Universität Ulm
Institut für Virologie
Prof. Dr. Thomas Mertens

Charakterisierung von Zytomegalieviren mit mutierten G-Protein-gekoppelten Rezeptorhomologen

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie
der medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

vorgelegt von
Jens-Michael Holl
aus Ulm

Ulm, 2006

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Detlef Michel

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Walter Just

Tag der Promotion: 19.11.2006

Das Lernen ist wie ein Meer ohne Ufer

Konfuzius (551 – 479 v.Chr.)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis VI
1 Einleitung 1
1.1 Herpesviren 1
1.1.1 Struktur und Taxonomie 1
1.2 Das humane Zytomegalievirus (HCMV) 2
1.2.1 Genomstruktur von HCMV 3
1.2.2 Infektion und Vermehrung 4
1.2.3 Regulation der viralen Genexpression während der Replikation 5
1.3 HCMV und Krankheiten 6
1.3.1 Epidemiologie 6
1.3.2 Klinische Manifestation 7
1.3.3 Therapie von HCMV-Erkrankungen 8
1.4 Mechanismen zur Immunevasion bei HCMV 9
1.4.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren 9
1.4.2 Von Viren kodierte G-Protein-gekoppelte Rezeptoren 12
1.4.3 Chemokine und Chemokinrezeptoren von HCMV 13
1.4.4 US28 und VEGF-Expression 18
1.4.5 Zielsetzung 19
2 Material 20
2.1 Geräte 20
2.2 Chemikalien 22
2.3 Radiochemikalien 23
2.4 Enzyme 23
2.5 Antikörper 24
2.6 Antibiotika 24
2.7 Sonstige Verbrauchsmaterialien 25
2.8 Bakterienstämme 26
2.9 Plasmide 26
2.10 Oligonukleotide 27
2.11 Zelllinien 28
2.12 Viren 28
2.13 Medien und Standardlösungen 29
2.13.1 Medien 29
2.13.2 Lösungen 30
3 Methoden 35
3.1 Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren 35
3.1.1 BAC-DNA-Minipräparation aus Bakterien 35
3.1.2 BAC-DNA-Maxipräparation aus Bakterien 35
3.1.3 DNA-Isolierung aus humanen Zellen 35
3.1.4 Gesamt-RNA-Isolierung aus humanen Zellen 36
3.1.5 RT-Reaktion 37
3.1.6 PCR (*polymerase chain reaction*) nach Mullis (1986) 38
3.1.7 Sequenzierung mittels Didesoxymethode nach Sanger (1977) 39
3.1.8 Phenol-Chloroform-Extraktion 40
3.1.9 Alkoholpräzipitation 41
3.1.10 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren 41
3.2 Zellkultur 42
3.2.1 Kultivierung von humanen Zellen 42
3.2.2 Langzeitlagerung von humanen Zellen 42
3.2.3 Infektion von HFF mit HCMV 42
3.2.4 Herstellung eines Virusstocks aus Kulturmediumüberstand 43
3.2.5 Titerbestimmung eines Virusstocks 43
3.3 Transfektion eukaryotischer Zellen 44
3.3.1 Calcium-Phosphat-Methode 44
3.3.2 Superfect™-Methode (Qiagen) 44

3.4 Immunhistochemische Färbung von Zellen 45
3.4.1 Proteolytischer Pepsinverdau zur Abspaltung des F_c-Teils von Antikörpern 45
3.4.2 Fixierung und Immunfärbung von Zellen 45
3.5 Proteinchemische Methoden 46
3.5.1 Western Blot 46
Semidry Blot 47
3.5.2 Coomassie-Färbung 47
3.5.3 Immunochemischer Nachweis mittels ECL 47
3.5.4 Proteolytischer Abbau von Proteinen im PAGE 48
3.6 Bakterien 49
3.6.1 Herstellung von Glycerinkulturen 49
3.6.2 Herstellung kompetenter *E.coli* nach der Calciumchloridmethode 49
3.6.3 Transformation 49
3.6.4 Expression von MBP-Fusionsproteinen in *E.coli* 50
3.6.5 Aufreinigung von MBP-Fusionsproteinen 50
3.6.6 Abspaltung des US28e-Proteins vom MBP-Fusionspartner 51
3.7 RANTES-Verdrängungsversuch 51
3.8 Bestimmung von Inositolphosphaten in Zellkulturüberständen 52
3.8.1 Herstellung der DOWEX-Säulen 52
3.8.2 Aufreinigung von Inositolphosphaten in Zellkulturüberständen 52
3.9 Aufreinigung von Proteinen mit der Tandem-Affinitätsreinigung (TAP) 53
3.10 Herstellung einer stabilen Zelllinie 55
3.10.1 Generierung des retroviralen Transfervektors 57
3.10.2 Generierung einer stabilen Zelllinie 57
4 Ergebnisse 59
4.1 Charakterisierung viraler GPCRs in infizierten Zellen 59
4.1.1 Allgemeine Bestimmung der 3'Enden viraler Transkripte für GPCRs und Sequenzvergleich zwischen dem Laborstamm AD169 und den niedrig passagierten Virusstämmen TB40E und Titan 59
4.1.2 Northern Blot-Analyse verschiedener US28-Mutanten 60
4.1.3 Chemokinbindungsversuche mit verschiedenen US28-Virusmutanten 62
4.1.4 Signaltransduktion bei verschiedenen US28-Virusmutanten 66
4.2 Erzeugung eines polyklonalen Antiserums gegen US28 71
4.2.1 Herstellung eines artifiziellen Genes 72
4.2.2 Klonierung von US28e in einen prokaryotischen Expressionsvektor 73
4.2.3 Expression und Reinigung des MBP::US28e Fusionsproteins in *E.coli* 74
4.2.4 Charakterisierung US28-spezifischer Antikörper 76
4.2.5 Nachweis von US28 in transfizierten HEK293-Zellen mittels Western Blot 77
4.3 Suche nach Interaktionspartnern von US28 mittels Tandem-Affinitätsaufreinigung 83
4.3.1 Erzeugung einer stabilen Zelllinie mittels retroviralem Gentransfer 85
4.4 Virus – Wirt – Interaktionen 87
4.4.1 Einfluss von US28 auf die Expression von VEGF 87
5 Diskussion 91
5.1 Charakterisierung viraler GPCRs in infizierten Zellen 92
5.1.1 Bestimmung der 3'-Enden viraler GPCR mRNAs in zwei verschiedenen Virusstämmen 92
5.1.2 Chemokinbindungsversuche mit verschiedenen US28-Virusmutanten 95
5.1.3 Signaltransduktion bei verschiedenen US28-Virusmutanten 97
5.2 Erzeugung eines US28-spezifischen polyklonalen Antiserums 98
5.3 Suche nach Interaktionspartnern von US28 mittels Tandemaffinitätsaufreinigung 101
5.4 Virus – Wirt – Interaktionen 102
5.5 Ausblick 103
6 Zusammenfassung 105
7 Literaturverzeichnis 106

Abkürzungsverzeichnis

7TM	sieben Transmembrandomänen
°C	Grad Celsius
α	Anti
AEC	3-Amino-9-ethylcarbazol
AIDS	*acquired immunodeficiency syndrome*
ApR	Ampicillinresistenz
AS	Aminosäure(n)
BAC	*bacterial artificial chromosome*
BSA	bovines Serumalbumin
CBP	*calmodulin binding peptide*
cDNA	copy DNA
ChCMV	*chimpanzee cytomegalovirus*
CIAP	*calf intestine alkaline phosphatase*
CM / CaM	Calmodulin
CMV	*cytomegalovirus*
CRE	*cyclic-AMP response element*
DAG	Diacylglycerol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	*desoxyribonucleic acid*
DTT	Dithiothreitol
E	*early*
E.coli	*Escherichia coli*
EBV	Epstein Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	*fetal calf serum*
g	Gramm
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
h	*hour* (Stunde(n))
HHV	Humanes Herpesvirus
HIF	*hypoxia inducible factors*
HRP	*horse radish peroxidase*, Meerrettichperoxidase
HUVEC	*human umbilical vein endothelial cells*
IE	*immediate early*
IFN	Interferon
I-TAC	*IFN-inducible T cell chemoattractant*
IP_3	Inositoltrisphosphat
IP10	IFN-γ Protein 10
IRES	*internal ribosomal entry site*
KnR	Kanamycinresistenz
L	*late*
L	Liter
Lj	Lebensjahr
M	Mol/l
m.o.i.	*multiplicity of infection*

MALDI-TOF	*matrix-assisted laser desorption / ionisation – time of flight*
MBP	Maltosebindeprotein
MCMV	*murine cytomegalovirus*
MEM	*minimal essential medium*
MHC	*major histocompatibility complex*
MIEP	*major immediate early promotor*
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimol
Mo-MuLV	*Moloney murine leukemia virus*
NIEP	*non infectious enveloped particle*
ORF	*open reading frame*
PCR	*polymerase chain reaction*
PDGF	*platelet derived growth factor*
Pfu	*plaque forming unit*
PFA	Paraformaldehyd
pH	pondus hydrogenii
p.i.	*post infection*
PIP_2	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PLC	Phospholipase C
pp	Phosphoprotein
PPi	Phyrophosphat
PSI	*pound per square inch*; Druckeinheit; (1 psi = 0,0689 bar)
RANTES	*regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted*; CCL-5
RCMV	*rat cytomegalovirus*
RhCMV	*rhesus monkey cytomegalovirus*
rpm	*rounds per minute*
RT	Raumtemperatur
RT	reverse Transkriptase, reverse Transkription
SAP	*shrimp alkaline phosphatase*
SCID	*severe combined immunodeficiency*
SDS	*sodium dodecyle sulphate*
SMC	*smooth muscle cell*
TAP	*tandem affinity purification*
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TEV	*tobacco etch virus protease*
Tris	Tris(hydroxymethyl)ammonium
U_L	*unique long*
ÜN	über Nacht
U_S	*unique short*
V	Volt
VEGF	*vascular endothelial growth factor*
v/v	Volumen per Volumen
VSV	*vesicular stomatitis virus*
w/v	*weight per volume* (Gewicht per Volumen)
YFP	*yellow fluorescent protein*
µl	Mikroliter

1 Einleitung

1.1 Herpesviren

1.1.1 Struktur und Taxonomie

Herpesviren besitzen ein doppelsträngiges, lineares DNA-Genom, das mit Proteinen assoziiert ist. Dieses DNA-Core wird vom ikosaedrischen Kapsid umgeben, das aus Proteinuntereinheiten, den Kapsomeren besteht, und einen Durchmesser von ca. 100-110 nm hat. Neben dem DNA-Genom werden in das Kapsid zelluläre und virale mRNAs verpackt[129]. Das Kapsid wird von einer als Tegument bezeichneten Proteinmatrix umgeben, die sich zum Teil schon im Nukleus und später im Zytoplasma vollständig an das Kapsid anlagert. 20 bis 25 Tegumentproteine wurden bisher in Viruspräparation nachgewiesen. Tegumentproteine, die ungefähr 50% der Masse des Viruspartikels ausmachen[131], sind meist phosphoryliert. Die zahlenmäßig häufigsten Tegumentproteine bei HCMV sind UL83 (pp65), UL32 (pp150), UL82 (pp71), UL48 und UL25[131]. Aber auch UL99 (pp28), UL24 und UL35[117] werden zu ihnen gerechnet. Die Funktionen der einzelnen Tegumentproteine sind meist unbekannt. Virusmutanten, bei denen Gene für Tegumentproteine deletiert wurden, sind dennoch *in vitro* replikationsfähig. UL48, das *large tegument protein* (LTP) ist als einzige Ausnahme für die Virusvermehrung essentiell[37]. Den Abschluss nach außen bildet eine Lipiddoppelmembran, die sich von zellulären Membranen ableitet. In die Membran sind virale Glykoproteine eingelagert. Das Viruspartikel hat einen Durchmesser von etwa 160 nm.

Die Familie der Herpesviren umfasst eine Gruppe von ca. 100 human- und tierpathogenen Vertretern[108]. Derzeit sind acht Herpesviren bekannt, deren natürlicher Wirt der Mensch ist. Aufgrund biologischer Eigenheiten wie Zelltropismus, Replikationsdauer und Ort der Latenz werden sie in drei Subfamilien, α-, β- und γ-Herpesviren, unterteilt. Die α-Herpesviren sind durch einen kurzen Replikationszyklus, ein großes Wirtsspektrum und eine schnelle Ausbreitung in Zellkultur gekennzeichnet. Infizierte Zellen werden mit großer Effizienz zerstört. Latente Infektionen können in

sensorischen Ganglien beobachtet werden. Zu ihnen gehören die Herpes-Simplex-Viren (HSV-1 und HSV-2) sowie das Varizella-Zoster-Virus (VZV).

Im Gegensatz zu den α-Herpesviren, sind die β-Herpesviren in ihrem Wirtsspektrum eingeschränkt und haben lange Replikationszyklen. Latenz wurde in sekretorischen Drüsen, lymphoretikulären Zellen und Niere beobachtet. Infizierte Zellen sind aufgrund zytoplasmatischer Einschlüsse häufig vergrößert (Zytomegalie). Neben dem humanen Zytomegalievirus (HCMV), das seinen Namen dieser morphologischen Veränderung verdankt, gehören die humanen Herpesviren 6 und 7 (HHV-6A, HHV-6B, HHV-7) ebenfalls zu dieser Unterfamilie. Zu den nicht humanpathogenen Vertretern der β-Herpesviren zählen auch die Zytomegalieviren der Maus (MCMV)[99], der Ratte (RCMV)[134], des Meerschweinchens (GPCMV)[68] [78] [77] und des Rhesusaffen (RhCMV)[127]. Zusammen mit ihrem jeweiligen Wirt dienen diese Viren als Tiermodelle für HCMV.

Das humane Herpesvirus 8 (HHV-8 oder KSHV) und das Epstein-Barr-Virus (EBV) gehören zu den γ-Herpesviren, die ebenfalls ein eingeschränktes Wirtsspektrum aufweisen. Diese Viren infizieren spezifisch B- oder T-Lymphozyten. Latenz wurde bei γ-Herpesviren in lymphoiden Geweben beobachtet[107].

1.2 Das humane Zytomegalievirus (HCMV)

Mit seinen 235 kb gehört das HCMV-Genom zu den größten bei Säugern vorkommenden Virengenomen. Es kodiert für über 200 verschiedene Proteine[29].

Neben den infektiösen Viren produzieren infizierte Zellen sogenannte *dense bodies*, denen das Kapsid und die virale DNA fehlen (Abb. 1). Daneben entstehen auch Partikel, die NIEP genannt werden[57]. Sie besitzen Kapside, die aber keine DNA enthalten.

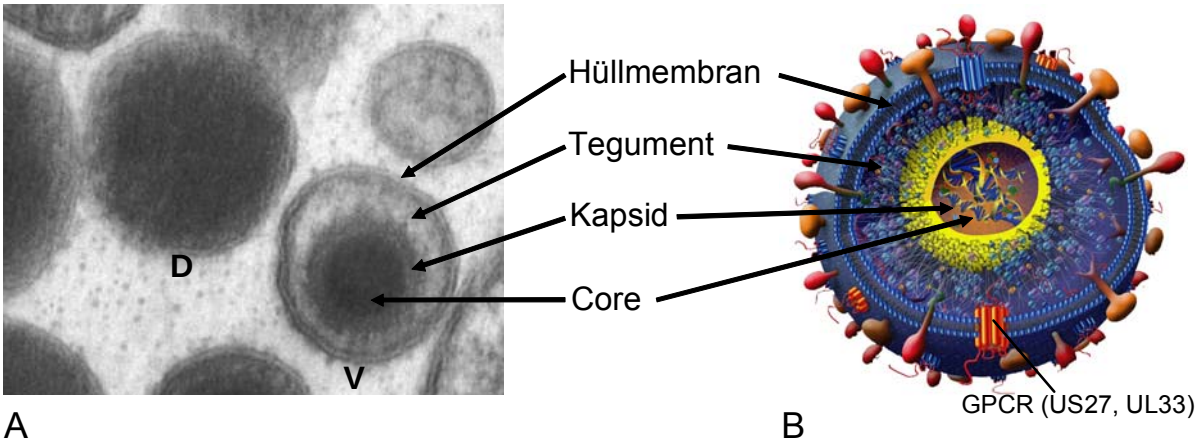


Abbildung 1: HCMV-Partikel

(A) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines infektiösen Partikels (V) im Vergleich mit einem *dense body* (D) (Vergrößerung: 250000 x; freundlicherweise von Christopher Buser zur Verfügung gestellt). (B) Schematische Darstellung eines HCMV-Partikels. In der Virushülle sind zahlreiche zelluläre und virale Proteine eingelagert, darunter wahrscheinlich auch virale GPCRs (aus Cytomegaloviruses: Pathogenesis, Molecular Biology and Infection Control. M.J. Reddehase[101]).

1.2.1 Genomstruktur von HCMV

Das HCMV-Genom besteht aus Einzelkopiesequenzen (*unique*), die den kodierenden Bereich darstellen, und sich wiederholenden Sequenzen von mehr als 100 bp (*terminal repeats*, T_R; *inverted repeats*, I_R). Die *unique*-Sequenzen werden durch die I_R-Abschnitte in zwei Bereiche unterteilt, einen großen, der als *unique long* (UL) und einen kleinen, der als *unique short* (US) bezeichnet wird. Die in diesen Bereichen enthaltenen Gene wurden in 5' – 3'-Richtung durchnummeriert (z.B. UL1, UL2... bzw US1, US2…). Beide Enden des Genoms werden von *terminal repeats* begrenzt (siehe Abb. 2). Durch die Anordnung der beiden Genomabschnitte und der repetitiven Sequenzen zueinander können durch Drehung vier verschiedene Genomisomere entstehen[108].

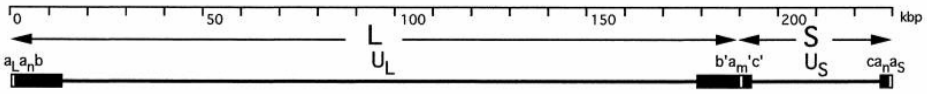


Abbildung 2: HCMV-Genomstruktur des Laborstamms AD169. Oben ist eine Größenskala in kbp dargestellt. Die UL- und US-Bereiche des Genoms sind mit Pfeilen symbolisiert. Einzelkopiesequenzen werden von *inverted repeats* (a-, b-, c-Bereiche) flankiert. a_L: L-terminale A-Sequenzwiederholung; a_n,a_m: zusätzliche, unterschiedlich lange a-Sequenzen; b': *inverted repeat* der b-Sequenz; c' *inverted repeat* der c-Sequenz; a_S: S-terminale A-Sequenzwiederholung ; aus Fields Virology 4. Edition, 2001.

Es ist noch zu erwähnen, dass sich die oben beschriebene Genomstruktur auf die Verhältnisse beim Laborstamm AD169 bezieht. Verglichen mit anderen Stämmen (Toledo) oder klinischen Isolaten, bei denen die internen, repetitiven Elemente fehlen können, zeigt der Stamm AD169 in seinem Genom eine größere Deletion (UL133 - UL154). Dadurch fehlen ihm bis zu 22 Gene[27].

1.2.2 Infektion und Vermehrung

Nach Adsorption des Virus mittels viraler Glykoproteine (gB) an den EGF-Rezeptor[142] und Korezeptoren[141] auf der Zelloberfläche und anschließender Fusion der Virushülle mit der Zellmembran wird das Kapsid ins Zytoplasma entlassen und zum Zellkern transportiert, wo das Genom freigesetzt und zirkularisiert wird[109]. Hier erfolgt die Replikation der viralen DNA unter Zuhilfenahme zellulärer Enzyme und, nach Synthese am ER und Transport der Kapsidproteine, schließlich der Zusammenbau des Nukleokapsids. Man unterscheidet A-, B- und C-Kapside. A-Kapside enthalten aufgrund eines Verpackungsdefekts keine DNA und erscheinen im Elektronenmikroskop (EM) heller (weniger elektronendicht). B-Kapside bilden die Vorstufe der reifen C-Kapside und befinden sich hauptsächlich im Zellkern[22]. Sie enthalten ebenfalls keine DNA, aber das *scaffolding*-Protein (UL80, 3 verschiedene Spleißformen), das den B-Kapsiden im EM einen dunklen Ring verleiht. Nach der Beladung mit dem viralen Genom spricht man vom reifen Nucleokapsid, dem C-Kapsid. Es erscheint im EM dunkler als A- und B-Kapside (siehe Abb.1)[110]. Durch

Knospung erhalten die C-Kapside an der inneren Kernmembran ihre primäre Hülle, die sie durch Budding an der äußeren Kernmembran wieder verlieren. Die zweite Umhüllung erfolgt an zytoplasmatischen Membranen, wahrscheinlich an Vesikeln des Golgiapparates[52]. Die Freisetzung der Viren erfolgt durch Exozytose. Ein Replikationszyklus dauert ungefähr 72 h[109].

1.2.3 Regulation der viralen Genexpression während der Replikation

Die Gene der Herpesviren werden in zeitlich koordinierten Phasen exprimiert[53]. Die lytische Infektion kann aufgrund der Expressionsmuster einzelner Gene in drei aufeinander folgende Phasen unterteilt werden. Man spricht deshalb von α-, β- und γ-Genen. Die α-Gene sind die ersten viralen Gene, die nach Eindringen in die Zelle exprimiert werden. Ihre Transkription und Expression sind unabhängig von einer *de novo* Synthese viraler Proteine und erfolgen durch zelluläre Proteine wie die RNA-Polymerase II. Die neu entstandenen α-Proteine aktivieren die Expression der β-Gene auf transkriptioneller Ebene. β-Proteine haben mehrere Funktionen: Sie aktivieren die Transkription der γ-mRNAs und sind an der Replikation des viralen Genoms beteiligt (z.B. ppUL54, ppUL44, ppUL97). Die meisten γ-Gene kodieren für Strukturproteine. Sie können nach dem Zeitpunkt ihrer Expression weiter unterteilt werden in γ1 (*leaky late*)- und γ2 (*true late*)-Gene (z.B. pp65 (γ1), pp28 (γ2)). Die DNA-Replikation erfolgt nach dem *rolling-circle*-Mechanismus. Dabei entstehen Konkatemere, die an den cleavage sites pac-1 und pac-2 geschnitten und dann ins Kapsid verpackt werden (Abb. 2).

Aus historischen Gründen werden die α-, β- und γ-Gene bei HCMV als IE- (immediate early), E- (early) und L- (late) Gene bezeichnet. Der gesamte Replikationszyklus von HCMV läuft mit 48 – 72h relativ langsam ab.

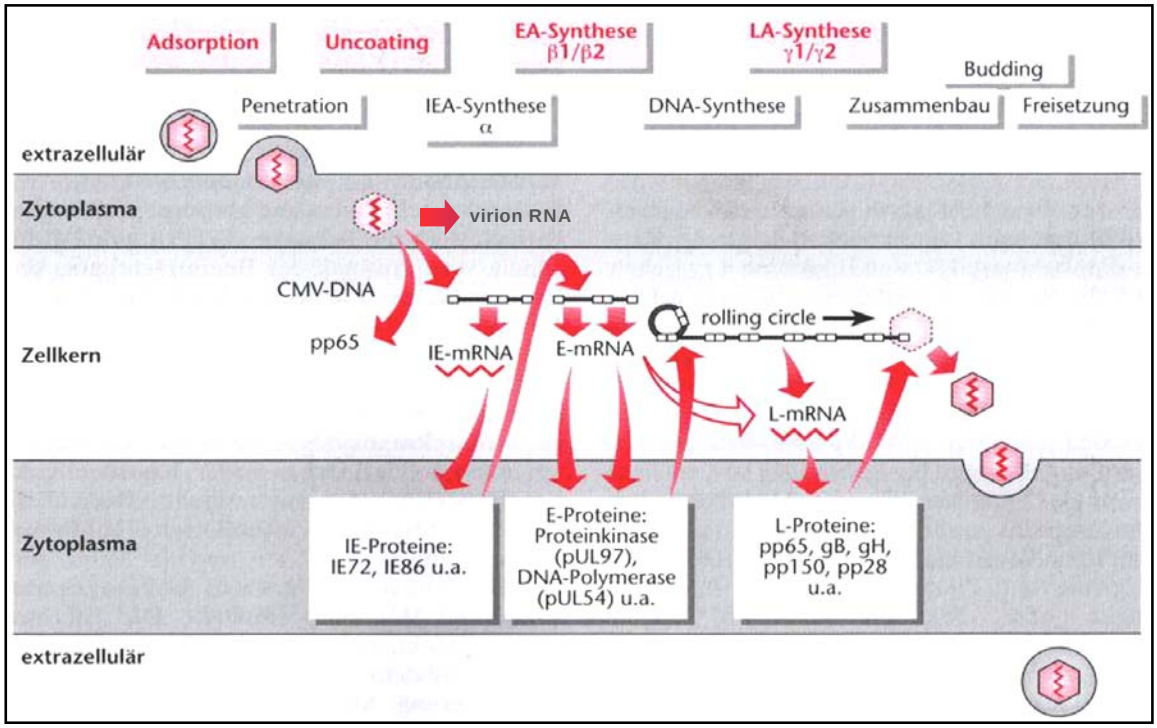


Abbildung 3: Schema des Replikationszyklus von HCMV

Hier ist der zeitlich gestaffelte Ablauf der HCMV-Vermehrung von links nach rechts dargestellt bzw der Weg des Virus duch die Zelle von oben nach unten. (nach Hampl und Mertens 2001)

1.3 HCMV und Krankheiten

1.3.1 Epidemiologie

HCMV ist weltweit verbreitet und wird meist von Mensch zu Mensch durch engen Kontakt übertragen. In Industrieländern sind 50 - 80 % der erwachsenen Bevölkerung mit HCMV infiziert, in Entwicklungsländern liegt diese Rate bei 80 – 100 %[91 116 93]. Die Transmission erfolgt durch Körperflüssigkeiten (Speichel, Urin, Zervix- und Vaginalsekrete, Samen, Blut, Stuhl, Tränenflüssigkeit und Muttermilch).

Wege für die horizontale Übertragung von HCMV sind zum einen enger Kontakt zwischen und zu infizierten Kindern oder sexuelle Übertragung. Zum anderen gibt es nosokomiale Übertragungen, das heißt, Übertragungen durch kontaminierte Blutprodukte[38] oder Infektionen nach einer Organtransplantation[63 66 124].

Die vertikale Übertragung von der Mutter zum Kind erfolgt durchaus häufig und trägt somit zur Weiterverbreitung des Virus bei[91]. HCMV kann diaplazentar, bei der Geburt oder durch die Muttermilch übertragen werden[91 123].

1.3.2 Klinische Manifestation

Bei immunkompetenten Personen verlaufen HCMV-Primärinfektionen meist asymptomatisch (etwa 90 % der Infektionen). Treten dennoch Symptome auf, so sind diese von einer Mononukleose nicht zu unterscheiden. Der Verlauf äußert sich u. a. in Fieber, Lymphadenopathie und Pharyngitis, die in seltenen Fällen zusammen mit einer Leuko- oder Thrombopenie oder einer Hepatitis auftreten können[91].

In Fällen, in denen das Immunsystem entweder noch nicht ausgereift (Föten, Frühgeburten) bzw. supprimiert ist (AIDS-Patienten, SCID-Kinder, Transplanat-empfänger, Tumorpatienten), sind schwere Erkrankungen durch Primärinfektionen oder Reaktivierungen die Folge.

Kommt es während der Schwangerschaft zur diaplazentaren Übertragung des Virus auf das Kind, so hängt der Schweregrad der Erkrankung davon ab, ob die infizierte Mutter selbst eine Primärinfektion durchmacht oder das Virus bei ihr reaktiviert wurde[91 45 1]. Im letzteren Fall erfolgt bei 0,2 – 2,2 % der Kinder eine kongenitale Übertragung, die jedoch meist asymptomatisch verläuft. Wird der Fötus jedoch während einer Primärinfektion der Mutter infiziert, das passiert in 20 – 40 % der Fälle, kann dies vor allem im ersten Trimester der Schwangerschaft zu schwersten Schäden beim Kind führen[92]: Das Krankheitsbild reicht von leichteren Symptomen wie Hepatosplenomegalie, Thrombozytopenie bis zu Hörschäden und Entwicklungsdefekten aufgrund einer Infektion des zentralen Nervensystems[19]. In 11 % der Fälle führen diese Erkrankungen zum Tode. Weiterhin kann die Infektion während der Geburt (perinatal), durch das Zervixsekret oder nach der Geburt (postnatal) erfolgen. 8 – 60 % der Kinder werden in den ersten sechs Lebensmonaten, entweder während der Geburt oder durch die Muttermilch infiziert [106 122]. Auf letzterem Weg sollen nach neueren Studien 58 – 76 % der Säuglinge über die Milch

ihrer seropositiven Mütter mit HCMV infiziert werden[130]. Bei Jugendlichen und Erwachsenen kommt es neben dem oralen Übertragungsweg auch zur Infektion durch Geschlechtsverkehr[91].

Unter AIDS-Patienten sind nahezu alle Erwachsenen und die Hälfte aller Kinder HCMV-seropositv. Aufgrund der geschwächten Immunabwehr kommt es wahrscheinlich zur Reaktivierung von HCMV. Bei diesen Patienten treten bestimmte Erkrankungen wie Retinitis oder Ösophagitis gehäuft auf[43]. Viele AIDS-Patienten erleiden darüber hinaus eine Enzephalitis[30]. Es wird in diesem Zusammenhang diskutiert, ob eine HIV-Erkrankung durch eine HCMV-Koinfektion begünstigt wird und das häufige Auftreten von HCMV bei AIDS-Patienten nur ein Zeichen für die Immunschwäche darstellt[91]. Es konnte gezeigt werden, dass infolge einer erfolgreichen HAART-Therapie, die zu einer gesenkten HIV-Viruslast führte, auch HCMV-Erkrankungen milder verliefen[35 18 89 91].

Bei Patienten nach Transplantationen kommt es häufig zu einer HCMV-Reaktivierung. Interstitielle Pneumonie, die bei 10 % der KMT-Patienten auftritt[69], und Hepatitis sind die schwerwiegendsten Erkrankungen. Bei Nieren- und Lebertransplanierten kann es auch zur Transplantatabstoßung kommen[91].

1.3.3 Therapie von HCMV-Erkrankungen

Für die antivirale Therapie von HCMV-Erkrankungen werden heute drei Therapeutika eingesetzt: die beiden Nukleosidanaloga Ganciclovir (GCV) [9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanin] und Cidofovir {(S)-1-[3-hydroxy-2-(phosphonylmethoxy)-propyl]cytosin}[65] sowie das Pyrophosphatanalogon Foscarnet (PFA)[31]. Die gute Virusselektivität des GCV wird dadurch erreicht, dass die Substanz eine Vorstufe des eigentlichen Therapeutikums darstellt. Sie ist ein Guanosinanalogon, das von einer viralen Serin-/Threoninkinase (UL97)[81], die bevorzugt gegenüber Guanosin, monophosphoryliert wird[126]. Anschließend folgt die Umwandlung zum Triphosphat durch zelluläre Kinasen. Das GCV-Triphosphat hat eine höhere Affinität zur viralen

DNA-Polymerase (UL54) und wird deshalb hauptsächlich bei der Synthetisierung der viralen DNA eingebaut und führt dadurch zum Abbruch der DNA-Synthese.

Foscarnet wirkt, indem es als Pyrophosphatanalogon die PP_i-Bindestelle der viralen Polymerase bindet und so die DNA-Synthese verhindert[138]. Diese Bindung erfolgt bei niedrigen Konzentrationen, bei denen die Funktion der zellulären DNA-Polymerasen nicht beeinträchtigt wird.

1.4 Mechanismen zur Immunevasion bei HCMV

HCMV besitzt wie andere Herpesviren die Fähigkeit, lebenslang im infizierten Wirt zu persistieren. Die Voraussetzung dafür ist eine sehr gute Anpassung an den Wirt, um dessen Immunsystem zu entgehen[100,135]. So kodieren die Gene US2, US3, US6 und US11, die alle in Zellkultur nicht essentiell sind, für Funktionen, die es dem Virus ermöglichen, die Expression von HLA-I- und HLA-II-Proteinen herunterzuregulieren[85,49,119]. Dadurch wird u.a. die Effizienz zytotoxischer T-Zellen, HCMV-infizierte Zellen zu zerstören, herabgesetzt.

Die Expression von viralen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) könnte einen weiteren Weg darstellen, auf dem das Virus versucht, das Immunsystem zu beeinflussen. Generell kann man sagen, dass durch die Expression viraler Chemokinrezeptoren in der Zellmembran infizierter Zellen das Verhalten dieser Zellen verändert wird. Chemokinrezeptoren sind eine Untergruppe der GPCRs, die z.B. die Migration von Leukozyten entlang von Chemokingradienten (Chemotaxis) kontrollieren.[40,91].

1.4.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Die Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) bildet bei Säugern mit 1000 – 2000 Vertretern die größte Familie der Zelloberflächenmoleküle. Bei Vertebraten kodiert ca. 1 % des Genoms für GPCRs[16]. Alle GPCRs besitzen ein aminoterminales, extrazelluläres und ein carboxyterminales, intrazelluläres Segment. An den aminoterminalen Teil können spezifische Liganden binden (Abb. 4). Bereiche

des 2. intrazellulären Loops binden an G-Proteine (siehe Abb. 5; hier: DRY-Motiv, R violett). Sequenzvergleiche zwischen verschiedenen GPCRs zeigen, dass alle Unterfamilien einen zentralen Kernbereich aus sieben Transmembrandomänen (7TM) besitzen (Abb. 5, gelb unterlegt), die kreisförmig angeordnet sind und über drei intrazelluläre und drei extrazelluläre Loops (e1 – e3) miteinander verbunden sind (siehe Abb. 4)[6].

Zwei Cysteinreste in den extrazellulären Loops e1 und e2 sind bei vielen GPCRs konserviert und dienen möglicherweise durch Ausbildung einer Disulfidbrücke zur Stabilisierung der dreidimensionalen Struktur des Rezeptors[16]. Daneben gibt es, wie hier gezeigt (Abb. 5), möglicherweise zwei weitere Cysteinreste, die zwischen N-terminus und dem 3. extrazellulären Loop ebenfalls eine Disulfidbrücke ausbilden können[136].

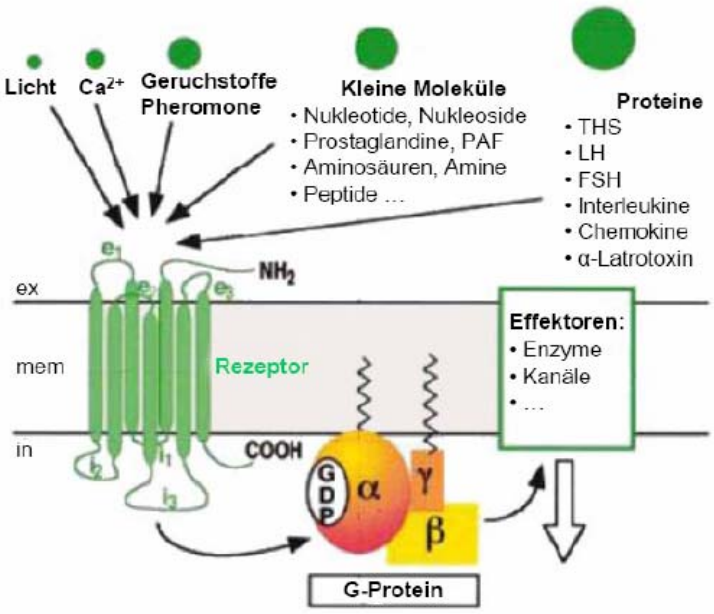


Abbildung 4: GPCRs haben alle eine zentrale gemeinsame Struktur aus 7TM-Helices und dienen der Signaltransduktion.

Die unterschiedlichen Liganden binden an das N-terminale Ende, im Inneren wird durch eine Konformationsänderung das G-Protein gebunden und anschließend gespalten. Die Spaltprodukte des G-Proteins binden an intrazelluläre Effektoren und leiten das Signal intrazellulär weiter. Bildquelle: Bockaert et Pin[16]

Durch die Bindung eines Liganden kommt es zu einer Konformationsänderung: die intrazellulären Loops i2 und i3 entfernen sich voneinander und bilden einen Spalt, der mit einem G-Protein interagieren kann (Abb. 6)[144]. Dieses wird aktiviert, spaltet sich in zwei Untereinheiten (α und $\beta\gamma$) auf, welche an Effektorproteine binden. Dadurch wird das extrazelluläre Signal in der Zelle weitergeleitet.

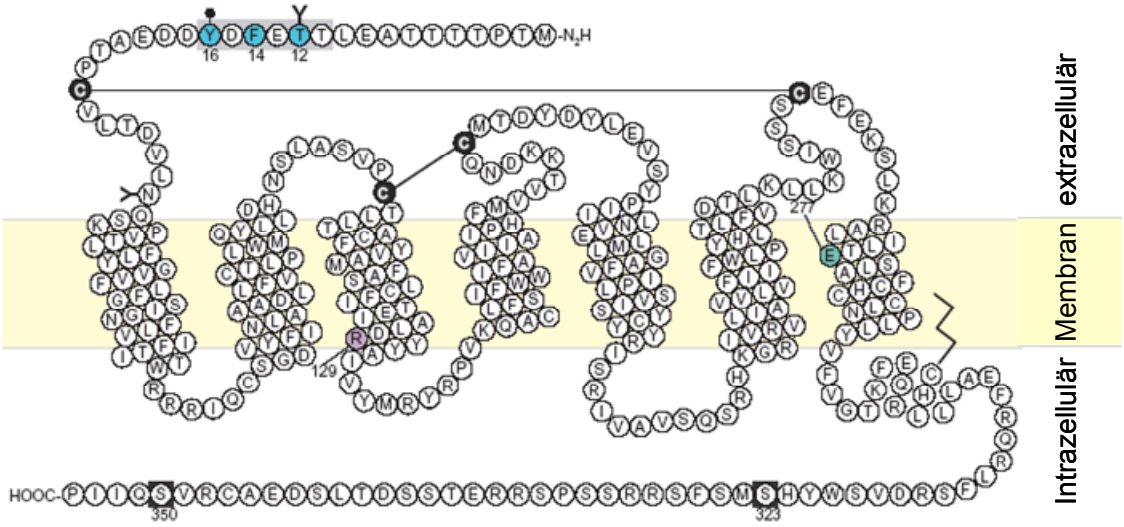


Abbildung 5: Zweidimensionale Schlangenprojektion *(snake plot)* des viralen GPCRs gpUS28. Die Anordnung des aminoterminalen, extrazellulären Teiles der 7TM-Helices und des intrazellulären, carboxyterminalen Teiles wurden anhand eines Aminosäuresequenzvergleiches mit dem bovinen Rhodopsinrezeptors berechnet. In Chemokinrezeptoren konservierte Disulfidbrücken, zwischen dem N-terminus und dem 3. extrazellulären Loop bzw. 1.und 2. Loop sind durch schwarze Kreise und Verbindungslinien gekennzeichnet. Ein konserviertes 6 AS-Motiv (auch in CCR-1, -2, CX3CR1)(graue Box). Wahrscheinliche Glykolisierungsstellen sind durch ein „Y“ nd Sulfatierungstellen (Y16) durch einen schwarzen Punkt gekennzeichnet. Das DRY-Motiv ist für die Bindung an G-Proteine essentiell (wird durch Mutation R129A (violett) unterbunden). Das saure Glutamin (E277) ist über die meisten Chemokinrezeptoren konserviert und könnte Wechselwirkungen mit basischen Gruppen von nicht peptidischen Verbindungen dienen. Die Serinreste S323 und S350 sind die meistverwendeten Phosphorylierungsstellen. (Bildquelle Vischer et al [136])

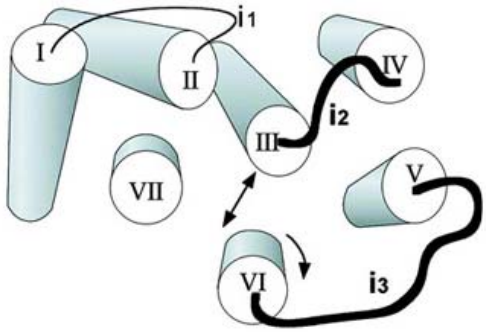


Abbildung 6: Schematische Anordnung der 7TM-Domäne eines GPCRs in aktivierter Form.

