führt, die mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) nachgewiesen werden kann. Für die Identifikation der viralen Gene, die diese verminderte Expression hervorrufen, wurde eine Bibliothek von MCMV-Mutanten hergestellt, in denen große Bereiche des Genoms deletiert wurden. Unter diesen Mutanten sollten sich auch solche befinden, bei denen eines oder mehrere der für die Reduktion von bestimmten Zelloberflächenproteinen verantwortlichen Gene deletiert wurden. Eine Infektion der Antigen-präsentierenden Zellen mit einer solchen MCMV-Mutante sollte keine Reduktion des entsprechenden Zelloberflächenproteins nach sich ziehen. Dies ermöglichte die Identifikation des viralen Gens durch den Ausfall des Effektes in den mit dieser Mutante infizierten Zellen.

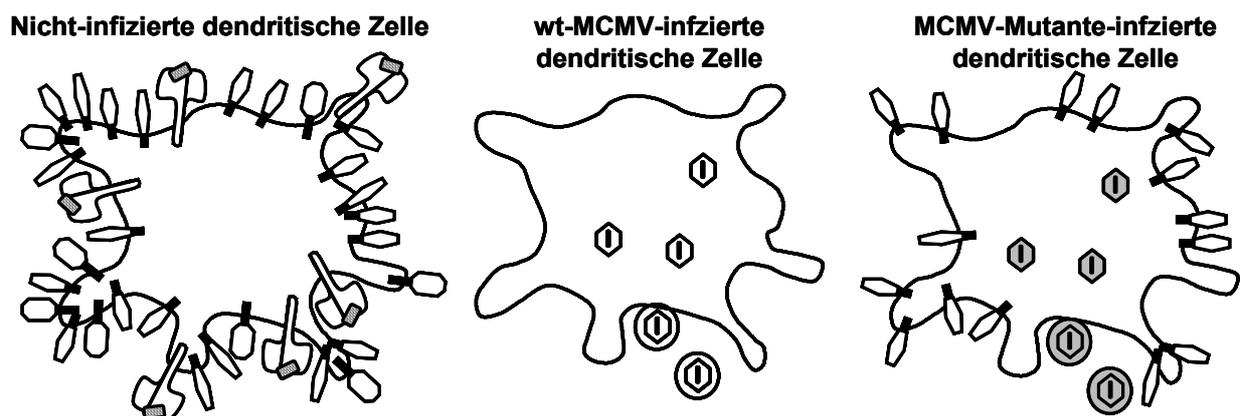


Abb. 11: Konzept: Einfluss von wtMCMV und MCMV-Mutanten auf reife dendritische Zellen

Nicht-infizierte reife dendritische Zellen exprimieren eine Vielzahl verschiedener Zelloberflächenmoleküle in großer Menge (links). Die Infektion dieser Zellen mit wt-MCMV-Virus (Ikosaeder) unterbindet diese Expression (Mitte). Eine Infektion mit mutanten MCMV-Viren (graue Ikosaeder) unterbindet die Expression eines bestimmten Zelloberflächenproteins nicht mehr, wenn das dafür verantwortliche Gen bei der Mutante inaktiviert ist (rechts).

3. Ergebnisse

Die als Analysemethode genutzte Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) ermöglichte die Quantifizierung von Zelloberflächenproteinen. Hierfür wurden Zellen mit Fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen ein Zelloberflächenprotein gefärbt, die proportional zu der Menge des jeweiligen Zelloberflächenproteins, welches als Antigen fungierte banden. Mit dem Durchflusszytometer wurde die Fluoreszenz für jede einzelne Zelle analysiert und graphisch dargestellt, wobei die Möglichkeit bestand, mehrere Fluoreszenzeigenschaften pro Zelle untersucht werden konnten. Eine Eigenschaft war die Expression von GFP, die ohne Antikörperfärbung durch die Infektion von Zellen mit einem MCMV-GFP-Virus hervorgerufen wurde und im Fluoreszenzkanal 1 (FL1) bei einer Emission von 530 nm gemessen wurde. Für die Färbung mit Antikörpern wurde der Kanal 4 verwendet (FL4), mit dem rote Fluoreszenz der Wellenlänge von 661 nm detektiert werden konnte. Die Ergebnisse konnten auf verschiedene Arten dargestellt werden, zum Beispiel als Dot Blot, bei dem zwei Fluoreszenzeigenschaften für jede einzelne Zelle, die als Punkt dargestellt wurde, verglichen wurden. Bei der Darstellung als Histogramm wurde eine Fluoreszenzeigenschaft in verschiedenen Zellpopulationen verglichen, die zuvor für die Auswertung definiert wurden, beispielsweise die Bindung eines Anti-CD86-Antikörpers an GFP-positive Zellen und GFP-negative Zellen. In beiden Fällen wurden die Messskalen der Fluoreszenzeinheiten logarithmisch dargestellt. In einem Dot Blot stellte jeder Punkt eine Zelle dar, der je nach der jeweiligen Fluoreszenz für die beiden betrachteten Parameter auf einer bestimmten Stelle der logarithmischen Skala lag. In dem Dot Blot der Abb. 12 lag die Hauptpopulation der Zellen im linken oberen Bereich. Auf der Y-Achse wurde die Rotfluoreszenz dargestellt; sie repräsentiert die Rotfärbung und somit die Bindung eines Anti-CD86-Antikörpers an die Zellen. Die Hauptpopulation der Zellen hatte den Antikörper gebunden, so dass diese eine Fluoreszenz von 10^3 im Kanal 4 aufwiesen. Auf der X-Achse wurde der Kanal 1 dargestellt, in dem die Grünfluoreszenz gemessen wurde. Die Zellpopulation wurde mit wtMCMV-GFP-Virus inkubiert, aber nur ein kleiner Teil der Zellen war tatsächlich infiziert und exprimierte GFP. Diese GFP-positiven Zellen wiesen eine Grünfluoreszenz im Kanal 4 von über $10^{1,5}$ auf, was anhand Rechtsverschiebung der Population auf der X-Achse erkennbar ist. Gleichzeitig wiesen diese Zellen eine geringe Rotfluoreszenz des Kanals 1 auf, für die meisten lag die Fluoreszenzintensität nur wenig höher als 10^1 und damit viel niedriger als die GFP-negative Hauptpopulation der Zellen. Die GFP-positiven Zellen exprimierten folglich weniger CD86 auf ihrer Zelloberfläche als die GFP-negativen Zellen. Ein direkter

3. Ergebnisse

Vergleich der FL-4 Rotfluoreszenzintensität der Zellen wurde im Histogramm der Abb. 12 vorgenommen. Die Position auf der X-Achse zeigte die Fluoreszenzintensität der jeweiligen Zellen und die Y-Achse die Anzahl der Zellen, welche die entsprechende Fluoreszenzintensität aufweisen. Die GFP-negative Population wurde als schwarze Linie dargestellt und die GFP-positive Population (die auf dem nebenstehenden Dot Blot innerhalb der Region 3 lag) als graue Linie. Dieser direkte Vergleich zeigte, dass die MCMV-infizierten, GFP-positiven Zellen eine um fast zwei Logstufen geringere Fluoreszenz im Kanal 4 aufwiesen als die GFP-negativen, nicht-infizierten Zellen der gleichen Kultur. Folglich exprimierten die infizierten Zellen signifikant weniger CD86 auf ihrer Zelloberfläche als die nicht-infizierten Zellen der gleichen Kultur.

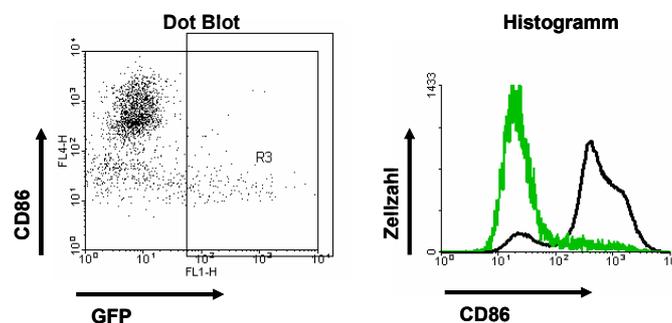


Abb. 12: Durchflusszytometrische (FACS) Analyse von wtMCMV-infizierten RAW-Zellen

Die Darstellung von FACS-Analysedaten als Dot Blot (links) beschreibt die Eigenschaft jeder als Punkt gezeigten Zelle in Bezug auf die zwei untersuchten Parameter. Auf der Y-Achse wurde die relative Fluoreszenz im FL-4-Kanals dargestellt, der die Fluoreszenz des Anti-CD86-Antikörpers quantifiziert. Auf der X-Achse wurde die Grünfluoreszenz dargestellt, die durch eine Expression von GFP in MCMV-GFP-infizierten Zellen hervorgerufen wird. Die Darstellung im Histogramm (rechts) ermöglichte den Vergleich von zwei Zellpopulationen, in diesem Fall der GFP-negativen Zellen (schwarze Kurve), die in dem Dot Blot außerhalb der Region 3 liegen und den GFP-positiven Zellen (graue Kurve), die in dem Dot Blot innerhalb der Region 3 liegen. Dargestellt ist die relative Fluoreszenz des Kanals 4 für diese beiden Populationen, die somit verglichen werden kann.

Neben der FACS-Analyse bietet auch die Färbung von fixierten Zellen die Möglichkeit, die An- oder Abwesenheit von Proteinen zu dokumentieren. Die in der Abb. 13 dokumentierten Zellen wurden 24 Stunden vor der Aufarbeitung mit wtMCMV-GFP infiziert und folglich exprimierten einige dieser Zellen GFP. Bei der Darstellung wurden nicht-infizierte, GFP-negative Zellen und infizierte, GFP-positive Zellen gemeinsam dokumentiert, die mit Antikörpern gegen CD40 und CD86 gefärbt wurden. Die Grünfärbung wurde auf dem rechten Bild ausgeblendet, um ggf. eine Überstrahlung der Rotfärbung zu vermeiden. Die Bilder dokumentieren die Abwesenheit der Proteine CD40 und CD86 auf der Oberfläche MCMV-infizierter APC.

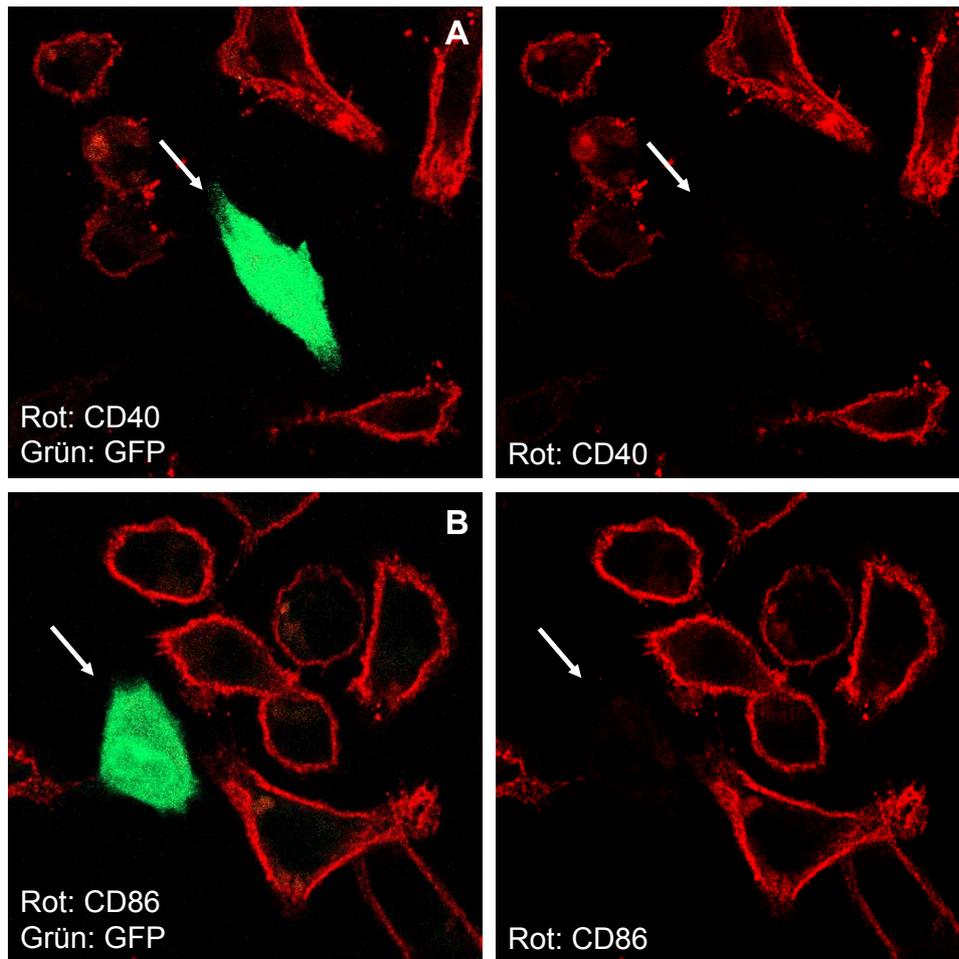


Abb. 13: Zelloberflächenfärbung von wt-MCMV-GFP-infizierten RAW-Zellen

Die Zellen wurden mit Anti-CD40 (A) und Anti-CD86-Antikörpern (B) rot gefärbt und GFP-positive und GFP-negative Zellen gemeinsam dokumentiert. Auf der linken Seite ist die Grünfärbung der GFP-positiven Zellen dargestellt und auf der rechten Seite wurde diese Fluoreszenz ausgeblendet.

Für die Bearbeitung der Fragestellung wurde die Monozyten/Makrophagenzelllinien RAW 264.7 genutzt. In der Abb. 14A wurde die Expression verschiedener Zelloberflächenmoleküle von Zellen einer vollkommen nicht-infizierten Kultur (graue Linien), von GFP-negativen, nicht-infizierten Zellen einer infizierten Kultur (schwarze Linien) und von GFP-positiven, infizierten Zellen der infizierten Kultur dargestellt. Im nicht-infizierten Zustand exprimierten die Zellen die MHC Moleküle der Klasse I und in geringerem Maße auch der Klasse II sowie die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 und das Protein CD40. Der Vergleich der nicht-infizierten Zellen mit den GFP-negativen Zellen der infizierten Kultur zeigte auf, dass die Expression von CD40, CD80, CD86 und MHC I auf den Zellen durch die Infektion stimuliert wurde, da die Fluoreszenzintensität der GFP-negativen Zellpopulation in für die verschiedenen Proteine unterschiedlich starkem Maße höher war, als die der nicht-infizierten Kultur.

3. Ergebnisse

Die GFP-positiven Zellen der infizierten Population zeigten eine geringere Fluoreszenzintensität gegenüber den GFP-negativen Zellen. Dies bedeutet, dass die Expression der verschiedenen Zelloberflächenmolekülen in infizierten Zellen gegenüber den nicht-infizierten Zellen und den GFP-negativen Zellen der infizierten Kultur reduziert war. Auch hier war für die verschiedenen Proteine ein unterschiedlich starkes Maß an Reduktion zu beobachten.

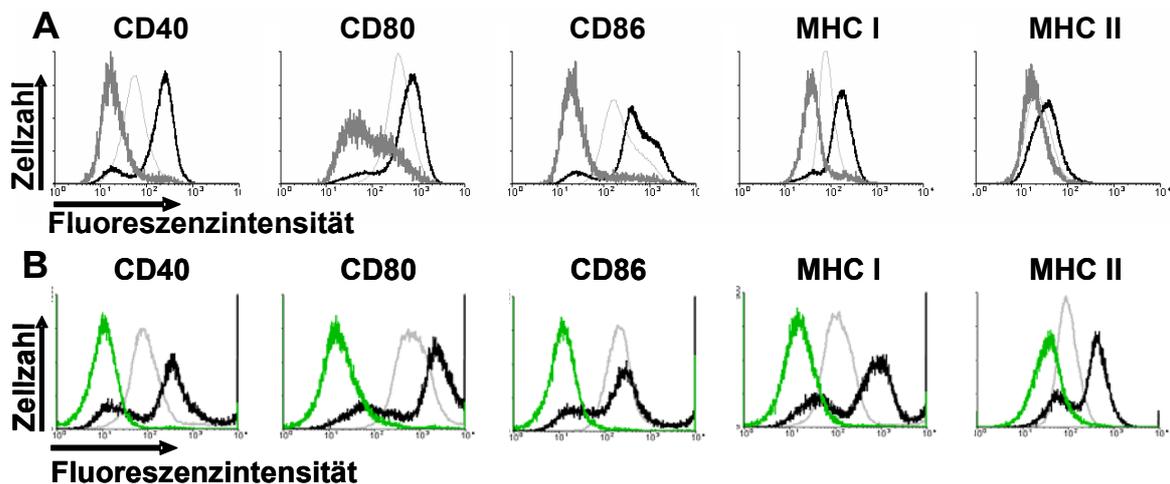


Abb. 14: Durchflusszytometrische Analyse der Expression von Zelloberflächenmolekülen auf nicht-infizierten und wtMCMV-GFP-infizierten RAW264.7 und DC2.4

Quantifizierung der Expression von CD40, den kostimulatorischen Molekülen CD80 und CD86 sowie MHC Klasse I und II auf wtMCMV-GFP-infizierten RAW264.7 (A) und DC 2.4 (B). Hellgraue Kurven: Nicht-infizierte Zellen, schwarze Kurven: GFP-negative Zellen der infizierten Population, dunkelgraue Kurven: GFP-positive Zellen der infizierten Population.

Die dendritische Zelllinie DC2.4 ist durch die Immortalisierung von Knochenmarkszellen mit Hilfe des Wachstums- und Differenzierungsfaktors GM-CSF sowie der *myc* und *raf* Onkogene entstanden (Shen *et al.*, 1997). Die Analyse der Zelloberflächenexpression verschiedener Proteine sowie der Effekt einer wtMCMV-GFP-Infektion auf die Proteinexpression auf DC2.4-Zellen ist in der Abb. 14 B dargestellt. Die starke Expression der verschiedenen Zelloberflächenmoleküle lässt darauf schließen, dass es sich um reife dendritische Zellen handelt. Auch diese Zelllinie war infizierbar und zeigte in unterschiedlich starkem Maße eine Reduktion der Zelloberflächenproteine nach Infektion mit wtMCMV-GFP.

Die Infektion von Zellen mit MCMV hat eine stimulierende Wirkung auf die APC, die durch die stärkere Expression von z.B. CD40, MHC I und MHC II auf den nicht-infizierten Zellen der infizierten Kultur im Vergleich zu vollständig nicht-infizierten Zellen

3. Ergebnisse

deutlich wird. Da eine zu starke Stimulation eventuell den Zelltod nach sich zieht, wurden die optimalen Infektionsbedingungen ausgetestet, unter denen möglichst viele Zellen infiziert werden, die Todesrate aber dennoch niedrig ist. Hierzu wurden RAW264.7-Zellen mit verschiedenen Infektionsdosen (Multiplicity of infection= MOI) des wtMCMV-GFP-Virus infiziert. Diese Untersuchungen zeigten, dass bei einer Infektionsdosis von größer als 2 infektiösen Einheiten pro Zelle die Expression der Zelloberflächenmoleküle (in diesem Fall CD86) auf den nicht-infizierten Zellen negativ beeinflusst wurde. Weiterhin stieg der Anteil toter Zellen rapide an, wodurch die Qualität der Untersuchungen negativ beeinflusst wurde (siehe Tabelle 15, Anhang). Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden deshalb Infektionsdosen von 1-2 infektiöser Einheiten/Zelle verwendet, da die Zellen in diesem Bereich eine optimale Vitalität und Expression der Proteine zeigten.

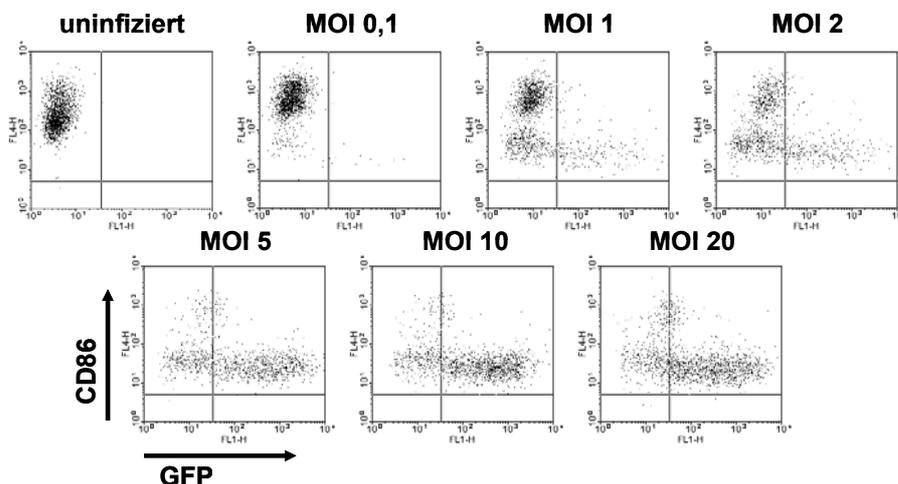


Abb. 15: Durchflusszytometrische Analyse von Zellen, die mit verschiedenen Virusdosen infiziert wurden

RAW264.7-Zellen wurden mit wtMCMV-GFP der angegebenen Menge infiziert. Die Zellen wurden mit einem Anti-CD86-Antikörper gefärbt und 24 Stunden p.i. im Durchflusszytometer analysiert

Für die Herstellung der MCMV-Mutanten wurde in den allermeisten Fällen der MCMV-GFP-BAC pSM3fr-GFP genutzt (Wagner *et al.*, 1999). Das eGFP-Gen führte zur Expression von eGFP in infizierten Zellen und ermöglichte deren Identifizierung anhand der Grünfärbung im Fluoreszenzlicht. Dies kann sowohl bei der Immunfluoreszenz als auch bei der Durchflusszytometrie genutzt werden, um infizierte (GFP-positive) von nicht-infizierten (GFP-negative) Zellen einer Kultur zu unterscheiden.

Für die ersten Untersuchungen wurden mit der ET-Mutagenese mehrere MCMV-Mutanten mit Deletionen von 4,3 kbp–23 kbp hergestellt (Beispiel in Abb. 16, schraffierte Rechtecke). Die Deletionen wurden an die Enden des linearen MCMV-

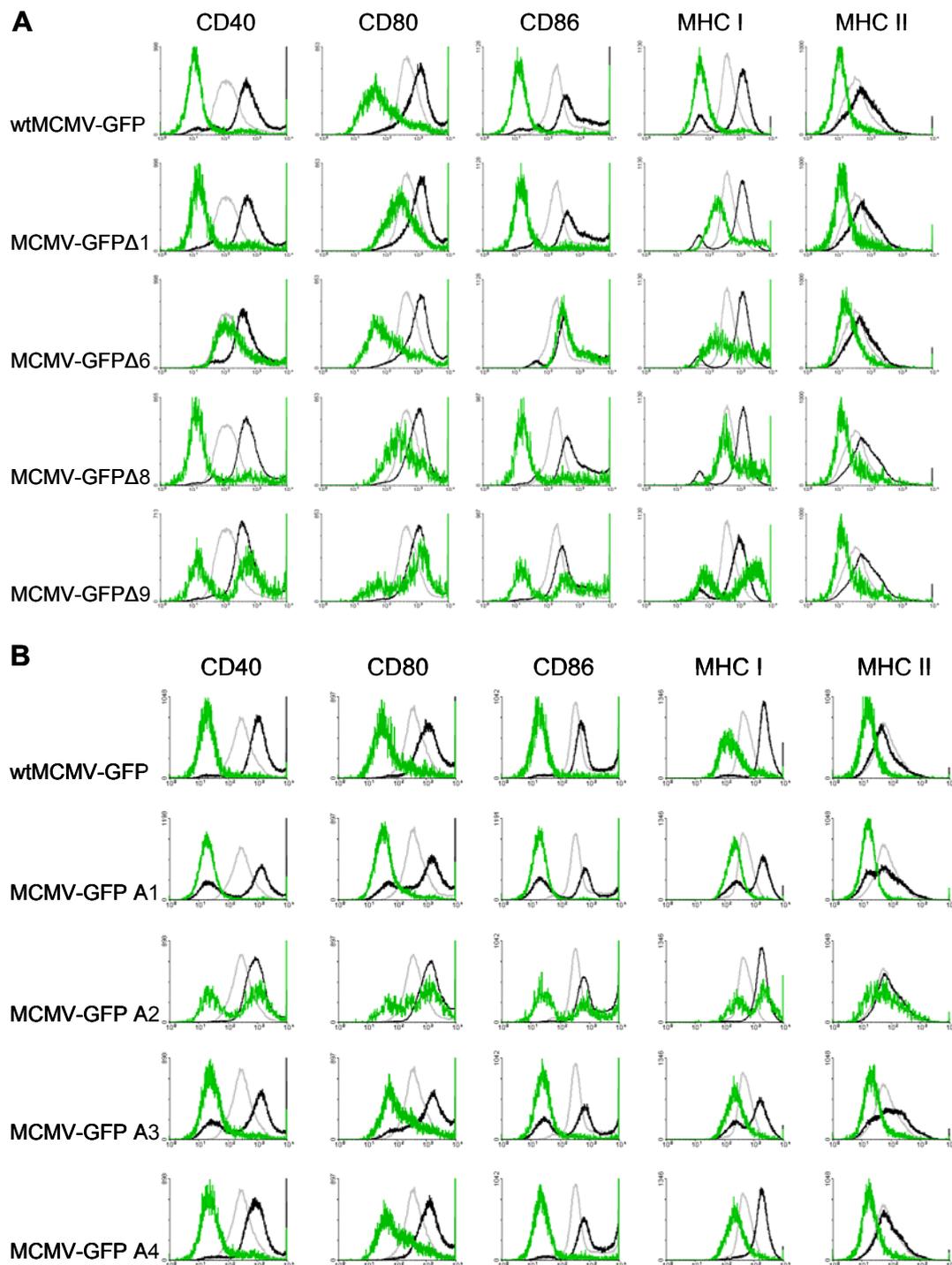


Abb. 17: Durchflusszytometrische Analyse von mit verschiedenen Deletionsmutanten infizierten RAW-Zellen

Die RAW-Zellen wurden mit den links aufgeführten MCMV-GFP-Mutanten infiziert und mit Antikörpern gegen verschiedene Zelloberflächenproteine gefärbt. Die hellgrauen Linien stellen die relative Menge des jeweiligen Zelloberflächenproteins in nicht-infizierten Zellen dar, die schwarzen Linien die nicht-infizierten Zellen der infizierten Kultur und die dunkelgrauen Linien die infizierten Zellen der infizierten Kultur. Die Versuche A und B wurden jeweils an einem Tag durchgeführt.

3. Ergebnisse

Ein Vergleich des durch wtMCMV-GFP (Abb. 17A, oberste Reihe) ausgelösten Effekts mit den durch die Mutanten ausgelösten Effekts zeigte, dass die Expression von CD40 und CD86 bei den mit der Mutante MCMV-GFP Δ 6 (Abb. 17A, dritte Reihe) infizierten RAW264.7-Zellen im Gegensatz zu mit wtMCMV-GFP-infizierten Zellen nicht herunterreguliert wurden. Die Expression von CD80 wurde bis auf die Mutante MCMV-GFP Δ 6 von allen untersuchten Deletionsmutanten negativ beeinflusst. Gleiches galt für MHC I, wobei hier auch die Mutante MCMV-GFP Δ 6 eine gegenüber dem Wildtypphänotyp schwächere Reduktion zeigte. Die Expression von MHC II wurde von allen Viren in gleichem Maße reduziert. Die Mutanten A1-A4 der Abb. 17B riefen in Bezug auf die untersuchten Zelloberflächenproteine einen Wildtypphänotyp hervor. Eine Ausnahme bildete die Mutante A2, die eine verminderte Reduktion von CD80 und einen intermediären Phänotyp für CD40, CD86 und MHC I zeigte.

Aus diesen Ergebnissen wurde gefolgert, dass die für die Reduktion von CD40 und CD86 verantwortlichen Gene im Bereich der Δ 6-Deletion liegen. Da das Virus MCMV-GFP Δ 6 eine Reduzierung der anderen Proteine induzierte und die beiden Proteine ihrerseits nur durch dieses Virus nicht herunterreguliert wurden, wurde davon ausgegangen, dass es sich hierbei um einen spezifischen Phänotyp handelte. Um die Identifizierung der für die Reduzierung von CD40 und CD86 verantwortlichen Proteine zu erreichen, wurde zunächst der in Frage kommende Genombereich weiter eingegrenzt, indem MCMV-Mutanten mit kleineren Deletionen hergestellt wurden. Die Region der Δ 6-Deletion umfasst 14 Gene (m144 bis m157), von denen in den neuen Mutanten jeweils vier oder fünf deletiert wurden. In den Mutanten MCMV-GFP Δ 6S1, MCMV-GFP Δ 6S2 und MCMV-GFP Δ 6S3 wurden jeweils nur die Gene m144 bis m148, m149 bis m153 oder m154 bis m157 deletiert.

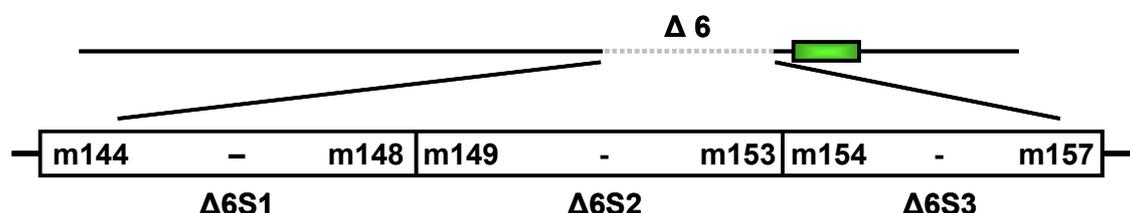


Abb. 18: Unterteilung der Region der Δ 6-Deletion in drei kleinere Deletionen
Darstellung der Lage der Deletionen Δ 6S1, Δ 6S2 und Δ 6S3 mit den jeweils deletierten ORFs.

Die aus den BAC-Mutanten hergestellten Viren wurden für die Infektion von RAW264.7-Zellen genutzt und 24 Stunden später die Expression der Zelloberflächenmoleküle mit der FACS-Analyse bestimmt, die in Abb. 19 dargestellt wurden.

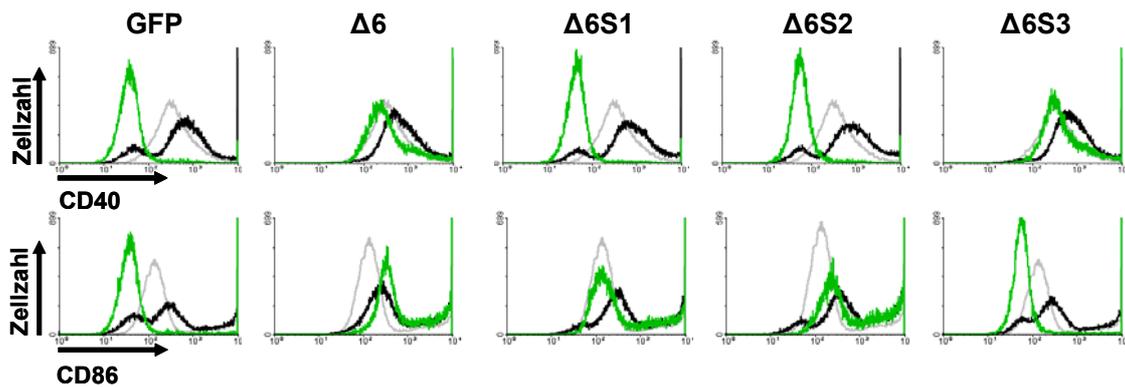


Abb. 19: Durchflusszytometrische Analyse von Zelloberflächenmolekülen nach Infektion von RAW-Zellen mit wtMCMV-GFP bzw. MCMV-Mutanten

FACS-Analyse von RAW264.7-Zellen, die mit den angegebenen MCMV-GFP-Mutanten für 24 Stunden infiziert waren. Darstellung der verschiedenen Oberflächenfärbungen mit den angegebenen Antikörpern. Graue Linien: nicht-infizierte RAW. Schwarze Linien GFP-negative Zellen der infizierten Kultur. Grüne Linien GFP-positive Zellen der infizierten Kultur.

Die Analysen demonstrierten, dass die Deletion der Gene m144 bis m148 ($\Delta 6S1$) und m149 bis m153 ($\Delta 6S2$) eine fehlende Reduktion von CD86 nach sich zog. Die Mutante $\Delta 6S3$, in der die Gene m154 bis m157 deletiert wurden, zeigte jedoch eine Reduktion von CD86, die dem Wildtypphänotyp entsprach. In Bezug auf die Herunterregulierung von CD40 zeigte die Mutante $\Delta 6S3$ einen Ausfall der Reduktion. Demgegenüber lösten die Mutanten, in denen die Gene m144 bis m148 ($\Delta 6S1$) und m149 bis m153 ($\Delta 6S2$) deletiert wurden, weiterhin den Wildtypphänotyp aus. Folglich rief die Entfernung der Bereiche $\Delta 6S1$ und $\Delta 6S2$ einen Ausfall der Herunterregulierung von CD86 hervor, während bereits die Deletion der Region $\Delta 6S3$ die Herunterregulierung von CD40 unterbinde. Daraus wurde geschlossen, dass die für den Wildtypphänotyp verantwortlichen Gene in den genannten Bereichen lokalisiert sind und CD40 und CD86 nicht von dem gleichen viralen Gen herunterreguliert werden.

