

**Charakterisierung des immunmodulatorischen Gens
modB7-2 des murinen Cytomegalovirus**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Diplom-Biologe Christoph Jakob Peter

geboren am 09.04.1982 in Wadern

2012

Referent: Prof. Dr. Martin Messerle

Korreferent: Prof. Dr. Roland Jacobs

Tag der Promotion: 27.06.12

Zusammenfassung

Sowohl das humane Cytomegalovirus als auch das eng verwandte murine Cytomegalovirus (MCMV) besitzen verschiedene Mechanismen, um das Immunsystem des Wirts zu manipulieren und so der Immunantwort entgegenzuwirken. Mehrere Mechanismen beeinflussen die Antigenpräsentation über MHC-I-Moleküle sowie die Expression der für die T-Zellstimulation wichtigen kostimulatorischen Moleküle. Das MCMV-Protein modB7-2 ist für die Verringerung der Oberflächenexpression des kostimulatorischen Moleküls CD86 in Antigen-präsentierenden Zellen (APC) verantwortlich. Der Mechanismus der Reduzierung der CD86-Expression ist bisher jedoch nicht bekannt.

Ziel dieser Arbeit war es, Einblick in den Mechanismus der modB7-2-abhängigen CD86-Modulation zu gewinnen. Dazu wurde die Expression von modB7-2 näher charakterisiert und das Schicksal von CD86 bei MCMV-Infektion untersucht. Die Ergebnisse zur Aktivität von modB7-2 in der dendritischen Zelllinie DC2.4 unterschieden sich von den zuvor berichteten Erkenntnissen mit der Makrophagen-Zelllinie RAW264.7; die Daten in dieser Arbeit weisen auf einen weiteren, zu modB7-2 additiv wirkenden Mechanismus zur Modulation der CD86-Expression in DC2.4-Zellen hin. Die Ergebnisse zur Aktivität von modB7-2 unabhängig von der MCMV-Infektion deuten zudem auf die Beteiligung weiterer MCMV-Proteine hin. Nach MCMV-Infektion von WT3-Fibroblasten, welche stabil CD86 exprimieren, konnte keine modB7-2-spezifische Verminderung der CD86-Oberflächenexpression detektiert werden. Dies spricht für eine Beteiligung eines zellulären Faktors in APC.

Untersuchungen zum Translationsstart des modB7-2-Gens ergaben, dass die Synthese des modB7-2-Proteins am dritten der drei *in frame* vorhandenen potentiellen Startkodons im modB7-2-ORF initiiert wird. Das erste Exon des modB7-2-ORFs wird nicht translatiert, das Vorhandensein des Exons ist aber für die volle Funktion des modB7-2-Proteins essentiell. Konfokale Mikroskopie-Analysen zeigten, dass die Hauptmenge von modB7-2 hauptsächlich im Golgi-Apparat zu finden ist. Dass ein *Acidic Clusters* in der modB7-2-Aminosäuresequenz als Golgi-Retentionssignal dient, konnte allerdings nicht bestätigt werden.

Mittels FACS-Analysen wurde gezeigt, dass modB7-2 einen Einfluss auf die schon zum Infektionszeitpunkt auf der Oberfläche von DC2.4-Zellen vorhandenen CD86-Moleküle hat. Nach Internalisierung durch Clathrin-abhängige Endozytose wird CD86 nicht intrazellulär gespeichert, sondern wahrscheinlich in Lysosomen degradiert.

Die Ergebnisse dieser Arbeiten deuten auf einen komplexen Regulationsmechanismus der modB7-2-Translation und die Beteiligung weiterer MCMV- sowie zellulärer Proteine an der modB7-2-abhängigen Endozytose von CD86 in DC2.4-Zellen und der anschließenden Degradation hin.

Schlagwörter: MCMV, CD86, Immunmodulation

Abstract

Both the human cytomegalovirus and the closely related murine cytomegalovirus (MCMV) have developed several mechanisms to interfere with the immune system of the host in order to evade an effective immune response. Several mechanisms target antigen-presentation via MHC-I molecules and the expression of co-stimulatory molecules that are important for activation of T cells. The MCMV-protein modB7-2 was shown to downregulate surface-CD86 in infected antigen-presenting cells (APC). To date, no mechanism responsible for the modB7-2-dependent downmodulation of CD86 has been identified.

The aim of this study was to obtain insight in the machinery behind the downmodulation of CD86 in infected APC. Therefore, the expression of modB7-2 was characterized and the fate of CD86 in infected cells was investigated. The activity of modB7-2 in dendritic cells differed from the previous results discovered with the macrophage-like cell line RAW264.7. The results of this study indicated the involvement of one or more additional pathways in the downregulation of CD86. Furthermore, expression experiments with modB7-2 independently of other MCMV-proteins using a lentiviral-based transduction system suggested the participation of at least one more MCMV protein in the modB7-2-dependent downregulation of CD86. In MCMV-infected fibroblasts stably expressing CD86 no modB7-2-specific effect on CD86 surface expression was observed pointing to the involvement of a cellular factor in APC.

Analysis of translation initiation revealed that the third of the three start codons *in frame* is used for synthesis of the modB7-2 protein, and the first exon of the modB7-2 gene was found to be essential for the complete function of the modB7-2 protein, although the exon is not translated. Confocal microscopy studies showed that modB7-2 mainly resides in the Golgi-apparatus during infection; the hypothesis that an *Acidic Cluster* served as Golgi-retention signal could not be verified.

Flow cytometry experiments showed that modB7-2 affects CD86-molecules already present on the surface of DC2.4-cells at the time point of infection. Furthermore, the results implicated that the internalization of CD86 is clathrin dependent and that CD86 is probably degraded in the lysosomal compartment and is not stored intracellularly.

The results of this study indicate a complex mechanism in the regulation of the modB7-2 translation and suggest the involvement of one or more MCMV and cellular proteins in the internalization and degradation of CD86 in MCMV-infected DC2.4-cells.

Keywords: MCMV, CD86, immunomodulation

Danksagung

Diese Arbeit wurde am Institut für Virologie, Medizinische Hochschule Hannover, in der Arbeitsgruppe von Prof. Martin Messerle angefertigt. Ich bedanke mich bei Prof. Martin Messerle ganz besonders dafür, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Dissertation in seiner Arbeitsgruppe ausarbeiten zu können.

Bei Prof. Roland Jacobs, Abteilung für Klinische Immunologie und Rheumatologie, Medizinische Hochschule Hannover, bedanke ich mich herzlich für die Übernahme des Korreferates. Herrn Prof. Edgar Maiss vom Institut für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz der Leibniz-Universität Hannover danke ich sehr für die Übernahme des Disputations-Vorsitzes.

Besonderer Dank gilt Dr. Penelope Kay-Fedorov für ihre Unterstützung und Förderung während meiner ganzen Tätigkeit in der AG Messerle. Ich bedanke mich, dass sie für jede Frage eine Antwort sowie für jedes Problem mindestens eine Lösung finden konnte. Außerdem gilt mein Dank Lars Steinbrück, der mir jederzeit mit seinem technischen Wissen und als Freund zur Verfügung stand.

Auch möchte ich mich bei allen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern und Kollegen der AG Messerle für die Hilfsbereitschaft und die ausgiebigen Diskussionen. Ich danke auch allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Virologie für ihre Hilfsbereitschaft und die gute Arbeitsatmosphäre.

Ganz besonders möchte ich mich bei Thorsten Ziegler bedanken, der mir jederzeit während der ganzen Promotion zur Seite stand, mich in jeglicher noch so schwierigen Situation unterstützte und immer an mich glaubte. Auch Dr. Natalie Motsch danke ich für ihren Beistand und dafür, dass das Telefon immer griffbereit zu liegen schien. Herzlicher Dank gilt auch Dr. Tina Ganzenmüller, Jeanette Kluba, Dr. Dominik Schneider und allen anderen, die mich stets begleitet und den Abschluss meiner Promotion ganz individuell unterstützt haben.

Außerdem möchte ich mich auch sehr bei meinen Eltern und meiner Schwester für ihre Hilfe und Unterstützung bedanken und dafür, dass sie immer für mich da waren.

Danke

Inhalt

Kapitel 1	Einleitung.....	1
1.1	Die Familie der Herpesviren	1
1.2	Das humane Cytomegalovirus –Aufbau, Replikation und Tropismus	2
1.3	Klinische Bedeutung von HCMV	6
1.4	Das murine Cytomegalovirus – ein Modell zur experimentellen Untersuchung der CMV-Infektion	8
1.5	Immunantwort gegen CMV	9
1.6	Mechanismen der Immunmodulation von HCMV	12
1.7	Immunmodulatorische Mechanismen von MCMV	14
1.8	Funktion und Regulation des kostimulatorischen Moleküls CD86.....	17
1.9	Internalisation von Membranproteinen über Clathrin-vermittelte Endozytose.....	20
1.10	Modulation der CD86-Oberflächenexpression durch das MCMV-Protein modB7-2.....	22
1.11	Zielsetzung der Arbeit	25
Kapitel 2	Material und Methoden	27
2.1	Material	27
2.1.1	Reagenzien und Chemikalien	27
2.1.2	Laborgeräte und Verbrauchsmaterial	27
2.1.3	Bakterienstämme	28
2.1.4	Zellen	28
2.1.5	Antibiotika	29
2.1.6	Inhibitoren	29
2.1.7	Antikörper.....	30
2.1.8	Plasmide und BACs (<i>bacterial artificial chromosomes</i>).....	31
2.1.9	Kodon-optimierte Variante von modB7-2.....	33
2.1.10	Sonstige Hilfsmittel.....	33
2.2	Kultivierung bakterieller und eukaryotischer Zellen	34
2.2.1	Kultivierung bakterieller Zellen	34
2.2.2	Kryokonservierung bakterieller Zellen	34
2.2.3	Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	34
2.2.4	Kryokonservierung und Auftauen eukaryotischer Zellen.....	35
2.2.5	Zellzahlbestimmung eukaryotischer Zellen.....	36

2.3	Molekularbiologische Methoden	36
2.3.1	Herstellung elektrokompenter Bakterien	36
2.3.2	Elektroporation von elektrokompenten Bakterien.....	36
2.3.3	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i> –in kleinem Maßstab	37
2.3.4	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i> – in großem Maßstab	38
2.3.5	BAC-Präparation aus <i>E.coli</i> –in kleinem Maßstab	38
2.3.6	BAC-Präparation aus <i>E.coli</i> - in großem Maßstab	39
2.3.7	Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA	39
2.3.8	Restriktion von Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen	39
2.3.9	Restriktion von BAC-DNA mit Restriktionsendonukleasen	39
2.3.10	Dephosphorylierung und Ligation von DNA.....	40
2.3.11	Agarose-Gelelektrophorese	41
2.3.12	Rückgewinnung von DNA aus dem Agarosegel.....	42
2.3.13	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	42
2.3.14	Quick Mutagenese.....	43
2.3.15	Sequenzierung von DNA.....	45
2.3.16	Transfektion eukaryotischer Zellen mit Ca_2PO_4	45
2.3.17	Luziferase-Assay	45
2.4	Protein-Biochemische Methoden	46
2.4.1	Herstellung von Zelllysaten	46
2.4.2	Bestimmung der Proteinkonzentration von Zelllysaten.....	46
2.4.3	Proteolytische Behandlung von Zelloberflächenproteinen mit Pronase	47
2.4.4	Untersuchung des Verbleibs von CD86 in MCMV-WT infizierten DC2.4-Zellen mit Pronase	48
2.4.5	Endoglykosidase H (Endo H)-Behandlung	48
2.4.6	PNGase F-Behandlung	48
2.4.7	Dephosphorylierung von Proteinlysaten.....	49
2.4.8	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	49
2.4.9	Western Blot.....	50
2.4.10	Entfernung von Antikörpern von der Nitrozellulosemembran	52
2.5	Immunfluoreszenz-Mikroskopie.....	52
2.5.1	Beschichtung von Deckgläschen mit Poly-L-Lysin	52
2.5.2	Immunfluoreszenzfärbung	52
2.6	FACS-Analysen.....	54

2.6.1	FACS-Färbung zur Bestimmung der CD86-Menge auf der Zelloberfläche nach Infektion	54
2.6.2	FACS-Färbung zur Bestimmung des Einflusses von modB7-2 auf die vor Infektion auf der Zelloberfläche vorhandene CD86-Menge	55
2.6.3	Zellsortierung.....	56
2.7	Virologische Methoden	56
2.7.1	Infektion muriner Zellen mit MCMV	56
2.7.2	Herstellung von Virusstocks	56
2.7.3	Virustiterbestimmung durch Plaque Assays.....	57
2.7.4	Produktion von Viruspartikeln aus BAC-DNA.....	58
2.8	Modifizierung von BACs durch Flp-vermittelte Rekombination	59
2.9	Herstellung lentiviraler Expressionsvektoren.....	61
2.9.1	Klonierung lentiviraler Vektoren	61
2.9.2	Produktion von Lentiviren	62
2.9.3	Lentivirale Transduktion.....	63
2.9.4	Bestimmung lentiviraler Titer.....	63
Kapitel 3	Ergebnisse.....	64
3.1	Aktivität von modB7-2 in der murinen Monozyten-/Makrophagen Zelllinie RAW264.7	64
3.2	Effekt von modB7-2 auf die CD86-Oberflächenexpression in Fibroblasten.....	65
3.3	Verminderung der CD86-Oberflächenexpression in der dendritischen Zelllinie DC2.4.....	68
3.4	Untersuchungen zur Verwendung verschiedener Startkodons für die Synthese des modB7-2-Proteins	71
3.5	Mögliche Funktion des ersten Exons für die Expression des modB7-2-Gens	77
3.6	Aktivität von modB7-2 unabhängig vom Viruskontext	80
3.7	Lokalisation von modB7-2 innerhalb MCMV-infizierter Zellen	86
3.8	Sequenzmotive in der modB7-2-Aminosäuresequenz.....	91
3.9	Oberflächenexpression und posttranslationale Modifikationen von modB7-2.....	95
3.10	Einfluss von modB7-2 auf die zum Zeitpunkt der Infektion auf der Zelloberfläche vorhandenen CD86-Moleküle	102
3.11	Vergleich der Gesamt-CD86-Proteinmenge infizierter versus nicht-infizierter DC2.4-Zellen	105
3.12	Vergleich der Gesamt-CD86-Menge mit der intrazellulären CD86-Menge.....	108
3.13	Inkubation infizierter DC2.4-Zellen mit Proteasom- und Lysosom-Inhibitoren verhindern die CD86-Degradation	111
3.14	Die CD86-Internalisation infizierter DC2.4-Zellen erfolgt über Clathrin-abhängige Endozytose	114

Kapitel 4	Diskussion.....	118
4.1	Auswirkung der modB7-2-Expression auf die CD86-Oberflächenexpression bei MCMV-Infektion von WT3-Fibroblasten und DC2.4-Zellen.....	119
4.2	Startkodons für die Initiation der modB7-2-Proteinsynthese.....	122
4.3	Potentielle Funktion des ersten Exons des modB7-2-Gens	127
4.4	Expression und Aktivität von modB7-2 außerhalb des Viruskontextes	129
4.5	Subzelluläre Lokalisation von modB7-2 und potentielle Funktion des <i>acidic clusters</i>	130
4.6	Einfluss von modB7-2 auf die zum Zeitpunkt der Infektion auf der Zelloberfläche vorhandenen CD86-Moleküle	133
4.7	Degradation internalisierter CD86-Rezeptoren in den Lysosomen	134
4.8	Mechanismen der CD86-Internalisation in MCMV-infizierten DC2.4-Zellen	136
4.9	modB7-2-abhängige CD86-Internalisation – ein Modell.....	137
Kapitel 5	Literaturnachweise.....	140

Kapitel 1 EINLEITUNG

1.1 DIE FAMILIE DER HERPESVIREN

Die Familie der *Herpesviridae* umfasst eine große Gruppe von Viren, die ubiquitär bei Vertebraten gefunden wird. Charakterisiert sind sie unter anderem durch ein sehr großes, doppelsträngiges DNA-Genom, welches umhüllt vorliegt und je nach Herpesvirus 125-235 kb umfassen kann. Die virale Genexpression ist bei Herpesviren in einer Kaskade mit drei Klassen gestaffelt: Die Funktion der zuerst exprimierten sehr frühen (*immediate early*) Gene liegt in der Regulation der folgenden frühen (*early*) und wahrscheinlich auch der späten (*late*) Gene. Die frühen Gene werden u. a. zur Synthese der viralen DNA oder der Kapsid-Reifung benötigt. Die letzte Klasse, die Gruppe der späten (*late*) Gene, reguliert die Verpackung der viralen DNA, die Reifung des Virions und seine Freisetzung. Alle Herpesviren vereinen die Fähigkeit, ihren Wirt latent zu infizieren. In latent infizierten Zellen ist das Genom im Zellkern lokalisiert, und es werden - wenn überhaupt - nur sehr wenige Gene exprimiert. Während der latenten Infektion treten kaum oder keine Symptome auf; nach einer Reaktivierung kommt es dann zur Virusreplikation und unter Umständen zum erneuten Ausbruch von Krankheiten. Die Herpesviren besetzen verschiedene biologische Nischen im Bezug auf die Orte der Primärinfektion und Latenz, und verursachen folglich eine große Bandbreite an klinischen Symptomen (Shukla und Spear, 2001; Boehmer und Nimonkar, 2003; Mocarski et al., 2007)

Die Gruppe der humanen Herpesviren umfasst acht Vertreter, welche nochmals in α -, β - und γ -Herpesviren unterteilt werden. Die neurotrophen Viren Herpes simplex Virus Typ 1 und Typ 2 (HSV-1 und HSV-2) und das Varizella-Zoster-Virus (VZV) gehören zu den α -Herpesviren (Modrow 2003, Zamora, 2011). Die HSV-1-Infektion erfolgt über den oralen Weg. Ein Symptom ist die Entstehung von Fieberbläschen, dem sog. Herpes labialis; bei Infektion der Cornea kann allerdings zudem eine Keratitis entstehen, die unbehandelt auch zur Erblindung führen kann (Zamora, 2001; Atherton und Cathcart, 2011, Kaye und Choudhary, 2006). HSV-2 wird durch Sexualkontakte übertragen; eine Infektion resultiert in schmerzhaften Bläschen und Geschwüren, die sich auf den Schleimhäuten des Genital- und Perianalbereiches bilden können (Zamora, 2011). Beim Varizella-Zoster-Virus erfolgt die Primärinfektion meist schon im Kindesalter und verursacht die bekannten Windpocken, sogenannte Varizellen. Später folgende Reaktivierung resultiert in Herpes zoster, auch Gürtelrose genannt, welche durch Ausbildung eines schmerzhaften Hautausschlages charakterisiert ist (Gnann und Whitley, 2002).

Zu den β -Herpesviren gehören das Cytomegalovirus und die humanen Herpesviren 6 und 7 (Mocarski et al., 2007). Symptome der HHV-6-Infektion sind hohes Fieber von drei bis sieben Tagen Dauer und Hautausschlag, auch als Roseola infantum oder Exanthema subitum bezeichnet. HHV-7, welches 85 % Sequenzhomologie zu HHV-6 aufweist, kann auch wie HHV-6 T-Lymphozyten infizieren, wird aber zusätzlich in der Speicheldrüse gefunden (Zamora, 2011). Symptome der Primärinfektion sind auch bei HHV-7 Fieber sowie Exanthema subitum, während die Langzeitinfektion asymptomatisch verläuft (Zamora, 2011; Tanaka et al., 1994). Auf den dritten Vertreter der β -Herpesviren, das Cytomegalovirus, wird im Detail im nächsten Abschnitt eingegangen.

Das Epstein-Barr-Virus (EBV) und das Kaposi-Sarkom assoziierte Herpesvirus (KSHV) sind die einzigen humanpathogenen Vertreter der γ -Herpesviren (Mocarski et al., 2007). Das Epstein-Barr-Virus wurde 1964 durch Epstein und Barr als erstes humanes Tumorstoff bekannt, welches in kultivierten Lymphoblasten des Burkitt-Lymphoms identifiziert werden konnte (Epstein et al., 1964); hauptsächlich werden B-Lymphozyten und Epithelzellen von EBV infiziert. Ein Krankheitsmerkmal EBV-infizierter Personen ist die infektiöse Mononucleose (Pfeiffersches Drüsenfieber); auch wird EBV als Auslöser des Burkitt-Lymphoms gehandelt. Das Hodgkin-Lymphom sowie das Nasopharynx-Karzinom sind ebenfalls EBV-assoziierte Krankheiten. Mehr als 90 % der EBV-Infizierten bleiben allerdings symptomlos (Saha und Robertson, 2011; Middeldorp et al., 2002).

KSHV wurde in AIDS-assoziiertem Kaposi-Sarkom im Jahre 1994 identifiziert (Chang et al., 1994). Später wurde auch das primäre Effusionslymphom (Cesarman et al., 1995) und die Castleman-Krankheit (Soulier et al., 1995) als KSHV-assoziiert beschrieben. Hauptübertragungsweg von KSHV ist die Speichelflüssigkeit; auch Sexualkontakte und Blut sowie Blutprodukte werden als Transmissionsweg diskutiert (Uldrick und Whitby, 2011; Hladik et al., 2006). Die Prävalenz liegt in Afrika über 50 %, während sie in den meisten Ländern Europas, USA und Asiens 10 % nicht überschreitet.

1.2 DAS HUMANE CYTOMEGALOVIRUS –AUFBAU, REPLIKATION UND TROPISMUS

Das humane Cytomegalovirus stellt den Prototypen unter den β -Herpesviren dar. Es besitzt mit ca. 240 kb das größte Genom unter den Herpesviren und kodiert für mindestens 166 Gene, wobei nur höchstens etwa 80 Gene essentiell sind, die übrigen Gene dienen wohl zur Beeinflussung der Wirtszelle. Allerdings sind nur 70 Protein-kodierende Regionen in allen Genomen der β -Herpesviren konserviert (Davison et al., 2003; Mocarski et al., 2007; Kalejta, 2008).

Das HCMV-Virion mit einem Durchmesser von etwa 200-300 nm hat eine typische Herpesvirus-Struktur: Die doppelsträngige lineare DNA ist in ein Nukleokapsid mit ikosahedraler Struktur eingebettet, welches aus fünf HCMV-core-Proteinen besteht (Mocarski et al., 2007). Um das Nukleocapsid herum befindet sich eine Matrix, welche auch als Tegument bezeichnet wird. Das Tegument seinerseits besteht aus mindestens 30 HCMV-Proteinen, aber auch zelluläre Proteine sowie RNA konnten nachgewiesen werden (Kalejta, 2008; Varnum et al., 2004; Terhune et al., 2004). Das Tegument ist wiederum von einer Lipidschicht - dem *Envelope* - umhüllt, die als vom *trans*-Golgi Netzwerk (TGN) abstammend beschrieben wurde (Mocarski et al., 2007). Neueren Erkenntnissen zufolge beinhaltet die Virushülle allerdings sowohl Marker des TGN als auch des endozytotischen Transportweges, so dass das HCMV-Envelope auch von Membranen aus Vesikeln stammen könnte (Cepeda et al., 2009; Homman-Loudiyi et al., 2003). In diese Membran sind wahrscheinlich mehr als 20 verschiedene Virus-kodierte Glycoproteine eingelagert (Mocarski et al., 2007). Ein elektronenmikroskopisches Bild des HCMV-Partikels und der schematische Aufbau eines HCMV-Virions sowie die Struktur des Nukleokapsids sind in Abbildung 1.1 gezeigt.

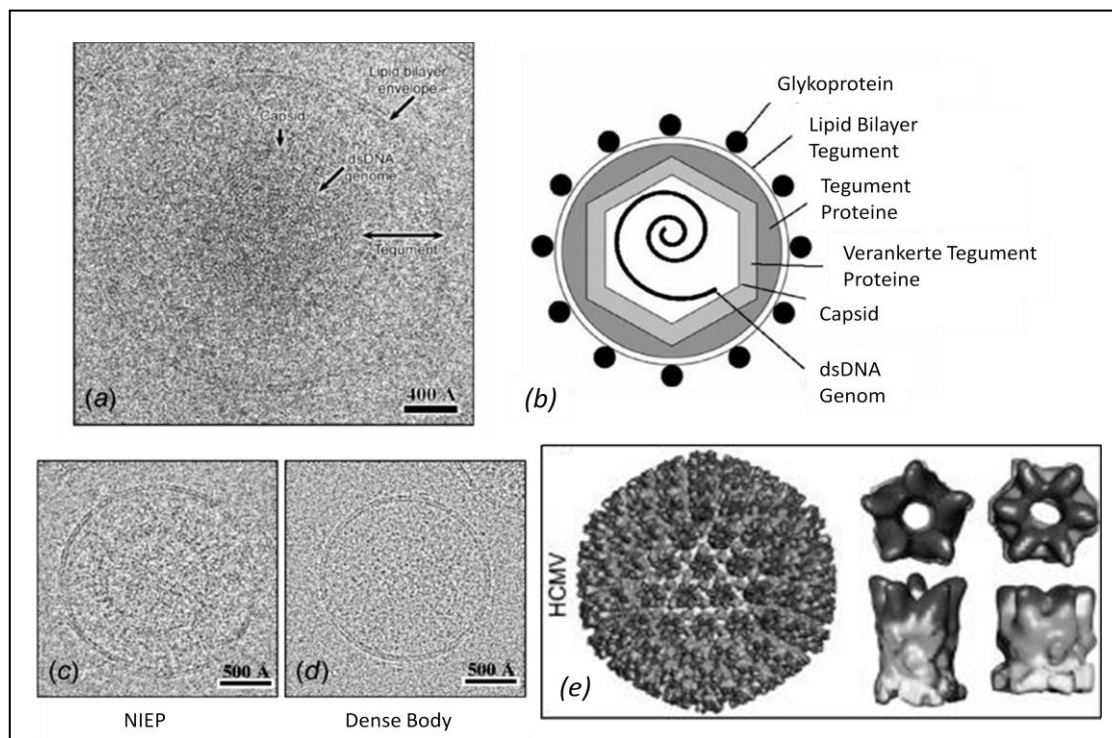


Abbildung 1.1 Aufbau und Struktur des HCMV-Virions

Dargestellt sind die Elektronen-Kryomikrographien eines HCMV-Partikels (a), eines nicht-infektiösen umhüllten Partikels NIEP (c) und eines Dense Bodies (d). In (b) ist der schematische Aufbau eines HCMV-Virions skizziert. (e) stellt die dreidimensionale Struktur des Kapsids von HCMV dar, daneben sind ein Penton (Mitte) und ein Hexamer im Vergleich gezeigt. Die Auflösung beträgt 35 Å (verändert nach Liu und Zhou, 2007)

Die CMV-Replikation läuft über einen mehrstufigen Prozess ab: Nachdem das Viruspartikel durch direkte Fusion mit der Zellmembran oder durch Endozytose aufgenommen wurde, wird das Viruskapsid - im Falle der Endozytose noch durch Fusion mit der Endosomenmembran ins

Cytoplasma freigesetzt - über Mikrotubuli zum Zellkern transportiert. Die virale DNA wird über die Kernporen in den Nukleus entlassen. Nach der Replikation durch den „*rolling circle*“-Mechanismus erfolgt der Zusammenbau des Viruskapsides und dieses tritt dann über die innere Kernmembran in den perinukleären Raum ein, wodurch die erste Membranhülle erfolgt. Anschließend wird das Kapsid durch Fusion mit der äußeren Kernmembran in das Cytoplasma entlassen, wobei die Membranhülle wieder entfernt wird (zusammengefasst in Mettenleiter et al., 2006 und Mocarski et al., 2007). Nach Anlagerung der Tegumentproteine erhält das Kapsid seine endgültige Membranhülle durch Abschnürung in Vesikel, die sich zwischen TGN und Endosomen befinden (Cepeda et al., 2009). Diese Vesikel werden dann zur Plasmamembran transportiert und setzen dort durch Fusion mit der Zellmembran die reifen Viren in den Extrazellularraum frei. Eine schematische Darstellung des Replikationszyklus von HCMV ist in Abbildung 1.2 gezeigt.

Bei der Virusreplikation in der Zelle werden allerdings nicht nur reife, infektiöse Viruspartikel gebildet, es entstehen auch eine Vielzahl unreifer bzw. defekter Partikel, denen z. B. das Nukleokapsid komplett fehlt oder in denen keine DNA eingelagert wurde (siehe Abbildung 1.1 (c) und (d)). Diese werden bei Fehlen viraler DNA als nicht-infektiöse umhüllte Partikel (NIEP) oder bei Fehlen des kompletten Nukleokapsids als *Dense Bodies* bezeichnet (Imiere und Gibson, 1983; Mocarski et al., 2007).

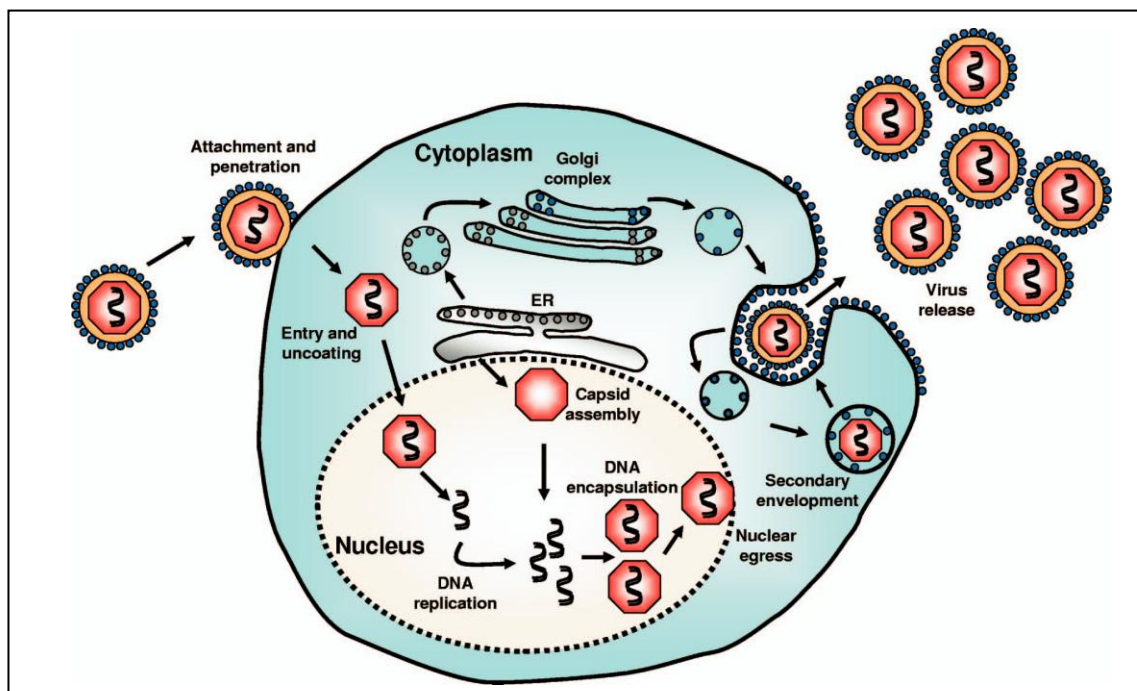


Abbildung 1.2 Schematische Darstellung des Replikationszyklus von HCMV

Nach Aufnahme des Virus und der Freisetzung des Kapsids ins Cytoplasma wird die virale DNA in den Zellkern entlassen, wo die Replikation der Virus-DNA stattfindet. Anschließend wird die DNA in die neusynthetisierten Kapside verpackt, ins Cytoplasma entlassen und mit der endgültigen Membran umhüllt. Die Freisetzung reifer CMV-Virionen erfolgt durch Exocytose an der Plasmamembran (übernommen aus Crough und Khanna, 2009). Für weiterführende Erklärungen siehe Text.

CMV zeigt strenge Wirtsspezifität *in vivo* und kann ein breites Spektrum an Zelltypen infizieren. So können sowohl Epithel- als auch Endothelzellen infiziert werden, und auch Fibroblasten, Muskelzellen sowie Hepatozyten sind permissiv für CMV. Des Weiteren können u. a. bestimmte Leukozyten - darunter auch Monozyten, Makrophagen und Dendritische Zellen - sowie Neurone und Gliazellen von CMV infiziert werden (Revello und Gerna, 2010; Sinzger et al., 2008). Diese breite Zellspezifität lässt auf einen weit verbreiteten Rezeptor schließen, oder auf mehrere Glykoproteine in der CMV-Membran, die den Kontakt zu unterschiedlichen Rezeptoren auf den genannten Zelltypen vermitteln. Obwohl schon mehrere Zelloberflächenproteine vorgeschlagen wurden, die beim CMV-Eintritt in die Zelle eine Rolle spielen (u.a. der *platelet-derived growth-factor-receptor alpha* PDGRF- α , Integrin $\alpha\beta 3$, EGF-Rezeptor sowie Annexin II), ist bis heute noch kein Rezeptor sicher identifiziert worden (Soroceanu et al., 2008; Wang et al., 2005; Wang et al., 2003; Wright et al., 1994). Auch auf Seiten des Virus wurden verschiedene Glykoproteine identifiziert (z. B. gB, gH, gL, gM und gN), die beim Zelleintritt eine Rolle spielen (Mocarski et al., 2007; Isaacson et al., 2009). Heute wird vermutet, dass gH/gL-Komplexe für die Bindung an die Zelloberflächenrezeptoren verantwortlich sind. Die Expression des gH/gL/gO-Komplexes erlaubt die Infektion von nur wenigen Zelltypen wie Fibroblasten und neuronalen Zellen. Monozyten und dendritische Zellen sowie Endothel- und Epithelzellen können dagegen nur infiziert werden, wenn das Virus den Komplex aus

gH/gL/UL(128,130,131A) exprimiert (Hahn et al., 2004; Wang et al., 2005; Gerna et al., 2005; Adler et al., 2006; Scrivano et al., 2011).

1.3 KLINISCHE BEDEUTUNG VON HCMV

Die Seroprävalenz von HCMV in der Bevölkerung liegt bei 50 – 90 %, dies variiert je nach Land und sozioökonomischem Status. Generell lässt sich sagen, dass in Entwicklungsländern die Prävalenz der HCMV-Infektion größer ist und dass dort die CMV-Infektion früher im Leben eines Menschen eintritt (Mocarski et al., 2007).

Die Übertragung erfolgt über den Kontakt mit Körperflüssigkeiten von Personen, die Virus ausscheiden; die Transmission erfolgt nicht über den Luftweg. Nach einer primären CMV-Infektion kann Virus im Urin und Speichel, in der Tränenflüssigkeit, in der Muttermilch, in Cervixsekreten und dem Sperma detektiert werden, und dies noch nach Monaten und manchmal auch noch nach Jahren. Somit ist die Wahrscheinlichkeit einer CMV-Infektion zum Einen durch Geschlechtsverkehr mit häufig wechselnden Partnern erhöht. Zum Anderen tritt die Virusausbreitung verstärkt in Einrichtungen auf, in denen viele Kleinkinder und Kinder anzutreffen sind, wie z. B. in Kinderkrippen, Kindergärten und Schulen, da hier der Kontakt mit Körperflüssigkeiten fast unvermeidlich ist (Mocarski et al., 2007).

Neben den genannten horizontalen Übertragungswegen von CMV ist auch eine vertikale Transmission möglich; mit diesem Übertragungsweg stellt CMV zusammen mit VZV eine Besonderheit unter den humanen Herpesviren dar (Mocarski et al., 2007, Gardella und Brown, 2007). Dabei kann HCMV transplazentar intrauterin übertragen werden, oder die Infektion erfolgt während der Geburt oder danach über die Muttermilch. Die intrauterine Transmissionsrate liegt dabei bei bis zu 40 % im Falle einer Primärinfektion; kommt es während der Schwangerschaft zu einer Reaktivierung von CMV, liegt die Transmissionsrate wahrscheinlich aufgrund der schon vorhandenen humoralen und zellvermittelten Immunantwort bei nur etwa 1 % (Revello und Gerna, 2004). Dem vertikalen Infektionsweg wird eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der Infektion innerhalb der Bevölkerung zugeschrieben. Die transplazentare und die neonatale Infektion können zu Schäden des ZNS führen, die sich u. a. als Mikrocephalus, Lethargie, Taubheit und Lernbehinderungen sowie Chorioretinitis manifestieren. In schweren Fällen kann die CMV-Infektion bei diesen Kindern auch tödlich verlaufen (Mocarski et al., 2007). In der Tat wurde 1999 aufgrund einer Studie des *US Institute of Medicine* der Entwicklung eines Impfstoffes gegen HCMV höchste Priorität eingeräumt (Arvin et al., 2004)

In Personen mit intaktem Immunsystem verläuft die CMV-Infektion meistens symptomlos. Nach der Primärinfektion geht das Virus in den Zustand der Latenz über, woraus das Virus sporadisch reaktivieren kann. Die Mechanismen, die zur Latenz und zur späteren Reaktivierung führen, sind bis heute nicht vollständig verstanden (Sinclair und Sisson, 2006; Mocarski et al., 2007). Die symptomatische CMV-Infektion zeigt Merkmale einer Mononukleose, wie sie auch bei einer EBV-Infektion auftreten kann. Charakteristisch sind hierbei Fieber (für mehr als 10 Tage), Müdigkeit, Kopfschmerzen und Unwohlsein, auch Hepatomegalie und Splenomegalie sowie Hautausschlag können Symptome sein. Generell verläuft die symptomatische Infektion mild und heilt von selbst aus; nur in äußerst seltenen Fällen entwickelt sich die CMV-Infektion zu einer schwerwiegenden lebensbedrohlichen Krankheit in immunkompetenten Individuen (Klemola et al., 1965; Eddleston et al., 1997; Mocarski et al., 2007).

Ernsthafte CMV-Infektionen entwickeln sich bei Patienten mit Einschränkungen im Immunsystem wie z. B. bei Transplantat-Empfängern oder AIDS-Patienten. Die schwerwiegendsten CMV-Krankheiten - nach der kongenitalen Infektion - wurden in AIDS-Patienten beobachtet. Charakteristisch sind hier u. a. die CMV-Retinitis sowie die CMV-Encephalitis, Gastritis, Ösophagitis, Pneumonitis und Hepatitis (Ho, 2008; Steininger et al., 2006). Bevor die hoch aktive antiretrovirale Therapie (HAART) eingeführt wurde, entwickelten 20 – 40 % der AIDS-Patienten CMV- assoziierte Erkrankungen (Mocarski et al., 2007); die mittlere Überlebensrate in HIV-Patienten nach Diagnose der CMV-Krankheit lag damals bei 4 – 9 Monaten (Harb et al., 1991; Steininger et al., 2006). Nach Einführung der HAART senkte sich die Inzidenz für CMV-assozierte Krankheiten in HIV-Patienten; das Auftreten der CMV-Retinitis reduzierte sich z. B. von 17,1 % auf 5,6 % pro 100 Patienten im Jahr (Mocroft et al., 2000 und Palella et al., 1998). Dennoch entwickeln HIV-Patienten, die seropositiv für CMV sind, zweieinhalbmal schneller AIDS mit Todesfolge als Seronegative (Webster et al., 1989).

Auch nach Transplantationen stellt die CMV-Infektion ein großes Risiko dar; 75 % der Organempfänger sind im ersten Jahr nach der Transplantation betroffen (Pereyra et al., 2004; Ho, 2008). In einer prospektiven Studie wurde festgestellt, dass 80 % der seronegativen Organempfänger/Rezipienten (R⁻) nach der Transplantation einer Niere von CMV-seropositiven Spendern/Donor (D⁺) selbst seropositiv für CMV wurden (Ho et al., 1975). Risikofaktoren für die CMV-Infektion nach Transplantation stellen somit u. a. der Serostatus des Donors und des Empfängers dar, aber auch die Art der Transplantation spielt eine Rolle. Die CMV-Krankheit kann sich bei Transplantatempfängern in Fieber mit Unwohlsein und systemischer Erkrankung auswirken, aber auch Retinitis, Pankreatitis, Hepatitis und Enzephalitis sogar mit Todesfolge können auftreten. Des Weiteren bleibt die CMV-Infektion bei der Transplantation hämatopoetischer Stammzellen eine der schwerwiegendsten Komplikationen, und Seropositivität für CMV stellt weiterhin ein Risiko für

Transplantation-bedingte Sterblichkeit dar (Ljungman, 2002; Boeckh und Ljungman, 2009; Mocarski et al., 2007).

Die Therapie der Wahl bei Ausbruch der CMV-Krankheit ist die orale Gabe von Valganciclovir oder die intravenöse Gabe von Ganciclovir. Dabei sollte die Behandlung solange fortgesetzt werden, bis virale Eradikation erreicht wurde, mindestens jedoch sollte die Behandlung zwei Wochen andauern. Bei schwerem Krankheitsverlauf kann auch eine kombinierte Therapie mit CMV-Immunglobulinen in Betracht gezogen werden. Dabei sollte während einer Therapie stets der Verlauf der Krankheit überprüft werden, um Erfolg bzw. Resistenzbildung zu kontrollieren (Asberg et al., 2007; Kotton et al., 2010). Zur Zeit sind verschiedene CMV-Vakzinen in der Entwicklung, allerdings steht bis heute kein Impfstoff gegen CMV für die klinische Anwendung zur Verfügung. Eine hergestellte attenuierte Lebend-Vakzine basierend auf dem Towne-Stamm von CMV wurde in klinischen Tests zwar als sicher eingestuft, allerdings konnte mit dieser Vakzine die CMV-Infektion nicht verhindert werden (Plotkin et al., 1984). Auch rekombinantes Glykoprotein gB zusammen mit den pp65- und IE-1-Proteinen sowie DNA-Vakzinen wurde vielversprechend zur Impfstoffentwicklung eingesetzt (Wloch et al., 2008). Derzeit wird eine Studie an der *Virginia Commonwealth University* zur Frage der Sicherheit und Verträglichkeit von CMV-Vakzinen, die als Chimären aus den Towne- und Toledo- HCMV-Stämmen hergestellt wurden, durchgeführt (<http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01195571?term=CMV+vaccines&rank=4>).

1.4 DAS MURINE CYTOMEGALOVIRUS – EIN MODELL ZUR EXPERIMENTELLEN UNTERSUCHUNG DER CMV-INFektion

Das Modell der Infektion von Mäusen mit murinem Cytomegalovirus (MCMV) hat sich als wichtiges Werkzeug für die Analyse der Mechanismen und individuellen Bestandteile der Immunantwort entwickelt, die zur Immunität gegen CMV-Infektionen führen. Die Infektion mit MCMV, die in Mäusen ein breites Spektrum an klinischen Erscheinungsformen aufweisen kann, spiegelt die mit HCMV-Infektion assoziierten Krankheiten im Menschen wider (Krpmotic et al., 2003; Webb et al., 2002). Hohe virale Titer im jeweiligen Organ führen zu Pneumonitis, Hepatitis und Retinitis; hohe Viruslast in Milz und Leber können zu einem tödlichen Ausgang führen. Auch Infektionen in Mäusen mit Einschränkungen oder Defekten im Immunsystem können zu schweren Krankheitsverläufen mit ähnlichen Symptomen wie bei der HCMV-Infektion führen (Mutter et al., 1988). Obwohl bisher eine transplazentare Übertragung von MCMV nicht möglich ist, kann im Mausmodell durch Inokulation von MCMV direkt in das fötale ZNS oder in den Uterus die kongenitale Infektion simuliert werden (Kashiwai et al., 1992; Webb et al., 2002). Zudem ist MCMV ebenso wie HCMV empfänglich für eine

Ganciclovir-Behandlung (Shanley et al., 1985). Als weiterer Vorteil des Mausmodells weist sich die Tatsache, dass hier unterschiedliche Mausstämme existieren, die sich bei MCMV-Infektion in der Virussuszeptibilität, in der Schwere der Krankheit und in der Überlebensrate unterscheiden. So können Untersuchungen im Mausmodell mit MCMV Erkenntnisse über Faktoren im Wirt liefern, die eine Infektion mit CMV bzw. den Verlauf der Krankheit positiv oder negativ beeinflussen. Auch prinzipielle Erkenntnisse zur Kontrolle der CMV-Infektionen durch das Immunsystem können in diesem Modell gewonnen werden, die sich dann auf den Menschen übertragen lassen (Shanley, 1984; Webb et al., 2002).

Die Bestimmung des kompletten Genoms von MCMV zeigte eine beachtliche Kolinearität zur Genomsequenz von HCMV auf sowie die Konservierung homologer Gene. Beide Genome sind nach dem folgenden Schema aufgebaut: In der zentralen Region befinden sich bei beiden Virusgenomen die „Haushaltsgene“, welche innerhalb der Gruppe der Herpesviren bei allen Vertretern konserviert sind. Die CMV-spezifischen Gene flankieren diese Kernregion; und die Gene welche spezifisch für jedes einzelne Virus sind, liegen an den Termini des Genoms. Das Fehlen primärer Sequenzhomologie bei HCMV und MCMV in diesen terminalen Bereichen des Genoms deutet darauf hin, dass die Gene in den terminalen Bereichen entweder unabhängig voneinander erworben wurden oder dass sich HCMV und MCMV von einem gemeinsamen Vorläufer divergierend entwickelt haben (Rawlinson et al., 1996; Davis-Poynter et al., 1999).

Der Übertragungsweg für MCMV ist z. T. noch spekulativ, wahrscheinlich ist jedoch die Übertragung über den Speichel der wichtigste Faktor für die Virusausbreitung; die Viruspartikel gelangen dann vermutlich über die Epithelien des Gastrointestinaltraktes bzw. des respiratorischen Traktes in den Körper. Auch Sexualkontakte sind bei MCMV mögliche Übertragungswege. Nach Virusaufnahme durch die Epithelien in den Körper wird das Virus dann über das Blut weiterverbreitet, um die Zielorgane zu infizieren. Ähnlich wie HCMV hat MCMV eine stark begrenzte Wirtsspezifität, kann aber ein breites Spektrum an Zellen, darunter auch Epithel- und Endothelzellen, Myozyten, Makrophagen, Fibrozyten, Knochenmarkszellen und braune Fettadipozyten infizieren (Rawlinson et al., 1996; Krmpotic et al., 2003).