Durch die Aktivierung öffnet sich ein Spalt zwischen den Loops i2 und i3, der mit dem G-Protein interagieren kann. Abgebildet ist die Aufsicht auf die 7TM-Domäne von der zytoplasmatischen Seite[16].

1.4.2 Von Viren kodierte G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Bei Viren kennt man heute ca. 20 Gene, welche hohe Sequenzübereinstimmungen mit GPCRs aufweisen (Tabelle 1)[111]. Es wird vermutet, dass diese Gene eine Funktion besitzen, die der von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren ähnelt. Die viralen Rezeptoren werden zur Untergruppe der Chemokinrezeptoren gezählt. Chemokine (*chemo*taktisch wirksame Cyto*kine*[111]) sind eine Gruppe niedermolekularer (8 -14 kDa), meist basischer, löslicher Proteine[71]. Sie werden in vier Gruppen unterteilt (CC, CXC, CX3C und XC). Die Unterteilung erfolgt nach Anzahl und Abstand der ersten beiden von insgesamt vier konservierten Cysteinresten[87]. Durch die Chemotaxis und Aktivierung von Leukozyten spielen Chemokine eine Schlüsselrolle bei Entzündungreaktionen oder der Immunantwort[70]. Die Wirkung von Chemokinen ist von der Bindung an Chemokinrezeptoren abhängig[54], welche die intrazelluläre Signaltransduktion, wie z.B Calciumfreisetzung oder Phosphorylierung, von Kinasen triggern. Chemokine steuern die Migration von Leukozyten bei der Homöostase oder bei inflammatorischen Prozessen[40].

1.4.3 Chemokine und Chemokinrezeptoren von HCMV

HCMV kodiert für mindestens vier ORFs, die Homologien zu Chemokinrezeptoren aufweisen (UL33, UL78, US27 und US28)[87 7 29 41 42 73]. US28 ist von den vier Genen am besten untersucht. Das Genprodukt pUS28 wird zur Gruppe der CC-Chemokinrezeptoren gezählt (30 % AS-Übereinstimmung mit CCR-1)[88]. Es kann an RANTES (CCL-5) sowie eine Vielzahl anderer CCL- (2, 3, 4, 7, 11, 13, 26 und 28)[96] und das CX_3CL- Chemokin (Fraktalkin) binden[60]. Da Fraktalkin ein membranständiges Chemokin ist, das auf vaskulären Endothelzellen (nach Stimulation durch proinflammatorische Cytokine) exprimiert wird[9], wird vermutet, dass US28 als möglicher Bestandteil der viralen Hüllmembran die Infektion dieser Zellen durch das Virus positiv beeinflusst[60] (siehe auch Abb. 7 Punkt 1).

Bisher konnte jedoch nur für US27 und UL33 gezeigt werden, dass sie im infektiösen Viruspartikel enthalten sind, jedoch nicht in *dense bodies*[132].

pUS28 ist auch ohne Ligandenbindung konstitutiv aktiviert[24]. In einem feedback-Mechanismus werden am C-Terminus Tyrosinreste phosphoryliert. Das führt zur Internalisierung von US28[41]. Durch Bindung von Chemokinen an den Rezeptor könnte so eine Absenkung der Konzentration dieser Moleküle in der Umgebung der infizierten Zelle erreicht werden[17] (Abb. 7 Punkt 3). US28 beeinflusst darüber hinaus verschiedene zelluläre Signaltransduktionswege. Dafür soll die Bindung an unterschiedliche Gruppen von G-Proteinen ($G\alpha_{q/11}$[83], $G\alpha_{i/0}$[14], $G\alpha_{12/13}$[125]) verantwortlich sein[14,24]. Für manche Funktionen ist US28 konstitutiv aktiv (Abb. 7.2). Es wird kein Ligand benötigt, um Transkriptionsfaktoren wie NF-κB, CRE oder NFAT zu aktivieren[24] oder die Konzentration an Inositolphosphaten (IP_3) in der Zelle ansteigen zu lassen[83]. Daneben gibt es aber auch Prozesse, die einer Aktivierung durch Liganden bedürfen. Versuche von Streblow et al. haben gezeigt, dass US28 in Gegenwart von RANTES (CCL-5) oder MCP-1 (CCL-2) die Migration von *smooth muscle cells* (SMC) auslösen kann[125] (Abb. 7.6). Es konnte auch gezeigt werden, dass US28 anstelle des CCR-5 Rezeptors als Korezeptor für den HIV-Eintritt in CD4-positive Zellen dienen kann[97 98 120] (Abb. 7.8).

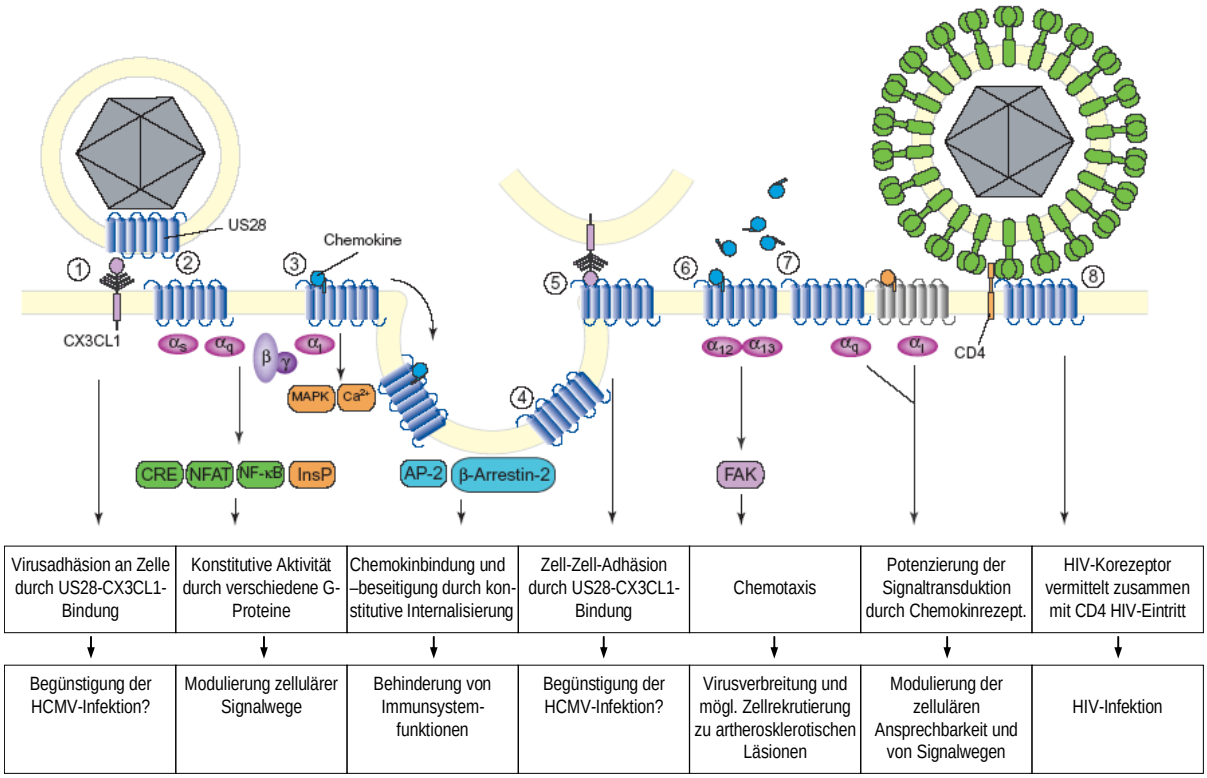


Abbildung 7: Mögliche Funktionen des von HCMV-kodierten Chemokinrezeptor US28.

Genauere Beschreibung erfolgt im Text (Bildquelle: Vischer et al.[136])

Die beiden HCMV-kodierten Rezeptoren, mit Homologien zu CC-Chemokinrezeptoren, UL33 und UL78, liegen auf einem Genomabschnitt, der in allen β-Herpesviren konserviert ist. Es sind homologe Gene beim RCMV (R33, R78)[13 11 135], beim MCMV (M33, M78)[134 90], bei einer Reihe von Affenarten Tupaia-HV (T33, T78)[5] ChCMV (US27, US28, UL78)[34] und bei den humanen Herpesviren 6A, 6B und 7 (U12, U51)[149] bekannt. UL33 zeigt eine begrenzte, aber signifikante Sequenzähnlichkeit zu zellulären Chemokinrezeptoren bei Mensch (hCCR-3, hCCR-10) und Maus (mCCR-10). Bislang sind für UL33, UL78 und auch US27 keine Liganden bekannt. Interessanterweise konnte aber für das UL33-Homolog der Maus kürzlich gezeigt werden, dass M33 RANTES binden und eine SMC-Migration auslösen kann[79]. *In vitro* Studien von Waldhoer et al.[139] konnten zeigen, dass M33 in MCMV und neben US28 in HCMV auch UL33 zelluläre Signalwege beeinflussen kann, wobei auch hier der

Rezeptor konstitutiv aktiv ist und kein Ligand benötigt wird[139]. In infizierten Zellen konnten diese Effekte bislang nicht beobachtet werden.

UL78 zeigt weniger Sequenzübereinstimmungen mit Chemokinrezeptoren als UL33, dennoch wird es zu den CC-Rezeptoren gezählt, obwohl man seine Funktion nicht kennt. Die Tatsache, dass der ORF UL78 in allen β-Herpesviren konserviert ist, lässt jedoch vermuten, dass es für diese Viren eine wichtige Bedeutung hat[82]. Für die permissive Replikation in Fibroblasten wird UL78 ebenso wie die anderen 3 GPCR von HCMV nicht benötigt[147].

Über US27 ist bis heute relativ wenig bekannt. Der Rezeptor zeigt 40 % Sequenzhomologie mit US28, kann aber an keinen der von US28 gebundenen Liganden binden. Ähnlich wie US28 und UL33 kann es in perinukleären Strukturen und im Endoplasmatischen Retikulum (ER) nachgewiesen werden[133].

HCMV kodiert selbst für die Chemokine UL146 (vCXC-1) und UL147 (vCXC-2)[95]. UL146 hat zwar nur eine geringe Aminosäuresequenzübereinstimmung mit CXCL-Chemokinen, ist aber voll funktionsfähig und wirkt über CXCR-2 chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten, jedoch nicht auf andere periphere B-Zelltypen[95]. Das virale Chemokin wird sezerniert und kann im Medium infizierter Zellen gefunden werden. Es kann jedoch nicht an US28 binden[95]. Von dem UL147-kodierten Chemokin ist keine Funktion bekannt[95]. Sequenzvergleiche haben gezeigt, dass vCXC-2 gewisse Homologien mit Proteinen hat, wie zu IFN-γ Protein 10 (IP10) oder *IFN-iducible T cell chemoattractant* (I-TAC)[10].

Der Laborstamm AD169 verfügt nicht über diese viralen Chemokine UL146 und UL147, da bei diesem, verglichen mit dem Toledo-Stamm, die Gene im Bereich zwischen UL133 und UL154 deletiert sind[27].

Neben Mechanismen, welche die Immunantwort unterlaufen, nimmt HCMV auch Einfluss auf die zelluläre Genexpression.

Tabelle 1: Virale Chemokine, Chemokinrezeptoren und Chemokinbindeproteine

(Sub-) Familie	Genus	Spezies	vGPCR	Andere Bezeichnung	Zelluläres Homolog	% AS Identität	Funktion / Wirkung
α Herpesviridae		Marek's disease virus	MDV0033	vIL-8	CXC Chemokin		Nicht bekannt
			MDV0083	vIL-8	CXC Chemokin		Nicht bekannt
β Herpesviridae	Zytomegalievirus	HCMV	US28	US28	CCR3, CX3CR1 konstitutiv aktiv	36 (CX3CR1)	Bindet breites Spektrum von Chemokinen; Chemokinesis glatter Muskelzellen; HIV entry; Zell-Zell Fusion; konstitutive NF-κB Aktivierung
			US27	US27	Putativer Rezeptor	23 (CXCR3)	Nicht bekannt
			UL33	UL33	CCR3, CCR10 Konstitutiv aktiv	21 (CCR10)	Aktiviert verschiedene Pathways in transfizierten Zellen
			UL78	UL78	Somatostatin R3	12	Nicht bekannt
			UL146	vCXC-1	CXC Chemokin		Calciumfluss in Neutrophilen;Chemotaxis und Degranulation (CXCR2-spezifisch)
			UL147	vCXC-2	CXC Chemokin		Homologien zu IP10, I-TAC
	Muromegalievirus	MCMV	m131/129	M131/129	CC Chemokin		Virulenzfaktor; blockiert NK- and T-Zellantwort auf MCMV in vivo; Proinflammatorsch bei Infektion (early) Virus mit Deletion zeigt schwächere Virämie
				MCK-1/MCK-2			
			UL33	M33	CCR10 konstitutiv aktiv	21	Virulenzfaktor, bindet RANTES, Migration glatter Muskelzellen
			UL78	M78	Opioid-like R1	13	Nicht bekannt
		RCMV	UL33	R33	CCR10	23	Virulenzfaktor (Replikation in Speicheldrüsenzellen)
			UL78	R78	CCR10	15	Virulenzfaktor
	Roseolovirus	HHV-6 a/b	U12	U12	CCR10	19	Calciumfluss in vitro
			U51	U51	Cysteinylleukotrien Rezeptor 2	16	Verringerte RANTES Expression
			U83	U83	CC Chemokin		Chemotaxis von THP-1 Zellen
		HHV-7	U12105	U12	CX3CR1	20	Nicht bekannt
			U51105	U51	CCR2	16	Nicht bekannt
γ Herpesviridae	Lymphocryptovirus	HHV-4 (Epstein-Barr-Virus)	BILF1		CXCR4	15	
	Rhadinovirus	Herpesvirus saimiri	ORF74	ECRF3	ELR+ CXCR	24 (CXCR2)	Calciumfluss in vitro

Fortsetzung Tabelle 1

(Sub-) Familie	Genus	Spezies	vGPCR	Andere Bezeichnung	Zelluläres Homolog	% AS Identität	Funktion / Wirkung
γ Herpesviridae	Rhadinovirus	HHV8 (KS-HV)	74	ORF 74	CC-CXCR konstitutiv aktiv	26 (CXCR2)	Proinflammatorisch, angiogen; onkogen
			K6	vMIP-I	CC Chemokin		Angiogen; CCR8 Agonist
			K4	vMIP-II	CC Chemokin		Angiogen; HIV-suppressiv; Chemoattractant für Eosinophile; Antagonist an CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR8, CXCR3, XCR1, CX3CR1, CXCR4 und US28; inverser Agonist für KSHV GPCR
			K4.1	vMIP-III	CC Chemokin		CCR4 Agonist; angiogen ; Chemotaxis von TH2-Zellen
		MHV-68	74	ORF 74	Putativer CXCR		Nicht bekannt
			M3	M3	CC, C, CXC and CX3C Chemokin-bindeprotein		Bindet breites Spektrum von Chemokinen
		Equines HV2	E1	ORFE1	CCR3	51	Eotaxinrezeptor; Chemotaxis
			E6	E6	CCR10	16	Nicht bekannt
			74	ORF74	CXCR5	22	Nicht bekannt
Poxviridae		MCV	MC148	MC148R	CC Chemokin		Blockiert die Chemotaxis von Neutrophilen, Monozyten und T-Zellen
				vMCC-1			CXC Chemokine; Antagonist für CCR2 und CCR8; blockiert die Proliferation humaner hämatopoietischer Vorläuferzellen
		Ortho-und Leporipoxviren	B29R (Vaccinia)	T1 35 kD Protein vCCI vCKBP vCBP-1	CC Chemokin-bindeprotein		Bindet breites Spektrum von Chemokinen, anti-inflammatorisch bei Vaccinia Infektion und allergischer Luftwegsinflammation im Meerschwein
		Myxoma	T7	M-T7 vCBP-2	CC, C and CXC Chemokin-bindeprotein		Bindet breites Spektrum von C, CXC and CC Chemokinen und bindet IFN-γ; Antiinflammatorisch bei Myxomainfetion
		Schweinepockenvirus	K2R	K2R	Putativer CCR		Nicht bekannt
		Capripoxvirus	Q2/3L	Q2/3L	Putativer CCR		Nicht bekannt
Lentiviridae		HIV	Tat	Tat	CC and CXC		Chemotaxis von Leukozyten(CCR2, CCR3)

KS, Kaposi's sarcoma; KSHV, Kaposi's sarcoma–associated herpesvirus; GPCR, G protein–coupled receptor; MCV, molluscum contagiosum virus; MCK, murine cytomegalovirus chemokine; IL, Interleukin; NF-κB, nuclear factor κB;TH,T Helferzelle; NK, Natürliche Killerzeillen.)

1.4.4 US28 und VEGF-Expression

Bei einer Infektion mit HCMV wird die Genexpression der Wirtszelle stark beeinflusst[152] [21]. HCMV wird eine bedeutende Rolle bei der Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen zugeschrieben. So ist HCMV mit einer erhöhten Restenoserate[151] [150] und einem verstärkten Auftreten von Vaskulopathien nach Organtrans-plantationen[121] [59] assoziiert. Auch bei der Entstehung der Atherosklerose soll HCMV aufgrund verstärkter Expression von Cytokinen bzw. Wachstumsfaktoren eine Schlüsselrolle zukommen. Es konnte gezeigt werden, dass HCMV-infizierte Zellen den Wachstumsfaktor VEGF (*vascular endothelial growth factor*) verstärkt exprimieren[104]. *In vitro* Versuche haben gezeigt, dass die Expression von US28 den VEGF-Promotor aktiviert und dass das Vorhandensein von US28 in transfizierten NIH3T3 die Expression von VEGF in diesen Zellen vervierfacht[75].

VEGF gehört zu der Familie der PDGF-/VEGF-Wachstumsfaktoren und kodiert für ein Protein, das häufig als Homodimer auftritt, wobei die Untereinheiten durch Disulfidbrücken verbunden sind. Das Protein ist ein glykosyliertes Mitogen, das spezifisch auf Endothelzellen wirkt und verschiedenste Effekte auslöst. Es erhöht die vaskuläre Permeabilität, kann Angiogenese induzieren, die Endothelzellproliferation und –migration anregen und Apoptose verhindern.

VEGF spielt als Signalprotein eine wichtige Rolle in der Gefässneubildung (Angiogenese). Es wird in Geweben bei Sauerstoffmangel ausgeschüttet. In dieser für den Körper bedrohlichen Situation werden Faktoren produziert (HIF, *hypoxia inducible factors*), die die VEGF-Freisetzung fördern. VEGF bindet an spezifische Rezeptoren, vor allem auf der Oberfläche von Endothelzellen, und aktiviert dadurch nachgeschaltete Tyrosinkinase Signaltransduktionswege.

Zwei Rezeptortyrosinkinasen, Flt-1 und KDR (VEGFR-1 und -2), sind die beiden wichtigsten Rezeptoren für VEGF. Während KDR vermutlich nur auf Endothelzellen exprimiert wird, kommt der VEGF Rezeptor 1 auf vielen Zelltypen vor.[75]

1.4.5 Zielsetzung

Das humane Zytomegalievirus kodiert für mindestens vier Gene, die große Homologien zu den Chemokinrezeptoren in Säugetieren aufweisen. Die meisten Experimente mit diesen viralen Proteinen wurden *in vitro* durchgeführt. In dieser Arbeit wurden diese Membranproteine von HCMV im viralen Kontext untersucht. Dazu sollten Ligandenbindungs- und Signaltransduktionsexperimente mit verschiedenen Deletionsmutanten in unterschiedlichen Zelltypen durchgeführt werden.

Da zu Beginn dieser Arbeit kein Antikörper zur Verfügung stand, um US28 in infizierten Zellen detektieren zu können, sollte als Bestandteil dieser Arbeit ein gegen den integralen Membranrezeptor US28 gerichteter Antikörper hergestellt werden.

Weiterhin sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob die in Transfektionsexperimenten gezeigte verstärkte Expression von VEGF durch US28 und dadurch mögliche onkomodulatorische Effekte bei der Infektion mit HCMV ebenfalls zu beobachten sind.

2 Material

2.1 Geräte

310 Perkin Elmer Sequencer	Applied Biosystems, ASI, Schwerzenbach, Schweiz
Bakterienschüttler Certomat	IS B. Braun Biotech International, Melsungen
Brutschränke	Heraeus, Hanau
Elektrophoreseapparaturen	Biometra, Göttingen
Eppendorf Mixer 5432	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
French Press	GlenMills, Clifton, NJ, USA
Gel Doc 2000	Bio-Rad, München
Gene Pulser	Bio-Rad, München
Heizblock	Liebisch, Bielefeld
Hybridization Incubator Model 2000	Micro Robbins Scientific Corp.,Sunnyvale, CA, USA
Invertmikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena
LKB 2219 Multitemp II Thermostatic	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Mikrowelle Bosch MG 800	Bosch, Gerlingen
Eppendorf-Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Gilson-Pipetten	Middleton, WI, USA
Gene Quant-Photometer	Pharmacia, Uppsala, Schweden
LKB NOVASPEC II-Photometer	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Lumat LB 9507	Berthold, Bundoora, Australien
Sartoblot II-S	Sartorius, Göttingen
Schüttler:	
GFL 3006	GFL, Burgwedel
Reax2	Heidolph Instruments, Schwabach
SDS-PAGE-Kammer	Biometra, Hanau
Panther Semidry Electroblotter	Owl, Portsmouth, NH, USA

Sonifier Power Supply B-12	Branson Sonic Power Company,Danbury CT, USA
Sterilbänke:	
Lamin Air HBB 2472S	Heraeus, Hanau
Lamin Air HB 2472	Heraeus, Hanau
Thermocycler:	
Omnigen	Hybaid, Ashford, UK
Genamp PCR system 9700	Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA
T3000	Biometra, Göttingen
TGradient	Biometra, Göttingen
Thermorührer IKA Mag Ret	IKA Labortechnik, Staufen
Tischzentrifugen:	
Heraeus Biofuge 13	Heraeus, Hanau
Heraeus Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Zentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifuge:	
Beckman L7-65	Beckman, München
Vortex VF 2	Bachofer, Reutlingen
Video graphic printer up 980CE	Sony, Tokyo, Japan
Waagen:	
PJ Precisa junior 500c	Digitana AG, Hamburg
Feinwaage AJ 100 Mettler,	ASI, Schwerzenbach, Schweiz
Wasserbäder:	
Circulator	LKB, Bromma, Schweden
Schüttelwasserbad GFL 1083	GFL, Burgwedel
Zentrifugen:	
Beckman J2-21	Beckman, München
Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau
Variofuge 3.0R	Heraeus, Hanau
Ultrazentrifuge L7-65	Beckman, München
Gammazähler:	
Minaxi X Auto-Gamma 5000	Packard, Downers Grove, IL USA

2.2 Chemikalien

Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung	Roth, Heidelberg
Agarose	Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA
Ammoniumpersulfat	Bio-Rad, München
Amylose Resin	New England Biolabs, Beverly, MA, USA
Bacto-Agar	Difco, Detroit, MI, USA
Bacto-Trypton	Difco, Detroit, MI, USA
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA (*Bovine serum albumin*)	Serva, Heidelberg
Coomassie brilliant blue R 250	Serva, Heidelberg
DMSO	Merck, Darmstadt
DTT	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
FCS (fötales Kälberserum)	Gibco BRL, Karlsruhe
L-Glutamin	Serva, Heidelberg
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Luciferase Assay System E1500	Promega, Madison, WI, USA
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe
Nukleosidtriphosphat	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Phenol	Roth, Karlsruhe
SDS	Serva, Heidelberg
TEMED	Serva, Heidelberg
Tris	USB, Cleveland, OH, USA
Tween-20	Sigma, Deisenhofen
Wasserstoffperoxid (30 %)	Merck, Darmstadt
Yeast-extract	Difco, Detroit, MI, USA

Alle weiteren und hier nicht aufgeführten Chemikalien und Lösungsmittel wurden in p.a. Qualität von den Firmen Fluka (Buchs, Schweiz), J.T. Baker (Deventer, Holland), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma (Deisenhofen) bezogen.

2.3 Radiochemikalien

^{32}P dCTP

^{125}I RANTES, human, rekombinant, Code NEX 292 5 µCi Perkin Elmer Life Sciences Boston, MA, USA

D-myo-[2-^{3}H]inositol (siehe Minisini et al.[83])

Alle Radiochemikalien wurden aus der Zentralen Einrichtung für Isotopenanwendung der Universität Ulm bezogen.

2.4 Enzyme

AcTEV™ Protease	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, No.12575-015
Calf intestine alcaline phosphatase	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Faktor Xa Protease	New England Biolabs, Beverly, MA, USA
Proteinase K	Boehringer, Mannheim
Trypsin	Seromed, Berlin
Pepsin	Serva, Heidelberg
Restriktionsenzyme diverse	Gibco BRL, Karlsruhe
	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
	New England Biolabs, Beverly MA, USA
RNAse H	Gibco BRL, Karlsruhe
Taq-Polymerase	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Expand high fidelity Polymerase	Roche Applied Science, Penzberg
Superscript II	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
T4-DNA-Ligase	Roche Applied Science, Mannheim

2.5 Antikörper

- Monoklonaler Mausantikörper gegen das Zytomegalievirus (pp65)
  DAKO Cytomation A/S, Kopenhagen, Dänemark Klon AAC10
  Code No. M 7065 Lot. 00004830
- Anti-MBP
  Monoklonaler Mausantikörper gegen das Maltosebindeprotein aus *E.coli*.
  New England Biolabs, Beverly, MA, USA
- Anti-Vimentin V9
  Monoklonaler IgG1 Mausantikörper gegen humanes Vimentin
  Santa Cruz Biotechnology cat.: SC6260 Lot. F300, Santa Cruz, CA, USA
- anti-pp65 Monoklonaler Antikörper aus Hybridomzelllinie von M. Mach aus Erlangen
- monoklonaler Kaninchen anti-Maus Antikörper HRP-konjugiert,
  spezifisch für Maus IgG, DAKO Cytomation A/S, Kopenhagen, Dänemark
  Code No. P0161 Lot. 00004972
- Fluorescein-markierter affinitätsgereinigter Antikörper Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L), $F(ab')_2$, (präadsorbiert mit humanem Serum); KPL Katalog Nummer 202-1516, Gaithersburg, Maryland, MD, USA
- Biotinylierter Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L), Vector Laboratories, Inc. Burlingame Ca, USA, Katalog Nummer BA-1000

2.6 Antibiotika

Ampicillin	Serva, Heidelberg
Chloramphenicol	Serva, Heidelberg
Gentimycin (G418)	Calbiotech, Merck, Darmstadt
Kanamycin	Serva, Heidelberg
Penicillin	Seromed, Berlin
Streptomycin	Seromed, Berlin

2.7 Sonstige Verbrauchsmaterialien

DNA Sequencing Kit	Applied Biosystems, ASI, Schwerzenbach, Schweiz
DNA-1kb Leiter	Roche Applied Science, Penzberg
DNA-100bp Leiter	New England Biolabs, Beverly, MA, USA
ECLTM Western Blotting Detection Reagents	Amersham Pharmacia, Little Chalfont, Uk
GFXTM PCR-DNA and Gel Band Purification Kit	Amersham Pharmacia, Little Chalfont, UK
Hybond ECL Nitrocellulosemembran	Amersham Pharmacia, Little Chalfont, UK
Jetstar Plasmid Maxi Kit 20	Genomed, Bad Oeynhausen
Kodak X-Omat-AR Röngtenfilme	Eastman-Kodak, Rochester, NY, USA
Nucleobond PC-500	Macherey-Nagel, Düren
Polymax RT Entwickler/Fixierer	Sigma, Deisenhofen
Protease Inhibitor Mix complete EDTA free	Roche, Basel, Schweiz
Protein Standard Precision Plus all blue	Biorad, Hercules, CA, USA
RNA guard	Pharmacia
SuperfectTM Transfection Reagent	Qiagen, Hilden
Whatman Filterpapier 3MM	Whatman, Maidstone, UK
Zellkulturflaschen, - schalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Poly prep columns	Biorad, München, 731-1550 (50 Stück)
DOWEX-1 Harz (100 – 200 mesh, Cl^- Form, 1x8-200)	Sigma, Deisenhofen
Vectashield Mounting Medium H-1000	Vector laboratories, Inc., Burlingame CA, USA
Vectastain ABC Kit, Peroxidase Standard PK-4000	Vector laboratories, Inc., Burlingame CA, USA

Peroxidase Substrat Kit DAB SK-4100	Vector laboratories, Inc., Burlingame CA, USA
Quantikine hVEGF Immunoassay	R&D Systems, Minneapolis MN, USA

2.8 Bakterienstämme

- **DH10B:** *E.coli* K12, [F^- araD139 Δ(ara,leu)7697 ΔlacX74 galU galK rpsL deoR ϕ80 dlacZ ΔM15 endA1 nupG recA1 mcrA Δ(mrr hsdRMS mcrBC)] (Life Technologies, Karlsruhe)
- **TG2:** *E.coli* K12, [F^- traD36 $lacI^q$ Δ(lacZ)M15 supE hsd Δ5 thi Δ(lac – $proAB^+$) Δ(srl - recA)306::Tn10 (tet^r)]
-

2.9 Plasmide

p132: pUC19 Klonierungsvektor mit Ampicillin (Ap^R)

p268: pEGFP, Kanamycin (Kn^R)

p427: pGL3 (Luciferase Reporter Vektor; Firefly (*Photinus pyralis*); Promega)

p452: pcDNA3.1 (Eukaryotischer Expressionsvektor mit CMV MIE-Promotor, (Ap^R)

p453: pcDNA3.1::US28

p582: pGL3::VEGF1340 (pGL3 mit VEGF Promotorkonstrukt -1286 -- +50)

p594: pTST101 Prokaryoter Expressionsvektor mit rha-Promotor, (Ap^R) und MBP-Fusionsprotein (freundlicherweise von Dr. G. Muth, Institut für Mikrobiologie / Biotechnologie der Universität Tübingen, zur Verfügung gestellt)

p602: pMALp2 Prokaryoter Expressionsvektor mit T7-Promotor, (Ap^R) und MBP-Fusionsprotein (New England Biolabs)

p614: pcDNA3.1::UL78

2.10 Oligonukleotide

Alle Primer wurden von MWG-Biotech AG aus Ebersberg oder biomers.net GmbH Ulm bezogen.

Name	Länge	Sequenz (5' → 3')
IRES-GFPneo 3' *PmeI*	31	CGTAGTTTAAACCAGGCTTTACACTTTATGC
IRES-GFPneo 5'*XhoI*	31	CTGACTCGAGACGCGTCGGATCCCGGAGTAC
IRES-GFPneo M1	37	TCATCCCGGGGCCAGGGTTGTACAGTTCATCCATGCC
IRES-GFPneo M2	34	CCACTGTGCTGGCAGGCTTTACACTTTATGCTTC
IRES-GFPneo P1	37	CGTACCATGGGGTTGGATCCCGGAGTACTACAAAGAC
IRES-GFPneo P2	35	CCTGGCCCCGGGATGATTGAACAAGATGGATTGCA
US28eloop M1	20	GGGAGTTGTGATCTAGCAGC
US28eloop M2	21	TTAGTGATGGTGATGGTGGTG
US28eloop P1	22	ATGCAAGCTTATGAACTGGAGC
US28eloop P2	21	TAGATCACAACTCCCTAGCCA
US28eloop1	89	GGAACTCACGACGGAGTTTGAATACGATCTTGGAGCGACTCCTTGTACCTTCA CCGACGTGCTTAATCAGCTGCTAGATCACAACTCCC
US28eloop2	120	GTTGAGGATGATCGGGTAACTGACCTCTAAGTAGTCGTAGTCGGTCATACATTG ATTGTCTTTTTTGGTCACCACCATTAACGTACACGGCACGCTGGCTAGGGAGTT GTGATCTAGCAG
US28eloop3	107	GTTACCCGATCATCCTCAACGTCGACACGTTAAAACTCCTCAAATGGATCTCTAG CAGTTGCGAGTTCGAAAGATCGCTCAAACGTCACCACCATCACCATCACTAA
US28 nterm	100	GTATTCAAACTCCGTCGTGAGTTCCGTGGTCGTCGTCGTCGGTGTCATGCGGCC CTCGATCTTCTCAAACTGCGGGTGGCTCCAGTTCATAAGCTTGCAT
US28 eloop 3' HindIII	31	GCATAAGCTTTTAGTGATGGTGATGGTGGTG
US28 eloop 5' BamHI	45	GACTGGATCCATGAACTGGAGCCACCCGCAGTTTG
US28 Anker PCR	24	TTTTTTTTTTGTATGAAAAGGCCG
US28 Anker RT	15	TTTTTTTTTGTATGA
UL34 3' Anker PCR	20	TTTTTTTGAGAAATCAACGC
UL34 3' Anker RT	14	TTTTTTGAGAAATC
RNA universe	37	GTAAAACGACGGCCACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTN
UL78 1350P	19	TGTGGTAACGACAACCACG
UL78 1160P	20	TCTGGTCGAGAGATGTCAGC

2.11 Zelllinien

Für die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden folgenden Zelllinien benutzt.

HFF:	humane Vorhautfibroblasten
HUVEC:	humane Nabelschnurendothelzellen
U373 MG:	humane Glioblastom-Astrocytomazelllinie
HEK 293:	humane embryonale Nierenepithelzelllinie
hTERT-RPE1:	humane retinale Pigmentepithelzelllinie

2.12 Viren

In der vorliegenden Arbeit wurde mit folgenden HCMV-Stämmen gearbeitet:
AD169, TB40E und Titan. In alle drei Stämme wurde eine BAC-Kassette eingebracht, um das Genom in Bakterien modifizieren zu können (BAC-Technologie[20]). Die ORFs US2-US6, die in vitro keine Funktion haben, gingen dabei verloren. Sie kodieren für Gene, die bei der Immunmodulation beteiligt sind.

AD169: Ein attenuierter, fibroblastenadaptierter Laborstamm, der ursprünglich von Rowe et al.[112] isoliert wurde.

AD169 ΔUL33/ΔUL78: Diese Doppeldeletionsmutante wurde mit Hilfe homologer Rekombination hergestellt. Dabei wurden zwei verschiedene Techniken der BAC-Technologie angewandt: Die Shuttleplasmid-Methode und die *ET-cloning*-Methode[20].

AD 169 Only28 (ΔUL33/ΔUL78/ΔUS27): Diese Trippelmutante entstand durch homologe Rekombination mittels BAC-Technologie aus der oben genannten Mutante[51].

Beide Mutanten beruhen auf dem AD169 Stamm und wurden im Labor von Detlef Michel hergestellt.

TB40E: Ein klinisches HCMV-Isolat, das durch wiederholtes Passagieren auf Endothelzellen die Fähigkeit, diesen Zelltyp infizieren zu können, behalten konnte. Dieser Endothelzelltropismus verschwindet bei längerer Passage auf Fibroblasten[118].

TB40E ΔUS28: Mutante, bei der mittels der *ET-Cloning*-Methode das US28 Gen aus dem Genom entfernt wurde.

TB40E US28-Flag: Bei dieser Mutante wurde an das US28 ein Flag-*Tag* an das carboxyterminale Ende angehängt.

TB40E US28-TAP: Diese Virusmutante trägt ein TAP-*Tag* am carboxyterminalen Ende von US28.

TB40E US28-YFP: In dieser Mutante wurde hinter US28 das YFP-ORF fusioniert.

Alle vier Mutanten im TB40E-Grundgerüst wurden von Michael Winkler (Universität Kiel) mittels *ET-Cloning*-Methode hergestellt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die US28-Flag-Mutante wurde von mir rekonstituiert.

Titan: Klinisches HCMV-Isolat, dessen Genom mit Hilfe der BAC- Technologie kloniert wurde. Die Titan-Stämme tragen im BAC als Reporterprotein GFP unter der Kontrolle des CMV MIEP.

Titan ΔUS28: Mutante, bei der mittels der *ET-Cloning*-methode das US28 Gen aus dem Genom entfernt wurde.

2.13 Medien und Standardlösungen

Alle Medien und Lösungen wurden, soweit nicht anders beschrieben, mit Aqua bidest. hergestellt.