3.2 Die Identifikation von immunmodulatorischen Genen in MCMV

Die unter Punkt 3.1.2 beschriebenen Untersuchungen haben gezeigt, dass die für die Herunterregulierung von CD40 und CD86 verantwortlichen Gene im Bereich von m144-m157 liegen müssen. Durch die Unterteilung dieser Region in drei Abschnitte wurden die für die jeweiligen Funktionen benötigten Bereiche genauer eingegrenzt, wobei die für die Reduktion von CD40 essentielle Region vier ORFs umfasst und die für die Reduktion von CD86 neun ORFs. Die Zielstellung der weiteren Arbeit war die Identifizierung der jeweils verantwortlichen Gene. Hierfür wurde zunächst der essentielle Bereich weiter eingegrenzt, indem MCMV-Mutanten mit Deletionen einzelner

ORFs hergestellt und auf ihren Effekt bezüglich der Expression von CD40 und CD86 auf den infizierten Zellen untersucht wurden. Die Analyse dieser Einzelgenmutanten bot die Basis zur Identifikation der für die Herunterregulierung von CD40 und CD86 verantwortlichen Gene, die im Folgenden getrennt betrachtet werden soll.

3.2.1 Die Identifizierung des für die Herunterregulierung von CD86 verantwortlichen Gens

3.2.1.1 Eingrenzen der genomischen Region

Den Ausgangspunkt für die Identifizierung des Gens, welches für die Herunterregulierung von CD86 verantwortlich ist, bildete die Beobachtung, dass sowohl der Genombereich mit den Genen m144 bis m148 ($\Delta 6S1$) als auch derjenige mit den Genen m149 bis m154 ($\Delta 6S2$) für die Funktion notwendig ist. Diese Beobachtung bewies, dass es sich bei dem für die Herunterregulierung von CD86 verantwortlichen Gen nicht um nur einen der vorhergesagten ORFs handelt. Für die weitere Eingrenzung wurden Mutanten mit Einzelgendeletionen aus dem Bereich der Deletionsmutanten $\Delta 6S1$ und $\Delta 6S2$ hergestellt und analysiert. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde der Einfluss einer Deletion der ORFs m144, m145, m146, m147/m148, m149, m149/m150, m151, m152 bzw. m153 untersucht. In der Abb. 20A sind die ORFs der Grenzregion zwischen den Deletionen $\Delta 6S1$ und $\Delta 6S2$ schematisch dargestellt. Da die ORFs m147 und m148 fast vollständig überlappen, wurden diese in einer Mutante gemeinsam deletiert. Der ORF m149 überlappt zu einem Drittel im 3'-Bereich mit dem auf dem Gegenstrang kodierten m150, weshalb zwei Mutanten hergestellt wurden, in der einmal der nicht-überlappende 5'-Bereich von m149 und in einer weiteren Mutante die ORFs m149 und m150 gemeinsam deletiert wurden. Die genauen Nukleotidpositionen der Deletionen und die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse sind in Tabelle 10 im Anhang vermerkt. Die Abb. 20B gezeigten Analysen verdeutlichten, dass die Mutanten MCMV-GFP Δ m146 und MCMV-GFP Δ m151 eine dem Wildtypphänotyp entsprechende Reduktion der Expression von CD86 auslösten. Die mit den drei Mutanten MCMV-GFP Δ m147/m148, MCMV-GFP Δ m149 und MCMV-GFP Δ m149/m150 infizierten Zellen zeigten hingegen keine Reduktion von CD86 (*Loss-of-Function* Phänotyp), der auch bei MCMV-GFP $\Delta 6$ infizierten Zellen beobachtet wurde. Folglich hatte die Deletion der Gene m146 und m151 keinen Einfluss auf die Herunterregulierung von CD86, während die Region der ORFs m147/m148, m149 und m150 für den Phänotyp essentiell ist. Diese Beobachtung ließ mehrere Deutungen zu.

Zunächst bestand die Möglichkeit, dass der Effekt von mehreren Genen hervorgerufen wird, die sich in den beiden Regionen befinden. Weiterhin konnte es sich um ein oder mehrere gespleißte Gene handeln, das/die innerhalb beider Submutanten lokalisiert sind.

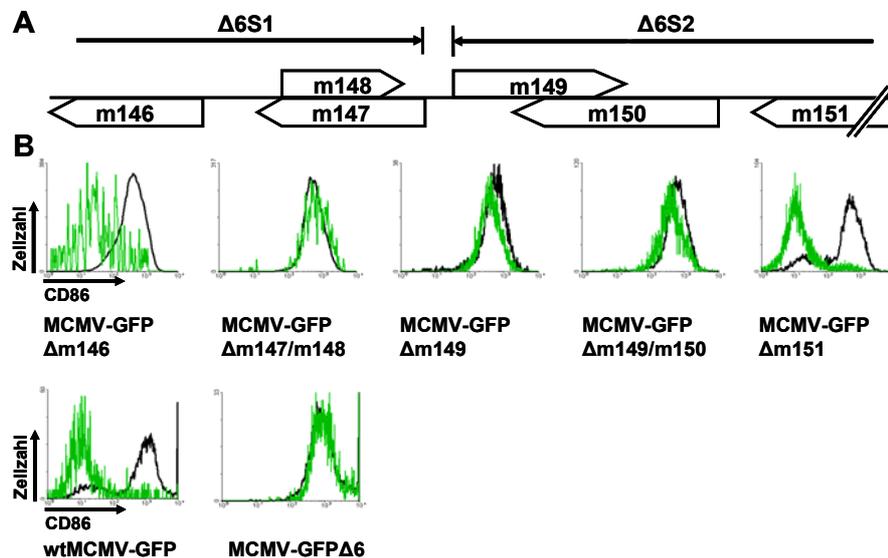


Abb. 20: Anordnung der ORFs der Grenzregion der Deletionen $\Delta 6S1$ und $\Delta 6S2$ und durchflusszytometrische Analyse von mit MCMV-Mutanten infizierten Zellen

Die unter A) dargestellten ORFs wurden einzeln (m146, m149 und m151) oder zusammen (m147/m148 und m149/m150) deletiert und die entsprechenden Viren für die Infektion von RAW264.7-Zellen genutzt. 24 Stunden nach Infektion wurde mit Hilfe der FACS-Analyse die Expression von CD86 auf der Oberfläche der Zellen untersucht. Positivkontrolle: untere Reihe links (wtMCMV-GFP), Negativkontrolle: untere Reihe rechts (MCMV-GFP $\Delta 6$). Schwarze Linien: GFP-negative Zellen, graue Linien: GFP-positive Zellen der gleichen Zellpopulation.

Um festzustellen, welche der beiden Möglichkeiten zutreffend ist, wurden zwei verschiedene Strategien verfolgt. Um festzustellen, ob mehrere Gene der Region gemeinsam agieren, wurden verschiedene Regionen in das Genom der Deletionsmutante MCMV-GFP $\Delta 6$ inseriert, die einen *Loss-of-function* Phänotyp hervorruft. Diesen Mutanten fehlen die Gene m144-157, sie tragen aber den inserierten Bereich mit eventuell darin enthaltenen Genen. Sollte das gesuchte Gen innerhalb der inserierten Region liegen, müsste dies in infizierten Zellen exprimiert werden und die Herunterregulierung von CD86 bewirken. Falls für den vollständigen Effekt mehr als nur ein Gen dieser Region zusammen arbeiten, müsste eine Doppelinfektion mit Mutanten, in denen die jeweiligen Genbereiche inseriert wurden, den Wildtypphänotyp auslösen. Eine weitere Möglichkeit war, dass es sich bei dem für die Herunterregulierung von CD86 verantwortlichen Gen nicht um einen der vorhergesagten ORFs handelte. Dies

3. Ergebnisse

wurde durch die gezielte Störung verschiedener Bereiche durch Insertionsmutanten untersucht, wodurch die für den Effekt essentiellen Sequenzen weiter eingegrenzt werden sollten.

Um die erste These zu untersuchen, wurden in der Mutante MCMV-GFP Δ 6m147/m148 die Sequenzen der ORFs m147 und m148 in die Δ 6-Deletion inseriert. Die Mutante MCMV-GFP Δ 6m149 beinhaltet die Region m149, während bei der Mutante MCMV-GFP Δ 6AL1 der gesamte genomische Bereich vom 3'-Ende des ORF m147 bis zum 3'-Ende des ORF m149 in die Region der Δ 6-Deletion inseriert wurde. Diese Mutanten wurden in der bereits beschriebenen Weise für durchflusszytometrische Analysen verwendet, deren Ergebnisse in der Abb. 21 dargestellt wurden.

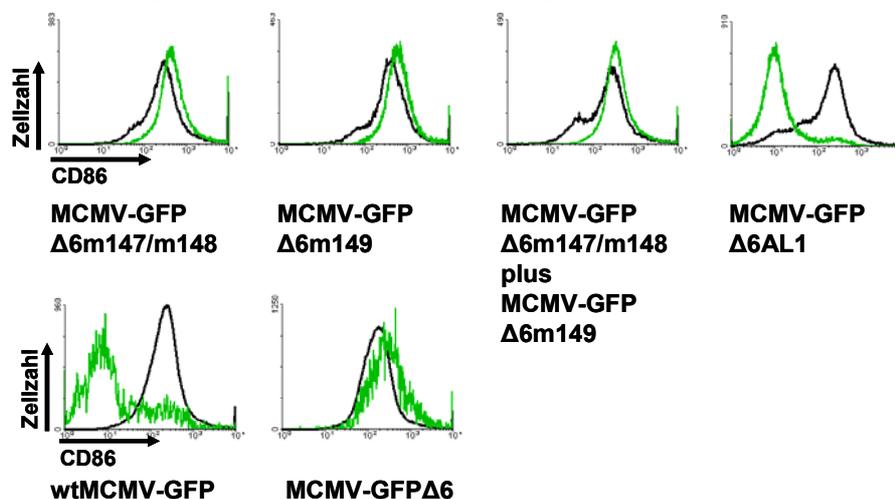


Abb. 21: Durchflusszytometrische Analyse von RAW-Zellen, die mit Δ 6-Insertionsmutanten infiziert wurden

Die aus den mutagenisierten BACs hergestellten Viren werden für die Infektion von RAW264.7-Zellen genutzt, die 24 Stunden p.i. auf ihre Expression von CD86 untersucht werden. Als Positivkontrolle dient eine mit wtMCMV-GFP-infizierte Zellpopulation (untere Reihe links) und als Negativkontrolle eine mit MCMV-GFP Δ 6 (Ausgangsmutante für die Insertionsmutanten) infizierte Zellpopulation (untere Reihe rechts). Graue Linien: GFP-positive Zellen, schwarze Linien: GFP-negative Zellen.

Die Infektion wurde zunächst mit allen drei Mutanten einzeln durchgeführt. Um festzustellen, ob es sich um zwei in Kooperation arbeitende Gene handelt, wurde eine Doppelinfection mit den Viren MCMV-GFP Δ 6m147/m148 und MCMV-GFP Δ 6m149 durchgeführt. Die Analyse der Zellen, die mit Mutanten infiziert waren, in denen die Regionen m147/m148 oder m149 einzeln reinseriert wurden (Abb. 21 Histogramme 1 und 2) ergab, dass diese Mutanten weiterhin den *Loss-of-function* Phänotyp Ausgangsmutante MCMV-GFP Δ 6 zeigten. Auch eine Doppelinfection mit den beiden Viren MCMV-GFP Δ 6m147/m148 und MCMV-GFP Δ 6m149 zog keine Reduktion der

3. Ergebnisse

Expression von CD86 nach sich. Nur Zellen, die mit der Mutante MCMV-GFP Δ 6AL1 infiziert waren, zeigten eine Reduktion der Zelloberflächenexpression von CD86. Die Herunterregulierung war mit dem durch die Infektion mit wtMCMV-GFP ausgelösten Effekt vergleichbar. Diese Untersuchungen zeigten, dass sich das gesuchte Gen/die gesuchten Gene über den gesamten Bereich von m147/m148 und m149 erstreckten. Eine Beteiligung des ORFs m150 konnte an dieser Stelle ausgeschlossen werden, da dieser in der Mutante MCMV-GFP Δ 6AL1 nicht vollständig enthalten war, diese Mutante jedoch einen Wildtypphänotyp auslöste. Da die getrennte Bereitstellung der einzelnen ORFs keine Reduktion von CD86 nach sich zog, konnte eine kooperative Wirkung der einzelnen ORFs hiermit ausgeschlossen werden.

Die vorherige Analyse belegte, dass keiner der drei ORFs m147, m148 und m149 allein für die Reduktion der CD86-Expression auf RAW264.7-Zellen verantwortlich ist und auch keine kooperative Wirkung dieser Gene vorliegt. Da ausschließlich die gesamte, zusammenhängende Region von m147/m148 bis einschließlich m149 in der Lage war, eine Reduktion der CD86-Expression zu induzieren, wurde die Möglichkeit untersucht, dass es sich bei dem gesuchten Gen nicht um einen der vorhergesagten ORFs sondern möglicherweise um ein gespleißtes Gen handelte. Um das oder die innerhalb der Region lokalisierten Gene weiter einzugrenzen, wurden in den Regionen der Kandidatengene (m147, m148, m149 und m150) verschiedene Insertionen vorgenommen. Das Antibiotikaresistenz-vermittelnde Gen wurde nach erfolgreicher Mutagenese mit Hilfe der Flp-Rekombinase entfernt, wodurch an der mutagenisierten Stelle eine FRT-Stelle zurückblieb und somit nur eine geringfügige Veränderung vorgenommen wurde. Die Insertionen wurden in den ORFs m147 und m148, im 5'-Bereich von m148, im 5'-Bereich von m149, in den ORFs m149 und m150 und im 5'-Bereich von m150 vorgenommen. Eine Skizze und das Ergebnis der Durchflusszytometrischen Analyse der Mutanten ist in der Abb. 22A dargestellt und die genauen Positionen sowie die eingebrachten Deletionen in Tabelle 10 im Anhang zusammengefasst. Von den Zellpopulationen, die mit den fünf hergestellten Insertionsmutanten infiziert wurden, zeigten zwei eine fehlende Reduktion von CD86 in den GFP-positiven Zellen der infizierten Population: die mit der Mutante RV-AL13, die eine Insertion im mittleren Bereich der ORFs m147 und m148 trägt und die mit der Mutante RV-AL15, die eine Insertion im ersten Drittel des ORF m149 trägt infizierten Zellen. Die anderen drei Mutanten riefen einen Wildtypphänotyp hervor. Bemerkenswert ist hierbei die Mutante RV-AL12, dessen Insertion im Bereich des ATG vom ORF m147

liegt, welches dadurch deletiert wurde. Diese Insertion ist zwischen den Insertionen positioniert, welche einen *Loss-of-Function* Phänotyp hervorriefen. Dennoch zeigten die mit der Mutante RV-AL12 infizierten Zellen eine reduzierte CD86-Expression.

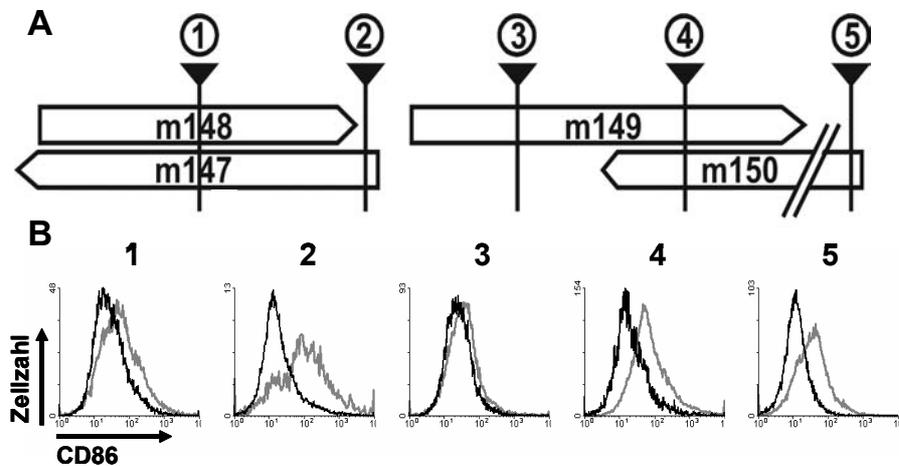


Abb. 22: Lage der Insertionen in den ORFs m147-m150 und durchflusszytometrische Analyse der Insertionsmutanten

Durch ET-Mutagenese wurde an verschiedenen Stellen der ORFs m147 bis m150 eine kleine Deletion gesetzt und eine FRT-Stelle integriert. Mutante 1: RV-AL13, Mutante 2: RV-AL14, Mutante 3: RV-AL15, Mutante 4: RV-AL16 und Mutante 5: RV-AL17. Die aus den BACs hergestellten Viren wurden für die Infektion von RAW264.7 Zellen genutzt, die 24 Stunden p.i. mit Hilfe der FACS-Analyse auf ihre Expression von CD86 auf der Zelloberfläche untersucht wurden. Graue Linien GFP-negative Zellen, schwarze Linien GFP-positive Zellen.

Folglich sind nicht zusammenhängende Bereiche in den ORFs m147/m148 und im ORF m149 für die Funktion essentiell. Weiterhin wurde deutlich, dass die Sequenzen vom 5'-Bereich des ORFs m147 nicht essentiell sind und demnach der potentielle ORF m147 nicht an der Funktion beteiligt sein konnte. Diese Daten legten nahe, dass es sich um ein gespleißtes Gen handelt.

3.2.1.2 Die Kartierung von modB7-2

Für die Identifizierung einer durch RNA-spleißing entstehenden mRNA wurden RNA-Analysen durchgeführt und dabei das mit dem vorhergehenden Versuch erlangte Wissen um die essentiellen Sequenzen genutzt. Mit einem Northern Blot sollte zunächst die Expression der vorhergesagten ORFs untersucht werden. Die Sonden waren spezifisch für Regionen, die durch die Analyse der Insertionsmutanten als essentiell identifiziert wurden (Abb. 22). Die RNA wurde zu einem Zeitpunkt aus MCMV-infizierten

3. Ergebnisse

RAW-Zellen gewonnen, an dem die Reduktion von CD86 nachweisbar ist und somit die Expression des viralen Gens angenommen werden konnte.

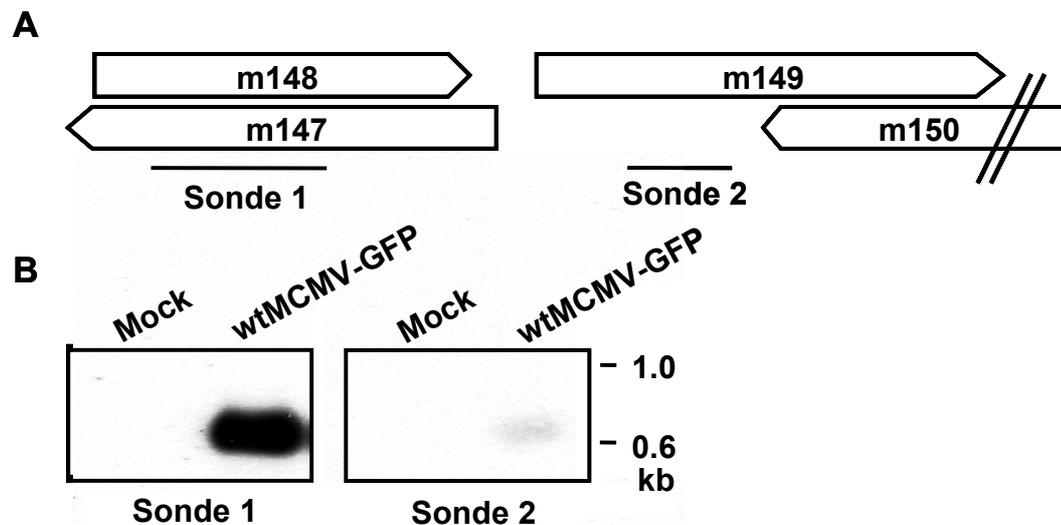


Abb. 23: Northern Blot Analyse der Gene m147/m148 und m149

Analyse der Expression von mRNAs aus der Region m147/m148 sowie m149 mit Northern Blot. RAW264.7-Zellen wurden mit wtMCMV-GFP infiziert oder mock infiziert und die RNA 24 Stunden p.i. gewonnen. Die Hybridisierung erfolgte mit den zwei Sonden, deren Lage in der Abbildung unter A skizziert ist. Für die Herstellung der Sonde 1 wurden die Primer m148Ori6K.for/ NotHAfalsch.rev und für die Herstellung der Sonde die Primer m147ori6K.rev/m149ori6K.rev verwendet.

In diesem Experiment konnte, wie in Abb. 23B gezeigt, nur ein Transkript mit einer Größe von ca. 0,7 kb nachgewiesen werden. Dies galt sowohl für die Sonde 1, die spezifisch zu Teilen der ORFs m147 und m148 war, als auch für die Sonde 2, die aus dem vorderen Bereich des ORFs m149 stammt. Die Hybridisierung mit der Sonde 2 ergab im Vergleich zur Sonde 1 ein schwächer ausgeprägtes Signal. Dies deutete auf eine schlechtere Interaktion der Sonde mit dem Transkript hin, was durch eine geringere Menge an mRNA oder einen kleineren homologen Bereich hervorgerufen werden kann. Die Größe von 0,7 kb korrespondierte mit keinem der vorhergesagten ORFs dieser Region, was auf die Entstehung einer mRNA durch RNA-Spleißing hindeutete. Für die Identifizierung eines solchen Spleißings wurden RT-PCR Analysen mit mRNA von Zellen, die 24 Stunden mit wtMCMV-GFP infiziert waren, durchgeführt. Diese wurde in cDNA umgeschrieben und eine PCR mit den Primern m147/m148 RT.for und Pr-AL10 durchgeführt, die in den als essentiell identifizierten Regionen banden (Abb. 24a).

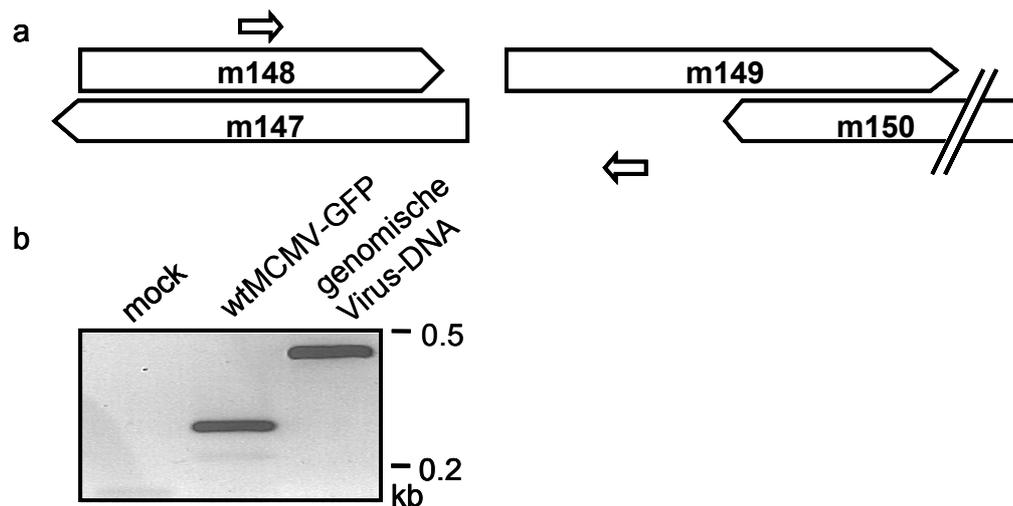


Abb. 24: Analyse der Region m147/m148 und m149 auf mögliches RNA Spleißing

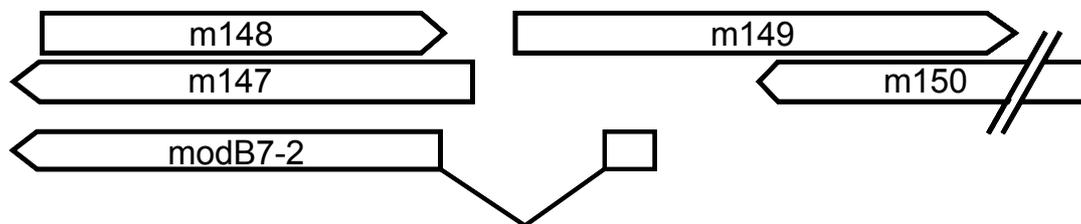
RAW264.7-Zellen wurden mit wtMCMV-GFP infiziert (mittlere Spur) oder mock infiziert (linke Spur) und für die RT-PCR eingesetzt (b). Genomische wtMCMV-GFP Virus-DNA diente als Positivkontrolle (rechte Spur). Die Lage der verwendeten Primer ist in der Abbildung a dargestellt.

Die RT-PCR ergab ein Produkt der Länge von ca. 250 bp. Wurde mit denselben Primern eine PCR mit Virus-DNA als Template durchgeführt, betrug die Größe des Produktes ca. 500 bp. Mit diesen Untersuchungen wurde eine Größendifferenz von ca. 200 bp zwischen den PCR-Produkten dokumentiert, die an genomischer Virus-DNA und aus cDNA gewonnen wurden, was sich durch das Herausspleißen eines Introns mit einer Länge von ca. 200 bp erklären lassen würde. Eine Sequenzierung des PCR-Produktes zeigte, dass nach 59 Nukleotiden, die aus dem 5'-Bereich des Gegenstrangs vom ORF m149 stammen, ein Spleißing stattfindet. Es fehlten hier 204 bp der genomischen Sequenz und der ORF wurde kurz nach dem ATG des ORF m147 fortgesetzt. Dadurch wurde die Annahme, dass sich in dieser Region ein gespleißtes Gen befindet, bestätigt und die genaue Lokalisierung der Spleißstelle festgestellt (Abb. 25). Der Transkriptionsstartpunkt und das erste Exon dieses Gens befindet sich auf dem Gegenstrang des 5'-Bereiches von ORF m149. Das zweite Exon ist im 3'-Bereich mit dem ORF m147 identisch. Die Untersuchungen geben keinen Hinweis auf eine Expression der ORFs m148 und m149 zum Zeitpunkt der Untersuchung.

Um die genauen Ausdehnungen des gespleißten ORFs zu untersuchen, wurden mit Hilfe von 5'-RACE und 3'-RACE-Experimenten der Transkriptionsstartpunkt und das Ende des Transkriptes ermittelt. Die Untersuchung ergab, dass zwei alternative Transkriptionsstartpunkte für das Gen bei den Positionen 207525 und 207523 im MCMV-Genom existieren. Eine TATA-Box mit der Sequenz TATATA befindet sich 24

3. Ergebnisse

bp strangaufwärts davon bei der Position 207554 bis 207549 (Rawlinson *et al.*, 1996). Das Transkript endet an der Position 206834, ein Polyadenylierungssignal (AATAAA) liegt an der Position 206866 bis 206861. Weiterhin konnte eine Region identifiziert werden, die Homologie mit der 3'-Konsensussequenz YGTTGTTY (TGTGTGATGTTGTCTT; 206825 bis 206810) (Zarudnaya *et al.*, 2003). Dementsprechend besteht das Transkript des Gens modB7-2 aus einem Exon mit der Länge von 59 Nukleotiden der Position 207525 bis 207467, welches an ein zweites Exon zwischen den Positionen 207263 bis 206834 gespleißt wird. Das zweite Exon entspricht fast vollständig dem vorhergesagten offenen Leserahmen m147 (Rawlinson *et al.*, 1996). Der offene Leserahmen beginnt innerhalb des ersten Exons an der Position 207502, in dem 12 der 145 Aminosäuren kodiert werden (Abb. 25 unten).



```
MSDHPGGCVFLMTDLWNKMQRPGSETKSYLKGHYLTFRVKDRRDADREE 50
DEVPKRPDWSTAIVLKWIPPICILYFVIAFRLVYLTVQAHGLWTRHERH 100
QRGTDAVRLAPVAAAFVIGVLT VHAYSLRGIANRYVAEPCGPDDE* 145
```

Abb. 25: Lage des Gens modB7-2 und Aminosäuresequenz des kodierten Proteins

Das Gen modB7-2 besteht aus zwei Exons, die auf dem unteren Strang liegen. Das zweite Exon entspricht im 3'-Bereich dem vorhergesagten ORF m147. Von dem Protein werden 12 Aminosäuren vom ersten Exon kodiert (kursiv) und 133 vom zweiten Exon. Die unterstrichenen Bereiche kennzeichnen die vorhergesagten Transmembranregionen.

Mit Hilfe der RNA-Analysen wurde ein gespleißtes Gen identifiziert, welches mit keinem der vorhergesagten ORFs identisch ist. Weiterhin ergaben die Untersuchungen keinen Hinweis auf eine Expression der ORFs m147, m148 und m149.

3.2.1.3 Das Gen modB7-2 ist für die Herunterregulierung von CD86 verantwortlich

Nachdem die Identifizierung eines Gens erfolgt war, welches in der für die Herunterregulierung von CD86 essentiellen Region lokalisiert ist, wurde überprüft, ob diese beschriebene Gen modB7-2 für diesen Effekt verantwortlich ist.

3. Ergebnisse

Einerseits wurden die cDNA-Sequenzen des identifizierten modB7-2-Gens in das BAC-Genom mit der Deletion $\Delta 6$ inseriert. Diese Untersuchungen basierten auf der Überlegung, dass die Ausgangsmutante MCMV-GFP $\Delta 6$ nicht in der Lage ist, die Expression von CD86 zu reduzieren und dass eine ggf. durch eine modB7-2-Insertionsmutante ausgelöste Reduktion auf eben diese inserierten Sequenzen zurück zu führen sein müsste.

Weiterhin wurde eine Mutante hergestellt, bei der der offene Leserahmen von modB7-2 selektiv durch Stopcodons unterbrochen wurde. Dies ist besonders wichtig, weil an dieser Stelle eine genaue Diskriminierung des ORF modB7-2 und dem auf dem Gegenstrang kodierten ORF m148 ermöglicht wurde, dessen Expression durch die eingebrachten Mutationen nicht beeinträchtigt werden sollte. Falls eine solche Mutante dennoch keine Reduktion von CD86 induzieren würde, müsste dies auf das Fehlen des Proteins ModB7-2 zurückzuführen sein.

Die Mutante MCMV-GFP $\Delta 6$ cDNA-MIEP enthielt die cDNA von modB7-2, so dass in dem erhaltenen Konstrukt die für das vollständige ModB7-2-Protein kodierenden Sequenzen vorhanden waren. Die Expression des Gens wurde von dem ebenfalls inserierten HCMV *Major Immediate Early* (MIEP)-Promotor kontrolliert. Eine schematische Skizze des Virus-Genoms MCMV-GFP $\Delta 6$ cDNA-MIEP sowie die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse von mit dieser Mutante infizierten Zellen sind in der Abb. 26 dargestellt.

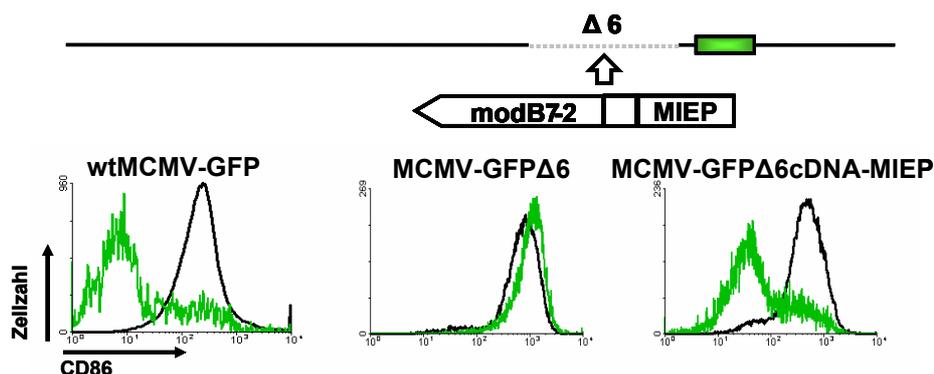


Abb. 26: Genomstruktur der modB7-2 $\Delta 6$ -Insertionsmutante und FACS-Analyse der mit dieser Mutante infizierten Zellen

In den MCMV-GFP $\Delta 6$ -BAC wurde die cDNA von modB7-2 unter Kontrolle des MIEP Promotors inseriert (oben). Die Viren wtMCMV-GFP, MCMV-GFP $\Delta 6$ und MCMV-GFP $\Delta 6$ cDNA-MIEP wurden für die Infektion von RAW264.7-Zellen genutzt. Schwarze Linien: GFP-negative Zellen, graue Linien: GFP-positive Zellen der gleichen Kultur.

3. Ergebnisse

Wie im rechten Histogramm der Abb. 26 ersichtlich, zeigten die mit der MCMV-GFP Δ 6cDNA-MIEP-Mutante infizierten Zellen eine Reduktion der Expression von CD86 und somit einen *Gain-of-function* Phänotyp. Da die mit der Ausgangsmutante MCMV-GFP Δ 6 infizierten Zellen einen *Loss-of-Function* Phänotyp zeigten, müssen die in der Mutante MCMV-GFP Δ 6cDNA-MIEP inserierten Sequenzen für ein Protein, welches die Herunterregulierung von CD86 hervorruft.

Um die weitere Differenzierung zwischen modB7-2 und m148 sowie einen weiteren Nachweis für die Involvierung von modB7-2 in die Reduktion der CD86-Expression zu erbringen wurde mittels Shuttle-Mutagenese eine Mutante hergestellt, bei der lediglich der ModB7-2 kodierende ORF unterbrochen wurde. Die Shuttle-Mutagenese ist ein Mutageneseverfahren, das auf homologer Rekombination basiert und bei der außer den gewünschten Veränderungen keine weiteren Spuren im Genom zurückbleiben. In dem vorliegenden Fall wurden in den vorderen Teil des zweiten Exons vier Stopcodons eingebracht (Abb. 27A und B).