1.5 IMMUNANTWORT GEGEN CMV

CMV ist ein starkes Immunogen, welches alle Zweige des Immunsystems aktiviert. Das angeborene Immunsystem spielt hierbei eine wichtige Rolle in der CMV-Abwehr und in der Aktivierung der adaptiven Immunantwort. Dabei sind z. B. die *Toll-like receptors* (TLRs) wichtig für die Aktivierung

verschiedener Signalwege und die Ausschüttung von pro-inflammatorischen Cytokinen, die ihrerseits Zellen des angeborenen Immunsystems rekrutieren und aktivieren. Dies führt außerdem zur verstärkten Expression der kostimulierenden Moleküle CD80 und CD86, die für das Anschalten der adaptiven Immunantwort von großer Bedeutung sind (siehe 1.8) (Crough und Khanna, 2009; Boehme und Compton, 2004). Für HCMV wurde gezeigt, dass die Interaktion der Glykoproteine gB/gH mit TLR2 das angeborene Immunsystem aktiviert und die Sekretion pro-inflammatorischer Cytokine veranlasst (Compton et al., 2003; Boehme et al., 2004; Juckem et al., 2008). Außerdem wurde für MCMV gezeigt, dass die Inokulation mit MCMV die Aktivierung von TLR3 und TLR9 bewirkt, wodurch dendritische Zellen und Makrophagen Typ I-Interferone synthetisieren und so die Aktivierung von Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) veranlassen (Tabeta et al., 2004; Krug et al., 2004).

Die NK-Zellen spielen in der MCMV-Infektion ebenfalls eine bedeutende Rolle bei der Eindämmung der Infektion (Bukowski et al., 1983; Polic et al., 1998); z. B. kann der adoptive NK-Zell-Transfer Immunität gegen CMV vermitteln (Bukowski et al., 1985). Im Menschen ist die Wirksamkeit der NK-Zellen noch nicht ganz eindeutig. Hinweise in Nierentransplantatempfängern deuten daraufhin, dass die NK-Zellen unterstützend bei der Bekämpfung der CMV-Krankheit wirken (Venema et al., 1994).

Auch die humorale Immunantwort wird bei einer CMV-Infektion aktiviert. Bisher wurde über die Bedeutung der anti-CMV-Antikörper in der HCMV-Kontrolle und dem Schutz vor einer Infektion heftig diskutiert, es häufen sich allerdings Hinweise, dass der humorale Immunantwort eine Rolle in der Begrenzung der Virusverbreitung und der Limitierung des Schweregrades der Infektion zukommt (Mocarski et al., 2007; Crough und Khanna, 2009).

Ein Großteil der Kontrolle von CMV und der Beschränkung der Virusreplikation wird durch die zelluläre Immunantwort bewirkt, v. a. CD8⁺ T-Zellen sowie CD4⁺ T-Zellen sind hier von großer Bedeutung. Studien in Mäusen und Affen zeigten, dass vor allem die CD8⁺ T-Zellen die wichtigste Rolle spielen. Depletion der Lymphozyten in Mäusen bewirkte Reaktivierung und Ausbreitung von MCMV; der adoptive Immuntransfer von CD8⁺ cytotoxischen T-Zellen schützte jedoch die Mäuse vor einem sonst tödlichen Ausgang der CMV-Krankheit (Reddehase et al., 1985; Mutter et al., 1988). Experimente, bei denen verschiedene Subpopulationen von Lymphozyten selektiv depletiert wurden, zeigten die Wichtigkeit der CD8⁺ T-Zellen bei der Kontrolle der CMV-Infektion (Polic et al., 1998). In SIV (*Simian immunodeficiency Virus*)-infizierten Affen führte die Inhibierung von CD8⁺ T-Zellen mit spezifischen monoklonalen α -CD8 -Antikörpern zur Reaktivierung von CMV (Barry et al., 2007). Auch im Menschen wurde die Bedeutung der CD8⁺ T-Zellen für die Kontrolle der CMV-Infektion gezeigt. In HIV-Infizierten zum Beispiel scheint das Vorhandensein IFN γ -sezernierender, spezifisch gegen HCMV gerichteter CD8⁺ T-Zellen vor einer CMV-bedingten Retinitis zu schützen (Jacobson et al., 2004). Auch in Empfängern von Knochenmarkstransplantaten korreliert die Entwicklung einer Immunantwort

durch CD8⁺ cytotoxischen T-Lymphozyten mit dem Schutz vor bzw. mit dem Ausheilen der CMV-Krankheit (Reusser et al., 1991). Außerdem konnte bei der allogenen Knochenmarkstransplantation durch Infusion von HCMV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen (welche vom Spender abstammten) eine antigenspezifische zelluläre Immunantwort im Empfänger wieder hergestellt werden. Der Empfänger war danach geschützt vor HCMV-assoziierten Komplikationen nach der Transplantation (Riddell et al., 1992; Walter et al., 1995). Auch bei Organtransplantationen konnte gezeigt werden, dass das Vorhandensein bzw. der Erwerb von spezifischen CD8⁺ T-Zellen vor der CMV-Krankheit schützt und zur Erhaltung der Funktion des Spenderorgans beiträgt (Shlobin et al., 2006; Bunde et al., 2005). Der Anteil der CD8⁺ T-Zellen, die an der Immunantwort beteiligt sind, liegt sehr hoch: In gesunden infizierten Personen liegt der Anteil CD8⁺ T-Zellen, welche spezifisch gegen HCMV-Antigene gerichtet sind, im Mittel bei 10 % (Sylwester et al., 2005; Gillespie et al., 2000; Khan et al., 2004).

Aber nicht nur die CD8⁺ T-Zellen alleine sind entscheidend für die Kontrolle der CMV-Infektion, auch den CD4⁺ T-Zellen kommt eine wichtige Bedeutung zu. In Mäusen, welche mit MCMV infiziert wurden, führte die Zerstörung der CD4⁺ T-Zellen zu einer vermehrten CMV-Reaktivierung. Zudem wurde in Mäusen, bei denen die CD8⁺ T-Zellen depletiert wurden, gezeigt, dass CD4⁺ T-Zellen ihren Beitrag zur Kontrolle einer primären CMV-Infektion leisten (Polic et al., 1998; Jonjic et al., 1990). Im Menschen wurde in einer Studie festgestellt, dass nach Nierentransplantationen die Anzahl der virusspezifischen CD4⁺ T-Zellen mit der Kontrolle der Cytomegalovirus-Infektion korreliert (Sester et al., 2001; Gamadia et al., 2003). Bei Empfängern von Knochenmarkstransplantaten war das Vorhandensein einer detektierbaren CD4⁺ T-Helferzellantwort verbunden mit dem Schutz vor der CMV-Erkrankung (Krause et al., 1997). Bei Empfängern in der hämatopoetischen Stammzelltransplantation führte der adoptive Transfer HCMV-spezifischer CD4⁺ T-Zelllinien zu einer starken Senkung der Viruslast; dabei reichte in 5 von 7 Patienten eine einzige Infusion zur Clearance der Virämie aus (Einsele et al., 2002). Ebenso wie für CD8⁺ T-Zellen ist der Anteil der zirkulierenden CD4⁺ T-Zellen, welche spezifisch an der Immunantwort gegen CMV beteiligt sind, mit ca. 9 % in gesunden, für CMV seropositiven Personen relativ hoch; in manchen Individuen war dieser Anteil auf bis zu 40 % erhöht (Sester et al., 2002; Sylwester et al., 2005). Analysen der Spezifität von für HCMV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen zeigen; dass diese ein breites Spektrum an Antigenen erkennen; in Gesunden wird am häufigsten eine gB-spezifische CD4⁺ T-Zellantwort detektiert (Sylwester et al., 2005). Zusätzlich zur eher indirekten Funktion der CD4⁺ T-Zellen in der latenten Infektion (durch Stimulation der humoralen sowie CD8⁺ T-Zellantwort) wurde interessanterweise sogar eine cytotoxische Aktivität und somit eine direkte Kontrolle der CMV-Infektion für gB- und gH-spezifische CD4⁺ T-Zellen festgestellt (Casazza et al., 2006; Elkington et al., 2004).

1.6 MECHANISMEN DER IMMUNMODULATION VON HCMV

Viren haben im Laufe der Evolution verschiedene Mechanismen entwickelt, die dazu führen, dass die Infektion und das Virus selbst vom Immunsystem nicht oder nur schwer erkannt werden. Auch Cytomegaloviren haben Mechanismen zur Modulation des Immunsystems entwickelt. Die HCMV-Proteine gpUS2, gpUS3, gpUS6 und gpUS11 sind für eine Verringerung von *major histocompatibility complex* (MHC) Klasse-I-Molekülen an der Zelloberfläche infizierter Zellen verantwortlich. Diese Verringerung dient dazu, das Erkennen und Zerstören CMV-infizierter Zellen durch CD8⁺ cytotoxische T-Zellen zu erschweren (Gewurz et al., 2001; Mocarski, 2002). Die gpUS3-Expression verhindert den Transport von MHC-I-Molekülen aus dem ER in den Golgi-Apparat (Jones et al., 1996), während die Expression von gpUS6 das Beladen des MHC-I-Moleküls mit Peptiden blockiert (Ahn et al., 1997; Lehner et al., 1997; Hengel et al., 1997). Die Proteine gpUS2 und gpUS11 behindern die Translokation der wachsenden MHC-Peptidkette in das ER bzw. führen zu einem Rücktransport der Kette ins Cytosol und dem folgenden Abbau durch das Proteasom (Jones et al., 1995; Wiertz et al., 1996a; Wiertz et al., 1996b).

HCMV kodiert des Weiteren für MHC-I homologe Proteine. Für die Funktion wurde angenommen, dass diese MHC-I-Homologe vor dem Angriff infizierter Zellen durch NK-Zellen schützen könnten, die aufgrund des Fehlens von MHC-I-Molekülen auf der Zelloberfläche gemäß der „*missing-self*“-Hypothese (Ljunggren und Karre, 1985) die entsprechende Zelle zerstören. Allerdings wurde diese Vermutung für gpUL18 nicht bestätigt (Leong et al., 1998; Mocarski, 2002; Sun und Lanier, 2011). Schutz vor dem Erkennen infizierter Zellen durch NK-Zellen und der anschließenden NK-Zellaktivierung bieten eher die Proteine gpUL40 und gpUL16: Das Protein gpUL40 bindet an den inhibierenden NK-Zellrezeptor CD94/NKG2A, wodurch die Erkennung der infizierten Zelle durch die NK-Zelle unterbunden ist und diese somit geschützt ist (Tomasec et al., 2000; Wang et al., 2002). gpUL16 bindet an die nicht-klassischen MHC-Moleküle MICB, ULBP1 und ULBP2, die normalerweise die Bindung an den aktivierenden NK-Zellrezeptor NKG2D vermitteln. Diese Interaktion mit dem aktivierenden Rezeptor NKG2D wird durch gpUL16 unterbunden (Cosman et al., 2001; Sutherland et al., 2001).

Auch die Zelloberflächenexpression von MHC-II-Molekülen wird von HCMV moduliert: Zum Einen hat die Inhibition des Proteins CT_{IIA}, welches als Transkriptionsfaktor die Expression von MHC-II steuert, einen drastischen Einfluss auf die MHC II-Menge (Le Roy et al., 1999); des Weiteren hat das oben erwähnte virale Glykoprotein gpUS2 auch die Fähigkeit, die MHC-II-Menge auf der Zelloberfläche von APCs zu verringern (Tomazin et al., 1999).

HCMV kodiert noch für weitere Membran-gebundene Proteine, die durch Interaktion mit Wirtsproteinen die Aktivität und das Verhalten von Leukozyten verändern. Das HCMV-Protein UL28 stellt einen *bona fide* Rezeptor für das CX3C-Chemokin Fraktalkin sowie weiterer Chemokine dar (Mocarski, 2002; Kledal et al., 1998). UL28 kann somit als „Chemokin-Falle“ betrachtet werden: Durch Chemokin-Bindung an UL28 werden Chemokine möglicherweise abgefangen, die Konzentration an inflammatorischen Cytokinen am Ort der Infektion wird vermindert und die Rekrutierung von Immunzellen wird verringert (Mocarski 2002). Die Expression von UL28 erhöht zudem die Migration infizierter Zellen, was zur Virusdissemination beiträgt (Streblov et al., 1999).

Zusätzlich kodiert HCMV für wirtshomologe Chemokine bzw. Cytokine, die entweder Immunzellen rekrutieren, um die Virusverbreitung zu unterstützen oder diese hemmen, um die Immunantwort zu unterbinden: CMV IL-10 zum Beispiel zeigt nur ca. 27 % Homologie zum humanen IL-10, kann aber in gleichem Maße wie humanes IL-10 die Proliferation von peripheren Leukozyten im Blut und die Cytokinsynthese hemmen. Die Sezernierung von CMV IL-10 führt zudem zu einer Verringerung der MHC-I- und MHC-II-Oberflächenexpression auf mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PMBCs) (Kotenko et al., 2000; Spencer et al., 2002; Mocarski, 2002). Außerdem wurden HCMV-Proteine detektiert, die die Apoptose unterbinden (Mocarski et al., 2002).

Auch andere Viren können mit dem Immunsystem des Wirts interferieren und so die Immunantwort manipulieren. Die Expression des HIV-Proteins Nef z. B. führt zu einem Verlust von *major histocompatibility complex* (MHC) Klasse-I- und Klasse-II-Molekülen (Schwartz et al., 1996; Stumptner-Cuvelette et al., 2001) sowie der kostimulierenden Rezeptoren CD80 und CD86 von der Zelloberfläche von APCs (Chaudhry et al., 2005), welche verantwortlich sind für das Erkennen infizierter Zellen durch Zellen des Immunsystems.

Auch K3 und K5 von KSHV sind Proteine, die zur Verminderung bestimmter Moleküle von der Zelloberfläche infizierter Zellen führen. Expression von K3 führt zu Internalisation von MHC-I- und CD1d-Molekülen von der Zelloberfläche, die Expression von K5 dagegen kann zusätzlich die Zelloberflächenexpression von ICAM-1 und CD86 verringern. K5 und K3 sind Membran-assoziierte RING-CH-Proteine (MARCH-Proteine); sie besitzen eine RING-Domäne (*really interesting new gene domain*), welche oft in E3-Ubiquitin-Ligasen zu finden ist. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass K3 und K5 die Ubiquitinierung oben genannter Zielmoleküle bewerkstelligen und so zu deren lysosomalen Degradation führen (Lehner et al., 2005; Means et al., 2007).

1.7 IMMUNMODULATORISCHE MECHANISMEN VON MCMV

Auch das murine Cytomegalovirus hat immunmodulatorische Proteine, die z. T. homolog zu HCMV sind. MCMV kodiert drei Proteine, welche mit der Antigenpräsentation durch MHC-I-Moleküle interferieren (Hengel, Brune, Koszinowski, 1998; Hengel et al., 1999). Gp48, das Genprodukt des m06-ORFs, bindet im endoplasmatischen Retikulum an das Peptid-beladene MHC-I-Molekül und dirigiert dieses dann zum Lysosom, wo das MHC-I-Molekül abgebaut wird (Reusch et al., 1999). Die Expression des m152-Gens, resultierend im MCMV-Protein gp40, blockiert den Transport von MHC-I-Molekülen, so dass diese in prä-Golgi-Kompartimenten stecken bleiben (Thäle et al., 1995; Ziegler et al., 1997). Das Produkt des m04-Gens, gp34, bindet an MHC-I-Moleküle im ER und wird mit diesen zur Zelloberfläche transportiert; hier interferiert dieses mit der Bindung an den T-Zell-Rezeptor (TCR) (Kleijnen et al., 1997). In Abbildung 1.3 ist Funktion der Gene m04, m06 und m152 schematisch dargestellt.

Auch in MCMV gibt es ein MHC-I-Homolog, dabei handelt es sich um das Produkt von m144. Viren, die kein m144 exprimieren, zeigen gegenüber Wildtypviren ein verringertes Viruswachstum aufgrund stärkerer Kontrolle durch NK-Zellen. Somit lässt sich vermuten, dass auch durch m144 die Eliminierung infizierter Zellen durch NK-Zellen analog der *missing-self*-Hypothese unterbunden wird (Cretney et al., 1999; Rawlinson et al., 1996). Aber auch weitere MCMV-Proteine beeinflussen die NK-Zellaktivität: gp40 vermindert nicht nur die Expression von MHC-I-Molekülen auf der Zelloberfläche, seine Expression führt auch zu einer niedrigeren Präsenz von H-60 auf der Zelloberfläche. H-60 ist ein hoch-affiner Ligand für den aktivierenden NK-Zellrezeptor NKG2D. Die Abwesenheit von gp40 verbesserte die Viruskontrolle durch NK-Zellen, dies war jedoch nur für BALB/c- nicht aber für C57BL/6-Mäuse der Fall (Krpmotic et al., 2002). Anders als in BALB/c-Mäusen exprimiert ein Teil der NK-Zellen von C57BL/6-Mäusen zusätzlich den aktivierenden NK-Zellrezeptor Ly49H, ein Ligand für diesen Rezeptor ist das MCMV-Protein m157. Durch die Aktivierung der NK-Zellen von C57BL/6-Mäusen über die m157-Ly49H-Bindung sind diese Mäuse relativ gut geschützt vor der CMV-Krankheit, während BALB/c-Mäuse sensitiver gegenüber der CMV-Infektion sind (Jonjic et al., 2008; Arase und Lanier, 2004; Lee et al., 2001).

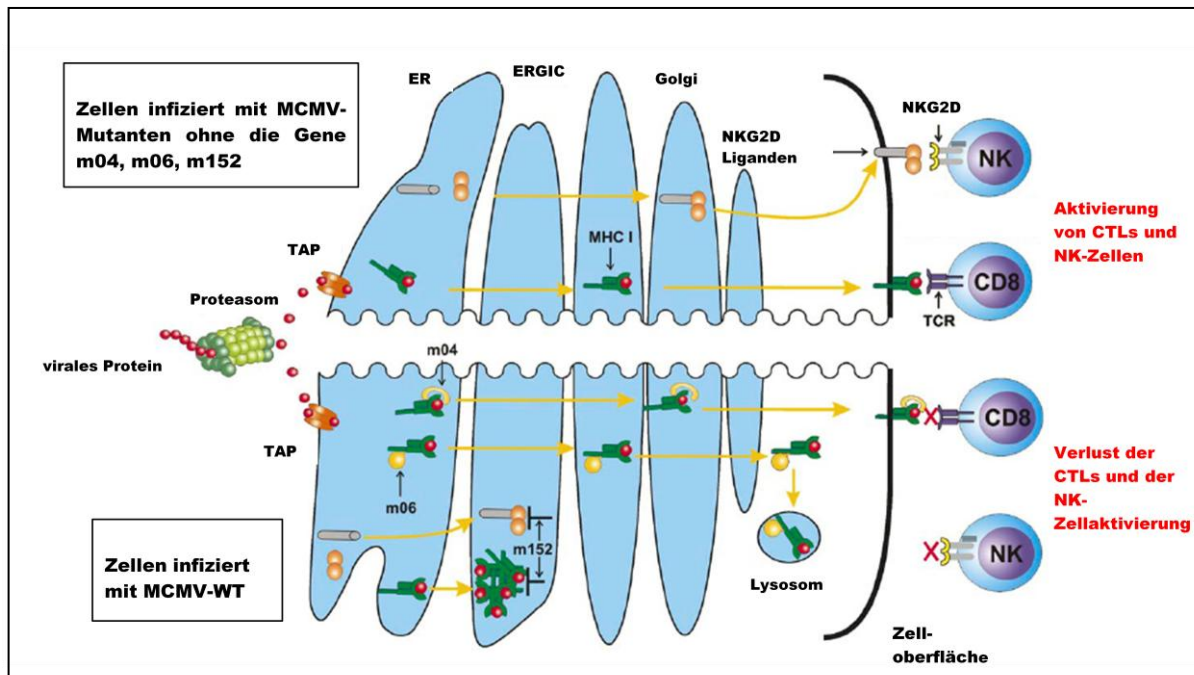


Abbildung 1.3 Einfluss der MCMV-Genprodukte m04, m06 und m152 auf die CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen von BALB/c-Mäusen

Zellen infiziert mit MCMV-Mutanten, denen die Gene m04, m06 und m152 fehlen, exprimieren MHC-I und NKG2D-Liganden an der Zelloberfläche und aktivieren so CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen (oben). Bei Infektion mit MCMV-WT führt die Expression dieser Gene zum Verlust von MHC-I und NKG2D-Liganden an der Zelloberfläche und somit zur Inhibition von CTLs und NK-Zellen (unten). Verändert nach Krmpotic et al., 2003; weitere Erklärung siehe Text.

Für MCMV gibt es noch weitere Beispiele, wie das Immunsystem manipuliert werden kann, darunter die Expression eines F_C-Rezeptor, von Homologen zu murinen Chemokinen sowie Apoptoseinhibitoren, die u. a. eine Verbreitung des Virus fördern und/oder das Erkennen durch das Immunsystem verringern (Mocarski, 2002). Eine andere Manipulationsart ist die Modulation der Expression verschiedener Oberflächenmoleküle und Korezeptoren auf Antigen-präsentierenden Zellen (APCs), die zur Antigenpräsentation und zur Aktivierung der zellulären adaptiven Immunantwort benötigt werden. Zu den Antigen-präsentierenden Zellen gehören Monozyten, Makrophagen sowie dendritische Zellen (DCs). Die Infektion von Monozyten und Makrophagen mit CMV trägt zur Viruspathogenese bei und unterstützt die Virusausbreitung im Körper; außerdem gibt es Hinweise, dass differenzierte Makrophagen latent CMV-DNA in sich tragen können (Stoddart et al., 1994; Collins et al., 1994). Bei Infektion von Makrophagen mit MCMV wurde zudem gezeigt, dass hier auch die Oberflächenexpression von MHC-II-Molekülen durch Aktivierung der IL-10-Synthese vermindert ist; das hierzu verantwortliche MCMV-Gen konnte allerdings bisher noch nicht identifiziert werden (Redpath et al., 1999).

Dendritische Zellen (DCs) gelten als die wirksamsten Zellen unter den APCs. Sie sind sowohl im peripheren Blut als auch in lymphoiden (Lymphknoten, Thymus, Knochenmark, Milz und Tonsillen) sowie nicht-lymphoiden Organen (Leber, Niere, Haut und Darm) zu finden, wo sie als „Wächter“ des

Immunsystems fungieren. Treffen unreife DCs auf ein Antigen, wird dieses aufgenommen und prozessiert; außerdem wird die Oberflächenexpression von MHC-I und von Korezeptoren verstärkt. Anschließend wandern sie zu den Lymphorganen, wo sie die primäre Immunantwort initiieren: Naïve T-Zellen werden aktiviert und stimuliert und die Ausschüttung von Cytokinen sowie Chemokinen rekrutiert und aktiviert dann weitere Immunzellen, wie z. B. NK-Zellen, Makrophagen und B-Zellen (Janeway, 2008; Barreira et al., 2011). Andrews und Kollegen (2001) zeigten, dass die Infektion von DCs mit MCMV (nach einer anfänglichen Steigerung) zu einer Verminderung der Oberflächenexpression von MHC-I und MHC-II sowie CD40, CD54 (ICAM) und CD86 führt. Zudem haben DCs nach Infektion eine verringerte Aktivierungsfähigkeit gegenüber Reifungsstimuli und die Sekretion bestimmter Cytokine ist eingeschränkt. Zusätzlich zeigten Andrews et al., dass *in vitro* MCMV-infizierte D1-Zellen - eine DC-Zelllinie - sowie isolierte DCs aus der Milz von infizierten Mäusen in ihrer Fähigkeit, T-Zellen zu stimulieren, eingeschränkt sind (Andrews et al., 2001). Auch Experimente von Mathys und Kollegen stellten eine verringerte Anzahl der Oberflächenmoleküle CD40, CD80, CD86, MHC-I und MHC-II auf der Oberfläche MCMV-infizierter DCs fest (Mathys et al., 2003). Dieselbe Arbeitsgruppe bestätigte zudem in Zellkulturassays, dass bei Stimulation von T-Zellen durch MCMV-infizierte DCs die proliferative T-Zellantwort verringert ist.

In den letzten Jahren wurden die zugrundeliegenden Mechanismen sowie die für die Immunmodulation verantwortlichen Gene identifiziert und z. T. untersucht. Das Gen m138 ist verantwortlich für die Internalisation von CD80 und die folgende Misslokalisation in Lysosomen-assoziierten Kompartimenten (Mintern et al., 2006). Die Expression des ORFs m155 führt zur posttranskriptionalen Inhibition der CD40-Expression. CD40 wird in APCs nach deren Reifung verstärkt exprimiert und fördert u. a. die Aktivierung der Immunantwort durch CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sowie die Stimulation von B-Zellen und Makrophagen (Janeway, 2008); die m155-Expression führt somit zu Verringerung der CD4⁺-T-Zellantwort (Loewendorf et al., 2011). Für die Internalisation von CD86 von der Zelloberfläche konnte in der Monozyten-/Makrophagen-Zelllinie RAW264.7 gezeigt werden, dass dafür der ORF m147.5 von MCMV mit dem Gen-Produkt modB7-2 verantwortlich ist (Loewendorf et al., 2004; Loewendorf, 2005). Ziel dieser Arbeit war es u. a. Hinweise auf den Mechanismus der CD86-Internalisation und der Wirkungsweise von modB7-2 in dendritischen Zellen zu gewinnen (siehe 1.11 Zielsetzung dieser Arbeit). Deshalb wird im Folgenden detailliert Einsicht in die Funktion und Regulation von CD86 gegeben sowie über die Erkenntnisse berichtet, die zuvor über das MCMV-Protein modB7-2 gewonnen wurden.

1.8 FUNKTION UND REGULATION DES KOSTIMULATORISCHEN MOLEKÜLS CD86

Eine Aufgabe der APCs ist das sogenannte „*Priming*“ der T-Zellen, also eine Stimulation ihrer Proliferation und Aktivität. Die APCs präsentieren prozessierte Antigene über die MHC-Moleküle auf ihrer Zelloberfläche. T-Zellen exprimieren auf ihrer Zelloberfläche den T-Zell-Rezeptor (TCR), der nicht-kovalent mit CD3 im Komplex assoziiert ist. Findet die Antigen-präsentierende Zelle eine naive T-Zelle mit passendem TCR und kommt eine Bindung des TCR der T-Zelle an das MHC-Molekül auf der APC zustande, bildet sich die sogenannte Immunologische Synapse. Allerdings wird für die Stimulation der naiven T-Zelle noch ein zweites, kostimulatorisches Signal benötigt: Der Rezeptor CD28 auf der Oberfläche von T-Zellen muss an die kostimulatorischen Moleküle CD86 oder CD80 auf der Oberfläche der APCs binden. Erst wenn die Bindung über MHC:TCR und über CD28:CD86/CD80 erfolgt ist, wird die T-Zelle aktiviert und „*geprimt*“ (Lenschow et al., 1996; Alegre et al., 2001; Janeway, 2008). Fehlt dieses zweite kostimulatorische Signal, geht die T-Zelle in die Apoptose über oder fällt in einen Zustand, der als Anergie bezeichnet wird. In diesem Zustand der Anergie sind die T-Zellen nicht mehr dazu in der Lage, zu proliferieren oder IL-2 zu sezernieren, welches seinerseits die weitere T-Zellproliferation aktivieren könnte (Dooms und Abbas, 2010). Ein drittes Signal wird durch das Ausschütten von Cytokinen übermittelt, die die Differenzierung in unterschiedliche Effektorzelltypen vermitteln.

Aber auch für die Beendigung der T-Zellaktivität sind die kostimulatorischen Rezeptoren CD80 und CD86 wichtig: Zwei bis drei Tage nachdem die T-Zelle aktiviert wurde, beginnt diese den Rezeptor CTLA-4 an der Zelloberfläche zu exprimieren. Kommt es nun erneut zur Bindung von MHC und TCR, bindet CD86 oder CD80 an den Rezeptor CTLA-4. Diese Bindung stellt ein inhibitorisches Signal dar; die T-Zelle reduziert ihre IL-2-Sekretion und es kommt zusätzlich zu einem G1-Zellzyklus-Arrest. Das Abschalten der T-Zellantwort über CTLA-4 nach vorheriger Initiation über CD28 scheint sehr wichtig zu sein; CTLA-4-defiziente Mäuse entwickeln lymphoproliferative sowie Autoimmun-Krankheiten (Krummel et al., 1995; Waterhouse et al., 1995; Alegre et al., 2001). Abbildung 1.4 stellt graphisch nochmal die Funktionen von CD86 und CD80 dar.

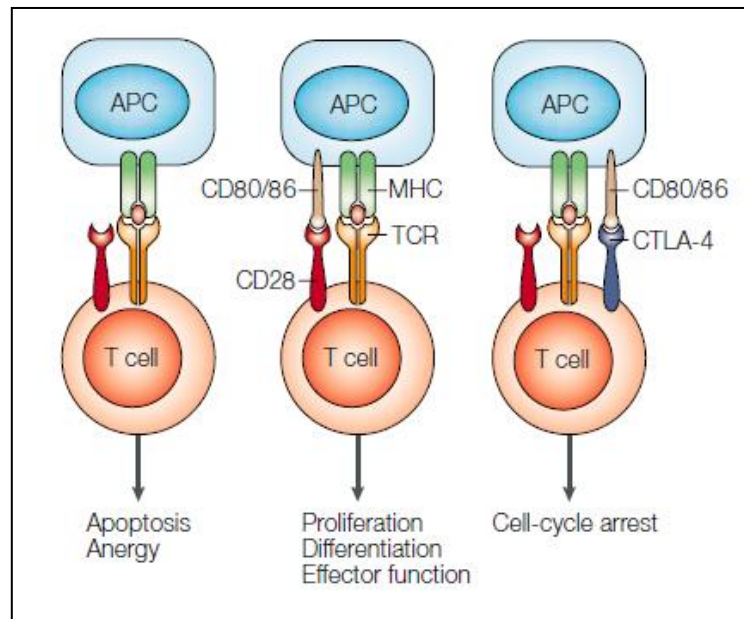


Abbildung 1.4 Funktion von CD80 und CD86 bei der T-Zellaktivierung

Bei Ausbildung der immunologischen Synapse kommt es zur Bindung zwischen T-Zell-Rezeptor (T-Zelle) und MHC-Molekülen (Antigen-präsentierende Zelle). Für die effiziente Aktivierung der T-Zellantwort wird noch ein zweites kostimulatorisches Signal benötigt: Dies erfolgt über die Bindung von CD28 an CD86 oder CD80. Ohne dieses zweite Signal geht die Zelle in die Apoptose oder wird anergisch; bei Vorhandensein des Signals wird die T-Zelle dagegen stimuliert und aktiviert. Um die T-Zellantwort zu beenden, wird ebenfalls die CD86/CD80-Bindung benötigt, dieses inhibitorische Signal wird durch Bindung an CTLA-4 vermittelt (modifiziert nach Alegre et al., 2001).

CD86 und CD80 sind beide Typ I Transmembranproteine und besitzen in etwa 25% Sequenzhomologie. Hinsichtlich CTLA-4 ist CD86 ein schwächerer Ligand als CD80, die Affinität für CTLA-4 ist ca. 5 -10x höher für CD80. Allerdings zeigt CD86 verglichen mit CD80 eine stärkere Affinität für CD28, während CD80 CTLA-4 bevorzugt (Bhatia et al., 2006; Pentcheva-Hoang et al., 2004). Auch hinsichtlich ihrer Expression und Funktion gibt es Unterschiede zwischen den Molekülen CD86 und CD80: Auf B-Zellen zum Beispiel ist CD86 nur schwach exprimiert. Die Expression von CD86 kann allerdings schnell induziert werden und ist 6 h nach Stimulation durch LPS feststellbar, sie erreicht ihren Höhepunkt nach etwa 18–24 h (Lenschow et al., 1996, Hathcok et al., 1994; Bhatia et al., 2006). Die Expression von CD80 wird dagegen nur langsam induziert (detektierbar 24 h nach Simulation) und ist dann jedoch für 4-5 Tage stabil (Lenschow et al., 1996, Hathcok et al., 1994; Bhatia et al., 2006). Für CD86 wurde außerdem ein intrazelluläres Speicherorganell berichtet, welches wohl dazu dient, CD86 bei Bedarf schnell an die Oberfläche zu transportieren (Smyth et al., 1998; Smyth et al., 2005). Sowohl für CD80 als auch für CD86 wurde gezeigt, dass sie die Differenzierung von Th1/Th2 T-Zellen modulieren können. Während CD80 eher die Differenzierung von Th1 T-Zellen bevorzugt, steigert CD86 mehr die IL-4-Produktion und die Th2 T-Zellantwort (Kuchroo et al., 1994; Bhatia et al., 2006). Indizien deuten zudem daraufhin, dass hauptsächlich CD86 eine Rolle in der Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen spielt (Makrigiannis et al., 1999).

Es gibt verschiedene Hinweise darauf, dass CD80 eher als negativer Modulator der Immunantwort fungiert, während CD86 vielmehr eine aktivierende Funktion zugeschrieben wird. *In vivo* Studien zeigten, dass die Inhibition von CD80 durch Antikörper in einer Erhöhung der Immunantwort resultierte, während die Blockierung von CD86 zu einer verringerten Antwort führte (Kuchroo et al., 1994; Lenschow et al., 1996). Außerdem wurde berichtet, dass CD86 ein positiver Regulator der B-Zellproliferation ist und die IgG1-, IgG2a-, IgG4 und IgE-Produktion sowie die Produktion anti-apoptotischer Moleküle stimuliert. CD80 dagegen hemmt die Proliferation und sorgt für die Aktivierung pro-apoptotischer Signale (Jeannin et al., 1997; Suvas et al., 2002). Aufgrund von Berichten, die diesen Ergebnissen widersprechen, ist allerdings noch nicht klar, ob CD86 und CD80 tatsächlich unterschiedliche regulatorische Funktionen haben oder ob sie redundante Signale vermitteln (Sansom et al., 2003). Über die Regulation von CD86 selbst ist nur wenig bekannt.

Neuen Erkenntnissen zufolge führt IL-10 in Monocyten und DCs autokrin zu einer Induktion der Expression des Proteins MARCH-1, was seinerseits CD86 ubiquitiniert und so zu der Internalisation von CD86 und der folgenden Degradation in den Lysosomen führt (Thibodeau et al., 2008; Baravalle et al., 2011; Corcoran et al., 2011). Es gibt hier Hinweise, dass die Interaktion von MARCH-1 über die Transmembrandomänen erfolgt, und für die Ubiquitinierung von CD86 scheint dabei besonders der Lysinrest K267 wichtig zu sein. DCs, die ein mutiertes CD86 exprimierten, welches nicht mehr ubiquitiniert werden kann, konnten T-Zellen in einem größeren Ausmaß aktivieren, als DCs, die Wildtyp-CD86 exprimierten. Dies unterstreicht die Bedeutung der Ubiquitin-abhängigen Regulation von CD86 (Baravalle et al., 2011; Corcoran et al., 2011).

MARCH-1 gehört zu den zellulären Vertretern der Membran-assoziierten RING-CH- Proteine (MARCH); zwei virale Vertreter K3 und K5 von KHSV wurden schon in Kapitel 1.6 angesprochen, diese viralen MARCH-Proteine sorgen ebenfalls durch Ubiquitinierung für die Internalisation von verschiedenen Membranproteinen, u. a. auch von CD86. Wie bereits an anderer Stelle erwähnt, sind MARCH-Proteine E3-Ubiquitinligasen und sind verantwortlich für die Ligation von Ubiquitin an einen speziellen Lysinrest des jeweiligen Substrates. Insgesamt sind elf MARCH-Homologe in Eukaryoten bekannt. Zusätzlich zu MARCH-1 wurde auch von MARCH-2 und von MARCH-8 beschrieben, dass ihre Expression zur Verringerung der CD86-Expression führt (Goto et al., 2003; Bartee et al., 2004). Von MARCH-2 wird eine eher ubiquitäre Expression berichtet, während MARCH-1 und MARCH-8 eher in lymphoiden Geweben wie Milz und Lymphknoten exprimiert werden. (zusammengefasst im Übersichtsartikel von Wang et al., 2008 sowie Matsuki et al., 2007; Ohmura-Hoshino et al., 2006). Es wird spekuliert, dass die Internalisation von CD86 nach Ubiquitinierung in Clathrin-abhängiger Weise geschieht. In der Tat ist die Endozytose von ubiquitinierten Plasmamembranproteinen Clathrin-abhängig; und es sind verschiedene Ubiquitin-bindende Clathrinadaptoren wie Epsin und Eps15

bekannt (Barriere et al., 2006; Hawryluk et al., 2006; Barriere et al., 2007). Für K3 von KSHV konnte gezeigt werden, dass die ubiquitinabhängige Internalisation von MHC-I tatsächlich über clathrinvermittelte Endozytose via Epsin abläuft (Wang et al., 2008; Duncan et al., 2006).

1.9 INTERNALISATION VON MEMBRANPROTEINEN ÜBER CLATHRIN-VERMITTELTE ENDOZYTULOSE

Durch den Prozess der Endozytose werden *de novo* intrazelluläre Membranen von der Lipid-Doppelschicht der Plasmamembran gebildet, wodurch Plasmamembran, Integralproteine sowie Extrazellulärflüssigkeit internalisiert werden (zusammengefasst im Übersichtsartikel von Doherty und McMahon, 2009). Es wurden schon verschiedene Mechanismen beschrieben, wodurch Zelloberflächenproteine und extrazelluläre Bestandteile in die Zelle aufgenommen werden können, wie z. B. die Calveolae-vermittelte Endozytose, die Flotillin und die Arf6-vermittelte Endozytose, oder die Endozytose über CLIC/GEEC und *circular dorsal ruffles* sowie die Makropinozytose und die Phagozytose. Einer der von der Zelle am häufigsten benutzten Endozytosewege und auch einer der am besten untersuchten Wege ist jedoch die Clathrin-vermittelte Endozytose (Higgins und McMahon, 2002). Proteine, die zur Internalisation über Endozytose mittels Clathrin bestimmt sind, sind durch verschiedene Aminosäuresequenzmotive gekennzeichnet, wie z. B. [D/E]XXXL[L/I]; YXX ϕ oder Asn-Pro-X-Tyr (Pandey, 2009), aber auch andere Signale wie Ubiquitinierung oder Phosphorylierung von Rezeptoren führen zu deren Internalisation (von Zastrow und Sorokin, 2007).

Die Clathrin-abhängige Endozytose ist ein mehrstufiger Prozess: Als erster Schritt wird vermutet, dass *FCH domain only*- (FCHO)-Proteine, Intersectine und Eps15 an die Plasmamembran binden, und vermutlich schon zu einer Membrankrümmung führen, bevor Clathrin an die Membran rekrutiert wird (Henne et al., 2010; McMahon und Boucrot, 2011). Der sogenannte *Clathrin coat* bildet sich anschließend auf der cytosolischen Seite der Plasmamembran durch die Rekrutierung des Adaptorkomplexes AP-2, der wiederum an Phosphoinoside wie Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat (PIP₂) in der Membran bindet und so die Verbindung zwischen den Clathrinmolekülen und der Plasmamembran herstellt (Takei und Hauke, 2001; Honing et al., 2005). Der Adapterkomplex AP-2 bindet zudem an Membranproteine, die ein Tyrosin-basiertes Sortiersignal tragen, wodurch die Konzentration dieser zu transportierenden Moleküle im sich abknospenden Vesikel erhöht wird. Andere Adaptorproteine sind verantwortlich für die Auswahl weiterer zu internalisierender Membranproteine, indem sie an die jeweiligen Transportproteine und an den AP-2-Komplex binden (McMahon und Boucrot, 2011). Zusätzliche Proteine wie Synaptotagmin und AP180/CALM

unterstützen die Vesikelbildung und bestimmen die Größe des Vesikels. Weitere akzessorische Proteine helfen beim Zusammenbau der Clathrinhülle, oder tragen zu Veränderungen des Aktinskeletts und des Lipidmetabolismus bei. Durch die verstärkte Assemblierung des Clathrin-Netzwerkes kommt es zu einer immer stärkeren Wölbung der Membran, bis sich eine tief eingestülpte Vertiefung gebildet hat. Die Abschnürung des Vesikels von der Membran wird durch die GTPase-Aktivität des Proteins Dynamin gewährleistet (Kosaka und Ikeda, 1982; Takei et al., 1995). In einem letzten Schritt wird das Clathrin-Netzwerk durch die Proteine hsc70, Auxilin sowie Synaptojanin von dem Vesikel entfernt, welches dann zu seinem Bestimmungsort transportiert werden kann. Der Ablauf der Clathrin-abhängigen Endozytose ist in Abbildung 1.5 schematisch dargestellt.

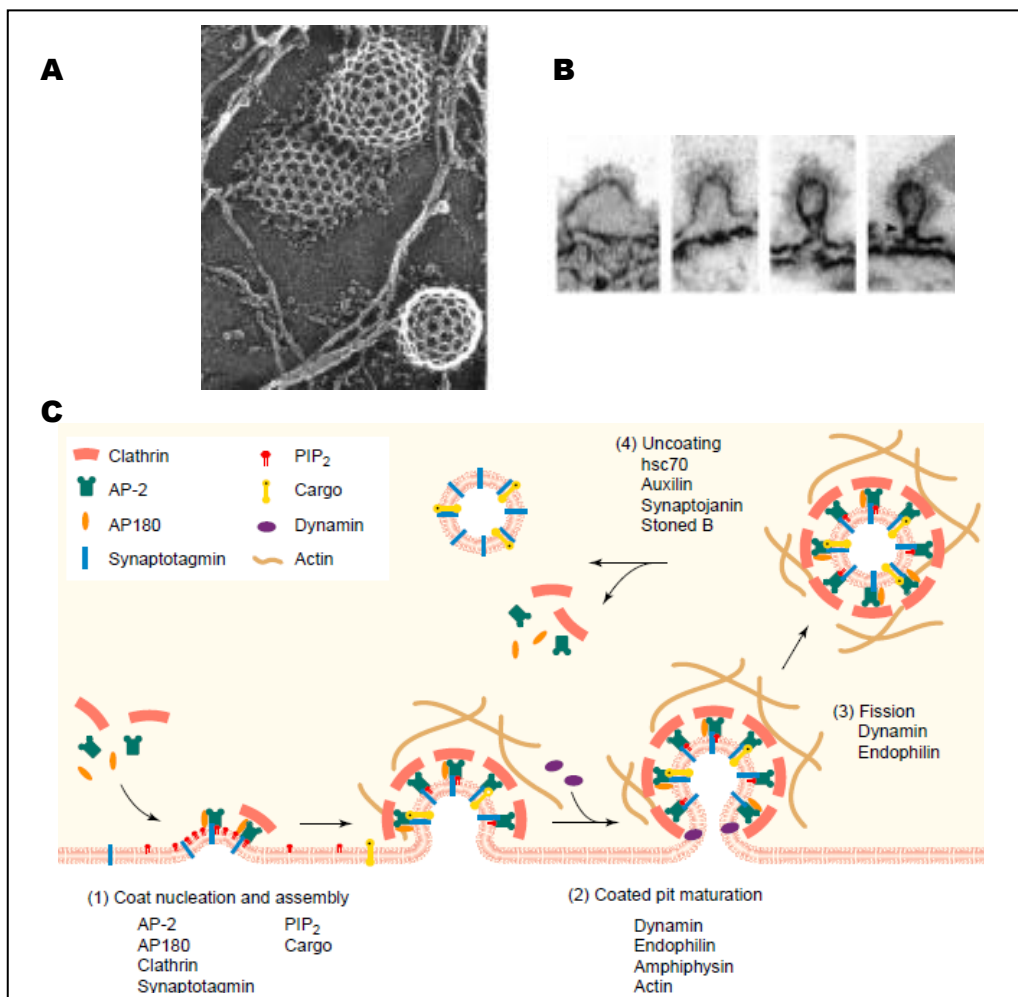


Abbildung 1.5 Bildung Clathrin-bedeckter Vesikel

(A) Verschiedene Stadien in der Ausbildung Clathrin-umhüllter Vesikel von der inneren Oberfläche von Hühnerfibroblasten (verändert nach Heuser und Anderson, 1989). (B) Unterschiedliche Stadien der Clathrin-vermittelten Vesikelbildung in fixierten Riesenaxonen (verändert nach Gad et al., 1998). (C) Überblick über verschiedene Stadien, Proteine und Schlüsselkomponenten, die bei der Clathrin-vermittelten Endozytose eine Rolle spielen (entnommen aus Takei und Hauke, 2001).

1.10 MODULATION DER CD86-OBERFLÄCHENEXPRESSION DURCH DAS MCMV-PROTEIN MODB7-2

Loewendorf et al. identifizierten das MCMV-Gen, welches für die Verringerung der Oberflächenexpression von CD86 in murinen APCs verantwortlich ist (Loewendorf et al., 2004; Loewendorf, 2005). Dieses Gen umfasst den ORF m147.5 in MCMV und das Genprodukt wird als modB7-2 (*modulator of B7-2*) bezeichnet. Es wurde gezeigt, dass das modB7-2-Gen zwei Exons und ein Intron umfasst, dessen ORF fast vollständig identisch ist mit dem ORF147. Die Lage im Genom wurde durch verschiedene Mutationsexperimente bestimmt, Abbildung 1.6 A zeigt die schematische Lage von modB7-2 im MCMV-Genom. Zudem wurde mit RACE-Experimenten der Transkriptionsstartpunkt von modB7-2 detektiert. Eine Besonderheit der modB7-2 mRNA ist das Vorhandensein dreier potentieller Startkodons *in frame*; der Translationsstartpunkt bzw. die Frage, welches Startkodon für die modB7-2 Translation genutzt wird, ist deshalb bisher ungeklärt.

Durch verschiedene MCMV-Mutanten konnte gezeigt werden, dass die Expression von modB7-2 für die Verminderung der CD86-Expression auf der Oberfläche von Zellen der Monozyten-/Makrophagenzelllinie RAW264.7 verantwortlich ist: Die Infektion von RAW264.7-Zellen mit der Mutante MCMV- $\Delta 6$, der die ORFs m144-m157 fehlen (Abbildung 1.6 B) resultierte in keiner Senkung der CD86-Oberflächenexpression. Wird allerdings die cDNA-Sequenz des modB7-2-ORFs inklusive Promotor wieder in die Mutante MCMV- $\Delta 6$ integriert, ist erneut eine Modulation der CD86-Oberflächenexpression feststellbar (Abbildung 1.6 D). Auch bei Unterbrechung des Leserahmens von modB7-2 durch Einfügen von Stop-Kodons (Abbildung 1.6 C) wird die Veränderung der CD86-Oberflächenexpression durch MCMV aufgehoben (Abbildung 1.6 D).