2.13.1 Medien

2.13.1.1 Medien für Bakterien

LB-Medium

Trypton10g, Hefeextrakt 5g, NaCl 10 g, ad 1 l Aqua demin

Typ-Medium

Hefeextrakt 16g, NaCl 5 g, K_2HPO_4 2,5 g, Trypton 16 g, ad 1 l Aqua demin

2.13.1.2 Zellkulturmedien

HFF-Medium

MEM (Gibco BRL, Karlsruhe) 500 ml, FCS 10 % (v/v), Penicillin/Streptomycin 1 % (v/v), nicht essentielle Aminosäuren 1 % (v/v), Glutamin 1 % (v/v)

HEK293-Medium / U373 MG-Medium

D-MEM (Gibco BRL, Eggstein) 500 ml, FCS 10 % (v/v), Penicillin/Streptomycin 1 % (v/v), Glutamin 1 % (v/v), (nicht essentielle Aminosäuren 1 % (v/v) nur bei U373 MG)

hTERT-RPE1-Medium

HAM's F12 : D-MEM = 1:1, FCS 10 % (v/v), Glutamin 1 % (v/v), $NaHCO_3$ 3,48 %, Penicillin/Streptomycin 1 % (v/v)

HUVEC-Medium

EBM (endothelial cell basal medium) 500 ml, FCS 5 %, Wachstumsfaktoren (EGMMV single aliquots, BioWhittaker, Walkersville, MD, USA)

Einfriermedium Zellkultur

D-MEM oder MEM 500 ml (je nach Zelltyp), FCS 20 % (v/v), DMSO 10 % (v/v)

2.13.2 Lösungen

2.13.2.1 Standardlösungen

50x TAE

40mM Tris 484 g, 5mM NaAcetat 41 g, 1mM EDTA 37 g, mit Eisessig auf ph 7,4 einstellen, ad 2 l Aqua bidest

10 % (w/v) SDS

SDS 100 g, auf 68°C erwärmen, mit HCl auf pH 7,2 einstellen, ad 1 l Aqua

0,01 % PBS

NaCl 17,0 g, KH_2PO_4 2,72 g, auf pH 7,8 einstellen, ad 2 l Aqua

2x Lysepuffer

40 mM Tris (pH 8,0 - 8,5), 200 mM EDTA

20x SSC

3 M NaCl 175,3 g, 0,3 M NaCitrat 88,2 g, ad 1 l Aqua bidest.

Sucrose-Phosphat-Puffer

Saccharose 37,31 g, KH_2PO_4 0,26 g, K_2HPO_4 0,609 g, auf pH 7.8 einstellen, ad 500 ml Aqua bidest.

Einfriermedium für Bakterien nach Laborjournal

65 % Glycerin 6,5 ml, 0,1M $MgSO_4$-$7H_2O$, 25 mM Tris HCl, ad 10 ml Aqua bidest.,
1 ml Einfriermedium mit 1 ml Bakterienkultur vermischen, bei -75°C lagern

2.13.2.2 Lösungen für die Proteinaufreinigung

Column-Puffer

20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, ad 1 l Aqua bidest.

Elutions-Puffer

20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Maltose, ad 1 l Aqua bidest.

2.13.2.3 Lösungen für Virustitration

Färbelösung

3-Amino-9-Ethyl-Carbazol(AEC) 1 Tablette, Dimetylformamid (DMF) 4 ml, vortexen bis die Tablette vollständig gelöst ist, Na-Acetatpuffer (50mM pH 5,0) 16 ml, H_2O_2 100 µl, Wasserstoffperoxid erst bei Verwendung hinzu pipettieren. Ohne

Wasserstoffperoxid ist die Färbelösung lichtgeschützt bei 4°C für mehrere Wochen lagerbar.

2.13.2.4 Lösungen für den Western Blot

10x Lämmli-Puffer

Tris 30 g, Glycin 144 g, SDS 10 g, ad 1 l Aqua bidest.

2x SDS-Ladepuffer

0,5 mM Tris-HCl pH 6,8 200 µl 1 M DTT 200 µl, 10 % SDS 400 µl, Glycerol 200 µl, 10 % Bromphenolblau 20 µl

Blotpuffer

48 mM Tris 5,8 g, 39 mM Glycin 2,9 g, 1,3 mM SDS 0,387 g, 20 % Methanol 200 ml, pH mit NaOH 9,2 einstellen, ad 1 l Aqua bidest.

Tris-HCl pH 7,5

50 mM Tris 6,06 g, pH 7,5 mit HCl einstellen, ad 1 l Aqua bidest.

10x PBS

NaCl 80 g, KCl 2 g, Na_2HPO_4-7 H_2O 26,8 g, KH_2PO_4 2,4 g, auf pH 7,4 einstellen (HCl), ad 1L ml Aqua bidest

Blocklösung

1x PBS 200 ml, 5 % Magermilchpulver 10,0 g, 0,1 % Tween 20 200 µl

2.13.2.5 Lösungen für die Plasmid-DNA-Minipräparation

Lösung 1

50 mM Glukose 1,98 g, 25 mM Tris 0,61 g, 10 mM EDTA 0,74 g, ad 200 ml Aqua bidest.

Lösung 2

1 % SDS 20 ml (10 % Stocklösung), 0,2 M NaOH 20 ml (2 M NaOH), ad 200 ml Aqua bidest.

Lösung 3

3 M KaAcetat 58,8 g, 1,8 M HCOOH 15,4 ml, ad 200 ml Aqua bidest.

2.13.2.6 Lösungen für RANTES-Bindeversuch

Binding buffer

MEM (ohne Zusätze) 50 ml, 25 mM Hepes 298 mg, 1 % BSA 500 mg, sterilfiltrieren (0,4 µm Filter), pH 7,0 einstellen, am Vortag herstellen, bei 4°C lagern

2.13.2.7 Lösungen für IP_3-Bestimmung

Labelling buffer

D-MEM 500 ml, Penicilin/Streptomycin 5 ml, Glutamin 5 ml, nicht essentielle Aminosäuren 5 ml

Säulenpuffer 1 (DAG wird abgewaschen)

60 mM Natriumformiat 4,08 g, 5 mM Dinatriumtetraborat 1,13 g, ad 1L Aqua bidest.

Säulenpuffer 2 (IP_3 wird abgewaschen)

1M Ammoniumformiat, 0,1M Ameisensäure

Säulenpuffer 3 (Reinigung der Säule)

2M Ammoniumformiat, 0,1M Ameisensäure

2.13.2.8 Puffer für die Proteinreinigung über TAP-tag

Lysispuffer

50 mM Tris/HCl (pH 8,0) 250 µl, 10% Glycerin 500 µl, 1 % Triton X-100 50 µl, 150 mM NaCl 150 µl, 10 mM EGTA pH 8,0 100 µl, Protease-Inhibitor 250 µl, ad 5 ml

IgG-Waschpuffer (P1)

20 mM Tris/HCl (pH 7,5) 1 ml, 150 mM NaCl 7,5 ml, 0,1 % Triton X 50 µl, ad 50 ml

IgG-Waschpuffer (P2)

20 mM Tris/HCl (pH 7,5) 1 ml, 150 mM NaCl 7,5 ml, 0,1 % Triton X 50 µl, 5 % Glycerin 2,5 ml, ad 50 ml

TEV-Protease-Puffer (P3)

50 mM Tris/HCl (pH 8,0) 2,5 ml, ad 50 ml

1x Calmodulin-Puffer (P4)

50 mM Tris/HCl (pH 8,0) 2,5 ml, 50 mM NaCl 2,5 ml, 1 mM $CaCl_2$ 50 µl, ad 50 ml

4x Calmodulin-Puffer (P5)

50 mM Tris/HCl (pH 8,0) 2,5 ml, 200 mM NaCl 10 ml, 4 mM $CaCl_2$ 200 µl, ad 50 ml

Calmodulin Elutionspuffer (P6)

50 mM Tris/HCl (pH 8,0) 2,5 ml, 150 mM NaCl 7,5 ml, 4 mM EDTA pH 8,0 400 µl

RIPA Puffer

50 mM Tris HCl (pH 7,5). 150 mM NaCl, 1 % NP40, 0,5 % Natriumdeoxycholat, 0,1 % SDS

3 Methoden

Alle Methoden wurden, wenn nicht anders beschrieben, nach Sambrook et al. (1989)[114] durchgeführt.

3.1 Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren

3.1.1 BAC-DNA-Minipräparation aus Bakterien

Da die HCMV-BAC-DNA aufgrund ihrer Größe (ca. 230 kb) sehr empfindlich ist, sollte bei der Präparation auf starkes Schütteln oder Vortexen verzichtet werden. Die BAC-Minipräparation erfolgte mit dem Jetstar Kit der Firma Genomed.

3.1.2 BAC-DNA-Maxipräparation aus Bakterien

Für die DNA-Aufreinigung im quantitativen Maßstab wurde das Nucleobond-Kit der Firma Macherey-Nagel verwendet. Dazu wurden 300 ml LB-Medium (mit den geeigneten Antibiotika versetzt) mit 100 µl einer Vorkultur oder aus einer Glycerinkultur angeimpft und ÜN bei 37°C im Schüttler inkubiert. Die Bakterien wurden für 10 min bei 4000 rpm abzentrifugiert. Die nachfolgende DNA-Präparation erfolgte nach dem im Kit enthaltenen Standardprotokoll durch alkalische Lyse. Nach der Elution wurde mit Isopropanol gefällt, um das Elutionsvolumen zu verringern. Hierzu wurde nach Zugabe des Alkohols für eine Stunde bei –20°C inkubiert, um die DNA-Ausbeute der Fällung zu erhöhen. Die erhaltene DNA wurde in 100 µl H_2O resuspendiert.

3.1.3 DNA-Isolierung aus humanen Zellen

Durchinfizierte Zellkulturen wurden mit einem Zellschaber abgeschabt und mit wenig Medium in ein 1,5ml-Eppendorfgefäß überführt. Die Zellen werden bei 2000 rpm für 5 min (Heraeus-Zentrifuge) pelletiert und danach mit 1 ml 0,01 M PBS gewaschen. Das Pellet wurde in 500 µl 2x DNA-Lysispuffer resuspendiert. Hinzugegeben wurden 500 µl 1 % (w/v) SDS und 50 µl Proteinase K (Endkonzentration 0,5 mg / ml). Es wurde

ÜN bei 56°C inkubiert. Danach wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt, um Proteine, vor allem die Proteinase K, abzutrennen. Die wässrige obere Phase wurde mit 0,6 Vol Isopropanol und 0,1 Vol 3 M Natriumacetat gefällt (Zentrifugation bei RT für 15 min 13000 rpm). Nach dem Waschen mit 70 %-igem EtOH wurde das Pellet in 80 µl H_2O aufgenommen. Für analytische Verdaue wurden gewöhnlich 5 – 10 µl des Eluats verwendet.

3.1.4 Gesamt-RNA-Isolierung aus humanen Zellen

Da RNA ohnehin schon sehr viel instabiler ist als DNA und zusätzlich noch den ubiquitären RNasen ausgesetzt ist, war besondere Sorgfalt im Umgang mit RNA notwendig: Tragen von Einmalhandschuhen, Verwendung gesonderter Reagenzien und eigens für den Umgang mit RNA bestimmter Plastikmaterialien. Das in weiteren Schritten verwendete Wasser, das mit RNA in Berührung kam, wurde zuvor mit DEPC (Diethylpyrocarbonat) behandelt, um RNasen zu inaktivieren: Zu einer frisch autoklavierten Flasche Aqua bidest. wurde DEPC 1:1000 zugegeben und nach 1 h Inkubation bei 37°C (die RNasen waren nun inaktiviert) wurde die Flasche erneut autoklaviert, um verbleibendes DEPC thermisch zu zersetzen.
Nach Entfernen des Überstands durch zweimaliges Waschen der Monolayer mit PBS wurde 3 ml TRIzol-Reagenz (Gibco BRL, Karlsruhe) auf jedes *well* gegeben. Mit Hilfe der Pipette wurde die Zellsuspension homogenisiert. Nach 5 min Ruhen bei Raumtemperatur wurde alles in 15 ml-Falcons überführt. Es erfolgte die Zugabe von 600 µl Chloroform. Durch gründliches Vortexen entstand eine homogene, weißliche Emulsion. Durch anschließende Zentrifugation für 15 min bei 12000 g bei 4°C wurden die Phasen getrennt. Proteine und DNA sammelten sich in Inter- und organischer Phase, während sich die RNA in der wässrigen Phase befand und sich vorsichtig mit einer Pipette abnehmen und in ein neues Reaktionsgefäß überführen ließ. Durch die Zugabe von 500 µl Isopropanol und gutes Vermischen, jedoch nicht Vortexen, wurde die RNA ausgefällt. Nach 10 min Zentrifugieren bei 12 000 g und 4 °C wurde die RNA als kleines Pellet am Rand des Reaktionsgefäßes sichtbar. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet mit 1 ml Ethanol (75 %), gewaschen indem das Pellet vom Gefäßboden durch kurzes Vortexen abgelöst wurde. Es folgte

Zentrifugieren bei 7500 g für 10 min bei 4 °C. Danach wurde der Überstand abgenommen und das Pellet getrocknet. Das Pellet wurde in 20 µl H_2O+DEPC (mit DEPC behandeltes, Ribonuklease-freies steriles Aqua bidest. durch 10 min Erwärmen bei 55-60 °C resuspendiert. Die RNA-Proben wurden bei -80°C eingefroren.
Alternativ wurde RNA auch mit dem RNeasy-Kit (Qiagen) präpariert. Dabei wurde das Herstellerprotokoll verwendet.

3.1.5 RT-Reaktion

Um die zu einem bestimmten Zeitpunkt in einer Zelle transkribierten Gene zu bestimmen, wurde die Methode der Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) gewählt. Durch ihre hohe Sensitivität erlaubte sie auch den Nachweis nur in geringer Quantität vorhandener Transkripte.
Durch die Reverse Transkription wird von sämtlichen mRNA-Strängen der Probe mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase (RT) eine Kopie in DNA erstellt. Erst diese cDNA (copy DNA) kann mittels der Polymerase Kettenreaktion (PCR) detektiert werden (RNA lässt sich durch die PCR nicht vervielfältigen). mRNA-Stränge unterscheiden sich von anderen RNA-Formen (rRNA, tRNA) durch ein Ende mit mehreren Adeninbasen (Poly-A-Sequenz). So lässt sich die mRNA spezifisch markieren, indem man DNA-Stränge aus Thymidin-Basen (Oligo-dT) den Proben hinzugibt: sie lagern sich aufgrund der spezifischen Basenpaarung nach Watson & Crick als Primer an die Poly-A-Sequenz an (Primer-Annealing). Hier kann die RT ansetzen, um einen komplementären DNA-Strang zu synthetisieren.

Es wurde 1 µg Gesamt-RNA pro Ansatz eingesetzt.

Grund RT-Protokoll:

Ansatz wurde in einem 500 µl Eppendorffcup angesetzt:

1 µg Gesamt-RNA	x	µl
dNTPs	2,5	µl 20 mM Stammlösung
poly T Primer (50 pmol)	5	µl 10 µM Stock
oder Zufallshexamerprimern	s.o.	
Wasser	20 - x	µl
Gesamtvolumen	27,5	µl

Ansatz für 5 Minuten auf 65°C erhitzen, danach für 1 Minute auf Eis abkühlen. Anschließend hinzugeben:

5x 1st strand buffer	10	µl
0,1 M DTT	5	µl
RNase Guard (50 U)	2	µl

Kurz abzentrifugieren dann für 2 min bei RT inkubieren. Danach hinzugeben:

Superscript II (500 U)	2,5	µl
Gesamtvolumen	50	µl

Der RT-Ansatz wurde für 10 min bei RT und danach für 50 min bei 42°C im Hybridisierungsofen inkubiert. Durch Inkubation für 15 min bei 75°C wurde die Reaktion abgestoppt. Die Proben wurden bei –80°C in kleinen Aliquots eingefroren.

3.1.6 PCR (*polymerase chain reaction*) nach Mullis (1986)

Standard-PCRs wurden wie in Sambrook et al.[114] beschrieben durchgeführt.

Typischer PCR-Ansatz:

28,5 µl	H_2O
5 µl	10x PCR-Puffer
5 µl	dNTPs 200mM
2,5 µl	*Primer* +
2,5 µl	*Primer* –
1 µl	10 % Tween 20
0,5 µl	*Taq*-Polymerase
5 µl	*Template*-DNA

touch-down-PCR-Programm:

Schritt 1	Denaturierung	94°C	2 min
Schritt 2	Denaturierung	94°C	15 s
Schritt 3	*Annealing*	x °C	15 s
Schritt 4	Elongation	72°C	2 min
Schritt 5	Elongation	72°C	2 min
Schritt 6	Kühlen	4°C	∞

Schritte 2 bis 4 wurden 11-mal wiederholt, das Programm (Schritte 1-5) wurde 3-mal durchgeführt.
x = 73, 71, 68, 65, 62, 59, 57, 54, 52, 49, 47, 45; x wurde nach jedem Zyklus kleiner.

Die PCR wurde mit der *Expand high fidelity*-Polymerase der Firma Roche durchgeführt.

3.1.7 Sequenzierung mittels Didesoxymethode nach Sanger (1977)

Sequenzierungen von bis zu 400 Nukleotiden Länge wurden an einem Kapillarsequenziergerät (Perkin Elmer) der Abteilung Virologie durchgeführt. Für eine Sequenzierung wurde die Sequenz-PCR nach folgendem Schema angesetzt:

Template DNA	1	µl	(500 ng)
Big Dye Sequenzierungsmix (Perkin Elmer)	4	µl	
5x Puffer	4	µl	
Primer	2	µl	
ad H_2O	20	µl	

Die Sequenz-PCR wurde mit folgendem Programm durchgeführt:

PCR-Programm:

Schritt 1:	Denaturierung	30 sec	96 °C
Schritt 2:	Denaturierung	10 sec	96 °C
Schritt 3:	*Annealing*	10 sec	50 °C
Schritt 4:	Elongation	4 min	60 °C
Schritt 5:	Elongation	10 min	60 °C
Schritt 6:	kühlen	∞	4 °C

Schritt zwei bis vier wurden zyklisch 25-mal wiederholt.

Nach der Sequenz-PCR wurde der Ansatz mit 80 µl Dextranblau versetzt und in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Es schließt sich eine Ethanolpräzipitation an. Das blau gefärbte Pellet wurde in 20 µl TSR-Puffer (Perkin Elmer) aufgenommen, für 3 min bei 95°C denaturiert, durch Vortexen gelöst und weitere 2 min bei 95°C denaturiert. Nach kurzem Abzentrifugieren konnte die Probe im Sequenziergerät ausgewertet werden.

3.1.8 Phenol-Chloroform-Extraktion

Um Nukleinsäurelösungen von Proteinen zu reinigen, wurde die Lösung mit demselben Volumen Phenol versetzt und anschließend ausgeschüttelt. Um die Phasen zu trennen, wurde der Ansatz für 3 min bei 13000 rpm abzentrifugiert. Es bildete sich eine obere wässrige und eine untere organische Phase. Bei kleinen Volumina wurde das Volumen der wässrigen Phase auf mindestens 150 µl

aufgestockt, da das Abnehmen der wässrigen Phase meist mit Verlusten verbunden war. Diese konnten so minimiert werden. Die Proteine bildeten eine Interphase aus, die nicht mit abgenommen wurde. Die obere, wässrige Phase wurde überführt und in einem neuen Eppendorfgefäß mit demselben Volumen Phenol/Chloroform (1 : 1) ausgeschüttelt. Es wurde erneut zentrifugiert (siehe oben) und die wässrige Phase anschließend in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit einem Volumen Chloroform versetzt. Der Ansatz wurde erneut ausgeschüttelt und abzentrifugiert. Die Nukleinsäuren wurden dann aus der wässrigen Phase gefällt (siehe 4.1.9.) und in einem definierten Volumen TE oder Aqua bidest. aufgenommen.

3.1.9 Alkoholpräzipitation

Um Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen zu fällen, wurde der Lösung das 2,5-fache Volumen 96 % Ethanol oder das 0,6-fache Volumen Isopropanol und 0,1 Vol. 3 M Na-Acetat, pH 5,2 hinzugegeben, gut gemischt und 20 min inkubiert. Die Fällung erfolgte bei RT oder bei -20°C. Dabei gilt: je höher die Temperatur, desto geringer ist die Ausbeute, aber umso weniger Salze fallen mit aus. Anschließend wurden die Nukleinsäuren 15 min bei 13000 rpm pelletiert und einmal mit 1 Vol. 70 % Ethanol (5 min 13000 rpm) gewaschen. Das Pellet wurde bei 37°C luftgetrocknet und anschließend in einem geeigneten Volumen TE oder Aqua bidest. aufgenommen.

3.1.10 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte durch Messung bei 260 nm oder durch Abschätzung der Menge auf einem Agarosegel. Bei der photometrischen Bestimmung entspricht eine OD_{260} von 1,0 folgenden Nukleinsäuremengen:

Doppelsträngige DNA:	50	µg/ml
Einzelsträngige DNA:	37	µg/ml
Einzelsträngige RNA:	40	µg/ml

Nukleinsäurekonzentration = $O.D._{260} * $ Verdünnungsfaktor $*$ Multiplikationsfaktor

Die Mengenabschätzung über ein Agarosegel erfolgte im Vergleich mit Standardproben.

3.2 Zellkultur

3.2.1 Kultivierung von humanen Zellen

HFF, HEK293, HUVEC, U373MG und RPE-1 wurden im Brutschrank bei 37°C, 90 % relative Luftfeuchtigkeit und 5 % CO_2-Gehalt kultiviert. Die Zellen wurden in Medien entsprechend der Angaben in 2.13.1.2 kultiviert. Zur Zellvermehrung wurden konfluente Flaschen im Verhältnis 1:3 (je nach Zelltyp auch höher) gesplittet. Dazu wurde das Medium abgenommen, anschließend zweimal mit PBS/EDTA (Verhältnis 50:1) gewaschen. Die Zellen wurden mit Trypsin / PBS/EDTA im Verhältnis 1:1 abgelöst, mit frischem Medium vermischt und auf neue Kulturgefäße verteilt.

3.2.2 Langzeitlagerung von humanen Zellen

Wenn mehr Zellen vorhanden waren als in nächster Zeit benötigt, wurden die überzähligen Zellen eingefroren. Dazu wurden die Zellen für 5 min bei 1200 rpm pelletiert und anschließend in Einfriermedium (Medium mit 10 % DMSO 20 % FCS) aufgenommen. Danach wurden sie in kleinen Aliquots in Kryoröhrchen überführt und in Zellstoff verpackt bei -20°C ÜN gelagert. An nächsten Tag wurden sie auf -75°C abgekühlt und ein paar Tage später in flüssigen Stickstoff für die Langzeitlagerung überführt.

3.2.3 Infektion von HFF mit HCMV

Zu konfluenten HFF wurde, entsprechend der im jeweiligen Experiment geforderten m.o.i. (*multiplicity of infection*), eine bestimmte Virusmenge (mit Medium verdünnt) hinzugegeben. Anschließend wurde 15 - 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde das infizierte Zellkulturgefäß für 2-mal 20 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Dieser Schritt erhöhte die Infektionseffizienz ca. um den Faktor 10.

3.2.4 Herstellung eines Virusstocks aus Kulturmediumüberstand

Der Zellkulturüberstand wurde 5 – 7 Tage nach Infektion geerntet. Dazu wurden die Medienüberstände aus allen Flaschen in 50 ml-*bluecaps* gesammelt und bei 1200 rpm für 10 min abzentrifugiert, um Zellreste zu entfernen. Die Überstände wurden auf autoklavierte Zentrifugenröhrchen verteilt und in der Ultrazentrifuge bei 23000 rpm und 4°C für eine Stunde zentrifugiert. Hierbei musste darauf geachtet werden, dass die Zentrifugenröhrchen austariert waren (± 0,01 g). Die Überstände wurden verworfen und die Pellets in wenig MEM (z.B. 200 µl) auf Eis vorsichtig durch Schwenken gelöst. An dieser Stelle konnten auch die zellfreien Überstände (siehe 4.2.3.) hinzugegeben werden. Die gelösten Pellets wurden in einem 15 ml-*bluecap* vereinigt und das Volumen abgeschätzt. Zum Medium wurde die gleiche Menge Sucrosephosphat-Puffer hinzugegeben und gemischt. Aliquots wurden in Einfrierröhrchen bei –75°C eingefroren.

3.2.5 Titerbestimmung eines Virusstocks

Es wurde eine T75 Flasche konfluenter HFF abtrypsiniert und auf eine 96-*well* Platte gegeben. Am folgenden Tag wurde eine Verdünnungsreihe (10er-Schritte) hergestellt. Dabei wurden 50 µl des Virusstocks zu 450 µl MEM in ein Eppendorfgefäß gegeben, kurz gemischt und davon 50 µl in ein weiteres Eppendorfgefäß zu 450 µl MEM gegeben usw.. Von jeder Verdünnungsstufe wurden je 3x 100 µl auf die 96-*well* Platte pipettiert, von der zuvor das Medium abgenommen worden war. Die Platte wurde für 15 min unter der Sterilbank inkubiert. Um die Infektionseffizienz zu erhöhen, wurde im Anschluss 2x 15 min bei 2000 rpm zentrifugiert und die Platte zwischendurch gedreht. Es folgte die Inkubation im Brutschrank für 5 Tage. Dann wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit 100 µl kaltem MeOH (alternativ MeOH : Aceton = 1 : 1) auf der Platte fixiert. Danach wurde das MeOH abgesaugt und die Platte luftgetrocknet. Darauf wurde 3x mit 0,01M PBS (100 µl) gewaschen. Es folgte die Inkubation für 30 min mit dem ersten Antikörper Maus Anti-pp65 (UL83) (Klon AAC10 der Firma DACO; 50 µl, 1:50 verdünnt mit PBS / 1 % BSA). Danach wurde erneut 3x mit 0,01 M PBS gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper Anti-Maus konjugiert mit HRP (50 µl, 1:100 verdünnt mit PBS / 1 % BSA),

ebenfalls für eine halbe Stunde. Danach wurde 3x mit 0,01 M PBS gewaschen. Es folgte die Färbereaktion mit je 50 µl AEC-Farbstoff.

3.3 Transfektion eukaryotischer Zellen

3.3.1 Calcium-Phosphat-Methode

HFF wurden einen Tag vor dem Experiment dünn aufgesät. Drei Stunden vor dem Experiment wurde 25 µM Chloroquin ins Medium gegeben. Am darauf folgenden Tag wurden in ein 15 ml Falconröhrchen 210 µl 0,1x TE, 250 µl HBS und 10 µl Plasmid-DNA pipettiert. Der Ansatz wurde abzentrifugiert und unter Schütteln wurden tropfenweise 31 µl 2M $CaCl_2$ zugegeben und geschwenkt. Nach einer Stunde Inkubation bei RT wurden 5 ml MEM zum Ansatz gegeben und alles anschließend auf die Zellen pipettiert. Es folgte eine Inkubationszeit für 3 – 4 h bei 37°C (Adsorptionszeit). Anschließend wurde mit PBS, danach mit MEM gewaschen und anschließend frisches Medium dazugegeben. Dann wurden die Zellen im Brutschrank für 1 – 2 Tage inkubiert bis zur Versuchsauswertung.

3.3.2 Superfect™-Methode (Qiagen)

HFF wurden einen Tag vor der Transfektion auf 6 mm-Schalen gesplittet. Am nächsten Tag wurde gemäß den Herstellerangaben DNA zu den Zellen gegeben. Dazu wurden 20 µl des Superfect-Reagenz hinzugegeben und gut gemischt. Der Ansatz wurde für 5 – 10 min inkubiert. In dieser Zeit bildete sich der Superfect-Komplex aus. In der Zwischenzeit wurden die HFF mit 4 ml PBS gewaschen. 1 ml MEM (mit Zusätzen) wurde zu dem Transfektionskomplex dazugegeben, kurz gemischt und anschließend sofort auf die Zellen gegeben. Nach 3 – 4 h Inkubationszeit wurden die Zellen 1-mal mit PBS gewaschen und schließlich mit neuem MEM im Brutschrank inkubiert.

3.4 Immunhistochemische Färbung von Zellen

3.4.1 Proteolytischer Pepsinverdau zur Abspaltung des F_c-Teils von Antikörpern

Kaninchenseren wurden mit PBS auf eine Konzentration von 3 mg/ml verdünnt und gegen Acetatpuffer pH 4,5 bei 4°C ÜN dialysiert. Dazu wurde in den Deckel eines 2 ml Eppendorffgefäßes ein Loch gebrannt und zwischen Deckel und Gefäß eine semipermeable Membran (Ausschlussgröße 8 kDa) eingeklemmt. Nach dem Dialyseschritt wurde photometrisch (A_{280}) die Antikörperkonzentration gemessen. Es wurden je 2 mg/ml des Antikörpers in einem 200 µl Ansatz durch Zugabe von 0,1 mg/ml Pepsin (Enzym/Substratverhältnis 1 : 20) bei pH 4,5 und 37°C enzymatisch gespalten. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 40 µl Tris pH 8 abgebrochen. Der Ansatz wurde durch einen erneuten Dialyseschritt gegen 1 l PBS entsalzt. Die Antikörpersuspension wurde nach der Dialyse in neue Eppendorfgefäße aliquotiert und bei -20°C gelagert.

3.4.2 Fixierung und Immunfärbung von Zellen

Zellen für die Immunfärbung wurden auf runde Deckgläschen in 24-*well*-Platten angelegt. Waschschritte wurden im 24-*well* durchgeführt. Um das Volumen nicht zu groß werden zu lassen, wurden Antikörperverdünnungen in Tropfenform (30 µl) auf Parafilm gespottet und die Deckgläschen invertiert auf die Tropfen gelegt.
Die Fixierung erfolgte mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS für 10 min bei RT. Danach wurde 2x mit PBS ohne EDTA für 5 Minuten gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 0,2 % Triton X-100 / PBS für 3 Minuten auf Eis permeabilisiert. Anschließend wurde erneut 3-mal mit PBS für 5 min gewaschen. Bei Immunfärbungen auf infizierten Zellen wurde für eine halbe Stunde mit humanem Serum HCMV-seronegativer Personen vorinkubiert. Dieser Schritt entfiel bei Färbungen nach transienter Expression. Danach wurde der 1. AK in PBS/ 1 % BSA in geeigneter Verdünnung für eine Stunde auf den Zellen inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS ohne EDTA erfolgte die Inkubation mit dem 2. Antikörper. Diese erfolgte ebenfalls 1 h in geeigneter Verdünnung in PBS/ 1 %

BSA (bei schlechtem Signal / Hintergrund Verhältnis, wurde zu den Antikörperverdünnungen zusätzlich 10 % humanes Serum dazugegeben) oder in 10 % Serum des Tieres aus dem der 2. Antikörper stammte. Nach der 2. Antikörperinkubation wurde einmal mit PBS ohne EDTA gewaschen. Danach wurden die Zellkerne unspezifisch mit DAPI (1 : 10000 in PBS) 3 min gegengefärbt. Anschließend wurden 3x 5 min mit PBS ohne EDTA gewaschen. Das Deckglas wurde anschließend aus dem 24-*well* entnommen und mit der Oberseite nach unten auf einen Tropfen (10 µl) Mounting-Medium auf einen Objektträger gelegt. Die Immunfärbungen wurden mit dem Zeiss Mikroskop Axioskop-2 betrachtet. Die Aufnahmen mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen bei unterschiedlichen Wellenlängen wurden mit Hilfe der Software Axiovision 3.1 von Zeiss durchgeführt.

3.5 Proteinchemische Methoden

3.5.1 Western Blot

Zellen wurden mit Zellschabern von den Kulturschalen gelöst und in 100 µl PBS zentrifugiert. Danach wurden die Gesamtzellpellets in 10 µl PBS gelöst und anschließend mit 10 µl 2x-SDS-*Loading-buffer* versetzt und für 10 min bei 95°C aufgekocht. Bei GPCR-Proteinen wurde nur auf 42°C erhitzt, da sich diese Proteine nach Aufkochen nicht mehr lösen und als hochmolekulare Komplexe in der Ladetasche zurückbleiben und sich deshalb nicht im Gel auftrennen lassen). Wenn die Extrakte nach dem Aufkochen zu viskös waren, wurden sie 2-mal für 10 min bei -70°C eingefroren und sofort wieder auf 95°C (bei GPCR 37°C) erhitzt. Danach konnten die Proteinproben in die Taschen des 10 %-igen SDS-Polyacrylamidgeles geladen werden. Das Gel lief eine Stunde bei 170 V. Anschließend wird das Gel für 5 min in Blotpuffer gelegt und das Sammelgel abgeschnitten. Es folgte der Semidry-Blot.

Semidry Blot

Zuerst wurden drei Lagen Whatman-Papier in der Größe des Gels mit Blotpuffer befeuchtet und auf die untere Metallplatte gelegt. Darauf wurde das Gel gelegt. Es folgte die ebenfalls in den Dimensionen des Gels zurecht geschnittene Nitrocellulosemembran (Hybond ECL; Amersham Pharmacia). Diese wurde zuvor kurz in H_2O und dann mit Blotpuffer befeuchtet. Darauf wurden wiederum 3 Lagen Whatman gelegt. Es wurde darauf geachtet, dass sich zwischen den Schichten keine Luftblasen bildeten. Diese wurden mit einer Glaspipette geglättet. Es wurde 30 – 60 min bei 2 mA / cm^2 geblottet.

3.5.2 Coomassie-Färbung

Die Färbung mit Coomassie (Brilliant) Blue R-250 ist ein häufig verwendetes Verfahren zur Visualisierung von Proteinen nach einer Polyacrylamid-gelelektrophorese. Die Coomassie-Färbung kann zwar zur Quantifizierung der Proteine verwendet werden, färbt aber Polypeptide mit vielen basischen Resten (Lysin, Arginin) verstärkt an. Vor der Färbung mit Coomassielösung wurde das Gel kurz mit demin H_2O gewaschen. Das Gel wurde ca. 20 min bei RT in der Färbelösung geschwenkt. Nach der Färbung wurde die Coomassielösung abgekippt und das Gel solange mit demin H_2O gespült, bis das Wasser sich nicht mehr anfärbte. Mit einer ÜN-Inkubation in 10 %-iger Essigsäurelösung wurde unspezifisch gebundenes Coomassie nahezu vollständig entfernt. Damit die Färbelösung nicht zu oft gewechselt werden musste, wurde nasser Zellstoff mit in die Schale gegeben, der das überflüssige Coomassie aufsaugte. Nach Entfärbung wurde das Gel mit H_2O demin gespült und in der Gel-Doc Anlage (Bio-Rad) photographiert.

3.5.3 Immunochemischer Nachweis mittels ECL

Die Membran wurde zum Absättigen der Membranbereiche, die nicht mit Protein bedeckt waren, in Blocklösung (5 % (w/v) Milchpulver; 0,1 % Tween 20 in PBS) gelegt. Dieser Vorgang wurde mindestens 30 min bei RT unter Schwenken durchgeführt. Danach wurde mit dem ersten Antikörper in Blocklösung verdünnt für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde insgesamt 3-mal für 10 min mit Blocklösung gewaschen, bevor der zweite HRP-konjugierte Antikörper (in Blocklösung) für 45 min zugegeben wurde. Danach wurde 3-mal mit TBS gewaschen. Nach dem letzten Waschschritt wurde der Filter mit Whatmanpapier kurz abgetupft und die Membran mit der Proteinseite nach oben in eine Schale gelegt. Dann erfolgte der Proteinnachweis mittels ECL-Detektionsreagenz (Amersham Pharmacia). Dazu wurden die beiden Kit-Komponenten im gleichen Verhältnis gemischt (5 - 6 ml Gesamtvolumen) und für 1 min auf die Membran gegeben. Nach kurzem Schwenken wurde die Membran abgetupft und einem Röntgenfilm für 1, 5, 60 min in einer Expositionskassette exponiert.

3.5.4 Proteolytischer Abbau von Proteinen im PAGE

Hierfür wurde das Protokoll der Sektion für Massenspektrometrie der Universität Ulm verwendet (http://www.uni-ulm.de/massenspektrometrie/). Im Gegensatz dazu wurden die lyophilisierten Proben am Ende zusätzlich in 10 µl Acetonitril / 0.1% Trifluoressigsäure (TFA) aufgenommen und mit ZipTips C18 Pipettenspitzen (Millipore) durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren für die MALDI-TOF-Massenspektrometrie vorbereitet. Die Analysen im MALDI-TOF-Massenspektrometer wurden in der Sektion für Massenspektrometrie der Universität Ulm durchgeführt.

3.6 Bakterien

3.6.1 Herstellung von Glycerinkulturen

Für die Langzeitlagerung von Bakterienkulturen wurden Glycerinkulturen hergestellt. Dazu wurde 1 ml der Bakterienflüssigkultur (LB, TYP) bei 3000 rpm für 1 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in einer Mischung aus LB-Medium und Einfriermedium (siehe Material und Methoden) 1:1 resuspendiert. Eine Bakterienkultur kann so über Jahre bei –70 °C aufbewahrt werden.

3.6.2 Herstellung kompetenter *E.coli* nach der Calciumchloridmethode

Mit einer Einzelkolonie (DH10B, TG2) wurden 2 ml LB-Medium als ÜN-kultur angeimpft und bei 37°C wachsen gelassen. Am nächsten Morgen wurden 100 ml LB mit 1 – 2 ml der Übernachtkultur angeimpft. Die Kultur wurde bis zu einer OD_{600} von 0,3 – 0,4 bei 37°C inkubiert (1 – 1,5 h) und anschließend kurz auf Eis gestellt. Die Kultur wurde dann auf 50 ml Falcontubes verteilt und 5 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 50 ml 0,1 M $MgCl_2$ resuspendiert und erneut bei 3000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen, das Sediment in 1 ml 50 mM $CaCl_2$ /15 % Glycerin aufgenommen und für 20 min auf Eis inkubiert. Danach waren die Bakterien kompetent für die Aufnahme von Plasmiden oder wurden für spätere Versuche in Aliquots zu 100 µL bei –70 °C eingefroren.

3.6.3 Transformation

DNA wurde zu den Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen für 20 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 2 min bei 42°C. Danach wurden 800 µl LB-Medium hinzugegeben und für 20 min bei 37°C inkubiert. Um die Bakterien zu konzentrieren, wurde für 1 min bei 3000 rpm abzentrifugiert. Anschließend wurde der

Überstand abgeschüttet und das Pellet mit der verbleibenden Flüssigkeit resuspendiert und ausplattiert.

3.6.4 Expression von MBP-Fusionsproteinen in *E.coli*

5 ml ÜN-Vorkulturen der Expressionskonstrukte in LB-Medium wurden mit dem Antibiotikum Ampicillin bei 37°C im Schüttler ÜN herangezogen. Mit der Vorkultur wurde eine 500 ml Expressionskultur inokuliert und bis zu einer OD_{578} von 0,5 bei 37°C im Schüttler kultiviert und anschließend im 4°C-Raum abgekühlt. Nach 30 min wurde der *rha*-Promotor mit 0,2 % Rhamnose induziert. Die Expressionskultur wurde bis zu einer OD_{578} von ca. 1,7 - 2,0 bei 23°C im Schüttler weiter kultiviert, in Zentrifugenbecher überführt und bei 4°C für 20 min mit 4000 rpm zentrifugiert. Der klare Überstand wurde verworfen, das Bakterienpellet bei 4°C bis zur Aufreinigung gelagert.