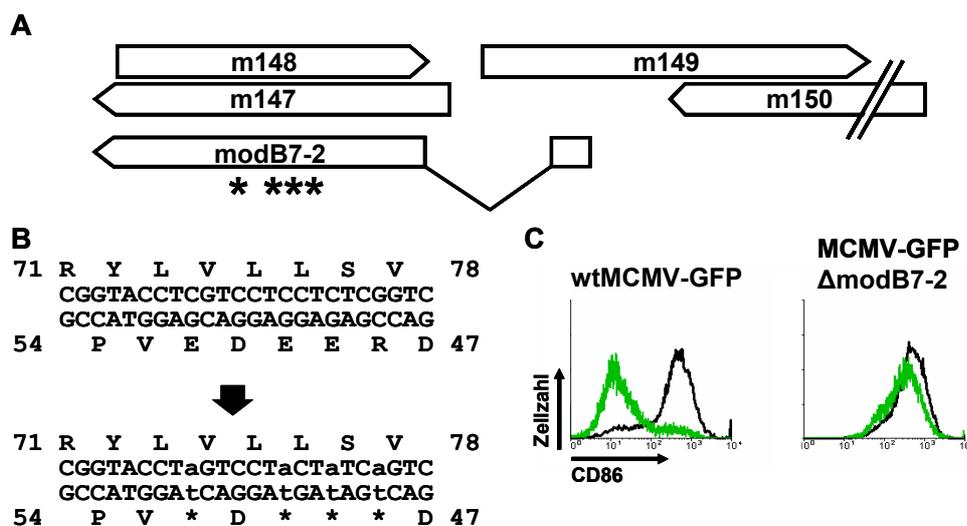


Abb. 27: Planung und durchflusszytometrische Analyse von mit der MCMV-GFP Δ modB7-2-Mutante infizierten Zellen

Mit Hilfe der Shuttle Mutagenese wurden in den wtMCMV-GFP-BAC mehrere Stopcodons (Sterne) eingefügt (Lageskizze in A, genaue Position in B), die keinen Einfluss auf die Translation des Gegenstrangs haben. B) Oben: wt Sequenz, unten: eingefügte Mutationen (kleine Buchstaben). Sterne: Stopcodons. C) Mit dem MCMV-GFP Δ modB7-2-Virus wurden RAW264.7-Zellen infiziert. Bei den FACS-Analysen mit Anti-CD86-gefärbten Zellen diente eine mit wtMCMV-GFP infizierte Population als Positivkontrolle. Schwarze Linien: GFP-negative Zellen, graue Linien: GFP-positive Zellen der gleichen Kultur.

Diese Stopcodons bewirken einen Abbruch der Translation von modB7-2 in diesem Bereich, haben aber keinen Einfluss auf den auf dem Gegenstrang kodierten ORF

m148 (Abb. 27B). Das aus diesem BAC hergestellte Virus MCMV-GFP Δ modB7-2 wurde wie bereits für andere MCMV-Mutanten beschrieben auf seinen Effekt bezüglich der CD86-Expression untersucht. Wie in Abb. 27C ersichtlich erfolgte in den mit dem MCMV-GFP Δ modB7-2 infizierten Zellen keine Herunterregulierung der Expression von CD86. Da dieser *Loss-of-Function* Phänotyp durch die Unterbrechung der Translation von modB7-2 hervorgerufen wurde, zeigte dies, dass das Gen modB7-2 für die Herunterregulierung von CD86 essentiell ist. Weiterhin konnte ausgeschlossen werden, dass das Gen m148 allein für die Reduktion von CD86 verantwortlich ist, was eine Beteiligung an dem durch ModB7-2 vermittelten Effekt konnte hiermit jedoch nicht ausschloss.

3.2.1.4 Nachweis des modB7-2 Proteins

Nachdem mit den vorhergehenden Experimenten nachgewiesen wurde, dass modB7-2 für die Verringerung der CD86-Expression auf der Oberfläche von MCMV-infizierten Antigen-präsentierenden Zellen verantwortlich ist, wurden als nächstes Informationen über das vom modB7-2-Gen kodierte Protein gesammelt. Hierzu gehören neben computergestützten Struktur- und Funktionsvorhersagen auch der Nachweis des Proteins im Western Blot und Analysen zur Expression des Proteins.

Bei der Analyse der Aminosäuresequenz mit dem PSORT II-Programm (<http://psort.nibb.ac>) wurde für das Protein ModB7-2 eine Typ IIIb Topologie mit zwei Transmembranregionen vorgeschlagen. Nach dieser Vorhersage befinden sich sowohl der N- als auch der C-Terminus des Proteins auf der ektoplasmatischen Seite der Membran. Für das Protein wurden keine bekannten Domänen, enzymatische Aktivität oder Signalpeptide vorhergesagt. Das Molekulargewicht wurde mit Hilfe des Swissprot-Programms auf 16,66 kDa kalkuliert (http://au.expasy.org/tools/pi_tool.html) (Bjellqvist *et al.*, 1993). Für das modB7-2HA-Protein wurde die Größe mit 17,63 kDa berechnet. Eine graphische Darstellung der vorhergesagten Topologie von modB7-2 ist in der Abb. 28 gezeigt (Hirokawa *et al.*, 1998).

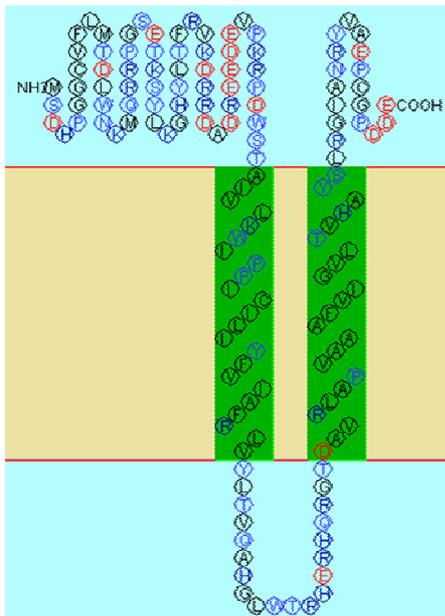


Abb. 28: Vorhergesagte Topologie des ModB7-2 Proteins

Aminosäuresequenz und Anordnung des ModB7-2 Proteins. N-Terminus und C-Terminus des Proteins liegen auf der ektoplasmatrischen Seite der Zellmembran. Für das Protein wurden zwei Transmembranregionen vorhergesagt, die mit einem kurzen, lumenalen Loop verbunden sind.

Die Bestimmung des Molekulargewichts und der Expressionskinetik vom ModB7-2-Protein wurde mit Western Blot-Analysen vorgenommen. Um eine Detektion im Western Blot zu ermöglichen, musste zunächst ein Epitoptag an den ORF modB7-2 angebracht werden. Hierfür wurde das Hämagglutinin-Epitop (HA) verwendet, welches mit einem Anti-Hämagglutinin-Antikörper im Western Blot nachweisbar sein sollte. Die durch ET-Mutagenese hergestellte Virusmutante MCMV-GFPmodB7-2HA kodiert für ein modB7-2-Hämagglutinin Fusionsprotein, bei dem das HA-Epitop am C-Terminus des Proteins angefügt ist. Aus dem mutagenisierten BAC wurde Virus hergestellt und für die Infektion von RAW264.7-Zellen verwendet. Als Negativkontrollen dienten Lysate nicht-infizierter und wtMCMV-GFP-infizierter Zellen.

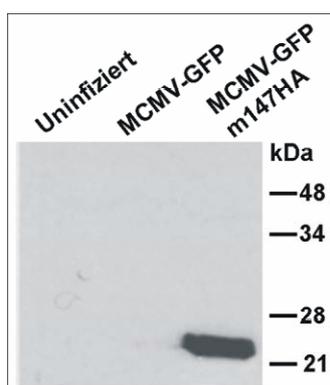


Abb. 29: Nachweis des ModB7-2HA-Proteins im Western Blot

RAW264.7-Zellen wurden mock infiziert (linke Spur), mit wtMCMV-GFP infiziert (mittlere Spur) oder mit MCMV-GFPm147HA infiziert (rechte Spur) und 24 Stunden p. i. lysiert. Nach dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran wurde diese mit Anti-HA-Antikörper gefärbt.

In der Abb. 29 ist das Ergebnis der Western Blot-Analysen dargestellt. Der Anti-HA-Antikörper detektierte kein Protein in den Spuren mit den Lysaten von nicht-infizierten und mit wtMCMV-GFP-infizierten Zellen. Ausschließlich in der Spur mit dem Lysat von MCMV-GFPm147HA-infizierten Zellen band der Anti-HA-Antikörper an ein Protein der

3. Ergebnisse

Größe von ca. 23 kDa. Folglich wies der Anti-HA-Antikörper keine unspezifische Reaktion auf und es wurde davon ausgegangen, dass es sich bei dem nachgewiesenen Protein um das ModB7-2HA-Protein handelte. Das Molekulargewicht lag etwa 6 kDa über dem vorhergesagten Molekulargewicht.

Im nächsten Schritt wurde die Kinetik der Expression von ModB7-2HA im Verlauf einer Infektion untersucht. Hierfür wurden RAW264.7-Zellen für 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 24, 36 und 48 Stunden mit dem MCMV-GFPm147HA-Virus infiziert und von den Zellen Proteinlysate hergestellt, die im Western Blot auf die Expression von modB7-2HA untersucht wurden. Weiterhin wurde die Einteilung des Proteins in die Klasse der sehr frühen (*immediate-early*), frühen (*early*) oder späten (*late*) Proteine mit Hilfe des MCMV-GFPmodB7-2HA-Virus vorgenommen (Honess et al., 1974). Der Versuchsablauf für die Klassifizierung ist in der Abb. 30 skizziert.

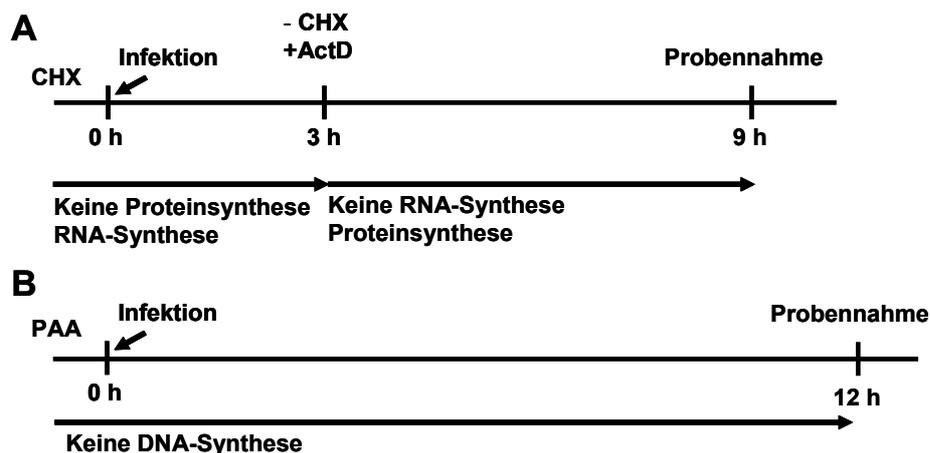


Abb. 30: Versuchsablauf zur Bestimmung der Proteinklasse von ModB7-2

Für die Bestimmung der Proteinklasse von ModB7-2 wurden zur Untersuchung auf Zugehörigkeit zur Immediate early bzw. early Proteinklasse (A) RAW264.7-Zellen 30 min vor Infektion mit Cycloheximid inkubiert. 3 Stunden nach Infektion mit MCMV-GFPm147HA wurde das Cycloheximid entfernt und dem Medium Actinomycin D zugegeben. Nach einer weiteren Inkubation von 6 Stunden erfolgte die Probennahme. Für die Unterscheidung der Zugehörigkeit zur Klasse der early oder late Proteine (B) wurden RAW264.7-Zellen 30 min vor Infektion mit MCMV-GFPm147HA mit Phosphono Acetic Acid (PAA) inkubiert. Die Probennahme erfolgte 12 Stunden nach Infektion.

Die Klassifizierung der viralen Proteine beruhte auf der Tatsache, dass die Transkription der *immediate-early*-Gene durch zelluläre Transkriptionsfaktoren kontrolliert wird, während für die Transkription der *early*-Proteine virale Transkriptionsfaktoren benötigt werden. Für die Klassifizierung der sehr frühen Proteine wurde Cycloheximid zum Zeitpunkt der Infektion für drei Stunden zu den Zellen zugegeben, wodurch während dieser Zeit die eukaryontische Proteinsynthese unterbunden war. Die Bildung von

3. Ergebnisse

viralen mRNAs wurde deshalb in diesem Zeitraum nur durch zelluläre Transkriptionsfaktoren kontrolliert und es konnten nur RNAs der *immediate-early* Klasse entstehen. Nach drei Stunden wurde das Cycloheximid durch Actinomycin D ersetzt, welches die Transkription inhibiert. Da die Translationsinhibition durch Cycloheximid reversibel ist, wurden die in den ersten drei Stunden der Infektion gebildeten mRNAs (u.a. virale *immediate-early* mRNAs) translatiert. Durch die Kombination der Inhibitoren wurden in diesem Versuch nur virale mRNAs translatiert, deren mRNA-Synthese von zellulären Transkriptionsfaktoren kontrolliert wird und die somit zur Klasse der *immediate-early*-Gene gehören.

Die Zugabe von Phosphono Acetic Acid (PAA) unterbindet die virale DNA-Replikation, die eine Voraussetzung für die Bildung von späten Proteinen notwendig ist. Demnach ist in den mit Phosphono Acetic Acid versetzten Proben nur die Bildung von Proteinen der *immediate-early* und *early* Klasse nicht jedoch von Proteinen der späten Klasse möglich. Die gemäß dem Schema in Abb. 30 gewonnenen Proteinproben wurden gemeinsam mit den Proteinlysaten der für verschiedene Zeiten infizierten Zellen in einem Western Blot untersucht.

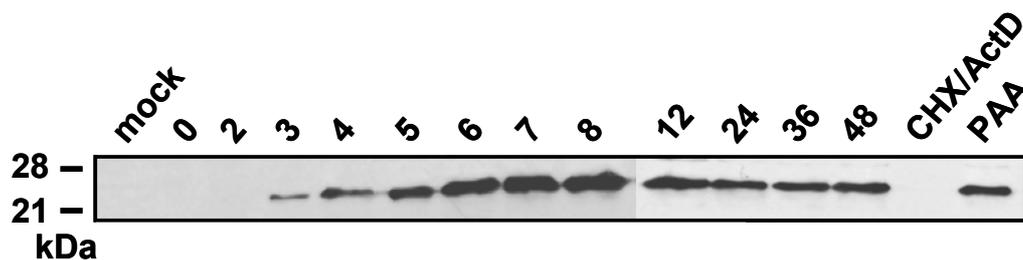


Abb. 31: Untersuchung der Expressionskinetik und Proteinklasse von ModB7-2

RAW264.7-Zellen wurden mock infiziert oder für die angegebene Dauer mit MCMV-GFPm147HA infiziert. In den letzten beiden Spuren sind die nach dem Ablauf in Abb. 30 beschriebenen Proben zur Untersuchung der Proteinklasse aufgetragen.

Der Western Blot ermöglichte die Detektion eines Proteins in der Spur in dem das Zelllysate aufgetragen wurde, welches aus für drei Stunden infizierten Zellen gewonnen wurde. Die Stärke des Signals nahm bei den nächsten Proben kontinuierlich zu und erreichte bei dem Lysat der für acht Stunden infizierten Zellen ein Maximum. Die Signalstärke nahm bis zu dem letzten analysierten Zeitpunkt, der 48 Stunden nach Infektion war, unwesentlich ab. Die Analysen zur Ermittlung der Proteinklasse zeigen bei der mit Cycloheximid und Actinomycin D behandelten Probe kein Signal, während in der mit Phosphono Acetic Acid behandelten Probe ein Protein nachweisbar ist. Folglich wird die Genexpression von modB7-2 nicht von zellulären Transkriptionsfaktoren

kontrolliert und das Protein gehört demnach nicht zur Klasse der sehr frühen Proteine. Da die Inhibition der DNA-Replikation die Expression des Proteins nicht verhindert, ist modB7-2 in die Klasse der frühen Proteine einzuordnen.

3.2.1.5 Nachweis von ModB7-2

Für einen Nachweis des ModB7-2-Wildtypproteins, wurde die Herstellung eines Kaninchenantiserums in Auftrag gegeben. Für die Immunisierung wurden zwei Peptide mit der Sequenz cKDRRDADREEDEVPK und RGIANRYVAePCGPDDE ausgewählt. Ihre Lage innerhalb der ModB7-2-Aminosäuresequenz ist in Abbildung 32 skizziert. Das zweite Peptid wurde durch die ausführende Firma fehlerhaft synthetisiert, statt dem kodierten Glycin (G) war an Position 10 eine Glutaminsäure (E) in das Peptid eingebaut worden. Das Antiserum wurde für die Western Blot Analyse von Proteinlysaten von wtMCMV-GFP und MCMV-GFPm147HA infizierten RAW264.7-Zellen genutzt. Wie in der Abb. 33 ersichtlich ist, war trotz des einen fehlerhaften Peptids mit dem Antiserum ein Nachweis von ModB7-2 möglich. Die Größendifferenz zwischen beiden Proteinen lässt sich durch das HA-Epitoptag an dem ModB7-2-Fusionsprotein erklären.

```
MSDHPGGCVFLMTDLWNKMQRPGSETKSYLKGHYLTFRVKDRRDADREE 50
DEVPKRPDWSTAIVLKWIPPICILIIYFVIAFRLVYLTVQAHGLWTRHERH 100
QRGTDAVRLAPVAAAFVIGVLT VHAYSLRGIANRYVAEPCGPDDE 145
```

Abb. 32: Aminosäuresequenz und Position der für die Immunisierung von Kaninchen verwendeten Peptide

Die die zur Immunisierung verwendeten Peptide sind fett gezeichnet, die Transmembranregionen sind unterstrichen. Das in Peptid 2 (AS 128-144) kursiv geschriebene E (Glutaminsäure) ist statt einem Glycin (G) in dem letztlich verwendeten Peptid enthalten. Ferner wurde für die Kopplung an das Trägerprotein an den Anfang des Peptids (AS 40-55) ein Cystein (C) angefügt.

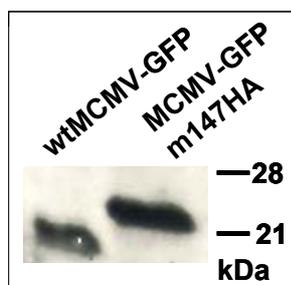


Abb. 33: Nachweis der Proteine ModB7-2 und ModB7-2HA mit einem spezifischen Antiserum

Lysate von wtMCMV-GFP (erste Spur) oder MCMV-GFPm147HA (zweite Spur) infizierten RAW264.7-Zellen wurden nach 24-Stündiger Infektionsdauer hergestellt. Der Nachweis des modB7-2 oder modB7-2HA-Proteins erfolgte mit dem beschriebenen Kaninchenantiserum.

3.2.1.6 Einfluss des Epitoptags auf die

Funktionalität von modB7-2

Für die weitere Verwendung des MCMV-GFPm147HA-Virus in der Immunfluoreszenz oder ggf. Immunpräzipitation, war es von entscheidender Bedeutung, ob das mit dem Epitoptag versehene ModB7-2-Protein funktionell war. Aus diesem Grunde wurde untersucht, ob das modB7-2HA-Protein in der Lage ist, die Reduzierung von CD86 auf der Oberfläche von RAW264.7-Zellen zu induzieren. Wie in der Abb. 34 ersichtlich, konnte in den mit MCMV-GFPmodB7-2HA-Virus infizierten Zellen eine Herunterregulierung von CD86 beobachtet werden, die der von wtMCMV-GFP ausgelösten entsprach. Folglich ist das mit einem HA-Epitoptag versehene ModB7-2HA-Protein im Hinblick auf die Reduktion der CD86-Expression vollständig funktionsfähig.

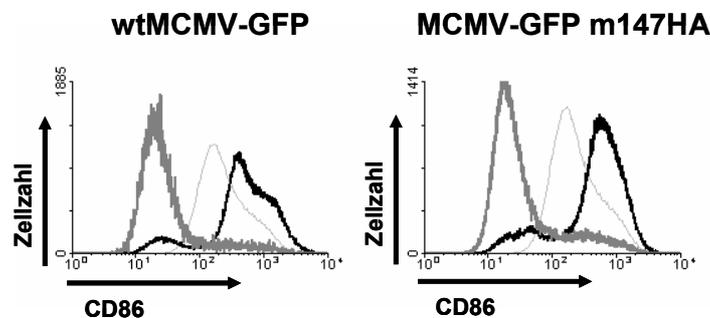


Abb. 33: Durchflusszytometrische Analyse von wtMCMV-GFP und MCMV-GFP m147HA-infizierten RAW264.7-Zellen

RAW264.7-Zellen wurden mit den angegebenen MCMV-Viren infiziert und 24 Stunden p.i. mit Hilfe der FACS-Analyse auf ihre Expression von CD86 untersucht. Schwarze Linien: GFP-negative Zellen, graue Linien: GFP-positive Zellen der gleichen Kultur, hellgraue Linien: Expression von CD86 auf nicht-infizierten Zellen.

3.2.1.7 Einfluss von modB7-2 auf andere Zelloberflächenproteine

Vollständig ausgereifte, aktivierte Antigen-präsentierende Zellen exprimieren CD40, CD80, CD86, MHC I und MHC II auf ihrer Oberfläche. Es ist möglich, dass ModB7-2 die Expression mehrerer Zelloberflächenmoleküle gleichzeitig beeinflusst oder dass der Effekt spezifisch für das Protein CD86 ist. Um diese Frage zu klären, wurden Antigen-präsentierende Zellen mit der MCMV-GFP Δ modB7-2-Mutante infiziert, die einen Funktionsausfall für die Herunterregulierung von CD86 zeigt. Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen verschiedene Zelloberflächenproteine gefärbt und die Menge der gebundenen Antikörper mit dem Durchflusszytometer bestimmt.

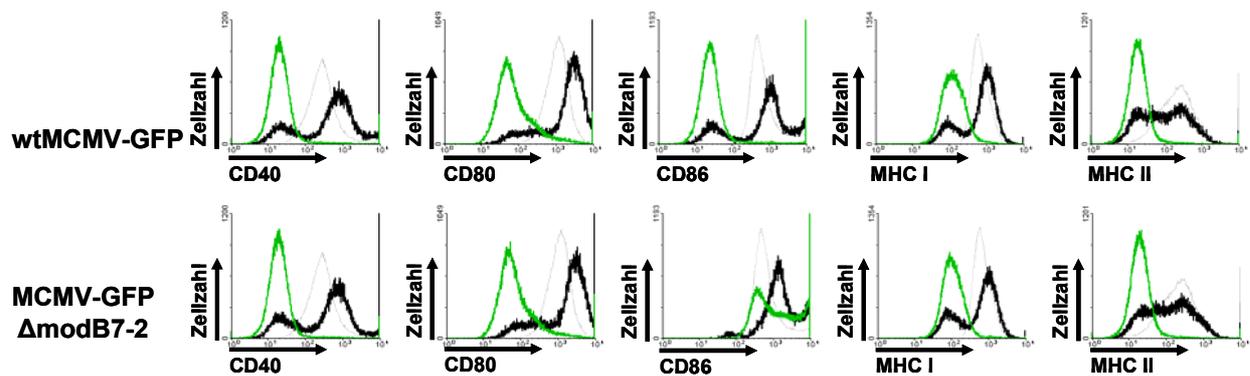


Abb. 34: Durchflusszytometrische Analyse von MCMV-GFP Δ modB7-2 infizierten RAW-Zellen

RAW264.7-Zellen wurden mit den angegebenen Viren infiziert und 24 Stunden p.i. die Expression der jeweiligen Zelloberflächenproteine untersucht. Graue Linien: nicht-infizierte RAW. Schwarze Linien GFP-negative Zellen der infizierten Kultur. Grüne Linien GFP-positive Zellen der infizierten Kultur.

Der Vergleich der Histogramme in denen die mit MCMV-GFP Δ modB7-2 infizierten Zellen dargestellt sind (Abb. 35, untere Reihe), mit den mit wtMCMV-GFP-infizierten Zellen (Abb. 35 obere Reihe) zeigte, dass die GFP-positiven Zellen, die mit der Δ modB7-2-Mutante infiziert waren die gleiche Reduzierung der Fluoreszenz von CD40, CD80, MHC I und MHC II aufwiesen, wie die mit wtMCMV-GFP-infizierten Zellen. Daraus wurde geschlossen, dass das Δ modB7-2-Virus in gleichem Maße wie das Wildtypvirus in der Lage ist, die Expression von CD40, CD80, MHC I und MHC II zu beeinflussen. Folglich ist der von modB7-2 induzierte Effekt unter den untersuchten Zelloberflächenmolekülen spezifisch für CD86.

3.2.2 Die Identifizierung des für die Herunterregulierung von CD40 verantwortlichen Gens

3.2.2.1 Die Identifizierung des Gens m155

Die Untersuchungen zur Identifizierung des für die Reduktion von CD40 auf APC verantwortlichen Gens wurden durch die variable Expression von CD40 auf den RAW264.7-Zellen erschwert. Da bei den durchgeführten Analysen mit der Durchflusszytometrie keine Standardisierung erfolgte, wurde das Gerät bei jedem Versuch erneut eingestellt und die Versuche erlaubten lediglich einen Vergleich der Proteinexpression von verschiedenen Proben innerhalb einer Messung. Die Einstellung erfolgte immer auf die unter Material und Methoden beschriebene Weise, bei der die ungefärbten Zellen als eine für alle Fluoreszenzen negative Population definiert wurden. Bei jeder Analyse von MCMV-Mutanten wurde der durch ein Wildtypvirus hervorgerufene Phänotyp mit untersucht. Dadurch wurde ein Vergleich der maximalen

3. Ergebnisse

Reduktion der Expression, welche vom Wildtypvirus ausgelöst wird, mit dem von einer eventuellen *Loss-of-function*-Mutante ausgelösten Phänotyp ermöglicht. War die Proteinexpression bei einer Messung jedoch grundsätzlich niedrig, konnte auch durch das Wildtypvirus nur eine geringfügige Reduktion ausgelöst und gemessen werden. In einigen Fällen war die Expressionsmenge von CD40 so niedrig, dass ein eindeutiger Nachweis der Herunterregulierung durch das Wildtypvirus nicht möglich war. In der Abb. 36 sind FACS-Analysen von RAW264.7-Zellen derselben Linie dargestellt, die zu zwei verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt wurden. Bei dem unter A gezeigten Versuch lag die Fluoreszenzintensität der nicht-infizierten RAW264.7-Zellen bei 10^1 (hellgraue Kurve) und damit sehr niedrig. Die GFP-negativen Zellen der MCMV-infizierten Population (links wtMCMV-GFP infiziert, rechts MCMV-GFP Δ 6 infiziert) zeigten eine etwas höhere Fluoreszenzintensität, die ca. bei $10^{1,5}$ lag. Die Fluoreszenzintensität der GFP-positiven, infizierten Zellen der wtMCMV-GFP-infizierten Population (linkes Bild) lag bei 10^1 und somit betrug die durch die wtMCMV-ausgelöste Reduktion der Fluoreszenzintensität nur etwa 0,5 Zehnerpotenzen. Da durch das MCMV-GFP Δ 6-Virus keinerlei Reduktion induziert wurde, kann davon ausgegangen werden, dass der volle Effekt auch in einem solchen Versuch hervorgerufen wurde, dieser allerdings aufgrund der niedrigen CD40-Expression kaum nachweisbar war. Bei dem unter B gezeigten Versuch lag die Fluoreszenz der nicht-infizierten Zellen mit $10^{2,5}$ wesentlich höher. Die durch die Infektion mit den beiden Viren (links wtMCMV-GFP infiziert, rechts MCMV-GFP Δ 6) ausgelösten Effekte waren jedoch aufgrund des deutlich höheren Grundniveaus besser nachweisbar.

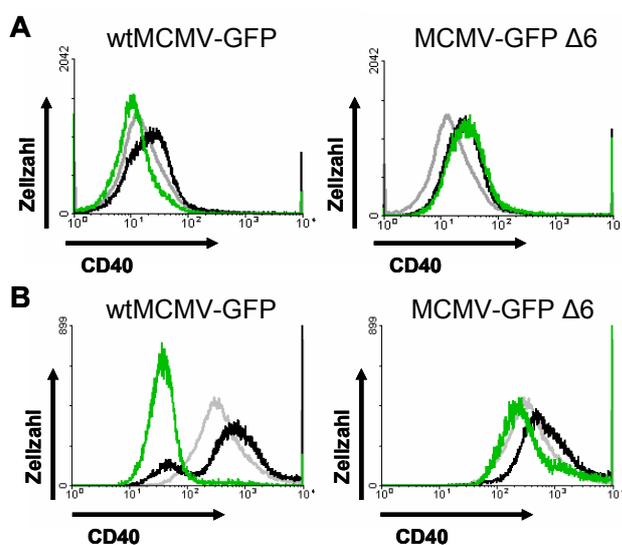


Abb. 35: Expression von CD40 auf RAW264.7-Zellen und ihre Beeinflussung durch wtMCMV-GFP und MCMV-GFP Δ 6

RAW264.7-Zellen wurden mock infiziert (hellgraue Kurve), mit wtMCMV-GFP oder mit MCMV-GFP Δ 6 infiziert und die Expression von CD40 24 Stunden p.i. mittels FACS-Analyse ermittelt. Schwarze Kurve: GFP-negative Zellen, Graue Kurve: GFP-positive Zellen. A und B stellen zwei verschiedene Versuche dar, die an unterschiedlichen Tagen durchgeführt wurden.

3. Ergebnisse

Da die Schwankungen der Proteinexpression von CD40 die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse deutlich erschwerte, wurde versucht, sie durch die Variierung der Kultivierungsbedingungen konstanter zu halten. Diese Veränderungen betrafen die Stimulation der Zellen mit LPS, eine Variation der Zelldichte vor und/oder während der Infektion, das Ausprobieren von unterschiedlichen Infektionsdauern und Herstellungsbedingungen für das Virus. Die Variation dieser Parameter hatte keinen reproduzierbaren Einfluss auf die Variabilität. Da es nicht gelang, die Expressionsmenge von CD40 zu standardisieren, wurde für die Verwendbarkeit eines Versuches eine messbare Herunterregulierung von CD40 durch wtMCMV-GFP vorausgesetzt.

Zur Identifikation des für die Reduktion der CD40-Expression verantwortlichen Gens wurde das gleiche Prinzip angewandt, was zur Entdeckung von modB7-2 geführt hatte, indem der für die Herunterregulierung von CD40 verantwortliche Bereich weiter eingegrenzt wurde. Den Ausgangspunkt hierfür bildete die Beobachtung, dass die GFP-positiven, mit der Mutante MCMV-GFP Δ 6S3 infizierten RAW264.7-Zellen einen *Loss-of-function* Phänotyp zeigten (Kapitel 1 Abb. 19). In dieser Mutante wurden die Gene m154 bis m157 entfernt, die somit als verantwortlich für die Reduktion von CD40 auf APC in Frage kamen. Im Folgenden wurden MCMV-Mutanten hergestellt, in denen die einzelnen ORFs dieses Bereiches deletiert wurden (Abb. 36 oben) und auf ihren Effekt bezüglich der Expression von CD40 untersucht (Abb. 36 unten). Die Ergebnisse verdeutlichten, dass die Infektion mit dem Δ m155-Virus nur eine partielle Reduktion der CD40-Expression nach sich zog. Dies wurde besonders durch den direkten Vergleich der durch das wtMCMV-GFP und MCMV-GFP Δ m155 ausgelösten Effekte verdeutlicht (Abb. 36 unteres, rechtes Histogramm). Im Gegensatz hierzu wiesen die mit den Deletionsmutanten MCMV-GFP Δ m154, MCMV-GFP Δ m156 und MCMV-GFP Δ m157-infizierten RAW264.7-Zellen eine dem Wildtypphänotyp entsprechende Verminderung der CD40-Expression auf. Dieser Versuch dokumentierte, dass die Deletion des ORFs m155 eine verminderte Reduktion der CD40-Expression nach sich zieht. Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass das Gen m155 an dem durch das Wildtypvirus ausgelösten Phänotyp in Bezug auf CD40 beteiligt ist.