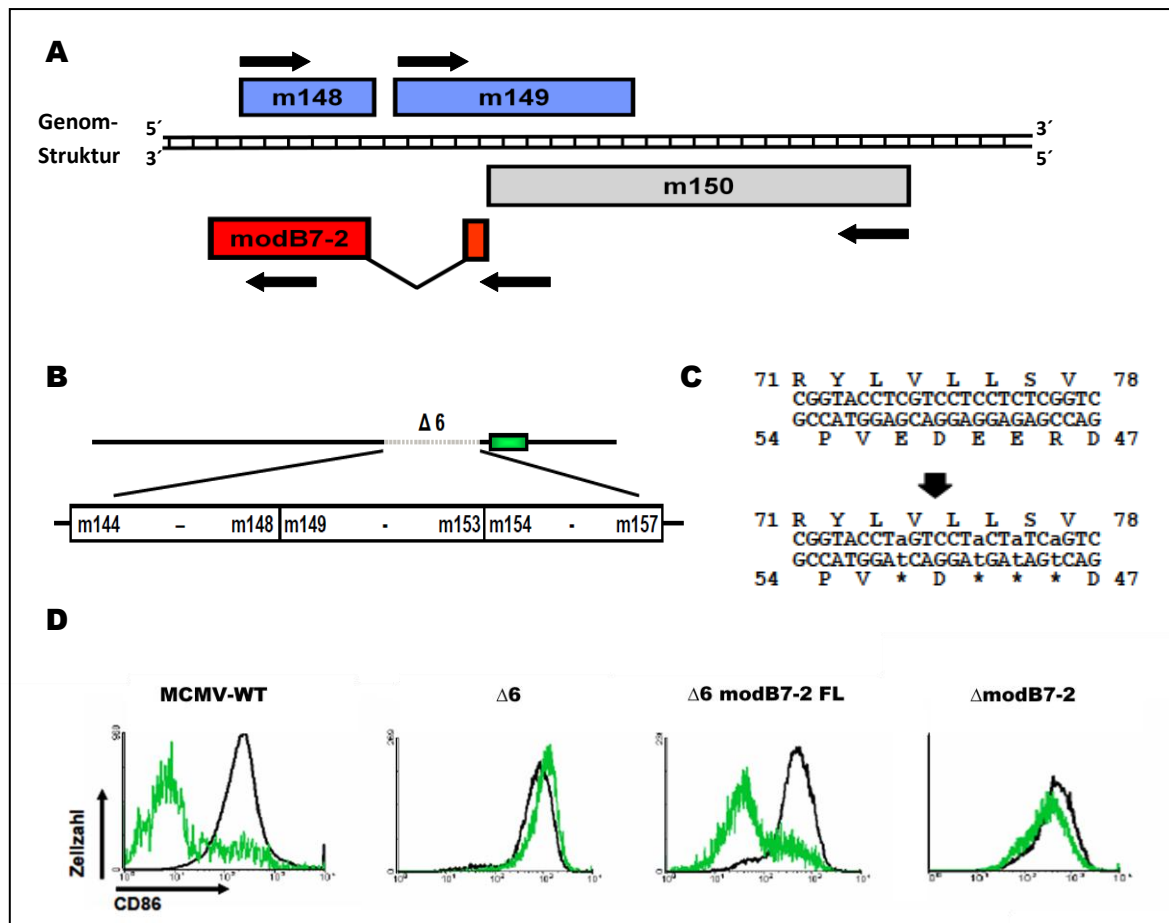


Abbildung 1.6 ModB7-2 ist das Gen-Produkt des ORFs m147.5 und seine Expression verringert die Oberflächenexpression von CD86 in RAW264.7-Zellen

(A) Lage von modB7-2 im MCMV Genom, Pfeile geben die Transkriptionsrichtung an. (B) Ausschnitt aus dem Genom von MCMV-Δ6, hier wurden die ORFs m144-m157 deletiert. (C) Ausschnitt aus der DNA-Sequenz der Mutante MCMV-ΔmodB7-2. Hier wurde durch Einfügen von vier Stop-Kodons (Sternchen) der Leserahmen von modB7-2 unterbrochen. (D) CD86-Oberflächenexpression von RAW264.7-Zellen nach Infektion mit verschiedenen Virus-Mutanten Grüne Kurven repräsentieren infizierte Zellen während schwarze Histogramme nicht-infizierte Zellen der gleichen Kultur darstellen (verändert nach Loewendorf, 2005).

Das Protein modB7-2 hat eine Größe von ca. 17 kDa, und gemäß Vorhersageprogrammen wird dieses als Typ IIIb Transmembranprotein berechnet (Loewendorf, 2005). Demnach besitzt das Protein modB7-2 zwei Transmembrandomänen und sowohl der C- als auch der N-Terminus des Proteins liegen auf der ektoplasmatischen Seite der Membran. Die putative Proteinstruktur und Membrantopologie von modB7-2 ist in Abbildung 1.7 dargestellt. ModB7-2 besitzt im Gegensatz zu den Proteinen K3 und K5 sowie den anderen MARCH-Proteine keine RING-Domäne, so dass vermutet werden kann, dass die Beeinflussung der CD86-Expression einem anderen Mechanismus folgt.

ModB7-2 gehört zu den frühen (*early*) Proteinen von MCMV und ist bei Infektion von RAW264.7-Zellen frühestens 3 h p. i. im Western Blot zu detektieren. Die Expression von modB7-2 kann dann allerdings selbst nach 48 h noch nachgewiesen werden. In unveröffentlichten Ergebnissen wurde gezeigt, dass die Transkription und Translation von CD86 sowie der CD86-Transport an die Zelloberfläche von modB7-2 unbeeinträchtigt zu sein scheinen (Dr. Kay-Fedorov, persönliche

modB7-2-abhängigen Verminderung der CD86-Oberflächenexpression in MCMV-infizierten APCs einen Beitrag leisten.

1.11 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Ein Charakteristikum des Cytomegalovirus ist seine Fähigkeit, das Immunsystem seines Wirtes zu manipulieren. Sowohl für HCMV als auch für den murinen Vertreter MCMV wurden bisher zahlreiche Proteine identifiziert, die in das Immunsystem eingreifen und so das Erkennen des Virus bzw. der infizierten Zelle erschweren und dadurch die Virusausbreitung unterstützen. Viele der bisher bekannten Mechanismen beeinflussen die Immunantwort durch das zelluläre Immunsystem, z. B. durch Modulation der MHC-I-Oberflächenexpression oder die Expression verschiedener kostimulatorischer Moleküle. Durch die Identifikation des MCMV-Proteins modB7-2 durch Loewendorf et al. wurde ein Protein bekannt, welches zur Reduktion der Zelloberflächenexpression des kostimulatorischen Moleküls CD86 führt (Loewendorf et al., 2004). Der Mechanismus der modB7-2-abhängigen CD86-Modulation ist bisher noch nicht geklärt.

Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, wie diese Beeinflussung der CD86-Expression durch das modB7-2-Protein funktioniert. Dazu sollte die Infektion von CD86-exprimierenden Fibroblasten sowie die Infektion von dendritischen Zellen (DC2.4-Zellen) mit MCMV Aufschluss über die Aktivität von modB7-2 in verschiedenen Zelltypen geben.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des Translationsstartpunktes des modB7-2-Gens. Durch Mutation der verschiedenen in der modB7-2-DNA-Sequenz vorhandenen Startkodons sollte die Frage beantwortet werden, an welchem der drei *in frame* vorhandenen, potentiellen Startkodons im modB7-2-ORF die Translation der modB7-2-mRNA initiiert wird. Zudem sollte die Rolle der 5'-nicht-translatierten Leaderregion des modB7-2-Transkripts analysiert werden. Anschließend sollte aufbauend auf diese Ergebnisse durch lentivirale Transduktion die Frage beantwortet werden, ob das modB7-2-Protein die Beeinflussung der CD86-Expression allein zu vollziehen vermag oder ob weitere MCMV-Proteine dafür benötigt werden.

Die intrazelluläre Lokalisation von modB7-2 kann u. U. Hinweise über den Mechanismus von modB7-2 liefern. Darum sollte in dieser Arbeit der Frage nachgegangen werden, wo sich modB7-2 als putatives Transmembranprotein innerhalb der Zelle aufhält. Dazu sollte mittels konfokaler Immunfluoreszenz-Mikroskopie die Lokalisation von modB7-2 mit der von verschiedenen Markern des sekretorischen Weges in der Zelle verglichen werden. Anhand dieser Ergebnisse sollten Mutationen der Aminosäuresequenz von modB7-2 Aufschluss darüber geben, ob bestimmte

Sequenzmotive innerhalb der Aminosäuresequenz des modB7-Proteins verantwortlich sind für dessen intrazelluläre Lokalisation.

Auch das Effektormolekül CD86 sollte in die Untersuchungen mit einbezogen werden. Zunächst sollte analysiert werden, ob das modB7-2-Protein CD86-Moleküle beeinflusst, die schon zum Zeitpunkt der Infektion auf der Zelloberfläche vorhanden sind, oder ob die modB7-2-Expression nur einen Effekt auf neusynthetisierte CD86-Moleküle hat. Zudem sollte das Verbleiben von CD86 untersucht werden: Dabei sollte Experimente durchgeführt werden, um eine mögliche Degradierung von CD86 oder eine intrazelluläre Speicherung von CD86 nach Infektion festzustellen. Zuletzt sollte untersucht werden, welche Endozytosemechanismen zur MCMV-abhängigen Internalisation von CD86 benutzt werden.

Kapitel 2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIAL

2.1.1 REAGENZIEN UND CHEMIKALIEN

Soweit nicht anders angegeben wurden die verwendeten Chemikalien von den Firmen Sigma-Aldrich (Steinheim), Roth (Karlsruhe) sowie Merck (Darmstadt) bezogen. Die Plastikwaren, die in dieser Arbeit verwendet wurden, wurden von Greiner Bio-one (Frickenhausen), Falcon (Heidelberg), Eppendorf (Hamburg) und Sarstedt AG & Co (Nümbrecht) bezogen.

2.1.2 LABORGERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIAL

Die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien und Laborgeräte sind in Tabelle 2.1 aufgelistet.

Tabelle 2.1 Verwendete Laborgeräte und Materialien

Avanti J-25-Zentrifuge	BeckmanCoulter, Fullerton, USA
Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
Blot-Papier	Roth, Karlsruhe
CO ₂ Zellkultur-Inkubator	Sanyo, Wood Dale, IL, USA
Deckgläschen (Φ 12 mm)	Menzel GmbH, Braunschweig
Durchflusscytometer Cytomics FC500	BeckmanCoulter, Fullerton, USA
Elektroporationsküvetten	Peqlab, Erlangen
Gel-Dokumentation	Alpha Innotech Corp., San Leandro, GB
Gene Pulser Xcell System	Biorad, München
Heraeus Megafuge 1.0	Thermo Scientific, Waltham, USA
Heraeus Multifuge 3SR+	Thermo Scientific, Waltham, USA
JA10-, JA20.1-, Type-19-, SW40-Rotoren	BeckmanCoulter, Fullerton, USA
LAS-3000 Imager	FujiFilm, Düsseldorf
Leica TCS SP5 MP Mikroskop	Leica Microsystems, Wetzlar
Mini-Protean Electrophoresis Systems	Biorad, München
Mini Trans-Blot Cell-System	Biorad, München

Nitrocellulose-Membran	Hybond-ECL, Amersham, Biosciences
Objektträger	Menzel GmbH, Braunschweig
Orion II Microplate Luminometer	Berthold Technologies, Bad Wildbad
PCR-Cycler Primus 25 advanced	Peqlab, Erlangen
pH-Meter PB 11	Sartorius, Göttingen
Power-Pac (200; HC)	Biorad, München
Roller CAT RM 5	Labortechnik Fröbel GmbH, Lindau
Schüttel-Inkubator Innova 4400	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Sterilwerkbank Heraeus HeraSafe	Kendro, Rodenbach
T3 Thermocycler	Biometra, Göttingen
Thermomixer kompakt	Eppendorf, Hamburg
Taumler Rocky 3D	Labortechnik Fröbel GmbH, Lindau
Ultrazentrifuge Optima L-70	BeckmanCoulter, Fullerton, USA
UV/vis Spektralphotometer Nanodrop	Peqlab, Erlangen
Zentrifugen 5415D; 5415R; 5417R; 5424	Eppendorf, Hamburg
Zeiss Axiovert 40C	Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
Zeiss Axiovert 40CFL	Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen

2.1.3 BAKTERIENSTÄMME

***E.coli* DH10B:** F-mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 endA1 araD139 Δ (ara leu) 7697 galU galK rpsL nupG λ -, bezogen von Invitrogen

***E.coli* PIR1:** F- Δ lac169 rpoS(am) robA1 creC510 hsdR514 endA recA1 uidA (Δ Mlul)::pir-116, exprimieren das Bakteriophagen-Protein λ pi, bezogen von Invitrogen

2.1.4 ZELLEN

DC2.4: Zelllinie aus dendritischen Zellen von C57BL/6-Mäusen (Shen et al., 1997)

HEK 293T: Humane embryonale Nierenzellen (zur Verfügung gestellt von Axel Schambach, Experimentelle Hämatologie, Medizinische Hochschule Hannover)

NIH 3T3: Murine Fibroblasten, bezogen von ATCC, CRL-1658

- MEF:** Primäre murine embryonale Fibroblasten, präpariert aus zwei Wochen alten BALB/c-Maus-Embryonen
- RAW264.7:** Monozyten-/Makrophagen-Zelllinie bezogen von ATCC, TIB-71
- WT3:** Fibroblasten-Zelllinie aus C57BL/6-Mäusen, die über retrovirale Transduktion stabil murines CD86 exprimieren (zur Verfügung gestellt von Lonnie Lybarger, Department of Cell Biologie and Anatomy, University of Arizona, Tucson, AZ; Jabbour et al., 2009)

2.1.5 ANTIBIOTIKA

Die folgenden Antibiotika-Konzentrationen wurden in der *E.coli*-Kultivierung mit LB-Flüssigkulturen oder LB-Agarplatten verwendet.

Chloramphenicol (Cam): 170 µg/ml (high copy Plasmide), 17 µg/ml (low copy Plasmide)

Kanamycin (Kan): 50 µg/ml (high copy Plasmide), 25 µg/ml (low copy Plasmide)

Ampicillin (Amp): 100 µg/ml (high copy Plasmide), 50 µg/ml (low copy Plasmide)

2.1.6 INHIBITOREN

Tabelle 2.2 In dieser Arbeit verwendete Inhibitoren und eingesetzte Konzentration

Inhibitor	Konzentration	Hersteller
Ammoniumchlorid	50 mM	Roth, Karlsruhe
Chlorpromazin	30 µM	Sigma-Aldrich, Steinheim
Filipin	16 nM	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dynasore	40 mM	Sigma-Aldrich, Steinheim
MG-132	5 µM	Sigma-Aldrich, Steinheim
Leupeptin	175 µM	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.1.7 ANTIKÖRPER

Tabelle 2.3 Antikörper

Name	Spezies	Quelle
Calnexin [AF18]	Maus, monoklonal	Abcam, Cambridge, UK
CD86	Ratte, monoklonal	BD Pharmingen, NJ, USA
CD86-Biotin	Ratte, monoklonal	BD Pharmingen, NJ, USA
EEA-1	Maus, monoklonal	BD Pharmingen, NJ, USA
GAPDH, clone 14C10	Kaninchen, monoklonal	CellSignalling Technologies, Danvers, USA
Golgi Matrix protein, GM130	Maus, monoklonal	BD Pharmingen, NJ, USA
Influenza-Virus Häm- agglutinin Epitop (HA)	Kaninchen, polyklonal	Sigma Aldrich, Steinheim
MCMV M57	Maus, monoklonal	S. Jonjic, Rijeka, Kroatien
MCMV modB7-2	Kaninchen, polyklonal	Pineda Antikörperservice, Berlin*
Isotyp Ratte IgG2a κ	Ratte monoklonal	BD Pharmingen, NJ, USA

Maus, Peroxidase-gekoppelt	Schaf-anti-Maus IgG	Amersham, Freiburg
Kaninchen, Peroxidase-gekoppelt	Ziege-anti-Kaninchen IgG	DAKO, Glostrup, Dänemark
Ratte, Peroxidase-gekoppelt	Kaninchen-anti-Ratte IgG	DAKO, Glostrup, Dänemark
Maus, Alexa488-gekoppelt	Ziege-anti-Maus IgG	Invitrogen, Heidelberg

Maus, Alexa568-gekoppelt	Ziege-anti-Maus IgG	Invitrogen, Heidelberg
Kaninchen, Alexa568-gekoppelt	Ziege-anti-Kaninchen IgG	Invitrogen, Heidelberg
Kaninchen, DyLight 649 gekoppelt	Ziege-anti-Kaninchen IgG	Jackson Immuno Research Laboratories Inc., Baltimore, USA
Streptavidin, PE-gekoppelt		BD Pharmingen, NJ, USA
Streptavidin, OregonGreen488 gekoppelt		Invitrogen, Heidelberg

*das polyklonale modB7-2-Antiserum von Pineda Antikörperservice wurde in Kaninchen hergestellt und ist gegen das Peptid NH₂-CLRGIANRYVAEPCGPDDE-COOH (entspricht dem C-Terminus von modB7-2) gerichtet.

2.1.8 PLASMIDE UND BACs (*BACTERIAL ARTIFICIAL CHROMOSOMES*)

pSM3fr:	low copy; BAC-Plasmid; enthält die vollständige Sequenz des MCMV-Stamms Smith. Cam ^R ; (Wagner et al., 1999).
pSM3fr-GFP:	low copy; BAC-Plasmid; enthält die vollständige Sequenz des MCMV-Stamms Smith. Das für das <i>enhanced green fluorescent protein</i> (GFP) kodierende Gen wurde in den IE2-Locus des viralen Genoms integriert. Cam ^R ; (Mathys et al., 2003).
MCMV-ΔmodB7-2:	low copy; BAC-Plasmid; der ORF von modB7-2 wurde durch Einführen von vier Stop-Kodons <i>in frame</i> unterbrochen. Cam ^R ; (Loewendorf et al., 2004; Loewendorf, 2005).
MCMV-Δ6:	low copy; BAC-Plasmid; hier wurden die ORFs m144-m157 durch das Einfügen eines Kanamycin-Resistenzgens ersetzt. Nach Entfernen dieses Gens blieb eine FRT-Stelle zurück. Cam ^R ; (Loewendorf et al., 2004; Loewendorf, 2005).

- MCMV-Δ6 FL:** low copy; BAC-Plasmid; entstanden durch Integration der modB7-2-cDNA unter der Kontrolle des MIEP in MCMV-Δ6. Cam^R; (Loewendorf et al., 2004; Loewendorf, 2005).
- MCMV-modB7-2HA:** low copy; BAC-Plasmid; an das 3'-Ende des ORFs von modB7-2 wurde die Sequenz für ein Hämagglutinin-Epitop zusammen mit einem Kanamycin-Resistenzgen angefügt. Nach Entfernen des Kanamycin-Resistenzgens blieb eine FRT-Stelle im Genom zurück. Cam^R; (Loewendorf et al., 2004; Loewendorf, 2005).
- pORI6K:** low copy, enthält eine multiple Klonierungsstelle (MCS). Die Selektion vermittelt ein Kanamycin-Resistenzgen, an das sich eine FRT-Stelle anschließt. Das Plasmid repliziert nur in Anwesenheit des λ pi-Proteins (Zur Verfügung gestellt von E. Borst, MHH, Hannover)
- pST76A-Flp:** low copy; exprimiert die Flp Rekombinase. Temperatursensitive Replikation bei 30 °C. Amp^R (zur Verfügung gestellt von E. Borst, MHH, Hannover; modifiziert nach Cherepanov und Wackernagel, 1995).
- pcDNA3:** high copy, Plasmid; Amp^R; dieser eukaryotische Expressionvektor ist erhältlich von Invitrogen life technologies, Darmstadt.
- pcDNA 3 + modB7-2HA:** high copy, Plasmid; hier wurde die am 3'-Ende HA-getaggte cDNA von modB7-2 in die MCS von pcDNA3 integriert und steht unter der Kontrolle des CMV-Promotors (zur Verfügung gestellt von Penelope Kay-Fedorov, MHH, Hannover).
- pCMV-Gluc:** Dieses Plasmid kodiert für die sekretierbare Gaussia Luciferase unter Kontrolle des murinen MIEP (zur Verfügung gestellt von Anja Marquardt; Marquardt et al., 2011)
- pRRL.PPT.SF.I2GFP:** Plasmid; Amp^R; lentiviraler Expressionsvektor. Das eingeführte Transgen steht unter der Kontrolle des SFFV (*spleen foamy forming virus*)-Promotors. Das Transgen kann direkt 5' vor einer IRES-GFP-Kassette eingebracht werden, so dass die Transgenexpression über die GFP-Expression verfolgt werden kann (siehe auch Abschnitt 2.9.1), (zur Verfügung gestellt von Axel Schambach; Experimentelle Hämatologie).

- pGag/pol:** Plasmid; Amp^R, kodiert für die lentivirale Polymerase und die Gruppenspezifischen Antigene; benötigt in der Lentivirusproduktion (Kapitel 2.9.1). (zur Verfügung gestellt von Axel Schambach; Experimentelle Hämatologie).
- pEnv:** Plasmid; Amp^R, kodiert für das Hüllprotein VSVg; benötigt in der Lentivirusproduktion (Kapitel 2.9.1). (zur Verfügung gestellt von Axel Schambach; Experimentelle Hämatologie).
- pRev:** Plasmid; Amp^R, kodiert für das Rev-Protein; benötigt in der Lentivirusproduktion (Kapitel 2.9.1). (zur Verfügung gestellt von Axel Schambach; Experimentelle Hämatologie).

2.1.9 KODON-OPTIMIERTE VARIANTE VON MODB7-2

Die Kodon-optimierte Variante von modB7-2 wurde von der Firma GeneArt (Invitrogen, Heidelberg) hergestellt. Dabei wurden auf die Expression negativ wirkende DNA-Elemente entfernt ohne jedoch die Aminosäuresequenz zu verändern; dies sollte die Expression von modB7-2 steigern (Angabe des Herstellers). Die DNA-Sequenz von modB7-2 KodOP kann im Anhang eingesehen werden.

2.1.10 SONSTIGE HILFSMITTEL

Zur Erstellung, Weiterverarbeitung und Veranschaulichung der Daten sowie zum Schreiben dieser Arbeit wurden folgende Software-Programme benutzt:

Vector NTI (Invitrogen, Darmstadt), Kaluza (BeckmanCoulter, Fullerton USA), Adobe Photoshop CS4 (Adobe Systems Inc., San Jose, USA), Adobe Illustrator CS (Adobe Systems Inc., San Jose, USA), LAS AF Lite (Leica Mikrosysteme, Wetzlar), Reference Manager (Thomas ISI ResearchSoft, Carlsbad, CA, USA) und MS Office (Microsoft Deutschland, Unterschleißheim).

2.2 KULTIVIERUNG BAKTERIELLER UND EUKARYOTISCHER ZELLEN

2.2.1 KULTIVIERUNG BAKTERIELLER ZELLEN

Die Kultivierung von Bakterien erfolgte entweder mit Flüssigkulturen oder mit Agarplatten. Als Nährmedium wurde Luria Bertani (LB)-Medium (Hefeextrakt, Trypton, NaCl) verwendet, dem je nach Bedarf das entsprechende Antibiotikum zugesetzt wurde. Zur Kultivierung wurden zunächst 5 ml Flüssigkulturen mit einem Bakterienklon angeimpft und – wenn nicht anders angegeben - über Nacht bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Mit dieser Kultur wurde entweder eine größere Flüssigkultur angeimpft, Plasmid-DNA isoliert oder eine kleine Menge (200-500 µl) zur Vereinzelung von Bakterienkolonien auf Agarplatten ausgestrichen. Agarplatten wurden, soweit nicht anders beschrieben, bei 37 °C ü. N. inkubiert und kurzfristig bei 4 °C gelagert.

2.2.2 KRYOKONSERVIERUNG BAKTERIELLER ZELLEN

Zur Kryokonservierung wurden 500 µl ü. N. gewachsener Flüssigkultur mit 500 µl einer 20%igen Glycerinlösung gemischt. Anschließend wurde die Glycerin-Bakterienmischung bei -80 °C gelagert.

2.2.3 KULTIVIERUNG EUKARYOTISCHER ZELLEN

Alle in dieser Arbeit verwendeten eukaryotischen Zellen wurden bei 37 °C und bei 5% CO₂ sowie bei hoher Luftfeuchtigkeit kultiviert. RAW264.7-Zellen und murine embryonale Fibroblasten (MEF) erhielten Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Sigma Aldrich) mit den Zusätzen 10% fötales Kälberserum (FCS), 2 mM Glutamin, 10 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin-Sulfat. Da es sich bei MEF um primäre Zellen handelt, wurden diese nur 2-3x passagiert.

HEK 293T-Zellen wurden in DMEM (Biochrom) mit 10% FCS, 2 mM Glutamin, 10 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert; NIH 3T3-Zellen erhielten DMEM (Sigma Aldrich) mit 5% NCS (*newborn calf serum*) sowie 10 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 2 mM Glutamin. Die Kultivierung von DC2.4-Zellen erfolgte mit RPMI 1640 (Biochrom), dem ebenfalls 10 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 2 mM Glutamin zugefügt wurde. WT3-Zellen wuchsen in DMEM (Sigma-Aldrich) mit 10% FCS, 1 mM HEPES, 2 mM Glutamin, 0,1 mM nicht-essentielle Aminosäuren, 1 mM

Natriumpyruvat, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin-Sulfat. Zur Erhaltung der CD86-Expression wurde dem Medium Hygromycin zugefügt.

Alle Zelllinien wurden regelmäßig auf Mykoplasma kontamination getestet (Venor® GeM Mycoplasma Detection Kits, Minerva Biolabs, Berlin).

Tabelle 2.4 Zellkulturmedien und -lösungen

DMEM (<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DMEM	Biochrom, Berlin
RPMI 1640	Biochrom, Berlin
FCS (fötales Kälberserum)	Biochrom, Berlin
NCS (<i>newborn calf serum</i>)	Biochrom, Berlin
1x Dulbecco's PBS-Puffer (<i>phosphate buffered saline</i>), ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	CytoGen, Sinn
Trypsin-EDTA (0,25%/ 0,02%) in PBS	Biochrom, Berlin
HEPES-Puffer	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Natriumpyruvat-Lösung	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
nicht-essentielle Aminosäuren-Lösung	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Penicillin/ Streptomycin-Sulfat/ Glutamin-Lösung	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Hygromycin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe

2.2.4 KRYOKONSERVIERUNG UND AUFTAUEN EUKARYOTISCHER ZELLEN

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen eines konfluenten Zellkulturgefäßes von dem Boden des Gefäßes abgelöst und in 2,5 ml des entsprechenden Zellkulturmediums ohne Zusätze aufgenommen. Anschließend wurden 800 µl dieser Zellsuspension in ein Kryoröhrchen überführt, vorsichtig 800 µl Einfriermedium (40% DMEM, 40% FCS, 20% DMSO) zugegeben und gemischt. Im Anschluss daran wurde das Kryoröhrchen in einem mit Isopropanol gefüllten Einfrierrondell bei -80 °C einige Tage gelagert und dann für die Langzeitlagerung in den Stickstofftank überführt.

Zum Auftauen eingefrorener Zellen wurden die Zellen schonend im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Anschließend wurde die Zellsuspension vorsichtig in neues, auf 37 °C vorgewärmtes Medium überführt. Zum Schluss wurden die Zellen 3 min bei 1300 rpm (Heraeus Megafuge 1.0)

abzentrifugiert, in frischem Medium aufgenommen und im Zellinkubator bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Am Folgetag wurde das Medium nochmals entfernt und durch frisches ersetzt.

2.2.5 ZELLZAHLBESTIMMUNG EUKARYOTISCHER ZELLEN

Die Zellzahlbestimmung wurde mittels der Neubauer-Zählkammer durchgeführt. Die Zellen eines konfluenten Zellkulturgefäßes wurden entsprechend Kapitel 2.2.3 von dem Gefäß abgelöst und in frisches, auf 37 °C vorgewärmtes Medium aufgenommen. 40 µl dieser Zellsuspension wurden mit 20 µl einer 0,4% Trypan-Blau-Lösung (Sigma-Aldrich, Steinheim) gemischt und gezählt

2.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

2.3.1 HERSTELLUNG ELEKTROKOMPETENTER BAKTERIEN

Zur Herstellung elektrokompetenter Bakterien wurden 500 ml LB-Medium mit 2,5 ml einer Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Sobald die Bakterienkultur eine OD_{578nm} von etwa 0,5 erreicht hatte, wurde die Kultur 15 min auf Eis abgekühlt. Im Anschluss wurden die Zellen bei 4 °C und 4000 rpm (Heraeus Megafuge 1.0) für 15 min abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 50 ml eiskaltem, sterilem bidest. H₂O resuspendiert und erneut unter den gleichen Bedingungen abzentrifugiert. Dieser Vorgang wurde ein weiteres Mal wiederholt. Danach wurden die Zellen mit einer sterilen, eiskalten 10%-Glyzerinlösung gewaschen. Die Zellen wurden nun in 0,5-1 ml der 10%-Glyzerinlösung aufgenommen, in vorgekühlte Gefäße aliquotiert (jeweils 50 µl) und anschließend wurden diese Aliquots bei -80 °C gelagert.

2.3.2 ELEKTROPORATION VON ELEKTROKOMPETENTEN BAKTERIEN

Zur genetischen Manipulation von Bakterien, zur Mutagenese oder zur Vermehrung von Plasmiden wurden die Plasmid-DNA durch Elektroporation in die jeweiligen elektrokompetenten Bakterien eingeschleust. Dazu wurde die Plasmid-DNA-Lösung zunächst für 15 min mit Hilfe einer Dialyse-Membran (Millipore, Billerica, MA, USA) dialysiert, um Salze zu entfernen; in der Zwischenzeit wurden die bei -80 °C gelagerten elektrokompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut. Nach der Dialyse wurden 2-40 ng Plasmid zu der Bakteriensuspension gegeben, welche nach Durchmischung in eine

vorgekühlte Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand 2 mm) gegeben wurden. Die Elektroporation erfolgte bei 2500 V, 200 Ω und 25 μ F. Nach der Elektroporation wurden die Bakterien kurz auf Eis gekühlt und dann mit 500 μ l LB-Medium gemischt. Danach wurde die Bakteriensuspension für 1 h bei 37 °C und 600 rpm im Heizblock geschüttelt und 50-200 μ l davon auf Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert.

2.3.3 PRÄPARATION VON PLASMID-DNA AUS *E.COLI* –IN KLEINEM MAßSTAB

Zur Herstellung von Plasmid-DNA aus *E.coli* im kleinen Maßstab wurde eine über Nacht gewachsene 5 ml-LB-Bakterienkultur mit entsprechendem Antibiotikum verwendet. 2 ml der Bakterienkultur wurden in ein 2 ml-Reagiergefäß überführt und 3 min bei 6000 rpm (Eppendorf-Zentrifuge 5415 R) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und erneut 2 ml der Bakteriensuspension in dasselbe Reagiergefäß überführt und zu gleichen Bedingungen zentrifugiert. Nachdem der Überstand restlos entfernt wurde, wurde das Pellet in 100 μ l Lösung I resuspendiert; anschließend wurde 200 μ l Lösung II zugegeben, durch Invertieren gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Sofort danach wurden 200 μ l Lösung III zugegeben, gemischt und für mind. 5 min auf Eis inkubiert. Dann wurde die Suspension 5 min bei 13.200 rpm und 4 °C zentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge 5415 R), der Überstand wurde in ein neues 2 ml-Reagiergefäß gegeben. Nach Zugabe von 400 μ l Isopropanol wurde der Ansatz gemischt; danach wurde die Plasmid-DNA durch Zentrifugation (20 min, 13.200 rpm, 4 °C; Eppendorf-Zentrifuge 5415 R) gefällt. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen (Zentrifugation bei 13.200 rpm, RT, 5 min). Der Überstand wurde hier restlos entfernt und das DNA-Pellet getrocknet (ca. 10 min bei RT oder 2-3 min bei 43 °C); dann wurde die DNA in 30 μ l TE (Tris-/EDTA)-Puffer unter Zugabe einer RNase A-Lösung (Endkonzentration 20 μ g/ μ l) aufgenommen und für 30 min bei 37 °C unter Schütteln gelöst. Die Plasmid-DNA wurde bei -20 °C gelagert.

Tabelle 2.5 Lösung zur Präparation von Plasmid-DNA

Lösung I:	Lösung II:	Lösung III:
50 mM Glukose	2,0 M NaOH	3 M Kaliumacetat
10 mM EDTA	1% SDS	
25 mM Tris pH 8.0	pH 12.5 bis 13.0	
TE-Puffer:	RNase A-Stocklösung	
10 mM Tris/HCl pH 7.5	10 mg/ml RNase A	
1 mM EDTA	10 mM Tris/HCl pH 7.5	
	15 mM NaCl	

2.3.4 PRÄPARATION VON PLASMID-DNA AUS *E.COLI* – IN GROßEM MAßSTAB

Zur Plasmidpräparation in großem Maßstab wurden eine ü. N. gewachsene Bakterienkultur (Volumen 100 ml) verwendet. Die gesamte Präparation wurde mit dem Nucleobond PC100 Kit (Machery-Nagel, Düren) durchgeführt; es wurden keine Abweichungen von den Herstellerangaben vorgenommen.

2.3.5 BAC-PRÄPARATION AUS *E.COLI* – IN KLEINEM MAßSTAB

Zur BAC (*bacterial artificial chromosomes*)-Präparation in kleinem Maßstab wurde am Vortag eine 10 ml-Bakterienkultur (mit entsprechendem Antibiotikum) im 50 ml-Gefäßen angeimpft und soweit nicht anders angegeben bei 37 °C ü. N. geschüttelt. Am Folgetag wurde die Bakterienkultur bei 4000 rpm und 4 °C für 10 min abzentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 200 µl der Lösung I gelöst und in ein 2 ml-Reagiergefäß überführt, anschließend wurden 300 µl Lösung II zugegeben, gemischt und der Ansatz wurde 5 min bei RT inkubiert. Dann wurden 300 µl Lösung III zugefügt und nach mind. 5-minütiger Inkubation auf Eis wurde der Ansatz für 5 min bei 13.200 rpm und 4 °C abzentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge 5415R). Der Überstand wurde in ein neues 2 ml-Reagiergefäß überführt, mit 600 µl Isopropanol gemischt und für 20 min bei 13.200 rpm und 4 °C abzentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge 5415R). Im Anschluss daran wurde der Überstand verworfen und das Pellet wie in 2.3.3 beschrieben mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen der BAC-DNA wurde das Pellet schonend mit 100 µl TE-Puffer mit RNase-Zusatz gelöst. Die so gewonnene BAC-DNA konnte für mehrere Wochen bei 4 °C gelagert werden. Alle hier verwendeten Puffer und Lösungen entsprachen den in Tabelle 2.5 angegebenen Puffern.

2.3.6 BAC-PRÄPARATION AUS *E. COLI* - IN GROßEM MAßSTAB

Auch hier wurde das Nucleobond PC100 Kit (Machery-Nagel, Düren) gemäß den Herstellerangaben verwendet; die BAC-Präparation wurde gemäß den Angaben für *low copy*-Plasmide durchgeführt.

2.3.7 KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON PLASMID-DNA

Die Konzentrationsbestimmung der DNA beruht hauptsächlich auf der Absorption von Adenin, dessen Absorptionsmaximum bei 260 nm liegt. Misst man nun die Absorption der DNA-Lösung bei 260 nm im Vergleich zur DNA-freien Referenzlösung, kann man die Konzentration der DNA bestimmen: eine OD_{260nm} von 1 entspricht einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml. Das Verhältnis von OD_{260nm}/OD_{280nm} , welches die Absorption der aromatischen Aminosäuren mit einbezieht, stellt ein nützliches Maß über die Reinheit der DNA-Lösung dar; der Quotient OD_{260nm}/OD_{280nm} sollte bei nahezu proteinfreier DNA zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

2.3.8 RESTRIKTION VON PLASMID-DNA MIT RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN

Für die Restriktion von Plasmid-DNA wurden Enzyme sowie Puffer der Firma New England Biolabs (NEB, Frankfurt) nach Herstellerangaben verwendet. Von aus Präparationen in kleinem Maßstab gewonnener Plasmid-DNA wurde 5 µl eingesetzt; bei Plasmid-DNA aus großem Maßstab wurde nach Konzentrationsbestimmung 0,5-1 µg DNA eingesetzt. Nach durchgeführter Restriktion wurde der Erfolg durch Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.3.11) überprüft.

Restriktionsansatz:	Plasmid-DNA	0,5 bis 1 µg
	10x Puffer (NEB)	3 µl
	Restriktionsenzym (20 U/µl)	1 µl
	H ₂ O bidest.	ad 30 µl → 3 h bei 37 °C

2.3.9 RESTRIKTION VON BAC-DNA MIT RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN

Auch bei der Restriktion von BAC-DNA wurden Enzyme und Puffer der Firma NEB (Frankfurt) nach Angaben des Herstellers ähnlich zu Kapitel 2.3.8 mit folgenden Abweichungen benutzt: Von

Präparationen aus kleinem Maßstab wurden 45 µl BAC-DNA und 5 µl 10xRestriktionspuffer verwendet. Bei Restriktion von BAC-DNA aus großem Maßstab wurde 10 µl BAC-DNA verwendet, die Reaktion fand im Endvolumen von 50 µl statt. Für beide Restriktionen wurden 5-40 U Enzym verwendet. Auch hier wurde die Restriktion mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.3.11) kontrolliert.

2.3.10 DEPHOSPHORYLIERUNG UND LIGATION VON DNA

Für die Dephosphorylierung von DNA wurde die *calf intestine phosphatase* (CIP) sowie der entsprechende Puffer von NEB (Frankfurt) verwendet. Die zu dephosphorylierende DNA-Lösung wurde gemäß Herstellerangaben mit der entsprechenden Menge Puffer gemischt und mit 10 U CIP versetzt. Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C wurde erneut 10 U CIP zugegeben und für weitere 20 min bei 56 °C inkubiert.

Dephosphorylierungsansatz:	Plasmid-DNA	x µl	
	10x Puffer (NEB)	3 µl	
	CIP (10 U/µl)	1 µl	
	H ₂ O bidest.	ad 30 µl	→ 1 h bei 37 °C
	Zugabe von 10 U CIP		→ 20 min bei 56 °C

Die Ligation wurde mit der T4-DNA-Ligase (NEB, Frankfurt) gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Die Inkubationszeit betrug 2 h bei RT oder die Ligation wurde bei 14 °C ü. N. durchgeführt. Das Verhältnis von Vektor zur Insert lag bei 1:3 bis 1:5.

Ligationsansatz:	10x Ligase-Puffer (NEB)	1 µl
	linearisiertes Plasmid	x µg
	Insert	y µg
	T4 DNA Ligase (NEB) (400 U/µl)	1 µl
	H ₂ O bidest.	ad 10 µl → 2 h bei RT

2.3.11 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Fragmenten mit unterschiedlicher Größe. Je nach zu erwartenden Größen der DNA-Fragmente wurden Gele zwischen 0,5% und 2% verwendet. Für die Auftrennung von Plasmid DNA-Fragmenten wurden TAE-Puffer verwendet. In der Regel wurden 10-20 µl Plasmid-DNA präpariert in kleinem Maßstab (Abschnitt 2.3.5) oder 1 µg Plasmid-DNA präpariert in großem Maßstab (siehe 2.3.4) mit der entsprechenden Menge 10x DNA-Ladepuffer versetzt und auf das Gel geladen. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 120 V für ca. 30 min. Im Anschluss daran wurde das Gel in einem Ethidiumbromid-Färbebad für 20 min gefärbt und dann mit der Gel-Dokumentationsanlage (Alpha Innotech Corp., San Leandro, GB) analysiert.

Für die Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten aus BAC-DNA wurden 0,5% TBE-Gele verwendet, hier wurde Ethidiumbromid dem Gel zugefügt. Es wurden 45 µl BAC-DNA (aus kleinem Maßstab – Abschnitt 2.3.5) mit 5 µl 10x DNA-Ladepuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Bei BAC-Präparationen in großem Maßstab (siehe 2.3.6) wurde 10 µl BAC-DNA verwendet. Die Elektrophorese wurde bei 90 V und mindestens 16 h in TBE-Puffer mit dem PerfectBlue TM Maxi S Gelsystem (Peqlab, Erlangen) durchgeführt.

Bei jeder Gelelektrophorese wurde ein Größenstandard (1 kb Plus DNA-Leiter; Invitrogen, Heidelberg) mitgeführt.

Tabelle 2.6 Verwendete Puffer zur Agarose-Gelelektrophorese

TAE-Puffer	TBE-Puffer	Agarose-Gel
40 mM Tris-Acetat pH 8.0	90 mM Tris/HCl pH 8.3	0,5-2% (w/v)
1 mM EDTA	90 mM Borsäure Agarose	in TAE- oder TBE-
	2 mM EDTA	Puffer
10x DNA-Ladepuffer		
50% (v/v) Glycerin		
0,37 mM Bromphenolblau		
10 mM EDTA pH 8.0		

2.3.12 RÜCKGEWINNUNG VON DNA AUS DEM AGAROSEGEL

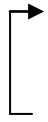
Um bestimmte DNA-Fragmente aus dem Gel zu extrahieren, wurden die entsprechende Banden aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten und in ein 2 ml-Reagiergefäß überführt. Für diese DNA-Extraktion aus dem Gel wurde das UltraClean™ 15-Kit von Mobio (Carlsbad, USA) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet.

2.3.13 POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)

Die 1987 etablierte Polymerase-Kettenreaktion von Kary B. Mullis (Mullis und Faloona, 1987) dient u. a. der Amplifizierung von DNA-Fragmenten. Für die PCRs in dieser Arbeit wurde die Phusion *high-fidelity* DNA -Polymerase von Finnzymes (Espoo, Finland) gemäß Herstellerangaben verwendet. Die PCR wurde im T3 Thermocycler von Biometra (Göttingen) durchgeführt.

PCR-Ansatz:	5x Phusion-Polymerase Puffer	10 µl
	dNTPs (0,2 mM)	2 µl
	Ausgangsplasmid (5-10 ng / µl)	1 µl
	Primer A (10 µM)	1 µl
	Primer B (10 µM)	1 µl
	Phusion-Polymerase (2 U/µl)	1 µl
	H ₂ O bidest.	ad 50 µl

PCR-Programm:

	Initiale Denaturierung	95 °C	5 min
35x		Denaturierung	95 °C 1 min
		Annealing	55-65 °C 30 s
		Extension	72 °C 15-30 s pro kb des Templates
			(Angabe von Finnzymes)
	Finale Extension	72 °C	7 min
	Lagerung	4 °C	∞

2.3.14 QUICK MUTAGENESE

Die in dieser Arbeit verwendete Methode der Quick Mutagenese beruht auf dem Prinzip von Weiner und Kollegen (Weiner et al., 1994). Dabei wird Plasmid-DNA mutiert, in dem man mit 5'-phosphorylierten Primern, welche die gewünschte Mutation in sich tragen, in einer PCR das gesamte Plasmid amplifiziert. Die so entstandene mutierte lineare DNA kann dann nach Ligation wieder in Bakterien transformiert und amplifiziert werden (siehe Abbildung 2.1).

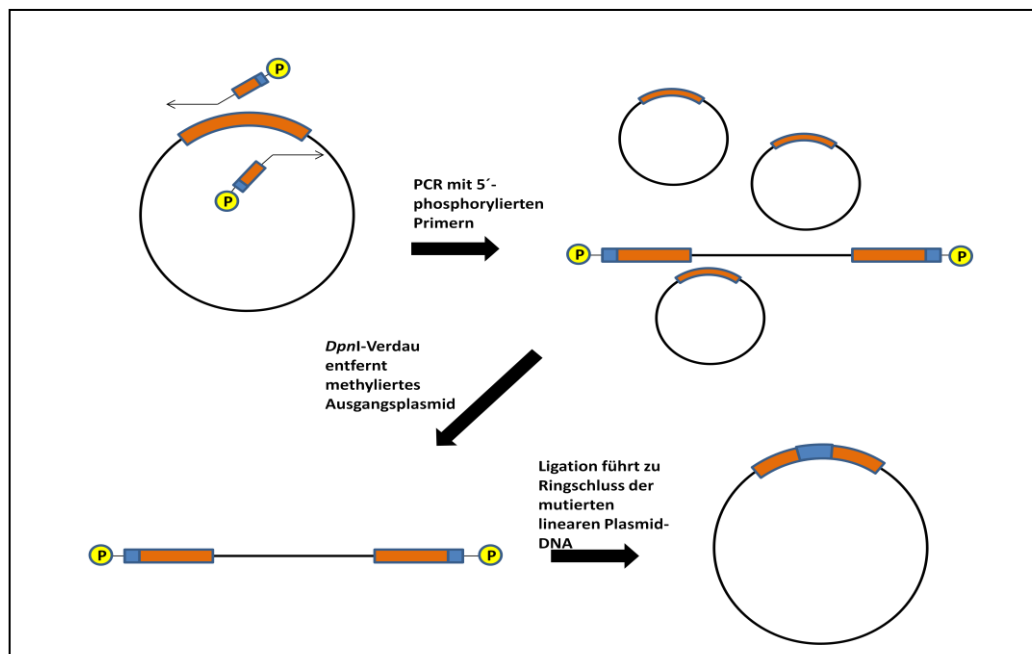


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung über den Ablauf der Quick Mutagenese

Zunächst wird das Ausgangsplasmid in einer PCR mit 5'-phosphorylierten Primern, die die einzuführende Mutation tragen, amplifiziert. Übriggebliebenes Ausgangsplasmid wird durch eine *DpnI*-Restriktion entfernt. Das mutierte lineare Plasmid wird dann zu einem ringförmigen Molekül ligiert (Weitere Ausführungen siehe Text).