3.6.5 Aufreinigung von MBP-Fusionsproteinen

Alle folgenden Arbeitsschritte wurden im 4°C Raum oder auf Eis durchgeführt. Nachdem die Expression von MBP-Fusionsproteinen, wie in Kapitel (4.6.4) beschrieben, durchgeführt worden war, wurde das Bakterienpellet in 4 ml *Column buffer* (bei 500 ml Expressionskultur) resuspendiert. Zum Schutz vor Degradation wurden Proteaseinhibitoren (1/20 des Volumens; Complete EDTA free (Roche)) hinzu pipettiert. Die Bakterien wurden mit der *French Press* bei 800 bzw. 1500 PSI (je nach Größe der verwendeten Patrone) in drei Durchgängen aufgeschlossen. Das Bakterienlysat wurde für 90 min bei 6000 rpm in der Zentrifuge sedimentiert. Der Überstand wurde zur weiteren Aufreinigung 1:2 mit *column buffer* verdünnt und an Amylose-Resin-Kügelchen (New England Biolabs) gebunden. Dieses erfolgte durch über Kopf-Schütteln für 60 min bei 4°C. Aufgrund der hohen Affinität des Maltosebindeproteins zur Amylose (Affinitätschromatographie), wurde das

Fusionsprotein an die Kügelchen gebunden, während die übrigen Proteine im Überstand verblieben. Um die MBP-*beads* vom Überstand zu trennen, wurde das Gemisch kurz bei 1000 rpm abzentrifugiert und anschließend der Überstand verworfen. Die Amylose-Kügelchen wurden dreimal mit *column buffer* gewaschen, wobei das Gesamtvolumen das 12-fache der Kügelchen betrug (in der Regel 2 ml Kügelchen, 24 ml *Column buffer*). Nach den Waschschritten wurde dreimal mit je 1 ml Elutionspuffer eluiert. Dieser Puffer enthielt Amylose, die in einem kompetetiven Prozess das MBP von den Amylose*beads* verdrängte. Das MBP-Fusionsprotein wurde dadurch von den Amylose-Kügelchen abgelöst und in 1 ml Aliquoten bei -20°C gelagert. Die Elutionen wurden in einer SDS-PAGE auf ihren Gehalt an MBP-Fusionsprotein und dessen Molekularmasse überprüft. Um die Konzentration des aufgereinigten Fusionsproteins in der Elution abzuschätzen, wurde ein Bradford-Test mit BSA-Standard nach Angaben des Herstellers (Bio-Rad) durchgeführt.

3.6.6 Abspaltung des US28e-Proteins vom MBP-Fusionspartner

Ein 1 ml-Aliquot der MBP::US28e Elution wurde aufgetaut und mit 4 mM $CaCl_2$ versetzt. Dies entsprach einer freien $CaCl_2$-Konzentration von 2 mM, da der Elutionspuffer 2 mM EDTA enthielt. Die Spaltung wurde in der Regel bei 22°C ÜN mit 2 Einheiten (2U) Faktor Xa pro ml MBP::US28e Elution durchgeführt.

3.7 RANTES-Verdrängungsversuch

HFF oder HUVEC wurden einen Tag vor Beginn des Experiments in 24-*well*-Platten ausgesät. Die konfluenten Zellen wurden, wenn nicht anders beschrieben, mit MOI=1 infiziert und 3 Tage nach Infektion für den Versuch verwendet. Das Experiment wurde im 6-fachen Ansatz durchgeführt, 3-mal wurde nicht markiertes RANTES im hundertfachen Überschuss zum markierten Liganden zugegeben (hot / cold), dreimal nicht (hot). Der unmarkierte Ligand diente als interne Kontrolle für eine spezifische Rezeptorbindung. Alle weiteren Schritte wurden bei 4°C durchgeführt.

Zu Beginn des Versuchs wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und für 15 min mit 200 µl *binding buffer* vorinkubiert. Danach folgte eine vierstündige Inkubation mit ^{125}I-RANTES. Die Hot/Cold Proben wurden 15 min mit nicht markiertem RANTES vorinkubiert. Nach der Inkubation wurde jedes *well* 2-mal mit 500 µl PBS gewaschen, um unspezifisches gebundenes RANTES zu entfernen. Spezifisch gebundenes RANTES wurde mit 500 µl 0,5M NaOH abgewaschen und in speziellen Küvetten gesammelt. Die verbleibende Radioaktivität wurde mit einem weiteren PBS-Waschschritt ebenfalls in die Küvetten überführt. Die γ-Strahlung wurde in einem Gammazähler (Minaxi X Auto-Gamma 5000; Packard, Downers Grove, IL, USA) in der zentralen Einrichtung Isotopenanwendungen der Universität Ulm gemessen.

3.8 Bestimmung von Inositolphosphaten in Zellkulturüberständen

3.8.1 Herstellung der DOWEX-Säulen

100g Dowex-1 Harz (100-200 mesh, Cl^- Form, Sigma, 1x8-200) wurden in 500 ml 1M NaOH aufgenommen. Eine Stunde lang wurde ca. alle 5 min mit einem Glasstab umgerührt. Nach der Sedimentation des DOWEX wurde der Überstand dekantiert. Diese Schritte wurden 3-mal wiederholt. Anschließend wurde 500 ml 1M Ameisensäure dazugegeben. Nach dem Farbumschlag nach gelb wurde erneut eine Stunde lang alle 5 min umgerührt. Nach erneuter Sedimentation wurde der Überstand dekantiert. Danach wurde 2x mit Aqua bidest. gewaschen. Das DOWEX-Harz wurde in 150 ml Aqua bidest. aufbewahrt.

3.8.2 Aufreinigung von Inositolphosphaten in Zellkulturüberständen

HFF wurden in 6-*well*-Platten ausgesät und wie oben beschrieben infiziert. Fünf Stunden nach Infektion wurde das Medium abgenommen und die Zellen wurden in einer 48-stündigen Inkubationszeit mit *labeling-medium* markiert (DMEM ohne Serum 1 % L-Glutamin, 1% nicht essentielle Aminosäuren, 1 % Penicillin/Streptomycin, 3 µCi of D-myo-[2-3H]inositol / ml). Danach wurde das *labeling-medium* abgenommen und die Zellen 2-mal mit 2 ml vorgewärmten DMEM (37°C) ohne Zusätze gewaschen und

anschließend für 10 min mit 1 ml desselben Mediums, versetzt mit 10 mM LiCl/*well*, im Brutschrank (95 % Feuchtigkeit, 5 % CO_2) inkubiert.
Die Inkubation wurde durch Entfernen des Mediums und zweimaligem Waschen mit 2 ml vorgewärmtem PBS/EDTA abgestoppt. Die Zellen wurden in 1 ml Zelllysispuffer (nonenzymatic cell dissociation solution (C-5914; Sigma)) für 1 min im Brutschrank abgelöst. Inositolphosphate wurden aus den Zellen extrahiert wie in[32] beschrieben. 1,5 ml eines Chloroform-Methanolgemisches (1 : 2 vol) wurde zu 1 ml der Supension abgelöster Zellen gegeben. Die Proben wurden gut gemischt und anschließend für 10 min bei RT inkubiert. Danach wurde 0,5 ml Chloroform hinzugegeben und anschließend bei 500g und Raumtemperatur für 10 min zentrifugiert, um die Phasentrennung zu beschleunigen. Je ein Aliquot (1,6 ml) der oberen wässrigen Phase wurde auf eine DOWEX-Säule (siehe 4.8.1) gegeben. Das DOWEX wurde zuvor in die Format-Form wie beschrieben umkristallisiert[23].
Inositol, Glycerinphosphoinositol und Inositolphosphate wurden eluiert nach [23] Die Proben (je 3 ml) wurden zu je 15 Scintillationsflüssigkeit (Quicksafe A; Zinser Analytic, Frankfurt, Germany) gegeben und die Radioaktivität wurde mittels eines γ-Zählers quantifiziert.

3.9 Aufreinigung von Proteinen mit der Tandem-Affinitätsreinigung (TAP)

Bei dieser Methode wird der sogenannte TAP-*Tag* an das gewünschte Protein angehängt. Mit Hilfe dieses *Tags,* das aus zwei Peptid- oder Protein-*Tag*s besteht, sollen in zwei aufeinander folgenden Affinitätschromatographieschritten Interaktionspartner des „Köderproteins“ nativ zusammen mit dem jeweiligen Protein aufgereinigt werden. Diese Tandem-Strategie vermindert die Gefahr der Identifizierung falsch positiver Proteine. Gleichzeitig ist die Aufreinigung schonend, wodurch auch schwach gebundene Proteine mit aufgereinigt werden. Durch Expression der TAP-*Tag*-Fusionsproteine im authentischen, zellulären Kontext ist es möglich, die Dynamik der Interaktion eines Proteins mit seinen Bindungspartnern zu untersuchen.

In dieser Arbeit wurde mit zwei unterschiedlichen TAP-*Tags* gearbeitet. In dem rekombinanten Virus TB40E US28-TAP besteht das *Tag* aus Protein A (Zellwandprotein von *Staphylococcus aureus;* bindet an IgG-Proteine von Säugern) und aus dem *Calmodulin binding peptide* (CBP) (bindet an Calmodulin; benötigt Ca^{++} als Cofaktor). Die beiden Bestandteile des *Tags* werden durch eine TEV-Protease-stelle voneinander getrennt.

Mittels retroviralem Transfer wurde TAP-US28 stabil in RPE-1-Zellen eingebracht. Hierbei war das TAP-Konstrukt aminoterminal mit US28 fusioniert. Das TAP bestand aus Protein A und einem Flag-*Tag*, die durch zwei aufeinander folgende TEV-Proteasestellen voneinander getrennt wurden.

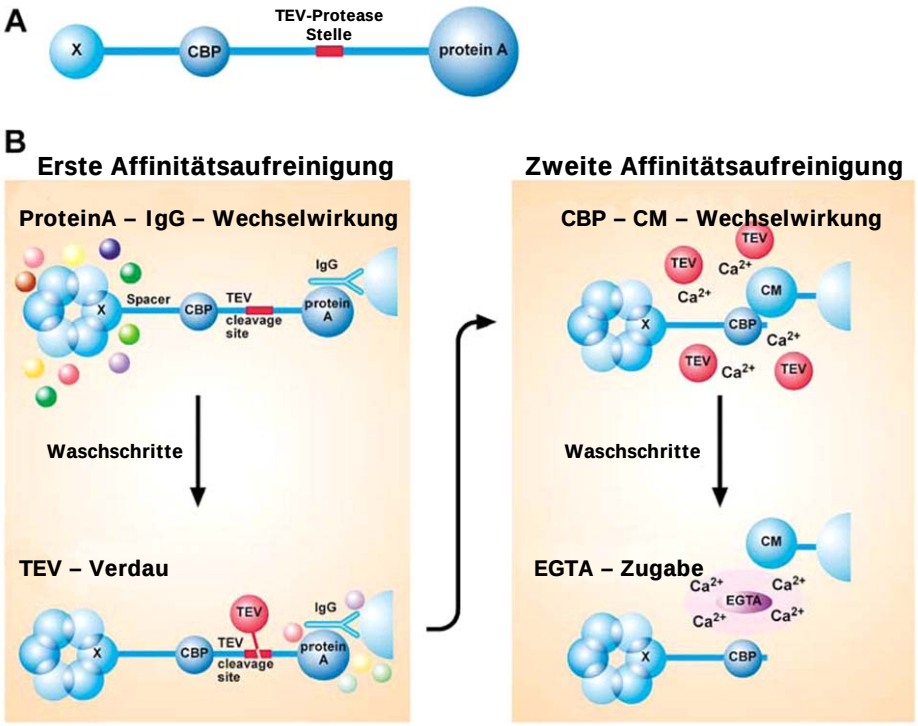


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Tandem Affinity Purification (TAP)

(A) Struktur des TAP-*Tags*. (B) TAP-Strategie. Ein Proteinkomplex, der ein TAP-*Tag* enthält, wird über zwei unabhängige, aufeinanderfolgende Aufreinigungsschritte über IgG- und Calmodulinkügelchen aufgereinigt. Im ersten Schritt wird das immobilisierte TAP-*Tag* durch Abspaltung des Protein A (TEV) wieder in Lösung gebracht. Im zweiten Aufreinigungsschritt wird die calciumabhängige Bindung von CBP an Calmodulin durch EGTA-Zugabe erniedrigt. CBP, *Calmodulin binding peptide*; CM, Calmodulin; TEV, *Tobacco Etch Virus Protease*; Quelle: Bauer et al.[8]

Das Medium wurde von den Zellen abgenommen, anschließend wurden diese mit PBS gewaschen und dann in einem kleinen Volumen PBS abgekratzt und in Eppendorfgefäße überführt. Es erfolgte ein Zentrifugationsschritt um die Zellen zu sedimentieren. Das Pellet wurde in 150 µl Lysispuffer auf Eis resuspendiert. Danach wurde 20 min bei 40 krpm zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurden 40 µl IgG-*beads* 3-mal mit je 200 µl P1 gewaschen (3000 rpm, 4°C). Der Zellüberstand wurde auf die IgG-*beads* gegeben (evtl. P1 zur Volumenvergrösserung dazugeben) und für 2 h bei 4°C über Kopf inkubiert. Der Protein A-Teil des TAP-*Tags* bindet an IgG (siehe Abbildung 8B). Der nicht gebundene Überstand wurde verworfen. Die IgG-*beads* wurden 5-mal mit 500 µl P2 3-mal mit 500 µl P3 gewaschen. Es wurden 8 µl TEV in 150 µl P3 zu den *beads* gegeben und 1 h bei RT, über Kopf inkubiert. In der Zwischenzeit wurden Calmodulin(CaM)-*beads* (20 µl) 2x mit 200 µl P4 gewaschen Nach der Inkubationszeit wurde der Überstand aus dem TEV-Verdau mit 50 µl P5 gemischt und dann mit den CaM-*beads* für 2 h über Kopf bei 4°C inkubiert. Der ungebundene Überstand wurde verworfen. Das gebundene Protein wurde mit 20 µl P6 von den CaM *beads* eluiert (1. Elution). Dieser Schritt wurde wiederholt (2. Elution).

3.10 Herstellung einer stabilen Zelllinie

Das retrovirale Gentransfersystem umfaßt zwei Komponenten, den retroviralen Vektor und die Verpackungszelllinie (Abb. 8). Der retrovirale Vektor ist ein Plasmid, das nicht für retrovirale Proteine kodiert, sondern nur über das Verpackungssignal Psi und die retroviralen 5´- und 3´-LTR verfügt, die eine Insertionsstelle für das zu übertragende Gen und gegebenenfalls einen Selektionsmarker flankieren. Die Verpackungszelllinie stellt die retroviralen Proteine (pol, gag, env) zur Verfügung, die für die Verpackung der Vektor-RNA und somit für die Erzeugung retroviraler Partikel notwendig sind. Die Verpackungszelllinie exprimiert zwar die retroviralen Strukturproteine, bei diesem Helfergenom ist jedoch das Verpackungssignal Psi deletiert, sodass die virale RNA, die in der Verpackungszelllinie von dem Helfergenom abgelesen wird, nicht in Virionen verpackt wird.

Je nach Art der vom Helfergenom exprimierten, retroviralen Hüllproteine wird zwischen ecotropen (infizieren nur Mäuse/Ratten) bzw. amphotropen (weites Wirtsspektrum, auch Mensch) Verpackungszelllinien unterschieden.

Das G-Glykoprotein (VSV-G) des *Vesicular Stomatitis Virus* (VSV) kann verwendet werden, um murine Retroviren mit einem breiteren Wirtsbereich auszustatten. Darüber hinaus weisen VSV-G-Pseudotypretroviren eine höhere Partikelstabilität auf, die eine Konzentrierung der infektiösen Viruspartikel durch Ultrazentrifugation erlaubt.

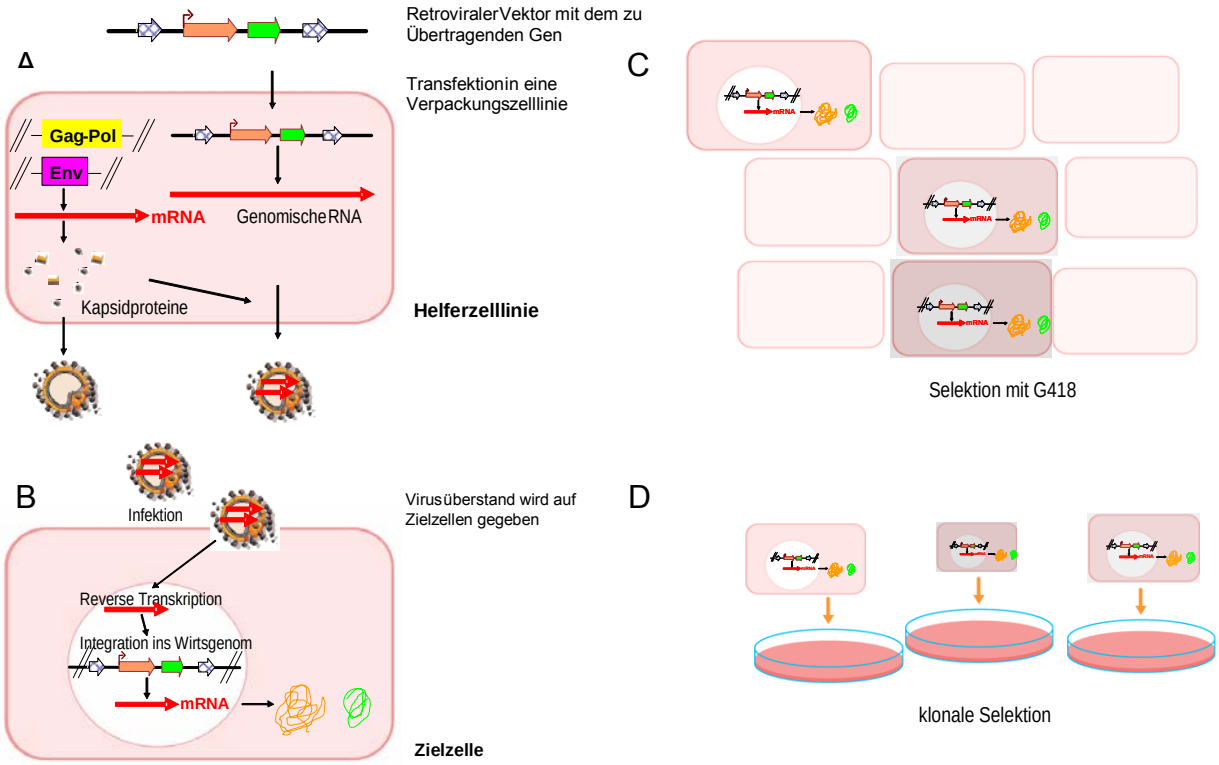


Abbildung 9: Herstellung rekombinanter replikationsdefekter Retroviren.

(A) Der retrovirale Vektor wird mit dem zu übertragenden Gen in die Verpackungszelllinie transfiziert, die die retroviralen Strukturproteine konstitutiv exprimiert. Vom retroviralen Vektor werden Transkripte hergestellt, die sowohl translatiert als auch als genomische RNA mit Hilfe der viralen Strukturproteine zu neuen Virionen verpackt werden, welche von der Verpackungszelllinie abgegeben werden. (B) Der Überstand der Verpackungslllinie wird abgenommen und mit den darin enthaltenen Retroviren auf die Zielzellen gegeben. Bei erfolgter Infektion wird das RNA-Genom in DNA umgeschrieben und in das Wirtsgenom integriert. (C) Aufgrund der ebenfalls transferierten Neomycinresistenz können die Zellen selektiert werden, bei denen die gewünschte Gensequenz ins Genom integriert wurde. (D) Nachdem aus Einzelzellen Kolonien dieses Klones gewachsen sind, werden diese auf verschiedene Gefäße verteilt und später charaktierisiert.

Nach Transfektion der Verpackungszellline mit dem retroviralen Vektor werden von diesem Transkripte hergestellt, die sowohl translatiert als auch als genomische RNA in neue Virionen verpackt werden, welche von der Verpackungszelllinie abgegeben werden. Mit Hilfe dieser Virionen, die in der Regel replikationsdefekt sind, können Zielzellen infiziert werden, in deren Genom sich das von der übertragenen retroviralen RNA umgeschriebene Provirus stabil integriert. Dort wird das zu übertragende Gen sowie gegebenenfalls der Selektionsmarker exprimiert.

3.10.1 Generierung des retroviralen Transfervektors

Der retrovirale Vektor pRAV-Flag[61] wurde von Xiudong Liu (University of Colorado, Boulder, CO, USA) zur Verfügung gestellt. US28 wurde aus dem Vektor p571 ausgeschnitten und in den Vektor pRAV-Flag kloniert. Da dieser Vektor kein Antibiotikaresistenzgen zur späteren Selektion in humanen Zellen enthielt, wurde ein Neomycin-GFP Fusionsprotein eingefügt. Dieses wurde zuvor mittels zweier PCR-Schritte hergestellt (Primer siehe oben).Es wurde *XhoI / PmeI* in den Vektor eingefügt.

3.10.2 Generierung einer stabilen Zelllinie

Um eine Zelllinie herzustellen, die TAP-US28 stabil exprimiert, wurde die Phoenix-Zelllinie[46] benutzt. Phoenix-Zellen sind HEK293, die die Gene gag (Proteine der inneren Kapsel; Mo-MuLV), pol (Polymerase-, Integrasefunktion; Mo-MuLV) und VSV-G (Hüllprotein von VSV) stabil exprimieren. Der Vektor p613 trug die flankierenden 5'- und 3' LTR-Bereiche, die Verpackungssequenz Psi, das TAP-US28 Konstrukt sowie ein GFP-Neomycin Fusionsprotein, das als Selektionsmarker diente. Der Bereich zwischen den beiden LTRs sollte in Retroviren eingebaut werden.
Dafür wurden Phoenix-Zellen auf eine 6-*well*-Platte ausgesät und ÜN inkubiert. Am nächsten Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Das neue Medium war mit Chloroquin (25 µM) versetzt und wurde für ca. 2 h erneut bei 37°C inkubiert. In der Zwischenzeit wurde der Transfektionsansatz nach folgendem Schema hergestellt:

	24 well	*6 well*
2x HBS (pH 7,12)	125 µl	250 µl
1x TE (pH 8,0)	110 µl - V_{DNA}	215 µl - V_{DNA}
DNA (V_{DNA})	5-10 µl	10-20 µl
$CaCl_2$	16 µl	32 µl

Die Transfektion erfolgte wie in Abschnitt 4.3.1 beschrieben. Es wurden 10 µg DNA pro 6-*well*-Ansatz verwendet. Nach 3 h Inkubation bei 37°C wurde das Medium mit dem Transfektionsansatz abgesaugt, die Zellen 2x mit PBS ohne EDTA gewaschen und mit neuem Medium versetzt. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C inkubiert, wobei alle zwei bis drei Tage der Überstand abgenommen wurde. Der Überstand wurde filtriert, um eine Kontamination mit Phoenix-Zellen zu vermeiden. Die enthaltenen Retroviren dienten der Infektion von RPE-1. Nach erfolgreicher Infektion wurde das RNA-Genom des Retrovirus in DNA umgewandelt und das DNA-Molekül zwischen den LTRs in das Zellgenom der infizierten Zelle integriert. In diesem Falle konnte man eine Grünfärbung der Zellen, aufgrund der GFP-neomycin-Expression, beobachten. Die „getroffenen“ Zellen konnten mit Hilfe der Neomycinresistenz durch Zugabe von G418 (400 µg / ml) selektiert und kloniert werden.

4 Ergebnisse

Die in den folgenden Versuchen verwendeten Viren sind in Kapitel 2.12 beschrieben.

4.1 Charakterisierung viraler GPCRs in infizierten Zellen

4.1.1 Allgemeine Bestimmung der 3'Enden viraler Transkripte für GPCRs und Sequenzvergleich zwischen dem Laborstamm AD169 und den niedrig passagierten Virusstämmen TB40E und Titan

HCMV besitzt vier Gene mit Homologien zu G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Diese sind UL33, UL78, US27 und US28. Alle vier Gene liegen in Genomabschnitten, die als bicistronische Einheiten transkribiert werden (siehe Abbildung 10). Zu Beginn dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob sich in klinischen Isolaten von HCMV, die nur sehr wenige Male in Zellkultur passagiert wurden, Unterschiede zum Laborstamm AD169 im Spleißen oder der Transkriptlänge ergaben.

Dafür wurde der Laborstamm AD169 mit dem niedrig passagierten Isolat TB40E[118] und dem Stamm Titan verglichen. Bei letzterem handelt es sich um eine monogenomische, rekombinante Variante aus einem klinischen Isolat.

Es wurden HFF mit einer MOI von 1 infiziert und 2 Tage nach Infektion die Gesamt-RNA präpariert (siehe 3.1.4).

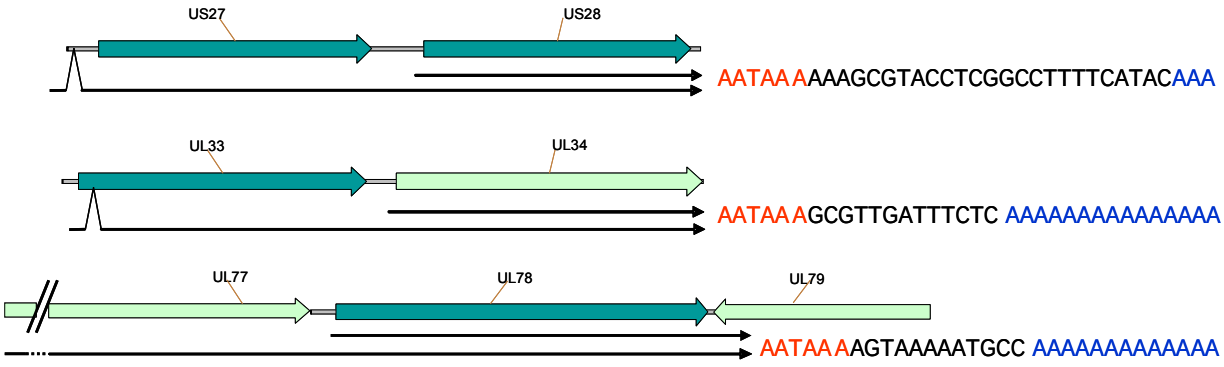


Abbildung 10: 3'-Enden der mRNA-Transkripte der HCMV-kodierten GPCRs.

Schematische Abbildungen der ORFs und der mRNA-Transkripte (links) und der 3'Enden der jeweiligen Transkripte (rechts); es sind die Polyadenylierungssignale (rot) und die in einem gewissen Abstand beginnenden Poly-A-Schwänze (blau) markiert.

Mit spezifischen Primern (US28 Anker RT, UL78, UL34 3' Anker RT (siehe 3.10) wurden die jeweiligen mRNA-Transkripte in einer reversen Transkription in cDNA umgeschrieben. Diese konnte in einer anschließenden PCR amplifiziert und danach sequenziert werden.

Die erhaltenen Sequenzen der 3'Enden der beiden klinischen Isolate TB40E und Titan waren identisch (Abb.10). Im Falle der beiden mRNA-Transkripte, die für US27 und US28 kodieren, ist das Stoppcodon nach US28 Teil des Polyadenylierungssignals (AA**TAA**A; Stoppcodon fett markiert). Das konnte bei beiden Virenstämmen festgestellt werden. Der Poly-A-Schwanz beginnt 31 Nukleotide weiter *downstream*.

Das Signal für die Polyadenylierung der UL33 spezifischen mRNA befindet sich bei beiden Stämmen 14 Nukleotide nach dem Stoppcodon (TAA) von UL34. Der Poly-A-Schwanz beginnt 19 Nukleotide nach dem Polyadenylierungssignal.

Das Polyadenylierungssignal 3' vom UL78 ORF befand sich ca. 250 bp nach dem Stoppcodon (TGA) von UL78 im ORF von UL79. Die Polyadenylierung erfolgte 18 bp danach.

4.1.2 Northern Blot-Analyse verschiedener US28-Mutanten

Für die funktionelle Charakterisierung des US28-Proteins wurden verschiedene US28-Fusionsmutanten generiert. Das virale Genom, das sich als künstliches Bakterienchromosom in *E. coli* befindet, wurde mittels homologer Rekombination (ET-Cloning-Technik) mutiert. Die Virusmutanten sind in der Abbildung 11 schematisch dargestellt. Bei der US28-Flag-Mutante vergrößerte sich pUS28 um 8 Aminosäuren, die beiden Mutanten US28-TAP und US28-YFP wurden durch den Fusionspartner mit 188 bzw. 240 AS deutlich größer.

Zunächst sollte sichergestellt werden, dass die Transkription der jeweiligen US28-Gene durch Anhängen eines Fusionspartners nicht gestört war. Dazu wurden Northern Blot-Analysen durchgeführt (Abb. 11).

Im Northern Blot sollte auch ein neuer Virusstamm (Titan) auf US28 spezifische Transkripte überprüft werden. Dafür wurde eine BAC-Rekombinationskassette in das

Genom eines klinischen Isolates eingebracht. So konnte das virale Genom in *E. coli* vermehrt und manipuliert werden. Es wurde eine Mutante hergestellt, bei der US28 ORF aus dem Genom deletiert wurde (Titan ΔUS28) (Abb. 11).

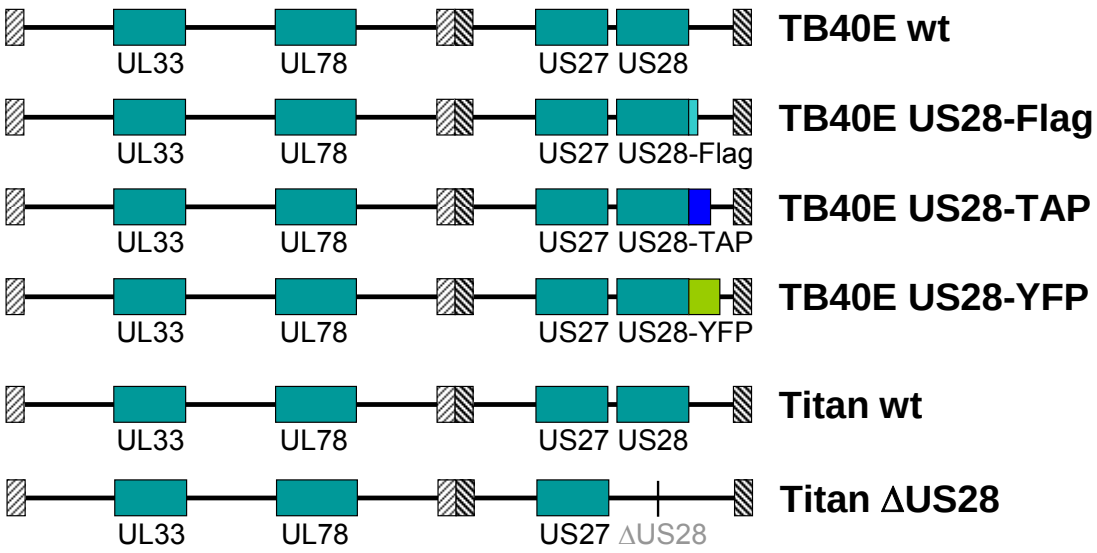


Abbildung 11: Schematische Darstellung der US28-Fusionsmutanten

Hier sollte überprüft werden, ob sich bei dem Titan Wildtypvirus (Titan wt) und den oben genannten Fusionsmutanten die Transkription US28-spezifischer mRNA im Northern Blot nachweisen ließ. Für die Titan ΔUS28-Mutante sollte gezeigt werden, dass kein US28-spezifisches Transkript mehr vorhanden ist (Abb.11).

In Abb.12 ist zu sehen, dass mit einer US28-spezifischen Sonde 30 Stunden nach Infektion beim Titan Wildtypvirus US28-mRNA detektiert werden konnte, während bei der Deletionsmutante Titan ΔUS28, wie zu erwarten, keine Bande nachzuweisen war. Die beiden Mutanten TB40E US28-Flag und TB40E US28-TAP wiesen ebenfalls US28-spezifische Banden auf, die entsprechend der Länge des

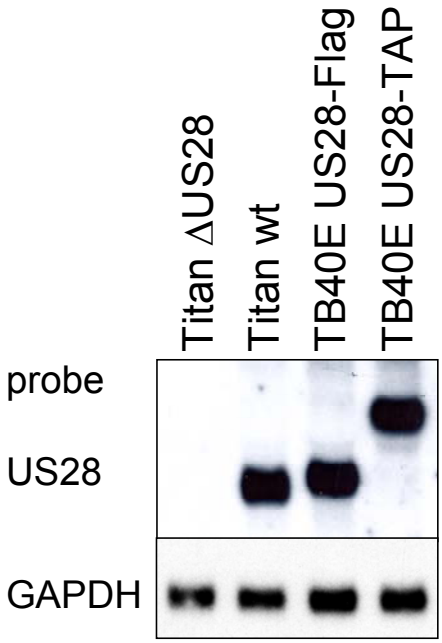


Abbildung 12: Northern Blot Analyse von Fibroblasten nach Infektion mit verschiedenen Viren mit Mutationen im US28-ORF

HFF wurden mit den Viren Titan wt, Titan ΔUS28, TB40E-TAP und TB40E-Flag infiziert. Nach 30 h wurde die Gesamt-RNA isoliert. Der Northern Blot wurde mit Sonden gegen US28 und GAPDH inkubiert. Dabei diente GAPDH als zelluläre Kontrolle.

angehängten *Tags* (24 bzw. ca. 560 bp) entsprechend langsamer im Gel wanderten. Eine GAPDH-spezifische Sonde diente als Kontrolle, um zu zeigen, dass gleiche RNA-Mengen aufgetragen wurden. Die detektierte mRNA lief in allen Ansätzen auf derselben Höhe, und in allen vier Spuren waren gleich starke Banden zu erkennen.

4.1.3 Chemokinbindungsversuche mit verschiedenen US28-Virusmutanten

Im folgenden Versuch sollte untersucht werden, ob sich die Fusionen von verschiedenen Proteinen an das c-terminale Ende von US28 die Bindung an seinen Liganden RANTES beeinflussten.

Wie in Abb. 12 zusammengefasst ist, wurden Zellen mit den drei Wildtypvirusstämmen AD169, TB40E und Titan, mit den US28-Fusions-Mutanten

US28-Flag, US28-TAP, US28-YFP sowie mit der Deletionsmutante ΔUS28 infiziert (MOI = 1). Zwei Tage nach Infektion wurden die Zellen daraufhin untersucht, ob sie RANTES binden können. Als Kontrolle dienten nicht infizierte Zellen. Jeder Versuchsansatz wurde pro Experiment 6-mal durchgeführt. Die ersten 3 Ansätze wurde jeweils unter Zugabe von [^{125}I]-markiertes RANTES inkubiert, zur zweiten Hälfte wurde zusätzlich nicht markiertes RANTES im Überschuss zugegeben. Im ersten Fall wird das gesamte, gebundene [^{125}I]-RANTES gemessen (schwarze Balken), da das markierte RANTES sowohl spezifisch an Rezeptoren als auch unspezifisch bindet. Um die spezifische Bindung bestimmen zu können, wurde zu der Hälfte der Ansätze ein Überschuss an nicht markiertem RANTES zugegeben (weiße Balken).

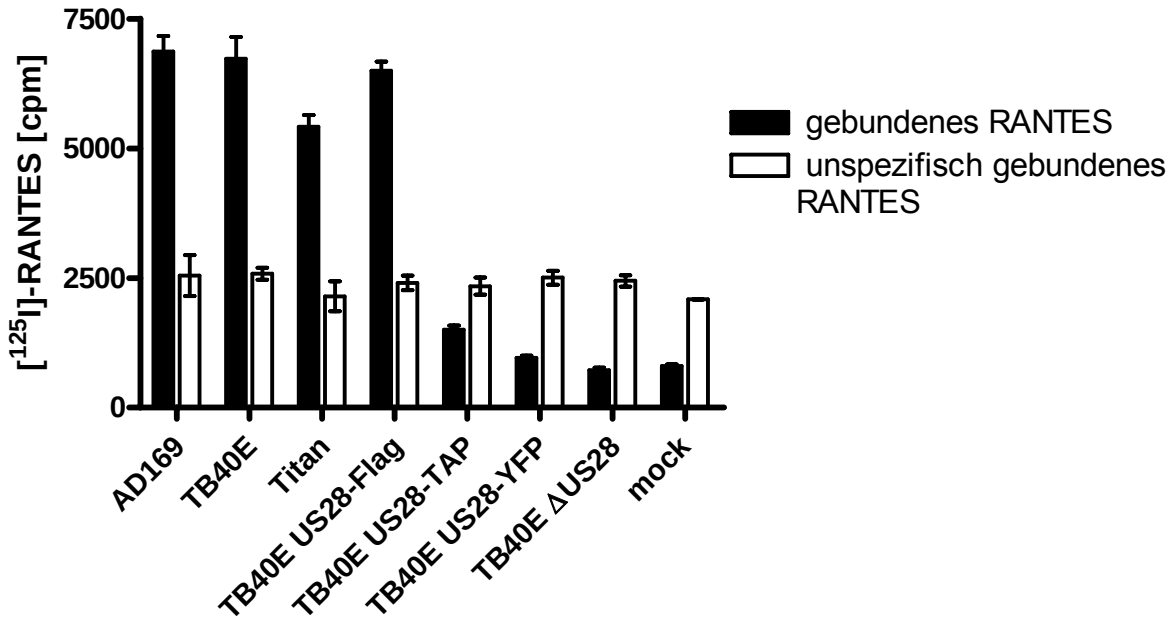


Abbildung 13: RANTES-Verdrängungsversuch mit Viren mit verschiedenen US28-Fusionskonstrukten

HFF wurden mit den Wildtypstämmen AD169, TB40E und Titan sowie den Mutanten TB40E-Flag, US28-TAP, US28-YFP und ΔUS28 mit einer MOI = 1 infiziert. Als Kontrolle dienten nicht infizierte Zellen (mock). Drei Tage nach Infektion wurden die Zellen mit ^{125}I-markiertem RANTES inkubiert. Die schwarzen Säulen zeigen den gebundenen Liganden [^{125}I]-RANTES, die weißen Säulen zeigen die gebundene Radioaktivität bei Verdrängung durch nicht markiertes RANTES (100-facher Überschuss). Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Standardabweichung der Werte ist als Fehlerbalken eingezeichnet.

Aufgrund des hundertfachen Überschusses wird der radioaktiv markierte Ligand vom nicht markierten Ligand kompetetiv von seiner Bindungsstelle verdrängt. Bei der

verbleibenden Radioaktivität handelt es sich um unspezifisch gebundenes markiertes RANTES. Die Differenz zwischen beiden Balken kann also als spezifisch gebundenes RANTES angesehen werden. In 4.1.2 konnte gezeigt werden, dass sowohl in den Fusionsmutanten US28-TAP und US28-Flag sowie beim Titan Wildtypvirus US28 spezifische mRNA Transkripte vorhanden waren.