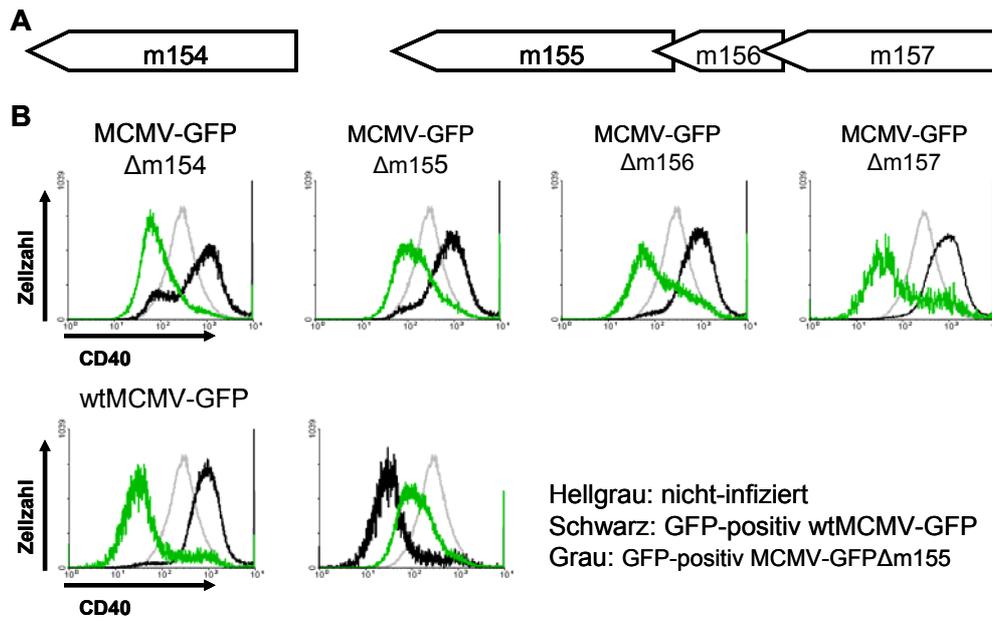


Abb. 36: Anordnung der ORFs m154 bis m157 und durchflusszytometrische Analyse der Zellen nach Infektion mit den verschiedenen Deletionsmutanten

A) Die ORFs der Region Δ 6S3 (m154-m157) sind auf dem Gegenstrang angeordnet und überlappen teilweise. Es wurden Deletionsmutanten hergestellt, in denen jeweils die nicht-überlappenden Teile der ORFs entfernt wurden, und für die Infektion von RAW-Zellen verwendet. Die FACS-Analyse der infizierten Zellen bezüglich der Expression von CD40 ist unter B) dargestellt. Schwarz: nicht-infizierte Zellen, grau: infizierte Zellen.

3.2.2.2 Das Gen m155 hat einen Effekt auf die Expression von CD40

Der im vorhergehenden Versuch beobachtete intermediäre Phänotyp zeigte deutlich, dass der ORF m155 nicht das einzige an der Reduktion der Expression von CD40 beteiligte MCMV-Gen ist, jedoch auf jeden Fall für einen Teil des beobachteten Wildtypphänotyps verantwortlich ist. Um einen weiteren Nachweis für die Beteiligung der Region ORF m155 an dem vollständigen Wildtypphänotyp zu erbringen, wurde der ORF in das Genom der MCMV-GFP Δ 6 inseriert. In diese Deletionsmutante mit *Loss-of-function* Phänotyp wurden die Sequenzen des m155 ORF unter Kontrolle eines MIEP-Promotors inseriert und der Einfluss der entstandenen Mutante MCMV-GFP Δ 6m155MIEP auf die Expression von CD40 mittels Durchflusszytometrie untersucht.

Der Vergleich der CD40-Expression von wtMCMV-GFP und MCMV-GFP Δ 6-infizierten Zellen dokumentierte eine starke Reduktion in den wtMCMV-GFP-infizierten Zellen, die bei den MCMV-GFP Δ 6- und MCMV-GFP Δ 6S3-infizierten Zellen nicht auftrat (Siehe Abb. 38B Histogramme 1, 2 und 3). Eine dem Wildtypphänotyp ähnliche Reduktion ist bei den MCMV-GFP Δ 6m155MIEP-infizierten Zellen im letzten Histogramm der Abb. 40B zu beobachten. Da sich die *Gain-of-function*-Mutante MCMV-GFP Δ 6m155MIEP-

Mutante von der *Loss-of-function*-Mutante MCMV-GFP Δ 6-Mutante nur durch die eingebrachten Sequenzen unterscheidet, kann die beobachtete Verminderung der CD40-Expression nur auf ein darin lokalisiertes Gen zurückzuführen sein. Ein eindeutiger Nachweis, dass es sich hierbei um den vorhergesagten ORF m155 handelt, wurde jedoch mit diesem Experiment nicht erbracht.

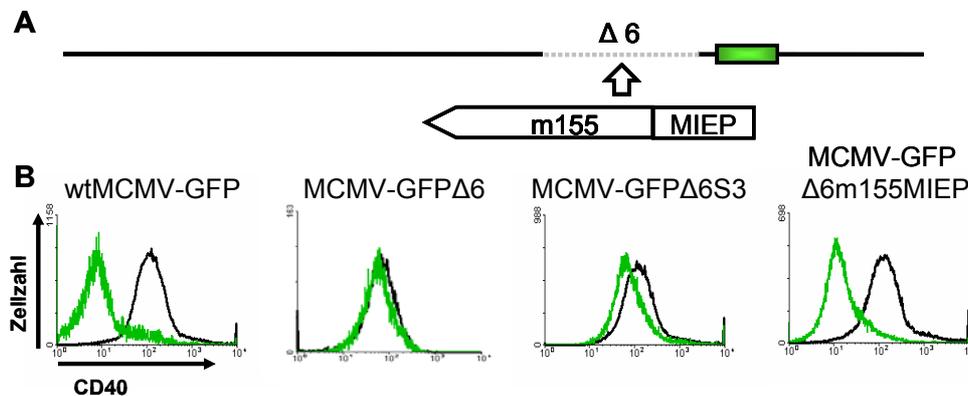


Abb. 37: Insertion des Gens m155 in das Genom der Deletionsmutante MCMV-GFP Δ 6 und durchflusszytometrische Analyse der resultierenden Mutante

Insertion des Gens m155 in die Δ 6-Deletion und Analyse des Phänotyps. Der ORF m155 wurde unter Kontrolle eines MIEP-Promotors in die Δ 6-Deletion inseriert und die erhaltene Mutante MCMV-GFP Δ 6m155MIEP zur Infektion von RAW264.7-Zellen genutzt (rechtes Histogramm). Bei der FACS-Analyse dienten wtMCMV-GFP-infizierte Zellen (linkes Histogramm) als Positivkontrolle und die Deletionsmutanten MCMV-GFP Δ 6 (zweites Histogramm von links) und MCMV-GFP Δ 6S3 als Negativkontrollen (zweites Histogramm von rechts). Schwarze Kurven: GFP-negative Zellen der infizierten Population, dunkelgraue Kurven: GFP-positive Zellen der infizierten Population.

3.2.2.3 Nachweis der Expression von m155

Nachdem die vorhergehenden Experimente eine Beteiligung der Region des ORF m155 an der Reduktion der CD40-Expression auf wtMCMV-GFP-infizierten RAW264.7-Zellen demonstriert haben, wurde als nächstes untersucht, welche Transkripte in der betreffenden Region kodiert werden. Zu diesem Zweck wurde ein Northern Blot mit cytoplasmatischer mRNA aus RAW264.7-Zellen durchgeführt, die für 24 Stunden mit wtMCMV-GFP-infiziert waren. Der Nachweis erfolgte mittels zweier radioaktiv markierter Sonden, die Sequenzen aus der Region des ORF m155 enthielten. Es handelte sich um doppelsträngige und folglich nicht strangspezifische Sonden, deren Lage in der Abb. 39 skizziert ist. Sowohl die Sonde A als auch die Sonde C detektierten eine mRNA der Größe von ca. 1,9kb. Innerhalb dieser Region wird der ORF m155 kodiert, der eine Größe von 1132 Bp hat und folglich ist es möglich, dass das Gen m155 ausgehend von dem detektierten Transkript exprimiert wird (Rawlinson *et al.*, 1996).

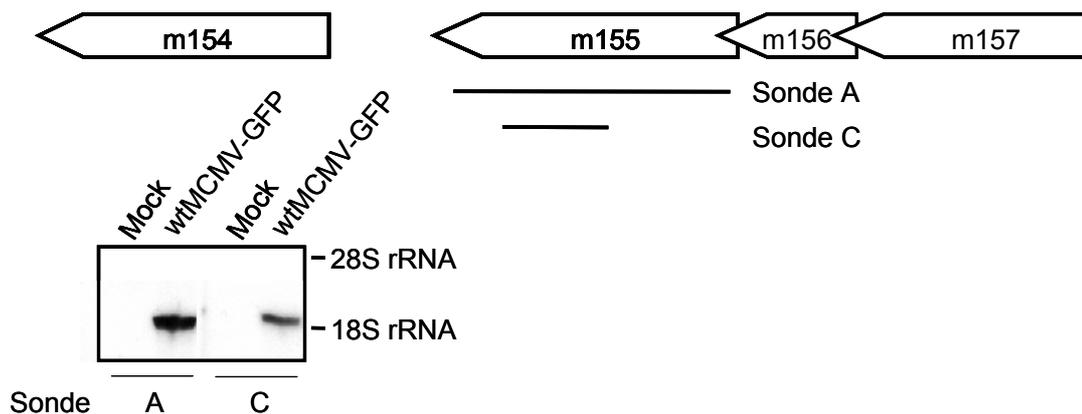


Abb. 38: Northern Blot der Region des ORFs m155

RAW264.7-Zellen wurden mit wtMCMVGFP infiziert oder Mock infiziert und die RNA 24 Stunden p.i. gewonnen. Die Hybridisierung erfolgte mit zwei Sonden, deren Lage in der oberen Abbildung skizziert ist. Die Größe der 18S rRNA beträgt 1874 Nukleotide und die der 28S rRNA 4718 Nukleotide (Elsevier and Ruddle, 1975).

3.2.2.5 Einfluss der MCMV-GFP Δ m155-Mutante auf verschiedene Zelloberflächenproteine

Mit Hilfe der vorhergehenden Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass die Region des ORFs m155 einen negativen Einfluss auf die Expression von CD40 hat. Um festzustellen, ob diese Region auch die Expression von anderen Zelloberflächenmolekülen beeinträchtigt, wurden RAW-Zellen mit einer Δ m155-Mutante infiziert und der Effekt bezüglich der Herunterregulierung verschiedener Zelloberflächenmoleküle untersucht. Falls in dieser Mutante die Expression eines Proteins gestört wurde, welches einen Effekt auf eines der analysierten Zelloberflächenproteine hat, sollte die Reduktion dieses Proteins von dem durch das Wildtypvirus ausgelösten Effekt abweichen.

Die Infektion der RAW-Zellen mit dem MCMV-GFP Δ m155 führte, wie in dem vierten Histogramm der ersten Reihe dargestellt, zu einem intermediären Phänotyp. Das heißt, dass die Reduktion zwischen dem durch das wtMCMV-GFP-Virus ausgelösten Phänotyp (erstes Histogramm der ersten Reihe) und dem durch die beiden Deletionsmutanten MCMV-GFP Δ 6 und MCMVGFP Δ 6S3 hervorgerufenen Effekt lag (Histogramme zwei und drei der ersten Reihe). Die Reduzierung von CD80 und CD86, die durch das MCMV-GFP Δ m155-Virus hervorgerufen wurde, entsprach dem Wildtypphänotyp, was in den ersten und letzten Histogrammen der Reihen zwei und

drei dargestellt ist. Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass die Region des ORF m155 keinen Einfluss auf die Expression von CD80 und CD86 hat.

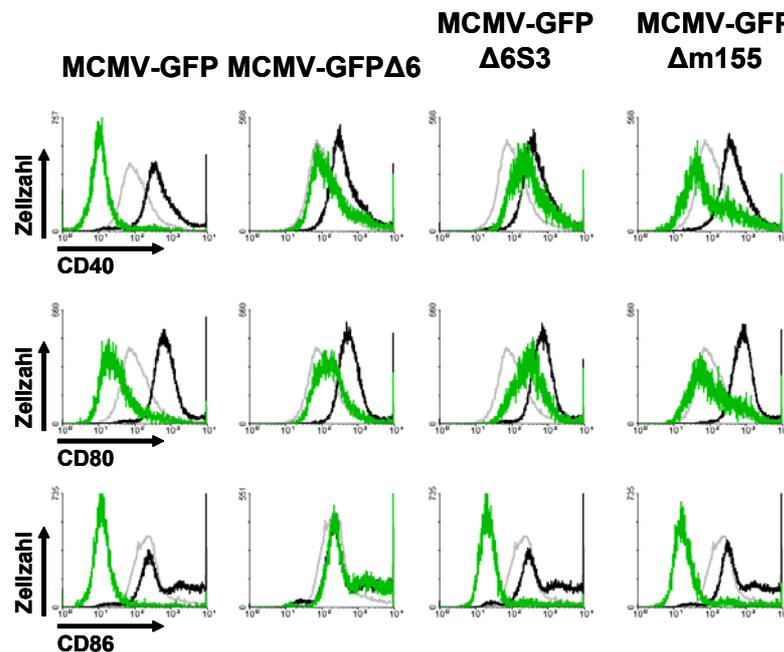


Abb. 39: Durchflusszytometrische Analyse von MCMV-GFP-infizierten RAW-Zellen

RAW264.7-Zellen wurden mit den angegebenen Viren infiziert und 24 Stunden p.i. die Expression der jeweiligen Zelloberflächenproteine untersucht. Graue Linien: nicht-infizierte RAW. Schwarze Linien: GFP-negative Zellen der infizierten Kultur. Grüne Linien: GFP-positive Zellen der infizierten Kultur.

3.3 Untersuchungen zu Effekt und Wirkungsmechanismus von modB7-2 und dem innerhalb der Region von m155 kodierten Protein

Mit den nächsten Versuchen wurde begonnen, den Mechanismus, der die reduzierte Expression von CD40 und CD86 hervorruft, zu ermitteln. Die Stellen an denen eine mögliche Einflussnahme durch die viralen Proteine stattfinden könnte sind einerseits die Proteinbildung (Transkription und Translation) und andererseits der Proteintransport an die Zelloberfläche. Dieser könnte durch ein Festhalten im Endoplasmatischen Retikulum- oder Golgi-Apparat oder eine Fehlleitung beim intrazellulären Transport, zum Beispiel in ein lysosomales Kompartiment, unterbunden werden. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass das natürliche Recycling der Proteine gestört bzw. diese statt in ein Recyclingkompartiment in ein lysosomales Kompartiment transportiert werden. Ferner ist denkbar, dass die Proteine auch während der Infektion auf der Zelloberfläche präsentiert werden, dort aber durch eine Bindung eines anderen Proteins maskiert werden und so für die Antikörper nicht mehr erkennbar sind.

3.3.2 Kinetik des Effektes

Die Kinetik des durch das Wildtypvirus ausgelösten Effektes ist eine grundlegende Eigenschaft, die mit dem vorliegenden Versuch untersucht und beschrieben werden sollte. Die bisher gezeigten FACS-Analysen wurden 24 Stunden nach Infektion durchgeführt, zu diesem Zeitpunkt ist der Phänotyp voll entwickelt und die Expression von CD40, CD80 und CD86 in den GFP-positiven, wtMCMV-GFP-infizierten Zellen deutlich reduziert. Mit dem nächsten Experiment wurde genauer untersucht, zu welchem Zeitpunkt die Infektion mit wtMCMV-GFP eine Reduktion der verschiedenen Zelloberflächenmoleküle induziert. Hierfür wurden RAW264.7-Zellen mit wtMCMV-GFP infiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten für die FACS-Analyse mit Antikörpern gegen die Zelloberflächenproteine MHC I, CD40, CD80 und CD86 gefärbt.

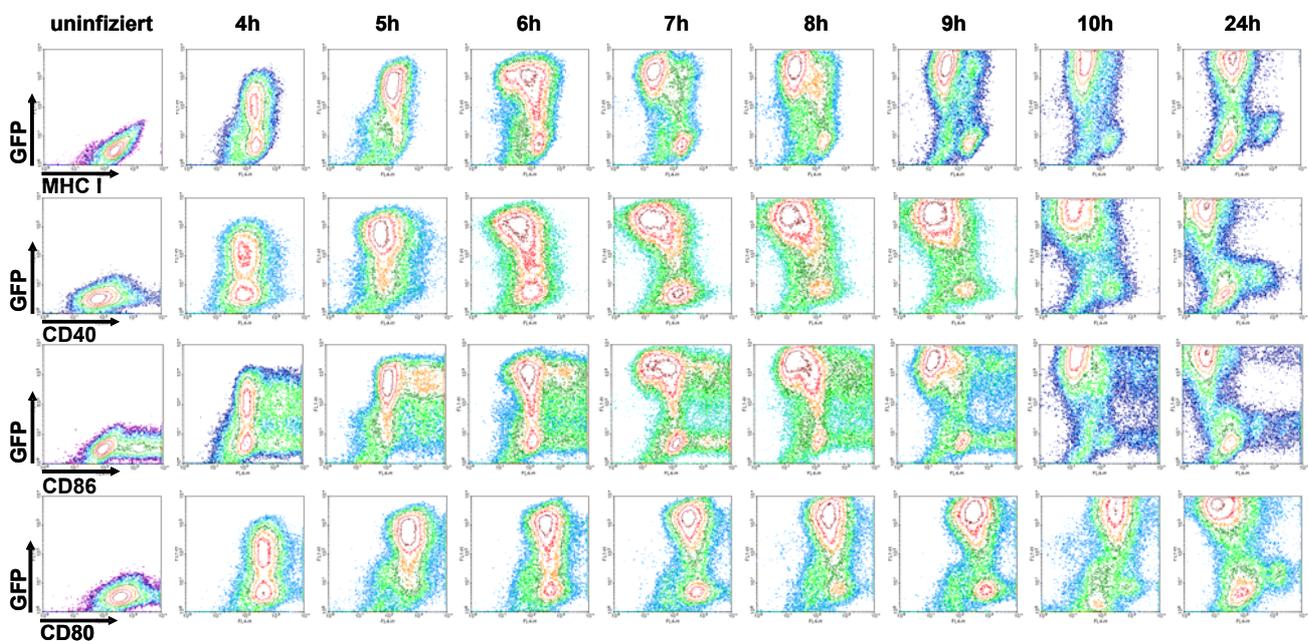


Abb. 40: Expression von Zelloberflächenmolekülen auf von für unterschiedliche Dauern infizierte RAW-Zellen

RAW264.7-Zellen wurden mit wtMCMV-GFP infiziert, für die angegebenen Dauern inkubiert und mit Hilfe der Durchflusszytometrie die Expression der angegebenen Zelloberflächenproteine untersucht. Die Färbung gibt die Menge der Zellen in der jeweiligen Position an, wobei die blauen Farben eine geringe Zellanzahl beschreibt und die grüne, rote, orange und weiße Farbe in dieser Reihenfolge eine größere Anzahl von Zellen repräsentieren.

In der Abb. 40 sind die Fluoreszenzeigenschaften der nicht-infizierten sowie der für 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 und 24 Stunden mit wtMCMV-GFP-infizierten Zellpopulationen dargestellt. Auf der Y-Achse wird hierbei die grüne Fluoreszenz (GFP) der Zelle gezeigt und auf der

3. Ergebnisse

X-Achse die Fluoreszenz der gebundenen Antikörper. Die nicht-infizierten Zellen (linke Abbildungen) wiesen keine GFP-Fluoreszenz und eine unterschiedlich starke Fluoreszenz der verschiedenen Antikörper auf, die um den Wert 10^2 lagen. Nach einer vierstündigen Infektion lag eine Zellpopulation auf der Y-Achse auf der Höhe von 10^2 - 10^3 und wies somit eine Grünfluoreszenz auf. Diese Population war folglich mit wtMCMV-GFP-infiziert und in den Zellen wurde das eGFP-Gen exprimiert. Diese GFP-positive Zellpopulation lag auf der X-Achse direkt über der GFP-negativen Population und wies somit die gleiche Expression der verschiedenen Zelloberflächenproteine auf, wie die uninfizierten, GFP-negativen Zellen. Dies traf ebenfalls für die Infektionsdauer von fünf Stunden zu. Bei einer Infektionsdauer von sechs Stunden konnte in den oberen beiden Abbildungen (Färbung mit Anti-MHC I-Antikörper und Anti-CD40-Antikörper) eine Linksverschiebung von einem Teil der GFP-positiven Population beobachtet werden. Die Fluoreszenzintensität dieses Teils der Population ist geringer als die der restlichen GFP-positiven und der GFP-negativen Population, was auf eine reduzierte Expression der Zelloberflächenproteine MHC I und CD40 in diesen Zellen zurück zu führen ist. Die für sieben Stunden infizierten Zellen wiesen eine reduzierte Expression von MHC I, CD40 und CD86 auf, wobei die Reduktion von CD40 und MHC I jetzt bereits für einen großen Teil der GFP-positiven Zellen zutraf. Die Färbung mit Anti-CD86-Antikörper war hingegen nur auf einem Teil der GFP-positiven Zellen schwächer ausgeprägt, als auf dem Rest der Population. Neun Stunden nach Infektion war die Expression von CD40 und CD86 in der gesamten GFP-positiven Population reduziert, während die Menge von MHC I und CD80 auf den infizierten Zellen der auf den nicht-infizierten Zellen gleich. Nach neunstündiger Infektion war die Reduktion der Zelloberflächenexpression von CD40 und CD86 voll ausgeprägt.

Es konnte in dieser Analyse ein unterschiedlicher zeitlicher Ablauf der Beeinflussung von CD40 und CD86 beobachtet werden, da die CD40-Expression bereits nach sechs Stunden in einigen Zellen reduziert wurde, der erste Effekt auf CD86 jedoch erst nach sieben Stunden nachweisbar war.

Das erlangte Wissen um die Kinetik der MCMV-vermittelten Reduktion von Zelloberflächenproteinen bildet eine Basis, um in weiteren Untersuchungen einzelne mögliche Wirkmechanismen auszuschließen. Ein erster Versuch bezog sich auf die Möglichkeit, dass die Blockierung von Proteinsynthese die Basis für den beobachteten Phänotyp bildet.

3.3.1 Einfluss der Blockierung von Proteinsynthese auf die Zelloberflächenexpression von CD40 und CD86

Für die Neubildung von Protein ist eine funktionierende Transkription und Translation notwendig, die möglicherweise durch die viralen Proteine gezielt gestört wird. Damit eine solche Blockierung des Proteinnachschubs zu dem beobachteten Phänotyp führt, müsste der natürliche Abbau der Proteine zu der beobachteten Reduktion der Expression führen, unter der Voraussetzung, dass dies der einzige Mechanismus ist, der für das Auslösen des Phänotyps verantwortlich ist. An dieser Stelle wurde untersucht, ob der beobachtete Phänotyp durch eine Blockierung der Proteinneusynthese hervorgerufen werden konnte. Hierfür wurde die Proteinsynthese durch die Zugabe von Cycloheximid für neun Stunden unterbunden und mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht, ob dies zu einer Reduzierung der Expression von CD40 und CD86 auf der Oberfläche der behandelten Zellen führte.

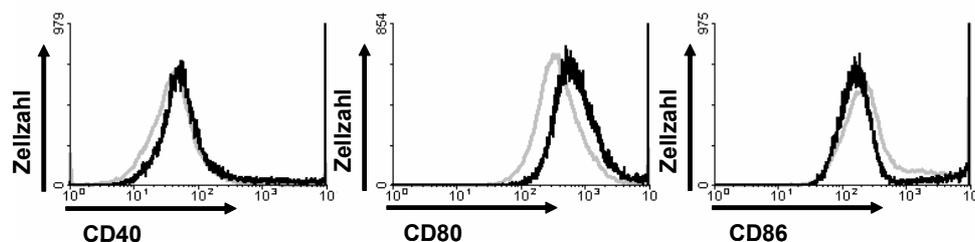


Abb. 41: Einfluss der Blockierung der Proteinneusynthese auf einige Zelloberflächenproteine

RAW264.7-Zellen wurden entweder 0 h (grau) oder 9 h (schwarz) mit Cycloheximid inkubiert und die Expression der Zelloberflächenproteine untersucht.

In der Abb. 41 ist die Expression der untersuchten Proteine auf für 0 Stunden (graue Linien) und für neun Stunden mit Cycloheximid inkubierten RAW264.7-Zellen (schwarze Line) dargestellt. Die Fluoreszenzintensität und damit die Proteinexpression zeigte in keinem der untersuchten Fälle eine signifikante Reduzierung, im Fall von CD80 fand sogar eine leichte Induzierung statt.

Diese Untersuchungen belegten, dass die Aufrechterhaltung der Zelloberflächenexpression der untersuchten Proteine für die Dauer von neun Stunden ohne Proteinneusynthese möglich ist. Da der durch die MCMV-Infektion induzierte Effekt nach neun Stunden bereits voll ausgeprägt ist, kann die Inhibierung der Transkription und Translation von CD40 und CD86 nicht die alleinige Basis für die Ausprägung des Phänotyps darstellen. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die

Blockierung der Proteinneubildung einen von mehreren Mechanismen darstellt, die in ihrer Gesamtheit zu der beobachteten Reduktion führen.

3.3.3 Einfluss einer MCMV-Infektion auf den sekretorischen Apparat und die Menge und Verteilung von Proteinen in Antigen-präsentierenden Zellen

Eine weitere Möglichkeit, wie der beobachtete Phänotyp hervorgerufen werden könnte, ist die Blockierung von Proteintransport durch das Endoplasmatische Retikulum (ER) und/oder den Golgi-Apparat. Eine solche Blockierung kann unter anderem durch eine Umstrukturierung der Kompartimente erreicht werden. Um zu untersuchen, ob die Infektion mit MCMV einen Einfluss auf die Struktur des endoplasmatischen Retikulums und den Golgi-Apparat von Antigen-präsentierenden Zellen hat, wurden DC2.4-Zellen mit wtMCMV-GFP infiziert und mit Antikörpern gegen ein Protein des ER-cis-Golgi Kompartiments, den KDEL-Rezeptor, gefärbt. Die Verwendung des wtMCMV-GFP-Virus erlaubte die Unterscheidung von infizierten (GFP-positiven) und nicht-infizierten (GFP-negativen) Zellen.

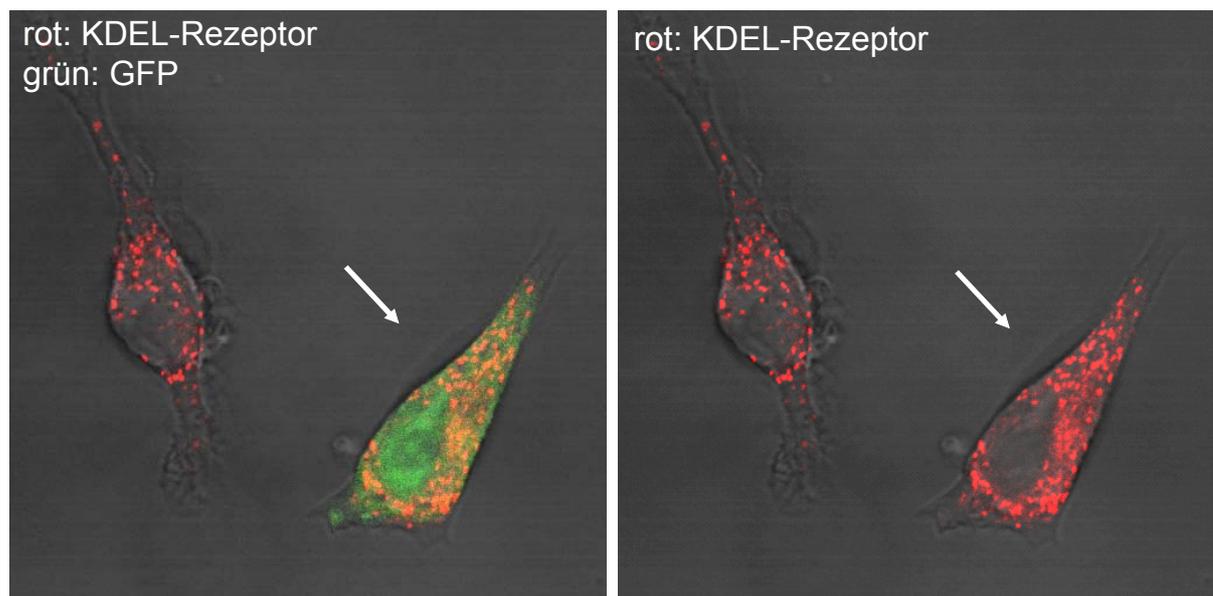


Abb 42: Einfluss der MCMV-Infektion auf den ER/Cis-Golgi Apparat

DC2.4-Zellen wurden mit Antikörpern gegen den KDEL-Rezeptor gefärbt. In der linken Abbildung wurden der rote und der grüne Kanal dargestellt und in der rechten Abbildung nur der rote Kanal.

In beiden Bildern der Abb. 42 sind links eine nicht-infizierte und rechts eine MCMV-infizierte Zelle dargestellt. Die Verteilung des KDEL-Rezeptors ist in rot gezeigt. Ein Vergleich der Verteilung des KDEL-Rezeptors in infizierten und nicht-infizierten Zellen

zeigt, dass keine wesentlichen Unterschiede zwischen diesen beiden Zellen bestehen und folglich das ER bzw der Cis-Golgi-Apparat auch in infizierten Zellen strukturell intakt sind.

Nachdem zunächst der Einfluss einer MCMV-Infektion auf den sekretorischen Apparat von APC betrachtet wurde, wurden in den nächsten Versuchen die intrazelluläre Lokalisierung der beiden zellulären Proteine CD40 und CD86 und der Einfluss einer MCMV-Infektion hierauf genauer analysiert. Die bisherigen Ergebnisse basieren auf FACS-Analysen, die lediglich die Quantifizierung von Protein auf der Oberfläche von Zellen ermöglicht und Infolgedessen sie keine Aussage über innerhalb der Zelle vorhandene Proteine erlaubt. Mit Hilfe der Färbung von CD40 und CD86 in permeabilisierten MCMV-infizierten Zellen sollte nun festgestellt werden, ob die Infektion einen Einfluss auf die intrazellulär vorhandene Proteinmenge hat. Da dies keine quantitative Methode ist, begrenzt sich diese Aussage auf eine An-oder Abwesenheit von Protein. Weiterhin wurde die Lokalisierung der zellulären Proteine betrachtet, um eventuell vorhandene Unterschiede zwischen infizierten und nicht-infizierten Zellen festzustellen. Da es Hinweise auf ein für APC spezifisches Kompartiment gibt, in dem CD86 und MHC II gemeinsam aufbewahrt bzw. transportiert werden, wurde MHC II in diese Untersuchungen mit einbezogen (Geuze, 1998; Kleijmeer *et al.*, 1997; Peters *et al.*, 1995). Hierfür wurden DC2.4-Zellen mit wtMCMV-GFP infiziert, zu einem Zeitpunkt an dem die Reduktion der Zelloberflächenproteine seinen Maximalwert erreicht hat fixiert, permeabilisiert und mit Antikörpern gegen CD40, CD86 und MHC II gefärbt.

In Abb. 43 sind eine nicht-infizierte und eine mit wtMCMV-GFP infizierte Zelle (mit Pfeil gekennzeichnet) dargestellt, die mit Antikörpern gegen CD40 (obere Abbildungen), CD86 (mittlere Abbildungen) und MHC II (untere Abbildungen) gefärbte wurden. Bei den nicht-infizierten Zellen zeigten die Proteine eine vesikuläre Verteilung, die sich über die ganze Zelle erstreckte. Besonders im Fall von CD86 gab es eine Konzentrierung in der Nähe des Zellkerns. In allen drei Fällen konnte auch in den infizierten Zellen noch Protein detektiert werden. Ferner wurde deutlich, dass die infizierten und nicht-infizierten Zellen auch bezüglich der Lokalisierung der Proteine CD40, CD86 und MHC II vergleichbar waren. Folglich konnte für keines der untersuchten zellulären Proteine eine Umlokalisierung oder eine detektierbare Reduzierung der Menge nachgewiesen werden.