Im Einzelnen wird bei der Quick Mutagenese zunächst eine PCR durchgeführt. Hierbei ist zu beachten, dass die Primer die gewünschte Mutation in sich tragen und am 5'-Ende phosphoryliert sind, zudem sind die Primer so gewählt, dass sie einer PCR das gesamte Plasmid amplifizieren (siehe 2.3.13). Im Anschluss an die PCR wurde der Reaktionsansatz auf ein Gel aufgetragen und nach erfolgter Agarose-Gelelektrophorese (Abschnitt 2.3.11) die entsprechende Bande aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA extrahiert (Kapitel 2.3.12). Um möglicherweise vorhandenes Ausgangsplasmid zu entfernen wurde nun ein *DpnI*-Verdau durchgeführt. *DpnI* schneidet nur methylierte DNA und somit nur DNA des nicht-mutierten Ausgangsplasmides aus *E.coli*, da der verwendete *E.coli*-Stamm DNA-Methylierungsenzyme exprimiert und so die Plasmid-DNA methyliert; das mutierte amplifizierte lineare PCR-Produkt bleibt unversehrt. Der *DpnI*-Verdau wurde laut Hersteller (NEB, Frankfurt) in einem Endvolumen von 30 µl für 1 h bei 37 °C durchgeführt.

DpnI-Restriktion:	DNA	x µl	
	10x Puffer (NEB)	3 µl	
	DpnI (20 U/µl)	1 µl	
	H ₂ O bidest	ad 30 µl	→ 1 h bei 37 °C

Anschließend wurde die DNA durch ein PCR-Aufreinigungskit von Quiagen von Puffer und Enzymen gereinigt. Die lineare DNA wurde wieder zu einem ringförmigen Molekül ligiert (Kapitel 2.3.10) und in *E.coli* transformiert (siehe 2.3.2). Der Erfolg der Mutagenese wurde über Restriktion und Sequenzierung der neu gewonnenen DNA überprüft.

Tabelle 2.7 Plasmide, welche mit Hilfe der Quick Mutagenese modifiziert wurden

Ausgangsplasmid	Modifikation	Primer	Zielpiasmid
pcDNA3 + modB7-2HA	Mutation des 2. und 3.ATG von modB7-2HA in CTA	1.ATGyes 2.ATGno3.ATGno	pcDNA3+ modB7-2HA1.ATG
pcDNA3 + modB7-2HA	Mutation des 1. und 3.ATG von modB7-2HA in CTA	1.ATGno 2.ATGyes3.ATGno	pcDNA3+ modB7-2HA2.ATG
pcDNA3 + modB7-2HA	Mutation des 1. und 2.ATG von modB7-2HA in CTA	1.ATGno 2.ATGno3.ATGyes	pcDNA3+ modB7-2HA3.ATG
pcDNA3 + modB7-2HA	Mutation der drei ersten ATGs von modB7-2HA in CTA	1.ATGno 2.ATGno3.ATGno	pcDNA3+ modB7-2HA2.ATG
pORI6K	Mutation der FRT-Stelle in eine zur in MCMV-Δ6 vorhandenen kompatiblen FRT-Stelle	FRT-mut for FRT-mut rev	pORI6K-FRTmut
pORI6K-FRTmut + modB7-2HA	Mutation des Acidic Clusters EEDE von modB7-2 in AAAA	noAcidic for noAcidic rev	pORI6K +modB7-2HAnoAcidic
pORI6K-FRTmut + modB7-2HA	Deletion der Sequenz vor dem 3.ATG von modB7-2	no1Exon for no1Exon rev	pORI6K +modB7-2HAno1Exon
pRRL.PPT.SF.i2GFP	Einfügen einer Restriktions- schnittstelle	AgeI for AgeI rev	pRRL.PPT.SF.i2GFP AgeI
pRRL.PPT.SF.i2GFP + modB7-2HA	Deletion der Sequenz vor dem 3.ATG von modB7-2	no1Exon Kozak for no1Exon rev	pRRL.PPT.SF.i2GFP + modB7-2HAno1Exon

2.3.15 SEQUENZIERUNG VON DNA

Sequenzierungen wurden hauptsächlich von Heidi Deppe, Institut für Virologie, MHH durchgeführt. In wenigen Fällen wurde die Sequenzierungen auch von Eurofins MWG Operon, Ebersberg und Sequiserve, Vaterstetten übernommen.

2.3.16 TRANSFEKTION EUKARYOTISCHER ZELLEN MIT Ca_2PO_4

Für die Transfektion von HEK 293T-Zellen wurden 2×10^6 Zellen in einer Zellkulturschale (Φ 10 cm) ausplattiert, die Transfektion der Zellen wurde am darauffolgenden Tag durchgeführt. Dazu wurde die jeweils benötigte Menge an Plasmid-DNA in einem Endvolumen von 438 μl sterilisiertem deionisiertem Wasser gegeben. Danach wurden 62 μl einer sterilen 2,5 M CaCl_2 -Lösung hinzugefügt und gut gemischt. Dann wurde der komplette Ansatz langsam und vorsichtig zu 500 μl 2x HEPES getropft, gefolgt von einer 20minütigen Inkubation bei RT. In der Zwischenzeit wurde das Medium der ausplattierten HEK 293T-Zellen abgenommen und durch 9 ml Medium inklusive 25 μM Chloroquin ersetzt. Im Anschluss wurde der gesamte Transfektionsansatz vorsichtig und tröpfchenweise zu den HEK 293T-Zellen gegeben, leicht geschwenkt und dann für 6-14 h kultiviert. Abschließend wurde das Medium abgenommen, durch frisches Medium ersetzt und bis zur Zellernte kultiviert.

2x HEPES:	10 g HEPES	
	16 g NaCl	
	0,74 g KCl	
	0,25 g Na_2HPO_4	
	2 g Dextrose	
	ad 1 l	pH 7,05

2.3.17 LUZIFERASE-ASSAY

Die Luziferase-Aktivität im Zellkulturüberstand wurde mit dem Orion II Microplate Luminometer (Berthold Technologies, Bad Wildbad) durchgeführt. Dazu wurden äquivalente Volumina der Substratlösung (1 mg Coelenterzin pro ml PBS) zum Überstand gegeben und in 96-Loch-Platten überführt; anschließend wurde das Chemolumineszenz-Signal detektiert.

2.4 PROTEIN-BIOCHEMISCHE METHODEN

2.4.1 HERSTELLUNG VON ZELLYSATEN

Zur Herstellung von Proteinlysaten wurden die Zellen von dem Boden des jeweiligen Zellkulturgefäßes gelöst (wie in 2.2.3 beschrieben) und in ein Reagiergefäß überführt. Die Zellen wurden für 10 min bei 4000 rpm und 4 °C (Heraeus Megafuge 1.0) abzentrifugiert und anschließend entweder eingefroren oder sofort in NP-40-Lysispuffer inklusive eines Protease-Inhibitor-Mixes (1% Endkonzentration; Proteinase-Inhibitor-Set III, Calbiochem, San Diego) resuspendiert. Die Menge des eingesetzten NP-40-Lysispuffers richtete sich nach der Zahl der zu lysierenden Zellen; für ein konfluent bewachsenes Loch einer 6-Loch-Platte wurde 30 µl Lysispuffer eingesetzt. Die Zellen wurden dann 3-4x in Folge abwechselnd für 30 s gevortext und 2 min auf Eis inkubiert. Nun wurde das Lysat erneut abzentrifugiert (5 min, 13.200 rpm; 4 °C; Eppendorf-Zentrifuge 5415R) und der Überstand in ein neues Reagiergefäß überführt. Im Anschluss daran wurde direkt die Proteinkonzentration bestimmt (Abschnitt 2.4.2) oder das Lysat wurde bei -20 °C gelagert.

NP-40-Lysis-Puffer:	Tris/HCl pH 7.4	20 mM
	NaCl	40 mM
	NP-40	1% (v/v)
	MgCl ₂	5 mM
	Zusatz:	1% Protease-Inhibitor-Cocktail

2.4.2 BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION VON ZELLYSATEN

Die Konzentrationsbestimmung von Zelllysaten erfolgte mit Hilfe der Konzentrationsbestimmung nach Bradford und wurde mit dem Biorad-ProteinAssay Dye Reagent Concentrate (Biorad, München) durchgeführt. Die Lysate wurden 1:10 verdünnt und anschließend wurde gemäß Herstellerangaben der Assay durchgeführt und die OD_{595nm} der Proteine in den Lysaten bestimmt. Die Messung erfolgte mit dem Plate reader Synergy 2 (Biotek, Bad Friedrichshall). Die Konzentration wurde mit Hilfe einer BSA-Eichgerade als Referenz errechnet. Sowohl die Messung der Eichgeraden als auch die der Proteinlysate wurde stets in Triplikaten durchgeführt.

Im Falle der Proteinlysate, die aus mit pcDNA3 + modB7-2 transfizierten HEK 293T-Zellen hergestellt wurden, wurde zur Berücksichtigung der Transfektionseffizienz ein Plasmid kotransfiziert, welches

für die „Gaussia Luciferase“ kodiert (siehe Kapitel 3.4). Um die Proteinlysate auf ihre Transfektionseffizienz normalisieren zu können wurde vor Zellernte der Zellkulturüberstand abgenommen und die Luziferaseaktivität in einer Dreifachmessung, wie in Kapitel 2.3.17 beschrieben, bestimmt. Anhand des Luziferase-Signals wurden dann die Lysatmengen normalisiert und so eventuell unterschiedliche Transfektionseffizienzen berücksichtigt.

2.4.3 PROTEOLYTISCHE BEHANDLUNG VON ZELLOBERFLÄCHENPROTEINEN MIT PRONASE

Um Zelloberflächenproteine von intakten Zellen zu entfernen, wurden die Zellen mit Pronase (Roche, Mannheim) behandelt (siehe Abbildung 2.2). Dabei handelt sich um einen Enzym-Cocktail aus mindestens 10 proteolytischen Komponenten, darunter neutrale Protease, Chymotrypsin, Trypsin, Carboxypeptidase, Aminopeptidase sowie neutrale und alkalische Phosphatasen.

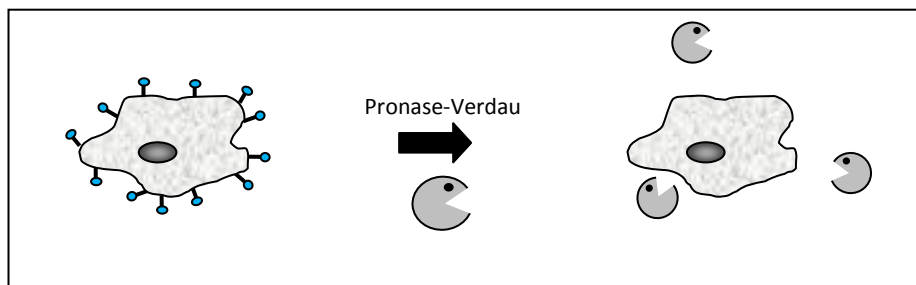


Abbildung 2.2 Pronase verdaut Oberflächenproteine

Der Enzym-Cocktail Pronase besteht aus verschiedenen Proteinasen und Phosphatasen und kann zur Degradierung von Oberflächenproteinen lebender Zellen genutzt werden.

Im jeweiligen Experiment wurden 1×10^6 -Zellen in 6-Loch-Platten ausplattiert, am Folgetag infiziert und 24 h p. i. zur Pronase-Behandlung eingesetzt. Die Zellen wurden von der 6-Loch-Platte abgelöst (siehe 2.2.3) und anschließend 5 min bei 1300 rpm (Heraeus Megafuge 1.0) sedimentiert. Die Zellen wurden 1x mit PBS gewaschen und danach in 400 μ l PBS mit 1,5 mg/ml Pronase (gelöst in H_2O) zugeben. Als Kontrolle dienten Zellen, die nicht mit Pronase behandelt wurden. Die Zellen wurden 1 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen 2x mit FCS gewaschen, in NP-40-Lysispuffer mit 2% Protease-Inhibitor-Mix resuspendiert und lysiert (Kapitel 2.4.1) und zur Konzentrationsbestimmung eingesetzt (Anschnitt 2.4.2).

2.4.4 UNTERSUCHUNG DES VERBLEIBS VON CD86 IN MCMV-WT INFIZIERTEN DC2.4-ZELLEN MIT PRONASE

Zur Untersuchung, ob CD86 in DC2.4-Zellen bei Infektion mit MCMV-WT intrazellulär gespeichert wird, wurden zunächst 1×10^6 -Zellen ausplattiert, am Folgetag mit MCMV-WT infiziert (MOI = 1) und 24 h p. i. zur Pronase-Behandlung eingesetzt (Abschnitt 2.4.3). Mit Hilfe dieses Versuchsansatzes konnte untersucht werden, ob CD86 nach Infektion von DC2.4-Zellen mit MCMV-WT intrazellulär gespeichert wird oder aber degradiert wird (siehe auch Kapitel 3, Abbildung 3.29).

2.4.5 ENDOGLYKOSIDASE H (ENDO H)-BEHANDLUNG

Endo H spaltet Asparagin-verknüpfte Mannose-reiche Oligosaccharide, die im endoplasmatischen Retikulum (ER) angefügt werden. Im Golgi-Apparat werden diese Oligosaccharide wieder modifiziert, so dass diese dann resistent gegenüber Endo H werden. So können ER-residente Proteinspezies identifiziert werden. Im entsprechenden Experiment wurden 1×10^6 -Zellen in 6-Loch-Platten ausplattiert und am nächsten Tag wie angegeben infiziert. 24 h nach der Infektion wurden die Zellen geerntet und lysiert (siehe 2.4.1). Dann wurde 13 μ l Lysat mit 2 μ l 10x EndoH-Puffer und 5 μ l EndoH (5 U/ml; Roche) gemischt und für 12-16 h bei 37 °C inkubiert. Dann wurden die Ansätze entsprechend mit SDS-Probenpuffer gemischt, gekocht und für die SDS-PAGE verwendet (Abschnitt 2.4.8).

10x EndoH-Puffer:

500 mM Natriumcitrat pH 5.5

EndoH-Ansatz:

13 μ l Proteinlysat

2 μ l 10x EndoH-Puffer

5 μ l EndoH (5 U/ml) → 12-16 h bei 37 °C

2.4.6 PNGASE F-BEHANDLUNG

PNGase F ist eine Amidase, die zwischen Glucose-N-acetyl-Resten und Asparagin in Mannose-reichen, Hybrid und komplex N-glykosylierten Proteinen spaltet. Bevor die Zelllysate der PNGase-Behandlung unterzogen wurden, musste diese denaturiert werden. Dazu wurden die Lysate mit dem 4x Denaturierungspuffer (2% SDS, 4% β -Mercaptoethanol) im Verhältnis 3:1 gemischt und 10 min bei

99 °C gekocht. Anschließend wurden 20 µl der denaturierten Lysate wie unten angegeben mit 2,5 µl einer 0,5 M Natriumphosphatlösung (pH 7.6), 1,5 µl einer NP-40-Lösung und 1 µl PNGase F (1000 U/ml, Roche) gemischt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Dann wurden die PNGase F-behandelten Proben nochmals mit SDS-Ladepuffer gemischt und 5 min bei 99 °C gekocht (wie in Abschnitt 2.4.8 beschrieben).

Denaturierungspuffer:

2% SDS
4% β-Mercaptoethanol

PNGase F-Ansatz:

20 µl denaturiertes Lysat
2,5 µl 0,5 M Natriumphosphat-Lösung pH 7.6
1,5 µl 10% NP-40-Lösung
1 µl PNGase F (1000 U/ml) → 1 h bei 37 °C

2.4.7 DEPHOSPHORYLIERUNG VON PROTEINLYSATEN

Die Dephosphorylierung von Proteinlysaten wurde mit der *caly intestine phosphatase* (CIP) sowie mit dem entsprechenden Puffer von NEB (Frankfurt) gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Die Dephosphorylierung erfolgt bei 37 °C für 1 h.

Dephosphorylierungsansatz:

Proteinlysat	17 µl	
10x Puffer (NEB)	2 µl	
CIP (10 U/µl)	1 µl	→ 1 h bei 37 °C

2.4.8 SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)

In dieser Arbeit wurde das diskontinuierliche Gel-System von Lämmli verwendet, bei dem das Trenngel von einem Sammelgel überschichtet wird. Je nach aufzutrennendem Protein wurden 10-15%ige Trenngele verwendet, zur Herstellung der Gele wurde eine 40%ige Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (37,5:1) von Qbiogen (Irvine, USA) benutzt. Die Auftrennung erfolgte bei 60 V im Sammelgel, erreichte die Lauffront das Trenngel, wurde die Spannung auf 120 V erhöht. Zur Größenbestimmung wurde bei jeder SDS-PAGE ein Protein Marker (Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder, Fermentas, St.Leon-Rot) mitgeführt.

Wurde nach der SDS-PAGE ein Western Blot (Abschnitt 2.4.9) durchgeführt, um CD86 zu detektieren, wurde kein β-Mercaptoethanol dem 2x SDS-Probenpuffer zugefügt, da sonst der α-CD86-Antikörper das Protein nicht mehr erkennt.

Tabelle 2.8 Verwendete Lösungen und Puffer zur SDS-PAGE

SDS-Probenpuffer:		Sammelgel (5%)*:	
TRIS/HCl, pH 6.8	100 mM	40% Acrylamid-Mix	0,4 ml
SDS	4% (v/w)	1,0 M Tris/HCl pH6.8	0,38 ml
Bromphenol-Blau	0,2% (v/w)	10%SDS-Lösung	30 µl
Glycerin	20% (v/v)	APS	30 µl
(β-Mercaptoethanol	Endkonz. 1:35)	TEMED	3 µl
		H ₂ O	2,2 ml
Trenngel (10%)*:		Trenngel (12%)*:	
40%Acrylamid-Mix	1,3 ml	40% Acrylamid-Mix	1,5 ml
1,5 M Tris/HCl pH8.8	1,3 ml	1,5 M Tris/HCl pH 8.8	1,3 ml
10% SDS-Lösung	50 µl	10% SDS-Lösung	50 µl
APS	50 µl	APS	50 µl
TEMED	2 µl	TEMED	2 µl
H ₂ O	2,3 ml	H ₂ O	2,1 ml
Trenngel (15%)*:		SDS-PAGE-Laufpuffer:	
40% Acrylamid-Mix	1,95 ml	Tris	25 mM
1,5 M Tris/HCl pH8.8	1,3 ml	Glyzin	250 mM
10% SDS-Lösung	50 µl	SDS	0,1% (w/v)
APS	50 µl		
TEMED	2 µl		
H ₂ O	1,65 ml		

*die Angaben beziehen sich auf Gele von 8 cm Breite

2.4.9 WESTERN BLOT

Beim Western Blot werden die in einer zuvor durchgeführten SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und können dann über Antikörperfärbungen sichtbar gemacht werden. In dieser Arbeit wurde das Mini Trans-Blot Cell-System (Biorad, München) verwendet. Vor dem Start des Western Blots wurden die Nitrozellulose-Membran (Hybond-ECL,

Amersham, Biosciences), SDS-Gel, Filter und Blot-Papier (Rot, Karlsruhe) für 15 min in Transferpuffer inkubiert. Im Anschluss daran wurde das „Sandwich“ aus allen Bestandteilen zusammgebaut und der Western Blot durchgeführt (1 h bei 350 mA). Dann wurde die Membran durch Inkubation in 5% Magermilchpulver in PBS-T für 1 h bei RT unter Schütteln geblockt, alternativ erfolgte die Inkubation auch bei 4 °C ü. N.. Die Primärantikörper-Inkubation erfolgte für 1,5 h bei RT unter Schütteln ebenfalls in 5% Milch-PBS-T. Danach wurde die Membran 3x für 10 min mit PBS-T gewaschen, um ungebundenen Primärantikörper zu entfernen. Die Inkubation mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper wurde für 1 h unter Schütteln bei RT in 5% Milch-PBS-T durchgeführt. Abschließend wurde die Membran erneut 3x für 10 min mit PBS-T gewaschen. Die Detektion erfolgte unter Verwendung des ECL-Kits der Firma Amersham Biosciences (Freiburg) gemäß Herstellerangaben mit dem LAS-3000 Imager. In einigen Fällen wurde das ECL-Advanced Kit (Amersham Biosciences, Freiburg) – inklusive Blockierlösung - gemäß den Herstellerangaben benutzt.

Tabelle 2.9 Verwendete Lösungen bei der Western Blot-Analyse

Transfer-Puffer:		PBS-T:	Blockierlösung:
Methanol	20% (v/v)	PBS mit 0,1% Tween (v/v)	5% Magermilchpulver (w/v)
Tris	40 mM		in PBS-T
Glyzin	119 mM		

Tabelle 2.10 In der Westernblot-Analyse verwendete Antikörper und ihre Verdünnungen

Prim. Antikörper	Verd.	Sek. Antikörper	Verd.
CD86	1:500	HRP-anti-Ratte IgG	1:2000
M57	1:8	HRP-anti-Maus IgG	1:2000
modB7-2	1:500	HRP-anti-Kaninchen IgG	1:1000
GAPDH	1:1000	HRP-anti-Kaninchen IgG	1:1000
Hämagglutinin (HA)	1:500	HRP-anti-Kaninchen IgG	1:1000

2.4.10 ENTFERNUNG VON ANTIKÖRPERN VON DER NITROZELLULOSEMEMBRAN

Eine im Western Blot verwendete Nitrozellulosemembran kann für eine zweite Färbung wiederverwendet werden. Dazu wurde die Membran in 50 ml Stripping Puffer bei 50 °C für 20 min inkubiert. Anschließend wurde die Membran mind. 10x mit PBS-T gewaschen und erneut mit Blockierlösung blockiert und für eine zweite Färbung analog zu Kapitel 2.4.9 verwendet.

Stripping Puffer:	0,5 M Tris pH 6.8	5 ml
	β-Mercaptoethanol	350 µl
	10% SDS-Lösung	10 ml
	bidest. H ₂ O	ad. 50 ml

2.5 IMMUNFLUORESCENZ-MIKROSKOPIE

2.5.1 BESCHICHTUNG VON DECKGLÄSCHEN MIT POLY-L-LYSIN

Zur besseren Haftung der Zellen an den Deckgläschen wurden die Deckgläschen mit Poly-L-Lysin beschichtet. Zunächst wurde je ein Deckgläschen (Φ 12 mm) in ein Loch einer 24-Loch-Platte gelegt und mit 70% Ethanol gewaschen und so sterilisiert. Anschließend wurden die Deckgläschen noch zweimal mit PBS gewaschen. Dann wurden die Deckgläschen entnommen, je auf einen Tropfen (50 µl) Poly-L-Lysin (0,01%, Sigma Aldrich) gelegt und unter sterilen Bedingungen bei RT für 1 h inkubiert. Danach wurden die Gläschen mit der Poly-L-Lysin beschichteten Seite nach oben wieder in die Löcher einer 24-Loch-Platte gelegt und 3x mit sterilem H₂O gewaschen. Zum Trocknen wurde die 24-Loch-Platte ü. N. bei 37 °C inkubiert und konnte dann bei RT gelagert werden.

2.5.2 IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG

Um Zellen für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie einzusetzen, wurden zunächst 3x 10⁴-Zellen auf sterilen, mit Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen (siehe 2.5.1) ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen mock infiziert oder mit MCMV infiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion geerntet. Dazu wurde das Medium von den Zellen entfernt und 300 µl 3% Paraformaldehyd (PFA) auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden für 20 min mit 3% PFA bei RT inkubiert und im Anschluss daran

3x mit PBS gewaschen. Nun wurde die Fixierung der Zellen mit 500 µl einer Ammoniumchlorid-Lösung (50 mM Ammoniumchlorid in PBS) für 15 min bei RT abgestoppt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 7 min in einer 0,2% Triton X-100-Lösung (in PBS) permeabilisiert und danach ebenfalls 3x mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für mind. 5 min bei RT mit einer Gelatine-Lösung (0,2% Gelatine in PBS) inkubiert.

Jetzt wurden die Zellen mit dem Primärantikörper und dem DNA-Farbstoff HOECHST33342 (HOECHST, Frankfurt-Höchst) inkubiert. Dazu wurden die Primärantikörper zusammen mit HOECHST33342 mit der Gelatinelösung verdünnt und ein Topfen davon (50 µl) wurde auf Parafilm in einer feuchten Kammer gegeben. Die Deckgläschen wurden mit der bewachsenen Seite nach unten auf diesen Tropfen gegeben und für 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Deckgläschen wieder zurück in die 24-Loch-Platte überführt (bewachsene Seite nach oben) und 4x mit der 0,2%igen Gelatinelösung gewaschen. Im Anschluss daran wurden die Deckgläschen wieder in der feuchten Kammer mit dem Sekundärantikörper inkubiert: dazu wurden die Deckgläschen erneut auf einen Tropfen (50 µl) einer 0,2% Gelatine-Lösung gelegt, die die Sekundärantikörper in der jeweiligen Verdünnung enthält (bewachsene Seite nach unten). Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte bei RT für 45 min im Dunkeln. Dann wurden die Deckgläschen erneut in die 24-Loch-Platte überführt, 4x mal mit PBS gewaschen, kurz in H₂O bidest. getaucht und auf einem Tuch trocken getupft. Zuletzt wurde das Deckgläschen auf einem Objektträger mit Hilfe des Einbettungsmediums Aqua Polymount (Polysciences, Warrington, USA) eingebettet.

Die Auswertung der Präparate erfolgte mit dem konfokalen Laser-scanning-Mikroskop (Leica TCS SP5 MP, Leica Mikrosysteme, Wetzlar). Helligkeit, Kontrast und Tonwert der fluoreszenz-mikroskopisch erstellten Abbildungen wurden mit Hilfe der Adobe Photoshop CS4-Software (Adobe Systems Inc., San Jose, USA) nachträglich justiert. Zur graphischen Darstellung und Auswertung wurde zudem die Software Adobe Illustrator (Adobe Systems Inc., San Jose, USA) und LAS AF Lite (Leica Mikrosysteme, Wetzlar) verwendet.

Tabelle 2.11 In der Immunfluoreszenz verwendete Antikörper, Farbstoffe und ihre Verdünnungen

Prim. Antikörper/Farbstoff	Verd.	Sek. Antikörper	Verd.
Calnexin	1:500	Maus, Alexa488-gekoppelt	1:1000
		Maus, Alexa568-gekoppelt	1:500
GM130	1:100	Maus, Alexa488-gekoppelt	1:1000
		Maus, Alexa568-gekoppelt	1:500
EEA-1	1:500	HRP Maus, Alexa488-gekoppelt	1:1000
		Maus, Alexa568-gekoppelt	1:500
Hämagglutinin (HA)	1:500	Kaninchen, Alexa568-gekoppelt	1:500
		Kaninchen DyLight 649-gekoppelt	1:200
CD86-Biotin	1:2500	Streptavidin, OregonGreen 488 gekoppelt	1:30.000
HOECHST33342	1:5000		

2.6 FACS-ANALYSEN

2.6.1 FACS-FÄRBUNG ZUR BESTIMMUNG DER CD86-MENGE AUF DER ZELLOBERFLÄCHE NACH INFEKTION

Zur Bestimmung der CD86-Menge auf der Zelloberfläche nach Infektion wurden 1×10^5 oder 1×10^6 Zellen am Vortag ausgesät. Am Tag des Experimentes wurden die Zellen von dem Kultivierungsgefäß

abgelöst (siehe 2.2.3). Im Anschluss daran wurden die Zellen bei 1.700 rpm und 4 °C (Heraeus Megafuge 1.0) für 7 min abzentrifugiert und in FACS-Puffer (2% FCS, 3% Pferdeserum, 2 mM EDTA in PBS) resuspendiert. Dieser Zentrifugationsschritt wurde einmal wiederholt und anschließend die Zellen in 100 µl FACS-Puffer aufgenommen, in die Löcher einer 96-Loch-Platte überführt und für 10 min in FACS-Puffer inkubiert, um den von MCMV kodierten F_c-Rezeptor zu blockieren. Danach wurden die Zellen erneut für 7 min bei 1.700 rpm und 4 °C abzentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0) und dann in 100 µl der Färbelösung aufgenommen. Die Zellen wurden für 20 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Dann wurden die Zellen abzentrifugiert (1.700 rpm, 7 min, 4 °C; Heraeus Megafuge 1.0) und einmal mit FACS-Puffer gewaschen, dann in 600 µl FACS-Puffer + 1,5% PFA aufgenommen und zur FACS-Analyse eingesetzt.

Zur Kompensation der spektralen Überlappungen (des emittierten Lichts der Farbstoffe) in den Detektoren wurden sowohl Einzelproben ungefärbt bzw. Einzelfärbungen für PE, GFP und 7AAD vorgenommen. Im Falle der Einzelfärbung für 7AAD (Lebend-Tot-Färbung) wurden die Zellen vor der Färbung 10 min bei 60 °C inkubiert.

Die FACS-Messung erfolgte mit dem Durchflusscytometer Cytomics FC500 (BeckmanCoulter, Fullerton, USA), die Auswertung wurde mit der Analysesoftware Kaluza (BeckmanCoulter, Fullerton USA) vorgenommen. Bei der Auswertung wurden im Overlay der Histogramme alle Histogramme auf die gleiche Höhe gesetzt.

Tabelle 2.12 Lösungen zur FACS-Analyse

FACS-Puffer (in PBS):		Färbelösung (je Probe):	
EDTA	2 mM	FACS-Puffer	100 µl
FCS	2%	anti-CD86-Biotin	1 µl
Pferdeserum	3%	Streptavidin-PE	0,5 µl
		7AAD	20 µl

2.6.2 FACS-FÄRBUNG ZUR BESTIMMUNG DES EINFLUSSES VON MODB7-2 AUF DIE VOR INFektion AUF DER ZELLOBERFLÄCHE VORHANDENE CD86-MENGE

Zur Bestimmung der CD86-Menge, welche vor Infektion auf der Zelloberfläche vorhanden ist, wurden zunächst 1×10^6 Zellen ausplattiert. Am Folgetag wurden die Zellen mit MCMV infiziert und zentrifugiert (Abschnitt 2.7.1) und bei 37 °C inkubiert. 30 min nach Infektion wurden die Zellen mit

FACS-Puffer gewaschen und dann in 100 µl FACS-Puffer aufgenommen, dem 1 µl anti-CD86-Biotin bzw. 1 µl monoklonaler IgG2a κ, Ratte (Isotypkontrolle) zugefügt wurde. Die Zellen wurden anschließend 30 min auf Eis inkubiert, mit FACS-Puffer gewaschen, in vorgewärmten Zellkulturmedium aufgenommen und bei 37 °C und 5% CO₂-inkubiert, bis der Zeitpunkt 16 h p. i. erreicht worden war. Dann wurden die Zellen wie in 2.6.1 beschrieben zur FACS-Färbung (allerdings nur mit 7AAD und Streptavidin-PE) und zur FACS-Messung eingesetzt. Der Versuchsaufbau ist nochmals in Kapitel 3, Abbildung 3.25 schematisch skizziert.

2.6.3 ZELLSORTIERUNG

Die Zellsortierung GFP-exprimierender Zellen wurde von der „Research Facility Cell Sorting“ der Medizinischen Hochschule Hannover (Labor-Koordinator Dr. Matthias Ballmaier) durchgeführt.

2.7 VIROLOGISCHE METHODEN

2.7.1 INFEKTION MURINER ZELLEN MIT MCMV

Zur Infektion von Zellen mit MCMV wurden am Vortag die vom jeweiligen Versuchsaufbau verlangte Zellzahl ausplattiert (i. d. R. 3×10^4 bis 1×10^6). Am Folgetag wurde dann die gewünschte Menge Virus (in der benötigten *multiplicity of infection* (MOI)) zu den Zellen gegeben. Nun wurden die Zellen zur Steigerung der Infektionsrate für 20 min bei 2.000 rpm (Heraus Multifuge 3SR+) und RT zentrifugiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen bei 37 °C und 5% CO₂ bis zur weiteren Verwendung inkubiert.

2.7.2 HERSTELLUNG VON VIRUSSTOCKS

Zunächst wurden zur Produktion von Virusstocks pro Stock MEFs in 10 Zellkulturschalen (Φ 14,5 cm) ausplattiert und kultiviert, bis die Zellen eine Konfluenz von ca. 70-80% aufwiesen. Dann wurden die Zellen mit einer MOI von 0,01 infiziert, wobei darauf geachtet wurde, dass die Viruszugabe in allen Schalen gleich erfolgte. Zur gleichmäßigen Verteilung des Virus in der jeweiligen Schale wurde die Schale sanft geschwenkt. Dann wurden die Zellen bei 37 °C und 5% CO₂ solange inkubiert, bis ein vollständiger cytopathischer Effekt (CPE) erreicht wurde. Nun wurden der Überstand inklusive Zellen geerntet, in ein steriles Zentrifugengefäß überführt und bei Bedarf bei -80 °C gelagert. Alle folgenden

Zentrifugationsschritte fanden bei 4 °C statt und es wurde streng darauf geachtet, den Virusstock bei jedem Schritt auf Eis zu halten. In der folgenden Zentrifugation im JA-10-Rotor von Beckmann (20 min, 6.000 rpm) wurden zunächst Zelltrümmer pelletiert. Der Überstand wurde nun in ein frisches, steriles Zentrifugegefäß überführt und für 3 h 10 min bei 13.000 rpm mit dem Type-19-Rotor (BeckmanCoulter, Fullerton, USA) zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und 5 ml Medium (DMEM; Sigma Aldrich, inklusive 10% fötales Kälberserum (FCS), 2 mM Glutamin, 10 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin-Sulfat) auf das Viruspellet gegeben. Zur schonenden Resuspendierung wurde das Pellet auf Eis und bei 4 °C ü. N. gelagert. Am nächsten Tag wurde das Pellet durch mehrmaliges Auf-und Abpipettieren resuspendiert und mit dem Hand-Homogenisator homogenisiert. 2 ml einer Saccharose-Lösung wurden dann in sterile Zentrifugenröhrchen gegeben und das Virus-Homogenisat darauf geschichtet. In der anschließenden Zentrifugation (20.000 rpm, 1 h 10 min, SW40Ti-Rotor) wurden die Viruspartikel erneut pelletiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Viruspellet in 2 ml Saccharose-Lösung resuspendiert und nochmals mit dem Hand-Homogenisator vollständig homogenisiert. Im Anschluss daran wird der so produzierte Virusstock in vorgekühlte Reagiergefäße aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Alle Virusstocks wurden nach der Präparation auf Mykoplasmakontamination getestet (Venor® GeM Mycoplasma Detection Kits, Minerva Biolabs, Berlin).

Saccharose-Lösung:

Saccharose	15% (w/v)
Tris/HCl pH7.8	50 mM
KCl	12 mM
EDTA	5 mM

2.7.3 VIRUSTITERBESTIMMUNG DURCH PLAQUE ASSAYS

Zur Bestimmung des Virustiters wurden murine embryonale Fibroblasten (MEF) in die Löcher einer 48-Loch-Platte gesät und kultiviert; die Titration selbst wurde erst bei Erreichen vollständiger Konfluenz durchgeführt. Dazu wurde ein Aliquot des Virusstocks aufgetaut und davon die Verdünnungsstufen 10^{-1} bis 10^{-9} in 4 °C kaltem MEF-Medium hergestellt. Anschließend wurde das Medium von den MEF-Zellen abgenommen und 100 µl der jeweiligen Verdünnung auf die MEFs gegeben; alle Verdünnungsstufen wurden dabei in Triplikaten angesetzt. Die MEFs wurden dann für 2 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Im Anschluss wurden das Medium wieder entfernt und 500 µl

Titrationsmedium zugeben. Die im Titrationsmedium vorhandene Carboxymethylcellulose verhindert als eine Art „Kleister“ die Virusausbreitung über das Medium, so dass infizierte Zellen das Virus nur an benachbarte Zellen weitergeben können. Die MEFs wurden dann weiter kultiviert, bis durch den CPE deutlich Plaques im Zellrasen zu erkennen waren (ca. 4 Tage nach Infektion). Die Plaques wurden ausgezählt und daraus der jeweiligen Titer berechnet.

Titrationsmedium:

Carboxymethylcellulose	0,75% (w/v)
FCS	5% (v/v)
10x DMEM	10% (v/v)
Glutamin	2 mM
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin-Sulfat	100 µg/ml
d-Glucose	3,5 g/l
Folsäure	4 mg/l
Natrium-Bicarbonat	0,37% (v/v)

2.7.4 PRODUKTION VON VIRUSPARTIKELN AUS BAC-DNA

Die Produktion von Virus aus BAC-DNA erfolgte durch Elektroporation von MEF oder NIH 3T3-Zellen. Die Zellen einer konfluenten Schale (Φ 10 cm) konnten für drei Elektroporationen verwendet werden. Die Zellen wurden gemäß Abschnitt 2.2.3 geerntet, 5 min bei 4 °C und 1.300 rpm abzentrifugiert (Heraus Multifuge 3SR+) und in 2,1 ml 4 °C kaltem Opti-MEM (Gibco Opti-MEM I, Invitrogen, Heidelberg) aufgenommen. 700 µl davon wurden dann in eine auf Eis vorgekühlte Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand 4 mm; Peqlab, Erlangen) überführt. Dazu wurden 20 µl BAC-DNA (aufgereinigt im großen Maßstab; Kapitel 2.3.6) gegeben, vorsichtig gemischt und die Zellen mit der BAC-DNA elektroporiert (250 V, 1500 µF). Anschließend wurden die Zellen in frisches vorgewärmtes Medium gegeben und in einer Zellkulturschale (Φ 10 cm) bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert, bis der Zellrasen zunächst Konfluenz und dann einen vollständigen CPE zeigte. Dann wurde der Überstand geerntet, bei -80 °C gelagert und zur Inokulation eines Virusstocks (siehe Kapitel 2.7.2) verwendet.

2.8 MODIFIZIERUNG VON BACs DURCH FLP-VERMITTELTE REKOMBINATION

Mit der Flp-vermittelten Rekombination ist es möglich, ein Plasmid, das eine FRT-Stelle besitzt, komplett in ein BAC zu integrieren, wenn dieses die gleiche FRT-Stelle besitzt. Zudem ist es möglich, einen von FRT-Stellen flankierten Bereich eines BACs (z. B. eine Kan^R-Expressionskassette) aus dem Genom zu entfernen; natürlich müssen auch hier beide FRT-Sequenzen identisch sein. In dieser Arbeit wurde zum Einen die Kan^R-Kassette aus dem Genom des MCMV-Δ6 entfernt (resultierend in MCMV-Δ6 ΔKan) und zum Anderen das Shuttle-Plasmid pORI6K (+ Transgen) in das MCMV-Δ6 ΔKan integriert. Beide Vorgänge wurden analog durchgeführt, wobei bei der Exzision der Kanamycin-Kassette kein Shuttle-Plasmid verwendet wurde. Der Ablauf der Flp-vermittelten Rekombination ist in Abbildung 2.3 dargestellt

Zunächst wurde in das Shuttle-Plasmid pORI6K das jeweilige Transgen inseriert und mittels Restriktionsanalyse und Sequenzierung der Erfolg der Klonierung überprüft. Die pORI6K-Shuttle-Plasmide wurden in *E. coli* PIR1-Bakterien propagiert, die durch die Expression des Bakteriophagen-Proteins λ pi die Replikation der pORI6K-Plasmide ermöglichen.

Im Anschluss daran wurden *E.coli*-Bakterien, welche das BAC MCMV-Δ6 ΔKan tragen, mit dem für die Flp-Rekombinase kodierenden Plasmid pST76A transformiert (Kapitel 2.3.2). Die Inkubation erfolgte hier bei 30 °C, da die Flp-Rekombinase temperaturabhängig bei 30 °C exprimiert wird. Die Selektion wird durch Ampicillin und Chloramphenicol im Kulturmedium vermittelt. Einzelklone dieser Bakterien wurden gepickt, kultiviert und elektrokompent gemacht (Abschnitt 2.3.1). Dann wurden diese Bakterien mit dem Plasmid pORI6K (+Transgen) elektroporiert (Kapitel 2.3.2) und danach bei 30 °C für 1 h bei 30 °C inkubiert. In diesem Schritt erfolgt die Expression der Rekombinase sowie die Integration des pORI6K-Plasmides. Anschließend wurden die Bakterien ausplattiert und bei 43 °C ü. N. inkubiert. Diese Temperatur sowie die Selektion auf Chloramphenicol und Kanamycin sorgen dabei für den Verlust des Plasmides pST76A. Nicht-integriertes Plasmid pORI6K (+Transgen) kann nur bei Anwesenheit des Proteins λ pi replizieren, somit können nur Bakterien wachsen, die pORI6K (+ Transgen) in das BAC integriert haben. Dann wurden verschiedene Klone gepickt, kultiviert und zur BAC-Präparation in kleinem Maßstab (Abschnitt 2.3.5) eingesetzt. Durch Restriktionsanalysen und Sequenzierung wurde sowohl die DNA-Sequenz des eingebrachten Transgens im BAC als auch der Ort der Integration überprüft. Bei korrekter Sequenz wurde aus dem BAC Virus rekonstituiert (Abschnitt 2.7.4)

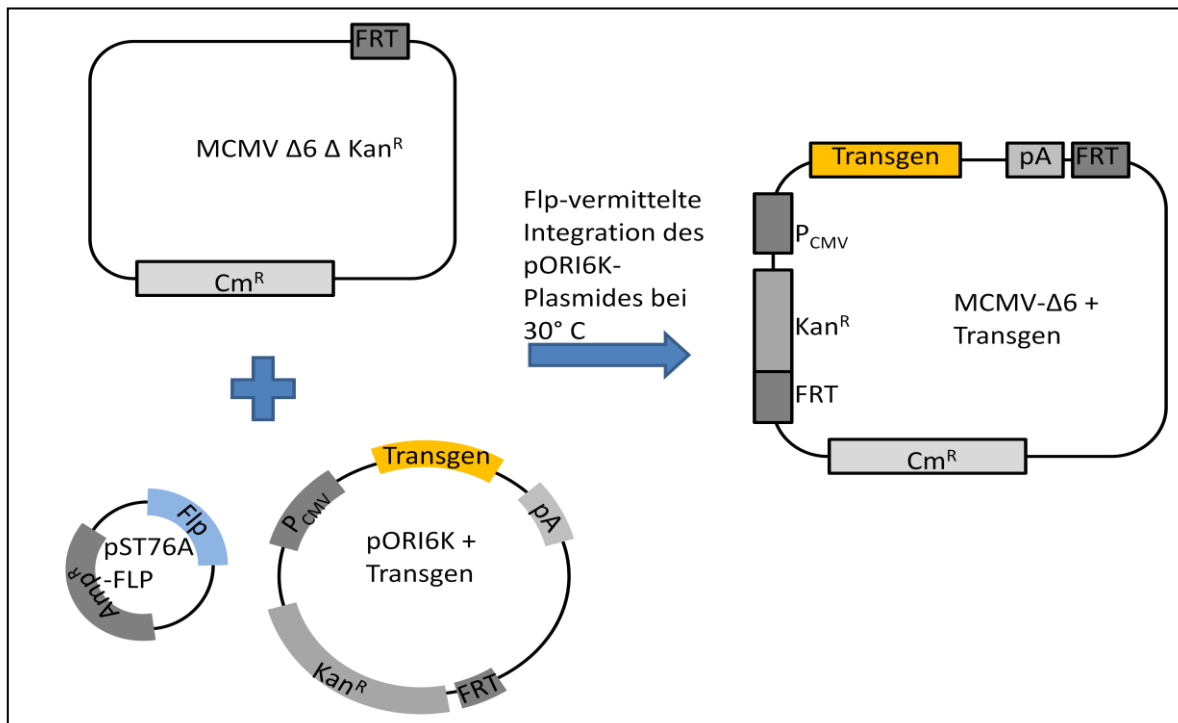


Abbildung 2.3 Überblick über den Ablauf der Flp-vermittelten Rekombination

Sowohl das *bacterial artificial chromosome* (in diesem Fall C3X Δ6ΔKan^R) als auch das einzubringende Plasmid (pORI6K + Transgen) tragen eine FRT-Stelle. Bei Anwesenheit des Plasmides pST76A-Flp, welches für die Flp-Rekombinase kodiert, kommt es bei 30 °C zur Integration von pORI6K in das BAC an der FRT-Stelle.

Tabelle 2.13 Im Rahmen dieser Arbeit modifizierte BACs

Ausgangs-BAC	Shuttle-Plasmid	modifiziertes BAC
MCMV Δ6	-	MCMV-Δ6 ΔKan
MCMV Δ6 ΔKan	pORI6K + modB7-2 FL	MCMV-Δ6 mod7-2 FL
MCMV Δ6 ΔKan	pORI6K + modB7-2 1.ATG	MCMV-Δ6 mod7-2 1.TAG
MCMV Δ6 ΔKan	pORI6K + modB7-2 3.ATG	MCMV-Δ6 mod7-2 FL 3.ATG
MCMV Δ6 ΔKan	pORI6K + modB7-2 FL no1Exon	MCMV-Δ6 mod7-2 no1Exon
MCMV Δ6 ΔKan	pORI6K + modB7-2 FL noAcidic	MCMV-Δ6 mod7-2ΔAC

2.9 HERSTELLUNG LENTIVIRALER EXPRESSIONSVEKTOREN

2.9.1 KLONIERUNG LENTIVIRALER VEKTOREN

Zur lentiviralen Transduktion dendritischer Zellen wurde der Vektor pRRL.PPT.SF.I2GFP verwendet. Dieser Vektor gehört zu den selbst-inaktivierenden Vektoren (SIN-Vektoren): Eine Deletion in der 3'-UTR des Vektors sorgt bei der *reversen Transkription* für die Übertragung dieser Deletion in die 5'-UTR, was zur Inaktivierung der Promotoraktivität in beiden UTRs sorgt. Ein in diesen Vektor eingeführtes Transgen steht unter der Kontrolle des SFFV (*spleen foamy forming virus*)-Promotors, zudem kann durch eine IRES-GFP-Kassette die Expression des Transgens über das GFP-Signal verfolgt werden. Der Vektor enthält zusätzlich weitere Bestandteile, die die Expression des Transgens stabilisieren (siehe Abbildung 2.4): Am RRE (*rev response element*) lagern sich Rev-Proteine an, welches zum bevorzugten Kernexport dieser mRNA in das Cytoplasma führt. PPT stellt den Polypurintrakt dar und ist wichtig für die Initiation der Synthese des DNA-Doppelstranges bei der reversen Transkription. PRE bezeichnet das *post-transcriptional regulatory element* und dient der Verstärkung der Expression des Transgens (Schambach et al., 2009; Modrow 2003; Hlavaty et al., 2005)

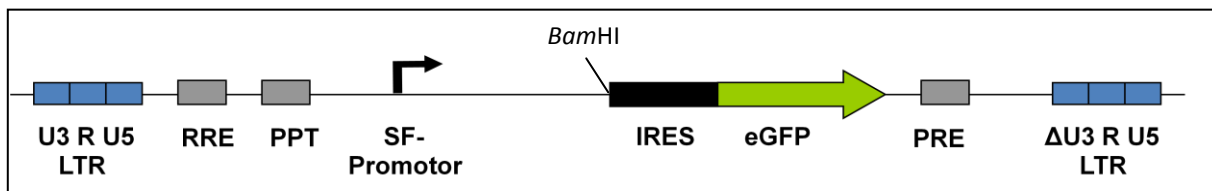


Abbildung 2.4 Schematischer Aufbau des Vektors pRRL.PPT.SF.I2GFP

Das Genom wird flankiert durch die jeweilige UTR bestehend aus U5, R und U5. Die 3'-UTR enthält eine Deletion, welche bei der *reversen Transkription* in die 5'-UTR übertragen wird. Das einzubringende Transgen steht unter der Kontrolle des *spleen foamy forming virus* (SF)-Promotors, seine Expression kann durch die GFP-Expression verfolgt werden. Das Transgen und GFP werden aufgrund der IRES (*internal ribosomal entry site*)-Sequenz auf einer mRNA kodiert, aber als zwei getrennte Proteine translatiert. PRE, PPT, RRE stellen weitere Elemente dar, die der Replikation und Integration sowie der Expressionsverstärkung dienen.