Die weissen Balken zeigen die unspezifisch gebundene Radioaktivität, die in allen Ansätzen ungefähr gleich hoch ist. Die Differenz zwischen schwarzen und weißen Balken entspricht dem spezifisch gebundenen RANTES. Sie ist sowohl bei den Wildtypviren als auch bei der US28-Flag Mutante besonders ausgeprägt. Diese Viren exprimieren US28 in den infizierten Zellen, bei denen es zum Teil in der Zytoplasmamembran lokalisiert ist und dadurch RANTES binden kann[41]. In den nicht infizierten Zellen (mock) und der Deletionsmutante fehlt dieser Rezeptor, der Ligand kann folglich nicht gebunden werden. Die beiden Mutanten US28-TAP und US28-YFP scheinen nicht in der Lage zu sein, an RANTES zu binden. Da die Fusion c-terminal erfolgte und damit die Ligandenbindung nicht beeinträchtigen sollte, muss angenommen werden, dass der Rezeptor aufgrund der Fusion in seiner Konformation verändert oder sein Transport zur Zelloberfläche behindert ist.

Es konnte beobachtet werden, dass die Werte für das insgesamt gebundene RANTES bei nicht vorhandenem Rezeptor niedriger waren als die Werte für unspezifisch gebundenes RANTES. Der Grund hierfür ist nicht ganz klar. In den Ansätzen, in denen zusätzlich unmarkiertes RANTES zugegeben wird, könnte es aufgrund der höheren Konzentration zu Komplexbildung aus markierten und nicht markierten RANTES-Molekülen kommen. So wären die erhöhten Werte zu erklären, da nicht gebundenes RANTES nicht abgewaschen werden könnte.

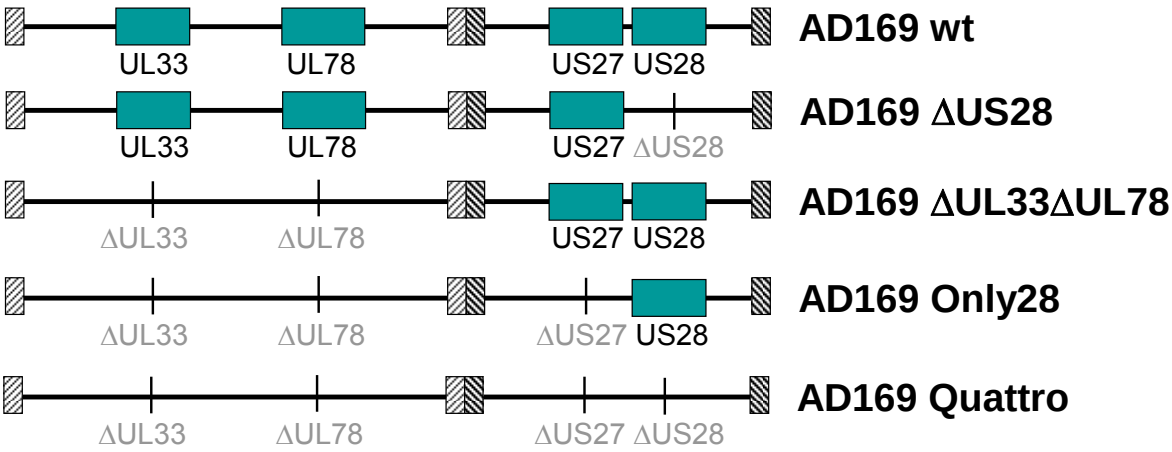


Abbildung 14: Schematische Darstellung der verwendeten Mutanten mit Deletionen in den ORFs der GPCR-Homologen

Neben US28 trägt das HCMV-Genom noch drei weitere ORFs (US27, UL33, UL78), die Sequenzhomologien zu Chemokinrezeptoren besitzen. In RANTES-Bindungsversuchen sollten Virusmutanten mit verschiedenen Deletionen in diesen vier ORFs (Abb. 14) daraufhin untersucht werden, ob sie mit Hilfe ihrer putativen Rezeptoren in infizierten Zellen an das Chemokin RANTES binden können (siehe Abb. 15). Dazu wurden nicht infizierte und mit verschiedenen Mutanten (mit jeweils MOI = 1) infizierte HFF zwei Tage nach Infektion verglichen. Abbildung 15 zeigt, dass Zellen, die mit Wildtypvirus oder der Only 28-Mutante (Abb.14) infiziert wurden, RANTES spezifisch binden konnten. Bei HFF hingegen, die mit einer US28 Deletionsmutante oder einer Mutante infiziert wurden, bei der alle vier ORFs für Chemokinrezeptoren aus dem Virusgenom deletiert waren (Quattro, siehe Abb. 15), konnte wie bei nicht infizierten Zellen keine spezifische RANTES-Bindung beobachtet werden.

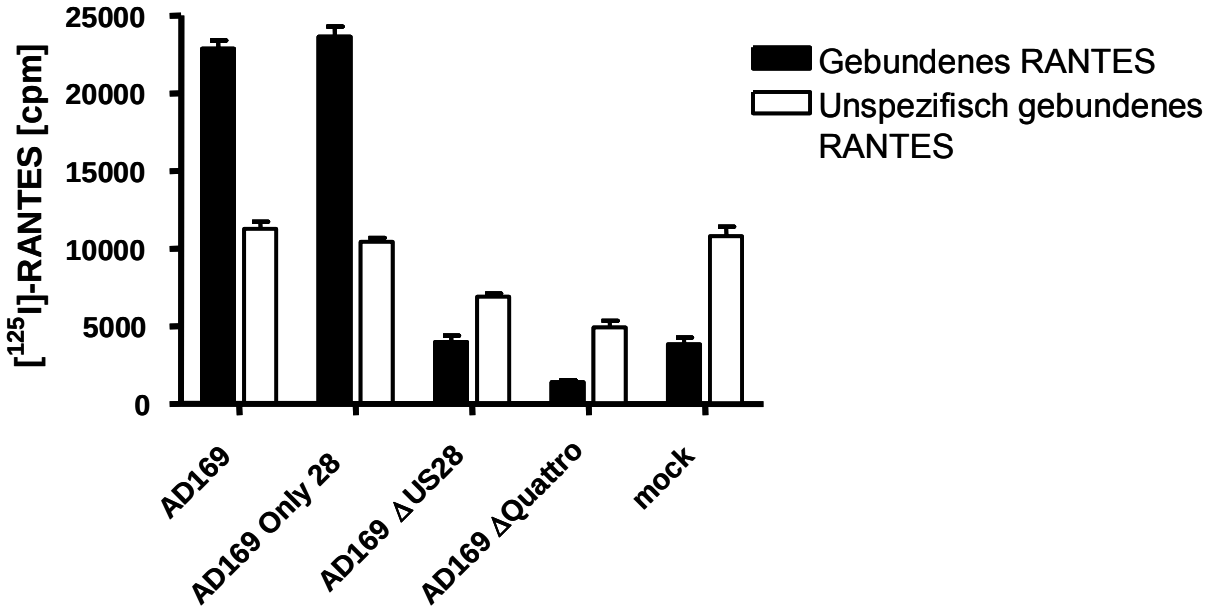


Abbildung 15: RANTES-Verdrängungsversuch mit Deletionsmutanten

HFF wurden mit dem Laborstamm AD169 und den Mutanten Only 28, ΔUS28 und Quattro mit einer MOI = 1 infiziert. Als Kontrolle dienten nicht infizierte Zellen (mock). Drei Tage nach Infektion wurden die Zellen mit ^{125}I-markiertem RANTES inkubiert. Die schwarzen Säulen zeigen den gebundenen Liganden [^{125}I]-RANTES, die weißen Säulen zeigen die gebundene Radioaktivität bei Verdrängung durch nicht markiertes RANTES (100-facher Überschuss). Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Standardabweichung der Werte ist als Fehlerbalken eingezeichnet.

Die weißen Balken, die die unspezifisch gebundene Radioaktivität anzeigen, sind in allen Ansätzen ungefähr gleich hoch. Die Bindung an RANTES ist also nur auf die Expression von US28 zurückzuführen.

4.1.4 Signaltransduktion bei verschiedenen US28-Virusmutanten

In früheren Versuchen unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass US28 in der Lage ist, in infizierten Zellen durch Stimulation der Phospholipase C-β (PLC-β) die Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP_2) in Inositoltrisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) anzuregen[83].

In diesen Experimenten (Abb.16) sollte untersucht werden, inwieweit die Funktion der Signaltransduktion von US28 durch einen Fusionspartner beeinträchtig wird. Dafür wurde das entstandene Zwischenprodukt Inositoltrisphosphat (IP_3) gemessen.

Die Fusionsmutanten aus den Abbildungen 11 und 14, die Wildtypstämme, die Deletionsmutante ΔUS28 und nicht infizierte HFF wurden verglichen.

5h vor Ende des 48-stündigen Versuchs (43h nach Infektion) wurde das Medium gegen inositolfreies Medium mit 3 µCi ^{3}H-markiertem myo-Inositol ausgetauscht. Das markierte Inositol wurde von den Zellen aufgenommen und zum Teil als ^{3}H-PIP_2 in die Zellmembran eingebaut. Bei aktivierter PLC-β wurde das dadurch entstandene ^{3}H-PIP_2 gespalten und dadurch markiertes ^{3}H-IP_3 produziert.

Es konnte bei den US28-Fusionsmutanten ein geringerer Anstieg in der IP_3-Konzentration in infizierten Zellen beobachtet werden als bei den Wildtypviren. Nur die US28-Flag-Mutante zeigte keine Veränderung zu den Wildtypen. Zellen, die mit der Deletionsmutante ΔUS28 infiziert wurden, wiesen keinen Anstieg der IP_3-Werte gegenüber nicht infizierten HFF auf. Es fiel auf, dass scheinbar die Größe des Fusionspartners umgekehrt proportional zur IP_3-Konzentration war (Abb. 16).

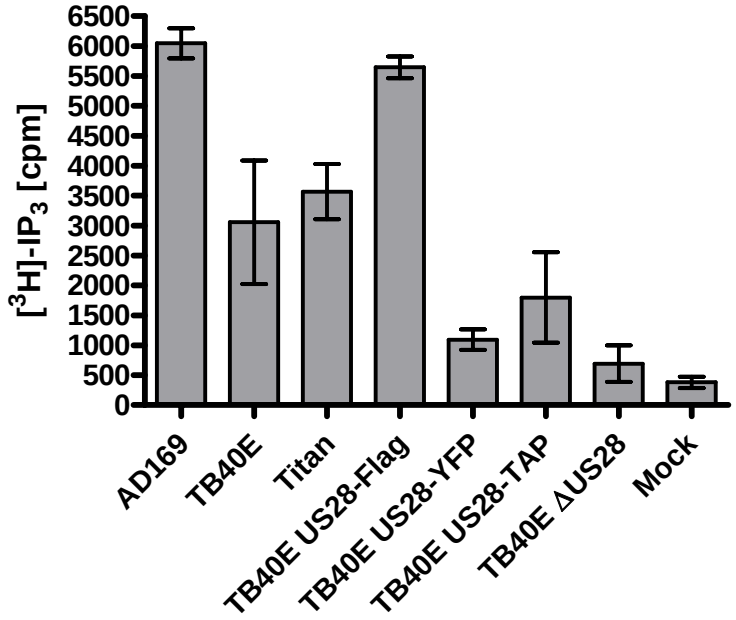


Abbildung 16: Inositoltrisphosphat Produktion in HFF nach Infektion mit verschiedenen Fusionsmutanten

Humane Vorhautfibroblasten wurden mit den Wildtypstämmen AD169, TB40E und Titan sowie den Mutanten TB40E-Flag, US28-TAP, US28-YFP und ΔUS28 mit einer MOI = 1 infiziert. Als Kontrolle dienten nicht infizierte Zellen (mock). 43 Stunden nach Infektion wurde das Medium gegen inositolfreies Medium mit 3 µCi ^{3}H-markiertem myo-Inositol ausgetauscht. 48h nach Infektion wurde der Inositolphosphatgehalt der Proben gemessen. Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Standardabweichung der Werte ist als Fehlerbalken eingezeichnet.

In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob neben US28 auch die drei anderen viralen Homologe zu GPCRs Einfluss auf die Aktivität der PLC-β haben. Dafür wurden HFF mit verschiedenen Mutanten und dem Laborstamm AD169 mit einer MOI von 1 infiziert (Abb. 17).

Beim Laborstamm AD169 konnte ein 5-facher Anstieg an IP_3 gegenüber den nicht infizierten HFF (mock) gemessen werden. Auch die Mutanten Only 28 (ΔUL33ΔUL78ΔUS27) und ΔUL33ΔUL78 (siehe Abb. 14) zeigten einen ca. 8-fachen Anstieg des produzierten IP_3. Hingegen konnte bei den Mutanten ΔUS28 und Quattro kein IP_3-Anstieg gemessen werden. Die Werte lagen sogar noch unter denen für nicht infizierte Zellen.

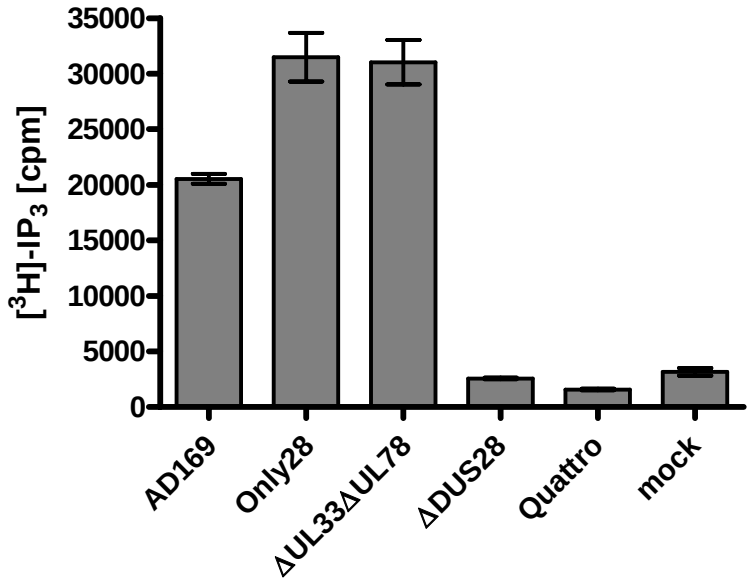


Abbildung 17: Inositoltrisphosphat-Produktion in HFF nach Infektion mit verschiedenen Deletionsmutanten

Humane Vorhautfibroblasten wurden mit dem Laborstamm AD169 sowie den Mutanten Only28, ΔUS28, ΔUL33/ΔUL78 und Quattro mit einer MOI von 1 infiziert. 43 Stunden nach Infektion wurde das Medium gegen inositolfreies Medium mit 3 µCi ^{3}H-markiertem myo-Inositol ausgetauscht. 48 h nach Infektion wurde der Inositolphosphatgehalt der Proben gemessen. Nicht infizierte Zellen (mock) dienten als Kontrolle. Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Standardabweichung der Werte ist als Fehlerbalken eingezeichnet.

In infizierten Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass ein Anstieg in der zytoplasmatischen IP_3-Konzentration ein US28-abhängiger Prozess ist. Im folgenden

Experiment sollte untersucht werden, ob sich dieses Ergebnis in menschlichen, venösen Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) reproduzieren ließ. Es konnte gezeigt werden, dass der Laborstamm AD169, im Gegensatz zu niedrig passagierten Isolaten wie TB40E oder Titan, nicht in der Lage ist, Endothelzellen permissiv zu infizieren. Durch viele Passagen in Zellkultur hat der Stamm AD169 wahrscheinlich Genfunktionen verloren, die zur Infektion bzw. Replikation in diesen Zellen notwendig sind[113].

Endothelzellen spielen möglicherweise eine wichtige Rolle im Hinblick auf den Einfluss von HCMV auf die Entstehung von Atherosklerose[55].

Es sollte nun überprüft werden, wie sich die Deletion von US28 auf die Inositoltrisphosphatkonzentration in infizierten HUVEC auswirkte. Dazu wurden HUVEC mit dem TB40E-Virus, dem daraus generierten TB40E-BAC-Wildtypvirus und der TB40E Mutante ΔUS28 mit einer MOI von 1 infiziert. Als Kontrolle dienten nicht infizierte HUVEC.

In anfänglichen Experimenten (Abb. 18 A) war zu beobachten, dass zwar das TB40E-Virus, nicht aber das daraus abgeleitete TB40E-BAC-Wildtypvirus zu einem signifikanten IP_3-Anstieg in infizierten Zellen führte. Das TB40E-BAC-ΔUS28-Virus verhielt sich wie in infizierten HFF. Es konnte kein signifikanter Anstieg der IP_3-Konzentration gegenüber nicht infizierten Zellen beobachtet werden.

Es lag die Vermutung nahe, dass sich die durch Titration auf HFF ermittelten Virustiter nicht auf die HUVEC übertragen ließen.

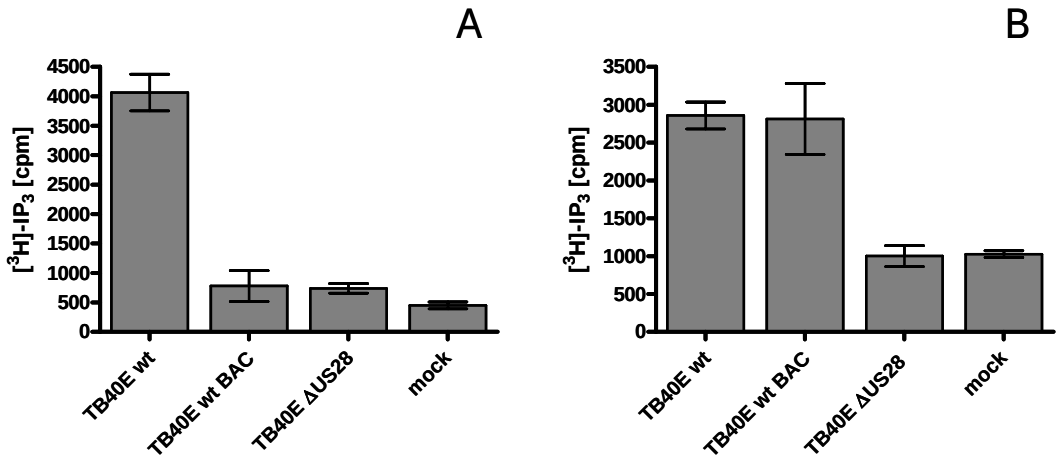


Abbildung 18: Inositoltrisphosphat Produktion in HUVEC.

HUVEC wurden mit dem Wildtypstamm TB40E und TB40E-BAC sowie der Mutanten ΔUS28 mit einer MOI = 1 infiziert. Als Kontrolle dienten nicht infizierte Zellen (mock). 43 Stunden nach Infektion wurde das Medium gegen inositolfreies Medium mit 3 µCi [^{3}H]-markiertem myo-Inositol ausgetauscht. 48 h nach Infektion wurde der Inositolphosphatgehalt der Proben gemessen. Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Standardabweichung der Werte ist als Fehlerbalken eingezeichnet.

Um dieses Problem zu beheben, wurden die verschiedenen Virusstocks nicht auf HFF titriert, wie sonst standardmäßig durchgeführt, um den Gehalt an infektiösen Einheiten pro ml zu bestimmen. Da im Experiment HUVEC verwendet wurden, wurden die Virusstocks ebenfalls auf diesen Zellen titriert. Das Ergebnis (Abb. 18 B) zeigte, dass jeder Virusstock sich in seiner Infektiosität auf HUVEC gegenüber HFF unterschied. Um eine MOI von 1 zu erreichen, benötigte man auf den Endothelzellen mehr Virus als bei HFF. In Tabelle 2 sind die experimentell ermittelten Titer dargestellt, die verschiedene Virusmutanten in Fibroblasten bzw. Endothelzellen erreichten. Interessanterweise ist das Verhältnis der infektiösen Einheiten in HFF zu den infektiösen Einheiten in HUVEC in jeder Mutante unterschiedlich. Das Wildtypvirus zeigt mit Faktor 7,5 den geringsten Unterschied zwischen beiden Zelltypen.

Tabelle 2: Übersicht der Virustiter verschiedener Virusmutanten nach Titration auf humanen Fibroblasten (HFF) oder Endothelzellen (HUVEC)

	TB40E wt BAC	TB40E BAC US28-Flag	TB40E BAC US28-TAP	TB40E BAC ΔUS28	TB40E wt
Titer HUVEC	$9{,}0*10^4$	$3{,}3*10^5$	$1{,}9*10^5$	$4{,}0*10^5$	$1{,}3*10^7$
Titer HFF	$5{,}0*10^6$	$1{,}0*10^7$	$1{,}5*10^7$	$1{,}0*10^7$	$1{,}0*10^8$
Titer HFF/ Titer HUVEC	55,6	30,3	80,4	25,0	7,5

Virustiter sind in PFU pro ml angegeben.

Die anderen Viren zeigten deutlich größere Unterschiede in der Infektiosität zwischen den beiden Zelltypen. Die Unterschiede waren, verglichen mit dem TB40E-Wildtypstamm, um den Faktor 3 bis 10 höher.

4.2 Erzeugung eines polyklonalen Antiserums gegen US28

Zu Beginn dieser Arbeit gab es keinen zufriedenstellenden US28-spezifischen Antikörper, mit dem es z.B. möglich gewesen wäre, die zelluläre Lokalisation des Proteins näher untersuchen zu können. Wie in 5.1.3 gezeigt, erwies es sich als schwierig, Fusionsproteine an US28 anzufügen, ohne die Funktion oder die zelluläre Lokalisation zu beeinträchtigen. Deshalb sollte in dieser Arbeit versucht werden, ein Antiserum gegen US28 herzustellen. Frühere Versuche mit diesem Ziel waren u. a. gescheitert, da sich G-Protein gekoppelte Rezeptoren mit ihren 7-Transmembrandomänen (7TM) in der Regel nur sehr schlecht in Bakterien exprimieren lassen[64]. Auch eukaryote und *in vitro* Expressionssysteme waren nicht erfolgreich. Alle diese Versuche hatten das Ziel, US28 als Volllängeprotein zu exprimieren, dabei bereitete besonders der hydrophoben Charakter des integralen Membranproteins große Probleme.

4.2.1 Herstellung eines artifiziellen Genes

In der vorliegenden Arbeit wurde eine andere Herangehensweise zur Generierung eines Antikörpers gewählt. Die hydrophoben Bereiche des Proteins, die eine erfolgreiche Expression und Aufreinigung sehr schwierig machen, wurden hierfür weggelassen. Es wurde ein artifizielles Gen generiert (US28e), das aus dem extrazellulären aminoterminalen Teil des Rezeptors und den 3 extrazellulären Loops bestand. Die dafür erforderlichen Daten wurden dem SwissProt-Eintrag P69332[145] entnommen.

Die Nukleotidsequenzen der vier extrazellulären Bereiche wurden mit Hilfe des Vector NTI 9.0 Software (InforMax) aneinander gefügt. Das aminoterminale Ende wurde mit einem StrepII-*Tag* und einer Faktor Xa Proteasespaltstelle versehen, der Carboxyterminus mit einem His_6-*Tag* (Abb. 19 C). Am Computer wurden nun vier Oligonukleotide entworfen, welche zusammen die ganze Sequenz des künstlichen Gens US28e überspannten. Dabei trugen jeweils zwei der Oligos komplementäre Sequenzen von je 20 Nukleotiden an den Überlappungsbereichen. In einem ersten PCR-Schritt wurden zwei PCR-Produkte (A) und (B) hergestellt, welche der Nukleotidsequenz zweier Oligos entsprachen. Da die beiden entstandenen PCR-Produkte (A, B) wiederum miteinander überlappten, konnte in einem zweiten PCR-Schritt ein DNA-Konstrukt amplifiziert werden, das die Gesamtsequenz des künstlichen Genes umfasste (C) (Abb. 19 A, B).

Dieses PCR-Produkt wurde phosphoryliert und anschließend in den Klonierungsvektor pUC19 kloniert, der zuvor mit dem Restriktionsenzym *SmaI* geschnitten und daraufhin dephosphoryliert worden war.

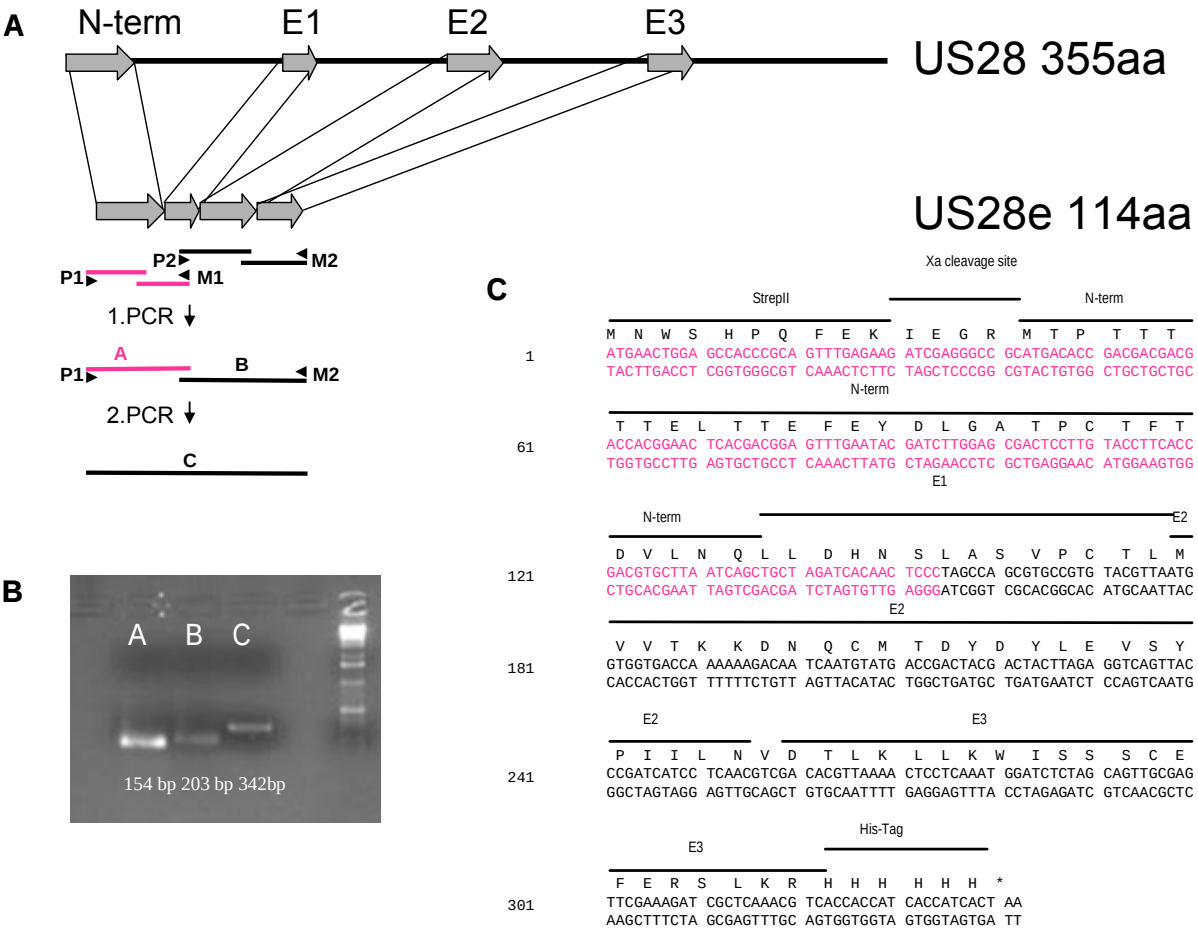


Abbildung 19: Herstellung eines artifiziellen Genes

(A) Die 4 extrazellulären Domänen von US28 wurden anhand von Proteinstrukturvorhersagen (SwissProt) ermittelt und ihre Nukleotidsequenz am Computer zusammengesetzt. Vier Oligonukleotide, die die gesamte Sequenz des künstlichen Genes überspannen, dienten als Vorlage. In zwei aufeinander folgenden PCR-Schritten wurden aus den vier Oligos erst 2 (A rot, B schwarz) und dann ein PCR-Produkt C amplifiziert. Es umfasst die komplette Sequenz des künstlichen Genes, sowie noch zwei *Tags* (StrepII, His_6) und eine Faktor Xa cleavage site. (C) Aminosäure- und Nukleotidsequenz des künstlichen Genes US28e. Darüber hinaus sind die vier Domänen NH_2-Terminus (N-term) und die extrazellulären Loops (E1-3) sowie die *Tags* und die Xa site annotiert. Das PCR-Produkt A ist rot markiert. Zwischen den extrazellulären Domänen E2 und E3 wurde die Sequenz *gtc* eingefügt, dadurch entstand eine *SalI*-Schnittstelle.

4.2.2 Klonierung von US28e in einen prokaryotischen Expressionsvektor

Das Fragment US28e wurde aus dem Vektor pUC19 in den prokaryotischen Expressionsvektor pTST101::GFP kloniert (freundlicherweise von Dr. G. Muth, Institut für Mikrobiologie/Biotechnologie der Universität Tübingen, zur Verfügung gestellt). Dazu wurde der Vektor pTST101::GFP *BamHI / HindIII* verdaut, wobei genau der

GFP-ORF herausgeschnitten wurde. Das *BamHI / HindIII verdaute* US28e wurde in den Vektor ligiert und somit an die kodierende Region des Maltosebindeproteins fusioniert (pTST101::US28e). Parallel wurde der vollständige US28-ORF ebenfalls *BamHI / HindIII* in pTST101 kloniert (pTST101::US28). Das jeweilige Konstrukt stand unter der Kontrolle des rha-Promotors, ein Promotor aus *E.coli*, der durch L-Rhamnose induziert wird. Die erfolgreiche Klonierung wurde durch einen analytischen Restriktionsschnitt mit *BamHI / HindIII* und eine Sequenzierung überprüft. Die Sequenzierung ergab, dass US28e im richtigen Leserahmen an das Maltosebindeprotein (MBP) kloniert worden war. Der aus dieser Klonierung resultierende Vektor pTST101::US28e wurde für spätere Expressionsversuche mit *E.coli* K12-Stämmen verwendet.

4.2.3 Expression und Reinigung des MBP::US28e Fusionsproteins in *E.coli*

Die Expressionskultur wurde bis zu einer OD_{578} von ca. 1,7 - 2,0 inkubiert. Höhere OD_{578}-Werte konnten bei dem MBP-US28e Fusionsprotein nicht erreicht werden, da es dann zur Lyse der Bakterien kam. Für das MBP::GFP-Konstrukt konnten Werte über 3,0 erreicht werden. Das Fusionsprotein MBP::US28 konnte trotz mehrerer Expressionsversuche nicht in *E.coli* exprimiert werden. Deshalb wurde ab diesem Zeitpunkt nur noch mit US28e weitergearbeitet. Das artifizielle US28e konnte in *E.coli* exprimiert und über Affinitätschromatographie aufreinigt werden (siehe Abb. 20 A).

In Abb. 20 A kann man erkennen, dass die aufgereinigte Bande etwas über 50 kDa läuft. Das entspräche den *in silico* berechneten 54 kDa für MBP-US28e. Es handelt sich um eine erst nach Induktion nachweisbare Bande, die in den beiden Elutionen am stärksten ist (grauer Pfeil). Das MBP-US28e Fusionsprotein ist zum größten Teil löslich, doch bleibt auch ein gewisser Prozentsatz in der unlöslichen Fraktion, denn auch hier ist eine Bande zu erkennen (Bande 4, Abb. 20A). Im Bradford-Test konnten für die erste Elution im Mittel ca. 500 ng/µl gemessen werden.

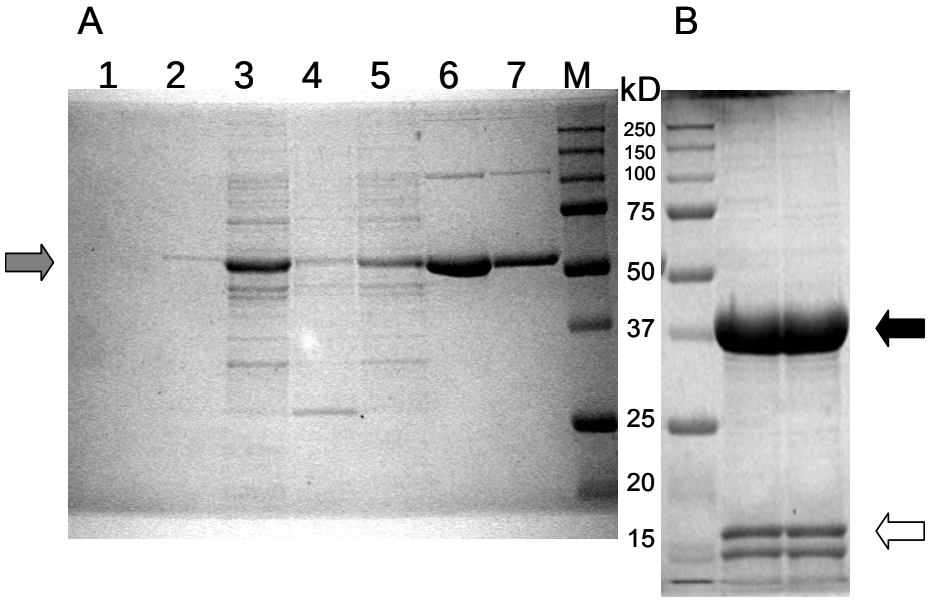


Abbildung 20: A: Aufreinigung des MBP::US28e Fusionsproteins

SDS-PAGE 10 %-iges Acrylamidgel mit Coomassie brilliant blue gefärbt. Es sind Aliquots der einzelnen Aufreinigungsschritte aufgetragen. Aliquot vor Induktion der Bakterien (1), nach Induktion (2), Überstand nach Aufschluss und Zentrifugation (7000g, 1h) (3), Pellet nach Zentrifugation (7000g, 1h) (4), Überstand nach Inkubation mit Amyloseresin (5), 1. und 2. Elution (6,7). Der graue Pfeil markiert das aufgereinigte MBP-US28e Fusionsprotein.

B: Faktor Xa-Spaltung des MBP::US28e Fusionsproteins

15 % Acrylamidgel mit Coomassie brilliant blue gefärbt. Es wurde MBP::U28e nach Faktor Xa-Spaltung aufgetragen. (M) Proteinstandard Precision Plus 10-250 kDa (Bio-Rad). Die Produkte der Faktor Xa-Spaltung sind gekennzeichnet: MBP (schwarzer Pfeil) und US28e (weißer Pfeil).

Da zwischen dem MBP und dem US28e eine Faktor Xa-Schnittstelle liegt, konnte pUS28e vom MBP mit der Protease Faktor Xa abgespalten werden. Nach Spaltung mit Faktor Xa wurde MBP::US28e in einer 15 %-igen SDS PAGE aufgetrennt. Nach

Coomassie-Färbung konnten im Gel drei Banden identifiziert werden: eine Doppelbande bei ca. 10 - 15 kDa (weißer Pfeil) und eine weitere Bande bei ca. 35 kDa (schwarzer Pfeil) (siehe Abb. 20 B). Das stimmt mit den am Computer berechneten Werten von 40 kDa für MBP und 13,5 kDa für US28e überein.

4.2.4 Charakterisierung US28-spezifischer Antikörper

Zur Generierung von Antikörpern wurde ein Kaninchen dreimal im Abstand von vier Wochen mit gereinigtem MBP::U28e Fusionsprotein subkutan immunisiert. Nach 12 Wochen wurde zum ersten Mal Serum entnommen. Das Serum erhielt die Bezeichnung H4. Dieses Kaninchenserum wurde zuerst auf Antikörper untersucht, die gegen das Erzeugerprotein US28e gerichtet waren. Hierzu wurde das aufgereinigte MBP-US28e bzw. das durch Faktor Xa verdaute Protein in einem SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Blotten wurde das Kaninchenserum H4 mit der Membran inkubiert. Als 2. Antikörper diente ein HRP-gekoppelter αKaninchenantikörper.

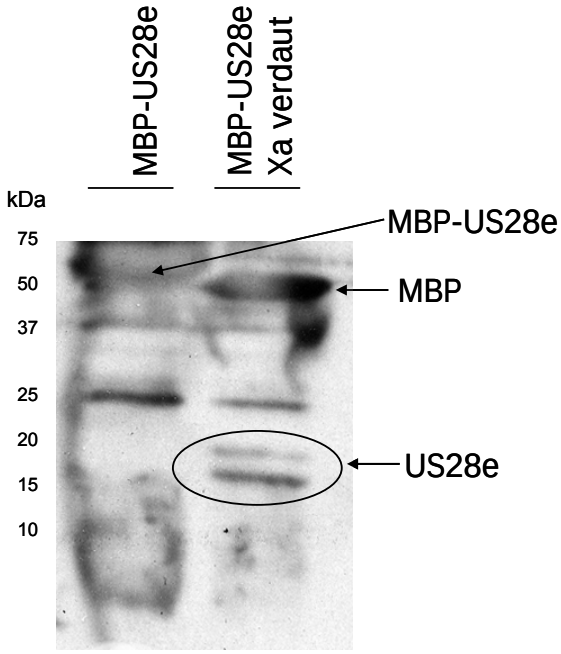


Abbildung 21: Anti-US28e-Serum detektiert Erzeugerprotein im Western Blot

Kaninchenantiserum H4 1:500 verdünnt, 2. Antikörper Maus anti-Kaninchen HRP-gekoppelt 1:3000 verdünnt.

In der linken Spur (Abb. 21) wurde das ungeschnittene Erzeugerprotein MBP-US28e aufgetragen, welches dem Kaninchen injiziert wurde. In die rechte Spur wurden die Spaltprodukte nach Faktor Xa-Proteaseverdau aufgetragen. Man kann in dieser Spur zwei Banden erkennen, die sich zwischen 15 und 20 kDa befinden. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um das abgespaltete US28e (13,5 kDa; berechnet mit VectorNTI Software). Die charakteristische Doppelbande konnte auch schon bei der Xa-Spaltung nach Aufreinigung im Coomassiegel beobachtet werden (Abb. 20 B). Trotz des starken Hintergrundes kann man auch zwischen 37 und 50 kDa eine weitere Bande erkennen, wahrscheinlich das MBP, das ein Molekulargewicht von 42,47 kDa hat. In der linken Spur ist bei ca. 50 kDa eine Bande zu erkennen. Dabei handelt es sich um das Fusionsprotein MBP-US28e. Die beiden oberen Banden sind deutlich stärker als die unteren US28e-Banden. Da dem Kaninchen das Fusionsprotein MBP-US28e gespritzt wurde, sind im polyklonalen Antiserum neben den US28e-spezifischen auch Antikörper enthalten, die gegen das Maltosebindeprotein gerichtet sind. Da das MBP stark immunogen wirkt und US28e wahrscheinlich zu klein wäre, um selbst eine starke Immunantwort auszulösen, wurde das Fusionsprotein bewusst nicht abgespalten. Dafür musste in Kauf genommen werden, dass möglicherweise ein großer Prozentsatz der Serumantikörper gegen das MBP gerichtet ist. Dies bestätigten die relativ starken MBP-Banden auf dem Western Blot.