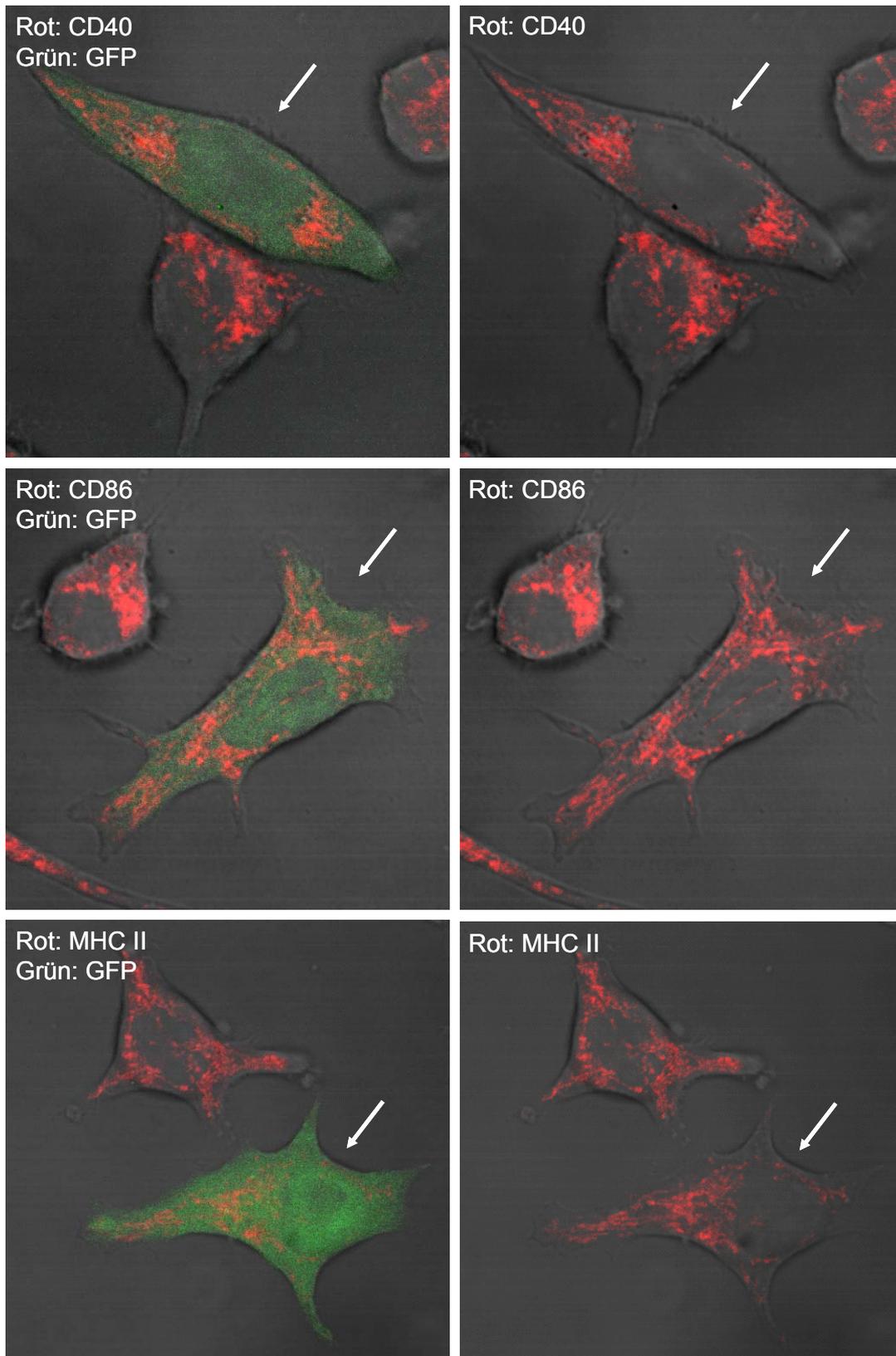


Abb. 43: Intrazelluläre Lokalisierung von CD40, CD86 und MHC II in wtMCMV-GFP-infizierten und nicht-infizierten DC2.4-Zellen

DC2.4-Zellen wurden mit wtMCMV-GFP und 24 Stunden p. i. mit Antikörpern gegen CD40 (oben), CD86 (Mitte) und MHC II (unten) gefärbt. In den linken Abbildungen wurden der rote und der grüne Kanal dargestellt und in den rechten Abbildungen nur der rote Kanal

3. Ergebnisse

Im nächsten Experiment wurde der Recyclingweg von CD40 und CD86 sowie deren in nicht-infizierten DC2.4-Zellen untersucht. Einige der auf der Zelloberfläche von Antigen-präsentierenden Zellen exprimierten Proteine stehen in einem ständigen Kreislauf der Internalisierung und erneutem Transport an die Zelloberfläche, dies trifft besonders auf Rezeptoren zu, die mit ihrem Liganden endozytiert und dann recycelt werden (Herbst *et al.*, 1994). Ein ebenfalls einem solchen Kreislauf unterliegendes Protein ist der Transferrin-Rezeptor, der das eisenbeladene Transferrin-Protein bindet, über den clathrinabhängigen Weg der rezeptorvermittelten Endozytose internalisiert und in ein *early sorting Endosome* transportiert wird (Fan, Carpentier, 1982). Im *early sorting Endosome* wird das Eisen entlassen und der Transferrin/Transferrin-Rezeptorkomplex akkumuliert sich in einem Recyclingkompartiment, von wo er wieder an die Zelloberfläche transportiert wird. Folglich ist der Transferrin-Rezeptor auf der Zelloberfläche oder in zelloberflächennahen Vesikeln (*early sorting Endosome* und Recyclingkompartiment) nachweisbar. In dem vorliegenden Experiment wurde untersucht, ob die Proteine CD40 und CD86 eine Kolokalisierung mit dem Transferrin-Rezeptor aufweisen. Dies würde darauf hindeuten, dass CD40 und CD86 durch die *early sorting Endosome* und/oder das Recyclingkompartiment transportiert werden und die rezeptorvermittelte Endozytose bei deren Internalisierung eventuell eine Rolle spielt.

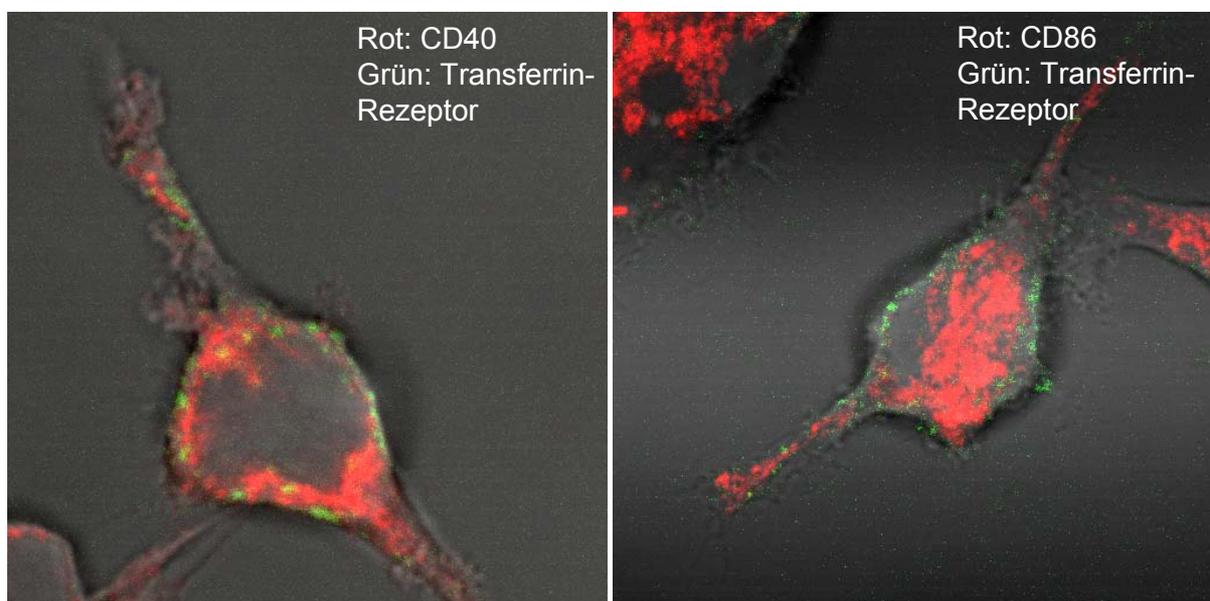


Abb. 44: Lokalisierung des Transferrin-Rezeptors und CD40 bzw. CD86 in dendritischen Zellen

DC2.4-Zellen wurden mit Antikörpern gegen CD 40 (links, rot) und CD86 (rechts, rot) sowie den Transferrin-Rezeptor (grün) gefärbt.

3. Ergebnisse

Wie auf Abb. 45 ersichtlich, ist die Hauptmenge von CD40 und CD86 in vesikulären Strukturen im Inneren der Zelle zu sehen. Es konnte keine ausgeprägte Kollokalisierung zwischen CD40 und CD86 und dem Transferrin-Rezeptor nachgewiesen werden. Es ist folglich anzunehmen, dass weder CD40 noch CD86 den gleichen Weg der rezeptorvermittelten Endozytose und den Transport in Recyclingkompartimente nehmen, wie der Transferrin-Rezeptor. Die vorliegenden Untersuchungen sind hierfür jedoch nur ein erster Hinweis, da die Sensitivität von Antikörperfärbungen nur den Nachweis von einer bestimmten Proteinmenge zulässt. Falls die Proteine CD40 und CD86 jedoch nur eine kurze Verweildauer in den genannten Kompartimenten haben bzw. nur eine geringe Proteinmenge internalisiert wird, ist ein Nachweis der Kollokalisierung von CD40 und CD86 mit dem Transferrin-Rezeptor mit der hier genutzten Methode nicht möglich.

4. Diskussion

Die Infektion von Antigen-präsentierenden Zellen mit MCMV ruft weitreichende Veränderungen hervor. So wird die Expression von Zelloberflächenproteinen und die Sekretion von Zytokinen negativ beeinflusst und die Funktion der Zellen ist gestört (Andrews *et al.*, 2001; Mathys *et al.*, 2003). Aufgrund der wichtigen Bedeutung die Antigen-präsentierenden Zellen bei der Initiation einer Immunantwort zukommt, ist die Identifizierung und Charakterisierung der MCMV-Gene, die diesen Phänotyp hervorrufen, von großem Interesse.

Um diese Fragestellung bearbeiten zu können, wurde ein geeignetes Screeningsystem etabliert, mit dem zwei verschiedene virale Gene eingegrenzt und schließlich identifiziert wurden. Weiterhin wurde eine erste Charakterisierung der Genprodukte vorgenommen und die Analyse des Wirkungsmechanismus begonnen.

4.1 Screening von MCMV-Mutanten zur Identifizierung von immunmodulatorischen Genen

Die Basis für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen bildete die Beobachtung, dass die Infektion von Antigen-präsentierenden Zellen mit Wildtyp-MCMV (wtMCMV) zu einer Reduktion der Zelloberflächenproteine MHC I und MHC II sowie CD40, CD80 und CD86 führt, die durch virale Gene hervorgerufen wird. Für die Identifizierung dieser Gene wurde ein genetisches Verfahren gewählt, indem MCMV-Mutanten hergestellt und für die Infektion von APC verwendet wurden. Falls eines der Gene, welche die Expression von Zelloberflächenmolekülen beeinträchtigt, in einer Mutante zerstört wurde, sollte in den mit dieser Mutante infizierten APC die Reduktion des Zelloberflächenproteins nicht mehr stattfinden. Dementsprechend ließen sich die für die Herunterregulierung von Zelloberflächenproteinen verantwortlichen viralen Gene anhand eines *Loss-of-Function* Phänotyps einer Mutante identifizieren.

Für die Quantifizierung von Oberflächenproteinen auf Zellen wurde die durchflusszytometrische Analyse eingesetzt. Sie ermöglicht den Vergleich mehrerer Eigenschaften innerhalb eines Versuchs, zum Beispiel die An- oder Abwesenheit von GFP, einem Zelloberflächenprotein und eine Färbung mit Propidiumiodid, welche die Identifizierung und den Ausschluss von toten Zellen erlaubt. Die Methode ermöglicht einen großen Probendurchsatz, die Analyse einer großen Anzahl von Zellen in einer

Probe und ist gut reproduzierbar. Eine Alternative zu dieser Methode, welche ebenfalls einen Nachweis von Zelloberflächenproteinen ermöglicht, ist eine Oberflächenfärbung mit der Immunfluoreszenz. Diese Methode ist bei einer größeren Anzahl von Proben in der Durchführung relativ aufwendig und ermöglicht in der Auswertung nur den Vergleich von einer geringen Anzahl Zellen auf An- oder Abwesenheit von Protein.

Weiterhin ist für eventuell auftretende intermediäre Phänotypen eine quantitative Analyse erforderlich. Bei der Immunfluoreszenz ist diese nur mit einem Mikroskop möglich, das über eine aufwendige Auswertungssoftware verfügt. Bei der durchflusszytometrischen Analyse von Zellen hingegen wird immer eine große Anzahl Zellen analysiert und die relative Proteinexpression verschiedener Zellpopulationen verglichen.

Das in dieser Arbeit verwendete Screeningverfahren erforderte die Herstellung von MCMV-Mutanten. Für die Mutagenese von BAC-Molekülen und damit auch des MCMV-Genoms standen verschiedene Methoden zur Verfügung, die sich grundlegend unterscheiden.

Eine Möglichkeit ist die zufällige Mutagenese des MCMV-Genoms durch die Insertion von Transposons. Mit dieser Methode haben Brune et al 2001 eine Bibliothek von 199 Transposonmutanten hergestellt, die in verschiedenen Screeningverfahren erfolgreich für die Identifizierung von viralen Genen herangezogen wurde (Brune *et al.*, 1999b; Brune *et al.*, 2001; Brune *et al.*, 2003).

Eine weitere Möglichkeit ist die Herstellung von Mutanten mit großen, definierten Deletionen in nicht-essentiellen Genombereichen, wie sie in dieser Arbeit zur Anwendung gekommen ist. Aufgrund der Sequenzierung der Genome von HCMV und MCMV wurden Kenntnisse über homologe und damit wahrscheinlich essentielle Gene beider Genome gewonnen. Dadurch war es möglich, in die Bereiche der nicht-essentiellen Gene Deletionen einzubringen. Die neun hergestellten Mutanten deckten einen Großteil der als nicht-essentiell vermuteten Bereiche ab.

Alternativ kann eine gezielte Injektion von Plasmiden, die Teile des MCMV-Genoms tragen, in eukaryotische Zellen vorgenommen werden. Bei einer Anwendung dieser Methode auf die vorliegende Fragestellung würde die Reduktion der Zelloberflächenmoleküle auftreten, wenn das injizierte Plasmid die für das Auslösen des Phänotyps erforderlichen Sequenzen beinhaltet. Diese Methode wurde bereits für die Identifizierung eines MCMV-Gens verwendet, das die Zurückhaltung von MHC I-

Molekülen im endoplasmatischen Retikulum von infizierten Zellen verursacht (Thale *et al.*, 1995).

Die Verwendung einer Transposon-Mutanten-Bibliothek bietet den Vorteil, dass mit einer MCMV-Mutante, die den Ausfall eines Phänotyps zeigt, das gesuchte Gen direkt identifiziert werden kann, da die eingebrachte Mutation wahrscheinlich nur ein einziges Gen betrifft. Für diese Identifizierung ist jedoch die Bestimmung der Lage der Transposoninsertion innerhalb des MCMV-Genoms erforderlich. Ein Nachteil der Transposon-Bibliothek ist die große Anzahl der MCMV-Mutanten die benötigt werden, da der Aufwand eines Screeningverfahrens maßgeblich durch die Probenanzahl bestimmt wird.

Die Plasmidinjektion ist die einzige der drei genannten Methoden, die ohne den zusätzlichen Aufwand der Herstellung von komplementierenden Zelllinien die Identifikation von essentiellen Genen erlaubt. Obwohl alle bisher identifizierten immunmodulatorischen Gene nicht-essentiell sind, schließt dies die Existenz von essentiellen immunmodulatorischen Genen nicht aus. Von daher ist es vorteilhaft, wenn ein Screeningverfahren die Identifizierung von essentiellen immunmodulatorischen Genen grundsätzlich ermöglicht. Die Plasmidinjektion ermöglicht die Definition eines MCMV-Genomabschnitts, der ggf. in der Lage ist, die Reduktion eines Zelloberflächenproteins auszulösen. Dies setzt voraus, dass die für den Effekt verantwortlichen Gene vollständig in den Plasmiden enthalten sind. Im Falle von kooperierenden Genprodukten müssten alle beteiligten Gene innerhalb eines Plasmids lokalisiert sein oder eine Koinjektion von zwei Plasmiden vorgenommen werden, um eine Identifizierung zu ermöglichen. Folglich besteht die Möglichkeit, dass ein durch mehrere Gene ausgelöster Phänotyp aufgrund dieser Tatsache unentdeckt bleibt. Die umgekehrte Vorgehensweise zu der Bereitstellung von Teilen des MCMV-Genoms durch Plasmidinjektion ist deren Deletion und Infektion der Zellen mit den aus diesen mutierten Genomen gewonnenen Viren. Ähnlich wie die Methode der Plasmidinjektion bietet das Screening von MCMV-Deletionsmutanten die Möglichkeit, einen Bereich innerhalb des MCMV-Genoms zu identifizieren, in dem ein immunmodulatorisches Gen lokalisiert ist. Sowohl bei der Plasmidinjektion als auch bei der Verwendung von Deletionsmutanten erfordert die Identifizierung des gesuchten Gens eine weitere Eingrenzung innerhalb der identifizierten Region. Ein klarer Vorteil der MCMV-Deletionsmutanten gegenüber der Plasmidinjektion ist, dass die Identifizierung der Gene durch den Ausfall des Phänotyps erfolgt und sichtbar wird, sobald ein essentielles

Element entfernt wurde. Auf diese Weise ist die Identifizierung von in Kooperation arbeitenden Genen sichergestellt, da auch der Ausfall eines Kooperationspartners bereits einen Einfluss auf den Phänotyp haben sollte. Die Vorteile gegenüber der Transposonbibliothek bestehen einerseits in der geringen Anzahl von der zu screenenden Mutanten und andererseits in dem genauen Wissen um die Lokalisierung der Deletionen. Sollte ein Phänotyp von Interesse mit den Mutanten nicht abgedeckt werden, also keine der verwendeten MCMV-Deletionsmutanten einen *Loss-of-Function*-Phänotyp zeigen, bietet diese Bibliothek eine zuverlässige Information darüber, wo das gesuchte Gen nicht lokalisiert sein kann. Eine solche Information kann durch das Screening der Transposonbibliothek nicht ermittelt werden.

4.2 Die Identifizierung des Gens modB7-2

Mit dem Screeningsystems gelang es, eine Region von ca. 15 kb innerhalb des MCMV-Genoms zu definieren, innerhalb derer Gene lokalisiert sind, die für die Reduktion der Expression von CD40 und CD86 verantwortlich sind. Bei der Identifizierung des für die Herunterregulierung von CD86 verantwortlichen Gens kamen neben den BAC-Mutagenesetechniken und der Durchflusszytometrie auch RNA-Analysen zur Anwendung.

Die identifizierte Region $\Delta 6$ umfasste ca. 15 kb, in denen 14 vorhergesagte ORFs lokalisiert sind. Durch neue MCMV-Mutanten, in denen jeweils nur Teilbereiche der ursprünglichen Deletion entfernt wurden, konnte die verantwortliche Region auf vier aneinandergrenzende und zum Teil überlappende ORFs eingeschränkt werden. Die Tatsache, dass mehr als nur einer der vorhergesagten ORFs für den Effekt essentiell war, ließ zwei verschiedene Schlüsse zu: es konnte sich einerseits um in Kooperation wirkende Gene handeln, die in den durch die Deletionen definierten Bereichen lokalisiert sind. Weiterhin war es möglich, dass sich ein Gen, welches keinem der vorhergesagten ORFs entsprach, über die gesamte Region erstreckte.

Um die Möglichkeit von zwei in Kooperation wirkenden Genen genauer zu untersuchen, wurde auf ein weiteres Mittel der BAC-Mutagenese zurückgegriffen: die Insertion von Sequenzen in ein BAC-Plasmid. Diese Methode bietet die Möglichkeit, in eine Deletionsmutante, in diesem Fall der *Loss-of-Function*-Mutante MCMV-GFP $\Delta 6$, Sequenzen zu inserieren. Auf diese Weise wurden die minimalen für das Auslösen eines *Gain-of-function* Phänotyps notwendigen Sequenzen identifiziert, die sich über den gesamten Bereich der beiden überlappenden ORFs m147/m148 und des

4. Diskussion

angrenzenden ORFs m149 erstreckte. Sollten zwei dieser Gene in Abhängigkeit voneinander für die Herunterregulierung von CD86 verantwortlich sein, müssten diese bei einer Koinfektion und somit einer Bereitstellung der Genprodukte *in Trans* ein *Gain-of-Function*-Phänotyp zu beobachten sein. Dies war jedoch nicht der Fall, was ein deutlicher Hinweis darauf war, dass der beobachtete Phänotyp nicht durch die Kooperation der Gene m147/m148 und m149 hervorgerufen wurde. Diese Ergebnisse können lediglich als Hinweis verstanden werden, da beide Virusmutanten ein GFP-Gen tragen und somit keine Möglichkeit bestand, eine Koinfektion tatsächlich nachzuweisen. Es wurde jedoch in diesem Versuch eine hohe Infektionsdosis eingesetzt und davon ausgegangen, dass zumindest in einem Anteil von Zellen eine Infektion mit beiden Viren stattgefunden haben musste.

Lediglich eine Beteiligung des ORFs m150 konnte an dieser Stelle ausgeschlossen werden. Diese Untersuchungen machten deutlich, dass das gesuchte Gen nicht mit nur einem der vorhergesagten ORFs übereinstimmte oder durch die kooperative Wirkung zweier ORFs hervorgerufen wurde. Tatsächlich war ein zusammenhängender Bereich, der die Gene m147/m148 und m149 umfasste, für die Herunterregulierung von CD86 essentiell.

Das Ergebnis dieser Untersuchungen war ein deutlicher Hinweis auf die zweite genannte Möglichkeit, nämlich dass innerhalb der Region ein Gen kodiert wird, welches mit keinem der vorhergesagten ORFs übereinstimmt und sich über den gesamten Bereich erstreckt. Um die für den Effekt essentiellen Sequenzen innerhalb der Kandidatenregion weiter einzugrenzen, wurden sehr kleine Deletionen an verschiedene Stellen platziert, in die eine FRT-Stelle inseriert wurde. Diese Veränderungen waren im Gegensatz zu allen vorher hergestellten Mutanten nur geringfügig und sollten somit nur einen sehr lokalen Effekt haben. Mit diesen Mutanten wurden essentielle Regionen im Bereich der Gene m147/m148 und m149 identifiziert. Hierfür wurde eine kleine Deletion im Bereich des ATG von m147 gesetzt, die ebenfalls das ATG des auf dem Gegenstrang kodierten m149 umfasste. In dieser Mutante ist von den drei in Frage kommenden ORFs nur der ORF m148 vollständig. Die Tatsache, dass diese Mutante einen Wildtypphänotyp aufwies belegte, dass weder der vorhergesagte ORF m147 noch der ORF m149 für den Effekt verantwortlich sind. Da jedoch mit Hilfe der weiteren Mutanten essentielle Regionen im Bereich der ORFs m147/m148 und m149 identifiziert

wurden, wurde deutlich, dass zwar der vollständige ORF m149 für die Funktion nicht notwendig ist, aber Sequenzen innerhalb des ORFs dies durchaus sind.

Mit den Northern Blot-Analysen wurde nur ein Transkript der Größe von 0,7 kb nachgewiesen, obwohl zwei Sonden verwendet wurden, die zu Bereichen der ORFs m147/m148 und m149 komplementär waren. Da das detektierte Signal in beiden Fällen die gleiche Größe hatte, deutete dies darauf hin, dass innerhalb der von den Sonden abgedeckten Region nur ein einziges Transkript gebildet wird, das sich über diesen Bereich erstreckt. Eine andere Möglichkeit war diejenige, dass dort zwei nahezu gleich große mRNA's kodiert werden, die beide zum Untersuchungszeitpunkt exprimiert werden. Die RT-PCR-Analyse bewies die Existenz eines gespleißten Gens, welches sich über die genannte Region erstreckt und als modB7-2 Gen (modulator of B7-2) bezeichnet wurde. Die durch die RNA-Analysen gewonnenen Erkenntnisse stehen im Einklang mit den durch die Analyse von MCMV-Mutanten gewonnenen Erkenntnissen, da alle MCMV-Mutanten, in denen der identifizierte ORF getroffen wurde einen *Loss-of-Function Phänotyp* zeigten. Die RNA-Analysen gaben keinen Hinweis auf die Expression der anderen in diesem Bereich lokalisierten ORFs, jedoch wurde die Untersuchung nur zu dem genannten Zeitpunkt und mit den genannten Zellen durchgeführt. Folglich kann nur geschlossen werden, dass die ORFs m147, m148 und m149 24 h nach Infektion von RAW-Zellen nicht exprimiert werden.

Dem Nachweis der Existenz von einem gespleißten Gen folgte der Nachweis, dass dieses Gen für die Reduktion von CD86 auf APC verantwortlich ist. Besondere Aufmerksamkeit wurde der Frage der Unterscheidung der ORFs m147, m148 und modB7-2 gewidmet, die auf komplementären Strängen in der gleichen Region kodiert werden. Eine Insertionsmutante, bei der lediglich die cDNA von modB7-2 unter Kontrolle des MIEP-Promotors in das Genom einer *Loss-of-Function*-Mutante eingebracht worden war, zeigte einen *Gain-of-Function* Phänotyp. Da in dieser Mutante der 5'-Bereich des ORF m147 fehlte und somit keine Expression desselben stattfinden sollte, konnte der ORF m147 an dieser Stelle erneut ausgeschlossen werden. Die mit der Shuttle-Mutagenese hergestellte Mutante, in der der ORF modB7-2 selektiv gestört wurde zeigte einen *Loss-of-Function*-Phänotyp. Da der ORF m148 in dieser Mutante nicht beeinträchtigt wurde, wurde hiermit gezeigt, dass das Gen modB7-2 eine essentielle Komponente bei der Reduktion von CD86 ist. Da keine Mutante existiert, in der lediglich der ORF m148 gestört, der ORF modB7-2 jedoch intakt ist, kann keine Aussage dazu getroffen werden, ob m148 an der Ausführung der Funktion von modB7-

2 beteiligt ist. Der mangelnde Nachweis eines Transkripts von m148 lässt hierzu keine eindeutige Aussage zu, da keine lückenlose Analyse zu unterschiedlichen Infektionszeitpunkten durchgeführt wurde. Da alle untersuchten Virusmutanten, in denen der ORF von modB7-2 betroffen ist, einen vollständigen Ausfall des Phänotyps zeigten, kann jedoch davon ausgegangen werden, dass modB7-2 für diesen Effekt essentiell ist. Dies lässt jedoch keine Aussage zu der Frage zu, ob das Gen diesen Effekt allein hervorruft oder ob hierfür die Kooperation mit einem weiteren viralen Gen notwendig ist. Diese Frage wird durch die isolierte Expression des modB7-2-Gens unabhängig vom Virusgenom geklärt werden, die aufgrund technischer Schwierigkeiten bis dato nicht geglückt ist. Derzeit kann lediglich ausgeschlossen werden, dass eines der Gene aus der Region $\Delta 6$ für die Reduktion von CD86 durch modB7-2 notwendig ist, da das modB7-2-Protein diesen Effekt auch in Abwesenheit der Gene der Region $\Delta 6$ induziert.

Die Markierung des ModB7-2-Proteins mit einem Epitoptag ermöglichte die Untersuchung der Kinetik der Proteinexpression sowie die für die Transkription von modB7-2 notwendigen Faktoren. Die Klassifizierung von modB7-2 als frühes Gen bedeutet, dass für die Expression virale Transkriptionsfaktoren notwendig sind. In diese Proteinklasse gehören viele immunmodulatorische Gene, wie zum Beispiel die Gene US2 und US11 von HCMV, welche mit der Expression von MHC I auf infizierten Zellen interferieren (Jones *et al.*, 1995). Eine Ausnahme bildet das HCMV-Protein US3, welche ebenfalls diese Aufgabe erfüllt, aber ein *immediate-early* Gen ist (Colberg-Poley *et al.*, 1992; Tenney *et al.*, 1993; Tenney and Colberg-Poley, 1991).

4.3 Die Identifizierung des Gens m155

Die Identifizierung des für die Herunterregulierung von CD40 verantwortlichen Gens wurde durch eine inkonsistente Expression von CD40 erschwert. Obwohl es sich bei den in dieser Arbeit verwendeten Zellen ausschließlich um Zelllinien handelte und die Handhabung weitestgehend konstant gehalten wurde, unterschied sich der Phänotyp der Zellen in der Expression von Zelloberflächenproteinen zwischen den einzelnen Versuchen. Es war leider nicht möglich, die Gründe für die variable Expression herauszufinden.

4. Diskussion

Mit den ersten Arbeiten konnte nachgewiesen werden, dass die Infektion von RAW-Zellen mit wtMCMV-GFP eine starke Reduktion von CD40 nach sich zieht und dass hierfür der Bereich mit den ORFs m144-m157 (die Region $\Delta 6$) essentiell ist. Bei der Eingrenzung des verantwortlichen Bereiches konnte in Zellen, die mit einer $\Delta m155$ -Mutante infiziert waren eine verminderte Reduktion von CD40 im Vergleich zum Wildtypphänotyp beobachtet werden. Die mit dieser Mutante infizierten Zellen zeigten einen intermediären Phänotyp, der zwischen dem durch das Wildtypvirus und der *Loss-of-Function*-Mutante MCMV-GFP $\Delta 6$ hervorgerufenen Phänotyp lag. Das in der Region von m155 lokalisierte Gen hat dementsprechend einen Einfluss auf die Reduktion von CD40, es ist jedoch nur für einen Teil des Wildtypphänotyps verantwortlich. Folglich muss noch ein weiteres virales Gen existieren, das die Expression von CD40 negativ beeinflusst. Die mit den *Loss-of-Function*-Mutanten MCMV-GFP $\Delta 6$ und MCMV-GFP $\Delta 6S3$ infizierten Zellen zeigten einen totalen Ausfall der Herunterregulierung von CD40. Somit ist dieses weitere Gen mit hoher Wahrscheinlichkeit in der Region von $\Delta 6S3$ lokalisiert. Die Reduktion der Expression eines Zelloberflächenmoleküls durch mehrere virale Gene wurde unter anderem auch beim MHC I-Molekül beobachtet, dessen Expression sowohl durch das gp40 (ORF m152) als auch durch das vom m06-Gen kodierte gp48 negativ beeinflusst wird (Reusch *et al.*, 1999; Ziegler *et al.*, 2000)Wagner, Gutermann, J Exp Med, 2002}.

Eine Reinsertion des ORF m155 in die $\Delta 6$ -Deletionsmutante belegte, dass der ORF einen negativen Einfluss auf die Expression von CD40 hat. Dieser *Gain-of-Function*-Phänotyp wurde von einer Mutante hervorgerufen, in der die gesamte Region von m144 bis m157 bis auf den ORF m155 fehlte. Folglich ist der Bereich von m144 bis m157 für die Funktion des in der Region von m155 kodierten Proteins nicht notwendig. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass das in der Region von m155 kodierte Gen den Effekt in Kooperation mit einem weiteren viralen Protein auslöst, welches ausserhalb der $\Delta 6$ -Deletion lokalisiert ist. Eine Aussage darüber, ob das innerhalb der Region m155 lokalisierte Gen allein in der Lage ist, die Expression von CD40 herunterzuregulieren ist durch diese Experimente nicht möglich und kann nur durch die gesonderte Expression des ORF beantwortet werden.

In einem Northern Blot Experiment mit zwei zu m155 komplementären Sonden wurde die Expression einer mRNA der Größe von ca. 1,9 kb nachgewiesen. In

Untersuchungen von Abenes et al. 2004 wurde in einem Northern Blot mit einer zu m155 komplementären Sonde die Expression einer mRNA der Größe von ca. 2 kb nachgewiesen, die als die mRNA des Gens m155 bezeichnet wurde (Abenes et al., 2004). Mit dem in dieser Arbeit durchgeführte Northern Blot wurde nur ein einziges Transkript der Region m155 nachgewiesen, dessen Größe mit dem von Abenes et al. 2004 nachgewiesenen übereinstimmte. Über das/die in diesem Transkript lokalisierten ORFs können an dieser Stelle jedoch keine Aussagen getroffen werden. Diese Frage ist Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Während der Bearbeitung dieses Themas wurde mit den in dieser Arbeit hergestellten MCMV-Mutanten durch eine andere Gruppe nachgewiesen, dass das Gen m155 mit der Expression des zellulären Proteins H60 auf MCMV-infizierten Fibroblasten interferiert (Hasan et al., 2005). Bei dem Protein H60 handelt es sich um einen von drei Liganden für den aktivierenden NK-Zell-Rezeptor NKG2D, der bei der Erkennung von virusinfizierten Zellen durch NK-Zellen eine wichtige Rolle spielt. Folglich erfüllt das Gen m155 zwei Funktionen: die Interferenz mit der Expression von CD40 auf Antigen-präsentierenden Zellen und von H60 auf Fibroblasten. Duale Funktionen von Virusproteinen wurden für MCMV bereits vorher berichtet, ein Beispiel ist das gp40, welches die Expression von MHC I und des NKG2D-Liganden RAE-1 auf infizierten Zellen unterdrückt (Krpmotic et al., 2002; Lodoen et al., 2004; Ziegler et al., 2000).

4.4 Untersuchung des Wirkungsmechanismus von modB7-2 und m155

Die im Abschnitt 3 des Ergebnisteils dargestellten Versuche stellten die ersten Schritte in Richtung eines Verständnisses der Wirkungsmechanismen der viralen Gene dar, welche die Expression von CD40 und CD86 modellieren. Diese Schritte wurden durch technische Hürden erschwert, die sich einerseits aus der Notwendigkeit ableiteten, Antigen-präsentierende Zellen für die meisten Versuche zu verwenden. Andererseits entstanden sie aus der Tatsache, dass die Proteine CD40 und CD86 häufig lediglich im Rahmen von immunologischen Fragestellungen bearbeitet werden.

Antigen-präsentierende Zellen reagieren empfindlich auf Veränderungen der Kultivierungsbedingungen und eine zu starke Stimulation führt zu einem vermehrten Zelltod. Folglich ist eine vollständige Infektion einer Zellpopulation sowie eine effiziente Transfektion, die beide die Voraussetzung für die Bearbeitung einiger Fragestellungen darstellen, nicht möglich.

4. Diskussion

Da über die Biochemie der Proteine CD40 und CD86 im Vergleich zu der Häufigkeit, mit der sie in der Literatur auftauchen sehr wenig bekannt ist, ist der Zugang zu technischen Hilfsmitteln wie Antikörper für Western Blot-Analysen, Immunfluoreszenz oder Immunpräzipitation sowie Informationen über den Lebenszyklus und die Halbwertszeit sehr begrenzt.

Die Beschreibung der Mechanismen, mit denen die viralen Proteine die Reduktion von CD40 und CD86 auf der Zelloberfläche herbeiführen ist das langfristige Ziel der Untersuchungen. Die hier vorgestellten Experimente sind erste Versuche, die Zahl der in Frage kommenden Wirkungsmechanismen einzuschränken. Diese Arbeiten bilden die Basis für die nächsten Schritte, die auf den direkten Nachweis des Mechanismus abzielen. Auf die verschiedenen denkbaren Möglichkeiten, durch die eine Inhibition der Expression von CD40 und CD86 erfolgen könnte, wurde in der Einleitung zum Punkt 3 des Ergebnisteils bereits eingegangen.