Für alle Transduktionen wurde das Plasmid pRRL.PPT.SF.I2GFP als Basis verwendet. Zur gerichteten Insertion der verschiedenen modB7-2-Varianten vor die IRES-Kassette wurde mittels Quick Mutagenese (siehe Kapitel 2.3.14) eine zusätzliche Restriktionsschnittstelle eingeführt (*AgeI*).

Tabelle 2.14 In dieser Arbeit verwendete lentivirale Vektoren

Lentivirus	Eigenschaft
empty	„leerer“ Vektor pRRL.PPT.SF.I2GFP, exprimiert GFP
modB7-2 FL	exprimiert den kompletten ORF von modB7-2
modB7-2 no1Exon	kodiert für den kompletten ORF von modB7-2 ab dem dritten ATG
modB7-2 KodOP	exprimiert die kodon-optimierte Variante von modB7-2

2.9.2 PRODUKTION VON LENTIVIREN

Die Produktion der Lentiviren erfolgte durch Transfektion von HEK 293T-Zellen mit Ca_2PO_4 (beschrieben in 2.3.16). Dazu wurden 2×10^6 -Zellen in einer Zellkulturschale (Φ 10 cm) ausplattiert und am Folgetag wie beschrieben mit vier Plasmiden transfiziert: Das Plasmid Gag/Pol kodiert für die lentiviralen gruppenspezifischen Antigene sowie für die eigene Polymerase. Des Weiteren wird ein Rev-kodierendes Plasmid cotransfiziert. Ein zusätzliches Plasmid dient der Pseudotypisierung der Lentiviren mit dem Hüll-Glykoprotein VSVg und das letzte Plasmid stellt den Vektor mit dem Transgen an sich dar.

Tabelle 2.15 Menge der eingesetzten Plasmide in der Lentivirusproduktion

Plamid	Menge
pGag/Pol	12 μg
pRev	5 μg
pVSVg	1,5 μg
pRRL.PPT.SF.I2GFP	5 μg

Nach der Transfektion wurde nach verschiedenen Zeitpunkten (36 h, 48 h, 56 h, 72 h) der Überstand geerntet und mit einem 0,22 μm Filter (Millipore SLGP033RB, Billerica, USA) filtriert und so von Zelltrümmern befreit. Die Überstände wurden dann sofort bei -80°C eingefroren und zur Titerbestimmung (Kapitel 2.9.4) bzw. zur weiteren Verwendung (Abschnitt 2.9.3) gelagert.

2.9.3 LENTIVIRALE TRANSDUKTION

Für die Transduktion von Zellen mit Lentiviren wurden zunächst 1×10^5 oder 1×10^6 -Zellen ausplattiert und nach 4-6 h transduziert. Dazu wurde das Medium von den Zellen abgenommen und durch frisches Zellkulturmedium inklusive 20 mM HEPES und 4 $\mu\text{g/ml}$ Protaminsulfat ersetzt, welches die Transduktionsrate durch Ausgleich positiver Ladungen der Zellmembran steigern sollte. Nach Zugabe der gewünschten Menge Virus wurden dann die Zellen 1 h bei 2.000 rpm und RT (Heraeus Multifuge 3SR+) und anschließend bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Am Folgetage wurde das Medium durch frisches Kulturmedium ersetzt.

2.9.4 BESTIMMUNG LENTIVIRALER TITER

Zur Bestimmung des lentiviralen Titers wurden 1×10^5 -Zellen ausplattiert und Transduktion am Folgetag – wie in 2.9.3 beschrieben – durchgeführt. Abweichend wurden hier von jedem der geernteten Überstände 50 μl , 100 μl und 200 μl in Dreifachansätzen in einem Endvolumen von 1 ml zur Transduktion eingesetzt. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium gewechselt und die Zellen weiter kultiviert. 72 h nach Transduktion wurden die Zellen geerntet und für die FACS-Messung vorbereitet (siehe 2.6.1). Da alle in dieser Arbeit verwendeten Lentiviren GFP exprimieren, konnte in der FACS-Analyse durch Messung des GFP-Signals der prozentuale Anteil der GFP-exprimierenden und damit transduzierten Zellen bestimmt werden. Unter Berücksichtigung der in der Messung eingesetzten Zellzahl, des verwendeten Volumens an Virusüberstand und der gemessenen Transduktionsrate konnte dann der Titer des jeweiligen Überstandes errechnet werden.

Kapitel 3 ERGEBNISSE

3.1 AKTIVITÄT VON MODB7-2 IN DER MURINEN MONOZYTEN-/MAKROPHAGEN ZELLINIE RAW264.7

In einem ersten Experiment wurden die Ergebnisse, die mit RAW264.7-Zellen gewonnen worden sind, reproduziert: RAW264.7-Makrophagen wurden für 9 h mit MCMV-WT oder mit der Deletionsmutante MCMV- Δ modB7-2 infiziert, als Kontrolle (mock) dienten nicht behandelte RAW264.7-Zellen (Abbildung 3.1). Alle diese Virusmutanten exprimieren GFP, so dass infizierte Zellen anhand ihres GFP-Signals im FACS identifiziert werden können. Dann wurden eine Oberflächenfärbung für CD86, eine Lebend-Tot-Färbung sowie eine Isotypkontrollfärbung durchgeführt und die Zellen im FACS analysiert. Dabei wurden ausschließlich lebende (7AAD-negative) und infizierte (GFP-positive) Zellen in die Auswertung mit eingeschlossen, im Falle der mock-Probe wurden nur lebende Zellen analysiert.

Es zeigte sich, dass 9 h p. i. die Zelloberflächenexpression von CD86 nach Infektion mit MCMV-WT von der Zelloberfläche verringert ist, wobei der Effekt noch nicht vollständig bzw. noch nicht in allen Zellen gleich stark zu beobachten ist. Bei Infektion mit der modB7-2-Deletionsmutante MCMV- Δ modB7-2, bei der der Leserahmen von modB7-2 durch vier Stop-Kodons unterbrochen wurde, konnte kein Verlust von CD86 von der Zelloberfläche festgestellt werden. Im Gegensatz dazu liegt die CD86-Menge sogar etwas über der von mock-infizierten RAW264.7-Zellen.

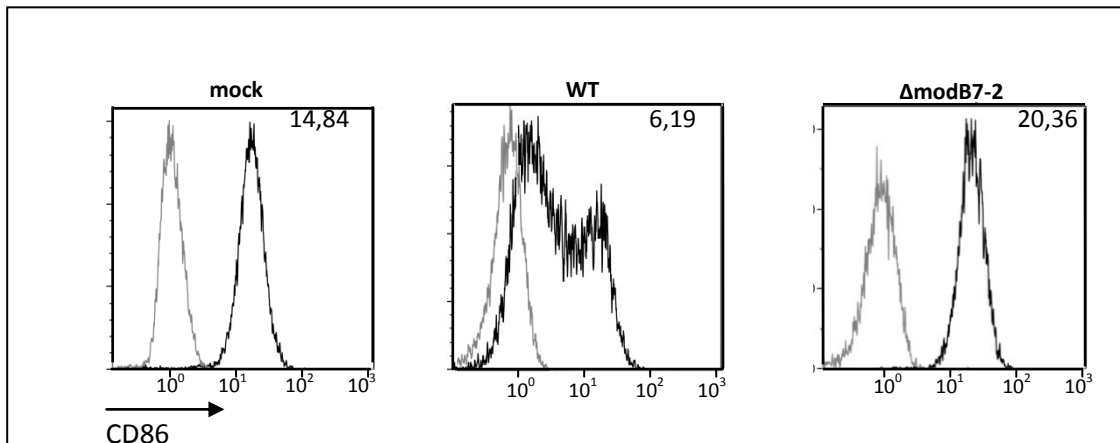


Abbildung 3.1 Verminderung der CD86-Oberflächenexpression 9 h nach Infektion in RAW264.7-Zellen.

RAW264.7-Zellen wurden mock, mit MCMV-WT oder MCMV- Δ modB7-2 mit MOI = 1 infiziert. 9 h nach der Infektion wurde die CD86-Oberflächen-Expression der Zellen im FACS analysiert. Für die Messung wurden in der mock-Probe nur lebende (7AAD-negative) Zellen, in allen infizierten Proben nur lebende (7AAD-negative) und infizierte (GFP-positive) Zellen verwendet. In grau ist jeweils die Färbung mit einer unspezifischen Isotypkontrolle dargestellt, während schwarze Histogramme die CD86-Oberflächenexpression zeigen. Die Zahlen geben die mittlere Fluoreszenzintensität der CD86-Messung an

Somit konnten die bisherigen Ergebnisse reproduziert werden: 9 h nach Infektion mit MCMV-WT ist schon eine deutliche Reduktion der CD86-Expression auf der Zelloberfläche von RAW264.7-Zellen zu erkennen, während bei Deletion von modB7-2 kein Effekt festzustellen ist (*loss-of-function*).

Da modB7-2 in RAW264.7-Zellen allein selektiv für die Verminderung der CD86-Oberflächenexpression verantwortlich ist, wurde zunächst der Frage nachgegangen, inwieweit modB7-2 auch in anderen Zelltypen als Antigen-präsentierenden Zellen aktiv ist, um so eventuell ein weiteres experimentelles Zellsystem etablieren zu können.

3.2 EFFEKT VON MODB7-2 AUF DIE CD86-OBERFLÄCHENEXPRESSION IN FIBROBLASTEN

Da MCMV sehr effizient dazu in der Lage ist, Fibroblasten zu infizieren, wurden zur Untersuchung der Frage nach der Aktivität von modB7-2 in nicht-hämatopoetischen Zellen zunächst Experimente mit Fibroblasten durchgeführt. Fibroblasten gelten außerdem als leicht zu manipulierendes Expressionssystem, so dass im Falle eines Effektes von modB7-2 auf die CD86-Oberflächenexpression in Fibroblasten diese als experimentelles Modell für die Untersuchung des zugrundeliegenden Mechanismus dienen könnten. Für die folgenden Experimente wurden Maus-Fibroblasten (WT3-Fibroblasten) verwendet, welche durch lentivirale Transduktion CD86 stabil exprimieren (Jabbour et al., 2009).

Um festzustellen, ob modB7-2 bei Infektion von WT3-Zellen mit MCMV exprimiert wird, wurden WT3-Fibroblasten mit MCMV-WT, MCMV- Δ modB7-2 oder der MCMV-Mutante MCMV- Δ 6 modB7-2 FL für 24 h mit einer MOI = 3 infiziert. Bei der Virusmutante MCMV- Δ 6 modB7-2 FL handelt sich um eine Mutante, bei der die cDNA von modB7-2 in das Virusgenom rückintegriert wurde, der zuvor die Leserahmen m144-m157 und damit auch der ORF von modB7-2 entfernt worden waren. Nach Ablauf der 24 h wurden die Zellen lysiert und die Lysate wurde im Western Blot auf die modB7-2-Expression hin analysiert.

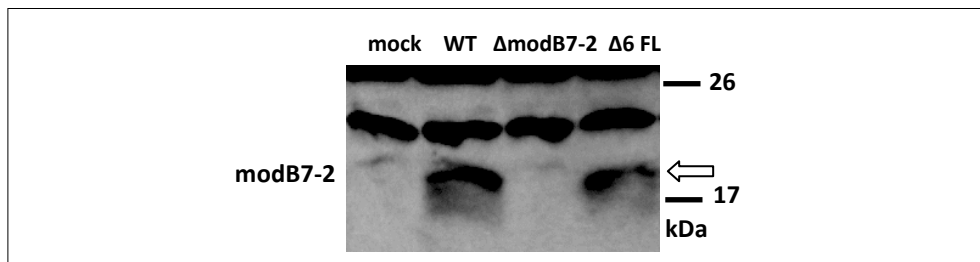


Abbildung 3.2 Expression von modB7-2 in MCMV-infizierten, CD86-exprimierenden WT3-Fibroblasten

Stabil CD86 exprimierende WT3-Fibroblasten wurden mock oder mit MCMV-WT, MCMV- Δ modB7-2 oder MCMV- Δ 6 modB7-2 FL infiziert (MOI = 3). 24 h p. i. wurden die Zellen geerntet und die Expression von modB7-2 wurde mit einem α -modB7-2 spezifischen Serum durch Immunoblotting detektiert. Der Pfeil deutet auf die modB7-2-spezifische Proteinbande.

Wie in Abbildung 3.2 zu erkennen, konnte 24 h p. i. eine deutliche modB7-2-Expression in WT3-Fibroblasten festgestellt werden. Somit konnte nun weiter untersucht werden, ob modB7-2 auch in Fibroblasten aktiv ist und die Expression von CD86 auf der Zelloberfläche verringern kann. Dazu wurden WT3-Fibroblasten mock-infiziert oder mit den zuvor verwendeten MCMV-Mutanten -WT, - Δ modB7-2 oder - Δ 6 modB7-2 FL infiziert (MOI =5). 24 h nach Infektion wurden die Zellen geerntet und die CD86-Oberflächenexpression untersucht (Abbildung 3.3). Da alle Virusmutanten GFP-exprimieren, wurde in der Durchflusszytometrie durch Analyse GFP-exprimierende Zellen die CD86-Zelloberflächenexpression in infizierten Zellen untersucht.

Zunächst ließ sich feststellen, dass die Infektion der WT3-Fibroblasten deutlich schlechter abläuft als in anderen Fibroblasten, wie z. B. der Zelllinie NIH 3T3 oder primärer muriner embryonaler Fibroblasten (MEF). Dies wird deutlich, wenn man mit einbezieht, dass für die Titration der Virusüberstände MEFs verwendet wurden, und selbst bei einer Infektion der WT3 -Fibroblasten mit einer MOI = 5 nur ein Bruchteil der Zellen infiziert werden konnte.

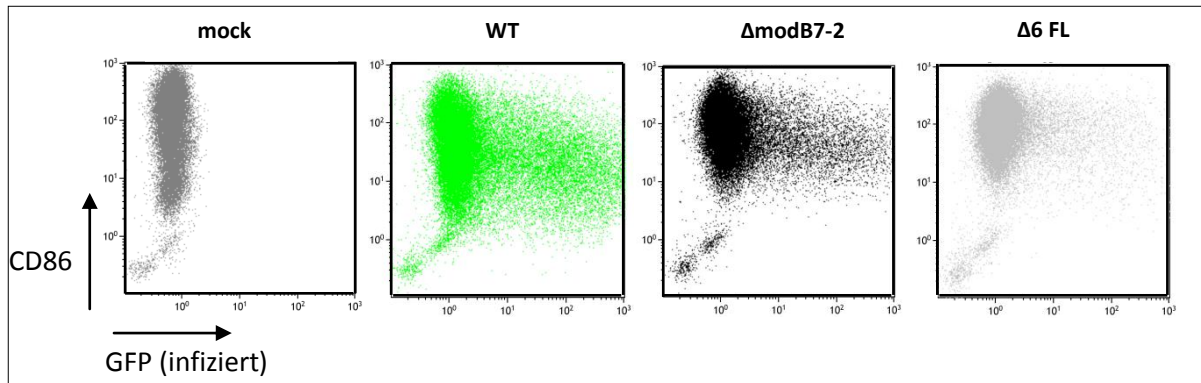


Abbildung 3.3 CD86-Oberflächenexpression in CD86 stabil transduzierten Fibroblasten (WT3-Fibroblasten)

WT3-Fibroblasten wurden mock infiziert oder mit GFP-exprimierenden Virusmutanten MCMV-WT, MCMV- Δ modB7-2, MCMV- Δ 6 modB7-2 FL mit einer MOI = 5 infiziert. 24 h p. i. wurden die GFP-Expression und die CD86-Oberflächenexpression analysiert.

Des Weiteren ließ sich beobachten, dass bei Infektion mit MCMV-WT die CD86-Menge auf der Zelloberfläche abnimmt. Zwar war nicht nur in mock infizierten sondern auch in GFP-negativen Zellen der MCMV-WT infizierten WT3 -Fibroblasten eine breite Spanne von hoher bis niedriger CD86-Oberflächenexpression zu beobachten, allerdings war deutlich zu erkennen, dass bei stärkerem GFP-Signal auch die CD86-Expression auf der Zelloberfläche stärker vermindert wurde. Dies spricht dafür, dass eine Infektion mit MCMV auch in diesen Zellen einen Effekt auf die CD86-Oberflächenexpression hat. Bei Infektion mit den Mutanten Δ modB7-2 bzw. Δ 6 modB7-2 FL war keine Reduktion der CD86-Oberflächenexpression feststellbar; auch die Wirkung der beiden Mutanten unterschied sich kaum. Aufgrund der variablen CD86-Expression in nicht-infizierten Zellen ist auch in Zellen mit starkem GFP-Signal keine Verminderung der CD86-Expression zu beobachten.

Um eine quantitative Aussage der Auswirkung von modB7-2 auf die CD86-Oberflächenexpression zu erhalten, wurde das Experiment dreimal wiederholt. Es wurden die Mittelwerte der mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) verglichen, die aus der CD86-Oberflächenexpression der Fibroblasten, welche mit den verschiedenen Virus-Mutanten infiziert wurden, resultieren (Abbildung 3.4).

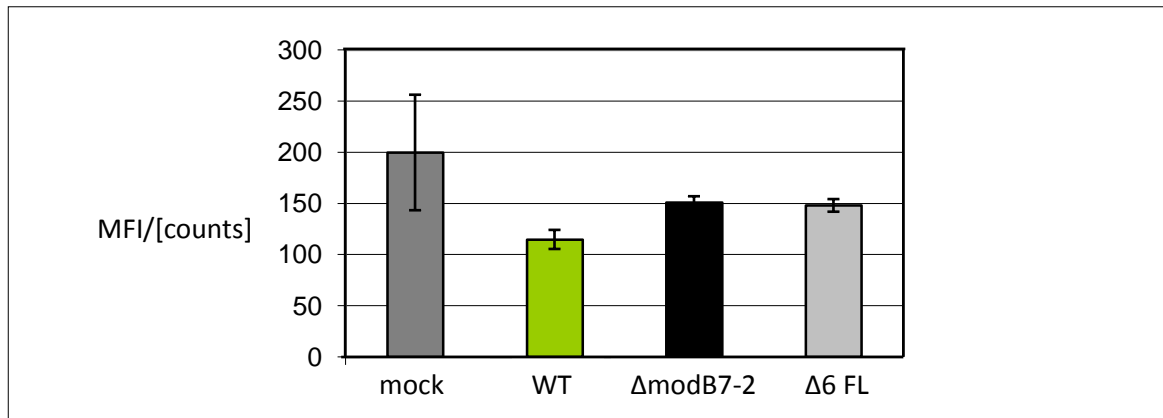


Abbildung 3.4 Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der CD86-Oberflächenexpression auf WT3-Fibroblasten

WT3-Fibroblasten wurden in Triplikaten mock infiziert oder mit MCMV-WT, MCMV-ΔmodB7-2 oder MCMV-Δ6modB7-2 FL infiziert (MOI = 5). 24 h p. i. wurden die MFI (+/- SD) der CD86-Oberflächenexpression gemessen.

Die Ergebnisse aus Abbildung 3.3 spiegeln sich in dieser Quantifizierung wider: Eine Infektion mit MCMV-WT führte zu einem Verlust von CD86 Molekülen von der Zelloberfläche von WT3 - Fibroblasten. Die Infektion mit MCMV-ΔmodB7-2 hatte im Gegensatz zu den in RAW264.7-Zellen gewonnenen Ergebnissen einen Effekt auf die CD86-Oberflächenexpression, der jedoch geringer war als bei der Infektion mit dem Wildtyp-Virus. Die Infektion mit MCMV-Δ6 FL zeigte keinen Unterschied zur MCMV-ΔmodB7-2-Infektion.

Hieraus ließ sich schlussfolgern, dass die Infektion mit MCMV-WT einen negativen Effekt auf die CD86-Oberflächenexpression von Fibroblasten hatte, allerdings war dieser Effekt nicht ausschließlich auf modB7-2 zurückzuführen, da bei Infektion mit MCMV-ΔmodB7-2 und MCMV-Δ6 kein Unterschied in der CD86-Oberflächenexpression festzustellen war. Somit unterscheidet sich die Aktivität von modB7-2 in WT3-Fibroblasten von der modB7-2-Aktivität in RAW264.7-Zellen, was auf einen anderen Wirkmechanismus von modB7-2 in nicht-hämatopoetischen Zellen hindeutet. Damit schieden WT3-Fibroblasten auch als Modell zur Untersuchung der Funktion und Wirkungsweise von modB7-2 aus.

3.3 VERMINDERUNG DER CD86-OBERFLÄCHENEXPRESSION IN DER DENDRITISCHEN ZELLINIE DC2.4

Um die Funktionsweise von modB7-2 noch in einem weiteren Zelltyp außer den Zellen der Monozyten-/Makrophagen-Zelllinie RAW264.7 untersuchen zu können, wurde als nächstes Versuchssystem die Mauszelllinie DC2.4 gewählt. Dabei handelt es sich um dendritische Zellen, die

zur Gruppe von Antigen-präsentierenden Zellen gehören und CD86 auf ihrer Zelloberfläche exprimieren.

Zunächst erfolgte eine Untersuchung des Einflusses der verschiedenen MCMV-Mutanten auf die CD86-Oberflächenexpression der dendritischen Zellen mit der Durchflusszytometrie (Abbildung 3.5 A) DC2.4-Zellen wurden mit den Virusmutanten MCMV-WT, MCMV- Δ modB7-2 und MCMV- Δ 6 modB7-2 FL infiziert. Als zusätzlich Kontrolle diente die Infektion mit MCMV- Δ 6, in der die ORFs m144-m157 deletiert worden waren.

Bei Infektion mit MCMV-WT sank die CD86-Menge fast bis auf das Niveau der Isotypkontrolle ab. Die Infektion von DC2.4-Zellen mit MCMV- Δ 6 resultierte in einem geringen Anstieg von CD86-Molekülen auf der Zelloberfläche. Die Virusmutante MCMV- Δ modB7-2 führte ebenfalls zu einer Reduktion von CD86 auf der Zelloberfläche infizierter Zellen, die allerdings schwächer war als bei der MCMV-WT-Infektion. Dies unterschied sich von den Ergebnissen nach Infektion von RAW264.7-Zellen (siehe Kapitel 3.1 und Loewendorf et al., 2004). Die Infektion der dendritischen Zellen mit MCMV- Δ 6 modB7-2 FL dagegen führte zu einer Verringerung der CD86-Oberflächenexpression, die stärker war als die der MCMV- Δ modB7-2-Mutante, aber schwächer als in der MCMV-WT-Infektion. Dies war wiederum konsistent mit den Ergebnissen nach Infektion von RAW264.7-Zellen.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Ergebnissen der Untersuchung der CD86-Expression im Western Blot (Abbildung 3.5 B): DC2.4-Zellen, die mit dem MCMV-WT-Virus infiziert wurden, wiesen ein schwächeres CD86-Signal auf, während MCMV- Δ 6 infizierte Zellen eine stärkere CD86-Expression als mock infizierte Zellen zeigten. Die Infektion mit MCMV- Δ 6 modB7-2 FL resultierte in gleich starker bis leicht verringerter CD86-Expression verglichen mit der Expression von CD86 in nicht-infizierten Zellen.

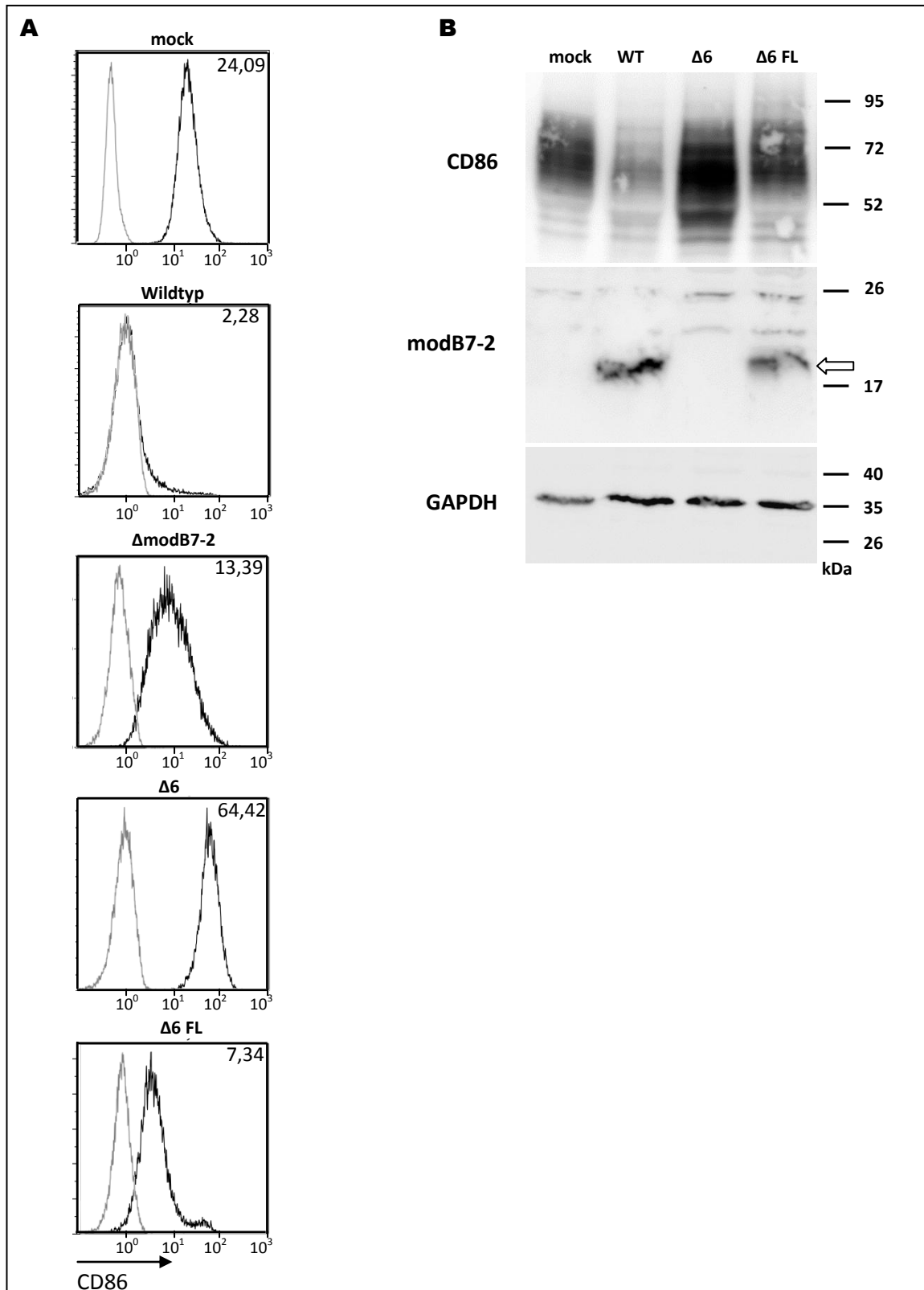


Abbildung 3.5 CD86-Oberflächenexpression (A) und CD86-Gesamt-Expression (B) in DC2.4 24 h nach Infektion mit verschiedenen MCMV-Mutanten

DC2.4-Zellen wurden mock infiziert oder mit den angegebenen Virusmutanten infiziert, 24 h p. i. wurden die Zellen geerntet und die CD86-Menge in der FACS-Messung (A) oder in der Western Blot-Analyse (B) bestimmt. In den Histogrammen ist in grau jeweils die Färbung mit einer unspezifischen Isotypkontrolle dargestellt, während schwarze Histogramme die CD86-Oberflächenexpression zeigen. Die Zahlen geben die mittlere Fluoreszenzintensität der CD86-Messung an (A). In der Western Blot-Analyse diente die Färbung mit modB7-2- und GAPDH-Antikörpern als Kontrolle für die modB7-2-Expression bzw. als Ladekontrolle. Der Pfeil deutet auf die modB7-2-spezifische Proteinbande hin (B).

Insgesamt ließ sich in DC2.4-Zellen ein deutlicher Unterschied zu den in RAW264.7-Zellen gewonnenen Ergebnissen feststellen: In DC2.4-Zellen wurde die CD86-Expression bei MCMV-Infektion auf der Zelloberfläche reduziert; dieser Effekt war spezifisch für modB7-2, da die in der MCMV-Δ6-Mutante verlorengewonnene Fähigkeit, die CD86-Expression zu verringern, durch Integration der modB7-2-cDNA (MCMV-Δ6 modB7-2 FL) wieder hergestellt wurde – wenn auch etwas schwächer als nach Infektion mit MCMV-WT. Da allerdings auch bei der Infektion von DC2.4-Zellen mit MCMV-ΔmodB7-2 ein Verlust von CD86-Molekülen auf der Zelloberfläche zu beobachten war (der jedoch schwächer war bei Infektion mit MCMV-Δ6 modB7-2 FL), kann vermutet werden, dass bei Infektion von DC2.4-Zellen modB7-2 ein weiteres virales Protein, welches in der Region zwischen m144 bis m157 kodiert wird, zur Verminderung der CD86-Zelloberflächenexpression benötigt wird. DC2.4-Zellen eignen sich insofern als Untersuchungssystem für die Funktion von modB7-2; Voraussetzung hierfür ist, dass statt MCMV-ΔmodB7-2 die Mutante MCMV-Δ6 verwendet wird, da nur hier die Verminderung der CD86-Expression auf der Zelloberfläche vollständig aufgehoben war.

3.4 UNTERSUCHUNGEN ZUR VERWENDUNG VERSCHIEDENER STARTKODONS FÜR DIE SYNTHESE DES MODB7-2-PROTEINS

Vor der Verwendung des DC2.4-Zellsystems zur Untersuchung der Funktion von modB7-2 wurde zunächst das Gen bzw. seine Translation näher betrachtet. Aus den Versuchen in RAW264.7-Zellen war bekannt, dass das modB7-2-Gen aus zwei Exons besteht, deren Lage im MCMV-Genom ermittelt worden war (Abbildung 3.6 A). Außerdem war der Transkriptionsstartpunkt für die Synthese der mRNA mittels RACE-Experimenten definiert worden (Loewendorf et al., 2004).

Bei Betrachtung der cDNA (Abbildung 3.6 B, „FL“) fiel auf, dass sich in der cDNA drei potentielle Start-Kodons (ATG) *in frame* befinden, wobei sich zwei der ATGs im ersten Exon befinden. Es ließ sich deshalb nicht ausschließen, dass nicht das erste ATG zum Start der Translation genutzt wird, sondern ein sich weiter in 3'-Richtung befindliches ATG. Es war sogar denkbar, dass alle drei Start-Kodons in unterschiedlichem Ausmaß zur Initiation der Translation verwendet werden. In der Tat ist dies u.a. von einem weiteren MCMV-Gen bekannt: Das M25-Gen, welches nach Infektion zur Veränderungen der Zellmorphologie (Zellabrundung) führt, besitzt in der DNA-Sequenz mindestens 10 potentielle Start-Kodons *in frame*, wobei hauptsächlich das zweite und das sechste ATG zur Translation genutzt werden; in geringem Maße beginnt die Translation möglicherweise auch an anderen ATGs wie dem 7., 9. und 10. ATG (Dallas et al., 2000; Sengstake 2009; Benkartek 2004).

Bevor modB7-2 und seine Funktion außerhalb des Viruskontextes untersucht werden konnten (siehe Kapitel 3.6), war deshalb zu klären, an welchem ATG die Translation von modB7-2 startet, um potentiell Fehler bei der Expression durch Expressionsvektoren und somit eventuelle Falschaussagen über die Funktion zu vermeiden.

Dazu wurde die cDNA für modB7-2 und am 3`-Ende eine Sequenz für ein HA-Epitoptag in den Expressionsvektor pcDNA3.1 kloniert. Das von diesem Vektor kodierte „full length“ modB7-2 FL besitzt eine theoretische Molekülmasse von 17,75 kDa. Weiterhin wurden modB7-2-Varianten mit unterschiedlichen Translationsstartpunkten hergestellt. Mittels Quick Mutagenese wurde in der modB7-2-Sequenz nur immer ein ATG beibehalten, während die anderen ATG-Kodons in CTA-Kodons mutiert wurden, was in einem Met→Leu-Austausch resultierte. Leucin wurde deshalb gewählt, weil diese Aminosäure in ihren biochemischen Eigenschaften Methionin am nächsten kommt, um so nur Auswirkungen auf den Translationsstart nicht aber auf die Funktion des modB7-2-Proteins zu haben. Die resultierenden modB7-2 Varianten modB7-2 1.ATG (17,71 kDa), modB7-2 2.ATG (16,58 kDa) und modB7-2 3.ATG (15,71 kDa) unterscheiden sich ausreichend in ihrer theoretisch zu erwartenden Molekülmasse, so dass bei Vergleich der Proteine im Western Blot auf den Translationsstart geschlossen werden konnte (Abbildung 3.6 B). Als Kontrolle diente eine modB7-2-Variante, die kein Start-Kodon *in frame* besitzt (modB7-2 noATG). Hier sollte die modB7-2-mRNA nicht translatiert werden (Abbildung 3.6 B).

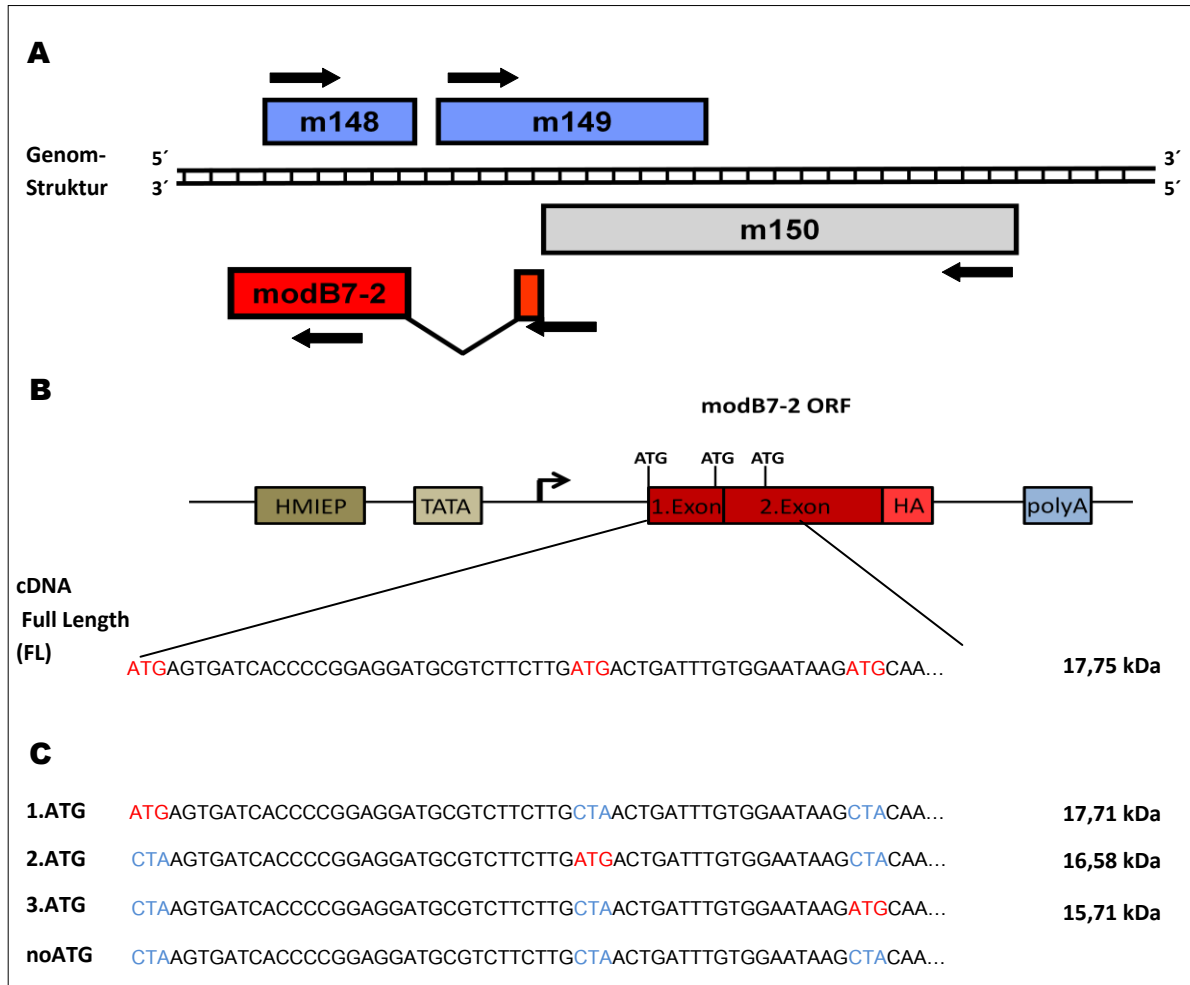


Abbildung 3.6 Schematische Darstellung der Genomstruktur (A) und DNA-Sequenz von modB7-2 FL und der Mutanten mit unterschiedlichen Start-Kodons in Vektor pcDNA3 (B)

Im Teil (A) der Abbildung ist schematisch ein Ausschnitt der Genomstruktur von MCMV zu sehen. Er zeigt modB7-2 als gespleißtes Gen im gegenüberliegenden Strang der ORFs m148 und m149. Die Pfeile markieren die Transkriptionsrichtung. In (B) ist schematisch ein Ausschnitt der Struktur der modB7-2 FL-DNA im Vektor pcDNA3 skizziert. Zudem ist der Anfang der kodierenden Sequenz der cDNA von modB7-2 FL (*Full length*) dargestellt. Der gewinkelte Pfeil gibt den putativen Transkriptionsstart auf der jeweiligen nach Transkription resultierenden mRNA an. (C) Die Sequenzen von 1.ATG, 2.ATG, 3.ATG und noATG bezeichnen den Anfang der kodierenden Sequenz der modB7-2-Varianten, bei denen nur ein oder kein ATG als Translationsstartpunkt zur Verfügung steht. Bei diesen Mutanten wurden ATG-Kodons, welche nicht als Translationsstartpunkte genutzt werden sollten, in CTA mutiert, was in der Aminosäuresequenz in einem Met→Leu-Austausch resultiert. Rechts in der Abbildung ist zu jeder modB7-2-Variante die jeweilige theoretisch zu erwartende Proteinmasse dargestellt.

HEK 293T-Zellen wurden mit Vektoren kodierend für die modB7-2-Varianten, welche sich im Start-Kodon unterscheiden, transfiziert. Mit jedem Vektor wurde zudem ein Plasmid kotransfiziert, welche für eine sekretierte Form der Luciferase („*Gaussia Luciferase*“) kodiert. 72 h nach der Transfektion wurde die Menge an sekretierter Luciferase gemessen. Die eingesetzten Lysatmengen für den Western Blot wurden anhand des Luciferase-Signals normalisiert, um eine eventuell unterschiedliche Transfektionseffizienz zu berücksichtigen (siehe Abschnitt 2.4.2). Die Ergebnisse des Western Blots sind in Abbildung 3.7 dargestellt.

Nur bei den modB7-2-Varianten modB7-2 FL und modB7-2 3.ATG ließ sich eine Expression detektieren. Bei beiden Proben waren zwei Banden auf gleicher Höhe erkennbar, wobei die obere Bande der Größe von modB7-2 in infizierten Zellen entsprach (vgl. Abbildung 3.7, „Positivkontrolle“). Dieses Ergebnis legt nahe, dass modB7-2 nach Transfektion von HEK 293T-Zellen ausschließlich vom dritten Start-Kodon aus translatiert wird.

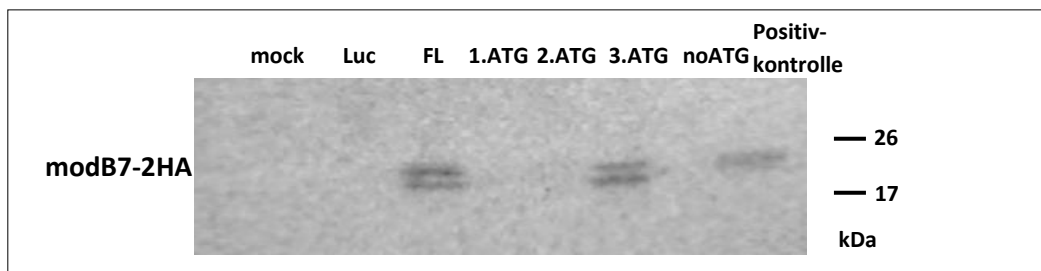


Abbildung 3.7 Expression von modB7-2 nach Transfektion von HEK 293T-Zellen mit den verschiedenen Expressionsplasmiden

HEK 293T-Zellen wurden entweder mock transfiziert, mit pCMV-Gluc allein oder mit pCMV-Gluc zusammen mit den pcDNA3.1 Vektoren, welche für modB7-2-Varianten kodieren, die verschiedene Translationsstartpunkte aufweisen (FL, 1.ATG, 2.ATG, 3.ATG und noATG). Die modB7-2HA-Expression wurde mit α -HA-Antikörpern detektiert. Bei der Positivkontrolle handelt es sich um Lysate von MCMV-modB7-2HA-infizierten RAW264.7-Zellen.

Dies wurde dann auch im Viruskontext überprüft. Dazu wurden die kodierenden Sequenzen für die modB7-2-Varianten modB7-1 1.ATG und modB7-2 3.ATG durch Flp-Rekombinase-vermittelte Rekombination, wie in Kapitel 2 Material und Methoden beschrieben (Abschnitt 2.8), in die Deletionsmutante MCMV- Δ 6 integriert.

Um die Expression und Funktion der modB7-Varianten im Viruskontext zu untersuchen, wurden DC2.4-Zellen mit den Virusmutanten MCMV- Δ 6 modB7-2 1.ATG und MCMV- Δ 6 modB7-2 3.ATG infiziert (MOI = 1) und 24 h p. i. sowohl die CD86-Oberflächenexpression im FACS (Abbildung 3.8 A) als auch die modB7-2-Expression im Western Blot (Abbildung 3.8 B) untersucht. Als Kontrolle dienten MCMV-WT, MCMV- Δ 6 und MCMV- Δ 6 modB7-2 FL infizierte Zellen.

Wie schon zuvor gezeigt, stellte man verglichen mit mock infizierten DC2.4-Zellen bei Infektion mit MCMV- Δ 6 eine leichte Erhöhung der CD86-Menge auf der Zelloberfläche fest; die Verminderung der CD86-Expression auf der Zelloberfläche fiel bei Infektion mit der MCMV- Δ 6 modB7-2 FL-Mutante dagegen leicht verringert aus als bei Infektion mit MCMV-WT (siehe auch Abbildung 3.5).

Verglich man die CD86-Oberflächenexpression nach MCMV- Δ 6 modB7-2 FL-Infektion mit MCMV- Δ 6 modB7-2 3.ATG infizierten DC2.4-Zellen, war festzustellen, dass die jeweiligen Histogramme in der FACS-Analyse nahezu identisch waren (Abbildung 3.8 A). Bei Infektion mit MCMV- Δ 6 modB7-2 1.ATG stellte man dagegen nur eine leichte Reduktion der CD86-Expression auf der Zelloberfläche fest.

Abbildung 3.8 B zeigt die Expression der jeweiligen modB7-2-Varianten nach Infektion von DC2.4-Zellen mit den verschiedenen Mutanten: modB7-2 1.ATG wies nur eine sehr schwache Expression auf, wobei anzumerken ist, dass diese Bande im Proteingel erwartungsgemäß leicht über der Bande der modB7-2 3.ATG-Variante lag. Die Infektion von DC2.4-Zellen mit MCMV-modB7-2 3.ATG zeigte eine starke modB7-2-Expression; die Bande lief auf gleicher Höhe wie das modB7-2-Protein, das bei Infektion mit MCMV-WT exprimiert wird. Die Infektion mit der Mutante MCMV- Δ 6 modB7-2 FL resultierte ebenfalls in der Expression eines modB7-2-Proteins, welches in SDS-Gel mit der gleichen Geschwindigkeit wanderte wie die modB7-2-Proteine, die bei Infektion mit MCMV-modB7-2 3.ATG sowie MCMV-WT exprimiert wurden. Allerdings konnte hier eine zweite schwache Bande gefunden werden, die auf gleicher Höhe lief wie das modB7-2-Protein, welches bei der Infektion von DC2.4-Zellen mit MCMV-modB7-2 1.ATG exprimiert wurde.