4.2.5 Nachweis von US28 in transfizierten HEK293-Zellen mittels Western Blot

Nachdem gezeigt werden konnte, dass das Antiserum H4 Antikörper enthält, die ihr Erzeugerprotein US28e detektieren können, sollte überprüft werden, ob diese ebenfalls in der Lage waren, das Volllängeprotein US28 zu erkennen.
Dazu wurden HEK293 mit 5 µg der Plasmide pcDNA::US28 oder pcDNA::UL78 nach der Calciumphosphatmethode transfiziert (3.3.1). Nach 24 bzw. 48 h wurden Gesamtzelllysate geerntet und in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Als Negativkontrolle wurden nicht transfizierte HEK293 verwendet. Die detektierte Vimentin-Bande zeigte, dass in allen Spuren ungefähr gleich viel Protein geladen war. Das Kaninchenserum H4 (αUS28e) detektierte in den Spuren mit US28-Protein bereits nach 24 Stunden 2

Banden, nach 48 Stunden war die Signalintensität höher. Die untere Bande lief bei etwa 40 kDa, was dem theoretischen Molekulargewicht von 41,13 kDa sehr nahe kommt. Daneben trat zu beiden Zeitpunkten eine zusätzliche Bande bei ungefähr 75 kDa auf. In den Spuren mit nicht transfiziertem Zelllysat, war auch nach 48 Stunden keine Bande zu erkennen. Bei den Zellen, die mit UL78 transfiziert wurden, konnte jedoch nach 48 h eine sehr feine Bande beobachtet werden (Abb. 22).

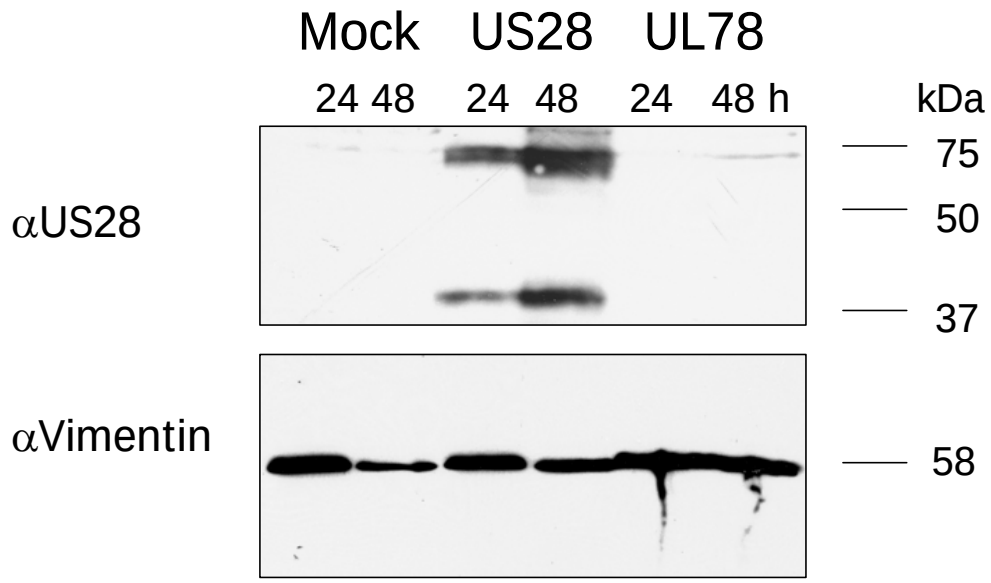


Abbildung 22: Antiserum H4 detektiert US28 imWestern Blot

HEK293 wurden mit den Plasmiden pcDNA::US28 oder pcDNA::UL78 transfiziert und 24 bzw. 48 h nach Transfektion geerntet und im Western Blot mit dem Kaninchenserum H4 inkubiert. Als Negativkontrolle dienten nicht transfizierte HEK293, als Ladekontrolle diente Vimentin.

4.2.5.1 Immunfluoreszenznachweis von US28 in transfizierter HEK293

Nachdem sich US28 im Western Blot mit dem polyklonalen Antiserum H4 detektieren ließ, sollte nun versucht werden, das transient exprimierte US28 in HEK293-Zellen mittels Immunfluoreszenz nachzuweisen. Hierzu wurden pro 24-*well* 10^5 HEK293 auf Glasplättchen ausgesät (siehe 4.4.2). Am darauffolgenden Tag wurden diese mit jeweils 5 µg DNA der Plasmide pcDNA3.1 und pcDNA3.1::US28 nach der Calciumphosphatmethode transfiziert (4.3.1). Nach 48 h wurden die Zellen durch

Inkubation mit 4 % PFA fixiert und anschließend nach dem in 4.4.2 beschriebenen Protokoll immunmarkiert.

In Abb. 22 (A), (B), (C) (obere Reihe) wurden die Zellen mit pcDNA3.1::US28 transfiziert, in Abb. 22 (D), (E), (F) (untere Reihe) mit dem Leervektor pcDNA3.1. Die Zellen in der mittleren Spalte wurden mit 4 %-igem PFA fixiert, bei den HEK293 in der linken Spalte wurde zusätzlich mit 0,1 % Triton permeabilisiert. Diese vier Ansätze wurden mit dem polyklonalen Kaninchenserum H4 inkubiert (1 : 100). Die beiden Ansätze auf der rechten Seite wurden mit dem Präimmunserum desselben Kaninchens inkubiert. Als Zweitantikörper diente in allen Ansätzen ein FITC-gekoppelter Ziegen anti-Kaninchen Antikörper, der 1 : 200 mit 10 % Ziegenserum in PBS verdünnt wurde. Beide Ansätze mit Präimmunserum zeigten keinerlei Fluoreszenzfärbung.

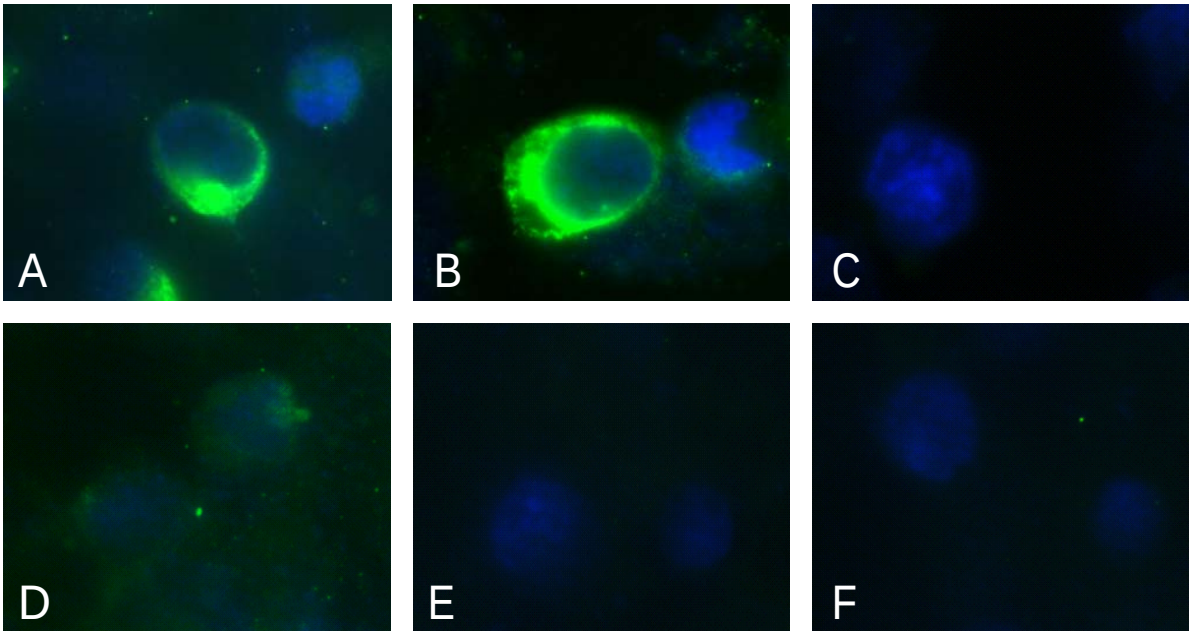


Abbildung 23: Antiserum H4 detektiert US28 in transient transfizierten HEK293

A-C wurde mit 5 µg pcDNA3.1::US28 transfiziert, D-F wurde mit 5 µg pcDNA3.1 (Leervektor) transfiziert; 2 Tage nach Transfektion wurden die Zellen mit 4 % PFA fixiert. A und D wurden zusätzlich mit 0,1 % Triton X-100 permeabilisiert. A, B, D, E wurden mit dem Kaninchenserum als 1. Ak inkubiert, C und F mit Präimmunserum von demselben Kaninchen.

Auch in den Ansätzen mit dem Leervektor ist keine spezifische Anfärbung der Zellen zu erkennen. Jedoch in den mit US28 transfizierten Zellen konnte eine deutliche

Färbung der Zellen beobachtet werden. Dabei konnte eine granuläre Verteilung im Cytoplasma beobachtet werden. Im oberen mittleren Bild, in dem die Zellen nicht permeabilisiert wurden, wird zudem membranständiges US28 als Ring um die Zelle sichtbar. Eigentlich sollte man in diesem Bild kein intrazelluläres US28 sehen können, da die HEK293 nicht permeabilisiert wurden und deshalb kein Antikörper in die Zellen eindringen sollte. Möglicherweise handelt es sich hierbei aber um Fluoreszenz, die von den Membranen oberhalb und unterhalb der fokussierten Ebene ins Bild hineinstrahlt.

4.2.5.2 Immunohistochemischer Nachweis von US28 in infizierten Zellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass das US28-Gesamtprotein in transfizierten Zellen durch das polyklonale Antiserum H4 (das gegen das artifizielle Protein US28e gerichtet ist) nachgewiesen werden konnte, sollte nun versucht werden, US28 auch in infizierten Zellen nachzuweisen.
Die ersten Versuche, pUS28 in infizierten Fibroblasten zu detektieren, schlugen fehl, da es sich bei diesem Antiserum um ein polyklonales Gemisch verschiedener Antikörper handelt, die nicht alle gegen US28e gerichtet sind. Bei der Infektion mit dem humanen Zytomegalievirus wurden virale Homologe zu den humanen Fc-Rezeptoren in der infizierten Zelle exprimiert. Diese sind in der Lage, unspezifisch Antikörper zu binden. Der Zweitantikörper erkennt die unspezifisch gebundenen Kaninchenantikörper und es kommt zu Fc-Rezeptor-spezifischen Färbungen in der infizierten Zelle.

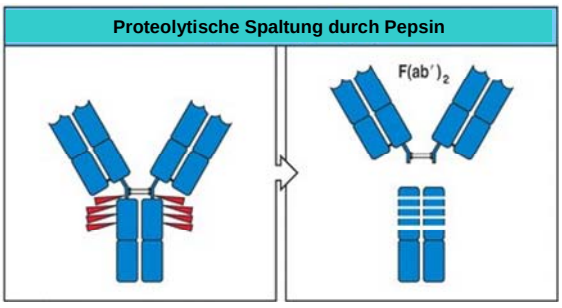


Abbildung 24: Schematische Abbildung der enzymatischen Abspaltung des Fc-Abschnittes eines Antikörpers durch Pepsin (Quelle: The Immune System 2nd editon, Garland Sciences, 2005)

Auch durch Absättigen der Bindungsstellen mit humanem Serum konnte dieses Problem nicht gelöst werden, obwohl dessen enthaltene Antikörper besser an die viralen Fc-Rezeptoren binden sollten als diejenigen aus dem Kaninchenserum. Es waren stets die typischen Immunfärbungen zu erkennen, wie sie für Fc-Rezeptoren beschrieben sind[72] (Daten nicht gezeigt).

Um das Problem der unspezifischen Antikörperbindung zu umgehen, wurden die Fc-Abschnitte der im Antiserum enthaltenen Antikörpern mittels eines Pepsinverdaues abgeschnitten (Abb. 24, siehe auch 4.4.1).

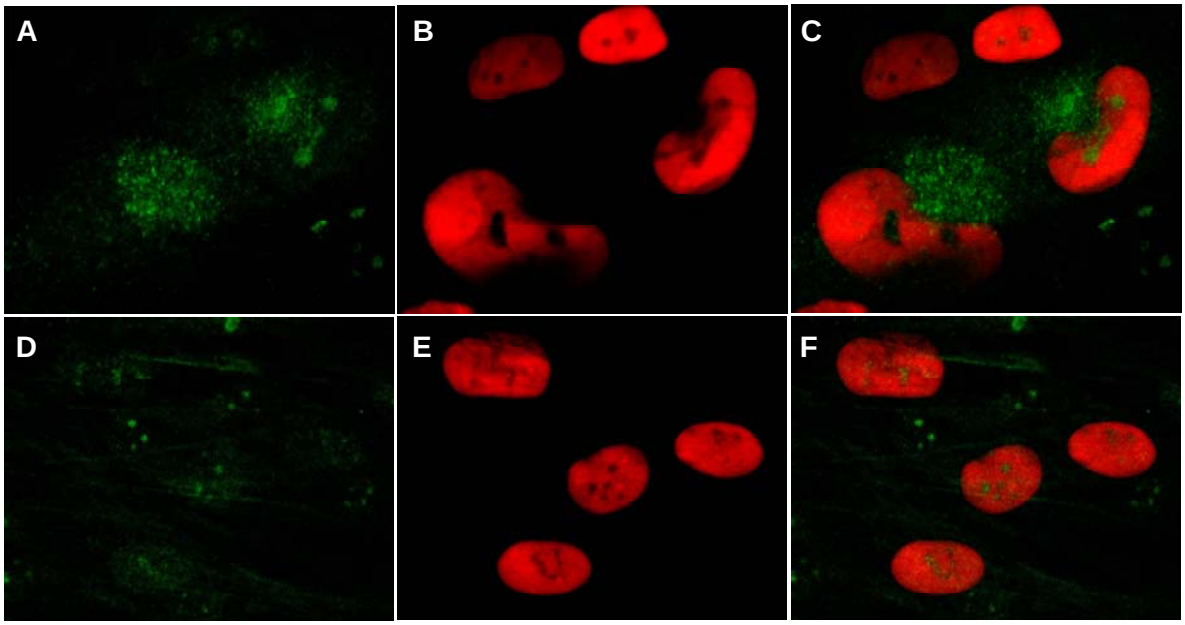


Abbildung 25: Konfokale Laserscanmikroskopaufnahmen von infizierten Zellen

HFF wurden 3 Tage nach Infektion mit TB40E wt (A) – (C) oder TB40E ΔUS28 (D) – (F) mit Antikörpern gegen US28 (Serum H4) (A), (D) und IE Antigen (B), (E) inkubiert. (C) und (F) zeigen die überlagerten Bilder.

Nachdem die Fc-Teile enzymatisch abgespalten waren, wurden neue Immunfluoreszenzaufnahmen gemacht. Die Fc-Abschnitte verblieben mit den $F(ab)_2$-Teilen im Antiserum. Sie dienten nun der Absättigung der Fc-Rezeptoren. Um eine Detektion der spezifischen $F(ab)_2$ zu ermöglichen, wurde jetzt ein Zweitantikörper verwendet, der ausschließlich gegen den $F(ab)_2$ Anteil gerichtet war.

In Abb. 25 sieht man HFF die mit TB40E wt (A) – (C) bzw. TB40E ΔUS28 (D) – (F) mit einer MOI von 0,3 infiziert wurden. Drei Tage nach Infektion wurden die Zellen mit

0,1 % Trition X-100 permeabilisiert. Um zu zeigen, dass die grün gefärbten Zellen infiziert waren, wurde parallel mit einem monoklonalen Antikörper gegen das IE-Antigen inkubiert. Als Zweitantikörper wurde ein TRITC-gekoppelter Ziege-anti-Maus-Antikörper verwendet. Die grüne Fluoreszenz (US28) befindet sich zytoplasmatisch in granulären Strukturen (Abb. 25A). In der Mutante, bei der US28 deletiert war, konnten diese perinukleären Strukturen nicht beobachtet werden (Abb. 25B). Allerdings fiel bei der Deletionsmutante auf, dass hier mehr unspezifische Signale zu beobachten waren. Das Antiserum detektierte in Zellkernen nicht infizierter Zellen punktförmige Strukturen. Bei Titan wt konnten diese Strukturen in allen nicht infizierten Zellkernen ebenfalls beobachtet werden.

Bei manchen der mit Titan wt infizierten Zellen konnte nur IE-Antigen nicht aber US28-spezifische Antigene nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich möglicherweise um ein frühes Stadium des nächsten Replikationszyklus, zu einem Zeitpunkt zu dem zwar IE-Antigen aber noch kein US28 exprimiert wird.

Mit der TB40E US28-YFP Mutante wurden ebenfalls konfokale Aufnahmen gemacht (Abb. 26).

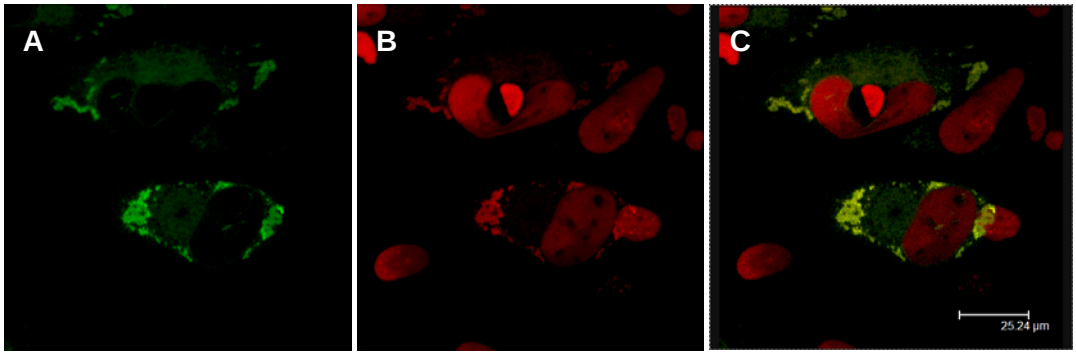


Abbildung 26:Konfokale Laserscanmikroskopaufnahmen von HFF 3 Tage nach Infektion mit TB40E US28-YFP

US28-YFP (A) und Antikörperfärbung gegen IE Antigen (B), (C) zeigt die überlagerten Bilder.

YFP erscheint hier grün, weil der verwendete Filtersatz gelb und grün nicht voneinander trennen konnte. An der Grünfärbung erkennt man, dass das US28-YFP Fusionskonstrukt exprimiert wird (Abb. 26A). Es scheint aber nicht gleichmäßig verteilt zu sein wie beim Wildtypvirus (Abb. 25C). Es liegt vielmehr in flächigen Strukturen vor und sieht fast denaturiert aus. Um die infizierten Zellen zu markieren,

wurde ein IE-Antikörper verwendet (rot). Die Grünfärbung war so intensiv, dass sie auch in die Rotfluoreszenz hineinstrahlte. Genauso wie bei TB40E-Wildtypvirus gibt es Zellen, die zwar aufgrund des exprimierten *immediate-early* Proteins rot leuchten, aber noch keine Grünfärbung aufweisen. Dabei handelt es sich möglicherweise um den nächsten Replikationszyklus.

4.3 Suche nach Interaktionspartnern von US28 mittels Tandem-Affinitätsaufreinigung

Mit Hilfe der BAC-Technologie wurde ein TAP-*Tag* carboxyterminal an US28 angehängt. Das rekombinante Virus TB40E US28-TAP wurde von Michael Winkler (Universität Kiel) hergestellt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.
Das TAP besteht hier aus einem Protein A-Teil (Zellwandprotein von *Staphylococcus aureus;* bindet an IgG-Proteine von Säugern) und dem *Calmodulin binding peptide* (CBP) (bindet an Calmodulin; benötigt Ca^{++} als Cofaktor). Beide Partner werden durch eine Erkennungsstelle der TEV-Protease voneinander getrennt.
Mit Hilfe dieser *Tags* sollten in zwei aufeinander folgenden Affinitäts-chromatographieschritten zusammen mit US28, Interaktionspartner nativ aufgereinigt werden (siehe 3.9). Dazu wurden HFF mit dem Virus TB40E US28-TAP infiziert und 3 Tage nach Infektion geerntet. Die Zellen wurden danach wie in 3.9 beschrieben aufgereinigt.

In Abb. 27 wurden zur Kontrolle der Aufreinigung Proben zu den verschiedenen Aufreinigungsschritten aufgetragen. Hier zeigte sich, dass auch aus größeren Mengen HFF (10 Flaschen T175) nur wenig US28 aufgereinigt werden konnte.
US28-TAP wurde im viralen System offensichtlich nicht in großen Mengen exprimiert. Nahezu alle Proteine blieben im Überstand nach der Inkubation mit den IgG-beads (2). Es erscheint eine Bande nach Abspaltung des Protein A-Anteils (3), die ungefähr ein Molekulargewicht von 50 kDa aufweist (US28-TAP ca. 60 kDa). Dabei könnte es sich um US28-TAP handeln, wahrscheinlicher ist aber, dass die Banden (3) – (6) Verunreinigungen der IgG- oder CaM-*beads* darstellen (Banden (8) und (9)).

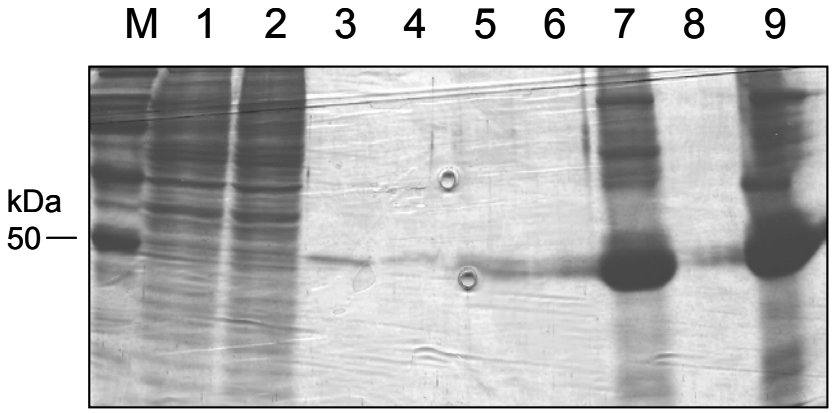


Abbildung 27: Aufreinigung von US28-TAP aus infizierten Zellen

Zu verschiedenen Schritten der Aufreinigung wurden Proben entnommen. Diese wurden mittels denaturierender PAGE aufgetrennt. Hier ist das Coomassie brilliant blue gefärbte SDS-Polyacrylamidgel dargestellt. (1) Gesamtzelllysat (2) Überstand nach Inkubation mit IgG-*beads*, (3) Überstand nach TEV-Verdau (TEV-Puffer), (4) Überstand nach Bindung an CaM-*beads*, (5) und (6) erste und zweite Elution, (7) IgG-*beads* nach Inkubation mit Zellüberständen, (8) Kontrolle CaM-*beads* vor Inkubation, (9) Kontrolle IgG-*beads* vor Inkubation.

Eine Möglichkeit, die Ausbeute an US28-TAP zu erhöhen, bestand darin, durch Verwendung eines stärkeren Promotors die Expression zu steigern.
Deshalb wurde versucht, eine stabile Zelllinie herzustellen, die US28 mit TAP-*Tag* stabil exprimiert. Dies wurde durch retroviralen Transfer der Gensequenz in RPE-1-Zellen erreicht. Die Zelllinie wurde verwendet, da sie zum einen von HCMV permissiv infiziert werden kann und es sich dabei zum anderen um immortalisierte Zellen handelt, die beliebig oft propagiert werden können. Als Ziel sollten möglichst viele Zellen und damit US28-TAP-Protein gewonnen werden.

4.3.1 Erzeugung einer stabilen Zelllinie mittels retroviralem Gentransfer

In den retroviralen Vektor pRAF-Flag wurde US28 hinter das TAP-*Tag* kloniert. Das US28-Gen befindet sich somit unter der Kontrolle eines SP6-Promotors. Um später die transformierten Zellen selektieren zu können, wurde zusätzlich ein Konstrukt in den Vektor eingefügt, das aus einer IRES (*internal ribosomal entry site*) – Sequenz, gefolgt von einem GFP-Neomycin-Fusionsprotein und einer Polyadenylierungssequenz bestand. Der entstandene Vektor p613 wurde mit der Calciumphosphatmethode in Phoenix-Zellen[46] eingebracht. Die Transfektionseffizienz konnte über die GFP-Expression abgeschätzt werden (Abb. 28A). Nach 48 - 72 h wurde der Überstand abgenommen, sterilfiltriert (um eventuell abgelöste Phoenix-Zellen abzutrennen) und auf die Zielzellen gegeben. Nach weiteren 48 h konnten vereinzelt grüne Zellen beobachtet werden (Abb. 28B). Diese wurden durch G418-Zugabe selektiert. Nachdem sich diese Zellen geteilt hatten und Kolonien entstanden waren, konnten diese vereinzelt werden, um monoklonale Zelllinien zu erhalten.

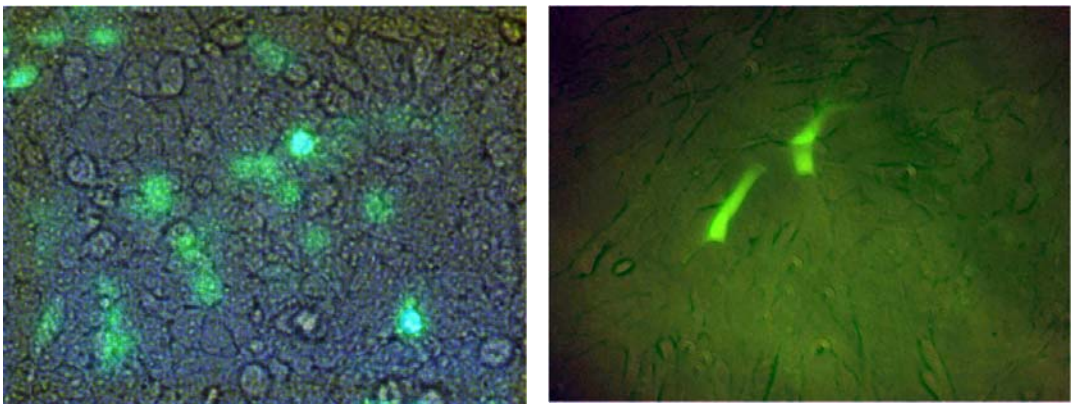


Abbildung 28: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen

(A) Phoenix-Zellen 2 Tage nach Transfektion mit dem retroviralen Transfervektor p613. Transfizierte Zellen leuchten grün (GFP-Neomycin). (B) RPE-1 Zellen nach erfolgreichem Transfer. In den grün leuchtenden Zellen wurden die DNA-Bereiche zwischen den beiden LTRs ins Genom der Zielzelle integriert.

Klone wurden bis auf 10 Flaschen T175 expandiert und wie in 3.9 beschrieben aufgereinigt. Zu verschiedenen Phasen der Aufreinigung wurden Proben genommen und später in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurde im Western Blot das US28-TAP-Konstrukt mit einem Flag-Antikörper detektiert (Abbildung 29).

Wenn man das Coomassiegel mit dem parallel durchgeführten Western Blot vergleicht, dann fällt auf, dass hier nur in Spur 2 bzw. Spur 6 und 7 Proteinbanden zu erkennen sind, im Western Blot hingegen konnten über fast alle Aufreinigungsschritte US28-TAP-spezifische Banden detektiert werden. Das mag daran liegen, dass generell geringe Mengen US28 aufgereinigt wurden. In Spur 2 sind die Proteine aufgetragen, die nicht an die IgG-*beads* gebunden hatten. Spur 7 zeigte, dass IgG-*beads* als dicke Proteinbande bei ca. 25 kDa im Gel liefen. Bei den Banden in der sechsten Spur, die zu Spur 7 zusätzlich auftraten, handelte es sich wahrscheinlich um an die IgG-*beads* gebunden Proteine. Eigentlich sollten die Proteine, die über das TAP-*Tag* an die IgG-*beads* gebunden hatten, durch Abschneiden der Protein A-Domäne wieder in Lösung gehen. Wie jedoch der Western Blot zeigt, ist Spur 3, die Probe nach dem TEV-Verdau leer, d.h. es wurde entweder nichts abgeschnitten oder das abgeschnittene Protein blieb dennoch an den IgG-Kügelchen hängen. Dass zumindest zum Teil zweiteres zutraf, lässt sich an den Proben von Spur 4 und 5 erkennen. Hierbei handelt es sich um Elutionen mit RIPA-Puffer. Dieser Puffer wird unter anderem benutzt, um Membranproteine in Lösung zu bringen und sollte hier dazu verwendet werden, das abgespaltene US28 wieder von den IgG-*beads* abzulösen. Das gelang nicht vollständig, da der Großteil des Proteins noch an den *beads* klebte (Spur 6). Da sich die Proteine von den IgG-*beads* nicht abtrennen ließen, wurden die *beads* nach Inkubation auf ein neues präperatives Gel geladen (Abb. 28C). Die erhaltenen Banden wurden ausgeschnitten und für die Analyse mittels Massenspektrometrie Trpysin verdaut und aufgereinigt (siehe 3.5.4).

Im MALDI-TOF-Massespektrometer wurden die aufgereinigten und Trypsin-verdauten Proteinproben analysiert. Dies wurde in der Sektion Massenspektrometrie der Universität Ulm durchgeführt. Mit dem Computerprogramm MASCOT wurde versucht, die dabei erhaltenen Massenspektren bestimmten Proteinen zuzuordnen. Das war jedoch nicht möglich.

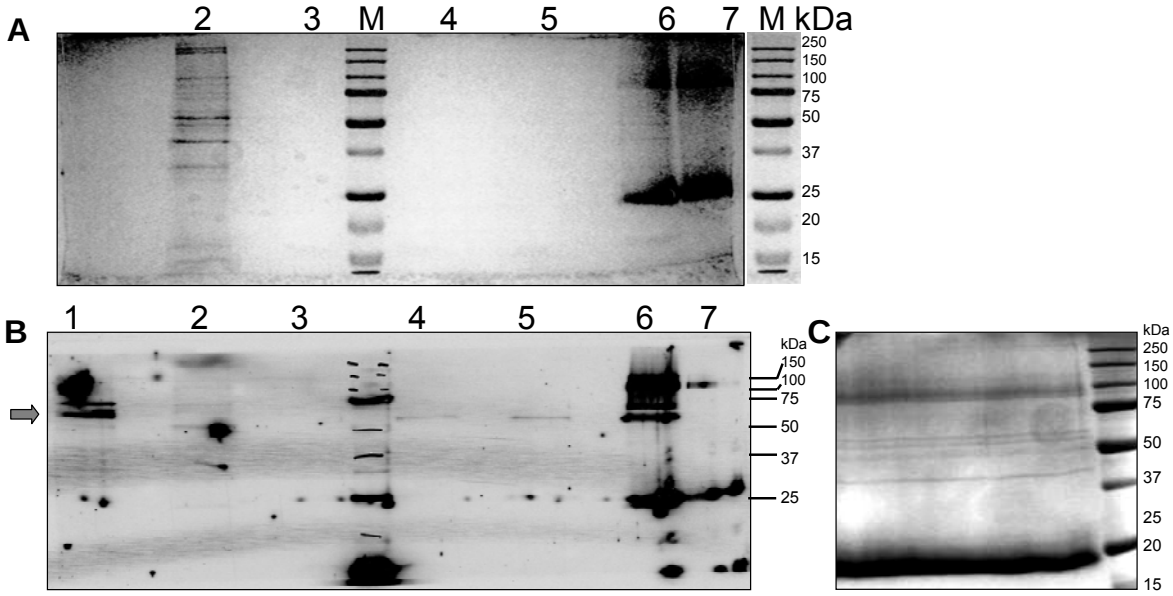


Abbildung 29: Aufreinigung von TAP-US28 über das TAP-Tag

Zu verschiedenen Schritten der Aufreinigung wurden Proben entnommen. Diese wurden im denaturierenden PAGE aufgetrennt. Hier sind das Coomassie brilliant blue gefärbte SDS-Polyacrylamidgel (A) und der anschließende Western Blot (B) dargestellt. (1) Gesamtzelllysat (2) Überstand nach Inkubation mit IgG-*beads*, (3) Überstand nach TEV-Verdau (TEV-Puffer), (4) und (5) erste und zweite Elution mit Ripa-Puffer nach TEV-Verdau, (6) IgG-*beads* nach Inkubation mit Zellüberständen, (7) Kontrolle *beads* vor Inkubation. (C) PAGE Coomassie brilliant blue gefärbt. Hier wurden die IgG-*beads* nach Inkubation mit dem Zellüberstand (Probe 6 A und B) erneut aufgetrennt.

4.4 Virus – Wirt – Interaktionen

4.4.1 Einfluss von US28 auf die Expression von VEGF

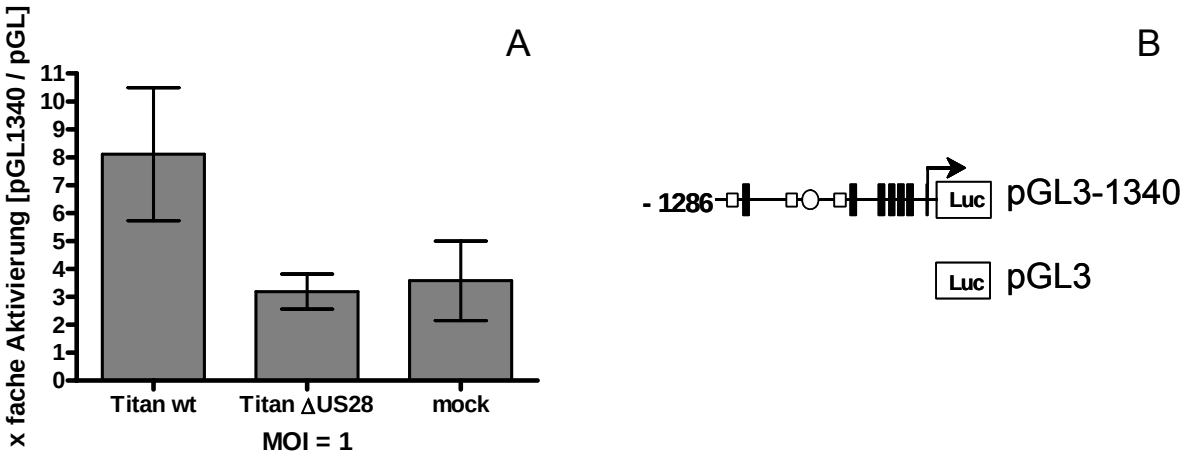
Durch die Infektion mit HCMV wird die Expression vieler Wirtsgene verändert[152,21]. Es konnte gezeigt werden, dass es dabei unter anderem auch zur verstärkten Expression von VEGF in verschiedenen Zelltypen kommt[104].

In Transfektionsexperimenten in murinen NIH3T3-Zellen konnte gezeigt werden, dass die transiente Expression von US28 zur Verfünffachung der Aktivierung des VEGF-Promotors in diesen Zellen führte (in Kooperation mit D. Maussang/M. Smit, Universität Leiden/Amsterdam, persönliche Mitteilung).

Im folgenden Versuch sollte untersucht werden, ob sich dieser Effekt auch in Infektionsexperimenten mit dem humanen Zytomegalievirus bestätigen lässt.

Abbildung 30: Transiente VEGF-Expression in U373 MG nach Infektion mit verschiedenen Viren

A: Transiente Expression in HCMV-infizierten und nicht infizierten (mock) U373MG. Die Zellen wurden 2 h vor Transfektion



infiziert. Am nächsten Tag wurden Zellen lysiert und die Luciferaseaktivität gemessen. Fehler sind als Standardfehler des Mittelwertes angegeben.

B: schematische Darstellung des VEGF-Promotors.

Die Nukleotidsequenz von Position -1286 bis + 50 des VEGF-Promotors wurden vor das Luciferasegen kloniert. Potentielle Konsensusbindestellen für AP-1 (weiße Kästchen), AP-2 (weiße Ringe) und SP1 (schwarze Kästchen) sind notiert.

Dazu wurden U373MG (menschliche Glioblastom Astrocytoma)-Zellen in 12-*well*-Platten ausgesät (10^5 Zellen pro *well*). Nach 24 h wurden sie mit verschiedenen Virusmutanten infiziert und nach weiteren 2 h mit einem VEGF-Luciferase-Reporterplasmid bzw. mit dem Leervektor pGL-basic transfiziert (siehe Abb. 30B). Nach weiteren 24 h wurden die Zellen mit PBS ohne EDTA gewaschen und anschließend in Lysispuffer (Promega) aufgeschlossen und im Luminometer gemessen.

Die Ergebnisse von fünf unabhängigen Experimenten sind in Abbildung 30A zusammengefasst. Da sich die absoluten Werte in den einzelnen Experimenten stark unterschieden, wurde jeweils der Quotient aus den Werten für pGL3-1340 und pGL3 (leer) gebildet und dann die ermittelten Quotienten relativ miteinander verglichen.