Eine wichtige Basis für die Einschränkung der möglichen Mechanismen bildete die Analyse der Kinetik der MCMV-vermittelten Reduktion von CD40 und CD86. Diese zeigte einen sehr schnell einsetzenden Effekt, der im Falle von CD40 bereits sechs Stunden nach Infektion und im Falle von CD86 sieben Stunden nach Infektion beobachtet werden konnte. Da zuvor ermittelt wurde, dass das Protein modB7-2HA drei Stunden nach Infektion exprimiert wird, bedeutet dies, dass zwischen dem ersten Proteinnachweis und dem ersten Nachweis des von ihm ausgelösten Effekts ein Zeitraum von nur vier Stunden vergeht. Die Expressionskinetik der für die Reduktion von CD40 verantwortlichen Gene ist nicht bekannt, aber auch hier kann der Zeitraum, in dem der Effekt hervorgerufen wird, sechs Stunden nicht überschreiten.

Das Wissen um die zeitliche Abfolge der Reduktion von CD40 und CD86 ist eine wichtige Voraussetzung, um mit weiteren Untersuchungen bestimmte Wirkungsmechanismen auszuschließen. Eine dieser Möglichkeiten ist, dass eine Blockierung der Translation von CD40 und CD86 die alleinige Basis für den beobachteten Effekt bildet. Diese Möglichkeit konnte durch die Kombination der Daten zur Kinetik des Effektes mit den Erkenntnissen, die durch die Blockierung der Proteinneubildung gewonnen wurden, ausgeschlossen werden. Die Blockierung der Proteinsynthese für eine Dauer von neun Stunden hatte keinen Effekt auf die Oberflächenexpression von CD40 und CD86. Das bedeutet, dass entweder die

4. Diskussion

Halbwertszeit der Proteine deutlich länger ist, oder ein grosser intrazellulärer Pool dieser Proteine vorhanden ist, aus dem trotz eines gewissen Turnovers die Menge an Protein, die auf der Zelloberfläche erscheint, aufgefüllt werden kann. Da neun Stunden nach MCMV-Infektion die Reduktion der Proteinexpression bereits voll ausgeprägt ist, bedeutet das Ausbleiben der Reduktion bei einer Inhibierung der Translation für die gleiche Dauer, dass die Blockierung der Proteinsynthese nicht der alleinige Mechanismus sein kann, auf dem der beobachtete Phänotyp basiert. Dies schließt nicht aus, dass es sich um einen Teil einer Kette von Ereignissen handelt, zum Beispiel eine vermehrte Proteindegradation in Kombination mit einer Blockierung der Neusynthese.

Ein weiterer Punkt, an dem ein Eingreifen durch virale Proteine den beobachteten Phänotyp hervorrufen könnte, ist der Transport der Proteine CD40 und CD86. Dies schließt sowohl den Transport durch das endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat ein, als auch den Transport während eines eventuellen Proteinrecyclings.

Die Untersuchungen mit intrazellulären Antikörperfärbungen von infizierten und nicht-infizierten Zellen haben gezeigt, dass die Menge und Lokalisierung von CD40 und CD86 durch die Infektion nicht merklich beeinflusst werden. Eine Färbung mit einem Antikörper gegen ein Protein des ER-cis-Golgi-Kompartiments hat ebenfalls keine merklichen Unterschiede zwischen infizierten und nicht-infizierten Zellen dokumentiert. Da die Auflösung und Sensitivität dieser Methode begrenzt ist, kann mit diesen Untersuchungen allein keine abschließende Aussage getroffen werden. Es deutet sich jedoch an, dass die MCMV-Infektion der Antigen-präsentierenden Zellen keine grobe Umstrukturierung des sekretorischen Apparats induziert.

Aus der Literatur sind einige Beispiele bekannt, in denen virale Gene eine Unterbrechung des Proteintransports hervorrufen, und auf diese Weise eine Reduktion der Zelloberflächenexpression von Proteinen bewirken. Das bereits erwähnte MCMV-Protein gp40 (ORF m152) bewirkt beispielsweise ein Zurückhalten von MHC I-Molekülen im ERGIC/cis-Golgi-Kompartiment (Ziegler *et al.*, 2000). Das vom m06 kodierte gp48 hingegen induziert durch seine Bindung an die β 2-Mikroglobulin-assoziierten MHC I-Moleküle im ER und eine Fehlleitung des intrazellulären Transports in endozytische Kompartimente (Reusch *et al.*, 1999). Eine ähnliche Beeinflussung durch Umleitung des MHC I-Proteins in den endolysosomalen Transportweg mit anschließender Degradation wird auch durch das HIV-Protein Nef hervorgerufen (Kasper *et al.*, 2005). Die hier aufgeführten Mechanismen bewirken eine lysosomale Degradation von MHC I. In den

4. Diskussion

Arbeiten über die Proteine gp40 und gp48 wurden intrazelluläre Antikörperfärbungen durchgeführt, die eine Kolo-kalisierung von MHC I mit lysosomalen Markern aufgezeigt haben. Bei diesen Experimenten wurde jedoch eine Blockierung der Proteindegradation mit Leupeptin durchgeführt. Dies war bei den in dieser Arbeit gezeigten Bildern nicht der Fall, da das Leupeptin auf die Antigen-präsentierenden Zellen stark toxisch wirkt und eine ausreichende Inkubationsdauer nicht durchführbar ist. Aus diesem Grunde kann die Möglichkeit dass eine partielle Umlokalisierung der Proteine in das Lysosomen stattfindet, nicht ausgeschlossen werden, da diese Proteine aufgrund des Abbaus eventuell nicht mehr nachweisbar wären.

Für das Protein CD86 ist in der Literatur ein besonderes „Speicherkompartiment“ beschrieben worden, in dem große Mengen des Proteins gelagert und nach Stimulierung der APC an die Oberfläche transportiert werden (Smyth *et al.*, 2005). Diese Vesikel wurden in humanen Makrophagen und dendritischen Zellen nachgewiesen und konnten weder dem Golgi-Apparat noch den MHC II containing vesicles (MIICs) oder endozytischen Kompartimenten zugeordnet werden. Die MIICs sind späte endozytische, lysosomale Vesikel, die aus einer Vakuole mit Vesikeln im Lumen bestehen und unter anderem für die Speicherung von MHC II in Antigen-präsentierenden Zellen verantwortlich sind (Geuze, 1998; Kleijmeer *et al.*, 1997; Peters *et al.*, 1995). Neben der Speicherung von Proteinen erfüllen diese MIICs noch weitere Funktionen wie die Sekretion der internen Vesikel als Exosomen oder die gezielte Fusion mit Lysosomen und Degradation der in ihnen enthaltenen Proteine (Felder *et al.*, 1990; Johnstone *et al.*, 1987; Raposo *et al.*, 1996; Renfrew and Hubbard, 1991). Ein Hinweis auf die Anwesenheit von CD86 in solchen Vesikeln ist die Beobachtung, dass in von Antigen-präsentierenden Zellen sekretierten Exosomen neben MHC II auch CD80 und CD86 enthalten sind (Clayton *et al.*, 2001). Auch wenn die intrazelluläre Lokalisierung von CD86 nicht abschließend geklärt ist, wurde jedoch nachgewiesen, dass eine intrazelluläre Akkumulation des Proteins in einem Vesikel stattfindet. Eine Blockierung des Proteintransports eines solchen Vesikels an die Zelloberfläche ist eine weitere Möglichkeit, den beobachteten Phänotyp auszulösen. Die Antikörperfärbungen haben jedoch keinen offensichtlichen Hinweis auf eine verstärkte intrazelluläre Akkumulation von CD40 und CD86 in infizierten Zellen ergeben.

Ein weiterer Transportprozess, der für einige Rezeptoren bereits gut untersucht ist, findet während des Recyclings von Proteinen statt (Hertel, 1986; Pandey, 2005). Hierzu

gehören der im Ergebnisteil unter 3.3.3 bereits erwähnte Transferrin-Rezeptor aber auch der *growth hormone-releasing hormone receptor* GHRH-R (Veyrat-Durebex *et al.*, 2005). Beide Proteine unterliegen einem ständigen Kreislauf der Endozytose, Transport in ein Recyclingkompartiment, wo die Proteine „sortiert“ werden und Rücktransport an die Zelloberfläche. Ob ein solcher Prozess auch ein Teil des Lebenszyklus von CD40 und CD86 bildet, ist derzeit nicht bekannt. Die Doppelfärbung von CD40 bzw. CD86 mit dem Transferrin-Rezeptor hat in beiden Fällen keine ausgeprägte Kollokalisierung ergeben. Auf den Bildern ist ersichtlich, dass der Transferrin-Rezeptor in Vesikeln lokalisiert ist, die sehr nahe an der Zelloberfläche liegen. Die Proteine CD40 und CD86 hingegen zeigen eine Verteilung in vesikelartigen Strukturen im Inneren der Zelle. Dieses Ergebnis schließt nicht aus, dass auch diese Proteine recycelt werden, da die Möglichkeit besteht, dass die Aufenthaltsdauer in Vesikeln des Recyclingweges kurz ist und in diesem Falle die Menge an Protein, welches zu dem gegebenen Zeitpunkt in diesen Vesikeln vorhanden ist unterhalb der Nachweisgrenze liegen würde. Das Recycling von Proteinen beinhaltet deren aktive Endozytose und Transport in ein Recyclingkompartiment, wo eine Sortierung stattfindet und einen anschließenden Transport an die Zelloberfläche oder weitere endozytische Vesikel und ggf. das Lysosomen. Die besonders schnelle Kinetik der Reduktion von CD40 und CD86 sind ein Hinweis darauf, dass diese Proteine aktiv von der Zelloberfläche endozytiert werden und der Rücktransport gleichzeitig vollständig unterbunden wird. Eine Blockierung des Proteinnachschubs auf der Ebene der Translation und/oder Transport durch das ER würde den vollständigen Pool an Protein, der sich bereits im Recyclingweg befindet weiterhin für die Präsentation auf der Oberfläche zugänglich machen und eine Reduktion der Proteinmenge ausschließlich durch den Proteinturnover herbeiführen, was wahrscheinlich einen deutlich längeren Zeitraum umfassen würde. Die Beeinflussung des Recyclingweges durch die viralen Proteine ist folglich eine denkbare Möglichkeit, die die besonders schnelle Kinetik der Reduzierung von CD40 und CD86 erklären würde.

4.4.1 Die Beeinflussung von CD86 durch KSHV-Proteine

Aus der Literatur ist inzwischen ein zelluläres und zwei virale Proteine bekannt, welche die Expression von CD86 beeinflussen: das zelluläre Protein c-MIR (*cellular modulator of immune recognition*) und zwei immunmodulatorische Proteine des Kaposi Sarkoma-assoziierten Herpesvirus (KSHV), MIR 1 und MIR 2 (*modulator of immune recognition*)

4. Diskussion

(Coscoy *et al.*, 2001; Coscoy and Ganem, 2001). Unter dem Einfluss der viralen Genprodukte MIR 1 und MIR 2 wird das zelluläre Gen CD86 normal transkribiert und translatiert und das Protein erreicht nach der Reifung die Zelloberfläche. Von dort wird es jedoch schnell endozytiert und im Endosomen degradiert, ein Prozess der von der MIR 1 und MIR 2 vermittelten Ubiquitinierung von CD86 abhängig ist. MIR 1 und MIR 2 sind, wie modB7-2 auch, Typ III Transmembranproteine, deren N- und C-Termini jedoch laut Vorhersagen ins Cytoplasma ragen. Dies ist gemäß der computergestützten Proteinanalyse bei ModB7-2 nicht der Fall. Im N-Terminus der beiden KSHV -Proteine ist ein *plant homeodomain* -Motiv zu finden (PHD), welches für deren Funktion essentiell ist, da es eine Ubiquitinligase E3 rekrutiert, die ihrerseits das Targetprotein ubiquitiniert (Ruberti *et al.*, 1991). Eine solche PHD-Domäne ist im modB7-2-Protein nicht nachweisbar. Die Autoren wiesen nach, dass auch die zelluläre Form des MIR Proteins (c-MIR) direkt mit CD86 interagiert und eine Ubiquitinierung des Proteins herbeiführt, die schließlich zum proteasomalen Abbau von CD86 führt. Das c-MIR Protein weist eine strukturelle Homologie zu MIR1 und 2 auf: es ist ebenfalls ein Typ III Transmembranprotein mit einer PHD-Domäne. Das c-MIR Gen wurde zunächst beim Menschen beschrieben, es existiert jedoch auch ein homologes Gen in der Maus (Genbank Accession-Number BC053090.1).

Die Parallelen zwischen dem von c-MIR, MIR 1 und 2 und ModB7-2 ausgelösten Phänotyp der reduzierten Expression von CD86 sind bedeutend. Der Wirkmechanismus von c-MIR und den KSHV-Proteinen MIR 1 und MIR 2 beruht auf einer ubiquitinabhängigen Degradation des zellulären Proteins. Ob dies bei der ModB7-2-vermittelten Reduktion der Expression von CD86 ebenfalls der Fall ist, ist bis dato unbekannt.

Bei der Kopplung von Ubiquitin an Zielproteine wirken mehrere Proteine zusammen. Die Ubiquitin-Aktivierung durch ein E1-Enzym erfordert ATP und resultiert in einer kovalenten Bindung von Ubiquitin an das E1-Protein über eine Thioesterbindung (Ciechanover, 1994; Jentsch and Schlenker, 1995). Das aktivierte Ubiquitin wird dann auf ein E2-Enzym übertragen, von dem es auf ein Substratprotein übergeht. Bei diesem Prozess kann ein weiteres Protein, ein E3-Protein, eine Rolle spielen, welches hauptsächlich die Substraterkennung durchführt. Es gibt allerdings auch E3-Ligasen, die selbst die Ubiquitinligation katalysieren (Huibregtse *et al.*, 1995; Scheffner *et al.*, 1995). Die Aminosäuresequenz von ModB7-2 zeigt keine PHD- oder *really interesting new gene* (RING)-Domäne, wie sie in E2- und E3-Ligasen gefunden wurden (Jackson

et al., 2000). Um ModB7-2 eine Rolle bei einer ubiquitinabhängigen Degradation zuzuweisen, müsste davon ausgegangen werden, dass das Protein eine E2- oder E3-Ubiquitinligase ist, die entweder bei der Substraterkennung eine Rolle spielt oder die katalytische Funktion mit Hilfe einer bisher unbekanntem Domäne ausführt. E3-Ligasen ohne direkte katalytische Funktion wurden als Bestandteile des Skp1-Cul1-F-box (SCF)-Ubiquitinligasekomplexes beschrieben, der bei der G1/S-Transition der Hefe (*S. cerevisiae*) eine Rolle spielt (Feldman *et al.*, 1997; Skowyra *et al.*, 1997). Diese Proteine besitzen selbst keine katalytischen Domänen, sondern rekrutieren die E2-Proteinligasen und das Targetprotein in den Komplex. Um eine solche Rolle von ModB7-2 zu untersuchen, müsste zunächst die Ubiquitinierung von CD86 in MCMV-infizierten Zellen nachgewiesen werden. Als nächstes müsste die Bindung von ModB7-2 an Proteine untersucht werden, die Ubiquitinligasefunktionen aufweisen, zum Beispiel das cMIR-Protein.

Die Gegenwart von CD40 und CD86 in Inneren von infizierten Zellen bedeutet, dass eine eventuelle Proteindegradation lediglich einen Teil der Proteine betreffen und somit nur einen Teilschritt des beobachteten Phänotyps darstellen kann. Es besteht beispielsweise die Möglichkeit, dass nur die zum Zeitpunkt der Infektion in einem bestimmten Vesikel befindlichen zellulären Proteine unter dem Einfluss der viralen Proteine verstärkt ubiquitiniert und somit deren Endozytose und Degradation beschleunigt werden. Dies würde nur einen kleinen Teil der zellulären Proteine betreffen und eine intrazelluläre Färbung würde weiterhin zum Nachweis der Proteine führen.

Die bisherigen Untersuchungen deuten an, dass sowohl ModB7-2 als auch das in der Region von m155 kodierte Protein zu einem späteren Stadium im Lebenszyklus der Proteine in den Transport und/oder die Proteinhalbwertszeit bzw. Aufenthaltsdauer an der Zelloberfläche interferieren. Die in der Zukunft durchzuführenden Untersuchungen zur Identifikation des Wirkungsmechanismus wäre es sinnvoll, zunächst die vorhandenen Möglichkeiten weiter eingrenzen. Hierfür könnten Substanzen genutzt werden, die gezielt verschiedene Prozesse in der Zelle inhibieren und so eine Aussage dazu ermöglichen, ob der jeweilige Prozess bei der Auslösung des Phänotyps eine Rolle spielt. Beispiele für derartige Chemikalien sind der Serin- und Cysteinproteaseinhibitor Leupeptin, der Proteasomeninhibitor MG132 oder Ammoniumchlorid, welches die Endozytose blockiert (Aoyagi, 1969; Rock *et al.*, 1994).

Weiterhin könnte untersucht werden, ob die zellulären Proteine CD40 und CD86 in Gegenwart von MCMV eine verkürzte Halbwertszeit haben und/oder ob sie verstärkt ubiquitiniert werden. Diese Untersuchungen sind mit Pulse-Chase-Experimenten bzw. durch Immunpräzipitation mit einem Anti-Ubiquitin-Antikörper und nachfolgendem Western Blot mit Antikörpern gegen das jeweilige Protein möglich.

4.5 Die mögliche biologische Bedeutung von modB7-2 und m155

Die Bedeutung der viralen Proteine m155 und modB7-2 leitet sich aus der Bedeutung der zellulären Proteine CD40 und CD86 ab, die eine Rolle bei der Initiation einer Immunantwort bzw. der Aktivierung von Immunzellen spielen.

Die Rolle von CD80 und CD86 bei der Initiation und Konzertierung einer Immunantwort stellt diese beiden Moleküle an eine zentrale Schaltstelle bei der Entstehung und Aufrechterhaltung von Toleranz und Immunität. Die Proteine CD80 und CD86 vermitteln bei der Interaktion von Antigen-präsentierenden Zellen mit T-Zellen das kostimulatorische Signal und ermöglichen dadurch eine Reaktion der T-Zelle auf die Interaktion des T-Zell Rezeptors mit dem MHC-Komplex (Harris and Ronchese, 1999; Linsley *et al.*, 1991a). Die Bindung des vollständigen Komplexes bestehend aus T-Zell-Rezeptor und kostimulatorischen Molekülen führt zur Aktivierung der T-Zellen, während ein Ausbleiben des kostimulatorischen Signals bei gleichzeitiger Bindung des T-Zell-Rezeptors zu T-Zell-Anergie führt. Dementsprechend spielen diese beiden Moleküle eine zentrale Rolle bei der Initiation von Immunantworten.

In neueren Untersuchungen wird ein Zusammenhang der Expression von CD80 und CD86 und der Aktivität von regulatorischen T-Zellen (Treg) beschrieben (Lohr *et al.*, 2003; Lohr *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2004). Untersuchungen mit blockierenden Antikörpern gegen CD80 und CD86 machten deutlich, dass eine Blockierung von CD86 und damit eine ausschließliche Interaktion über CD80 zu einer Proliferation der Treg und damit zur Unterdrückung der Immunantwort führt. Im Gegensatz hierzu führt eine durch die Blockierung von CD80 erreichte Interaktion über CD86 zu einer Unterdrückung des inhibitorischen Effekts (Zheng *et al.*, 2004). Diese Untersuchungen deuten darauf hin, dass einer der Mechanismen, mit denen CD80 und CD86 Einfluss auf die Immunantwort nehmen, die der Stimulation oder Inhibierung von regulatorischen T-Zellen ist.

4. Diskussion

Das Protein CD40 ist aufgrund seiner immunstimulierenden Wirkung für Impf- und Immuntherapiekonzepte interessant. So werden agonistische anti-CD40 Antikörper bei Vaccinierungen verabreicht und fungieren dort als Adjuvantien (Cairing *et al.*, 2005). In Tumormodellen sind agonistische CD40-Antikörper in der Lage, eine effektive Immunantwort zu induzieren, die zu einer Eliminierung des Tumors führen kann (van Mierlo *et al.*, 2002). Die Bindung von CD40 auf APC durch den CD40-Liganden auf T-Zellen führt zu einer vermehrten Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 und verstärkt damit die Interaktion von DCs mit T-Zellen (Grewal *et al.*, 1995; Schoenberger *et al.*, 1998).

Eine Möglichkeit, die Bedeutung der Herunterregulierung von CD40 und CD86 für die Interaktion von T-Zellen mit dendritischen Zellen zu untersuchen, ist die Durchführung von T-Zell Proliferationsassays. Dafür müssten die DC mit mit modB7-2 oder m155-Deletionsmutanten infiziert werden. Diese dendritischen Zellen würden weiterhin kein MHC II exprimieren und kein IL-12 ausschütten, sie würden aber CD86 bzw. CD40 auf ihrer Oberfläche exprimieren. Ein Vergleich der T-Zell-Population von mit wtMCMV- und den genannten Mutanten infizierten DC im T-Zell Proliferationsassay würde einen Aufschluß über die Bedeutung geben, die diese Moleküle für die Bildung von Treg und die Stimulation von T-Zellen *in vitro* haben. Ob die Proliferation oder Bildung von Treg durch diese Mutanten gezielt beeinflusst wird, ließe sich durch eine FACS-Analyse der entstehenden Zellen klären, da die Treg aufgrund ihrer Expression der Alpha-Kette des Interleukinrezeptors zwei (CD25) identifizierbar sind.

Weiterhin ist es möglich, mit T-Zell-Proliferationsassays, in denen aktivierte T-Zellen mit einem MCMV-Antigen stimuliert werden, eine eventuelle Rolle von Treg zu untersuchen. Hierfür müsste diese Zellpopulation dem Ansatz gezielt entfernt bzw. zugeführt werden. Da in HCMV-infizierten Patienten bereits eine Rolle von regulatorischen T-Zellen bei der Unterdrückung einer CMV-spezifischen Immunantwort nachgewiesen wurde (Aandahl *et al.*, 2004), wäre es interessant mit Hilfe des Maus-Modellsystems eine genauere Untersuchung der Funktion dieser Zellen während der CMV-Erkrankung durchzuführen.

Eine Untersuchung der Bedeutung der beiden viralen Gene im Kontext einer Infektion könnte durch *in vivo*-Experimente, bei denen Mäuse mit Δ modB7-2 und Δ m155-Viren infiziert werden, erfolgen. Je nach Zeitpunkt der Untersuchung könnte der Effekt auf die

4. Diskussion

angeborene oder auf die adaptive Immunantwort untersucht werden. Im Fall von m155 wurden bereits *in vivo*-Experimente mit Deletionsmutanten durchgeführt (Abenes *et al.*, 2004; Hasan *et al.*, 2005). Diese Untersuchungen dokumentierten einen reduzierten Virustiter in den Speicheldrüsen und weiteren Organen sowie eine NK-Zell-abhängige Virusattenuierung. Die Schwierigkeiten bei *in vivo*-Versuchen mit Δ m155-Mutanten besteht in der Unterscheidung der Effekte, die durch die Beeinflussung der Expression des NK-Zell-Rezeptors H60 und von CD40 entstehen. Die Durchführung von *in vivo*-Versuchen mit den genannten Mutanten bietet die Möglichkeit, weitere Einblicke in die Bedeutung der Proteine CD40 und CD86 im Kontext einer MCMV-Infektion zu erhalten.

5. Zusammenfassung

Die Infektion der für die Aktivierung der adaptiven Immunantwort essentiellen Antigen-präsentierenden Zellen durch MCMV führt zu einer Beeinträchtigung der Funktion dieser Zellen. Ein Teil dieser Beeinflussung bezieht sich auf eine reduzierte Oberflächenexpression von wichtigen Proteinen in MCMV-infizierten APC. Ziel dieser Arbeit war es, die dafür verantwortlichen viralen Gene zu identifizieren.

Hierfür wurde zunächst ein Screeningsystem etabliert, das die effiziente Lokalisierung und Eingrenzung von Genen ermöglichte, die einen Einfluss auf die Expression von Zelloberflächenproteinen der APC haben. Dabei wurde von der Überlegung ausgegangen, dass die durch das Wildtypvirus ausgelöste Reduktion von Zelloberflächenproteinen in mit MCMV-Mutanten infizierten APC ausbleiben sollte, wenn die hierfür verantwortlichen Gene in der Mutante inaktiviert wurden.

Die Komponenten des Screeningverfahrens waren die Zelllinie RAW264.7, die Messung der Oberflächenexpression der Ziel-Proteine mit der Durchflusszytometrie und eine Reihe von MCMV-Mutanten, denen jeweils größere Genombereiche mit nicht-essentiellen Genen fehlten.

Mit dem Screeningverfahren gelang zunächst die Identifizierung einer Region von ca. 12 kbp, in der virale Gene lokalisiert sind, die einen negativen Einfluss auf die Zelloberflächenexpression von CD40 und CD86 auf APC haben.

Die Identifizierung des für die Reduktion der Expression von CD86 essentiellen Gens erfolgte durch eine schrittweise Eingrenzung der für diesen Effekt verantwortlichen Region. Bei diesen Analysen wurde deutlich, dass weder einer der vorhergesagten ORFs, noch eine kooperative Wirkung zweier vorhergesagter ORFs für den Effekt verantwortlich war. Vielmehr wurden nicht zusammenhängende Sequenzen von zwei verschiedenen ORFs als essentiell identifiziert. Mit RT-PCR-Analysen gelang die Identifizierung des gespleißten Gens modB7-2. Der positive Nachweis, dass dieses identifizierte Gen einen Einfluss auf die Expression von CD86 hat, wurde durch die Insertion der modB7-2 cDNA in eine *Loss-of-function* Mutante geführt. Die resultierende Virusrekombinante zeigte dadurch einen *Gain-of-function* Phänotyp. Dieses Ergebnis war im Einklang mit der Beobachtung, dass eine selektive Unterbrechung des modB7-2 ORFs mit Stopcodons in einem Verlust der viralen Funktion resultierte. Das Produkt des modB7-2-Gens interferiert gezielt mit der Zelloberflächenexpression von CD86 und hat

5. Zusammenfassung

keinen Einfluss auf die Expression von CD40, CD80 oder der MHC-Moleküle. Die Expression des Proteins konnte bereits drei Stunden nach Infektion nachgewiesen werden und der reduzierende Effekt auf die CD86-Expression sieben Stunden nach Infektion.

Die genomische Region mit dem ORF m155 wurde als für die Reduzierung des Proteins CD40 essentiell identifiziert. Der Nachweis eines dort kodierten Proteins gelang bisher noch nicht. Da die Deletion des ORF m155 nur einen partiellen Verlust des Phänotyps zur Folge hatte wurde geschlossen, dass das dort kodierte Protein nicht das einzige Protein sein kann, welches mit der Expression von CD40 interferiert. Aufgrund der Tatsache, dass die Mutante $\Delta 6S3$ einen vollständigen Ausfall der viralen Funktion zeigte, wird vermutet, dass ein weiteres Protein, welches CD40 beeinflusst, im durch die Deletion der Mutanten $\Delta 6S3$ definierten Bereich kodiert wird. Für die im Bereich des ORFs m155 kodierte Funktion konnte nur ein Einfluss auf CD40, nicht jedoch auf die Expression der MHC- oder der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 nachgewiesen werden. Der Effekt auf die CD40-Expression zeichnet sich durch eine schnelle Kinetik aus, so kann die Reduktion von CD40 in MCMV-infizierten Zellen bereits sechs Stunden nach Infektion beobachtet werden.

Durch Inhibitionsversuche wurden die möglichen Wirkungsmechanismen der viralen Gene eingegrenzt. Eine selektive Inhibierung der Translation der CD40- bzw. CD86-mRNA durch die beiden viralen Gene konnte als alleiniger Grund für den beobachteten Phänotyp ausgeschlossen werden. Ferner zeigte eine Untersuchung von infizierten Zellen mit Immunfluoreszenz keine fundamentalen Umstrukturierungen von zellulären Kompartimenten und auch keine Verringerung der Menge oder Veränderung der intrazellulären Lokalisation von CD40 und CD86. Folglich konnten eine vollständige Degradation der Targetproteine oder die Umstrukturierung des sekretorischen Apparates als Ursache für den beobachteten Phänotyp ebenfalls ausgeschlossen werden. Ziel der weiterführenden Untersuchungen wird es sein, den Wirkungsmechanismus der viralen Proteine im Detail aufzuklären und die biologische Bedeutung der immunmodulatorischen Virusfunktionen zu bestimmen.

6. Literaturverzeichnis

- AANDAHL, E.M., MICHAELSSON, J., MORETTO, W.J., HECHT, F.M., and NIXON, D.F. (2004). Human CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells control T-cell responses to human immunodeficiency virus and cytomegalovirus antigens. *J. Virol.* **78**, 2454-2459.
- ABENES, G., CHAN, K., LEE, M., HAGHJOO, E., ZHU, J., ZHOU, T., ZHAN, X., and LIU, F. (2004). Murine cytomegalovirus with a transposon insertional mutation at open reading frame m155 is deficient in growth and virulence in mice. *J. Virol.* **78**, 6891-6899.
- ADLER, H., MESSERLE, M., WAGNER, M., and KOSZINOWSKI, U.H. (2000). Cloning and mutagenesis of the murine gammaherpesvirus 68 genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *J. Virol.* **74**, 6964-6974.
- ANDREWS, D.M., ANDONIOU, C.E., GRANUCCI, F., RICCIARDI-CASTAGNOLI, P., and DEGLI-ESPOSTI, M.A. (2001). Infection of dendritic cells by murine cytomegalovirus induces functional paralysis. *Nat. Immunol.* **2**, 1077-1084.
- AOYAGI, T., (1969) Inhibitor of trypsin, plasmin, papain and cathepsin B. *J. Antibiot.* **22**, 283
- ARASE, H., MOCARSKI, E.S., CAMPBELL, A.E., HILL, A.B., and LANIER, L.L. (2002). Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors. *Science* **296**, 1323-1326.
- AUSTYN, J.M. (1996). New insights into the mobilization and phagocytic activity of dendritic cells. *J. Exp. Med.* **183**, 1287-1292.
- BACHMANN, M.F., MCKALL-FAIENZA, K., SCHMITS, R., BOUCHARD, D., BEACH, J., SPEISER, D.E., MAK, T.W., and OHASHI, P.S. (1997). Distinct roles for LFA-1 and CD28 during activation of naive T cells: adhesion versus costimulation. *Immunity.* **7**, 549-557.
- BANCHEREAU, J. and STEINMAN, R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245-252.
- BIRNBOIM, H.C. and DOLY, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523.
- BJELLQVIST, B., HUGHES, G.J., PASQUALI, C., PAQUET, N., RAVIER, F., SANCHEZ, J.C., FRUTIGER, S., and HOCHSTRASSER, D. (1993). The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. *Electrophoresis* **14**, 1023-1031.
- BORST, E.M., POSFAI, G., POGODA, F., and MESSERLE, M. (2004). Mutagenesis of herpesvirus BACs by allele replacement. In *Bacterial Artificial Chromosomes Volume 2: Functional Studies*. S.Zhao and M.Stodolsky, eds. (Humana Press Inc., Totowa, NJ) pp. 269-280.