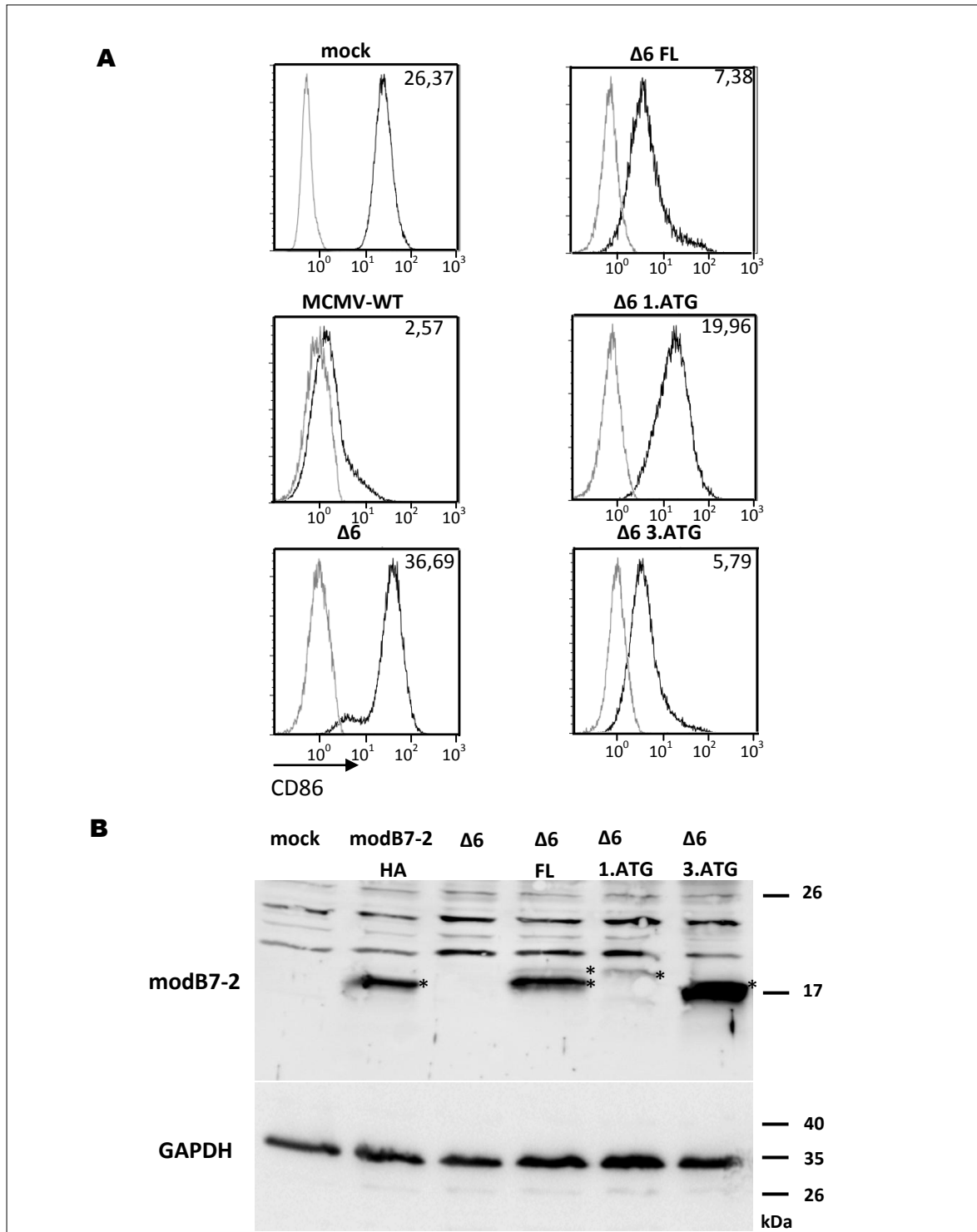


Abbildung 3.8 Verringerung der CD86-Oberflächenexpression von DC2.4-Zellen, die modB7-2-Varianten mit unterschiedlichen Startkodons exprimieren

DC2.4-Zellen wurden mock infiziert oder mit den angegebenen MCMV-Mutanten, welche ModB7-2HA komplett (modB7-2HA, Δ6 FL) oder mit unterschiedlichen Startkodons (Δ6 1.ATG, Δ6 3.ATG) exprimieren. Als Kontrolle dienen mock infizierte und MCMV-Δ6 infizierte Zellen, welche kein modB7-2-Protein exprimieren. 24 h p. i. wurden die Zellen geerntet und für die FACS- (A) oder Western Blot-Analyse (B) eingesetzt. (A) In grau ist jeweils die Färbung mit einer unspezifischen Isotypkontrolle dargestellt, während schwarze Histogramme die CD86-Oberflächenexpression zeigten. Die Zahlen geben die mittlere Fluoreszenzintensität der CD86-Messung an. (B) GAPDH stellt die Ladekontrolle dar, Sternchen deuten auf die modB7-2-spezifischen Proteinbanden hin.

Anhand dieser Ergebnisse ließ sich feststellen, dass beim „Erzwingen“ des Translationsstartes am 3. ATG das daraus resultierende Protein modB7-2 hinsichtlich der Reduktion der CD86-Oberflächenexpression gleich funktionell war wie das Protein modB7-2 FL, das alle drei potentiellen Start-Kodons kodiert. Die insgesamt etwas schwächere Verringerung der CD86-Expression auf der Zelloberfläche verglichen mit dem Wildtyp-Virus scheint auf das Fehlen der ORFs m144-m157 im MCMV- Δ 6-Genom zurückzuführen zu sein. Die Expression von modB7-2 1.ATG war stark verringert; dies legt den Schluss nahe, dass dieses Protein möglicherweise instabil ist, die richtige Faltung gestört ist und/oder schnell abgebaut wird. Aufgrund der sehr schwachen Expression von modB7-2 1.ATG und da die CD86-Oberflächenexpression hier nur schwach verringert war, spielt das 1. ATG als Translationsstartpunkt wohl eine eher untergeordnete Rolle.

Zusammen mit den Ergebnissen aus Abbildung 3.7 kann somit das 3. ATG von modB7-2 vorrangig als Startpunkt der Translation angenommen werden.

3.5 MÖGLICHE FUNKTION DES ERSTEN EXONS FÜR DIE EXPRESSION DES MODB7-2-GENS

Da das 1. ATG des modB7-2-Gens kaum als Start-Kodon benutzt wird und da das modB7-2-Protein bei ausschließlicher Verwendung des 3. ATG als Start-Kodon voll funktionsfähig war, stellte sich die Frage, warum das modB7-2-Gen überhaupt das erste Exon und das Intron benötigt, wenn das erste und zweite Start-Kodon nicht genutzt werden. Tatsächlich befinden sich sowohl das erste als auch das zweite Startkodon innerhalb des ersten Exons (Abbildung 3.9).

Um die Frage nach der Funktion des ersten Exons beantworten zu können, wurde eine weitere Virus-Mutante MCMV- Δ 6 no1Exon hergestellt, welche die für das modB7-2-Protein kodierenden Sequenzen enthielt, nicht jedoch die Sequenzen des ersten Exons vor dem 3. ATG.

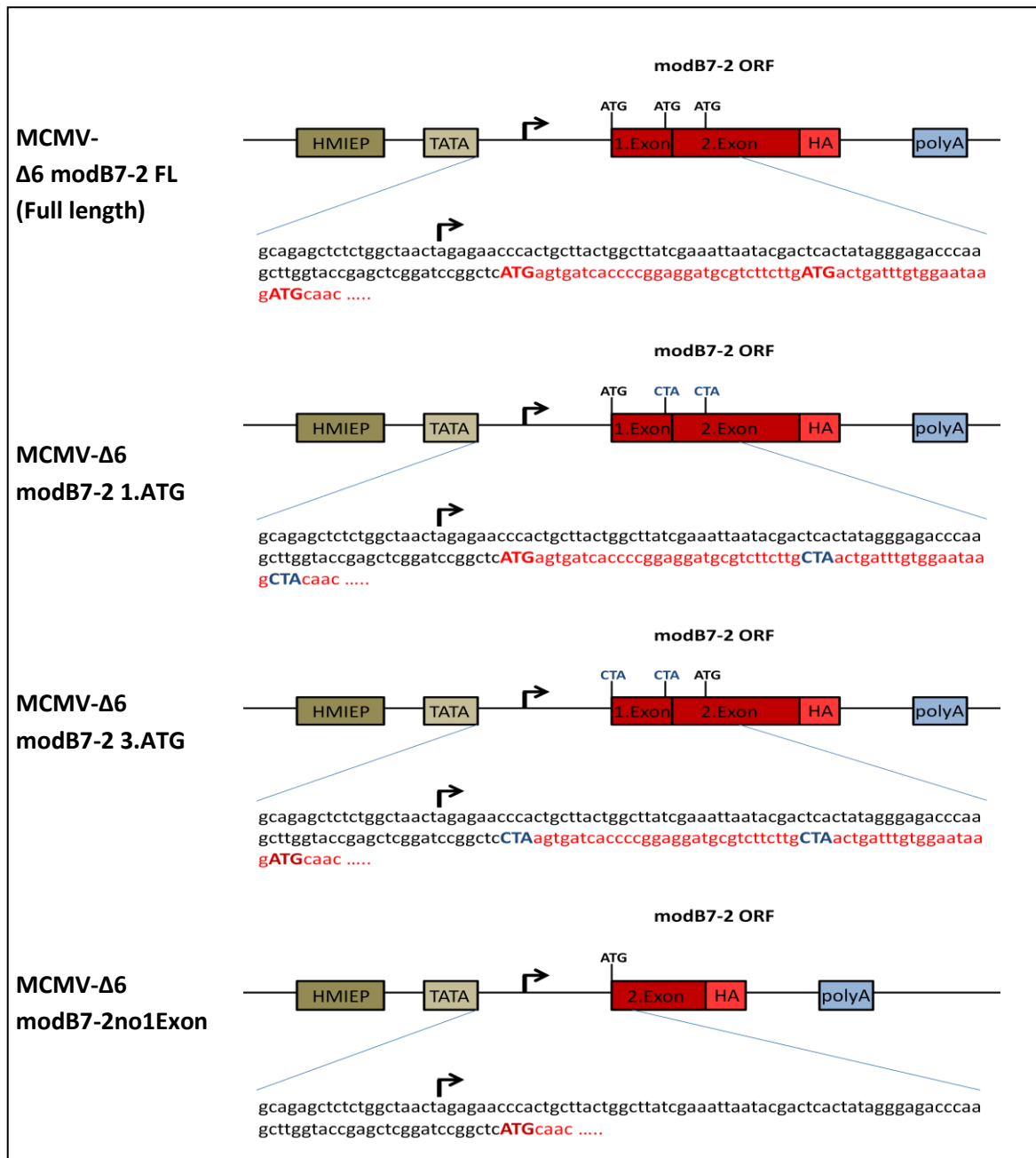


Abbildung 3.9 Ausschnitt aus dem Genom der Mutanten MCMV-Δ6 modB7-2 1.ATG, MCMV-Δ6 modB7-2 3.ATG und MCMV-Δ6 modB7-2no1Exon

Die Abbildung stellt schematisch einen Ausschnitt der Genomstruktur sowie einen Ausschnitt aus der DNA-Sequenz der Mutanten MCMV-Δ6 modB7-2 1.ATG, MCMV-Δ6 modB7-2 3.ATG und MCMV-Δ6 modB7-2no1Exon dar. In der Sequenz sind potentielle Startkodons ATG fett dargestellt; ATG-Kodons, die in CTA-mutiert wurden sind blau markiert. Der Beginn der für die einzelnen modB7-2-Varianten kodierende Bereiche des modB7-2-ORFs ist rot markiert; in schwarz ist der nicht-translatierte Bereich des modB7-2-Gens zwischen der TATA-Box und dem modB7-2-ORF dargestellt. Pfeile symbolisieren den putativen Transkriptionsstart.

Wie bei dem Experiment zuvor (Abbildung 3.8) wurden nun DC2.4-Zellen mit den Mutanten MCMV-Δ6 modB7-2 FL und MCMV-Δ6 modB7-2no1Exon infiziert und 24 h später wurde die modB7-2-Expression und die CD86-Oberflächenexpression untersucht (Abbildung 3.10)

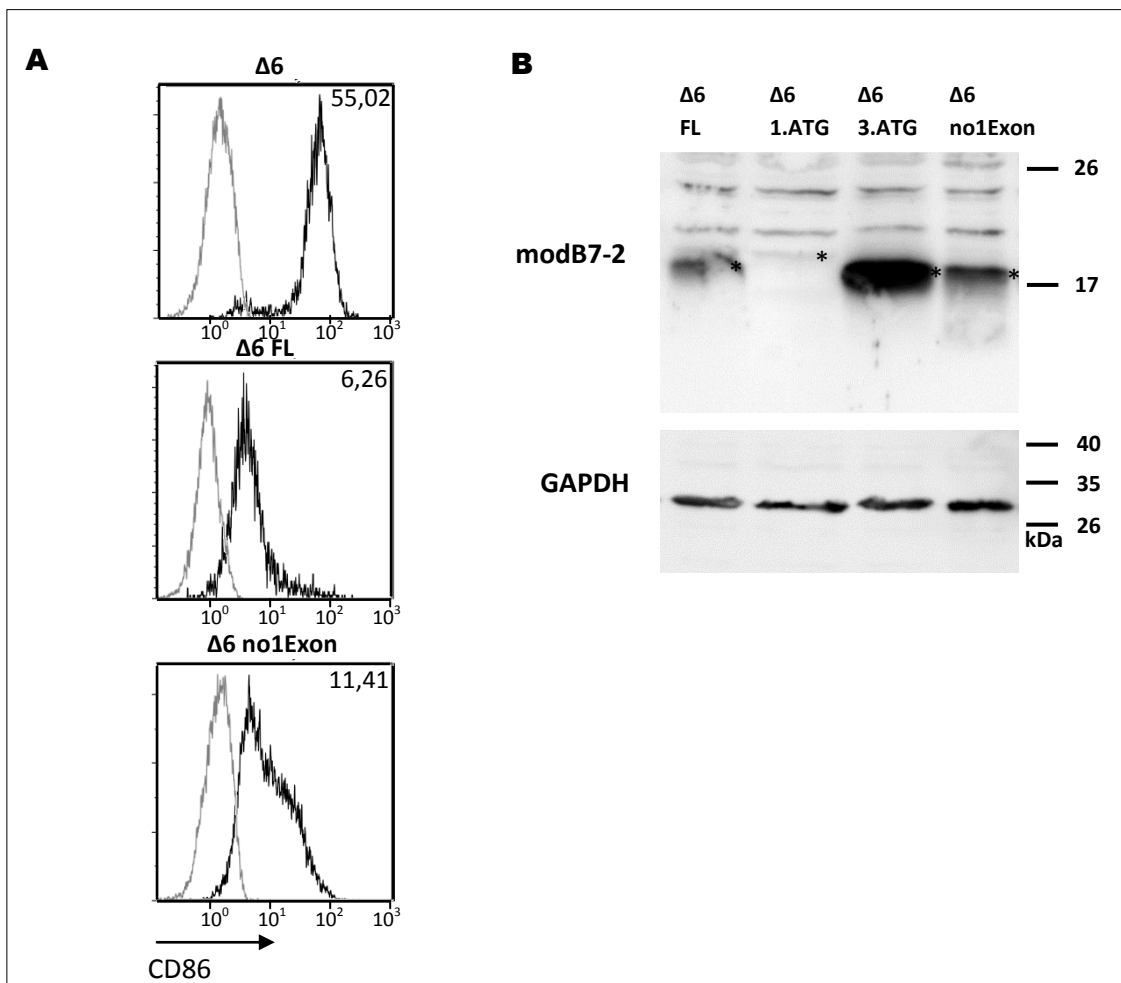


Abbildung 3.10 CD86-Oberflächenexpression bei Infektion von DC2.4-Zellen mit MCMV-Δ6 modB7-2 no1Exon

(A) FACS-Analyse von MCMV-Δ6 modB7-2 FL- bzw. MCMV-Δ6 modB7-2no1Exon-infizierten DC2.4-Zellen (MOI=1). 24 h p. i. wurden die Zellen geerntet und die CD86-Oberflächenexpression analysiert. In grau ist jeweils die Färbung mit einer unspezifischen Isotypkontrolle dargestellt, während schwarze Histogramme die CD86-Oberflächenexpression zeigen. Die Zahlen geben die mittlere Fluoreszenzintensität der CD86-Messung an: (B) Western Blot von infizierten DC2.4-Zellen, gefärbt mit α -modB7-2-spezifischen Serum und α -GAPDH-Antikörpern. Sternchen deuten auf die modB7-2-spezifischen Proteinbanden hin

In der FACS-Analyse (Abbildung 3.10 A) wurde deutlich, dass nach Infektion mit der Mutante MCMV-Δ6 modB7-2no1Exon keine ähnlich starke Reduktion der Expression von CD86 an der Zelloberfläche auftrat wie nach Infektion mit MCMV-Δ6 modB7-2 FL. Es entstanden zwei Zellpopulationen: eine Population zeigte die in gleichen Maße verminderte CD86-Oberflächenexpression wie die mit MCMV-Δ6 modB7-2 FL-infizierten Zellen, während bei der zweiten die CD86-Oberflächenexpression höher war. Die Expression des modB7-2-Proteins war zwar im Vergleich zur Expression in MCMV-Δ6 modB7-2 FL-infizierten Zellen erhöht, allerdings waren in der Spur mit dem Lysat aus MCMV-Δ6 modB7-2no1Exon infizierten Zellen noch weitere kleinere Banden im Western Blot zu sehen. Die Western Blot-Daten legten den Schluss nahe, dass bei Fehlen der Sequenz, die sich vor dem dritten

Start-Kodon befindet, die modB7-2-Expression fehlerhaft abläuft (Detektion zusätzlicher modB7-2-spezifischer Proteinbanden im Western Blot). Auch die Funktion der MCMV- $\Delta 6$ modB7-2no1Exon-Mutante war gestört und hinsichtlich der CD86-Beeinflussung nicht vollständig. Somit scheint die Sequenz des ersten Exons wichtig zu sein für die Expression von modB7-2, allerdings scheint die Initiation der Translation am dritten Start-Kodon bei Fehlen des ersten Exons nicht gestört zu sein.

3.6 AKTIVITÄT VON MODB7-2 UNABHÄNGIG VOM VIRUSKONTEXT

Nach der Beantwortung der grundlegenden Fragen zur Expression und Translation von modB7-2 wurde der Frage nachgegangen, ob modB7-2 die Verminderung der CD86-Expression von der Zelloberfläche Antigen-präsentierender Zellen allein bewerkstelligen kann oder ob dazu weitere MCMV-Proteine benötigt werden. So wurde für das KSHV-Protein K5 beispielsweise gezeigt, dass K5 unabhängig von der KSHV-Infektion die CD86-Expression auf der Zelloberfläche von B-Zellen reduzieren kann (Ishido et al., 2000; Coscoy und Ganem, 2001). Um dies für modB7-2 zu prüfen, wurde modB7-2 außerhalb des MCMV-Kontextes in DC2.4-Zellen exprimiert. Da dendritische Zellen als schwer transfizierbar gelten, wurde die lentivirale Transduktion auf Basis des Vektors pRRL.PPT.SF.i2GFP durchgeführt. Eine günstige Eigenschaft dieses Vektors ist der SFFV-Promotor, der in myeloiden/hämatopoetischen Zellen stark aktiv ist und somit auch in DCs funktionieren sollte (Baum et al., 1995). Weiterhin erlaubt der Vektor die Transduktion auch sich nicht-teilender Zellen (im Gegensatz zu MLV-basierenden Vektoren) und so die Unabhängigkeit vom Zellzyklus. Da es sich bei diesem Plasmid um einen *self-inactivating*- (SIN-) Vektor handelt, ist das Sicherheitsrisiko minimiert (zu SIN-Vektoren siehe auch Kappes und Wu, 2001). Außerdem erlaubt die IRES-GFP-Kassette, die Expression des Transgens anhand des GFP-Signals abzuschätzen (siehe Abbildung 3.11).

Es wurden verschiedene Varianten von modB7-2 in den lentiviralen Vektor pRRL.PPT.SF.i2GFP kloniert (Abbildung 3.11). Bei dem „empty vector“ handelt es sich um das Basis-Plasmid ohne Transgen. Der Vektor FL enthält den gesamten ORF von modB7-2 („full length“), der direkt vor die IRES-GFP-Kassette in den Vektor eingefügt wurde. Vor die modB7-2 FL-Sequenz wurde eine Kozak-Sequenz kloniert, welche die Expression von modB7-2 verstärken sollte. Eine Kozak-Sequenz mit der Konsensus Sequenz GCCGCC (R= Purin) direkt vor einem Startkodon unterstützt den Translationsbeginn an diesem ATG, da das Startkodon effizienter vom Ribosom erkannt wird (Kozak et al., 1986; Kozak et al., 1991; Kozak et al., 2002). Um die Funktion von modB7-2no1Exon auch außerhalb des Viruskontextes überprüfen zu können und damit evtl. Rückschlüsse auf die Funktion des ersten Exons ziehen zu können, wurde auch der ORF von modB7-2 ab dem 3. ATG-Kodon

(=modB7-2no1Exon) zusammen mit einer Kozak-Sequenz vor die IRES-GFP-Kassette inseriert. Um die Untersuchung der modB7-2-Expression in der lentiviralen Transduktion unabhängig von einer Kozak-Sequenz zu ermöglichen, aber gleichzeitig eine möglichst starke Expression des Transgens zu erzielen, wurde eine Kodon-optimierte Version von modB7-2 in den Vektor kloniert. Hierbei wurde die DNA-Sequenz für den modB7-2-ORF derart verändert, dass die verwendeten Kodons optimal für die Expression in murinen Zellen angepasst sind, ohne dass die Aminosäuresequenz des modB7-2-Proteins verändert wurde (Abbildung 3.11 „KodOP“). Gleichzeitig wurden auch RNA-Elemente mutiert, die sich evtl. negativ auf die modB7-2-Expression auswirken könnten. Die DNA-Sequenz für den Kodon-optimierten modB7-2-ORF sowie die jeweilige Klonierungsstrategie kann im Anhang eingesehen werden.

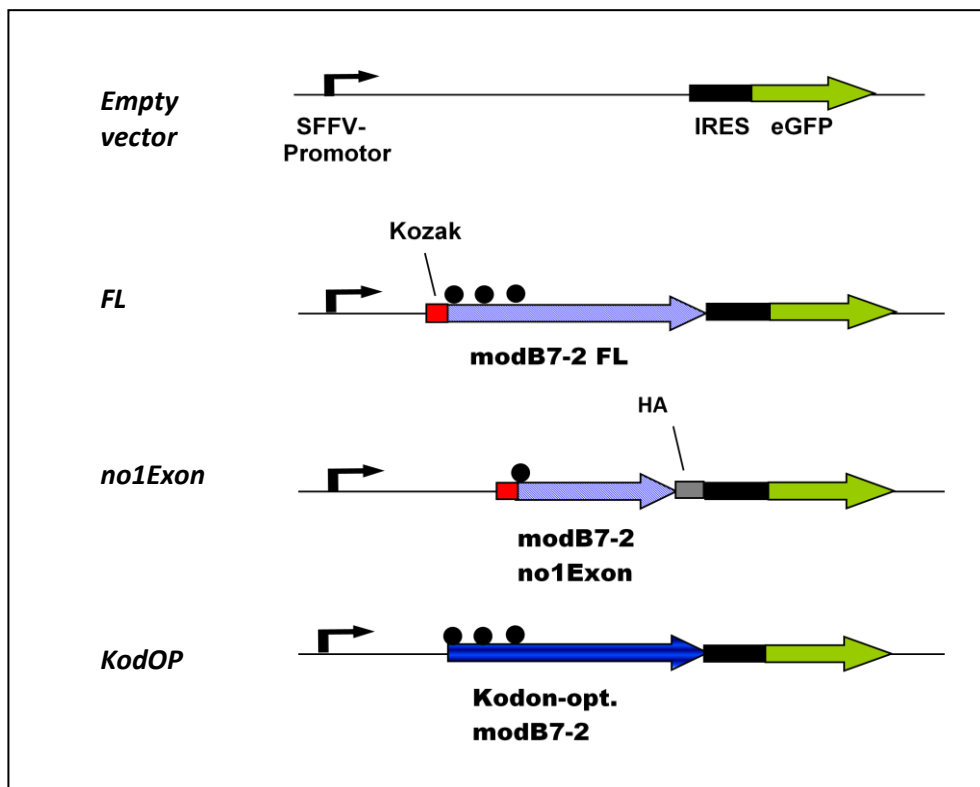


Abbildung 3.11 Schematische Darstellung der lentiviralen Konstrukte zur Untersuchung der Expression von modB7-2

Alle Konstrukte basieren auf dem Vektor pRRL.PPT.SF.IRES.GFP. Hier ist schematisch nur der jeweilige modB7-2-ORF zusammen mit der IRES-GFP-Kassette gezeigt. Alle Konstrukte besitzen einen SFFV-Promotor, der die Expression der Kassette reguliert. Zur Kontrolle der modB7-2-Expression wurde die jeweilige Variante von modB7-2 direkt vor die Sequenz der IRES-GFP-Kassette kloniert, so dass die modB7-2-Expression durch die GFP-Expression verfolgt werden konnte. *In frame* vorhandene ATG-Kodons innerhalb der modB7-2-Sequenzen werden in der Abbildung durch schwarze Kreise schematisch gekennzeichnet. Für weitere Erklärungen siehe Text.

Mit den lentiviralen Plasmiden wurden nun VSVg-pseudotypisierte lentivirale Vektoren hergestellt. Diese wurden anschließend zur Transduktion von DC2.4-Zellen verwendet (MOI =1,5). 69 h nach Transduktion wurde einem Teil der Zellen der Proteasom-Inhibitor MG-132 (5 μ M) zugegeben, um zu prüfen, ob sich dadurch die modB7-2-Expression verstärken lässt (Abbildung 3.12 A). 5 h nach

Inhibitor-Zugabe bzw. 74 h nach Transduktion wurden die Zellen geerntet und die modB7-2-Expression im Western Blot untersucht (Abbildung 3.12 B).

Es zeigte sich, dass in Abwesenheit von MG-132 nur eine schwache modB7-2-Expression mit dem Konstrukt, das für modB7-2 KodOP kodiert, zu detektieren war. Bei Transduktion der Zellen mit dem modB7-2-FL-Konstrukt konnte zudem eine minimale modB7-2-Expression detektiert werden; bei der Transduktion mit den Konstrukten *empty* bzw. *no1Exon* wurde keine modB7-2-Expression festgestellt. Nach MG-132-Zugabe konnte in den mit modB7-2 KodOP transduzierten Zellen die stärkste Expression gefunden werden; es waren zwei Banden sichtbar. Das modB7-2 FL-Konstrukt zeigte eine etwas schwächere modB7-2-Expression mit ebenfalls zwei Proteinbanden. Die Tatsache, dass erst nach Zugabe von MG-132 eine modB7-2-Expression in den mit den verschiedenen lentiviralen Konstrukten transduzierten Zellen festgestellt werden konnte, deutet darauf hin, dass das modB7-2 instabil ist, eine geringe Halbwertszeit hat und schnell degradiert wird.

Des Weiteren entspricht die stärkere, obere der beiden Proteinbanden, die nach Transduktion mit dem Konstrukt modB7-2 FL im Western Blot detektiert werden konnte, der schwächeren oberen Bande, die bei Transduktion der Zellen mit dem modB7-2 KodOP-Vektor nachweisbar war. Die modB7-2-Bande der Positivkontrolle (MCMV) zeigte das gleiche Laufverhalten wie die untere der modB7-2-Proteinbanden, die bei Transduktion mit dem modB7-2 FL-Konstrukt exprimiert wurden und wie die untere der modB7-2-spezifischen Proteinbanden, die bei Transduktion mit dem Konstrukt modB7-2 KodOP nachzuweisen waren. Es ließ sich daher vermuten, dass bei der Transduktion der Zellen mit dem modB7-2-FL-Konstrukt und dem Konstrukt modB7-2 KodOP die Translation sowohl am 1. ATG-Kodon als auch am 3. ATG-Kodon des modB7-2-ORFs initiiert werden kann, was in zwei modB7-2-spezifischen Proteinbanden auf dem Western Blot resultiert. Ferner deuten die Ergebnisse daraufhin, dass bei dem modB7-2 FL-ORF aufgrund der Kozak-Sequenz das erste ATG-Kodon stärker als das dritte ATG-Kodon benutzt wird, während bei modB7-2 KodOP das 3. ATG-Kodon stärker als das erste benutzt wird. Die modB7-2-Expression nach Transduktion des modB7-2no1Exon-Konstruktes war kaum zu sehen, die modB7-2-spezifische Proteinbande lief hier am höchsten, und resultierte aus dem Anfügen der Sequenz für das HA-Tag am 3'-Ende des modB7-2no1Exon-ORFs.

Die Funktion der lentiviral transduzierten modB7-2-Varianten wurde anhand der CD86-Oberflächenexpression in transduzierten DC2.4-Zellen untersucht. Wie in Abbildung 3.12 A dargestellt, wurden die Zellen nach Transduktion für 74 h inkubiert und 5 h vor der Ernte wurde MG-132 (5 µM) zugegeben. Als Positivkontrolle dienten für 24 h mit MCMV-WT infizierte DC2.4-Zellen, denen ebenfalls 5 h vor der Ernte MG-132 zugegeben wurde. Vergleicht man die Histogramme der CD86-Oberflächenexpression, so zeigt sich, dass keine der

modB7-2-Varianten dazu in der Lage war, die CD86-Menge auf der Zelloberfläche zu reduzieren. Ein möglicher Einfluss der MG-132-Zugabe auf die Verminderung der CD86-Oberflächenexpression konnte ausgeschlossen werden, da nach MCMV-Infektion keine Auswirkung von MG-132 auf die Reduktion der CD86-Oberflächenexpression zu verzeichnen war (siehe auch Abbildung 3.12 C).

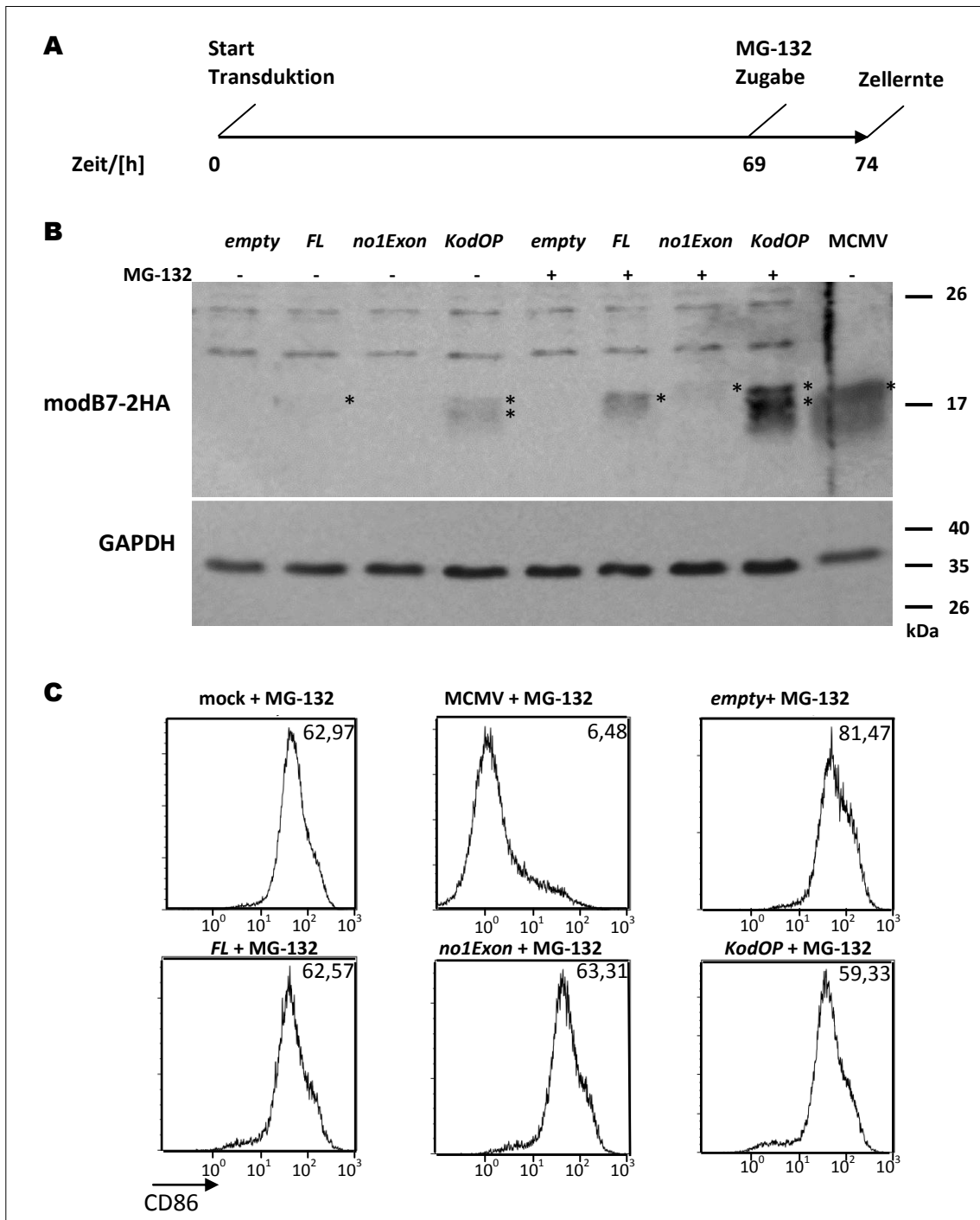


Abbildung 3.12 Expression und Funktion von modB7-2-Varianten nach Transduktion von DC2.4-Zellen mittels lentiviraler Expression

In (A) ist schematisch der Versuchsablauf skizziert. DC2.4-Zellen wurden gemäß Material und Methoden mit Lentiviren transduziert. Nach 69 h wurden 5 μ M MG-132 zugegeben, die Zellen nach 5 h Inkubation geerntet und für Western Blot (B) und für FACS-Analysen (C) eingesetzt, um die modB7-2-Expression und den Einfluss auf die CD86-Oberflächenexpression zu prüfen. MCMV-infizierte Zellen in (C) [MCMV + MG-132] wurden 24 h p. i. geerntet, 5 h vor Zellernte wurden 5 μ M MG-132 dem Zellkulturmedium zugegeben. Die Zahlen geben die mittlere Fluoreszenzintensität an.

Um zu prüfen, welche Mengen an modB7-2-Protein nach Transduktion von DC2.4-Zellen exprimiert werden, wurden DC2.4-Zellen wie zuvor transduziert und für 74 h inkubiert, und 5 h vor der Ernte mit MG-132 versetzt. Als Positiv-Kontrolle wurden DC2.4-Zellen für 24 h mit MCMV-WT (MOI = 1) infiziert; hier wurde kein MG-132 zugegeben. MCMV-infizierte und lentiviral transduzierte Zellen

wurden anhand des GFP-Signals sortiert und die Lysate einer gleichen Zahl an Zellen durch Immunoblotting analysiert (Abbildung 3.13).

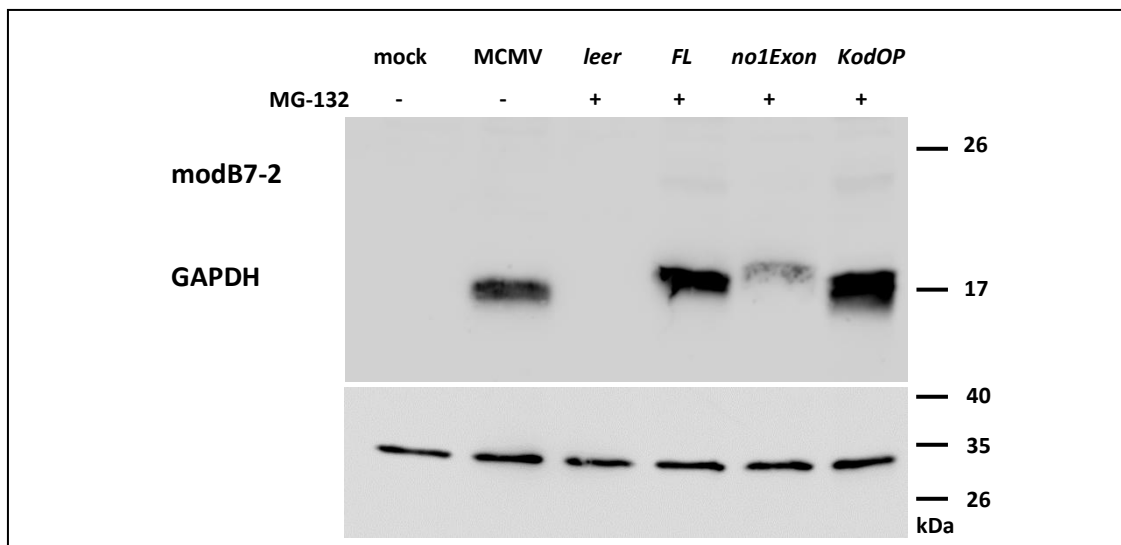


Abbildung 3.13 modB7-2-Proteinmenge nach lentiviraler Transduktion von DC2.4-Zellen mit verschiedenen modB7-2-Varianten im Vergleich zur modB7-2-Proteinmenge nach MCMV-Infektion von DC2.4-Zellen

Vergleich der modB7-2-Expression in gesorteten MCMV-infizierten bzw. mit den lentiviralen Vektoren transduzierten Zellen. Die Sortierung erfolgte anhand der GFP-Expression und der Nachweis von modB7-2 und GAPDH (Ladepkontrolle) wurde durch Immunoblotting mit spezifischen Antikörpern durchgeführt.

Die Menge an modB7-2-Protein in Zellen, die mit den lentiviralen Vektoren modB7-2 FL und modB7-2 KodOP transduziert wurden, war höher als in MCMV-infizierten Zellen (Abbildung 3.13). Dabei galt auch hier wieder, dass die molekulare Masse der modB7-2-spezifischen Proteinbande in modB7-2 FL-transduzierten Zellen höher war, als die des modB7-2-Proteins in MCMV-infizierten Zellen. Dies resultiert vermutlich aus der Nutzung des 1. ATGs aufgrund der Kozak-Sequenz im Konstrukt modB7-2 FL. Eine Expression von modB7-2 nach Transduktion von DC2.4-Zellen mit dem modB7-2no1Exon-Konstrukt war nach Zellsortierung nur sehr schwach detektierbar.

Das Ergebnis zeigt, dass in den lentiviral transduzierten Zellen tendenziell eher höhere Mengen an modB7-2-Protein exprimiert wurden als in MCMV-infizierten Zellen. Trotzdem war in den transduzierten Zellen keine verminderte CD86-Oberflächenexpression festzustellen. Mit einer zu geringen modB7-2-Expression kann dies jedoch nicht erklärt werden. Außerdem deuten die Ergebnisse darauf hin, dass nach lentiviraler Transduktion der Zellen bei Vorhandensein einer Kozak-Sequenz vor dem modB7-2-ORF im jeweiligen lentiviralen Vektor die Translation auch am 1. ATG-Kodon initiiert werden kann. Nach Transduktion von DC2.4-Zellen mit dem Konstrukt, dem das erste Exon fehlt, wird modB7-2 nur schwach exprimiert, obwohl sich auch in diesem Konstrukt eine Kozak-Sequenz vor dem modB7-2-ORF befindet.

3.7 LOKALISATION VON MODB7-2 INNERHALB MCMV-INFIZIERTER ZELLEN

Um Rückschlüsse auf die Funktionsweise von modB7-2 schließen zu können, wurde im nächsten Experiment die Lokalisation von modB7-2 in der Zelle untersucht. Da die *in silico*-Analyse der Proteinstruktur von modB7-2 ein Transmembranprotein mit zwei Transmembrandomänen vorhersagt (Loewendorf 2005), war besonders eine Lokalisation im sekretorischen Weg und somit in den Organellen ER, Golgi und Endosomen von Interesse. Dazu wurde die Lokalisation von modB7-2 mit der von Markern des sekretorischen Weges verglichen: Calnexin ist ein Kolokalisationsmarker für das endoplasmatische Retikulum(ER), während GM130 ein Markerprotein für den Golgi-Apparat/die Golgi-Matrix darstellt. Bei EEA-1 (*Early Endosome Antigen*) handelt es sich um ein Markerprotein für frühe Endosomen.

Im folgenden Experiment wurden mock infizierte oder MCMV-modB7-2HA infizierte Zellen (MOI = 2,5) 24 h p. i. geerntet, fixiert und mit den jeweils spezifischen Antikörpern gefärbt. Bei Betrachtung der nicht-infizierten Zellen (Abbildung 3.14 A) zeigte sich, dass der ER-Marker Calnexin in punktartigen Strukturen um den Zellkern zu finden war, wobei sich eine größere Menge Calnexin in einer Kernausbuchtung befand. Der Marker GM130 als Golgi-Matrixprotein befand sich in tubulusartigen, länglichen Strukturen konzentriert neben dem Zellkern. Der Marker EEA-1 fand sich in vesikelartigen, punktförmigen Strukturen, die im ganzen Cytoplasma verteilt waren. Auch hier war neben dem Zellkern eine Struktur zu finden, in der EEA-1 konzentriert vorlag.

Nach Infektion (Abbildung 3.14 B) war zu beobachten, dass modB7-2HA sich in Kernnähe anhäufte. Im Falle des ER-Markers Calnexins ließ sich feststellen, dass sich nach Infektion sein Lokalisation veränderte: statt punktartiger Strukturen, die in nicht-infizierten DC2.4-Zellen um den Kern angeordnet auftauchten, war nach Infektion Calnexin hauptsächlich an einer Stelle neben dem Kern angehäuft; an dieser Stelle waren ebenfalls modB7-2-Signale zu sehen. Im *overlay* der beiden Bilder war allerdings nur vereinzelt eine Kolokalisation von modB7-2 und Calnexin zu erkennen. Bei Analyse des Markers GM130 (als Golgi-Matrixprotein) ließ sich keine Umstrukturierung/Umvteilung in der Zelle detektieren. Im *Overlay* ließ sich deutlich feststellen, dass modB7-2 und GM130 zu großen Teilen kolokalisierten. Nur in einem kleinen Bereich war das GM130-Signal allein detektierbar; während man modB7-2 etwas weiter entfernt vom Zellkern und von der GM130-Lokalisation in punktförmigen Strukturen finden konnte. Bei Untersuchung des EEA-1-Signals wurde beobachtet, dass nach Infektion ein deutlich stärkeres EEA-1-Signal in Kernnähe zu finden war als in nicht-infizierten Zellen. Eine Kolokalisation von modB7-2 mit EEA-1 trat nur vereinzelt auf.

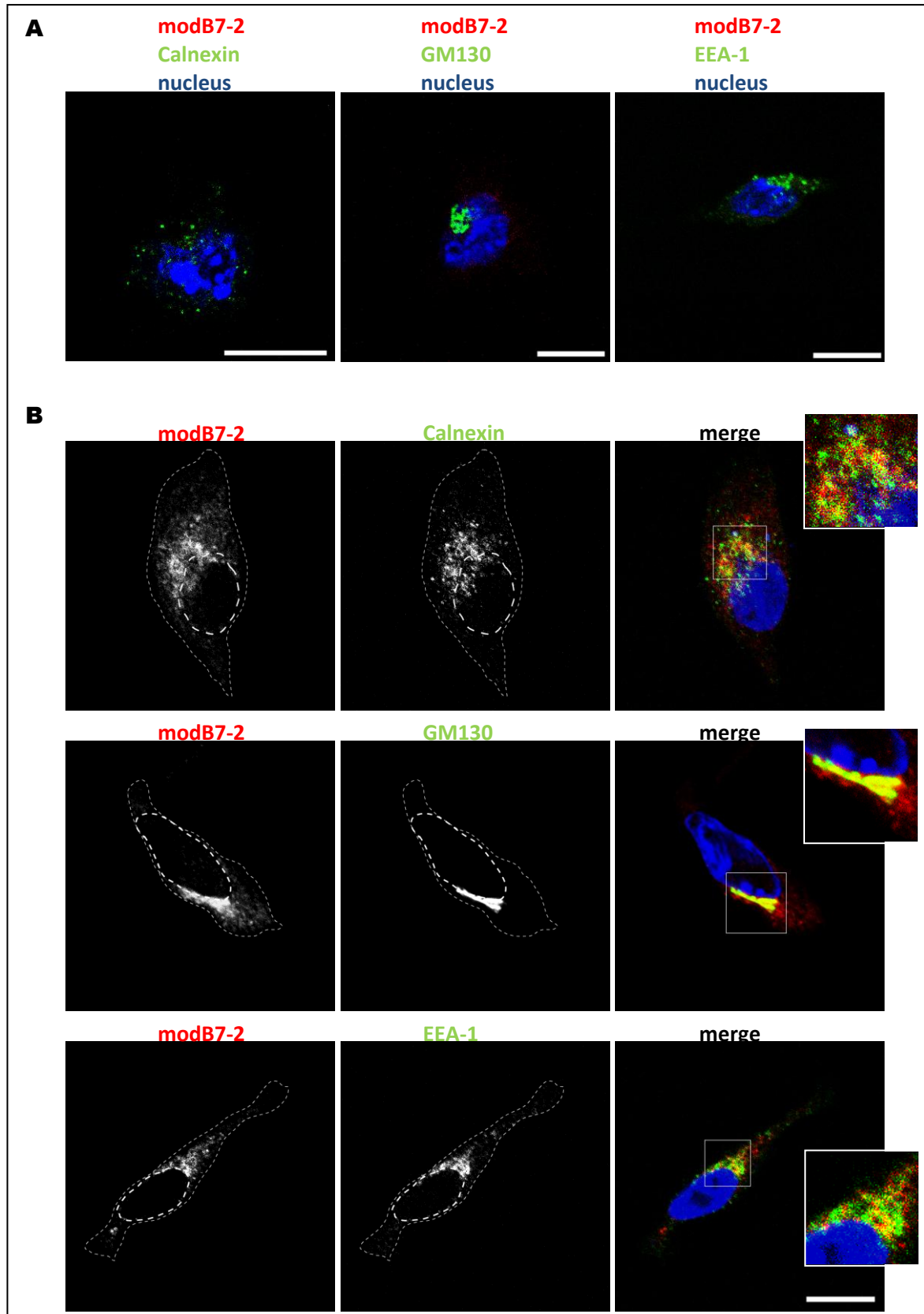


Abbildung 3.14 Lokalisation von modB7-2HA in MCMV-infizierten DC2.4-Zellen 24 h p. i.

Mock-infizierte DC2.4-Zellen (A) und MCMV-modB7-2HA infizierte DC2.4-Zellen 24 h p. i. (B) wurden mit spezifischen Antikörpern gegen das HA-Epitop (Alexa568, rot) und gegen Calnexin, GM130 oder EEA-1 (Alexa488, grün) gefärbt, für die Kern-Färbung wurde Hoechst33342 verwendet. Die Analyse erfolgte mit konfokaler Laserscanning-Mikroskopie. Der

Zellkörper und der Zellkern sind mit gestrichelten Linien angedeutet, der Maßstabsbalken entspricht 10 μm . Die gezeigten Bilder sind repräsentativ für mindestens 3 Experimente und für mehr als 30 analysierte Zellen.