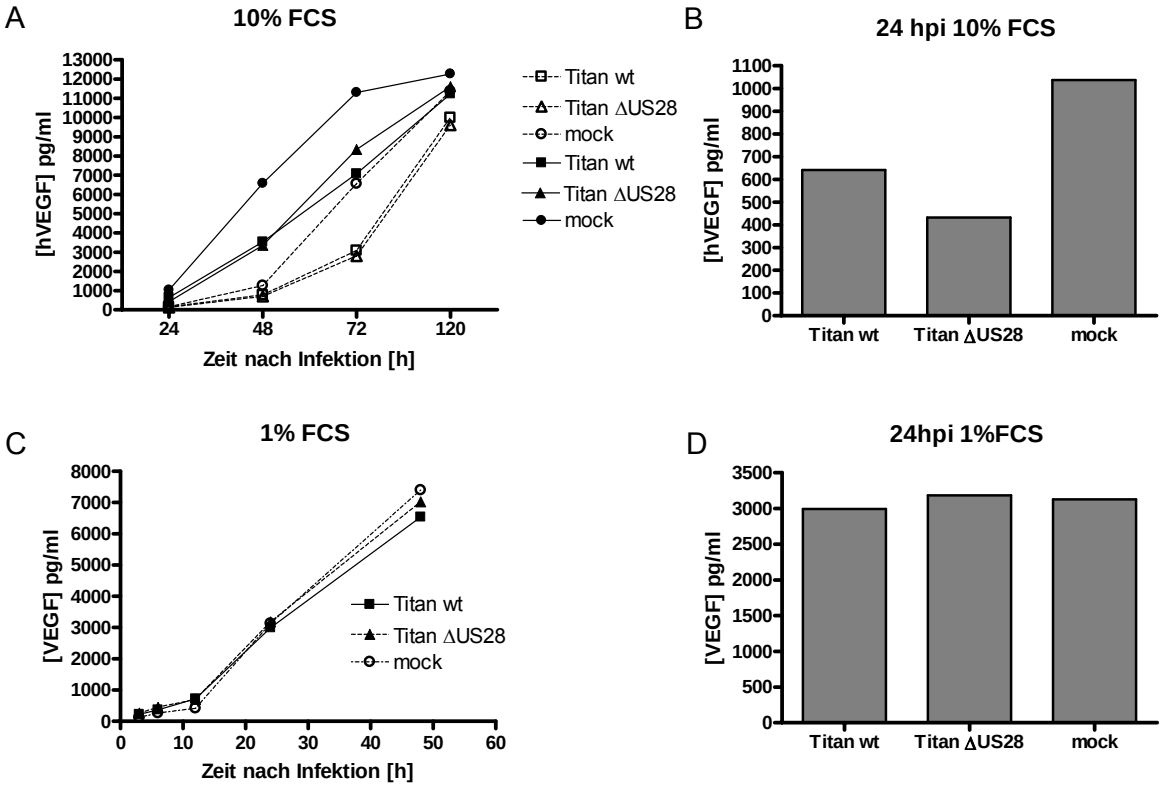


Abbildung 31: VEGF-ELISA mit Überständen aus infizierten U373MG-Zellen

(A) Es wurden 50000 (weiße Symbole; ☐ Titan wt, △ Titan □US28, ○ mock) oder 100000 Zellen (schwarze Symbole; ■ Titan wt, ▲ Titan □US28, ● mock) pro 12-*well* ausgesät und mit den Viren Titan wt oder Titan □US28 mit einer MOI = 1 infiziert. Als Kontrolle dienten nicht infizierte Zellen (mock). Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben aus dem Kulturüberstand abgenommen und anschließend der VEGF-Gehalt im ELISA untersucht. (B) Die VEGF-Konzentrationen aus A zum Zeitpunkt 24 h nach Infektion wurde nochmal einzeln dargestellt. (C) Es wurden 100000 Zellen pro 12-*well* ausgesät und mit den Viren Titan wt und Titan □US28 infiziert. 3, 6, 12, 24, 48 h nach Infektion wurden Überstände für den ELISA abgenommen. Die Zellen wurden für diesen Versuch unter Mangelbedingungen (1 % FCS) inkubiert. (D) VEGF-Konzentrationen aus C zum Zeitpunkt 24 h nach Infektion wurden nochmals einzeln dargestellt.

Abb. 30A zeigt, dass das TB40E-Wildtypvirus den VEGF-Promotor stark induziert. Die Infektion mit ΔUS28 hingegen führt zu einer weit schwächeren Induktion als beim Wildtypvirus. Die mock-Kontrolle zeigt ebenfalls eine geringe Aktivierung. Zwar sind die Quotienten (pGL3-1340 / pGL3 (leer)) bei ΔUS28 und mock ungefähr gleich hoch, jedoch waren die RLU-Werte bei den nicht infizierten Zellen viel niedriger.

Im vorherigen Versuch konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des VEGF-Promotors in HCMV-infizierten Zellen zum Teil auf das Vorhandensein von US28

zurückzuführen ist. Im folgenden ELISA-Experiment sollte untersucht werden, ob auch mehr VEGF-Protein in den Überständen infizierter Zellen vorhanden war.
Dazu wurden U373MG unterschiedlich dicht ausgesät (50000 oder 100000 Zellen pro 12-*well*). Es wurden Überstände 24, 48, 72 und 120 h nach Infektion abgenommen und im ELISA (Quantikine Human VEGF Immunoassay-Kit, R&D Systems) der VEGF-Gehalt bestimmt. In Abb. 31A sind die VEGF-Konzentrationen über die Zeit abgebildet. Man sieht deutlich, dass die Ansätze mit den dichter ausgesäten Zellen zu Anfang deutlich mehr VEGF produzierten als die dünner ausgesäten Zellen. Zu späteren Zeitpunkten näherten sich die Werte zwischen den beiden Gruppen immer mehr. Bei den 100000 Zellen pro 12-*well* ist 24 h nach Infektion ein deutlicher Unterschied zwischen Titan wt und ΔUS28-Virus zu erkennen (Abb. 31B). Die Zellen, die mit der Deletionsmutante infiziert wurden, produzierten ungefähr 30 % weniger VEGF. Allerdings produzieren die nicht infizierten Zellen mit Abstand am meisten VEGF (ungefähr das Doppelte des Titan wt Wertes). Zu späteren Zeitpunkten näherten sich die Werte der Viren und der mock-Kontrolle immer mehr. Das galt für beide Gruppen mit 50000 und 100000 Zellen.
Um die hohen VEGF-Werte für die mock-Kontrolle zu reduzieren, wurden neue Experimente duchgeführt. Dafür wurden 100000 Zellen pro 12-*well* ausgesät und am nächsten Tag mit Titan wt und ΔUS28-Virus infiziert. Als Kontrolle dienten nicht infizierte Zellen. Eine Stunde nach Infektion wurde das normale U373MG-Medium gegen Medium ausgetauscht, welches nur 1 % FCS enthielt. Anschließend wurde 3, 6, 12, 24 und 48 h nach Infektion Proben genommen (Abb. 31C).
In diesem Experiment konnte beobachtet werden, dass die mock-Werte deutlich niedriger waren als bei den Ansätzen mit infizierten Zellen (ca. 50 %) (Abb. 31D). Allerdings konnte in diesem Experiment keinen Unterschied zwischen Titan wt und ΔUS28-Virus erkannt werden. Die Werte für die Deletionsmutante waren sogar leicht höher als beim Wildtyp.

5 Diskussion

Das humane Zytomegalievirus besitzt mit seinen ca. 230 kb, die für mindestens 220 Gene kodieren, die größte Kodierungskapazität unter den Herpesviren[28]. Bei HCMV wie auch bei MCMV erstreckt sich über ca. 100 kb des Genoms ein zentraler Kernbereich, der hauptsächlich essentielle (~80) Gene umfasst. Dieser Bereich ist über die β-Herpesviren konserviert und enthält die für die Verbreitung und das Verbleiben in einer Population benötigten Gene[49] [85]. Daran anschließende flankierende Bereiche hingegen sind heterogen und beinhalten die für die Anpassung an den Wirt spezifischen Gene. Sie können in Tandems zu zwei oder mehr Genen angeordnet sein und kodieren darüber hinaus meist für Glykoproteine[49].

Aufgrund der langen Koevolution mit ihren Wirten war es den jeweiligen Vertretern der Herpesviren möglich, verschiedene Strategien zu entwickeln, um lebenslang im Körper überdauern zu können: Die Viren sind in der Lage, sich in bestimmte Zelltypen „zurückzuziehen“ (Latenz) und sich dadurch bei minimaler Genexpression dem Immunsystem zu entziehen[119] [62]. Eine weitere Strategie könnte darin bestehen, sich bevorzugt in Geweben zu vermehren, die vom Immunsystem weniger gut kontrolliert werden können. Ein Beispiel hierfür sind Speicheldrüsenepithelzellen, die weniger MHC Klasse I Moleküle auf ihrer Oberfläche präsentieren und deshalb bei einer Infektion schlechter von $CD8^+$ T-Zellen erkannt und eliminiert werden können[49]. Darüber hinaus verfügt das humane Zytomegalievirus über ein großes Arsenal an Genen (2/3 des Genoms[84]), die unter Zellkulturbedingungen nicht essentiell für die erfolgreiche Replikation sind und deren Funktion darin liegt, einer Eliminierung des Virus aus dem Wirtsorganismus durch das Immunsystem entgegenzuwirken. Vertreter der US6-Genfamilie (US2, US3, US6 und US11) sind in der Lage, die Oberflächenpräsentation von MHC I Molekülen zu unterdrücken[85]. Dadurch wird die Eliminierung von HCMV infizierten Zellen durch zytotoxische T-Lymphozyten verhindert. HCMV kodiert selbst für ein MHC I Homolog (UL18). Seine Expression soll, zumindest *in vitro,* die Lyse infizierter Zellen (die keine MHC I Moleküle mehr präsentieren) durch natürliche Killerzellen unterdrücken[105].

HCMV kodiert für zwei verschiedene IgG Fc-Rezeptoren, die während der Infektion in Fibroblasten exprimiert werden. Der erste Rezeptor wird vom TRL11-Gen kodiert[67], der zweite entsteht durch alternatives Spleißen aus Teilen von UL118 und UL119[4].
Daneben kodiert HCMV für ein IL-10 Homolog (UL111a), das wohl die Funktion hat, die Immunantwort generell abzuschwächen[102].
HCMV verfügt über mindestens vier Homologe zu G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (US27, US28, UL33 und UL78). Zumindest UL33 und US28 werden zu der Gruppe der Chemokinrezeptoren gezählt. Besonders US28 scheint ein sehr vielseitiges Protein zu sein. Er war der erste Chemokinrezeptor, bei dem konstitutive Aktivität nachgewiesen wurde und der zumindest für die meisten Funktionen keine Ligandenbindung benötigt[24]. US28 bindet an die inflammatorischen, humanen Chemokine RANTES (CCL-5), MIP-1α (CCL-3), MIP-1β (CCL-4), MCP-1 (CCL-2) und MCP-3 (CCL-7) und vermittelt die Liganden-abhängige Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) ERK-1/2, die Erhöhung zytoplasmatischer Calciumkonzentrationen und die Chemotaxis glatter Muskelzellen. Daneben induziert die US28-Expression die konstitutive Aktivierung von Phospholipase C und der Transkriptionsfaktoren NF-κB und CREB. Die US28-abhängige Entfernung von Chemokinen aus der Umgebung infizierter Zellen wird auch als Mechanismus zur Abschwächung der Immunantwort gedeutet.

5.1 Charakterisierung viraler GPCRs in infizierten Zellen

5.1.1 Bestimmung der 3'-Enden viraler GPCR mRNAs in zwei verschiedenen Virusstämmen

Die meisten Experimente, mit denen bis zum heutigen Tag das humane Zytomegalievirus untersucht wurde, fanden *in vitro* in Fibroblasten oder in Zelllinien statt. Darüber hinaus wurden die meisten Untersuchungen mit dem attenuierten Laborstamm AD169 durchgeführt, der ursprünglich als Impfstamm gedacht war[39] und zu diesen Zweck oft in Zellkultur passagiert wurde. Deshalb ist es nicht verwunderlich, dass sich im Laufe von vielen Passagen auf ein und demselben Zelltyp Mutationen in Gene einschlichen, die nicht essentiell für die Replikation in diesen Zellen waren[36 86].

Punktmutationen können zufällig in Genen auftreten und dadurch deren Funktion mehr oder weniger stark beeinflussen. Daneben können solche Mutationen auch Spleißstellen treffen. Das kann zu verkürzten oder in ihrer Aminosäuresequenz stark veränderten Proteinen führen.

Sowohl in den 5'-Enden der Transkripte der mRNAs für US27-US28[73] als auch für UL33-UL34[33] sind Spleißstellen beschrieben. Im Gegensatz dazu besitzen mehr als 90 % der humanen G-Protein-gekoppelter Rezeptoren keine Introns[44]. Es wäre durchaus möglich, dass in den niederpassagierten Isolaten Titan oder TB40E durch andere oder weitere Spleißstellen in der Sequenz bislang unbekannte Proteinvarianten entstehen könnten. Dies konnte mit 3'-RACE Experimenten nicht bestätigt werden. Möglicherweise könnten diese Spleißstellen aber eine Funktion bei der Regulation der Translation dieser Gene haben.

Das Polyadenylierungssignal für die UL78-mRNA befand sich ca. 250 bp nach dem Stoppcodon (TGA) von UL78 im ORF UL79, 18 bp vor der Polyadenylierungsstelle. Auch beim Schimpansenzytomegalievirus (ChCMV)[34] befindet sich das Polyadenylierungssignal in der Sequenz des UL79-Gens (siehe Tabelle 2). In allen β-Herpesviren sind UL78-Homologe in Position und Orientierung im jeweiligen Genom konserviert. MCMV und RCMV, den entsprechenden Viren bei Maus und Ratte, sind dabei keine Ausnahme. Jedoch befindet sich das Polyadenylierungssignal upstream von M79 bzw R79 (Tabelle 2)[82].

Tabelle 3: Polyadenylierungssignale von UL78-homologen Genen

Virus	Gene	Translation stop codon	Putative polyadenylation signal	Position	
				UL78*	UL79†
HCMV	UL78	TGA	AATAAA	+247 bp (114466)‡	+190 bp
ChCMV	UL78	TAG	AATAAA	+225 bp (115633)§	+151 bp
RCMV	R78	TGA	AATAAA	+95 bp (100615)‖	−114 bp
MCMV	M78	TGA	AATAAA	+1 bp (112405)¶	−236 bp
			AATAAA	+167 bp (112571)	−69 bp

* bezogen auf das Stoppcodons von UL78, † bezogen auf das Startcodon von UL79, ‡ Genbankeintrag X17403, § Genbankeintrag AF480884, II Genbankeintrag NC_002512, ¶Genbankeintrag U68299; aus Michel et al. [82]

Das Signal für die Polyadenylierung der UL33 spezifischen mRNA (3,3 kb[17]) befindet sich 14 Nukleotide nach dem Stoppcodon (TAA) von UL34. Der Poly-A-Schwanz beginnt 19 Nukleotide nach dem Polyadenylierungssignal[137].

Es konnte in diesem Experiment gezeigt werden, dass diese Sequenzen vor allem auch im nicht translatierten Bereich zwischen verschiedenen Stämmen konserviert sind. So sind die Aminosäuresequenzen von UL78 zwischen AD169 und verschiedenen klinischen Isolaten nahezu identisch (98,2 - 100% Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz)[82]. Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass auch der Bereich zwischen Stoppcodon bis zur Adenylierungsstelle konserviert ist.

Im Falle der beiden mRNA Transkripte, die für US27 und US28 kodieren (2,9 kb und 1,1 kb[17]), liegt das Stoppcodon von US28 im Polyadenylierungssignal[10] (AA**TAA**A; Stoppcodon fett markiert). Das konnte bei den beiden Virenstämmen Titan und TB40E ebenfalls festgestellt werden. Der Poly-A-Schwanz beginnt 31 Nukleotide später.

Interessanterweise besitzen Primaten-CMVs, ein Gen-*Cluster* in der US-Region, die bei nichtprimaten-CMV nicht vorkommt. Es besteht aus zwei (HCMV, US27, US28; ChCMV US27, US28)[34] oder fünf (Rhesusaffe, US28.1-5; afrikanische Grüne Meerkatze, ORF3-7)[34 48] aufeinander folgenden GPCR-Gene, die sich wahrscheinlich durch Verdopplung aus einem Gen entwickelt haben. Anhand der Sequenzunterschiede und Zahl der aufeinanderfolgenden Gene kann man sogar die Coevolution der Viren mit zwei verschiedenen Wirtsfamilien *Hominidae* (HCMV/CCMV) und *Cercopithecidae* (RhCMV, SCMV) nachvollziehen[137].

Die Gene, die für US28 und UL78 kodieren, werden als *early* Gene exprimiert und sind dabei auf die transkriptionelle Aktivierung durch IE-Proteine angewiesen. Dagegen werden die US27- und UL33-Genprodukte zu einem späten (*late*) Zeitpunkt der Infektion nach Einsetzen der viralen Replikation transkribiert[85]. Alle vier Gene werden zu späten Zeitpunkten als bicistronische mRNAs transkribiert. Dagegen werden die Gene, die am 3'-Ende der bicistronischen Transkripte liegen (UL78, US28), auch schon zu früheren (early) Zeitpunkten als monocistronische mRNA abgelesen. Vermutlich hat die Anordnung der Gene im Genom Einfluss auf die Regulation der Transkription.

5.1.2 Chemokinbindungsversuche mit verschiedenen US28-Virusmutanten

In RANTES-Bindungsexperimenten konnte gezeigt werden, dass US28 als einziger der vier von HCMV kodierten Homologen zu GPCRs in der Lage ist, Liganden an infizierte Zellen zu binden. Es konnte ebenso gezeigt werden, dass sowohl das Wildtypvirus AD169 als auch die Trippeldeletionsmutante Only 28, die beide US28 in der infizierten Zelle exprimieren, der Zelle die Bindung an RANTES ermöglichen. Dagegen konnten Mutanten, in denen der Leserahmen für US28 deletiert ist (ΔUS28, Quattro), ebenso wenig RANTES binden wie nicht infizierte Zellen.

In den RANTES-Bindeversuchen konnte teilweise beobachtet werden, dass in den Ansätzen, in denen markiertes und nicht markiertes RANTES eingesetzt wurde, trotz des Überschusses an nicht markiertem Liganden mehr [^{125}J]-RANTES an die Zellen gebunden war als bei den Ansätzen, die nur markiertes RANTES enthielten. Dieses Phänomen trat bei zu hohen Gesamtkonzentrationen an RANTES auf. Dabei handelte es sich wahrscheinlich um Ligandenoligomere, die sich bei zu hoher Ligandenkonzentration bilden und dann gleichzeitig an mehrere Rezeptoren binden und dadurch nicht mehr abwaschbar sind. Da diese Komplexe aus markierten und nicht markierten Liganden bestehen, können die markierten RANTES-Moleküle nicht mehr durch den Überschuss an unmarkierten Molekülen verdrängt werden, sondern bleiben im Komplex an den Zellen haften. Das führt zu den erhöhten Hot / Cold-Werten.

Die DNA-Sequenzen der US28-Gene der Virusstämme TB40E und AD169 unterscheiden sich in 6 Positionen (A8T, D15E, E18L, D19G, V23T, and I49V)[83]. Beide Sequenzen tragen eine Insertion an Position 220095 (GenBank Eintrag X17403[28]), die zu einem frame-shift im carboxyterminalen Ende an Aminosäure 299 führt. Diese Mutation wurde zuvor schon für den Towne-Stamm von HCMV beschrieben[88]. Da sich die oben beschriebenen Austausche im aminoterminalen Teil von US28 befinden, sollte untersucht werden, ob diese Sequenzunterschiede zwischen verschiedenen Virusstämmen Einfluss auf die Bindungseigenschaften zum Liganden RANTES haben oder die nachgeschalteten Signaltransduktionswege beeinflussen. Es konnte hierbei gezeigt werden, dass trotz der

Aminosäureaustausche am extrazellulären Teil von US28 keine Unterschiede in der Bindung an RANTES bestehen.

Da sich dieser Teil von US28 außerhalb der Zelle befindet, könnte es sich hierbei um eine Anpassung an den selektiven Druck durch das Immunsystem handeln. Das kann auch bei anderen HCMV-Proteinen, wie z.B. gpUL74 (gO) oder gpUL55 (gB), beobachtet werden[48 56 80]. Alle diese Gene zeigen Aminosäureaustausche zwischen verschiedenen Virusstämmen. Interessanterweise sind alle drei Proteine Glykoproteine.

Auch bei UL33, ebenfalls ein Glykoprotein[73], konnte gezeigt werden, dass im Sequenzvergleich zwischen dem AD169 Stamm und dem klinischen Isolat Zeus2 18 Aminosäuren ausgetauscht waren, von denen sich 12 auf den extrazellulären Loops 2 und 3 befanden. Im UL78-Lokus dagegen gab es keinerlei Aminosäureaustausche[146].

Da zu Beginn dieser Arbeit keine geeigneten Antikörper zur Verfügung standen, um die GPCR-Homologe von HCMV zu detektieren und ihre zeitliche und räumliche Verteilung näher zu charakterisieren, wurden Virusmutanten hergestellt, bei denen Fusionsproteine bzw. ein Peptid*tag* (Flag-*Tag*) an US28 angehängt wurde. Da das aminoterminale Ende für die Ligandenbindung wichtig ist[15 25], wurden die Fusionsproteine carboxyterminal an die Aminosäuresequenz angefügt. Es wurde angenommen, dass ein großer aminoterminaler Fusionspartner (z.B. GFP) die korrekte Faltung des Membranrezeptors am ER beeinflussen würde und das „Einfädeln“ der Aminosäurekette in die Phospholipidmembran erschweren müsste.

Bei den erzeugten c-terminalen Fusionsmutanten US28-TAP und US28-YFP zeigte sich jedoch, dass bei zunehmender Länge der *Tags*, die Fähigkeit an RANTES zu binden, entsprechend abnahm.

Der genaue Grund hierfür ist nicht ganz klar. Sicherlich könnte ein Fusionspartner die korrekte Faltung des Proteins beeinflussen, was zu einer schnelleren Degradation des Proteins, z.B. durch die *unfolded protein response*[58], führen würde. Dadurch könnte ein geringeres Bindevermögen an den Liganden erklärt werden. Es wäre auch möglich, dass die Fusionspartner in der infizierten Zelle Dimere bilden, wodurch der Transport von US28 an die Zelloberfläche beeinträchtigt wäre. Solche Dimerisierungen sind für Fusionen an bestimmte fluoreszente Proteine beschrieben[94].

Der korrekte Transport durch ER und das Trans-Golgi-Netzwerk könnte auch deswegen behindert worden sein, da sich nach neuesten Erkenntnissen im c-terminalen, intrazellulären Bereich Aminosäurereste befinden, die beim Transport des Rezeptors durch die Zelle sowie beim Recycling des Rezeptors eine wichtige Rolle spielen[50]. Diese Aminosäuremotive könnten durch einen carboxyterminalen Fusionsparter sterisch abgeschirmt werden.
Unter dem konfokalen Mikroskop konnten bei der US28-YFP-Mutante cytoplasmatische Agglomerationen des Fusionsproteins beobachtet werden. Diese Beobachtung stützt die These einer Falschfaltung oder eines unvollständigen Transports an die Zelloberfläche.

5.1.3 Signaltransduktion bei verschiedenen US28-Virusmutanten

Ähnlich wie bei der Ligandenbindung an RANTES konnte die verstärkte Produktion von Inositolphosphaten ebenfalls nur bei den Mutanten beobachtet werden, die US28 in die infizierte Zelle einbringen. Ein Einfluss der anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren konnte während der viralen Infektion nicht beobachtet werden. Das galt für alle in dieser Arbeit verwendeten Virusstämme. Carboxyterminale Fusionen an US28 führten, wie schon bei der RANTES Bindung diskutiert, ebenfalls zur Reduktion der IP_3-Produktion, je nach Länge des angehängten Fusionpartners.
Für die Signaltransduktion über G-Proteine ist zuerst die Bindung an dieses Molekül (in diesem Fall $G\alpha_{q/11}$) notwendig. Für diese Interaktion ist ein Motiv aus drei aufeinanderfolgenden Aminosäuren, 128 – 130 DRY, verantwortlich. Dieses Motiv befindet sich am Übergang zwischen der 3. Transmembrandomäne und dem 2. intrazellulären Loop (siehe Abbildung 5). Man könnte deshalb vermuten, dass sich eine c-terminale Fusion nicht direkt auf diese Interaktion mit dem G-Protein auswirken sollte. Auch ist hier im Gegensatz zur erfolgreichen Ligandenbindung der Transport an die Oberfläche nicht unbedingt notwendig, da es die für die Signaltransduktion erforderlichen Enzyme und Phospholipide auch in anderen intrazellulären Membranen gibt[76].

Die Beeinflussung zweier unabhängiger Funktionen von US28 durch carboxyterminale Fusionen kann möglicherweise durch eine veränderte dreidimensionale Struktur des Membranrezeptors erklärt werden. Es wäre möglich, dass US28 zur korrekten Faltung die Bildung von Homodimeren benötigt. Für $GABA_B$-Rezeptoren konnte gezeigt werden, dass zwei verschiedene GPCRs exprimiert werden, die nur als Dimer einen funktionellen Rezeptor bilden können[74]. Auch bei Riechrezeptoren, die als GPCRs in Zellmembranen von Neuronen des Riechepithels sitzen, wurde gezeigt, dass der olfaktorische Rezeptor 71 der Maus (M71 OR) nur bei Koexpression mit dem β_2-adrenergen Rezeptor effizient an die Zelloberfläche transportiert wird[47]. Es wird angenommen, dass sich die beiden Rezeptoren gegenseitig stabilisieren, wodurch der Transport an die Zytoplasmamembran erst möglich wird. Durch eine Fusion an den c-terminalen Teil von US28 könnte solch eine Bindung zweier US28-Rezeptoren aus sterischen Gründen verhindert werden. Diese Bindungsstelle kann sich allerdings nicht am intrazellulären c-terminalen Ende von US28 befinden, da eine Deletionsmutante, der die letzten 54 AS fehlen, die Zelloberfläche erreicht und dort verbleibt, weil sie aufgrund fehlender Phosphorylierung des C-Terminus nicht mehr recycled wird[140].

5.2 Erzeugung eines US28-spezifischen polyklonalen Antiserums

Zu Beginn dieser Arbeit gab es keinen Antikörper, der den HCMV kodierten G-Protein-gekoppelten Rezeptor US28 in infizierten Zellen detektieren konnte. Wie oben beschrieben, zeigen Ergebnisse dieser Arbeit, dass GFP- oder andere Fusionen an den Membranrezeptor dazu führen, die Funktionen von US28 zu beeinträchtigen.
Antikörper gegen US28 aber auch gegen die anderen von HCMV kodierten GPCRs sind interessant, da über den Zeitpunkt ihrer Expression während der HCMV-Infektion wenig bekannt ist. Auch könnte damit überprüft werden, ob in latent infizierten Monozyten(-vorläuferzellen) US28 exprimiert wird, wie von Beisser et al.[12] postuliert wurde.
In dieser Arbeit sollte ein polyklonaler Antikörper gegen ein artifizielles Gen erzeugt werden, das die extrazellulären Bereiche von US28 umfasst (US28e). Aufgrund der

hauptsächlich hydrophilen Sequenzen von US28e ließ sich das künstliche Gen als Fusion an das Maltosebindeprotein in *E.coli* überexprimieren. Zwar konnte die Expressionskultur nur bis zu einer optischen Dichte von maximal 2,0 inkubiert werden, während ein MBP::GFP-Konstrukt erst bei 3,0 die stationäre Wachstumsphase erreichte. Trotzdem konnte genug Protein für die Immunisierung aufgereinigt werden, was bei dem Konstukt MBP::US28 (Volllängeprotein) nicht möglich war.

Mit dem erhaltenen Antiserum konnte das US28 Protein aus transient transfizierten HEK293 im Western Blot nachgewiesen werden. Dabei trat neben der erwarteten Bande bei ca. 40 kDa eine zweite Bande auf Höhe von 75 kDa auf. Es handelte sich dabei möglicherweise um ein US28-Dimer, das ungefähr auf doppelter Höhe im Gel lief. Da es sich um ein denaturierendes SDS-PAGE handelte, würde man erwarten, dass Proteine unter diesen Bedingungen ihre 3D-Struktur verlieren und somit als Monomere vorliegen sollten. Jedoch ist es bei GPCRs trotz dieser Bedingungen möglich, dass Dimere erhalten bleiben[3]. Fraile-Ramos et al. konnten diese zweite Bande bei ungefähr dem doppelten Molekulargewicht bei einer US28-Fusionsmutante beobachten[41]. Die Dimerisierung von US28 würde auch zu den oben beschriebenen Ergebnissen passen. Die RANTES-Bindung und das Signaling über G-Proteine könnte indirekt beeinflusst werden, weil durch die Fusionsproteine die Dimerisierungsstelle blockiert wird und deswegen die Rezeptoren nicht richtig gefaltet und an ihren Bestimmungsort transportiert werden können.

Mittels Immunfluoreszenz in transient transfizierten HEK293 konnte US28 ebenfalls nachgewiesen werden. Signale konnten in kernnahen Membranstrukturen lokalisiert werden. Das stimmt mit den Immunfluoreszenzen von Fraile-Ramos et al. überein[41]. Waldhoer et al. konnten zeigen, dass die intrazelluläre Verteilung von US28 eine Kolokalisation mit Markern für frühe Endosomen (Transferrin) und für Lysosomen (LAMP1) zeigt[140].

Bei Immunfluoreszenzaufnahmen in infizierten Zellen verursachte das polyklonale Antiserum einen starken Hintergrund. Da bei der Infektion mit HCMV mindestens zwei virale[4,67] und möglicherweise auch zelluläre Fc-Rezeptoren[72] exprimiert werden, können Immunglobuline unspezifisch an infizierte Zellen gebunden werden. Da es sich hierbei um ein polyklonales Antiserum handelte, ist anzunehmen, dass ein großer Prozentsatz der enthaltenen Antikörper nicht gegen US28 spezifische Epitope

gerichtet ist. Da das artifizielle Gen US28e mit 13,5 kDa sehr klein war, wurde es an MBP gekoppelt, um eine bessere Immunantwort zu erhalten, da MBP stark immunogen wirkt. Das hatte jedoch zur Folge, dass ein Großteil der entstandenen Antikörper nicht gegen US28 sondern gegen MBP gerichtet war. Dies stellte sich als Problem heraus, da HCMV in der infizierten Zelle virale Fc-Rezeptoren exprimiert, die unspezifisch Antikörper binden.

Um dieses Problem zu lösen, wurden mit Hilfe von Pepsin die Fc-Teile der im Serum enthaltenen Antikörper abgetrennt. Durch einen Zweitantikörper, der nur Fab-Fragmente erkannte, konnten nun die US28-spezifischen Fab-Teile detektiert werden, während die unspezifisch gebundenen Fc-Abschnitte nicht markiert wurden.

Auch mit dem erhaltenen Antiserum zeigte sich in infizierten Zellen eine perinukleäre Verteilung. Um welche Kompartimente es sich dabei handelt, muss in zukünftigen Studien geklärt werden. Sanchez et al. zeigten, dass sich virale Proteine der Hüllmembran und des Teguments wie pp150 (UL32) während der *late*-Phase der Infektion in einem Kompartiment nahe des Zellkerns ansammeln[115]. Die gezeigten Strukturen gleichen der Verteilung von US28. Ob es sich dabei um den Ort der sekundären Umhüllung handelt und US28, wie postuliert wurde[136], auch in die virale Membran eingebaut wird und wie eine mögliche Funktion von US28 dabei aussieht, kann nur spekuliert werden.

Neben US28-spezifischen Antikörpern enthielt das Kaninchenserum Antikörper, die Epitope von Zellkernstrukturen erkannten. Es scheint sich hierbei um keinen Effekt zu handeln, der auf HCMV zurückzuführen ist, da nicht infizierte Zellen ebenfalls markiert wurden. Dass es sich hierbei um eukaryonte Homologe des *E.coli*-Proteins MBP handelt, die vom polyklonalen Antiserum detektiert werden, ist auch eher unwahrscheinlich.

Mit dem Pepsin-verdauten Antikörper wurde auch versucht, das US28-Protein im Western Blot zu detektieren. Das war jedoch nicht möglich. Möglicherweise erkennt das Antiserum ein odere mehrere Epitope des Proteins, die im denaturierten Gel nicht mehr erkannt werden können. Dagegen spricht jedoch, dass es sich hierbei um ein polyklonales Antiserum handelte, d.h. es sollten mehrere Epitope des Proteins erkannt werden. Auch die Tatsache, dass der Antikörper in transient transfizierten Zellen funktioniert, spricht gegen diese Annahme. Vielleicht liegt das Protein in

infizierten Zellen in zu geringer Menge vor und wird darüber hinaus durch andere virale Proteine maskiert, die sich in denselben intrazellulären Strukturen befinden wie US28. Es könnte auch sein, dass die HEK293 die überexprimierten US28 Proteine nicht vollständig glykosylieren, wodurch das Protein für das Antiserum zugänglicher ist und deshalb besser detektiert wird.

5.3 Suche nach Interaktionspartnern von US28 mittels Tandemaffinitätsaufreinigung

Bei der TAP-Methode sollten in zwei aufeinander folgenden Affinitäts-chromatographieschritten Interaktionspartner des „Köderproteins“ US28 nativ mit aufgereinigt werden. Die Tandem-Strategie sollte die Gefahr der Identifizierung falsch positiver Proteine verhindern. Durch Expression der TAP-*Tag*-Fusionsproteine während der Infektion, also im authentischen, zellulären Kontext sollte es möglich sein, die Dynamik der Interaktion von US28 mit seinen Bindungspartnern zu untersuchen.

Auch wenn diese Methode in der Theorie scheinbar viele Vorteile gegenüber herkömmlichen Methoden der Protein-Protein-Interaktion hat, so waren ihre Möglichkeiten hier doch limitiert. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die TAP-Methode nicht geeignet ist, um nach Interaktionspartnern von 7-Transmembranproteinen zu suchen. Hier ergaben sich während des Aufreinigungsprozesses Probleme, die bei löslichen Proteinen keine Schwierigkeiten darstellen. Die Bindung an IgG-*beads* und die anschließende enzymatische Abspaltung war im Falle von US28 nicht durchführbar. Der hydrophobe Charakter des Proteins führte dazu, dass US28 nach der Abspaltung nicht in Lösung ging, sondern an den *beads* hängen blieb. Es wäre auch möglich, dass die proteolytische Spaltung aufgrund von Aneinanderlagerungen der hydrophoben Proteine erschwert wurde. Da diese Spaltung von der Zugänglichkeit der Spaltungsstelle zur wässrigen Lösung und damit zur TEV-Protease abhängt, kann diese Reaktion durch hydrophobe Wechselwirkungen der Transmembrandomänen beeinträchtigt werden. Erst durch Verwendung eines anderen Puffers war es überhaupt möglich, einen Teil des

gebundenen US28 von den IgG-*beads* herunterzuwaschen. Der zweite Aufreinigungsschritt war danach gar nicht mehr durchführbar.
Abbildung 29 zeigt eine typische TAP-Aufreinigung. Während auf dem Coomassie-gefärbten Gel keine Banden nach den Elutionen zu erkennen waren, konnte man im parallel durchgeführten Western Blot deutliche Banden sehen. Die Nachweisgrenze für Proteine in Coomassiegelen liegt bestenfalls bei 200 – 400 ng[103]. Trotz der Überexpression in einer stabilen Zelllinie war es nicht möglich, größere Mengen an US28 über das TAP-*Tag* aufzureinigen. Wahrscheinlich lag es am unzureichenden Herauslösen des Rezeptors aus den zellulären Membranen.
Es wäre auch möglich, dass die Zellen aufgrund der konstitutiven Aktivität von US28 so stark beeinflusst wurden, dass sie die integrierte DNA stumm schalteten, z.B. durch Methylierung der Promotorregion.
Aufgrund der eher geringen Proteinausbeute und wahrscheinlich durch den fehlenden zweiten Aufreinigungschritt konnten Fragmente nach dem Trypsinverdau keinen Proteinen in der Datenbank zugeordnet werden.

5.4 Virus – Wirt – Interaktionen

HCMV ist ein ubiquitär verbreitetes humanes Pathogen, das in Immunsupprimierten schwere Erkrankungen hervorrufen kann. Während der HCMV-Infektion wird die zelluläre Genexpression stark beeinflusst[152]. Reinhardt et al. konnten zeigen, dass es in HCMV infizierten Fibroblasten oder glatten Muskelzellen (SMC) zu einer Aktivierung des VEGF-Promotors kommt[104]. Dieser Wachstumsfaktor spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation des vaskulären Systems. Darüber hinaus scheint er eine wichtige Funktion beim Wachstum von Tumoren zu haben, da VEGF indirekt über die Neoangiogenese das Wachstum von Tumorgeweben begünstigt[128].
Kürzlich wurde publiziert, dass auf menschlichen Mammakarzinomzellen VEGF-Rezeptoren exprimiert werden, die diesen Zellen eine autokrine Stimulation ermöglichen[143].
In Transfektionsexperimenten führte die Expression von US28 in NIH3T3-Zellen zur Aktivierung des VEGF-Promotors. Dieser Effekt konnte auch bei einer HCMV-

Infektion in Fibroblasten (HFF) oder glatten Muskelzellen (SMC) beobachtet werden[104]. Bei Infektion von HFF mit dem Titan-Wildtypvirus oder der ΔUS28-Mutante konnte zwischen beiden Viren kein Unterschied in der Aktivierung des VEGF-Promotors beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Sollte das Vorhandensein von US28 Einfluss auf die Aktivierung des Wachstumsfaktors haben, dann müsste dieser Effekt bei der US28-Deletionsmutante fehlen. Northern Blot Analysen zeigten, dass bei dieser Mutante kein US28 exprimiert wird.

In der Astrozytomazelllinie U373MG konnte eine geringere Aktivierung des VEGF-Promotors durch die Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtypvirus beobachtet werden. Allerdings war es nicht möglich, diesen Effekt auch auf Proteinebene zu zeigen. Im ELISA konnte im Zellkulturüberstand kein Unterschied in der VEGF-Konzentration gemessen werden. Auch war die VEGF-Konzentration in nicht infizierten Zellen verhältnismäßig hoch.

Es ist bekannt, dass mRNA- und Proteindaten desselben ORFs nur in den seltensten Fällen identisch sind[2,26]. Zwischen Transkription und Translation gibt es vielfältige Regulationsmöglichkeiten, die zu deutlichen Unterschieden führen können. Gerade bei der Infektion mit einem Virus wie HCMV, das bekanntermaßen in eine Vielzahl zellulärer Prozesse eingreift[152], wäre es nicht verwunderlich, wenn dadurch auch die Translation von zellulären Proteinen beeinflusst werden. Allein das Andocken der viralen Proteine gB oder gH (auch bei UV-inaktivierten Viren) an ihre zellulären Rezeptoren führt zu einer Aktivierung von Sp1[148]. Dieser Transaktivator kann ebenfalls den VEGF-Promotor aktivieren. Es wäre möglich, dass diese Aktivierung stärker ist als der durch US28 induzierte Effekt. Auch die Konzentration des fötalen Kälberserums scheint sich auf die Expression von VEGF auszuwirken.

5.5 Ausblick

In dieser Arbeit konnte ein Antiserum gegen den GPCR US28 erzeugt werden. Als nächstes Ziel sollte damit untersucht werden, in welchem Zeitverlauf US28 während der Infektion exprimiert wird. Weiterhin könnte untersucht werden, ob sich die Expression in Leukozyten unterscheidet. Im Hinblick auf HCMV wäre es

wünschenswert, auch gegen die anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren Antikörper zur Verfügung zu haben. Der c-terminale Teil scheint sich hierfür besonders zu eignen. Aber es wäre zu überlegen, ob man nicht versuchen sollte, monoklonale Antikörper herzustellen. Diese haben den Vorteil, dass sie nahezu unbegrenzt zur Verfügung stehen und weniger unspezifische Bindungen eingehen. Auch gegen US28 sollte ein monoklonaler Antikörper generiert werden, da dieses Protein viele interessante Eigenschaften aufweist, die aber erst noch erforscht werden müssen. Der hier generierte Antikörper funktioniert zwar, aber seine Einsatzmöglichkeiten sind beschränkt.

Da die Generierung eines Antikörpers immer arbeitsintensiv und risikoreich ist und auch viel Zeit in Anspruch nimmt, wäre das Einfügen kleiner *Tags* (Flag, HA) an ausgewählte Positionen von Proteinen eine mögliche, schnellere Alternative. Diese könnten mit kommerziell erhältlichen Antikörpern detektiert werden.