6. Literaturverzeichnis

- BROERS, A.E., VAN-DER, H.R., VAN, E.J., GRATAMA, J.W., HENZEN, L.S., KUENEN, B.V., LOWENBERG, B., and CORNELISSEN, J.J. (2000). Increased transplant-related morbidity and mortality in CMV-seropositive patients despite highly effective prevention of CMV disease after allogeneic T-cell-depleted stem cell transplantation. *Blood* **95**, 2240-2245.
- BROWN, M.G., DOKUN, A.O., HEUSEL, J.W., SMITH, H.R., BECKMAN, D.L., BLATTENBERGER, E.A., DUBBELDE, C.E., STONE, L.R., SCALZO, A.A., and YOKOYAMA, W.M. (2001). Vital involvement of a natural killer cell activation receptor in resistance to viral infection. *Science* **292**, 934-937.
- BROWNE, H., CHURCHER, M., and MINSON, T. (1992). Construction and characterization of a human cytomegalovirus mutant with the UL18 (class I homolog) gene deleted. *J Virol* **66**, 6784-6787.
- BRUNE, W., HENGEL, H., and KOSZINOWSKI, U.H. (1999a). A mouse model for cytomegalovirus infection. In *Current protocols in immunology*(John Wiley & Sons, New York) pp. 19.7.1-19.7.13.
- BRUNE, W., MENARD, C., HEESEMANN, J., and KOSZINOWSKI, U.H. (2001). A ribonucleotide reductase homolog of cytomegalovirus and endothelial cell tropism. *Science* **291**, 303-305.
- BRUNE, W., MENARD, C., HOBOM, U., ODENBREIT, S., MESSERLE, M., and KOSZINOWSKI, U.H. (1999b). Rapid identification of essential and nonessential herpesvirus genes by direct transposon mutagenesis. *Nat. Biotechnol.* **17**, 360-364.
- BRUNE, W., MESSERLE, M., and KOSZINOWSKI, U.H. (2000). Forward with BACs: new tools for herpesvirus genomics. *Trends Genet.* **16**, 254-259.
- BRUNE, W., NEVELS, M., and SHENK, T. (2003). Murine cytomegalovirus m41 open reading frame encodes a Golgi-localized antiapoptotic protein. *J. Virol.* **77**, 11633-11643.
- CAIRING, J., BARR, T., and HEATH, A.W. (2005). Adjuvanticity of anti-cD40 in vaccine development. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **7**, 73-77.
- CHAI, J.G., VENDETTI, S., BARTOK, I., SCHOENDORF, D., TAKACS, K., ELLIOTT, J., LECHLER, R., and DYSON, J. (1999). Critical role of costimulation in the activation of naive antigen-specific TCR transgenic CD8+ T cells in vitro. *J. Immunol.* **163**, 1298-1305.
- CHAMBERS, J., ANGULO, A., AMARATUNGA, D., GUO, H., JIANG, Y., WAN, J.S., BITTNER, A., FRUEH, K., JACKSON, M.R., PETERSON, P.A., ERLANDER, M.G., and GHAZAL, P. (1999). DNA microarrays of the complex human cytomegalovirus genome: profiling kinetic class with drug sensitivity of viral gene expression. *J. Virol.* **73**, 5757-5766.
- CHEE, M.S., BANKIER, A.T., BECK, S., BOHNI, R., BROWN, C.M., CERNY, R., HORSNELL, T., HUTCHISON, C.A., KOUZARIDES, T., MARTIGNETTI, J.A., PREDDIE, E., SATCHWELL, S.C., TOMLINSON, P., WESTON, K.M., and

6. Literaturverzeichnis

- BARRELL, B.G. (1990). Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **154**, 125-169.
- CHEREPANOV, P.P. and WACKERNAGEL, W. (1995). Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* **158**, 9-14.
- CIECHANOVER, A. (1994). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell* **79**, 13-21.
- CLAYTON, A., COURT, J., NAVABI, H., ADAMS, M., MASON, M.D., HOBOT, J.A., NEWMAN, G.R., and JASANI, B. (2001). Analysis of antigen presenting cell derived exosomes, based on immuno-magnetic isolation and flow cytometry. *J. Immunol. Methods* **247**, 163-174.
- COLBERG-POLEY, A.M., SANTOMENNA, L.D., HARLOW, P.P., BENFIELD, P.A., and TENNEY, D.J. (1992). Human cytomegalovirus US3 and UL36-38 immediate-early proteins regulate gene expression. *J. Virol.* **66**, 95-105.
- COSCOY, L. and GANEM, D. (2001). A viral protein that selectively downregulates ICAM-1 and B7-2 and modulates T cell costimulation. *J. Clin. Invest* **107**, 1599-1606.
- COSCOY, L., SANCHEZ, D.J., and GANEM, D. (2001). A novel class of herpesvirus-encoded membrane-bound E3 ubiquitin ligases regulates endocytosis of proteins involved in immune recognition. *J. Cell Biol.* **155**, 1265-1273.
- DANIELS, K.A., DEVORA, G., LAI, W.C., O'DONNELL, C.L., BENNETT, M., and WELSH, R.M. (2001). Murine cytomegalovirus is regulated by a discrete subset of natural killer cells reactive with monoclonal antibody to Ly49H. *J. Exp. Med.* **194**, 29-44.
- DATSENKO, K.A. and WANNER, B.L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 6640-6645.
- DE SMEDT, T., PAJAK, B., MURAILLE, E., LESPAGNARD, L., HEINEN, E., DE BAETSELIER, P., URBAIN, J., LEO, O., and MOSER, M. (1996). Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo. *J. Exp. Med.* **184**, 1413-1424.
- DITTMER, U., HE, H., MESSER, R.J., SCHIMMER, S., OLBRICH, A.R., OHLEN, C., GREENBERG, P.D., STROMNES, I.M., IWASHIRO, M., SAKAGUCHI, S., EVANS, L.H., PETERSON, K.E., YANG, G., and HASENKRUG, K.J. (2004). Functional impairment of CD8(+) T cells by regulatory T cells during persistent retroviral infection. *Immunity.* **20**, 293-303.
- ELSEVIER, S.M. and RUDDLE, F.H. (1975). Location of genes coding for 18S and 28S ribosomal RNA within the genome of *Mus musculus*. *Chromosoma* **52**, 219-228.

6. Literaturverzeichnis

- FAN, J.Y., CARPENTIER, I. L., GORDEN, P., VAN OBERGHEEN, E., BLACKETT, N.M., GRUNFELD, C., ORCI, L., (1982). Receptor-mediated endocytosis of insulin: role of microvilli, coated pits, and coated vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **(24)**:7788-91.
- FARRELL, H.E., VALLY, H., LYNCH, D.M., FLEMING, P., SHELLAM, G.R., SCALZO, A.A., and DAVIS-POYNTER, N.J. (1997). Inhibition of natural killer cells by a cytomegalovirus MHC class I homologue in vivo. *Nature* **386**, 510-514.
- FELDER, S., MILLER, K., MOEHREN, G., ULLRICH, A., SCHLESSINGER, J., and HOPKINS, C.R. (1990). Kinase activity controls the sorting of the epidermal growth factor receptor within the multivesicular body. *Cell* **61**, 623-634.
- FELDMAN, R.M., CORRELL, C.C., KAPLAN, K.B., and DESHAIES, R.J. (1997). A complex of Cdc4p, Skp1p, and Cdc53p/cullin catalyzes ubiquitination of the phosphorylated CDK inhibitor Sic1p. *Cell* **91**, 221-230.
- FOWLER, K.B., STAGNO, S., PASS, R.F., BRITT, W.J., BOLL, T.J., and ALFORD, C.A. (1992). The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status. *N. Engl. J. Med.* **326**, 663-667.
- FOY, T.M. and WALDSCHMIDT, T.J. (1993). Switching capacity of Fc epsilon RII-positive and -negative murine B cells. *Eur. J. Immunol.* **23**, 3208-3216.
- FUGIER-VIVIER, I., SERVET-DELPRAT, C., RIVAILLER, P., RISSOAN, M.C., LIU, Y.J., and RABOURDIN-COMBE, C. (1997). Measles virus suppresses cell-mediated immunity by interfering with the survival and functions of dendritic and T cells. *J. Exp. Med.* **186**, 813-823.
- GEUZE, H.J. (1998). The role of endosomes and lysosomes in MHC class II functioning. *Immunol. Today* **19**, 282-287.
- GIBSON, W., CLOPPER, K.S., BRITT, W.J., and BAXTER, M.K. (1996). Human cytomegalovirus (HCMV) smallest capsid protein identified as product of short open reading frame located between HCMV UL48 and UL49. *J. Virol.* **70**, 5680-5683.
- GREDMARK, S. and SODERBERG-NAUCLER, C. (2003). Human cytomegalovirus inhibits differentiation of monocytes into dendritic cells with the consequence of depressed immunological functions. *J. Virol.* **77**, 10943-10956.
- GREWAL, I.S., XU, J., and FLAVELL, R.A. (1995). Impairment of antigen-specific T-cell priming in mice lacking CD40 ligand. *Nature* **378**, 617-620.
- HARRIS, N.L. and RONCHESE, F. (1999). The role of B7 costimulation in T-cell immunity. *Immunol. Cell Biol.* **77**, 304-311.
- HASAN, M., KRMPOTIC, A., RUZSICS, Z., BUBIC, I., LENAC, T., HALENIUS, A., LOEWENDORF, A., MESSERLE, M., HENGEL, H., JONJIC, S., and KOSZINOWSKI, U.H. (2005). Selective down-regulation of the NKG2D ligand H60 by mouse cytomegalovirus m155 glycoprotein. *J. Virol.* **79**, 2920-2930.

6. Literaturverzeichnis

- HERBST, J. J., OPRESKO, L. K., WALSH, B. J., LAUFFENBURGER, D. A., WILEY, H. S. (1994). Regulation of postendocytic trafficking of the epidermal growth factor receptor through endosomal retention. *J. Biol. Chem.* **269**(17), 12865-73
- HERTEL, C., COULTER, S. J.; PERKINS, J. P. (1986). The involvement of cellular ATP in receptor-mediated internalization of epidermal growth factor and hormone-induced internalization of beta-adrenergic receptors. *J. Biol. Chem.* **261** (13) 5974-80
- HERTEL, L., LACAILLE, V. G., STROBL, H., MELLINS, E. D., and MOCARSKI, E. S. (2003). Susceptibility of immature and mature Langerhans cell-type dendritic cells to infection and immunomodulation by human cytomegalovirus. *J. Virol.* **77**, 7563-7574.
- HIROKAWA, T., BOON-CHIENG, S., and MITAKU, S. (1998). SOSUI: Classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics* **14**, 378-379.
- HOLTAPPELS, R., PAHL-SEIBERT, M. F., THOMAS, D., and REDDEHASE, M. J. (2000). Enrichment of immediate-early 1 (m123/pp89) peptide-specific CD8 T cells in a pulmonary CD62L(lo) memory-effector cell pool during latent murine cytomegalovirus infection of the lungs. *J. Virol.* **74**, 11495-11503.
- HOLTAPPELS, R., PODLECH, J., GRZIMEK, N. K., THOMAS, D., PAHL-SEIBERT, M. F., and REDDEHASE, M. J. (2001). Experimental preemptive immunotherapy of murine cytomegalovirus disease with CD8 T-cell lines specific for ppM83 and pM84, the two homologs of human cytomegalovirus tegument protein ppUL83 (pp65). *J. Virol.* **75**, 6584-6600.
- HOLTAPPELS, R., THOMAS, D., PODLECH, J., and REDDEHASE, M. J. (2002). Two antigenic peptides from genes m123 and m164 of murine cytomegalovirus quantitatively dominate CD8 T-cell memory in the H-2d haplotype. *J. Virol.* **76**, 151-164.
- HONESS, R. W., ROIZMAN, B. (1974). Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. *J. Virol.* **14**, 8-19.
- HUDSON, J. B. (1979). The murine cytomegalovirus as a model for the study of viral pathogenesis and persistent infections. *Arch. Virol.* **62**, 1-29.
- HUIBREGTSE, J. M., SCHEFFNER, M., BEAUDENON, S., and HOWLEY, P. M. (1995). A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**, 2563-2567.
- IKEMIZU, S., GILBERT, R. J., FENNELLY, J. A., COLLINS, A. V., HARLOS, K., JONES, E. Y., STUART, D. I., and DAVIS, S. J. (2000). Structure and dimerization of a soluble form of B7-1. *Immunity.* **12**, 51-60.
- JACKSON, P. K., ELDRIDGE, A. G., FREED, E., FURSTENTHAL, L., HSU, J. Y., KAISER, B. K., REIMANN, J. D. (2000). The lore of the RINGs: substrate

6. Literaturverzeichnis

- recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *Trends Cell Biol.* **10**, 429-39. Review.
- JANEWAY, C.A., JR. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **54 Pt 1**, 1-13.
- JENTSCH, S. and SCHLENKER, S. (1995). Selective protein degradation: a journey's end within the proteasome. *Cell* **82**, 881-884.
- JOHNSTONE, R.M., ADAM, M., HAMMOND, J.R., ORR, L., and TURBIDE, C. (1987). Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J. Biol. Chem.* **262**, 9412-9420.
- JONES, T.R., HANSON, L.K., SUN, L., SLATER, J.S., STENBERG, R.M., and CAMPBELL, A.E. (1995). Multiple independent loci within the human cytomegalovirus unique short region down-regulate expression of major histocompatibility complex class I heavy chains. *J. Virol.* **69**, 4830-4841.
- JONJIC, S., PAVIC, I., LUCIN, P., RUKAVINA, D., and KOSZINOWSKI, U.H. (1990). Efficacious control of cytomegalovirus infection after long-term depletion of CD8+ T lymphocytes. *J. Virol.* **64**, 5457-5464.
- KASPER, M.R., ROETH, J.F., WILLIAMS, M., FILZEN, T.M., FLEIS, R.I., and COLLINS, K.L. (2005). HIV-1 Nef disrupts antigen presentation early in the secretory pathway. *J. Biol. Chem.* **280**, 12840-12848.
- KLEIJMEER, M.J., MORKOWSKI, S., GRIFFITH, J.M., RUDENSKY, A.Y., and GEUZE, H.J. (1997). Major histocompatibility complex class II compartments in human and mouse B lymphoblasts represent conventional endocytic compartments. *J. Cell Biol.* **139**, 639-649.
- KLEIJNEN, M.F., HUPPA, J.B., LUCIN, P., MUKHERJEE, S., FARRELL, H., CAMPBELL, A.E., KOSZINOWSKI, U.H., HILL, A.B., and PLOEGH, H.L. (1997). A mouse cytomegalovirus glycoprotein, gp34, forms a complex with folded class I MHC molecules in the ER which is not retained but is transported to the cell surface. *EMBO J.* **16**, 685-694.
- KNIGHT, S.C. and PATTERSON, S. (1997). Bone marrow-derived dendritic cells, infection with human immunodeficiency virus, and immunopathology. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 593-615.
- KRMPOTIC, A., BUBIC, I., POLIC, B., LUCIN, P., and JONJIC, S. (2003). Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection. *Microbes. Infect.* **5**, 1263-1277.
- KRMPOTIC, A., BUSCH, D.H., BUBIC, I., GEBHARDT, F., HENGEL, H., HASAN, M., SCALZO, A.A., KOSZINOWSKI, U.H., and JONJIC, S. (2002). MCMV glycoprotein gp40 confers virus resistance to CD8+ T cells and NK cells in vivo. *Nat. Immunol.* **3**, 529-535.
- KRMPOTIC, A., HASAN, M., LOEWENDORF, A., SAULIG, T., HALENIUS, A., LENAC, T., POLIC, B., BUBIC, I., KRIEGESKORTE, A., PERNJAK-PUGEL, E.,

6. Literaturverzeichnis

- MESSERLE, M., HENGEL, H., BUSCH, D.H., KOSZINOWSKI, U.H., and JONJIC, S. (2005). NK cell activation through the NKG2D ligand MULT-1 is selectively prevented by the glycoprotein encoded by mouse cytomegalovirus gene m145. *J. Exp. Med.* **201**, 211-220.
- KRUMMEL, M.F. and ALLISON, J.P. (1995). CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J. Exp. Med.* **182**, 459-465.
- KURZ, S.K. and REDDEHASE, M.J. (1999). Patchwork pattern of transcriptional reactivation in the lungs indicates sequential checkpoints in the transition from murine cytomegalovirus latency to recurrence. *J. Virol.* **73**, 8612-8622.
- LEE, S.H., GIRARD, S., MACINA, D., BUSA, M., ZAFER, A., BELOUCHI, A., GROS, P., and VIDAL, S.M. (2001). Susceptibility to mouse cytomegalovirus is associated with deletion of an activating natural killer cell receptor of the C-type lectin superfamily. *Nat. Genet.* **28**, 42-45.
- LENSCHOW, D.J., WALUNAS, T.L., and BLUESTONE, J.A. (1996). CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu. Rev. Immunol.* **14**, 233-258.
- LINSLEY, P.S., BRADY, W., GROSMIRE, L., ARUFFO, A., DAMLE, N.K., and LEDBETTER, J.A. (1991a). Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation. *J. Exp. Med.* **173**, 721-730.
- LINSLEY, P.S., BRADY, W., URNES, M., GROSMIRE, L.S., DAMLE, N.K., and LEDBETTER, J.A. (1991c). CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J. Exp. Med.* **174**, 561-569.
- LINSLEY, P.S., BRADY, W., URNES, M., GROSMIRE, L.S., DAMLE, N.K., and LEDBETTER, J.A. (1991b). CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J. Exp. Med.* **174**, 561-569.
- LINSLEY, P.S., GREENE, J.L., BRADY, W., BAJORATH, J., LEDBETTER, J.A., and PEACH, R. (1994). Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. *Immunity.* **1**, 793-801.
- LJUNGGREN, H.G. and KARRE, K. (1985). Host resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma variants. Analysis of the mechanism. *J. Exp. Med.* **162**, 1745-1759.
- LODOEN, M.B., ABENES, G., UMAMOTO, S., HOUCHINS, J.P., LIU, F., and LANIER, L.L. (2004). The cytomegalovirus m155 gene product subverts natural killer cell antiviral protection by disruption of H60-NKG2D interactions. *J. Exp. Med.* **200**, 1075-1081.
- LOHR, J., KNOECHEL, B., JIANG, S., SHARPE, A.H., and ABBAS, A.K. (2003). The inhibitory function of B7 costimulators in T cell responses to foreign and self-antigens. *Nat. Immunol.* **4**, 664-669.

6. Literaturverzeichnis

- LOHR, J., KNOECHEL, B., KAHN, E.C., and ABBAS, A.K. (2004). Role of B7 in T cell tolerance. *J. Immunol.* **173**, 5028-5035.
- LUCIN, P., JONJIC, S., MESSERLE, M., POLIC, B., HENGEL, H., and KOSZINOWSKI, U.H. (1994). Late phase inhibition of murine cytomegalovirus replication by synergistic action of interferon-gamma and tumour necrosis factor. *J Gen Virol* **75**, 101-110.
- MAILLIARD, R.B., EGAWA, S., CAI, Q., KALINSKA, A., BYKOVSKAYA, S.N., LOTZE, M.T., KAPSENBERG, M.L., STORKUS, W.J., and KALINSKI, P. (2002). Complementary dendritic cell-activating function of CD8+ and CD4+ T cells: helper role of CD8+ T cells in the development of T helper type 1 responses. *J. Exp. Med.* **195**, 473-483.
- MATHYS, S., SCHROEDER, T., ELLWART, J., KOSZINOWSKI, U.H., MESSERLE, M., and JUST, U. (2003). Dendritic cells under influence of mouse cytomegalovirus have a physiologic dual role: to initiate and to restrict T cell activation. *J. Infect. Dis.* **187**, 988-999.
- MAYER, A., PODLECH, J., KURZ, S., STEFFENS, H.P., MAIBERGER, S., THALMEIER, K., ANGELE, P., DREHER, L., and REDDEHASE, M.J. (1997). Bone marrow failure by cytomegalovirus is associated with an in vivo deficiency in the expression of essential stromal hemopoietin genes. *J. Virol.* **71**, 4589-4598.
- MENARD, C., WAGNER, M., RUZSICS, Z., HOLAK, K., BRUNE, W., CAMPBELL, A.E., KOSZINOWSKI, U. H.(2003). Role of murine cytomegalovirus US22 gene family members in replication in macrophages. *J Virol.* **77**, 5557-70.
- MESSERLE, M., CRNKOVIC, I., HAMMERSCHMIDT, W., ZIEGLER, H., and KOSZINOWSKI, U.H. (1997). Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 14759-14763.
- MOUTAFTSI, M., BRENNAN, P., SPECTOR, S.A., and TABI, Z. (2004). Impaired lymphoid chemokine-mediated migration due to a block on the chemokine receptor switch in human cytomegalovirus-infected dendritic cells. *J. Virol.* **78**, 3046-3054.
- MOUTAFTSI, M., MEHL, A.M., BORYSIEWICZ, L.K., and TABI, Z. (2002). Human cytomegalovirus inhibits maturation and impairs function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* **99**, 2913-2921.
- MUTTER, W., REDDEHASE, M.J., BUSCH, F.W., BUHRING, H.J., and KOSZINOWSKI, U.H. (1988). Failure in generating hemopoietic stem cells is the primary cause of death from cytomegalovirus disease in the immunocompromised host. *J. Exp. Med.* **167**, 1645-1658.
- ORABONA, C., GROHMANN, U., BELLADONNA, M.L., FALLARINO, F., VACCA, C., BIANCHI, R., BOZZA, S., VOLPI, C., SALOMON, B.L., FIORETTI, M.C., ROMANI, L., and PUC CETTI, P. (2004). CD28 induces immunostimulatory signals in dendritic cells via CD80 and CD86. *Nat. Immunol.* **5**, 1134-1142.

6. Literaturverzeichnis

- PANDEY, KN (2005) Internalization and trafficking of guanylyl cyclase/natriuretic peptide receptor-A. *Peptides*. **6**, 985-1000
- PASS, R.F. (2001). Cytomegalovirus. In *Fields Virology*. D.M.Knipe and P.M.Howley, eds. (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.) pp. 2675-2705.
- PETERS, P.J., RAPOSO, G., NEEFJES, J.J., OORSCHOT, V., LEIJENDEKKER, R.L., GEUZE, H.J., and PLOEGH, H.L. (1995). Major histocompatibility complex class II compartments in human B lymphoblastoid cells are distinct from early endosomes. *J. Exp. Med.* **182**, 325-334.
- PODLECH, J., HOLTAPPELS, R., PAHL-SEIBERT, M.F., STEFFENS, H.P., and REDDEHASE, M.J. (2000). Murine model of interstitial cytomegalovirus pneumonia in syngeneic bone marrow transplantation: persistence of protective pulmonary CD8-T-cell infiltrates after clearance of acute infection. *J. Virol.* **74**, 7496-7507.
- POLIC, B., HENGEL, H., KRMPOTIC, A., TRGOVCICH, J., PAVIC, I., LUCCARONIN, P., JONJIC, S., and KOSZINOWSKI, U.H. (1998). Hierarchical and redundant lymphocyte subset control precludes cytomegalovirus replication during latent infection. *J. Exp. Med.* **188**, 1047-1054.
- RAPOSO, G., NIJMAN, H.W., STOORVOGEL, W., LIEJENDEKKER, R., HARDING, C.V., MELIEF, C.J., and GEUZE, H.J. (1996). B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J. Exp. Med.* **183**, 1161-1172.
- RAWLINSON, W.D., FARRELL, H.E., and BARRELL, B.G. (1996). Analysis of the complete DNA sequence of murine cytomegalovirus. *J. Virol.* **70**, 8833-8849.
- REDDEHASE, M.J., BALTHESSEN, 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., JONJIC, S., WEILAND, F., MUTTER, W., and KOSZINOWSKI, U.H. (1988). Adoptive immunotherapy of murine cytomegalovirus adenitis in the immunocompromised host: CD4-helper-independent antiviral function of CD8-positive memory T lymphocytes derived from latently infected donors. *J. Virol.* **62**, 1061-1065.
- 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.
- REIS E SOUSA. (2004). Activation of dendritic cells: translating innate into adaptive immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **16**, 21-25.
- RENFREW, C.A. and HUBBARD, A.L. (1991). Sequential processing of epidermal growth factor in early and late endosomes of rat liver. *J. Biol. Chem.* **266**, 4348-4356.

6. Literaturverzeichnis

- REUSCH, U., MURANYI, W., LUCIN, P., BURGERT, H.G., HENGEL, H., and KOSZINOWSKI, U.H. (1999). A cytomegalovirus glycoprotein re-routes MHC class I complexes to lysosomes for degradation. *EMBO J.* **18**, 1081-1091.
- ROCK, K.L., GRAMM, C., ROTHSTEIN, L., CLARK, K., STEIN, R., DICK, L., HWANG, D., and GOLDBERG, A.L. (1994). Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* **78**, 761-771.
- RUBERTI, I., SESSA, G., LUCCHETTI, S., MORELLI, G. (1991). A novel class of plant proteins containing a homeodomain with a closely linked leucine zipper motif. *EMBO J.* **10**, 1787-91
- RUEDL, C., KOPF, M., and BACHMANN, M.F. (1999). CD8(+) T cells mediate CD40-independent maturation of dendritic cells in vivo. *J. Exp. Med.* **189**, 1875-1884.
- SALIO, M., CELLA, M., SUTER, M., and LANZAVECCHIA, A. (1999). Inhibition of dendritic cell maturation by herpes simplex virus. *Eur. J. Immunol.* **29**, 3245-3253.
- SCALZO, A.A. (2002). Successful control of viruses by NK cells--a balance of opposing forces? *Trends Microbiol.* **10**, 470-474.
- SCHEFFNER, M., NUBER, U., and HUIBREGTSE, J.M. (1995). Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature* **373**, 81-83.
- SCHOENBERGER, S.P., TOES, R.E., VAN DER VOORT, E.I., OFFRINGA, R., and MELIEF, C.J. (1998). T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* **393**, 480-483.
- SHEN, Y., ZHU, H., and SHENK, T. (1997). Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins are mutagenic and mediate "hit-and-run" oncogenic transformation in cooperation with the adenovirus E1A proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 3341-3345.
- SHORTMAN, K. and LIU, Y.J. (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 151-161.
- SKALETSKAYA, A., BARTLE, L.M., CHITTENDEN, T., MCCORMICK, A.L., MOCARSKI, E.S., and GOLDMACHER, V.S. (2001). A cytomegalovirus-encoded inhibitor of apoptosis that suppresses caspase-8 activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 7829-7834.
- SKOWYRA, D., CRAIG, K.L., TYERS, M., ELLEDGE, S.J., and HARPER, J.W. (1997). F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell* **91**, 209-219.
- SMYTH, C.M., LOGAN, G., BOADLE, R., ROWE, P.B., SMYTHE, J.A., and ALEXANDER, I.E. (2005). Differential subcellular localization of CD86 in human PBMC-derived macrophages and DCs, and ultrastructural characterization by immuno-electron microscopy. *Int. Immunol.* **17**, 123-132.

6. Literaturverzeichnis

- SPAETE, R.R., MOCARSKI, R.S. (1987). Insertion and deletion mutagenesis of the human cytomegalovirus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **84**, 7213-7.
- STAGNO, S., PASS, R.F., DWORSKY, M.E., and ALFORD, C.A., JR. (1982). Maternal cytomegalovirus infection and perinatal transmission. *Clin. Obstet. Gynecol.* **25**, 563-576.
- STEFFENS, H.P., PODLECH, J., KURZ, S., ANGELE, P., DREIS, D., and REDDEHASE, M.J. (1998). Cytomegalovirus inhibits the engraftment of donor bone marrow cells by downregulation of hemopoietin gene expression in recipient stroma. *J. Virol.* **72**, 5006-5015.
- TENNEY, D.J. and COLBERG-POLEY, A.M. (1991). Human cytomegalovirus UL36-38 and US3 immediate-early genes: temporally regulated expression of nuclear, cytoplasmic, and polysome-associated transcripts during infection. *J. Virol.* **65**, 6724-6734.
- TENNEY, D.J., SANTOMENNA, L.D., GOUDIE, K.B., and COLBERG-POLEY, A.M. (1993). The human cytomegalovirus US3 immediate-early protein lacking the putative transmembrane domain regulates gene expression. *Nucleic Acids Res.* **21**, 2931-2937.
- THALE, R., SZEPAN, U., HENGEL, H., GEGINAT, G., LUCIN, P., and KOSZINOWSKI, U.H. (1995). Identification of the mouse cytomegalovirus genomic region affecting major histocompatibility complex class I molecule transport. *J. Virol.* **69**, 6098-6105.
- TIVOL, E.A., BORRIELLO, F., SCHWEITZER, A.N., LYNCH, W.P., BLUESTONE, J.A., and SHARPE, A.H. (1995). Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity*. **3**, 541-547.
- VAN DER MERWE, P.A., BODIAN, D.L., DAENKE, S., LINSLEY, P., and DAVIS, S.J. (1997). CD80 (B7-1) binds both CD28 and CTLA-4 with a low affinity and very fast kinetics. *J. Exp. Med.* **185**, 393-403.
- VAN MIERLO, G.J., BOONMAN, Z.F., DUMORTIER, H.M., DEN BOER, A.T., FRANSEN, M.F., NOUTA, J., VAN DER VOORT, E.I., OFFRINGA, R., TOES, R.E., and MELIEF, C.J. (2004). Activation of dendritic cells that cross-present tumor-derived antigen licenses CD8+ CTL to cause tumor eradication. *J. Immunol.* **173**, 6753-6759.
- VAN MIERLO, G.J., DEN BOER, A.T., MEDEMA, J.P., VAN DER VOORT, E.I., FRANSEN, M.F., OFFRINGA, R., MELIEF, C.J., and TOES, R.E. (2002). CD40 stimulation leads to effective therapy of CD40(-) tumors through induction of strong systemic cytotoxic T lymphocyte immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 5561-5566.
- VEYRAT-DUREBEX, C., POMERLEAU, L., LANGLOIS, D., and GAUDREAU, P. (2005). Internalization and trafficking of the human and rat growth hormone-releasing hormone receptor. *J. Cell Physiol* **203**, 335-344.

6. Literaturverzeichnis

- WAGNER, M., GUTERMANN, A., PODLECH, J., REDDEHASE, M.J., and KOSZINOWSKI, U.H. (2002). Major histocompatibility complex class I allele-specific cooperative and competitive interactions between immune evasion proteins of cytomegalovirus. *J. Exp. Med.* **196**, 805-816.
- WAGNER, M., JONJIC, S., KOSZINOWSKI, U.H., and MESSERLE, M. (1999). Systematic excision of vector sequences from the BAC-cloned herpesvirus genome during virus reconstitution. *J. Virol.* **73**, 7056-7060.
- WALUNAS, T.L., LENSCHOW, D.J., BAKKER, C.Y., LINSLEY, P.S., FREEMAN, G.J., GREEN, J.M., THOMPSON, C.B., and BLUESTONE, J.A. (1994). CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity.* **1**, 405-413.
- ZARUDNAYA, M.I., KOLOMIETS, I.M., POTYAHAYLO, A.L., and HOVORUN, D.M. (2003). Downstream elements of mammalian pre-mRNA polyadenylation signals: primary, secondary and higher-order structures. *Nucleic Acids Res.* **31**, 1375-1386.
- ZHENG, Y., MANZOTTI, C.N., LIU, M., BURKE, F., MEAD, K.I., and SANSOM, D.M. (2004). CD86 and CD80 differentially modulate the suppressive function of human regulatory T cells. *J. Immunol.* **172**, 2778-2784.
- ZHU, H., SHEN, Y., and SHENK, T. (1995). Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins block apoptosis. *J. Virol.* **69**, 7960-7970.
- ZIEGLER, H., MURANYI, W., BURGERT, H.G., KREMMER, E., and KOSZINOWSKI, U.H. (2000). The luminal part of the murine cytomegalovirus glycoprotein gp40 catalyzes the retention of MHC class I molecules. *EMBO J.* **19**, 870-881.