24 h nach der Infektion ist der modB7-2-Effekt schon voll ausgeprägt und die CD86-Menge auf der Oberfläche stark reduziert. Deshalb war es wichtig festzustellen, ob sich die modB7-2-Lokalisation in der Zelle im Verlauf der Infektion ändert. Daher wurde das Experiment zur modB7-2-Lokalisation auch 8 h p. i. (Abbildung 3.15) und 12 h p. i. (Abbildung 3.16) wiederholt. In RAW264.7-Zellen war nach 8 h der Verlust der CD86-Menge auf der Zelloberfläche noch nicht komplett, während nach 12 h der Effekt weiter und nahezu vollständig ausgeprägt war (Loewendorf, 2005).

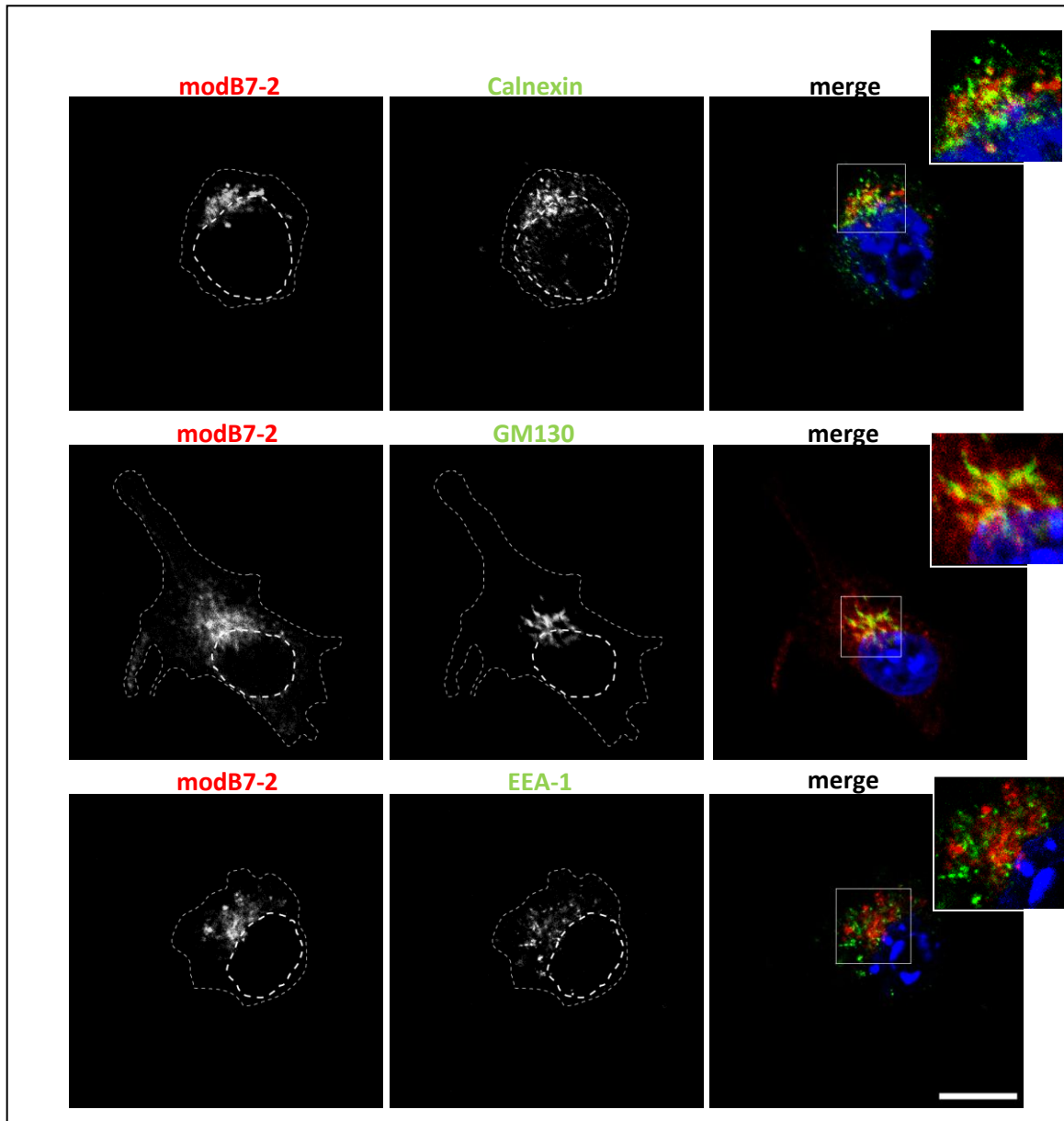


Abbildung 3.15 Lokalisation von modB7-2HA in MCMV-infizierten DC2.4-Zellen 8 h p. i.

Die Färbungen wurden analog der Beschreibung in Abbildung 3.14 durchgeführt. Der Zellkörper und der Zellkern sind mit gestrichelten Linien angedeutet, der Maßstabsbalken entspricht 10 μm . Die gezeigten Bilder sind repräsentativ für mindestens 3 Experimente und für mehr als 30 analysierte Zellen.

8 h nach Infektion ließ sich feststellen, dass die Umlagerung der Organell-Marker schon stattgefunden hatte und gegenüber den 24 h p. i. gefärbten Zellen diesbezüglich kein Unterschied besteht (Abbildung 3.15): Sowohl Calnexin als auch EEA-1 befanden sich konzentriert in punktförmigen, vesikelartigen Strukturen in der Nähe des Zellkerns und waren sonst kaum in der Zelle zu finden. GM130 dagegen befand sich unverändert zum Zeitpunkt 24 h p. i. in tubulusförmigen Strukturen neben dem Zellkern.

modB7-2HA war zu einem Großteil in denselben Strukturen wie der Marker GM130 zu finden, allerdings auch darüber hinaus. Im Gegensatz zu 24 h p. i. fand man 8 h p. i. kleine Bereiche, in der

Calnexin und modB7-2 zusammen anzufinden waren, während EEA-1 keine Kolo­kalisierung mit modB7-2 zeigte.

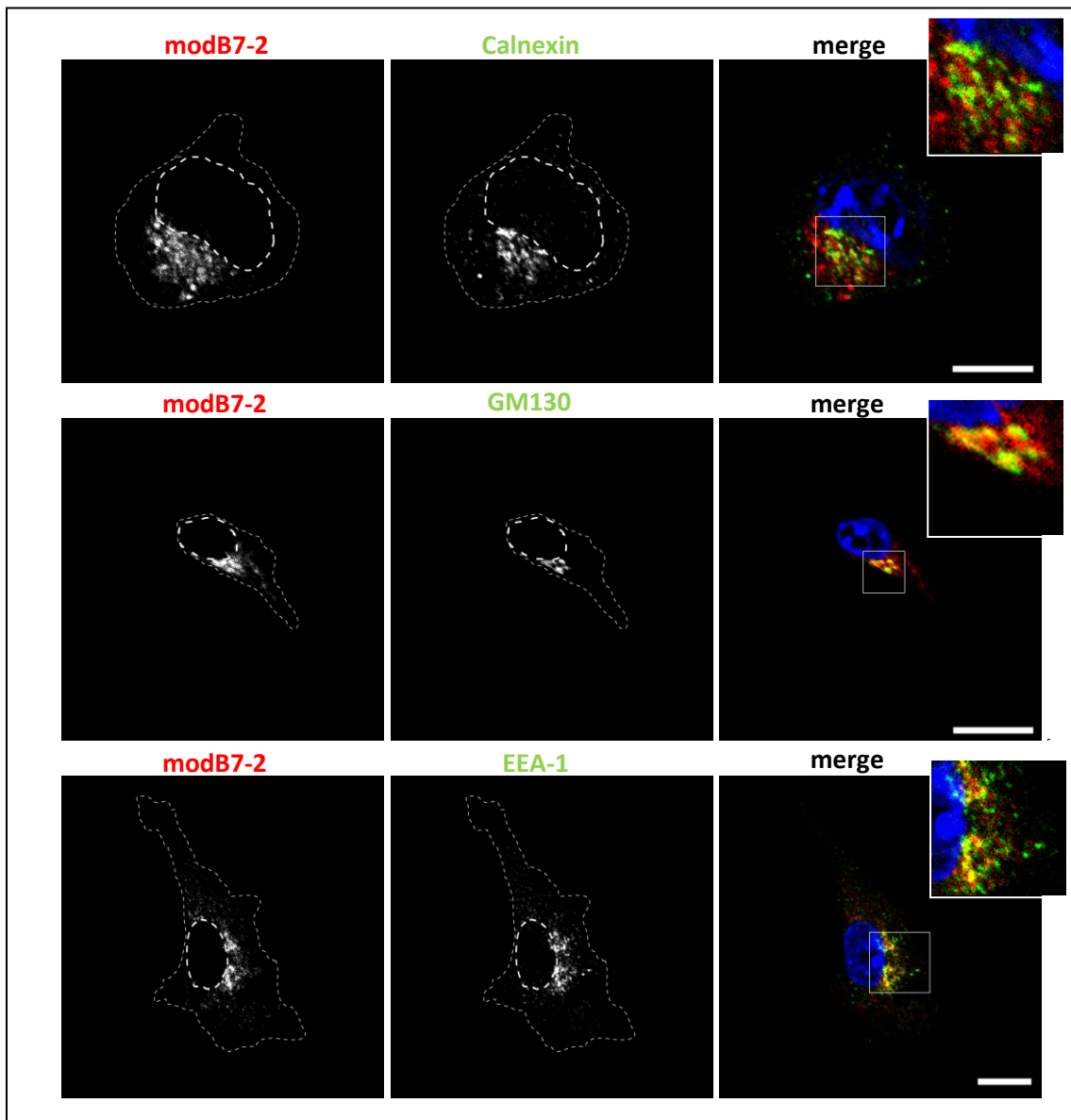


Abbildung 3.16 Lokalisation von modB7-2HA in MCMV-infizierten DC2.4 12 h p. i.

Die Färbung wurde wie in Abbildung 3.14 beschrieben durchgeführt. Der Zellkörper und der Zellkern sind mit gestrichelten Linien angedeutet, der Maßstabsbalken entspricht 10 μm . Die gezeigten Bilder sind repräsentativ für mindestens 3 Experimente und für mehr als 30 analysierte Zellen.

12 h nach Infektion ließ sich nur noch eine schwache Kolo­kalisierung von Calnexin mit modB7-2 feststellen (Abbildung 3.16). Bei Vergleich der Signale zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion, ließ sich beobachten, dass sich die modB7-2HA- und EEA-1-Signale stärker überlagerten als zu den anderen Zeitpunkten. Die Kolo­kalisierung von GM130 und modB7-2 war 12 h nach Infektion wie zuvor 8 h p. i. festzustellen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich modB7-2HA tatsächlich in den sekretorischen Organellen der DC2.4-Zellen befand, wobei der Hauptanteil von modB7-2 zu allen betrachteten Zeitpunkten im Golgi-Apparat nachzuweisen war. Im Laufe der Infektion war modB7-2HA auch in geringer Menge im ER zu finden (8 h p. I.), und 12 h p. I. hielt sich ein Teil der modB7-2HA-Moleküle auch in frühen Endosomen auf, während 24 h p. i. dagegen dort nur noch wenig modB7 zu finden war.

3.8 SEQUENZMOTIVE IN DER MODB7-2-AMINOSÄURESEQUENZ

Im Folgenden wurde der Frage nachgegangen, ob Signalsequenzen im modB7-2-Protein identifiziert werden können, welche die subzelluläre Lokalisation des Proteins bestimmen. Für das Furin-Protein (eine Endoprotease im sekretorischen Weg der Zelle) ist bekannt, dass ein „saures Motiv“ (*Acidic Cluster*) in der Aminosäuresequenz im cytoplasmatischen Teil des Proteins dafür verantwortlich ist, dass Furin von der Zelloberfläche in das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) zurücktransportiert wird (Molloy, 1999). Im Furinprotein besteht das *Acidic Cluster* aus den Aminosäureresten EECPSDSEEDE, wobei hier die beiden Serinreste von der Casein-Kinase II phosphoryliert werden können. Für die Sortierung von Furin von der Plasmamembran zurück in das TGN ist die Bindung an das *phosphofurin acidic cluster sorting protein* PACS-1 erforderlich (Wan, 1998). Auch das Nef-Protein des Humanen Immundefizienz Virus Typ-1 beinhaltet ein *Acidic Cluster* mit der Aminosäuresequenz ⁶²EEEE⁶⁵. Dieses „saure Motiv“ spielt eine große Rolle in der Funktion von Nef, welches bei Infektion von T-Zellen u.a. zur Internalisation von MHC-I-Molekülen von der Zelloberfläche und zur anschließenden Speicherung im TGN führt. Nach der Mutation des *Acidic Clusters* in ⁶²AAAA⁶⁵ wird die Nef-abhängige Reduktion von MHC-I-Molekülen von der Zelloberfläche von T-Zellen aufgehoben (Greenberg et al., 1998). Neueren Erkenntnissen zufolge dient das *Acidic Cluster* in Nef weniger der PACS-1-Bindung, sondern eher der Stabilisierung eines ternären Komplexes aus Nef, MHC-I und AP1 (Baugh et al., 2008).

Bei Betrachtung der modB7-2-Sequenz fiel auf, dass modB7-2 auch ein *Acidic Cluster* besitzt. (Abbildung 3.17 A, grün markiert). Das Kernmotiv besteht aus ⁴⁹EEDE⁵², allerdings befindet sich N-terminal zu diesem Motiv die Sequenz ⁴¹KDRRDADR⁴⁸, bei der sich saure Reste mit basischen Resten abwechseln. In der Nähe des *Acidic Clusters* befindet sich kein phosphorylierbarer Rest, wie dies bei Furin der Fall ist. Da bei Nef die Mutation von ⁶²EEEE⁶⁵ in ⁶²AAAA⁶⁵ ausreichte, um die MHC-I-Relokalisation von der Zelloberfläche in das TGN zu unterbinden, wurde analog bei modB7-2 das *Acidic Cluster* ⁴⁹EEDE⁵² in ⁴⁹AAAA⁵² mutiert; das Protein wird im Folgenden modB7-2ΔAC genannt (Abbildung 3.17).

A			
1	MQRRPGSETKSYLKGHYLTFRVKDRRDADR	EEDEVKRPDWST	60
61	IAFRLVYLTVQAHLWTRHERHQRGT	DAVRLAPVAAAFVIGVLT	120
121	PCGPDDE*		127

B	
modB7-2ΔAC	...RRDADREEEDEVKRP... → ...RRDADRAAAAAVPKR...

Abbildung 3.17 Die Aminosäuresequenz von ModB7-2 beinhaltet ein Acidic Cluster

Dargestellt ist die Aminosäuresequenz von modB7-2. Grün hinterlegt ist das *Acidic Cluster*, blaue Buchstaben kennzeichnen vorhergesagte Transmembranbereiche (A). (B) zeigt die Veränderung in der Aminosäuresequenz der modB7-2-Variante, welche von der Virusmutante MCMV-Δ6 modB7-2noAcidic exprimiert wird.

Die Integration des ORF dieses modB7-2ΔAC-Proteins in das Genom der MCMV-Δ6-Mutante führt zu Generierung der Mutante MCMV-Δ6 modB7-2ΔAC. Das Prinzip zur Herstellung dieser Virusmutante MCMV-Δ6 modB7-2ΔAC kann im Anhang eingesehen werden.

DC2.4-Zellen wurden mit der Virus-Mutante MCMV-Δ6 modB7-2ΔAC infiziert (MOI = 1) und 24 h nach Infektion die modB7-2-Expression im Vergleich zu den zuvor hergestellten Mutanten im Western Blot untersucht (Abbildung 3.18 A). Es war festzustellen, dass bei Infektion mit MCMV-Δ6 modB7-2ΔAC eine modB7-2-Expression detektiert werden konnte, die etwa der modB7-2-Expression in MCMV-Δ6 modB7-2 FL-infizierten Zellen entsprach.

Dazu wurde auch die Funktion der modB7-2ΔAC-Mutante bezüglich der Reduzierung der CD86-Oberflächenexpression beurteilt. Zu diesem Zweck wurden DC2.4-Zellen mit den Mutanten MCMV-Δ6 modB7-2 FL sowie MCMV-Δ6 modB7-2ΔAC mit einer MOI = 1 infiziert und 24 h p. i. wurde die CD86-Oberflächenexpression im FACS analysiert (Abbildung 3.18 B).

Nach Infektion der DC2.4-Zellen mit MCMV-Δ6 modB7-2ΔAC war die Verringerung der CD86-Oberflächenexpression ähnlich stark als in DC2.4-Zellen, welche mit MCMV-Δ6 modB7-2 FL infiziert wurden.

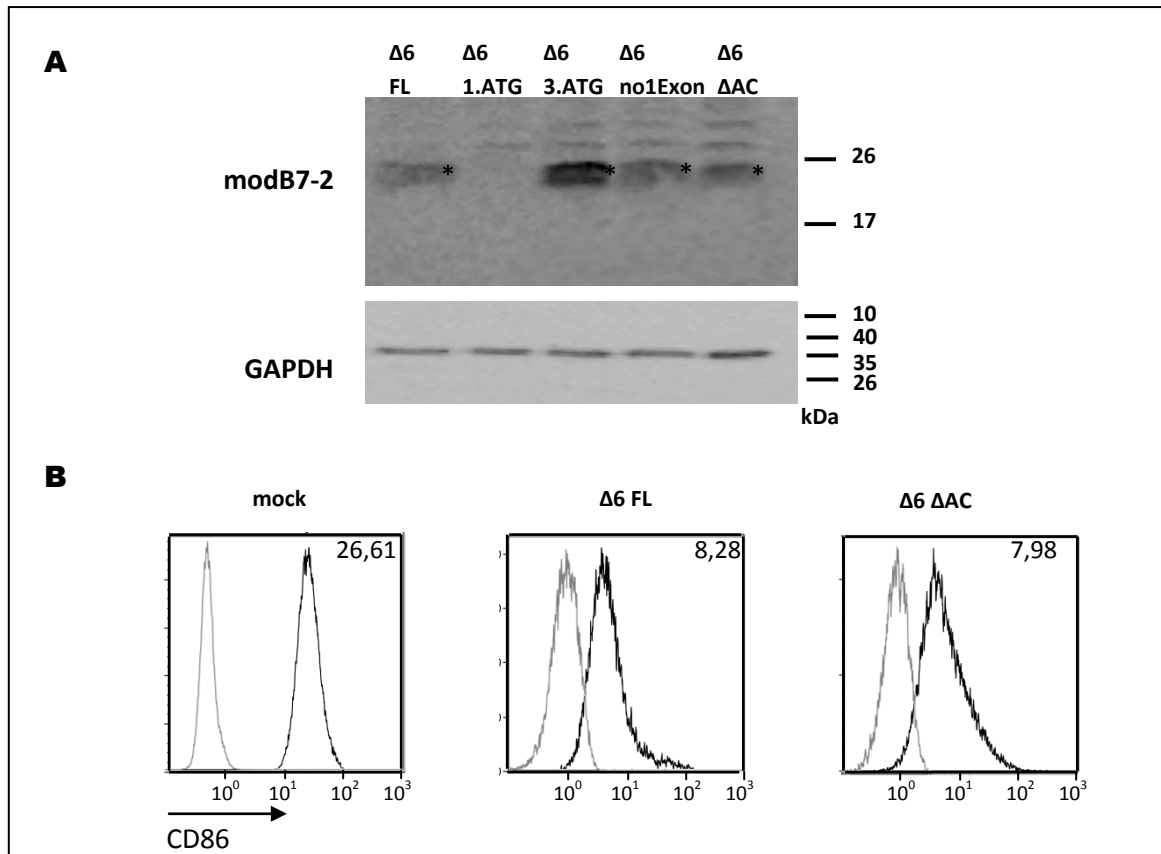


Abbildung 3.18 Expression (A) und Funktion (B) von modB7-2ΔAC nach Infektion von DC2.4-Zellen

DC2.4-Zellen wurden mit verschiedenen MCMV Δ6-Mutanten infiziert. 24 h p. i. wurden die Zellen geerntet und für die Western Blot- (A) oder FACS-Analyse (B) zum Nachweis der modB7-2-Expression bzw. der CD86-Oberflächenexpression eingesetzt. Sternchen deuten auf modB7-2-spezifische Proteinbanden hin (A); In grau ist jeweils die Färbung mit einer unspezifischen Isotypkontrolle dargestellt, während schwarze Histogramme die CD86-Oberflächenexpression zeigen. Die Zahlen geben die mittlere Fluoreszenzintensität der CD86-Messung an (B).

Obwohl die Funktion der modB7-2ΔAC-Variante durch die Mutation des *Acidic Clusters* offensichtlich nicht beeinträchtigt war, kann es möglich sein, dass durch die Mutation die modB7-2-Lokalisation in der Zelle verändert ist und das modB7-2ΔAC-Protein sich nicht mehr im Golgi-Apparat befindet. Um diese Frage zu beantworten, wurden DC2.4-Zellen mit den Mutanten MCMV-Δ6modB7-2 FL und MCMVΔ-6modB7-2ΔAC mit einer MOI = 2,5 infiziert und 24 h p. i. fixiert, für modB7-2HA und den Golgi-Marker GM130 gefärbt und durch konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie analysiert (Abbildung 3.19)

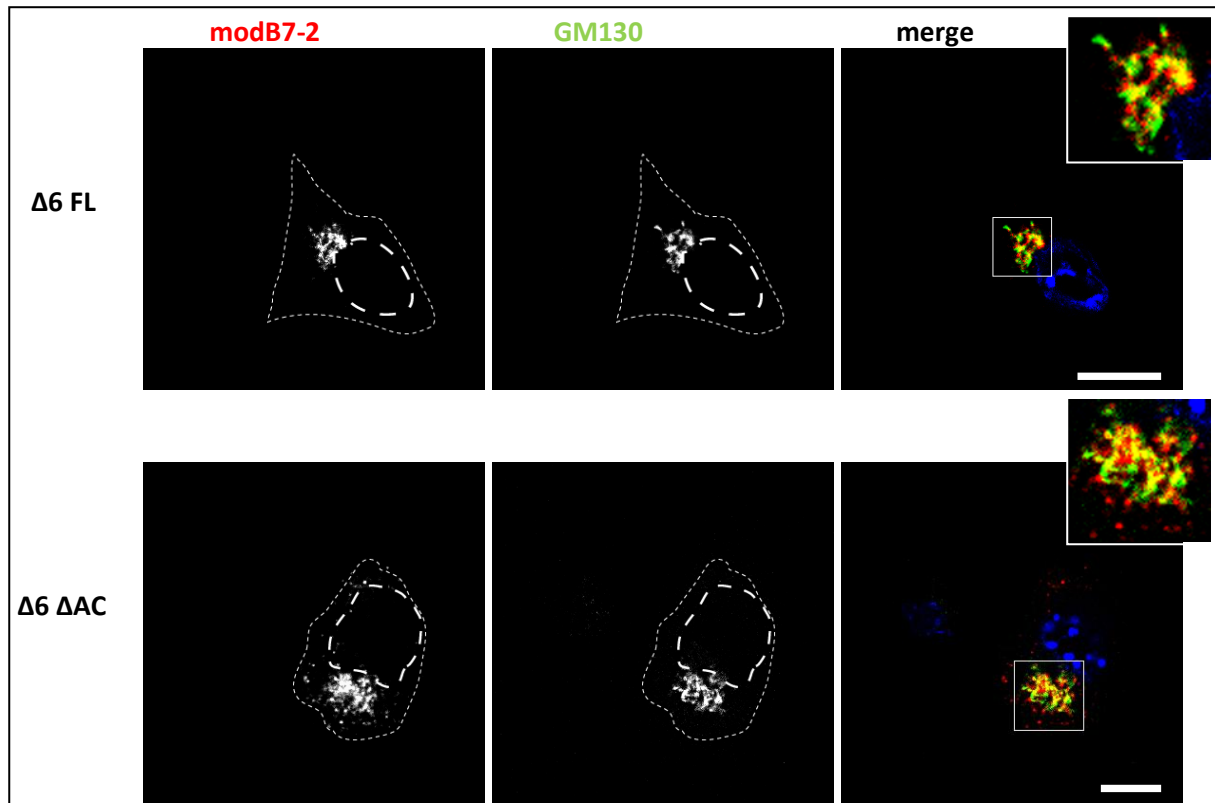


Abbildung 3.19 Lokalisation von modB7-2 nach Infektion von DC2.4-Zellen mit MCMV- $\Delta 6$ modB7-2 FL bzw. MCMV- $\Delta 6$ modB7-2- Δ AC

DC2.4-Zellen wurden mit den angegebenen MCMV-Mutanten infiziert und 24 h p. i. nach geerntet. GM130 und modB7-2HA wurden mit spezifischen Antikörpern detektiert. Die Dokumentation erfolgte durch Laser-Scanning-Mikroskopie. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μ m, Zellkörper und Zellkern sind durch gestrichelte Linien angedeutet. Die gezeigten Bilder sind repräsentativ für mindestens 3 Experimente und für mehr als 30 analysierte Zellen.

Bei Vergleich der Mikroskopbilder in Abbildung 3.19 ließ sich feststellen, dass sich modB7-2 nach Infektion mit der jeweiligen Mutante immer noch in einer Region neben dem Zellkern aufhielt. Sowohl die modB7-2 FL- als auch die modB7-2 Δ AC-Proteinvariante kolokalisierten zu einem Teil mit GM130; es war kein Unterschied in der Lokalisation der jeweiligen modB7-2-Proteinvariante nach Infektion mit beiden Virusmutanten festzustellen. Allerdings konnte man beobachten, dass die Kolokalisation von modB7-2 mit GM130 schwächer als nach Infektion mit MCMV- $\Delta 6$ modB7-2 FL bzw. MCMV- $\Delta 6$ modB7-2 Δ AC war. Dies deutet darauf hin, dass möglicherweise weitere virale Proteine in der Region m144-m157 an der modB7-2-Lokalisation beteiligt sind. Zusammenfassend konnte kein Einfluss des *Acidic Clusters* von modB7-2 auf seine Lokalisation und Funktion festgestellt werden.

3.9 OBERFLÄCHENEXPRESSION UND POSTTRANSLATIONALE MODIFIKATIONEN VON MODB7-2

Obwohl modB7-2 überwiegend im Golgi-Apparat zu finden war, schließt dies nicht aus, dass ein Teil der modB7-2-Moleküle an die Zelloberfläche transportiert wird, diese dort möglicherweise mit CD86 interagieren, um dann wieder in den Golgi relokalisiert zu werden. Durch FACS-/Immunfluoreszenz-Analysen konnte die Oberflächenexpression von modB7-2 nicht ermittelt werden, da das modB7-2-Antiserum wegen unspezifischer Reaktionen für solche Analysen nicht geeignet war und die Membrantopologie von modB7-2 nicht bekannt war. In ersten FACS-Experimenten zur Detektion einer modB7-2-Oberflächenexpression konnte in der Tat mit einem α -HA-Antikörper kein Signal an der Zelloberfläche detektiert werden. Um herauszufinden, ob sich modB7-2 an der Zelloberfläche befindet, wurde folgender Versuch durchgeführt: Infizierte DC2.4-Zellen (24 h p. i., MOI = 1) wurden geerntet und mit Pronase für 2 h bei 37 °C inkubiert. Dann wurden die Zellen lysiert und die Menge an modB7-2-Protein in den Lysaten durch Immunoblotting bestimmt. Bei Pronase handelt es sich um einen Enzym-Cocktail aus mindestens 10 proteolytischen Komponenten, darunter neutrale Protease, Chymotrypsin, Trypsin, Carboxypeptidase, Aminopeptidase sowie neutrale und alkalische Phosphatasen; Entsprechend wurde erwartet, dass bei Inkubation der Zellen mit Pronase weitestgehend der Großteil der Zelloberflächenproteine proteolytisch abgebaut war.

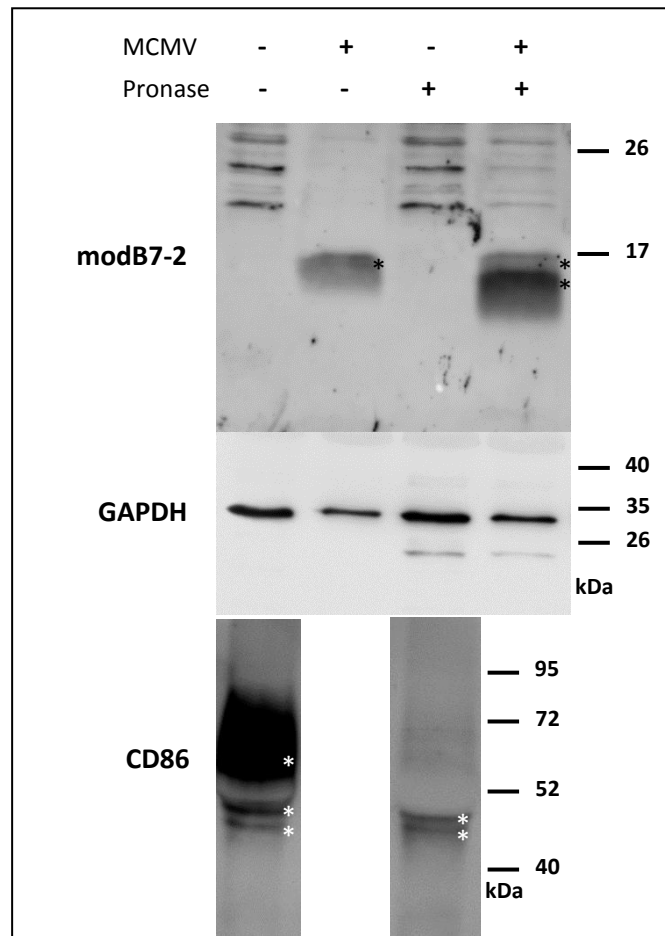


Abbildung 3.20 modB7-2 mit und ohne Pronase-Behandlung mock infizierter und MCMV-infizierter Zellen

DC2.4-Zellen wurden mock infiziert oder mit MCMV-WT infiziert (MOI = 1). 24 h nach Infektion wurden die Zellen für 1 h bei 37 °C mit und ohne Pronase (1,5 µg/µl) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert, und die modB7-2-, CD86- und GAPDH-Proteine in den Lysaten nachgewiesen. Schwarze Sternchen stellen modB7-2-spezifische Proteinbanden, weiße Sternchen stellen CD86-spezifische Proteinbanden dar.

Der Western Blot in Abbildung 3.20 zeigt, dass es nach Pronasebehandlung zu einem Shift der modB7-2-Bande kam: Es waren zwei modB7-2-spezifische Protein-Banden zu erkennen, wobei die untere, ca. 2 kDa kleinere Bande die stärker vertretene Bande darstellte. Interessanterweise war auch bei GAPDH nach Pronasebehandlung eine zweite schwache Bande mit kleinerer molekularer Masse zu erkennen. Dass die Pronasebehandlung effektiv Zelloberflächenproteine proteolytisch abbauen kann, zeigt der Nachweis der CD86-Proteine: Nach Pronase-Behandlung ist der Großteil der CD86-spezifischen Protein nicht mehr detektierbar, lediglich zwei schwache CD86-spezifische Proteinbanden sind noch zu sehen. Auf diese beiden schwachen CD86-spezifischen Proteinbanden wird später noch im Detail eingegangen, in diesem Experiment dient dieses Ergebnis lediglich der Überprüfung der Pronase-Aktivität

In Bezug auf diesen Effekt auf das modB7-2-Protein ist auszuführen, dass dieser nicht immer in dem vorgehend gezeigten Ausmaß zu beobachten war, manchmal war auch die untere Bande die schwächere. Allerdings trat nach Pronasebehandlung im Vergleich zur unbehandelten Probe immer eine modB7-2-Bande mit kleinerer molekularer Masse auf.

Die Pronasesensitivität spricht dafür, dass modB7-2 die Zelloberfläche erreicht. Jedoch entsprach der Shift in der molekularen Masse von modB7-2 von nur 1 kDa nicht der Erwartung (siehe Abbildung 3.21). modB7-2 ist ein putatives Transmembranprotein mit zwei Transmembrandomänen, wobei aufgrund von computergestützten Analysen davon ausgegangen wird, dass der extrazelluläre Teil von modB7-2 einen kleinen *loop* von nur 20 Aminosäuren ausmacht (Loewendorf, 2005).

Wird nur dieser extrazelluläre *loop* durch Pronase gespalten, sollten zwei Proteinfragmente entstehen, die theoretisch eine molekulare Masse von 9,9 kDa und 4,3 kDa aufweisen sollten. Da das modB7-2-spezifische Antiserum gegen den C-Terminus des modB7-2-Proteins gerichtet ist, würde hier nur das Proteinfragment vom Antiserum erkannt werden, das den vollständigen C-Terminus des modB7-2-Proteins trägt; somit sollte nur das 4,3 kDa-große Fragment erkannt werden. Wenn sich der *loop* von modB7-2 entgegen der Vorhersagen intrazellulär befände, sollte die Pronase-Behandlung in einem 7,5 kDa großen modB7-2-Fragment resultieren. Auch hier erkennt der modB7-2-spezifische Antikörper dieses Proteinfragment nicht mehr, da das Epitop degradiert werden würde.

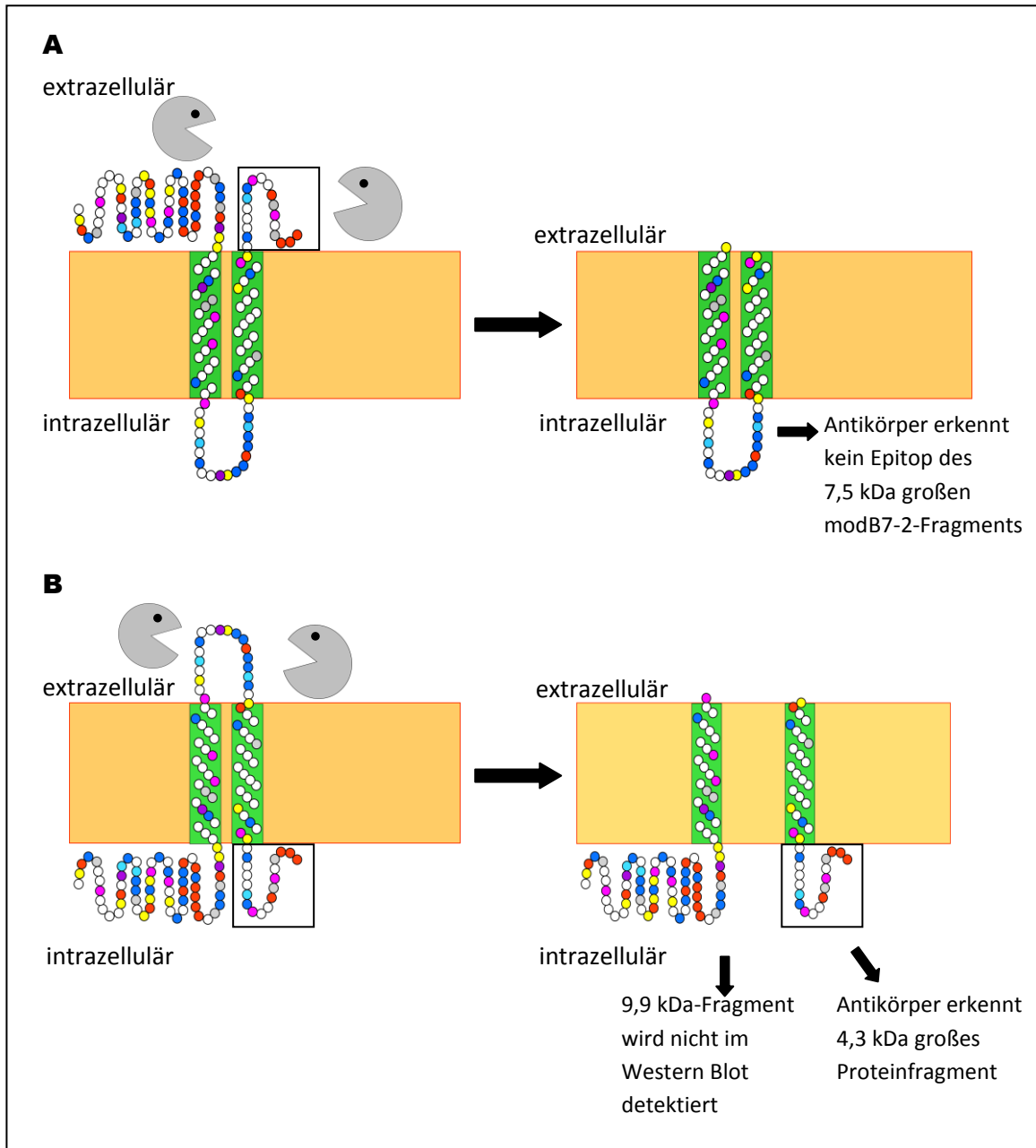


Abbildung 3.21 Schematische Darstellung der theoretisch zu erwartenden modB7-2-Proteinfragmente bei Pronase-Behandlung MCMV-infizierter DC2.4-Zellen bei beiden theoretisch möglichen Membrantopologien von modB7-2

Bei extrazellulärer Lokalisation des N- und C-Terminus des modB7-2-Proteins ist nach Pronasebehandlung ein 7,5 kDa großes Proteinfragment zu erwarten, das allerdings vom modB7-2-spezifischen Antiserum nicht erkannt wird (A). Bei intrazellulärer Lokalisation des N- und C-Terminus des modB7-2-Proteins ist nach Pronasebehandlung ein 9,9 kDa und ein 4,3 kDa großes Proteinfragment zu erwarten, wobei hier nur das kleinere Fragment vom modB7-2-spezifischen Antiserum nicht erkannt wird (B). Diejenigen Aminosäuren des modB7-2-Proteins, gegen die das modB7-2-spezifische Antiserum gerichtet ist, sind schwarz umrandet

Allerdings wäre denkbar, dass modB7-2 posttranslational modifiziert wird. Durch potentielle posttranslationale Modifizierung von modB7-2 würden nach Pronase-Behandlung modB7-2-Proteinfragmente entstehen, die eine andere molekulare Masse aufweisen als die angegebene theoretische Masse (Abbildung 3.21). Möglich wäre auch, dass durch die Phosphatase-Aktivität Phosphatreste entfernt werden und den beobachteten Shift bewirken.

Deshalb wurden *in silico*-Analysen durchgeführt, um Hinweise auf mögliche posttranslationale Modifikationen von modB7-2 zu erhalten. Glykosylierungsanalysen wurden mit dem NetNGlyc 1.0 Server (für N-Glykosylierungen, Abbildung 3.22 A) und dem NetOGlyc 3.1 Server (für O-Glykosylierungen, Abbildung 3.22 B) durchgeführt. Für alle Analysen der Aminosäuresequenz von modB7-2 wurde davon ausgegangen, dass die Translation am 3. ATG-Kodon der mRNA beginnt.

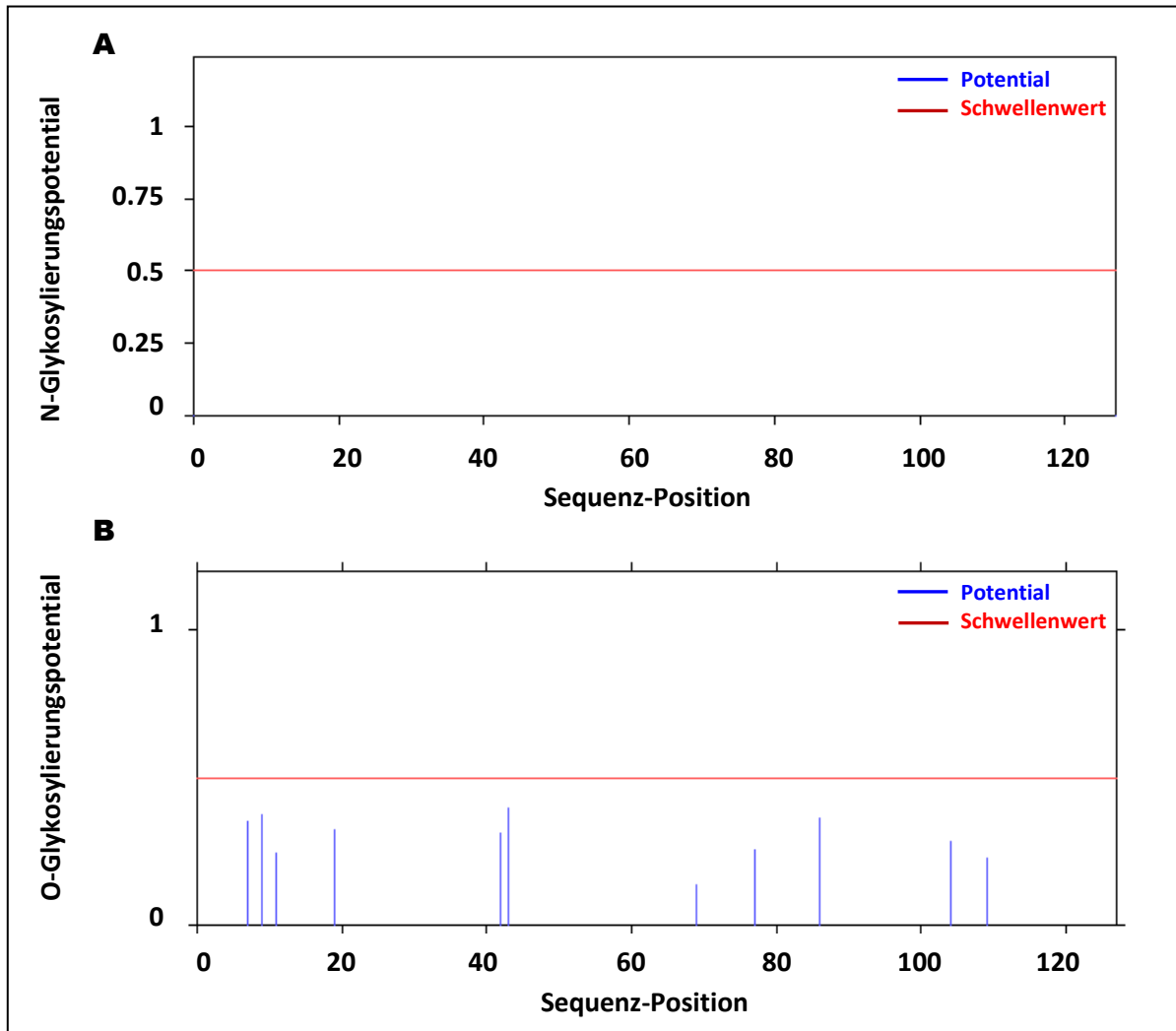


Abbildung 3.22 Vorhersage putativer N- und O-Glykosylierungsstellen von modB7-2

Die Vorhersage von N-Glykosylierungsstellen (A) wurde mit Hilfe des NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) durchgeführt und die von O-Glykosylierungsstellen (B) mit dem NetOGlyc 3.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>)

Wie Abbildung 3.22 zeigt, ist laut Computerberechnungen die Wahrscheinlichkeit für das Vorhandensein von N- und von O-Glykosylierungsstellen von modB7-2 sehr gering. *In silico*-Analysen für das Vorhandensein möglicher Phosphorylierungsstellen von modB7-2 zeigt Abbildung 3.23 A, hier sind vier mögliche Phosphorylierungsstellen denkbar. Die drei putativen Serin- und eine Threoninphosphorylierungsstellen sind in der modB7-2-Sequenz in Abbildung 3.23 B gezeigt.

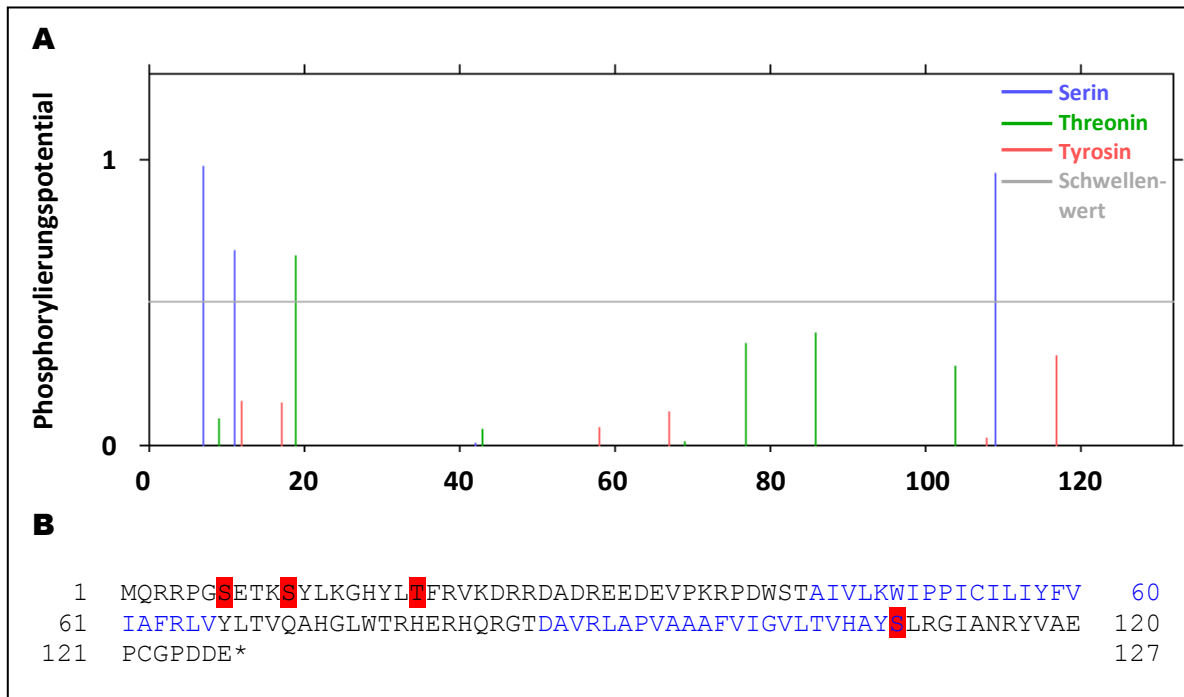


Abbildung 3.23 Vorhersage putativer Phosphorylierungsstellen von modB7-2

Die Vorhersage von Phosphorylierungsstellen wurde mit Hilfe von NetPhos 2.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) durchgeführt (A). (B) zeigt die möglichen Phosphorylierungsstellen in der modB7-2-Sequenz, die putativen Transmembrandomänen sind blau dargestellt.