Um die Regulation von Faktoren wie VEGF durch HCMV besser untersuchen zu können, sollten Virusstocks generell in Dichtegradienten aufgetrennt werden. Dadurch könnte man Viruspartikel von *dense bodies* oder im Medium enthaltenen Faktoren befreien.

6 Zusammenfassung

Das Genom des humanen Zytomegalievirus kodiert mit US27, US28, UL33 und UL78 für vier G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit Sequenzhomologie zu humanen Chemokinrezeptoren. Das bisher am besten charakterisierte Protein ist US28. Bis zu Beginn dieser Arbeit gab es keinen Antikörper gegen US28, mit dem es möglich gewesen wäre, US28 in infizierten Zellen zu detektieren. Versuche, an das carboxyterminale Ende von US28 Fusionsproteine anzuhängen, führten zu einer stark reduzierten Bindung an den Liganden RANTES sowie einer verminderten IP_3 Produktion. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Antikörper gegen den HCMV-kodierten Chemokinrezeptor US28 hergestellt. Die heterologe Überexpression und Aufreinigung von US28 in verschiedenen Expressionsystemen erwies sich aufgrund des hydrophoben Charakters als schwierig. Deshalb wurde dazu übergegangen, ein verkürztes, artifizielles US28 herzustellen, welches nur für die löslichen, extrazellulären Bereiche des Rezeptors kodierte (US28e). Als MBP-Fusionprotein wurde dieses Konstrukt in *E.coli* überexprimiert. Nach Aufreinigung wurden damit Kaninchen immunisiert. Das erhaltete Antiserum erkannte das Volllängeprotein in transient transfizierten HEK3T3, in Immunfluoreszenzaufnahmen und im Western Blot. Auch in infizierten Zellen konnte das US28-Protein in Immunfluoreszenzen nachgewiesen werden. Dabei befand sich der Großteil des US28-Proteins in perinukleären Strukturen.

Es konnte gezeigt werden, dass US28 in infizierten Zellen zumindest für einen Teil der Aktivierung des VEGF-Promotors durch die virale Infektion verantwortlich ist. Allerdings war es nicht möglich, auf Proteinebene mittels ELISA ebenfalls einen US28 abhängigen Anstieg von VEGF zu messen.

7 Literaturverzeichnis

1. Alford, C. A., Stagno, S. & Pass, R. F. Natural history of perinatal cytomegaloviral infection. *Ciba Found. Symp.* 125-147 (1979).

2. Anderson, L. & Seilhamer, J. A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis.* **18**, 533-537 (1997).

3. Angers, S. *et al.* Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *PNAS* **97**, 3684-3689 (2000).

4. Atalay, R. *et al.* Identification and expression of human cytomegalovirus transcription units coding for two distinct Fcgamma receptor homologs. *J Virol.* **76**, 8596-8608 (2002).

5. Bahr, U. & Darai, G. Analysis and characterization of the complete genome of tupaia (tree shrew) herpesvirus. *J Virol.* **75**, 4854-4870 (2001).

6. Baldwin, J. M., Schertler, G. F. & Unger, V. M. An alpha-carbon template for the transmembrane helices in the rhodopsin family of G-protein-coupled receptors. *J. Mol. Biol.* **272**, 144-164 (1997).

7. Bankier, A. T. *et al.* The DNA sequence of the human cytomegalovirus genome. *DNA Seq.* **2**, 1-12 (1991).

8. Bauer, A. & Kuster, B. Affinity purification-mass spectrometry: Powerful tools for the characterization of protein complexes. *Eur J Biochem* **270**, 570-578 (2003).

9. Bazan, J. F. *et al.* A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature.* **385**, 640-644 (1997).

10. Beisser, P. S., Goh, C. S., Cohen, F. E. & Michelson, S. Viral chemokine receptors and chemokines in human cytomegalovirus trafficking and interaction with the immune system. CMV chemokine receptors. *Curr. Top. Microbiol. Immunol* **269:203-34.**, 203-234 (2002).

11. Beisser, P. S., Grauls, G., Bruggeman, C. A. & Vink, C. Deletion of the R78 G protein-coupled receptor gene from rat cytomegalovirus results in an attenuated, syncytium-inducing mutant strain. *J. Virol.* **73**, 7218-7230 (1999).

12. Beisser, P. S., Laurent, L., Virelizier, J. L. & Michelson, S. Human cytomegalovirus chemokine receptor gene US28 is transcribed in latently infected THP-1 monocytes. *J. Virol.* **75**, 5949-5957 (2001).

13. Beisser, P. S. *et al.* The R33 G protein-coupled receptor gene of rat cytomegalovirus plays an essential role in the pathogenesis of viral infection. *J. Virol.* **72**, 2352-2363 (1998).

14. Billstrom, M. A., Johnson, G. L., Avdi, N. J. & Worthen, G. S. Intracellular signaling by the chemokine receptor US28 during human cytomegalovirus infection. *J. Virol.* **72**, 5535-5544 (1998).

15. Blanpain, C. *et al.* A chimeric MIP-1alpha/RANTES protein demonstrates the use of different regions of the RANTES protein to bind and activate its receptors. *J Leukoc. Biol.* **69**, 977-985 (2001).

16. Bockaert, J. & Pin, J. P. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J.* **18**, 1723-1729 (1999).

17. Bodaghi, B. *et al.* Chemokine sequestration by viral chemoreceptors as a novel viral escape strategy: withdrawal of chemokines from the environment of cytomegalovirus-infected cells. *J. Exp. Med.* **188**, 855-866 (1998).

18. Bodaghi, B. & Michelson, S. Cytomegalovirus: virological facts for clinicians. *Ocul. Immunol. Inflamm.* **7**, 133-137 (1999).

19. Boppana, S. B., Fowler, K. B., Britt, W. J., Stagno, S. & Pass, R. F. Symptomatic congenital cytomegalovirus infection in infants born to mothers with preexisting immunity to cytomegalovirus. *Pediatrics* **104**, 55-60 (1999).

20. Borst, E. M., Hahn, G., Koszinowski, U. H. & Messerle, M. Cloning of the human cytomegalovirus (HCMV) genome as an infectious bacterial artificial chromosome in Escherichia coli: a new approach for construction of HCMV mutants. *J. Virol.* **73**, 8320-8329 (1999).

21. Browne, E. P., Wing, B., Coleman, D. & Shenk, T. Altered Cellular mRNA Levels in Human Cytomegalovirus-Infected Fibroblasts: Viral Block to the Accumulation of Antiviral mRNAs. *J. Virol.* **75**, 12319-12330 (2001).

22. Butcher, S. J., Aitken, J., Mitchell, J., Gowen, B. & Dargan, D. J. Structure of the human cytomegalovirus B capsid by electron cryomicroscopy and image reconstruction. *J Struct. Biol.* **124**, 70-76 (1998).

23. Camps, M., Hou, C. F., Jakobs, K. H. & Gierschik, P. Guanosine 5'-[gamma-thio]triphosphate-stimulated hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in HL-60 granulocytes. Evidence that the guanine nucleotide acts by relieving phospholipase C from an inhibitory constraint. *Biochem. J.* **271**, 743-748 (1990).

24. Casarosa, P. *et al.* Constitutive signaling of the human cytomegalovirus-encoded chemokine receptor US28. *J. Biol. Chem.* **276**, 1133-1137 (2001).

25. Casarosa, P. *et al.* CC and CX3C chemokines differentially interact with the N terminus of the human cytomegalovirus-encoded US28 receptor. *J Biol. Chem.* **280**, 3275-3285 (2005).

26. Celis, J. E. *et al.* Gene expression profiling: monitoring transcription and translation products using DNA microarrays and proteomics. *FEBS Lett.* **480**, 2-16 (2000).

27. Cha, T. A. *et al.* Human cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains. *J. Virol.* **70**, 78-83 (1996).

28. Chee, M. S. *et al.* Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **154:125-69.**, 125-169 (1990).

29. Chee, M. S., Satchwell, S. C., Preddie, E., Weston, K. M. & Barrell, B. G. Human cytomegalovirus encodes three G protein-coupled receptor homologues. *Nature* **344**, 774-777 (1990).

30. Cheung, T. W. & Teich, S. A. Cytomegalovirus infection in patients with HIV infection. *Mt. Sinai J. Med.* **66**, 113-124 (1999).

31. Chou, S. Antiviral drug resistance in human cytomegalovirus. *Transpl. Infect. Dis.* **1**, 105-114 (1999).

32. Cockcroft, S., Thomas, G. M., Cunningham, E. & Ball, A. Use of cytosol-depleted HL-60 cells for reconstitution studies of G-protein-regulated phosphoinositide-specific phospholipase C-beta isozymes. *Methods Enzymol.* **238:154-68.**, 154-168 (1994).

33. Davis-Poynter, N. J. *et al.* Identification and characterization of a G protein-coupled receptor homolog encoded by murine cytomegalovirus. *J. Virol.* **71**, 1521-1529 (1997).

34. Davison, A. J. *et al.* The human cytomegalovirus genome revisited: comparison with the chimpanzee cytomegalovirus genome. *J Gen Virol.* **84**, 17-28 (2003).

35. Deayton, J. *et al.* Loss of cytomegalovirus (CMV) viraemia following highly active antiretroviral therapy in the absence of specific anti-CMV therapy. *AIDS* **13**, 1203-1206 (1999).

36. Dolan, A. *et al.* Genetic content of wild-type human cytomegalovirus. *J Gen Virol* **85**, 1301-1312 (2004).

37. Dunn, W. *et al.* Functional profiling of a human cytomegalovirus genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 14223-14228 (2003).

38. Eisenfeld, L. *et al.* Prevention of transfusion-associated cytomegalovirus infection in neonatal patients by the removal of white cells from blood. *Transfusion* **32**, 205-209 (1992).

39. Elek, S. D. & Stern, H. Development of a vaccine against mental retardation caused by cytomegalovirus infection in utero. *Lancet* **1**, 1-5 (1974).

40. Foxman, E. F., Campbell, J. J. & Butcher, E. C. Multistep navigation and the combinatorial control of leukocyte chemotaxis. *J. Cell Biol.* **139**, 1349-1360 (1997).

41. Fraile-Ramos, A. *et al.* The human cytomegalovirus US28 protein is located in endocytic vesicles and undergoes constitutive endocytosis and recycling. *Mol. Biol. Cell* **12**, 1737-1749 (2001).

42. Fraile-Ramos, A. *et al.* Localization of HCMV UL33 and US27 in endocytic compartments and viral membranes. *Traffic.* **3**, 218-232 (2002).

43. Gallant, J. E., Moore, R. D., Richman, D. D., Keruly, J. & Chaisson, R. E. Incidence and natural history of cytomegalovirus disease in patients with advanced human immunodeficiency virus disease treated with zidovudine. The Zidovudine Epidemiology Study Group. *J. Infect. Dis.* **166**, 1223-1227 (1992).

44. Gentles, A. J. & Karlin, S. Why are human G-protein-coupled receptors predominantly intronless? *Trends Genet.* **15**, 47-49 (1999).

45. Griffiths, P. D. & Baboonian, C. Intra-uterine transmission of cytomegalovirus in women known to be immune before conception. *J. Hyg. (Lond)* **92**, 89-95 (1984).

46. Grignani, F. *et al.* High-efficiency gene transfer and selection of human hematopoietic progenitor cells with a hybrid EBV/retroviral vector expressing the green fluorescence protein. *Cancer Res.* **58**, 14-19 (1998).

47. Hague, C. *et al.* Olfactory receptor surface expression is driven by association with the beta2-adrenergic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 13672-13676 (2004).

48. Hansen, S. G., Strelow, L. I., Franchi, D. C., Anders, D. G. & Wong, S. W. Complete sequence and genomic analysis of rhesus cytomegalovirus. *J Virol.* **77**, 6620-6636 (2003).

49. Hengel, H., Brune, W. & Koszinowski, U. H. Immune evasion by cytomegalovirus--survival strategies of a highly adapted opportunist. *Trends Microbiol.* **6**, 190-197 (1998).

50. Heydorn, A. *et al.* A Library of 7TM Receptor C-terminal Tails: INTERACTIONS WITH THE PROPOSED POST-ENDOCYTIC SORTING PROTEINS ERM-BINDING PHOSPHOPROTEIN

50 (EBP50), N-ETHYLMALEIMIDE-SENSITIVE FACTOR (NSF), SORTING NEXIN 1 (SNX1), AND G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR-ASSOCIATED SORTING PROTEIN (GASP). *J. Biol. Chem.* **279**, 54291-54303 (2004).

51. Holl, J. Diplomarbeit: Mutagenese und Charakterisierung von Zytomegalieviren mit deletiertem G-Protein gekoppelten Rezeptorhomologen. 30-6-2002.
Ref Type: Thesis/Dissertation

52. Homman-Loudiyi, M., Hultenby, K., Britt, W. & Soderberg-Naucler, C. Envelopment of Human Cytomegalovirus Occurs by Budding into Golgi-Derived Vacuole Compartments Positive for gB, Rab 3, Trans-Golgi Network 46, and Mannosidase II. *J. Virol.* **77**, 3191-3203 (2003).

53. Honess, R. W. & Roizman, B. Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. *J. Virol.* **14**, 8-19 (1974).

54. Horuk, R. Molecular properties of the chemokine receptor family. *Trends Pharmacol Sci.* **15**, 159-165 (1994).

55. Horvath, R. *et al.* The possible role of human cytomegalovirus (HCMV) in the origin of atherosclerosis. *J. Clin. Virol.* **16**, 17-24 (2000).

56. Huber, M. T. & Compton, T. The human cytomegalovirus UL74 gene encodes the third component of the glycoprotein H-glycoprotein L-containing envelope complex. *J Virol.* **72**, 8191-8197 (1998).

57. Irmiere, A. & Gibson, W. Isolation and characterization of a noninfectious virion-like particle released from cells infected with human strains of cytomegalovirus. *Virology* **130**, 118-133 (1983).

58. Isler, J. A., Skalet, A. H. & Alwine, J. C. Human cytomegalovirus infection activates and regulates the unfolded protein response. *J Virol.* **79**, 6890-6899 (2005).

59. Kim, S. J. *et al.* Renal ischemia/reperfusion injury activates the enhancer domain of the human cytomegalovirus major immediate early promoter. *Am. J Transplant.* **5**, 1606-1613 (2005).

60. Kledal, T. N., Rosenkilde, M. M. & Schwartz, T. W. Selective recognition of the membrane-bound CX3C chemokine, fractalkine, by the human cytomegalovirus-encoded broad-spectrum receptor US28. *FEBS Lett.* **441**, 209-214 (1998).

61. Knuesel, M. *et al.* Identification of novel protein-protein interactions using a versatile mammalian tandem affinity purification expression system. *Mol Cell Proteomics.* **2**, 1225-1233 (2003).

62. Kondo, K., Xu, J. & Mocarski, E. S. Human cytomegalovirus latent gene expression in granulocyte-macrophage progenitors in culture and in seropositive individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**, 11137-11142 (1996).

63. Kuhn, J. E. Transfusion-Associated Infections with Cytomegalovirus and Other Human Herpesviruses. *Infusionsther. Transfusionsmed.* **27**, 138-143 (2000).

64. Laage, R. & Langosch, D. Strategies for prokaryotic expression of eukaryotic membrane proteins. *Traffic.* **2**, 99-104 (2001).

65. Lalezari, J. P. *et al.* Randomized, controlled study of the safety and efficacy of intravenous cidofovir for the treatment of relapsing cytomegalovirus retinitis in patients with AIDS. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* **17**, 339-344 (1998).

66. Lamberson, H. V. & Dock, N. L. Prevention of transfusion-transmitted cytomegalovirus infection. *Transfusion* **32**, 196-198 (1992).

67. Lilley, B. N., Ploegh, H. L. & Tirabassi, R. S. Human cytomegalovirus open reading frame TRL11/IRL11 encodes an immunoglobulin G Fc-binding protein. *J Virol.* **75**, 11218-11221 (2001).

68. Liu, Y. & Biegalke, B. J. Characterization of a cluster of late genes of guinea pig cytomegalovirus. *Virus Genes* **23**, 247-256 (2001).

69. Ljungman, P. Cytomegalovirus infections in transplant patients. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl* **100**, 59-63 (1996).

70. Locati, M. & Murphy, P. M. Chemokines and chemokine receptors: biology and clinical relevance in inflammation and AIDS. *Annu. Rev. Med.* **50**, 425-440 (1999).

71. Luster, A. D. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N. Engl. J Med.* **338**, 436-445 (1998).

72. MacCormac, L. P. & Grundy, J. E. Human cytomegalovirus induces an Fc gamma receptor (Fc gammaR) in endothelial cells and fibroblasts that is distinct from the human cellular Fc gammaRs. *J Infect. Dis.* **174**, 1151-1161 (1996).

73. Margulies, B. J., Browne, H. & Gibson, W. Identification of the human cytomegalovirus G protein-coupled receptor homologue encoded by UL33 in infected cells and enveloped virus particles. *Virology* **225**, 111-125 (1996).

74. Marshall, F. H., Jones, K. A., Kaupmann, K. & Bettler, B. GABAB receptors - the first 7TM heterodimers. *Trends Pharmacol Sci.* **20**, 396-399 (1999).

75. Maussang, D. *et al.* Human cytomegalovirus-encoded chemokine receptor US28 promotes tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 13068-13073 (2006).

76. Mazzotti, G. *et al.* Immunocytochemical detection of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate localization sites within the nucleus. *J. Histochem. Cytochem.* **43**, 181-191 (1995).

77. McGregor, A. & Schleiss, M. R. Recent advances in herpesvirus genetics using bacterial artificial chromosomes. *Mol. Genet. Metab* **72**, 8-14 (2001).

78. McGregor, A. & Schleiss, M. R. Molecular cloning of the guinea pig cytomegalovirus (GPCMV) genome as an infectious bacterial artificial chromosome (BAC) in Escherichia coli. *Mol. Genet. Metab* **72**, 15-26 (2001).

79. Melnychuk, R. M. *et al.* Mouse cytomegalovirus M33 is necessary and sufficient in virus-induced vascular smooth muscle cell migration. *J. Virol.* **79**, 10788-10795 (2005).

80. Meyer-Konig, U., Haberland, M., von, L. D., Haller, O. & Hufert, F. T. Intragenic variability of human cytomegalovirus glycoprotein B in clinical strains. *J Infect. Dis.* **177**, 1162-1169 (1998).

81. Michel, D. & Mertens, T. The UL97 protein kinase of human cytomegalovirus and homologues in other herpesviruses: impact on virus and host. *Biochim. Biophys. Acta* **1697**, 169-180 (2004).

82. Michel, D. *et al.* The human cytomegalovirus UL78 gene is highly conserved among clinical isolates, but is dispensable for replication in fibroblasts and a renal artery organ-culture system. *J Gen Virol* **86**, 297-306 (2005).

83. Minisini, R. *et al.* Constitutive inositol phosphate formation in cytomegalovirus-infected human fibroblasts is due to expression of the chemokine receptor homologue pUS28. *J. Virol.* **77**, 4489-4501 (2003).

84. Mocarski, E. S., Jr. Immunomodulation by cytomegaloviruses: manipulative strategies beyond evasion. *Trends Microbiol.* **10**, 332-339 (2002).

85. Mocarski, E. S. & Courcelle, C. T. Cytomegaloviruses and Their Replication. In Fields: Virology Fourth Edition Volume 2; B.N.; Knipe,D.M.; Howley,P.M.Lippincott-Raven,Philadelphia-New York. Knipe, D. M. and Howley, P. M. In Fields Virology, Fourth Edition, Chapter 76. (2001).

86. Murphy, E. *et al.* Coding potential of laboratory and clinical strains of human cytomegalovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 14976-14981 (2003).

87. Murphy, P. M. *et al.* International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol. Rev.* **52**, 145-176 (2000).

88. Neote, K., DiGregorio, D., Mak, J. Y., Horuk, R. & Schall, T. J. Molecular cloning, functional expression, and signaling characteristics of a C-C chemokine receptor. *Cell* **72**, 415-425 (1993).

89. O'Sullivan, C. E. *et al.* Decrease of cytomegalovirus replication in human immunodeficiency virus infected-patients after treatment with highly active antiretroviral therapy. *J. Infect. Dis.* **180**, 847-849 (1999).

90. Oliveira, S. A. & Shenk, T. E. Murine cytomegalovirus M78 protein, a G protein-coupled receptor homologue, is a constituent of the virion and facilitates accumulation of immediate-early viral mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 3237-3242 (2001).

91. Pass, R. F. Cytomegalovirus. In Fields: Virology Fourth Edition Volume 2; B.N.; Knipe,D.M.; Howley,P.M.Lippincott-Raven,Philadelphia-New York. Knipe, D. M. and Howley, P. M. In: Fields Virology Fourth Edition Volume 2 Chapter 77. (2001).

92. Pass, R. F., Fowler, K. B., Boppana, S. B., Britt, W. J. & Stagno, S. Congenital cytomegalovirus infection following first trimester maternal infection: Symptoms at birth and outcome. *J Clin. Virol.* **35**, 216-220 (2006).

93. Peckham, C. S. *et al.* Cytomegalovirus infection in pregnancy: preliminary findings from a prospective study. *Lancet* **1**, 1352-1355 (1983).

94. Pedelacq, J. D., Cabantous, S., Tran, T., Terwilliger, T. C. & Waldo, G. S. Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. *Nat Biotech* **24**, 79-88 (2006).

95. Penfold, M. E. *et al.* Cytomegalovirus encodes a potent alpha chemokine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 9839-9844 (1999).

96. Penfold, M. E., Schmidt, T. L., Dairaghi, D. J., Barry, P. A. & Schall, T. J. Characterization of the rhesus cytomegalovirus US28 locus. *J Virol.* **77**, 10404-10413 (2003).

97. Pleskoff, O. *et al.* The human cytomegalovirus-encoded chemokine receptor US28 induces caspase-dependent apoptosis. *FEBS J.* **272**, 4163-4177 (2005).

98. Pleskoff, O. *et al.* Identification of a chemokine receptor encoded by human cytomegalovirus as a cofactor for HIV-1 entry. *Science* **276**, 1874-1878 (1997).

99. Rawlinson, W. D., Farrell, H. E. & Barrell, B. G. Analysis of the complete DNA sequence of murine cytomegalovirus. *J. Virol.* **70**, 8833-8849 (1996).

100. Reddehase, M. J. Antigens and Immunoevasins: opponents in cytomegalovirus immune surveillance. *Nat Rev Immunol* **2**, 831-844 (2002).

101. Reddehase, M. J. & Lemmermann, N. *Cytomegaloviruses: Pathogenesis, Molecular Biology and Infection Control.* Caister Academic Press, (2006).

102. Redpath, S., Ghazal, P. & Gascoigne, N. R. Hijacking and exploitation of IL-10 by intracellular pathogens. *Trends Microbiol.* **9**, 86-92 (2001).

103. Rehm, H. *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics.4. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2002*. (2006).

104. Reinhardt, B. *et al.* Upregulation of functionally active vascular endothelial growth factor by human cytomegalovirus. *J Gen Virol* **86**, 23-30 (2005).

105. Reyburn, H. T. *et al.* The class I MHC homologue of human cytomegalovirus inhibits attack by natural killer cells. *Nature* **386**, 514-517 (1997).

106. Reynolds, D. W., Stagno, S., Hosty, T. S., Tiller, M. & Alford, C. A., Jr. Maternal cytomegalovirus excretion and perinatal infection. *N. Engl. J. Med.* **289**, 1-5 (1973).

107. Roizman, B. & Pellett.P.E. The Family Herpesviridae: A brief introduction. In Fields: Virology Fourth Edition Volume 2; B.N.; Knipe,D.M.; Howley,P.M.Lippincott-Raven,Philadelphia-New York. (2001).

108. Roizman, B. *et al.* The family Herpesviridae: an update. The Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol.* **123**, 425-449 (1992).

109. Roizman, B. & Knipe, D. M. Herpes simplex viruses and their replication.In Fields: Virology Fourth Edition Volume 2; B.N.; Knipe,D.M.; Howley,P.M.Lippincott-Raven,Philadelphia-New York.pp 2399-2459. B.N., Knipe, D. M., and Howley, P. M. Lippincott-Raven Philadelphia-New York. pp 2399-2459. In Fields Virology Fourth Edition Volume 2. (2001).

110. Roizman, B. & Knipe, D. M. Cytomegaloviruses and their replication.In Fields: Virology Fourth Edition Volume 2; B.N.; Knipe,D.M.; Howley,P.M.Lippincott-Raven,Philadelphia-New York.pp 2399-2459. B.N., Knipe, D. M., and Howley, P. M. Lippincott-Raven Philadelphia-New York. pp 2399-2459. In Fields Virology Fourth Edition Volume 2. (2001).

111. Rosenkilde, M. M., Waldhoer, M., Luttichau, H. R. & Schwartz, T. W. Virally encoded 7TM receptors. *Oncogene* **20**, 1582-1593 (2001).

112. ROWE, W. P., HARTLEY, J. W., WATERMAN, S., TURNER, H. C. & HUEBNER, R. J. Cytopathogenic agent resembling human salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **92**, 418-424 (1956).

113. Ryckman, B. J., Jarvis, M. A., Drummond, D. D., Nelson, J. A. & Johnson, D. C. Human cytomegalovirus entry into epithelial and endothelial cells depends on genes UL128 to UL150 and occurs by endocytosis and low-pH fusion. *J Virol.* **80**, 710-722 (2006).

114. Sambrook, J., Maniatis, T. & Fritsch, E. F. Molecular cloning - a laboratory manual. (1989). Cold Spring Harbor laboratory press.

115. Sanchez, V., Greis, K. D., Sztul, E. & Britt, W. J. Accumulation of Virion Tegument and Envelope Proteins in a Stable Cytoplasmic Compartment during Human Cytomegalovirus Replication: Characterization of a Potential Site of Virus Assembly. *J. Virol.* **74**, 975-986 (2000).

116. Sarov, B. *et al.* Prevalence of antibodies to human cytomegalovirus in urban, kibbutz, and Bedouin children in southern Israel. *J. Med. Virol.* **10**, 195-201 (1982).

117. Schierling, K., Buser, C., Mertens, T. & Winkler, M. Human Cytomegalovirus Tegument Protein ppUL35 Is Important for Viral Replication and Particle Formation. *J. Virol.* **79**, 3084-3096 (2005).

118. Sinzger, C. *et al.* Tropism of human cytomegalovirus for endothelial cells is determined by a post-entry step dependent on efficient translocation to the nucleus. *J Gen Virol* **81**, 3021-3035 (2000).

119. Slobedman, B., Mocarski, E. S., Arvin, A. M., Mellins, E. D. & Abendroth, A. Latent cytomegalovirus down-regulates major histocompatibility complex class II expression on myeloid progenitors. *Blood* **100**, 2867-2873 (2002).

120. Sodhi, A., Montaner, S. & Gutkind, J. S. Viral hijacking of G-protein-coupled-receptor signalling networks. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 998-1012 (2004).

121. Srivastava, R., Curtis, M., Hendrickson, S., Burns, W. H. & Hosenpud, J. D. Strain specific effects of cytomegalovirus on endothelial cells: implications for investigating the relationship between CMV and cardiac allograft vasculopathy. *Transplantation* **68**, 1568-1573 (1999).

122. Stagno, S. *et al.* Cervical cytomegalovirus excretion in pregnant and nonpregnant women: suppression in early gestation. *J. Infect. Dis.* **131**, 522-527 (1975).

123. Stagno, S., Reynolds, D. W., Lakeman, A., Charamella, L. J. & Alford, C. A. Congenital cytomegalovirus infection: consecutive occurrence due to viruses with similar antigenic compositions. *Pediatrics* **52**, 788-794 (1973).

124. Stocchi, R., Ward, K. N., Fanin, R., Baccarani, M. & Apperley, J. F. Management of human cytomegalovirus infection and disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Haematologica* **84**, 71-79 (1999).

125. Streblow, D. N. *et al.* The human cytomegalovirus chemokine receptor US28 mediates vascular smooth muscle cell migration. *Cell* **99**, 511-520 (1999).

126. Sullivan, V. *et al.* A protein kinase homologue controls phosphorylation of ganciclovir in human cytomegalovirus-infected cells. *Nature* **358**, 162-164 (1992).

127. Swanson, R., Bergquam, E. & Wong, S. W. Characterization of rhesus cytomegalovirus genes associated with anti-viral susceptibility. *Virology* **240**, 338-348 (1998).

128. Takahashi, H. & Shibuya, M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin. Sci. (Lond).* **109**, 227-241 (2005).

129. Terhune, S. S., Schroer, J. & Shenk, T. RNAs are packaged into human cytomegalovirus virions in proportion to their intracellular concentration. *J Virol.* **78**, 10390-10398 (2004).

130. van der Strate, B. W. *et al.* Viral load in breast milk correlates with transmission of human cytomegalovirus to preterm neonates, but lactoferrin concentrations do not. *Clin. Diagn. Lab Immunol.* **8**, 818-821 (2001).

131. Varnum, S. M. *et al.* Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome. *J Virol.* **78**, 10960-10966 (2004).

132. Varnum, S. M. *et al.* Identification of Proteins in Human Cytomegalovirus (HCMV) Particles: the HCMV Proteome. *J. Virol.* **78**, 10960-10966 (2004).

133. Vieira, J., Schall, T. J., Corey, L. & Geballe, A. P. Functional analysis of the human cytomegalovirus US28 gene by insertion mutagenesis with the green fluorescent protein gene. *J. Virol.* **72**, 8158-8165 (1998).

134. Vink, C., Beuken, E. & Bruggeman, C. A. Complete DNA sequence of the rat cytomegalovirus genome. *J. Virol.* **74**, 7656-7665 (2000).

135. Vink, C., Smit, M. J., Leurs, R. & Bruggeman, C. A. The role of cytomegalovirus-encoded homologs of G protein-coupled receptors and chemokines in manipulation of and evasion from the immune system. *J. Clin. Virol.* **23**, 43-55 (2001).

136. Vischer, H. F., Leurs, R. & Smit, M. J. HCMV-encoded G-protein-coupled receptors as constitutively active modulators of cellular signaling networks. *Trends Pharmacol. Sci.* **.**, (2005).

137. Vischer, H. F., Vink, C. & Smit, M. J. A viral conspiracy: hijacking the chemokine system through virally encoded pirated chemokine receptors. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **303:121-54.**, 121-154 (2006).

138. Wahren, B., Ruden, U., Gadler, H., Oberg, B. & Eriksson, B. Activity of the cytomegalovirus genome in the presence of PPi analogs. *J. Virol.* **56**, 996-1001 (1985).

139. Waldhoer, M., Kledal, T. N., Farrell, H. & Schwartz, T. W. Murine cytomegalovirus (CMV) M33 and human CMV US28 receptors exhibit similar constitutive signaling activities. *J Virol.* **76**, 8161-8168 (2002).

140. Waldhoer, M. *et al.* The Carboxyl Terminus of Human Cytomegalovirus-encoded 7 Transmembrane Receptor US28 Camouflages Agonism by Mediating Constitutive Endocytosis. *J. Biol. Chem.* **278**, 19473-19482 (2003).

141. Wang, X., Huang, D. Y., Huong, S. M. & Huang, E. S. Integrin alphavbeta3 is a coreceptor for human cytomegalovirus. *Nat Med.* **11**, 515-521 (2005).

142. Wang, X., Huong, S. M., Chiu, M. L., Raab-Traub, N. & Huang, E. S. Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus. *Nature.* **424**, 456-461 (2003).

143. Weigand, M., Hantel, P., Kreienberg, R. & Waltenberger, J. Autocrine vascular endothelial growth factor signalling in breast cancer. Evidence from cell lines and primary breast cancer cultures in vitro. *Angiogenesis.* **8**, 197-204 (2005).

144. Wess, J. G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition. *FASEB J.* **11**, 346-354 (1997).

145. Weston, K. & Barrell, B. G. Sequence of the short unique region, short repeats, and part of the long repeats of human cytomegalovirus. *J Mol Biol.* **20;192**, 177-208 (1986).

146. Wiesner, D. Diplomarbeit: Rekonstitution und Charakterisierung eines replikationsfähigen, klinischen Zytomegalievirus. (2003).

147. Yu, D., Silva, M. C. & Shenk, T. Functional map of human cytomegalovirus AD169 defined by global mutational analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 12396-12401 (2003).

148. Yurochko, A. D. *et al.* The human cytomegalovirus UL55 (gB) and UL75 (gH) glycoprotein ligands initiate the rapid activation of Sp1 and NF-kappaB during infection. *J Virol.* **71**, 5051-5059 (1997).

149. Zhen, Z., Bradel-Tretheway, B., Sumagin, S., Bidlack, J. M. & Dewhurst, S. The Human Herpesvirus 6 G Protein-Coupled Receptor Homolog U51 Positively Regulates Virus Replication and Enhances Cell-Cell Fusion In Vitro. *J. Virol.* **79**, 11914-11924 (2005).

150. Zhou, Y. F. *et al.* Association between prior cytomegalovirus infection and the risk of restenosis after coronary atherectomy. *N. Engl. J Med.* **335**, 624-630 (1996).

151. Zhou, Y. F. *et al.* Cytomegalovirus infection of rats increases the neointimal response to vascular injury without consistent evidence of direct infection of the vascular wall. *Circulation* **100**, 1569-1575 (1999).

152. Zhu, H., Cong, J. P., Mamtora, G., Gingeras, T. & Shenk, T. Cellular gene expression altered by human cytomegalovirus: global monitoring with oligonucleotide arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 14470-14475 (1998).

Danksagung

Für den erfolgreichen Abschluß der vorliegenden Arbeit schulde ich vielen Menschen meinen herzlichen Dank!
An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Detlef Michel danken, der mir viel Geduld und Vertrauen entgegengebracht und mich in schwierigen Situationen mit seiner Diskussionsbereitschaft und seinen wertvollen Ratschlägen zum Weitermachen motiviert hat.
Herrn Prof. Dr.Walter Just gilt mein Dank für die unkomplizierte Übernahme des Zweitgutachtens.
Herrn Prof. Dr. Thomas Mertens möchte ich für die freundliche Aufnahme in der Abteilung Virologie danken. Auch für das kritische Lesen dieser Arbeit bin ich sehr dankbar. Seine Bemerkungen im Freitagsseminar werden mir fehlen.
Meinen Eltern und meiner Familie möchte ich für die vielfache Unterstützung über all die Jahre danken. Euer Anteil war grösser als Ihr denkt!
Großen Dank schulde ich meinen Kollegen, die mir in zahlreichen - oft sehr kontrovers geführten - Diskussionen wertvolle Anregungen und fundierte Empfehlungen für meine wissenschaftliche Arbeit gegeben haben.
Hervorheben möchte ich Andreas Schreiber, mit dem ich gemeinsam durch die GPCR-Expressionshölle gegangen bin. Dabei konnte ich lernen, dass geteiltes Leid halbes Leid ist.
Seit dem ersten Semester teilen Robert Pretsch und ich denselben Weg. Während meiner Doktorarbeit stand er mir Rat und Tat zur Seite und hat mich immer wieder mit seinen Spässen aufgeheitert, wenn es nötig war.
Giada Frascaroli ist die gute Seele der Abteilung. Sie hat viel für das allgemeine Wohlbefinden während meiner Zeit in der Virologie beigetragen, wenn auch häufig durch Schokolade!
Mit Jens von Einem kam ein neuer Wind in unsere Abteilung. Von ihm konnte ich mir vieles abschauen.

Weiterhin danken möchte ich:
Adam Slusarski, Aleksandar Blagojevic, Andreas Brylka, Anja Braun, Anke Lüske, Anne Stolte, Annette Pretsch, Barbara Reinhardt, Britt König, Carsten Bellan, Christine Mieck, Christoph Stöver, Christopher Buser, Claas Otto, Daria Camozzi, David Maussang, Felix Offermann, Florian Schröder, Heike Wilts, Ho Phi Khanh, Ingrid Bennett, Irena Milotic, Jacqueline Früh, Jens Reuther, Julia Oertel, Jutta Hegler, Katharina Kalinova, Manuela Michel, Marlies Just, Martine Smit, Matthias Richter, Max Marwede, Melanie Riediger, Monika Dürre, Natalie Woityinski, Natascha Bachmann, Nina Blankenhorn, Norbert Gäng, Olesia Sirik, Raffaella Hesse, Ramona Ansorge, Rosalie Quach, Sebastien Chartier, Sonja Steinmann, Sören Zieher, Thomas Brade, Thomas Schmid, Thomas Unsöld, Ton Nu Phuong Nghi, Verena Schulz, Walter Hampl, Viola und Evelyn Prestele.
Und allen anderen die ich vergessen habe!

Jens Michael Holl
Diplom-Biologe
Schützenstrasse 9
89231 Neu-Ulm
☎ 0731-2076438
✉ mail@jensholl.de

CURRICULUM VITAE **Ausbildung**

Promotion

Universitätsklinikum Ulm, Institut für Virologie Abschluss: Dr. hum. biol “Charakterisierung der viralen Chemokinrezeptoren von HCMV”	2002-2006

Diplom-Biologe

Studium der Biologie an der Universität Ulm Abschluss: Diplom-Biologe Note: sehr gut	1997 – 2002
Diplomarbeit im Institut für Virologie Universitätsklinikum Ulm „Mutagenese und Charakterisierung von Zytomegalieviren mit deletierten G-Protein gekoppelten Rezeptorhomologen“	2001 – 2002

Abitur

allgemeine Hochschulreife	1996
Gymnasium in Langenau	1987 – 1996

CURRICULUM VITAE

Veröffentlichungen

Casarosa, P., Y. K. Gruijthuijsen, D. Michel, P. S. Beisser, J. Holl, C. P. Fitzsimons, D. Verzijl, C. A. Bruggeman, T. Mertens, R. Leurs, C. Vink, and M. J. Smit. 2003. Constitutive Signaling of the Human Cytomegalovirus-encoded Receptor UL33 Differs from That of Its Rat Cytomegalovirus Homolog R33 by Promiscuous Activation of G Proteins of the Gq, Gi, and Gs Classes. *J. Biol. Chem.* 278:50010-50023.

Michel, D., I. Milotic, M. Wagner, B. Vaida, J. Holl, R. Ansorge, and T. Mertens. 2005. The human cytomegalovirus UL78 gene is highly conserved among clinical isolates, but is dispensable for replication in fibroblasts and a renal artery organ-culture system. *J Gen Virol* 86:297-306.

Maussang, D., D. Verzijl, M. van Walsum, R. Leurs, J. Holl, O. Pleskoff, D. Michel, G. van Dongen and M.J. Smit. 2006. Human cytomegalovirus-encoded chemokine receptor US28 promotes tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Aug 21; [Epub ahead of print]

Neu-Ulm, 02.01.2007