7. Anhang

7.1 Tabellen

Tabelle 2: Vektoren

Vektor (Bezeichnung)	Verwendung	Herkunft
pST76-KSR	Shuttle-Plasmid	(Borst <i>et al.</i> , 2004)
pGP704-Kan	Template für BAC-Mutagenese-PCR	Dr. Borst
pCP20	Expression der FLP-Rekombinase	(Cherepanov and Wackernagel, 1995)
pKD46	Expression von <i>redα</i> , <i>-β</i> und <i>-γ</i> des Bakteriophagen λ	(Datsenko and Wanner, 2000)
pMUT37	Subklonierung von Fragmenten des MCMV-Genoms	Prof. Messerle
pOri6K	Mutagenese von BAC-Plasmiden	Dr. Borst
pGEM-T	Klonierung von PCR-Produkten	Promega

Tabelle 3: Antikörper und sekundäre Farbstoffe

Antigen	Isoliert aus	Hersteller und Produktnummer	gekoppelt an/ Fluoreszenz	Anwendung	Verdünnung
CD80 Maus	Hamster	BD Pharmingen, 553767	Biotin	FACS	1 μ l/1x10 ⁶ Zellen
H-2D ^d	Maus	BD Pharmingen, 553578 Klon KH74	Biotin	FACS	1 μ l/1x10 ⁶ Zellen
H-2K ^b	Maus	BD Pharmingen, 553568 Klon AF6-88.5	Biotin	FACS	1 μ l/1x10 ⁶ Zellen
I-A ^b	Maus	BD Pharmingen, 553550 Klon AF6-120.1	Biotin	FACS, IF	1 μ l/1x10 ⁶ Zellen, 1:4000- 1:6000
I-A ^d	Maus	BD Pharmingen, 553546, Klon AMS 32.1	Biotin	FACS, IF	1 μ l/1x10 ⁶ Zellen, 1:4000- 1:6000
CD86 Maus	Ratte	BD Pharmingen, 553690	Biotin	FACS, IF	1 μ l/1x10 ⁶ Zellen 1:4000- 1:6000
CD40 Maus	Ratte	BD Pharmingen, 553789	Biotin	FACS, IF	1 μ l/1x10 ⁶ Zellen 1:4000- 1:6000
CD71 Maus (Transferrin-Rezeptor)	Ratte	eBioscience, 11-0711	FITC	IF	1:2000
SAV		BD Pharmingen 554067	APC	FACS	0,5 μ l/1x10 ⁶ Zellen

HA	Kaninchen	Sigma H6908		WB	1:2000
Biotin		Molecular Probes	Alexa Fluor 546	IF	1:8000
KDEL-Rezeptor Maus	Maus	Stressgen VAA-PT048		IF	1:3000
Maus IgG (H+L) highly cross-absorbed	Ziege	Molecular Probes A-11030	Alexa Fluor 546	IF	1:6000

Tabelle 4: Primer für die Durchführung der RT-PCR

Name	Labornamen	Sequenz 5' nach 3'
m147/m148RT.for		CAG ATA CAC CAG CCG AAA G
Pr-AL10	Exon I.rev	ATC ACC CCG GAG GAT GCG TCT TCT TG

Tabelle 5: Primer für die Durchführung der RACE-Analysen

Name	Labornamen	Sequenz 5' nach 3'
Pr-AL11	M148/m149 splice.for	GGCGGAATCCATTTCAAGAC
Pr-AL 12	m147/m148 splice.rev	TTTGGCAAGCTTTCCACCTC
m147/m148RT.rev		TGGAATAAGATGCAACGAAGAC
T3		ATTAACCCTCACTAAAG
T7		AATACGACTCACTATAG

Tabelle 6: Primer zur Herstellung der Northern-Blot Sonden

Name	Sequenz 5' nach 3'	Verwendung
m148Ori6K.for	GGATGCGGCCGCTCACGTAGCCC ACCCAAAGCGAGA	Sonde 1) modB7-2 Northern Blot
NotHafalsch.rev (m149i2.rev)	GAGGCGGCCGCGTGTGAAGGGG GTCTTGTG	Sonde 1) modB7-2 Northern Blot Ori6K cDNA MIEP
m147ori6K.rev	GATCGGATCCACAAGACACAAGTG CTCAATATATATCAAAAAGGATTTA TTTGACCGGAAAGGTTGAATTTTT	Sonde 2) modB7-2 Northern Blot
m149ori6K.rev	GATCGGATCCACAAGACACAAGTG CTCAATATATATCAAAAAGGATTTA TTTTTCGGATACGGTGGCGTG	Sonde 2) modB7-2 Northern Blot
m155RT1.for	GATCGCTTGTGCCTACGCCTACAT CGAT	Sonde a) m155 Northern Blot
m155RT1.rev	ACGGGCGGGACGCTCTTCTTCTC CCCTTCACAGGA	Sonde a) m155 Northern Blot
m155RT3.for	GTCGGCTAAGTTCTCGAGACTTGA	Sonde c) m155 Northern

	GATAGATTTTC	Blot
m155RT2.rev	TGACCTTGACGGATGATGGTTCCG AGCGAACCCCTCCT	Sonde c) m155 Northern Blot

Tabelle 7: Primer für die Herstellung von Virusmutanten mit großen Deletionen

Name	Sequenz 5' nach 3'	Herstellung von Virus
A1.for	CcgggggcgtgagggacgcgActgctcacggttctgttctgTttgtctg agatCTACAAGGACGACGACGACAAGTAA	MCMV-GFP A1
A1.rev	CagagcgcgagctcaagtcgCcatcatctctcggtcggaGagccg aggcgGTGACACAGGAACACTTAACGGCTGA	MCMV-GFP A1
A2.for	GtttctgacatgagtctgtGtgtttatttattaattatctgtcagtcaCTAC AAGGACGACGACGACAAGTAA	MCMV-GFP A2
A2.rev	CtgggcgccgaggccagtaaTgtgcctgtctcccggaccgcctag cagGTGACACAGGAACACTTAACGGCTGA	MCMV-GFP A2
A3.for	GtgtccgagaggftaaatagTtgatgggggtgacggggaaaaactcg ctacCTACAAGGACGACGACGACAAGTAA	MCMV-GFP A3
A3.rev	GtacgagtccgtgaccgcgtCctcccgtctttctgtcctaccgacc aGTGACACAGGAACACTTAACGGCTGA	MCMV-GFP A3
A4.for	CtggcgggataactgcaagaGaggggaaaagcggtcgatcccagc cgtaCTACAAGGACGACGACGACAAGTAA	MCMV-GFP A4
A4.rev	CggggagatcagcagagaggcGgatggggctctgcgggcgccagac cgtaGTGACACAGGAACACTTAACGGCTGA	MCMV-GFP A4
Δ1.for (5- m01)	CacgtgtagcataggaatcCagacgcgcgctcgctgaGCGTC GTGGAATGCCTTCGAATTC	MCMV- GFPΔ1, MCMV- GFPΔ8
Δ1.rev (3- m17)	CtttgaaatcggacgaccgaTcagaacgtccgccttcgagAACAA GGACGACGACGACAAGTAA	MCMV- GFPΔ1
Δ6.for	Agcgcgctccgaacctcctacgcgcttctctgttcttgagaacgacg acgacaagtaa	MCMV- GFPΔ6
Δ6.rev	Ctaccgtctcctgaatggcagagaggcgatctcgtacctctaccagg aacacttaacggctga	MCMV- GFPΔ6
Δ7S1.for	Aactggaaaatatagtttagcaccgtagagagggcgacagattcgat cactacaaggacgacgacaagtaa	MCMV- GFPΔ7, MCMV- GFPΔ7S1
Δ7S3.rev	atgtgctcggtaacgagttggccttcgtccggctgtccggcagactac gtgacacaggaacacttaacggctga	MCMV- GFPΔ7, MCMV- GFPΔ7S3
Δ8.rev (3- M22)	cgacgcaggagcccgttcacaatacacacggttcccgtccgtaccga ggAACAAAGGACGACGACGACAAGTAA	MCMV- GFPΔ8
Δ9.for (5- m23)	GaagttgtgggacactcggTcttcttggtgagcatggcctcGCGTC GTGGAATGCCTTCGAATTC	MCMV- GFPΔ9
Δ9.rev (3- m25.5)	GgcgtcaacgccgtgggccaGgtcttcacctacgagatcaAACAA GGACGACGACGACAAGTAA	MCMV- GFPΔ9

Tabelle 8: Aufbau der MCMV-Mutanten mit großen Deletionen

Name der Mutante	Position der Deletion (nt)	Deletierte ORFs	Deletierte Bp
MCMV-GFP Δ1	479-16910	m01-m17	16431
MCMV-GFP Δ6	203002-217799	m144-m158	14797
MCMV-GFP Δ7	218203-230019	M163-m170	11816
MCMV-GFP Δ8	479-23676	m01-m22	23197
MCMV-GFP Δ9	23943-31660	M23-M26	7717
MCMV-GFP A1	186084-193943	m128Ex 3-m138	7859
MCMV-GFP A2	153915-162771	m106-m108	8856
MCMV-GFP A3	169216-174574	M117-m120	5358
MCMV-GFP A4	34488-38827	M28-M31	4339

Die Position der Deletion gibt die jeweils erste und letzte Base der Deletion an. Die Deletierten ORFs geben die ersten und letzten ORFs an, die durch die Deletion nicht mehr vollständig vorliegen.

Tabelle 9: Primer für die Herstellung von Virusmutanten mit Insertionen und Einzelgendetionen

Name	Sequenz 5' nach 3'	Herstellung von Virus
M144.for	Ttttacaccatccgggtgaccacaccagacagatcagaggcg cgctcaaCTACAAGGACGACGACGACAAGTAA	MCMV- GFPΔm144, MCMV-GFPΔ6S1
M144.rev	gacatgaatgtgagatgtcgcatgggtgtcgatgtgtgatgtgta attaGTGACACAGGAACACTTAACGGCTGA	MCMV-GFPΔm144
M145.for	atgtcctgtttattgtctcacgacagacatacagagattcggacag tcacCTACAAGGACGACGACGACAAGTAA	MCMV-GFPΔm145
M145.reva	ccgcacacagatgtaggggcagactctgaggaccgggtgttca actccgcgaGTGACACAGGAACACTTAACGGCT GA	MCMV-GFPΔm145
M146.for	caaagaaaacacggggtttattttattgcattggccatctgactctt acCTACAAGGACGACGACGACAAGTAA	MCMV-GFPΔm146
M146.rev	gtgtgatgtgtcttttagtctctatccgtatcgcgcgcggtctcgcgac gaGTGACACAGGAACACTTAACGGCTGA	MCMV-GFPΔm146
M147/M148 .for	acatcacacaagtttattgagatggaccggaaaggttgaat ttatCTACAAGGACGACGACGACAAGTAA	MCMV- GFPΔm147/m148
M147/M148 .rev	tctctgaagaacgagacgggtcatcctgctgggtagatatctagaa catcaGTGACACAGGAACACTTAACGGCTGA	MCMV- GFPΔm147/m148, MCMV-GFPΔ6S1
M149.for	ttctagatatctaccagcaggatgaccgtctcgttcttcagagac ctccCTACAAGGACGACGACGACAAGTAA	MCMV- GFPΔm149, MCMV- GFPΔm149/m150, MCMV-GFPΔ6S2
M149.rev	ggtcgattgacacgaggaagcatcaccggatgccgcgtgacac ccgctccgGTGACACAGGAACACTTAACGGCTG A	MCMV-GFPΔm149
M149/M150 .rev	tgattgtcggcgggtctaataaaaatgtgtattgtcgcggttctctc acGTGACACAGGAACACTTAACGGCTGA	MCMV- GFPΔm149/m150

M151.for	attagaccgccgacaatcagttatcgaaagctgagctcgctgtg ggacgtCTACAAGGACGACGACGACAAGTAA	MCMV-GFPΔm151
M151.rev	tcattgaacgaacatattcgcgcatggagggacgggggctcggt gaggtGTGACACAGGAACACTTAACGGCTGA	MCMV-GFPΔm151
M152.fora	agcaccgacgatctgacattgtccagtggtccgggtcgacgaa catcacCTACAAGGACGACGACGACAAGTAA	MCMV-GFPΔm152
M 152.reva	gtcaccgctccacgtttcaccgtcggtctccgatcgctagcctgt acaaGTGACACAGGAACACTTAACGGCTGA	MCMV-GFPΔm152
M153.for	gactttcccaaaggcctgagccgaccgagggcggactcgctcgt cgatcacCTACAAGGACGACGACGACAAGTAA	MCMV-GFPΔm153
M153.rev	gcgcttattttttggccccacacacaaagctgggtaccgggag aacgaGTGACACAGGAACACTTAACGGCTGA	MCMV- GFPΔm153, MCMV-GFPΔ6S2
M154.for	accgcaccagagaccaagtataaagcagttttattgagctgatg agtcacCTACAAGGACGACGACGACAAGTAA	MCMV- GFPΔm154, MCMV-GFPΔ6S3
M154.rev	cgccaatcacattcacgaggggggtgctccgagatacgggtcga ccacgaGTGACACAGGAACACTTAACGGCTGA	MCMV-GFPΔm154
M155.for	gtcataattgtttattaatcgacgggagcgggggaccggggtg atcatCTACAAGGACGACGACGACAAGTAA	MCMV-GFPΔm155
M155.rev	gtgcctacgcctacatcgattacaagactatgatgatgacaacg acgattGTGACACAGGAACACTTAACGGCTGA	MCMV-GFPΔm155
M156.for	aagtctgtaagacaaaagtaaattttagtcgcgagacgcgag ctgtcgaCTACAAGGACGACGACGACAAGTAA	MCMV-GFPΔm156
M156.rev	tagtgacgatgggaattatggtgggaactatcttggtgataatgt cacgaGTGACACAGGAACACTTAACGGCTGA	MCMV-GFPΔm156
M157.for	agttgacgatccccgtccatttcgaagagctgatattgacaggca cgcggtCTACAAGGACGACGACGACAAGTAA	MCMV-GFPΔm157
M157.rev	tgaaccccgatattgagaaagtgtaccccgatattcagtacctctt gacaGTGACACAGGAACACTTAACGGCTGA	MCMV- GFPΔm157, MCMV-GFPΔ6S3
m147/m148 i for	gtagatgaggatgcagatgggcggaatccattcaagactacaa ggacgacgacgacaaa	RV-AL 13 (MCMV- GFPm147/m148i)
m147/m148 i rev	aaggatcggagagacgcggaccgagaggaggacgaggtag tgacacaggaacacttaa	RV-AL 13 (MCMV- GFPm147/m148i)
m149 i.for	Aatgtccaaccacccccacagagccgcacggtaccactaca aggacgacgacgacaaa	RV-AL 15 (MCMV- GFPm149i)
m149 i.rev	Cggttttggcaagcttccacctcagaccttcagatgtgacaca ggaacacttaa	RV-AL 15 (MCMV- GFPm149i)
m150 i.for A	Ggtcagatggaaccgctgctcccgaatgaagtatacttcgggat cattgacagtcactacaaggacgacgacgacaaa	RV-AL 17 (MCMV- GFPm150i)
m150 i.rev A	Gagcgcagtcgcggtcgtcttctcggcttcgatttcagcgatacc ttgtgacacaggaacacttaa	RV-AL 17 (MCMV- GFPm150i)
m149Ha.for	gtcgtcgcgctgagaaacacataggcacacaagaccccctc aacaccgTACCCATACGACGTCCCAGACTACG	RV-AL 16 (MCMV- GFPm149 HA

	CTtaaCTACAAGGACGACGACGACAAGTAA	falsch, m149/m150i)
m149Ha.rev	gaggccaagatcttgagaacggcaacgacgacagagagga gccggccGTGACACAGGAACACTTAACGGCTG A	RV-AL 16 (MCMV- GFPm149 HA falsch, m149/m150i)
M148Ha.for	tattccacaaatcagtctgtatgtgaaaattaacatatagatTAC CCATACGACGTCCCAGACTACGCTtagCTACA AGGACGACGACGACAAGTAA	RV-AL 14 (MCMV- GFPm148 HA falsch, MCMV-GFP m147i)
m148Ha.rev	gtggcggtaaattcagcgagaagaattcggagggtctctgaaga acGTGACACAGGAACACTTAACGGCTGA	RV-AL 14 (MCMV- GFPm148 HA falsch, MCMV-GFP m147i)

Tabelle 10: Positionen der in den $\Delta 6$ -Submutanten, den Einzelgendeletionsmutanten und den Insertionsmutanten deletierten Bereiche

Name der Mutante	Position der Deletion (nt)	Deletierte/betroffene ORFs	Phänotyp bezüglich CD86-Expression
MCMV-GFP $\Delta 6S1$	202746-207298	M144-m148	Ausfall
MCMV-GFP $\Delta 6S2$	207354-212803	M149-m153	Ausfall
MCMV-GFP $\Delta 6S3$	212946-216883	M154-m157	Wildtyp
MCMV-GFP Δ m144	202746-203892	M144	Wildtyp
MCMV-GFP Δ m145	204032-205492	M145	Wildtyp
MCMV-GFP Δ m146	205646-206774	M146	Wildtyp
MCMV-GFP Δ m147/m148	206866-207265	M147/m148	Ausfall
MCMV-GFP Δ m149	207354-207566	M149	Ausfall
MCMV-GFP Δ m149/m150	207354-208762	M149/m150	Ausfall
MCMV-GFP Δ m151	208844-209982	M151	Wildtyp
MCMV-GFP Δ m152	210246-211376	M152	Wildtyp
MCMV-GFP Δ m153/m154	211591-214047	M153/m154	Wildtyp
MCMV-GFP Δ m155	214440-215476	M155	Wildtyp
MCMV-	215628-	M156	Wildtyp

GFP Δ m156	215837		
MCMV-GFP Δ m157	216038-216883	M157	Wildtyp
RV-AL13	207112-207141	M147 und m148	
RV-AL14	207290-207337	M147	
RV-AL15	207467-207506	M149	
RV-AL16	207812-207864	M149 und m150	
RV-AL17	208529-208628	M150	

Die Position der Deletion gibt die jeweils erste und letzte Base der Deletion an.

Tabelle 11: Primer für die Herstellung der Ori6K-Plasmide

Name	Primer for (Sequenz 5' nach 3')	Primer rev (Sequenz 5' nach 3')
Ori6Km147	M147ori6k.for 5'GGATGCGGCCGCTTTG GCAAGCTTTCCACCTC	M147ori6k.rev 5'GATCGGATCCacaagacacaagtgtcaat atatatcaaaaaggattatttGACCGGAAAGGT TGAATTTTT
Ori6Km148	M148ori6k.for 5'GGATGCGGCCGCTCAC GTAGCCACCCAAAGCG AGA	M148ori6k.rev 5'GATCGGATCCacaagacacaagtgtcaat atatatcaaaaaggattatttTCTAGAACATCA TGTTTGCTAAT
Ori6Km149	M149ori6k.for 5'GGATGCGGCCGCGGC GGAATCCATTTCAAGAC	M149ori6k.rev 5'GATCGGATCCacaagacacaagtgtcaat atatatcaaaaaggattatttTTCGGATACGGT GGAGTG
Ori6KAL1	M147ori6k.for	M149ori6k.rev
Ori6Km155 MIEP	M155rei.for aaggatccgacgacgatacagttt gggatag	M155rei.rev aaggcggccgctcgaaaatgtctgtacgagtatg

Tabelle 12: Die Δ 6-Insertionsmutanten

Name	Inserierte ORF's
GFP Δ 6m147	M147
GFP Δ 6m148	M148
GFP Δ 6m149	M149
GFP Δ 6AL1	M147, m148 und m149
MCMV-GFP Δ 6m155MIEP	M155 und MIEP-Promotor
MCMV-GFP Δ 6cDNA-MIEP	modB7-2cDNA und MIEP-Promotor

Tabelle 13: Primer für die Herstellung von epitopmarkierten Virusmutanten

Name	Sequenz 5' nach 3'	Herstellung von Virus
------	--------------------	-----------------------

M147HA.for	TAACAGATATGTAGCGGAACCCTG CGGTCCCGACGATGAATACCCATA CGACGTCCCAGACTACGCTTAAAG GACGACGACAAGTAA	MCMV-GFPmodB7-2HA (MCMV-GFPm147HA), MCMV-modB7-2HA (MCMV-m147HA)
M147HA.rev	AGAGACTAAAGACAACATCACACA AGTTTATTGAGATGGTGACACAGG AACACTTAACGGCTGA	MCMV-GFPmodB7-2HA (MCMV-GFPm147HA), MCMV-modB7-2HA (MCMV-m147HA)

Tabelle 14: Primer für die Shuttle-Mutagenese von modB7-2

Name	Sequenz 5' nach 3'	Verwendung
Pr-AL17	TTTTCGGTACCTaGTCCTaCTaT CaGTCCGCGTCTCTCCGATCCT	Klonierung pST76-KSR-AL1
M147/m148RT. rev	tgaataagatgcaacgaagac	Klonierung pST76-KSR-AL1
Pr-AL 22 (invivotet.for)	cgcggtacgggcgccagtcgtaccgctcg gtccccctctgatgccgcCTTCTTCTAG AGGTACCGCA	MCMV-GFPinivotet
Pr-AL 23 (invivotet.rev)	agacagatcagcgcacgctatgtctcggca gaccgcctggcgagtcgaGTGGAATTC CCGGGAGAGCT	MCMV-GFPinivotet

Tabelle 15: Infektionsrate und Zustand der RAW264.7-Zellen

Infektionsdosis (PFU/Zelle)	% infizierte Zellen	% tote Zellen
0	0	7,99
0,1	0,55	16,31
1	11,6	28,97
2	28,86	43,94
5	69,42	42,54
10	77,89	33,7
20	70,63	24,54

7. 2 Abbildungsverzeichnis:

Abb. 1: Vorhergesagte ORFs des HCMV- (unten) und MCMV-Genoms (oben) und Darstellung der homologen Bereiche	8
Abb. 2: Proteine auf der Oberfläche von reifen dendritischen Zellen und T-Zellen	12
Abb. 3: Herstellung von MCMV-Mutanten mit der ET-Mutagenesemethode	32
Abb. 4: Struktur des Plasmids Ori6kcDNA-MIEPpA	36
Abb. 5: BAC-Mutagenese mit der Zweischnitt-Shuttle-Mutagenesemethode	37
Abb. 6: Definition der Zellpopulation und Einstellung des Gates für Vorwärts- und Seitwärtsstreuung	39
Abb. 7: Identifizierung von toten Zellen	39
Abb. 8: Identifizierung von unspezifischen Färbungen	40
Abb. 9: Darstellung der Ergebnisse	40
Abb. 10: Unterscheidung von GFP-positiven und GFP-negativen Zellen	41
Abb. 11: Konzept: Einfluss von wtMCMV und MCMV-Mutanten auf reife dendritische Zellen	42
Abb. 12: Durchflusszytometrische (FACS) Analyse von wtMCMV-infizierten RAW-Zellen	44
Abb. 13: Zelloberflächenfärbung von wt-MCMV-GFP-infizierten RAW-Zellen	45
Abb. 14: Durchflusszytometrische Analyse der Expression von Zelloberflächenmolekülen auf nicht-infizierten und wtMCMV-GFP-infizierten RAW264.7 und DC2.4	46
Abb. 15: Durchflusszytometrische Analyse von Zellen, die mit verschiedenen Virusdosen infiziert wurden	47
Abb. 16: Lokalisation der Deletionen im Genom der verschiedenen Mutanten	48
Abb. 17: Durchflusszytometrische Analyse von mit verschiedenen Deletionsmutanten infizierten RAW-Zellen	49
Abb. 18: Unterteilung der Region der $\Delta 6$ -Deletion in drei kleinere Deletionen	50
Abb. 19: Durchflusszytometrische Analyse von Zelloberflächenmolekülen nach Infektion von RAW-Zellen mit wtMCMV-GFP bzw. MCMV-Mutanten	51
Abb. 20: Anordnung der ORFs der Grenzregion der Deletionen $\Delta 6S1$ und $\Delta 6S2$ und durchflusszytometrische Analyse von mit MCMV-Mutanten infizierten Zellen	53
Abb. 21: Durchflusszytometrische Analyse von RAW-Zellen, die mit $\Delta 6$ -Insertionsmutanten infiziert wurden	54

Abb. 22: Lage der Insertionen in den ORFs m147-m150 und durchflusszytometrische Analyse der Insertionsmutanten.....	56
Abb. 23: Northern Blot Analyse der Gene m147/m148 und m149	57
Abb. 24: Analyse der Region m147/m148 und m149 auf mögliches RNA spleißing	58
Abb. 25: Lage des Gens modB7-2 und Aminosäuresequenz des kodierten Proteins	59
Abb. 26: Genomstruktur der modB7-2 Δ 6-Insertionsmutante und FACS-Analyse der mit dieser Mutante infizierten Zellen	60
Abb. 27: Planung und durchflusszytometrische Analyse von mit der MCMV-GFP Δ modB7-2-Mutante infizierten Zellen.....	61
Abb. 28: Vorhergesagte Topologie des ModB7-2 Proteins	63
Abb. 29: Nachweis des ModB7-2HA-Proteins im Western Blot.....	63
Abb. 30: Versuchsablauf zur Bestimmung der Proteinklasse von ModB7-2	64
Abb. 31: Untersuchung der Expressionskinetik und Proteinklasse von ModB7-2	65
Abb. 32: Aminosäuresequenz und Position der für die Immunisierung von Kaninchen verwendeten Peptide	66
Abb. 33: Durchflusszytometrische Analyse von wtMCMV-GFP und MCMV-GFP m147HA-infizierten RAW264.7-Zellen	67
Abb. 34: Durchflusszytometrische Analyse von MCMV-GFP Δ modB7-2 infizierten RAW-Zellen.....	68
Abb. 35: Expression von CD40 auf RAW264.7-Zellen und ihre Beeinflussung durch wtMCMV-GFP und MCMV-GFP Δ 6.....	69
Abb. 36: Anordnung der ORFs m154 bis m157 und durchflusszytometrische Analyse der Zellen nach Infektion mit den verschiedenen Deletionsmutanten	71
Abb. 37: Insertion des Gens m155 in das Genom der Deletionsmutante MCMV-GFP Δ 6 und durchflusszytometrische Analyse der resultierenden Mutante.....	72
Abb. 38: Northern Blot der Region des ORFs m155	73
Abb. 39: Durchflusszytometrische Analyse von MCMV-GFP-infizierten RAW-Zellen	74
Abb. 40: Expression von Zelloberflächenmolekülen auf von für unterschiedliche Dauern infizierte RAW-Zellen	75
Abb. 41: Einfluss der Blockierung der Proteinneusynthese auf einige Zelloberflächenproteine	77
Abb 42: Einfluss der MCMV-Infektion auf den ER/Cis-Golgi Apparat	78
Abb. 43: Intrazelluläre Lokalisierung von CD40, CD86 und MHC II in wtMCMV-GFP-infizierten und nicht-infizierten DC2.4-Zellen	80

Abb. 44: Lokalisierung des Transferrin-Rezeptors und CD40 bzw. CD86 in
dendritischen Zellen 81

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung von SDS-PAGE-Trenngelen

Tabelle 2: Vektoren

Tabelle 3: Antikörper und sekundäre Farbstoffe

Tabelle 4: Primer für die Durchführung der RT-PCR

Tabelle 5: Primer für die Durchführung der RACE-Analysen

Tabelle 6: Primer zur Herstellung der Northern-Blot Sonden

Tabelle 7: Primer für die Herstellung von Virusmutanten mit großen Deletionen

Tabelle 8: Aufbau der MCMV-Mutanten mit großen Deletionen

Tabelle 9: Primer für die Herstellung von Virusmutanten mit Insertionen und Einzelgendeletionen

Tabelle 10: Positionen der in den $\Delta 6$ -Submutanten, den Einzelgendeletionsmutanten und den Insertionsmutanten deletierten Bereiche

Tabelle 11: Primer für die Herstellung der Ori6K-Plasmide

Tabelle 12: Die $\Delta 6$ -Insertionsmutanten

Tabelle 13: Primer für die Herstellung von epitopmarkierten Virusmutanten

Tabelle 14: Primer für die Shuttle-Mutagenese von modB7-2

Tabelle 15: Infektionsrate und Zustand der RAW264.7-Zellen

7.4 Abkürzungsverzeichnis

AIDS	erworbenes Immunschwächesyndrom (<i>acquired immune deficiency syndrome</i>)
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumperoxidsulfat
AS	Aminosäure (n)
ATP	Adenosintriphosphat
BAC <i>chromosome</i>)	Artifizielles Bakterienchromosom (<i>Bacterial artificial chromosome</i>)
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
c-MIR	<i>cellular modulator of immune recognition</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i>
DTT	Dithiotreitol
et al.	<i>et alii</i>
ET-Mutagenese	abgeleitet von <i>Rec E</i> und <i>Rec T</i> - Mutagenese
FACS	Durchflusszytometrie (<i>fluorescence activated cell sorting</i>)
FCS	Foetales Kälberserum (<i>foetal calf serum</i>)
GHRH-R	<i>Growth hormone-releasing hormone receptor</i>
HA	Haemagglutinin
HCMV	Humanes Cytomegalievirus
IE	<i>immediate early</i>
IF	Immunfluoreszenz
Kbp	Kilobasenpaare
kDA	Kilodalton
KSHV/HHV8 Herpesvirus 8	Kaposi's Sarkom-assoziiertes Herpesvirus/ Humanes
LB	Luria-Bertani
MEF <i>fibroblasts</i>)	Fibroblasten von Mäuseembryonen (<i>mouse embryonic fibroblasts</i>)
MIEP	<i>major immediate early</i> Promotor
MIR	<i>modulator of immune recognition</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i>

NCS	Neugeborenen Kälberserum (<i>newborn calf serum</i>)
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PBS-T	Phosphat gepufferte Salzlösung mit Tween 100
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PHD	<i>plant homeodomain</i>
p.i.	nach Infektion (<i>post infection</i>)
RACE ends)	Amplifizierung von cDNA-Enden (<i>rapid amplification of cDNA</i>
RING	<i>really interesting new gene</i>
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	<i>rounds per minute</i>
SAV	Streptavidin
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylaminomethan
Ü. N.	über Nacht
WB	Western Blot
Wt	Wildtyp

7.3 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass diese Arbeit von mir bisher weder der Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg noch einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung zum Zwecke der Promotion eingereicht wurde.

Ferner erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die darin angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Halle, den
15.10.2005

Andrea Loewendorf

7.6 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Andrea Ivonne Loewendorf

Geburtsdatum: 9.8.1976

Geburtsort: Berlin, Deutschland

Staatsangehörigkeit: deutsch

Anschrift:

Händelstrasse 33

06114 Halle (Saale)

Ausbildung

- 1984-1990 Erpelgrundschule Berlin.
Grundschulabschluß mit Gymnasialempfehlung.
- 1990-1996 Internat Schulfarm Insel Scharfenberg, Gymnasium, Berlin.
Abitur mit der Durchschnittsnote 1,9 nach dem Besuch der Gymnasialen Oberstufe (Klasse 12 und 13)
- 1993/1994 Pottstown High School, Pottstown, Pennsylvania (USA).
Abschluß der Klasse 11 mit „High Honors“
- 1996-2001 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Sachsen-Anhalt, Deutschland
Studium der Biologie (Diplom) mit den Hauptfächern Genetik und Pflanzenphysiologie sowie den Nebenfächern Immunologie und Biochemie.
Thema der Diplomarbeit: „Identifizierung und Funktionelle Analyse des mRNA-Transsplicing in *Drosophila melanogaster*“ in der Arbeitsgruppe Entwicklungsgenetik. Betreuer: Dr. Dorn.
- 2001- Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Sachsen-Anhalt, Deutschland
Promotionsstudium in der NBL-3 Nachwuchsgruppe „Virus-Zell-Interaktion“, Dr. Messerle.
2003 Erhalt des Anton-Wilhelm-Amo Preises der Martin-Luther-Universität für herausragende wissenschaftliche Leistungen von Studierenden und Graduierten der Universität.

7.7 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer, Dr. Martin Messerle, der mir bei der technischen und theoretischen Einarbeitung in das Gebiet der Virologie geholfen und auch darüber hinaus durch seine gezielte Kritik und Anregungen einen großen Beitrag zu meinem Bestreben geleistet hat, ein Wissenschaftler zu werden.

Herrn Prof. Wahle danke ich für die Betreuung der Arbeit und die Übernahme des Gutachtens.

Weiterhin gilt mein Dank den Mitarbeitern der AG Virus-Zell-Interaktion für das gute Arbeitsklima. Besonders erwähnt sei hierbei Dr. Eva Borst, die mir bei technischen Schwierigkeiten sehr geholfen hat, unseren beiden engagierten, kompetenten und geduldigen technischen Hilfskräften Sabine Herrmann und Lars Steinbrück sowie meiner Kollegin Dr. Penelope Kay-Jackson für eine anregende, produktive und amüsante Teamarbeit.

Herrn Dr. Andreas Simm danke ich für die Bereitstellung des FACS-Geräts und die weitere nette Unterstützung.

Ich danke meiner Mutter, meinem Vater und Inge für die Begleitung während dieser Zeit und das grosse Verständnis, was sie mir entgegenbringen.

Meinen Freunden Christine Schmidt und Stephan Härtel möchte ich für die Überarbeitung dieses Manuskripts danken. Herrn Härtel danke ich weiterhin für den ständigen, freundschaftlichen Beistand bei allen Höhen und Tiefen, die während der Promotionsphase entstehen.

Meinen Freunden und Mitspielern des Ultimate Frisbee Teams „Hallunken“ danke ich für die vielen netten gemeinsamen Stunden und das entspannte Umfeld, in dem ich den idealen Ausgleich zu dieser wissenschaftlichen Tätigkeit finden konnte.

Publikationsverzeichnis

Andrea Loewendorf

Veröffentlichungen in Wissenschaftlichen Fachzeitschriften:

1. Hasan M, Krmpotic A, Ruzsics Z, Bubic I, Lenac T, Halenius A, Loewendorf A, Messerle M, Hengel H, Jonjic S, and Koszinowski U H. (2005). *Selective down-regulation of the NKG2D ligand H60 by mouse cytomegalovirus m155 glycoprotein. J. Virol.*, **79**:2920-30.
2. Krmpotic A, Hasan M, **Loewendorf A**, Saulig T, Halenius A, Lenac T, Polic B, Bubic I, Kriegeskorte A, Messerle M, Hengel H, Busch D, Koszinowski U H, and Jonjic S. (2005). *NK cell activation through the NKG2D ligand MULT-1 is selectively prevented by the glycoprotein encoded by mouse cytomegalovirus gene m145. J. Ex. Med.*, **17**;201(2):211-20.
3. **Loewendorf A**, Krüger C, Borst E, Wagner M, Just U, Messerle M. (2004). *Identification of a mouse cytomegalovirus gene selectively targeting CD86 expression on antigen presenting cells. J. Virol.*, **78**:13062-71.
4. Dorn R, Reuter G, **Loewendorf A**. (2001). *Transgene analysis proves mRNA trans-splicing at the complex mod(mdg4) locus in Drosophila. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:9724-9729.

Vorträge:

1. **A. Loewendorf**, P. Kay-Jackson and M. Messerle. *Identification of a mouse cytomegalovirus gene targeting CD86 expression on antigen presenting cells.* Gemeinsame Tagung der Deutschen und Niederländischen Gesellschaften für Immunologie, Maastricht, 2004.
2. **A. Loewendorf**, P. Kay-Jackson and M. Messerle. *Immunmodulation by cytomegalovirus: identification and analysis of a mouse cytomegalovirus gene targeting CD86 expression on antigen presenting cells.* Tagung der Studiengruppe "Immunbiologie der viralen Infektionen" der Deutschen Gesellschaft für Virologie, Zeilitzheim 2004.
3. **A. Loewendorf**, C. Krüger and M. Messerle. *Nothing left to chance: Each costimulatory molecule of antigen presenting cells is targeted by a different mouse cytomegalovirus gene.* Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Virologie, Tübingen 2004.
4. **A. Loewendorf**, C. Krüger, M. Wagner, U. Just, and M. Messerle. *Identification of a mouse cytomegalovirus gene targeting CD86 expression on antigen presenting cells.* 28. Internationaler Herpesvirusworkshop, Madison/USA 2003.

Poster:

1. **A. Loewendorf,** C. Krüger and M. Messerle. *A putative type III transmembrane protein of mouse cytomegalovirus specifically downmodulates the costimulatory molecule CD86.*
29. Internationaler Herpesvirusworkshop, Reno/USA 2004
2. **A. Loewendorf,** and M. Messerle. *Immune modulation by cytomegaloviruses: introduction of the immunomodulatory gene modB7-2.*
Walberberg Immunologietagung, Bonn 2004.
3. **A. Loewendorf,** C. Krüger, M. Wagner, U. Just, and M. Messerle. *Identification of a mouse cytomegalovirus gene targeting CD86 expression on antigen presenting cells.*
1. Internationales gemeinsames Symposium der Forschungszentren Immunologie Magdeburg/Halle "Molekulare Regulation der Immunfunktionen", Weimar, 2003.
4. **A. Loewendorf,** C. Krüger, M. Wagner, U. Just, and M. Messerle. *Identification of a mouse cytomegalovirus gene targeting CD86 expression on antigen presenting cells.*
Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Virologie, Berlin 2003.

Preise:

Anton-Wilhelm-Amo-Preis der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg 2004.
Dieser Preis wird für herausragende wissenschaftliche Leistungen von Studierenden oder Graduierten unter 30 Jahre verliehen.