Diese *in silico*-Analysen sollten auch *in vitro* auf ihre Richtigkeit hin überprüft werden. Dazu wurden DC2.4-Zellen für 24 h mit MCMV-WT infiziert (MOI = 1) und anschließend lysiert. Diese Lysate wurden - wie in Material und Methoden beschrieben - mit Endoglykosidase H (Endo H) oder Peptid:N-Glycosidase F (PNGase F) oder *Calf intestine Phosphatase* (CIP) behandelt. Zur Kontrolle wurden die Lysate im jeweiligen Puffer ohne Enzym inkubiert, um festzustellen, ob modB7-2 stabil ist oder Degradationsprodukte unabhängig vom jeweils eingesetzten Enzym entstehen. Endo H spaltet Asparagin-verknüpfte Mannose-reiche Oligosaccharide, die im endoplasmatischen Retikulum angefügt werden. PNGase F ist eine Amidase, die zwischen Glucose-N-acetyl-Resten und Asparagin in Mannose-reichen, komplexen N-glykosylierten Proteinen spaltet. Nach der Enzymbehandlung wurde modB7-2 im Western Blot analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.24 dargestellt.

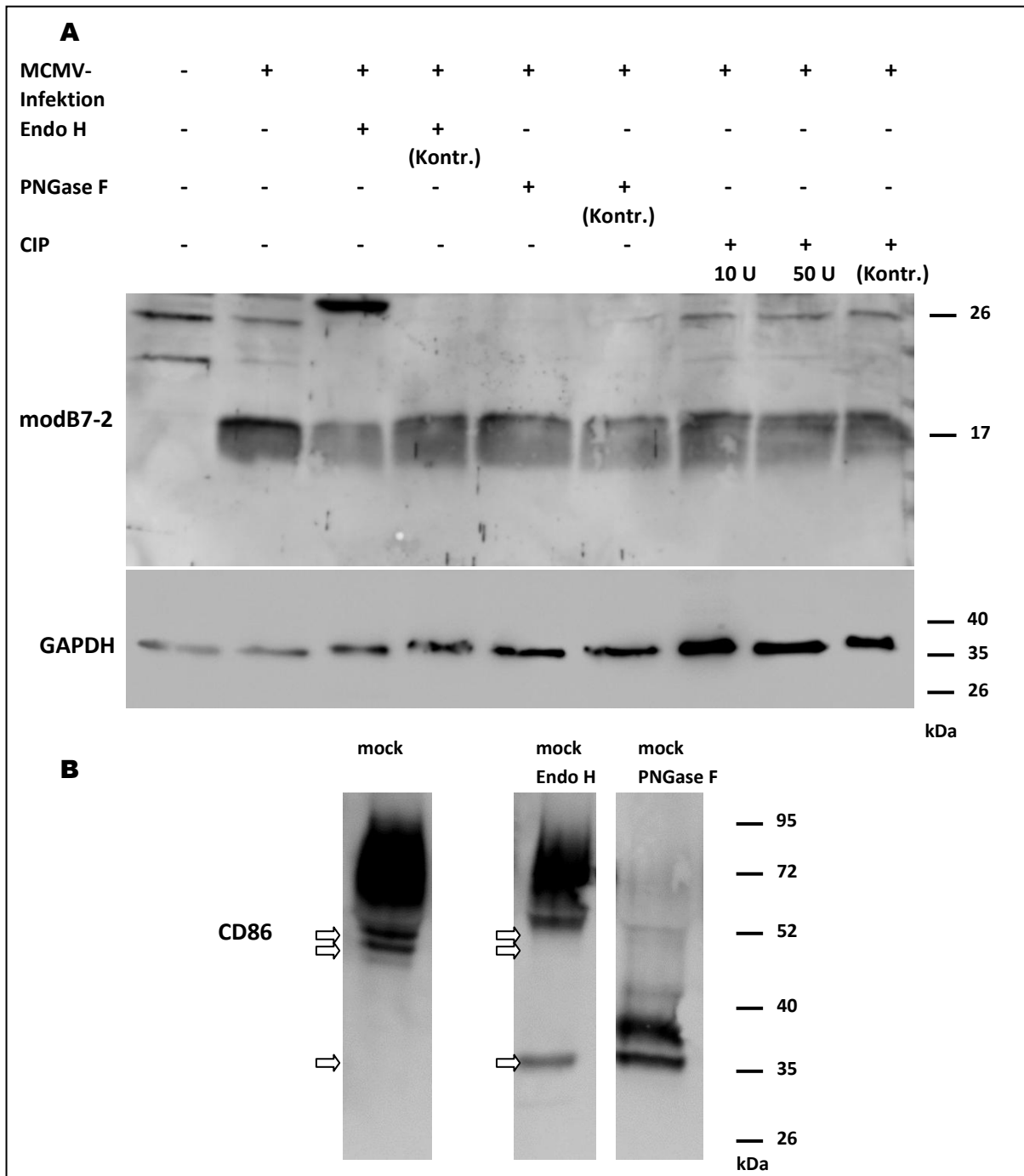


Abbildung 3.24 Untersuchung auf mögliche Glykosylierung und Phosphorylierung von modB7-2

DC2.4-Zellen wurden mock infiziert oder mit MCMV-WT infiziert und 24 h p. i. geerntet. Nach Lyse wurden die Zellextrakte mit Endo H, PNGase F, und CIP gemäß Material und Methoden behandelt oder zur Kontrolle ohne Enzym inkubiert. Anschließend wurden die Extrakte für den Western Blot eingesetzt und für modB7-2 (A) oder CD86 (B) gefärbt. Der CD86-Blot dient als Kontrolle, dass die Enzyme Endo H und PNGase F aktiv waren. Pfeile markieren CD86-Banden, welche durch Endo H-Behandlung verändert werden bzw. entstehen.

Der Westernblot in Abbildung 3.24 A zeigt, dass weder der Einsatz von Endo H noch PNGase F oder CIP das modB7-2-Signal im Western Blot veränderte. Unspezifische Proteindegradation trat auch nicht auf. Dass sowohl die Endo H- als auch der PNGase F-Behandlung prinzipiell funktionierten, konnte durch Inkubation von Lysaten von nicht-infizierten DC2.4-Zellen mit Endo H bzw. PNGaseF und Immunoblotting mit einem CD86-Antikörper gezeigt werden (Abbildung 3.24 B). Nach Endo H-

Behandlung waren die beiden CD86-Banden mit der geringsten molekulare Masse verschwunden, und es entstand eine kleinere Bande von ca. 35 kDa (Pfeile). Nach PNGase F-Behandlung verschwanden die CD86-Banden mit großer molekularer Masse und es entstanden zwei Banden von ca. 35 und 38 kDa. Insgesamt zeigten die Ergebnisse, dass modB7-2 weder glykosyliert noch phosphoryliert ist.

3.10 EINFLUSS VON MODB7-2 AUF DIE ZUM ZEITPUNKT DER INFESTION AUF DER ZELLOBERFLÄCHE VORHANDENEN CD86-MOLEKÜLE

Auf Grundlage der bisherigen Ergebnisse, nach denen das modB7-2-Protein zwar hauptsächlich im Golgi-Apparat lokalisiert ist, aber wahrscheinlich auch die Zelloberfläche erreichen kann, bestand die Möglichkeit, dass das modB7-2-Protein schon im Golgi-Apparat mit CD86 direkt oder indirekt interagiert oder aber, dass das modB7-2-Protein die CD86-Moleküle erst nach deren Erreichen der Zelloberfläche beeinflusst. Im ersten Fall würde CD86 vielleicht gar nicht erst an der Zelloberfläche ankommen und dadurch die Reduktion der CD86-Expression auf der Zelloberfläche bewirken. In diesem Szenario wären die zum Zeitpunkt der Infektion auf der Zelloberfläche vorhandenen CD86-Moleküle von modB7-2 nicht direkt beeinflusst und würden möglicherweise aufgrund des natürlichen *Turnovers* (Recycling) internalisiert. Denkbar ist auch, dass modB7-2 an die Zelloberfläche transportiert wird und dort schon vorhandene CD86-Moleküle zur Internalisation zwingt. Natürlich können alle Mechanismen parallel wirksam sein.

Um einen Einblick zu bekommen, über welche Mechanismen die CD86-Internalisation funktioniert, wurde zunächst ein „Aufnahme-Assay“ durchgeführt, der Klarheit darüber geben sollte, ob die zum Zeitpunkt der Infektion auf der Zelloberfläche vorhandenen CD86-Moleküle von der modB7-2-Expression beeinflusst sind. Hier wurden zunächst DC2.4-Zellen infiziert und nach 30 min die sich an der Zelloberfläche von DC2.4-Zellen befindlichen CD86-Moleküle mit spezifischen Antikörpern markiert. 16 h p. i. wurden dann die DC2.4-Zellen in der Durchflusszytometrie analysiert (siehe Material und Methoden, Abschnitt 2.6.2). Das Prinzip des Aufnahme-Assays ist schematisch in Abbildung 3.25 dargestellt.

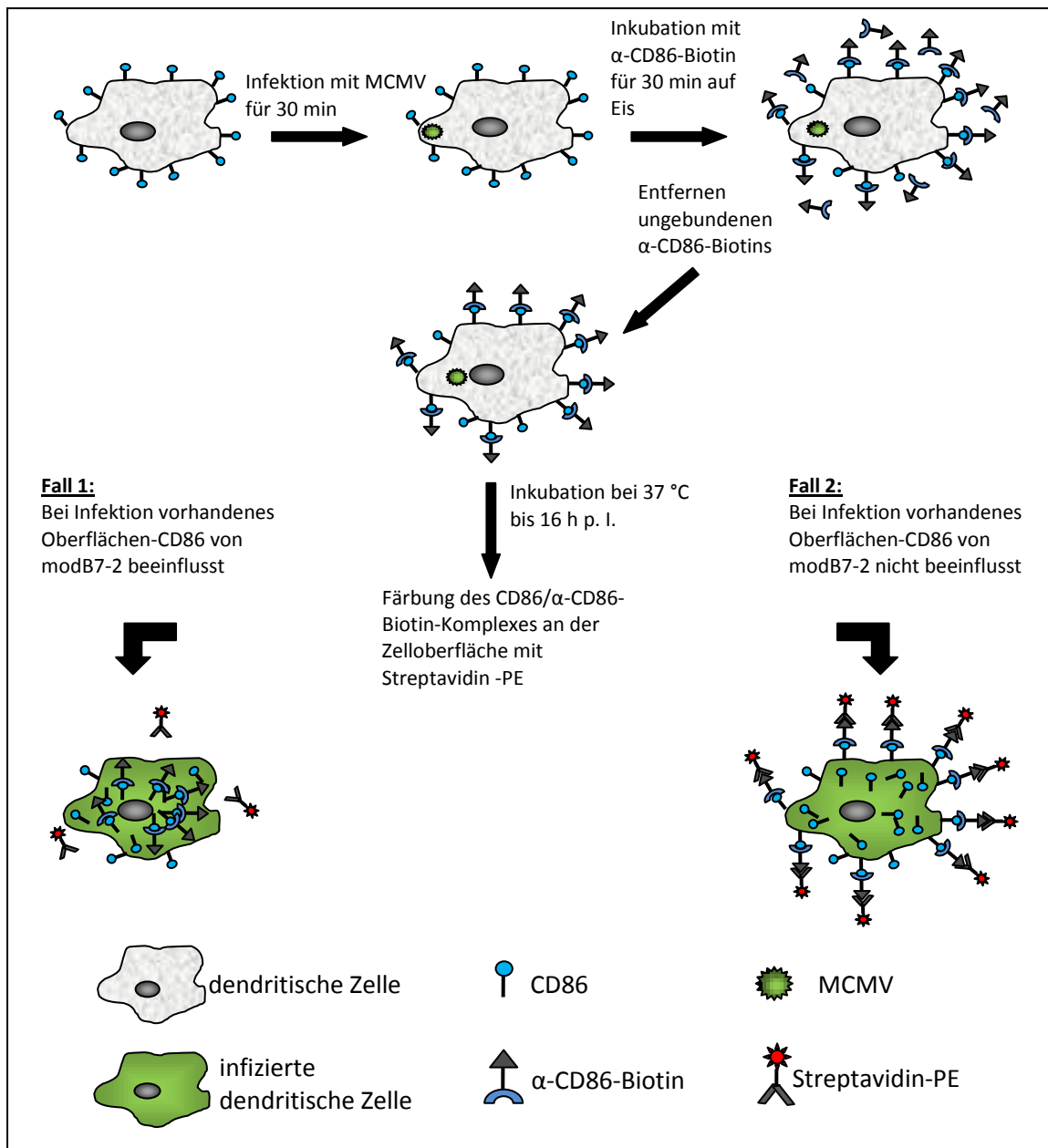


Abbildung 3.25 Versuchsdurchführung zur Untersuchung des Einflusses von modB7-2 auf die zum Zeitpunkt der Infektion auf der Zelloberfläche vorhandenen CD86-Moleküle ("Aufnahme"-Färbung)

DC2.4-Zellen werden mit MCMV mit einer MOI = 1 für 30 min infiziert. Nach anschließendem Waschen werden die Zellen für 30 min auf Eis mit α-CD86-Biotin-Antikörpern inkubiert. Nach erneutem Waschen (Entfernen ungebundenen Antikörpers) werden die Zellen bei 37 °C inkubiert. 16 h p. i. werden die Zellen mit Streptavidin und 7AAD gefärbt. Ist das zum Infektionszeitpunkt vorhandene Oberflächen-CD86 von modB7-2 beeinflusst, erhält man im FACS kein PE-Signal, hat modB7-2 jedoch keinen Einfluss auf das zum Infektionszeitpunkt vorhandene Oberflächen-CD86, erhält man ein PE-Signal.

Die Ergebnisse dieses Aufnahme-Assays sind in Abbildung 3.26 veranschaulicht. Die oberen Histogramme zeigen die FACS-Analyse, wie sie bereits zuvor durchgeführt wurde: DC2.4-Zellen wurden mock infiziert oder mit MCMV-WT, MCMV-Δ6 oder MCMV-Δ6 modB7-2 FL infiziert. 16 h nach Infektion wurde die Zelloberflächenexpression von CD86 analysiert. Hier konnte das schon zuvor gezeigte Expressionsmuster von CD86 auf der Zelloberfläche (vgl. z. B. Abbildung 3.5)

detektiert werden: Bei Infektion von DC2.4-Zellen mit dem MCMV-WT-Virus wurde die CD86-Expression auf der Zelloberfläche stark vermindert, während in MCMV- $\Delta 6$ -infizierten Zellen etwas mehr CD86-Moleküle als in mock infizierten Zellen auf der Oberfläche exprimiert waren. In MCMV- $\Delta 6$ modB7-2 FL-infizierten Zellen war eine etwas schwächere CD86-Internalisation als bei MCMV-WT-Infektion feststellbar.

Die mittleren Histogramme stellen die Ergebnisse des „Aufnahme“-Assays dar. Bei Vergleich von beiden Messungen für die nicht-infizierten Proben war die CD86-Oberflächenexpression bei der „Aufnahme“-Färbung leicht erhöht, während bei den MCMV-WT-infizierten Zellen kein Unterschied zwischen den beiden Messungen zu sehen war. Daraus lässt sich schließen, dass die modB7-2-Expression auch Einfluss auf die zum Infektionszeitpunkt auf der Zelloberfläche vorhandenen CD86-Moleküle hat. Allerdings waren auch bei MCMV- $\Delta 6$ -infizierten Zellen mit der „Aufnahme“-Färbung weniger CD86 auf der Zelloberfläche detektierbar als mit der Oberflächen-Färbung und zwar weniger als bei den mock infizierten Proben unabhängig davon, welche Färbung verwendet wurde. In MCMV- $\Delta 6$ modB7-2 FL-infizierten DC2.4-Zellen war die CD86-Oberflächenexpression gemessen nach „Aufnahme“-Färbung ähnlich derjenigen, die nach „normaler“ Oberflächen-Färbung detektiert wurde.

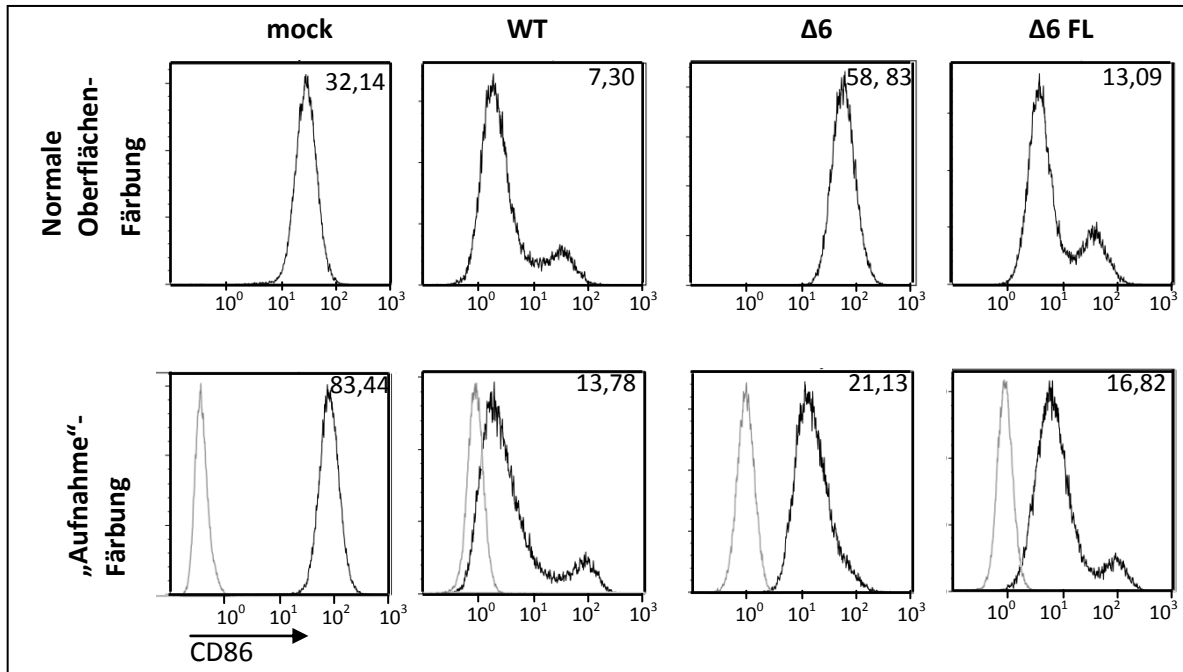


Abbildung 3.26 „Aufnahme“-Assay zur Bestimmung des Einflusses der modB7-2-Expression auf die zum Infektionszeitpunkt auf der Zelloberfläche vorhandenen CD86-Moleküle infizierter DC2.4-Zellen

DC2.4-Zellen wurden entweder mock infiziert oder mit den Virusmutanten MCMV-WT, MCMV- $\Delta 6$ oder MCMV- $\Delta 6$ modB7-2 FL infiziert und wie zuvor mit der Durchflusszytometrie analysiert (normale Färbung) oder für den „Aufnahme“-Assay wie in Material und Methoden, Abschnitt 2.6.2. beschrieben, gefärbt („Aufnahme“-Färbung). In beiden Versuchsanordnungen wurden die Zellen 16 h p. i. geerntet. In grau ist jeweils die Färbung mit einer unspezifischen Isotypkontrolle dargestellt, während schwarze Histogramme die CD86-Oberflächenexpression zeigten. Die Zahlen geben die mittlere Fluoreszenzintensität der CD86-Messung an

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die bei Infektion auf der Zelloberfläche vorhandenen CD86-Moleküle von modB7-2 beeinflusst wurden. Allerdings wurde die CD86-Oberflächenexpression auch schon durch Infektion an sich - und somit durch modB7-2-unabhängige Effekte - vermindert (siehe die Messungen für MCMV- $\Delta 6$ -infizierte Zellen, Abbildung 3.26), jedoch war die Reduktion der CD86-Expression auf der Zelloberfläche stärker nach Infektion mit Virusmutanten, welche modB7-2 exprimieren.

3.11 VERGLEICH DER GESAMT-CD86-PROTEINMENGE INFIZIERTER VERSUS NICHT-INFIZIERTER DC2.4-ZELLEN

Im Folgenden wurde untersucht, was mit CD86 passiert, nachdem es von der Zelloberfläche internalisiert wurde. Primär vorstellbar sind zwei Alternativen: Einerseits könnte CD86 intrazellulär zurückgehalten werden, andererseits wäre auch eine lysosomale/proteasomale Degradation denkbar. Eine proteasomale Degradation ist für CD86 als Transmembranprotein eher unwahrscheinlich, wenn man bedenkt, dass auch CD86-Moleküle von modB7-2 beeinflusst werden,

die sich an der Zelloberfläche aufhalten. Für das KSHV-Protein K5 ist bekannt, dass nach Elektroporation/Transduktion von BJAB-Zellen mit K5-kodierenden Vektoren CD86 von der Zelloberfläche internalisiert und abgebaut wird (Ishido et al., 2000; Coscoy und Ganem, 2001; Means et al., 2007).

Für humane Monozyten wurde ein intrazelluläres Speicher-Organell für CD86 beschrieben, das nicht mit dem Golgi-Apparat übereinstimmt. Von diesem Organell kann CD86 anterograd zur Zelloberfläche transportiert werden (Smyth et al., 1998). Smyth und Kollegen haben auch für von PBMC-abgeleiteten humane DCs ein solches Reservoir beschrieben, welches sich vom Golgi-Apparat, dem Lysosom und anderen endosomalen Strukturen unterscheidet (Smyth et al., 2004). Es erscheint durchaus möglich, dass CD86 modB7-2-abhängig von der Zelloberfläche internalisiert wird und dann in einem solchen Reservoir intrazellulär festgehalten wird.

Für das HIV-1-Protein Nef konnte gezeigt werden, dass CD86 Nef-abhängig von der Zelloberfläche internalisiert und anschließend in den Golgi-Apparat rekrutiert wird (Chaudhry et al., 2005; Chaudhry et al., 2008).

Um den Verbleib von CD86 nach MCMV-Infektion zu klären, wurden zunächst infizierte DC2.4-Zellen mit der Immunfluoreszenz-Mikroskopie untersucht. Dazu wurden DC2.4-Zellen mock infiziert oder mit MCMV, welches eine C-terminale Fusion von modB7-2 mit dem HA-Epitop exprimiert (MCMV-modB7-2HA). 24 h p. i. wurden die Zellen für modB7-2HA und CD86 gefärbt und mit der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

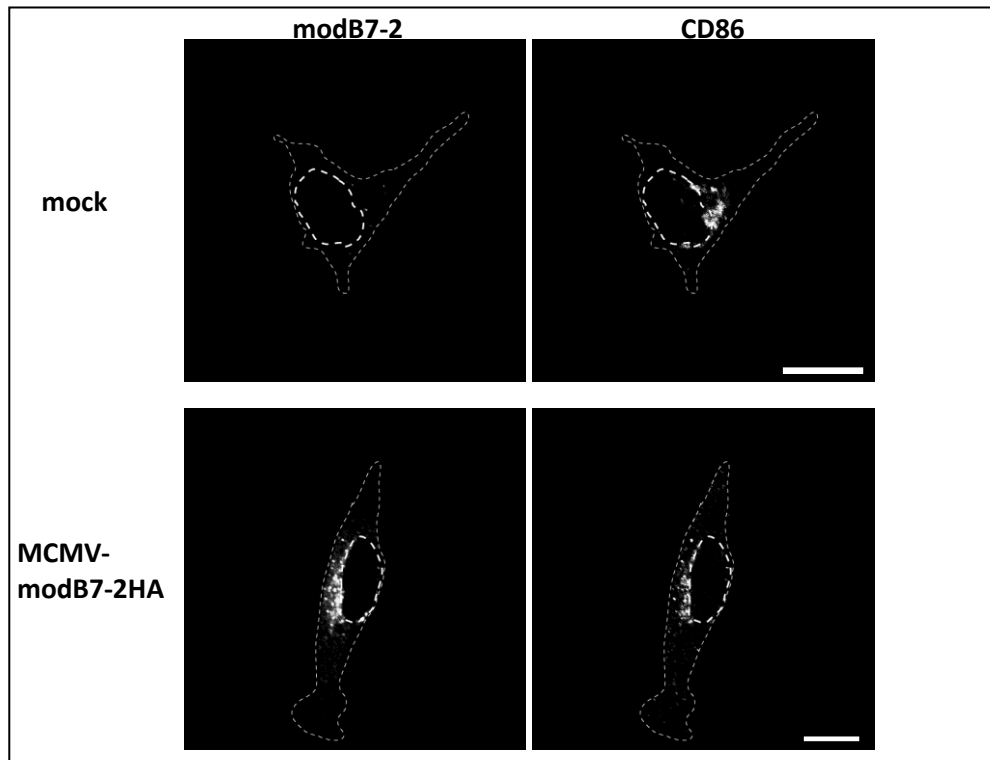


Abbildung 3.27 CD86-Expression in mock infizierten und mit MCMV-WT-infizierten DC2.4-Zellen

DC2.4-Zellen wurden mock infiziert oder mit der MCMV-modB7-2HA infiziert. 24 h p. i. wurden die Zellen mit spezifischen Antikörpern für modB7-2HA und CD86 gefärbt. Der Zellkörper ist mit einer dünn-gestrichelten Linie, der Zellkern mit einer dick-gestrichelten Linie umrandet. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μm . Die gezeigten Bilder sind repräsentativ für mindestens 3 Experimente und für mehr als 30 analysierte Zellen.

Die Daten der Immunfluoreszenz-Mikroskopie (Abbildung 3.27) zeigten deutlich, dass in MCMV-modB7-2HA-infizierten DC2.4-Zellen CD86-Protein intrazellulär zu erkennen war. Diese Methode lässt keine quantitative Aussage zu, es lässt sich nur feststellen, ob CD86 intrazellulär vorhanden ist. Die intrazellulär vorhandene Menge an CD86 in nicht-infizierten und infizierten Zellen lässt sich mit dieser Technik nicht vergleichen. Auch wenn man die Ergebnisse des Western Blots in Abbildung 3.5 B mit einbezieht, mit dem eine große Reduktion der CD86-Expression in infizierten Zellen festgestellt wurde, lässt sich noch keine Aussage über den Verbleib von CD86 treffen. Bei dem in Abbildung 3.5 B gezeigten Western Blot wurden DC2.4-Zellen zwar mit einer MOI = 1 infiziert, die Infektionsrate bei DC2.4-Zellen liegt allerdings nur bei 30-45 %. Es erscheint also möglich, dass das verbleibende CD86-Signal im Western Blot von nicht-infizierten Zellen stammt. Um dies zu überprüfen, wurden DC2.4-Zellen mit dem GFP-exprimierenden MCMV-WT-Virus infiziert und 24 h p. i. mittels der GFP-Expression sortiert. Dann wurde eine gleiche Anzahl infizierter und nicht-infizierter Zellen im Western Blot auf die CD86-Expression hin untersucht (Abbildung 3.28).

Die Ergebnisse zeigten, dass nach Infektion kaum CD86-Protein in den DC2.4-Zellen zu detektieren war, lediglich zwei schwache Banden bei 50/48 kDa und eine bei ca. 65 kDa waren zu erkennen. Daraus lässt sich schließen, dass CD86 nach Infektion von DC2.4-Zellen degradiert wird.

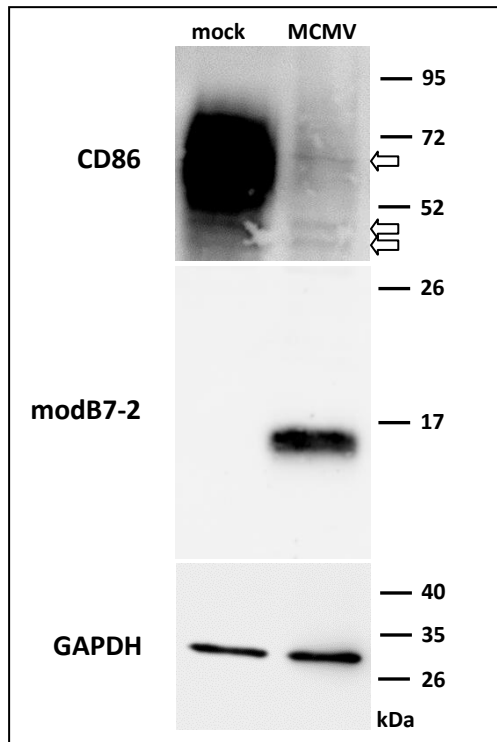


Abbildung 3.28 Detektion der Gesamt-CD86-Expression in MCMV-infizierten DC2.4-Zellen nach Zellsortierung

DC2.4-Zellen wurden mock infiziert oder mit MCMV-GFP infiziert. 24 h p. i. wurden die infizierten Zellen anhand der GFP-Expression sortiert und gleiche Zellzahlen eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit α -CD86- und α -GAPDH-Antikörpern sowie dem α -modB7-2- spezifischen Serum.

3.12 VERGLEICH DER GESAMT-CD86-MENGE MIT DER INTRAZELLULÄREN CD86-MENGE

Den Ergebnissen des Western Blots mit sortierten Zellen zufolge wird CD86 nach Internalisation abgebaut, während in der Immunfluoreszenz intrazellulär noch ein CD86-Signal beobachtet werden konnte. Diesem Unterschied wurde mit folgendem Experiment nachgegangen, um das Schicksal von CD86 weiter zu erklären: Wie schon in Kapitel 3.9 beschrieben, ist Pronase ein Enzym-Cocktail, mit dem es möglich ist, Zelloberflächenproteine abzubauen, während intrazelluläre Moleküle intakt bleiben. Mit Hilfe dieses Enzymcocktails wurde nun untersucht, ob CD86 nach der Internalisation in MCMV-infizierten DC2.4-Zellen degradiert wird. Im Falle einer Degradation von CD86 bei Infektion von DC2.4-Zellen mit MCMV-WT sollte CD86 sowohl mit als auch ohne Pronase-Behandlung höchstens schwach im Western Blot nachgewiesen werden können. Bei einer intrazellulären CD86-Speicherung sollte sich dagegen nach Pronase-Behandlung die intrazellulär vorhandene CD86-Proteinexpression quantitativ deutlich von der der mock infizierten Probe unterscheiden. Der Versuchsaufbau zu diesem Experiment ist Abbildung 3.29 schematisch dargestellt.

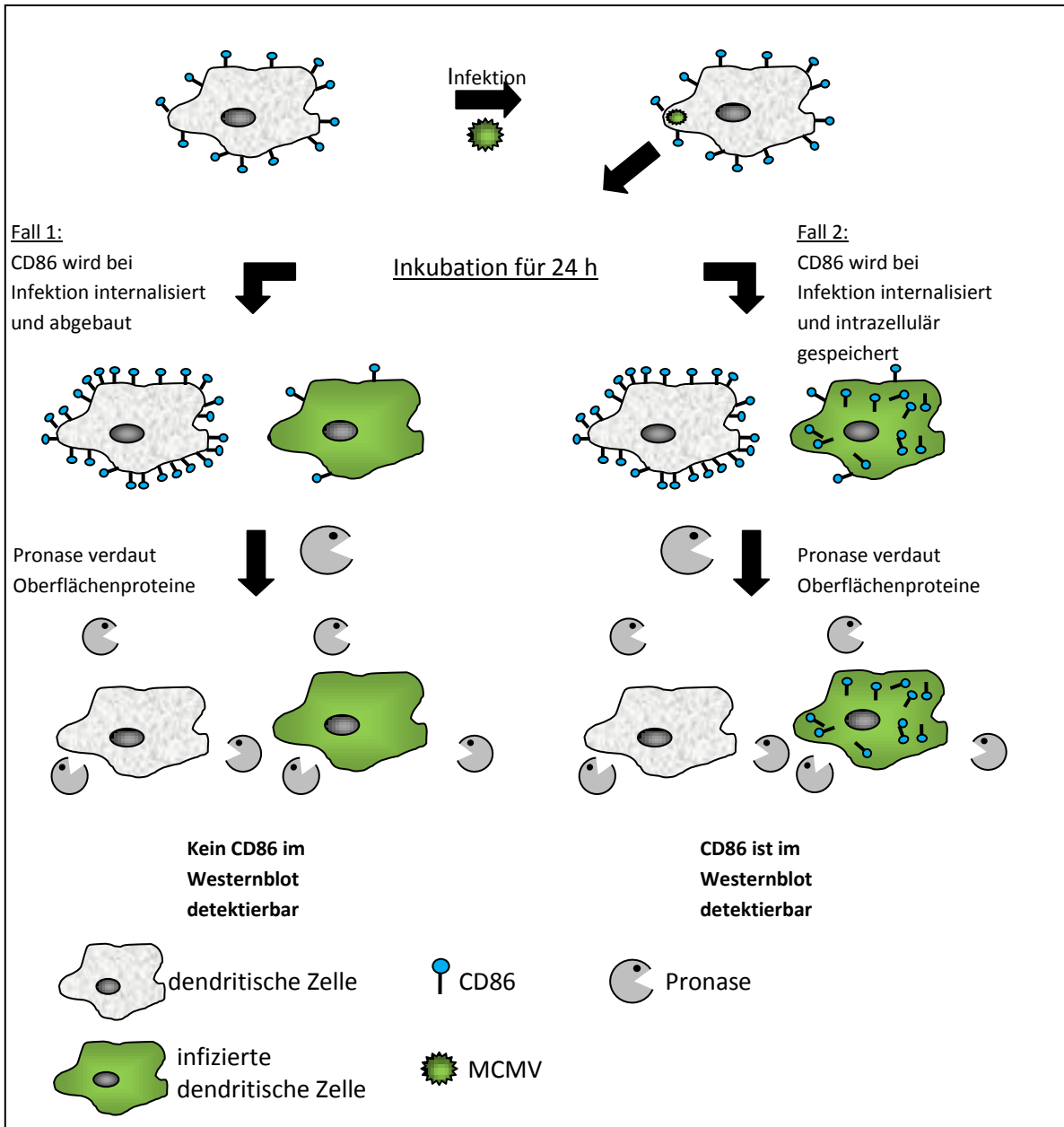


Abbildung 3.29 Schematische Darstellung des Experimentes zur Aufklärung des Schicksals von CD86 nach MCMV-WT-Infektion von DC2.4-Zellen mit Pronase

DC2.4-Zellen werden mit MCMV-WT infiziert und 24 h p. i. geerntet. Die Zellen werden anschließend 1 h mit Pronase bei 37 °C inkubiert, um Zelloberflächenproteine abzubauen. Wird CD86 bei MCMV-Infektion von DC2.4-Zellen degradiert, finden sich nach Pronaseverdau weder intra- noch extrazellulär CD86 Proteine, sodass im Western Blot dieser Zelllysate kein CD86-Protein detektierbar ist. Wird CD86 allerdings nach MCMV-Infektion von DC2.4-Zellen internalisiert und intrazellulär gespeichert, kann das CD86-Protein auch nach Pronase-Behandlung im Western Blot detektiert werden

Das Ergebnis des Pronase-Experimentes ist in Abbildung 3.30 A veranschaulicht. Ohne Pronase-Behandlung zeigte sich das bereits bekannte Ergebnis: Die MCMV-WT-Infektion führte zu einer starken Verringerung der CD86-Expression. Der Western Blot zeigte nach Pronase-Behandlung die fast vollständige Degradation der CD86-spezifischen Proteinbanden zwischen 55 und 90 kDa, übrig blieben erneut nur zwei schwache CD86-spezifische Banden bei 48/50 kDa. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass CD86 nach Internalisation intrazellulär gespeichert wird und es wurde geschlossen, dass CD86 nach Infektion von DC2.4-Zellen degradiert wird.

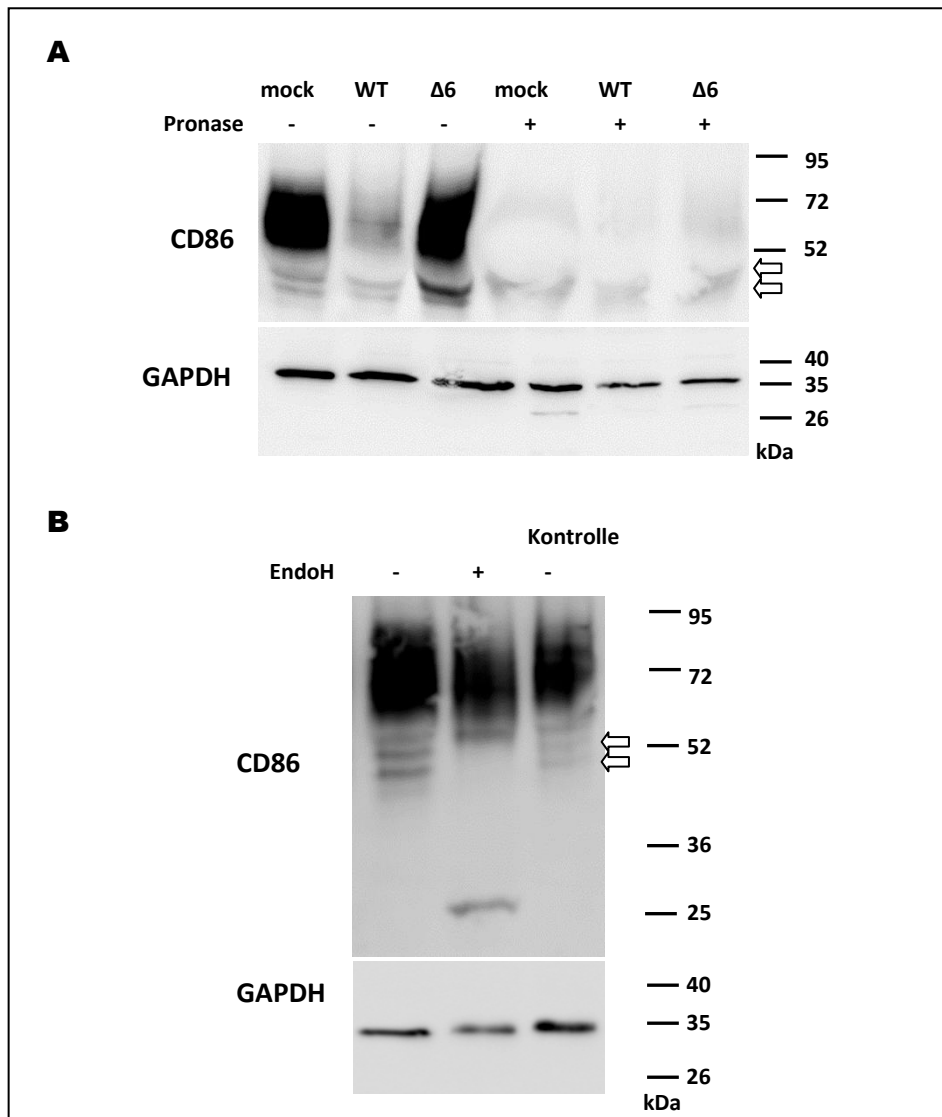


Abbildung 3.30 Pronase- (A) und Endo H-Behandlung (B) von mock infizierten oder mit den verschiedenen Virusmutanten infizierten DC2.4-Zellen

(A) DC2.4-Zellen wurden mock infiziert oder mit MCMV-WT bzw. MCMV-Δ6 infiziert. 24 h p. i. wurden die Zellen geerntet, mit Pronase behandelt, lysiert und anschließend im Western Blot analysiert. Der schwarze Rahmen markiert die modB7-2-spezifischen Proteinbanden. (B) Proteinextrakte aus nicht-infizierten DC2.4-Zellen wurden mit Endo-Glykosidase H behandelt und anschließend im Western Blot untersucht. Als Kontrolle diente Proteinlysate von nicht-infizierten DC2.4-Zellen, welche nur mit Endo H-Puffer ohne Endo H-Enzym inkubiert wurde. GAPDH diente jeweils als Ladekontrolle.

Da auffallender Weise in Lysaten von MCMV-infizierten DC2.4-Zellen - sowohl mit als auch ohne Pronase-Behandlung - immer die beiden CD86-spezifischen Proteinbanden bei 48/50 kDa detektierbar waren, und auch noch immer die Frage unbeantwortet blieb, warum CD86 in der Immunfluoreszenz in infizierten Zellen sichtbar war, wurde die Herkunft dieser beiden CD86-Banden näher untersucht. Dazu wurde eine Endoglykosidase H-Behandlung durchgeführt. Dieses Enzym spaltet Asparagin-verknüpfte Mannose-reiche Oligosaccharide, allerdings nur, wenn das Protein noch nicht in Berührung mit den im Golgi-Apparat lokalisierten modifizierenden Enzymen gekommen ist. Durchläuft das Protein den Golgi-Apparat, werden diese Zuckerreste so modifiziert, dass Endo H diese nicht mehr spalten kann. Somit sind ER-residente, glykosylierte Proteine Endo H sensitiv,

während Glykoproteine, die den sekretorischen Weg über den Golgi-Apparat hinaus passiert haben, nicht mehr Endo H sensitiv sind.

Beim Vergleich der Proben in Abbildung 3.30 B ist zu sehen, dass die beiden Banden bei 48 und 50 kDa tatsächlich Endo H-sensitive Populationen von CD86 repräsentieren und es sich damit um ER-residente Proteinspezies handelt, während die breite CD86-Proteinbande zwischen 55 und 90 kDa nicht von Endo H beeinflusste CD86-Populationen darstellen. Die Kontrolle zeigt, dass keine unspezifische Degradation von CD86 vorlag. Somit wurde gezeigt, dass die beiden verbleibenden CD86-spezifischen Banden bei 48 und 50 kDa im ER lokalisierte CD86-Moleküle verkörperten.

3.13 INKUBATION INFIZIERTER DC2.4-ZELLEN MIT PROTEASOM- UND LYSOSOM-INHIBITOREN VERHINDERN DIE CD86-DEGRADATION

Um festzustellen, wie der Abbau von CD86 nach Infektion von DC2.4-Zellen mit MCMV erfolgt, wurde im Folgenden untersucht, ob die CD86-Degradation durch Einsatz von Inhibitoren der lysosomalen (durch Leupeptin) oder der proteasomalen (durch MG-132) Proteasen blockiert werden kann. Dazu wurden DC2.4-Zellen für 24 h mit MCMV-WT infiziert, wobei 5 h vor Zellernte Leupeptin (175 μ M) oder MG-132 (5 μ M) zugegeben wurde (Abbildung 3.31). In einem zweiten Versuch wurden DC2.4-Zellen mit MCMV-WT infiziert und von Anfang an mit Leupeptin oder MG132 inkubiert. 9 h nach Infektion wurden die Zellen geerntet und die CD86-Expression im Western Blot untersucht (Abbildung 3.32).

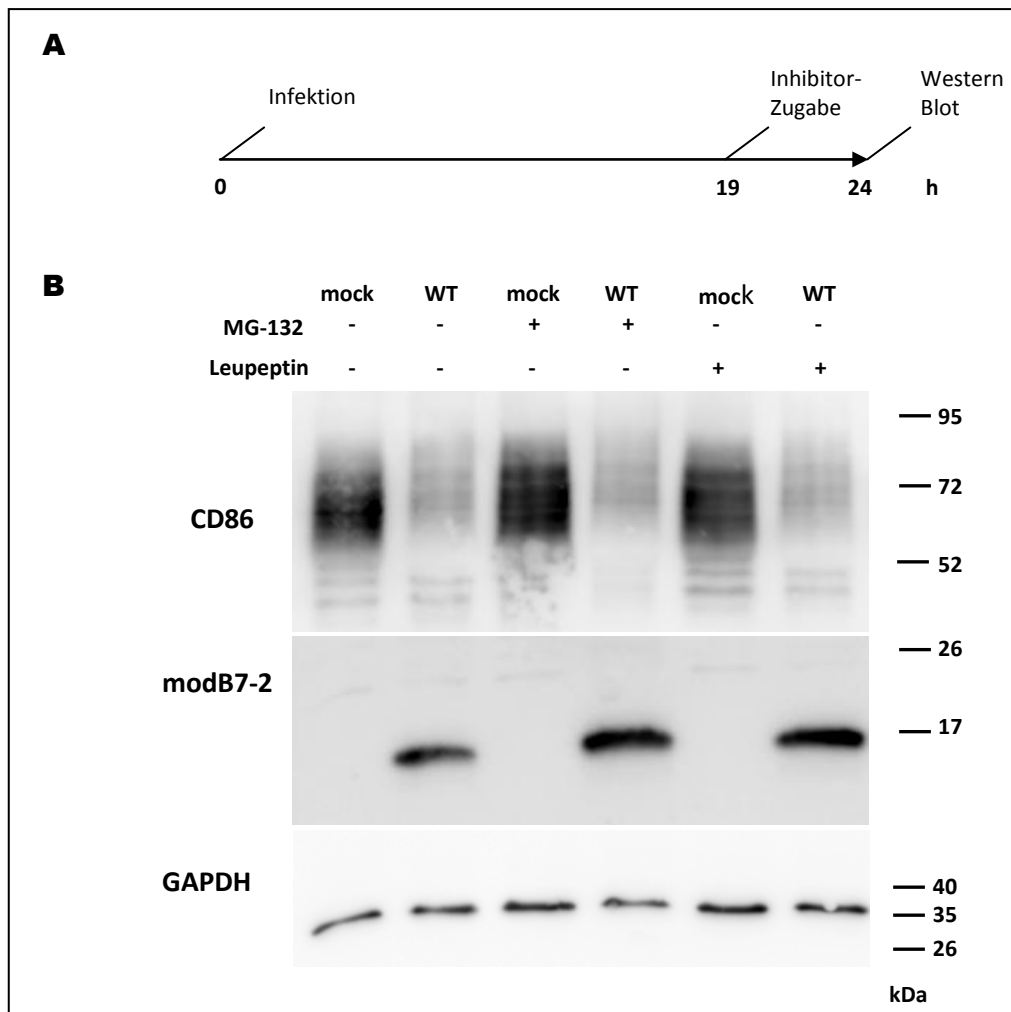


Abbildung 3.31 MG-132- und Leupeptin-Zugabe 19 h p. i. verhindern nicht die Degradation von CD86 in infizierten DC2.4-Zellen

Versuchsablauf (A) und Western Blot-Analyse (B) zur Verhinderung der CD86-Degradation in MCMV-WT infizierten DC2.4-Zellen. DC2.4-Zellen wurden mock infiziert oder mit MCMV-WT infiziert und 19 h nach Infektion wurden 5 μ M MG-132 bzw. 175 μ M Leupeptin zugegeben. Nach weiteren 5 h Inkubation wurden die Zellen geerntet; im Western Blot wurden dann CD86, modB7-2 und GAPDH detektiert

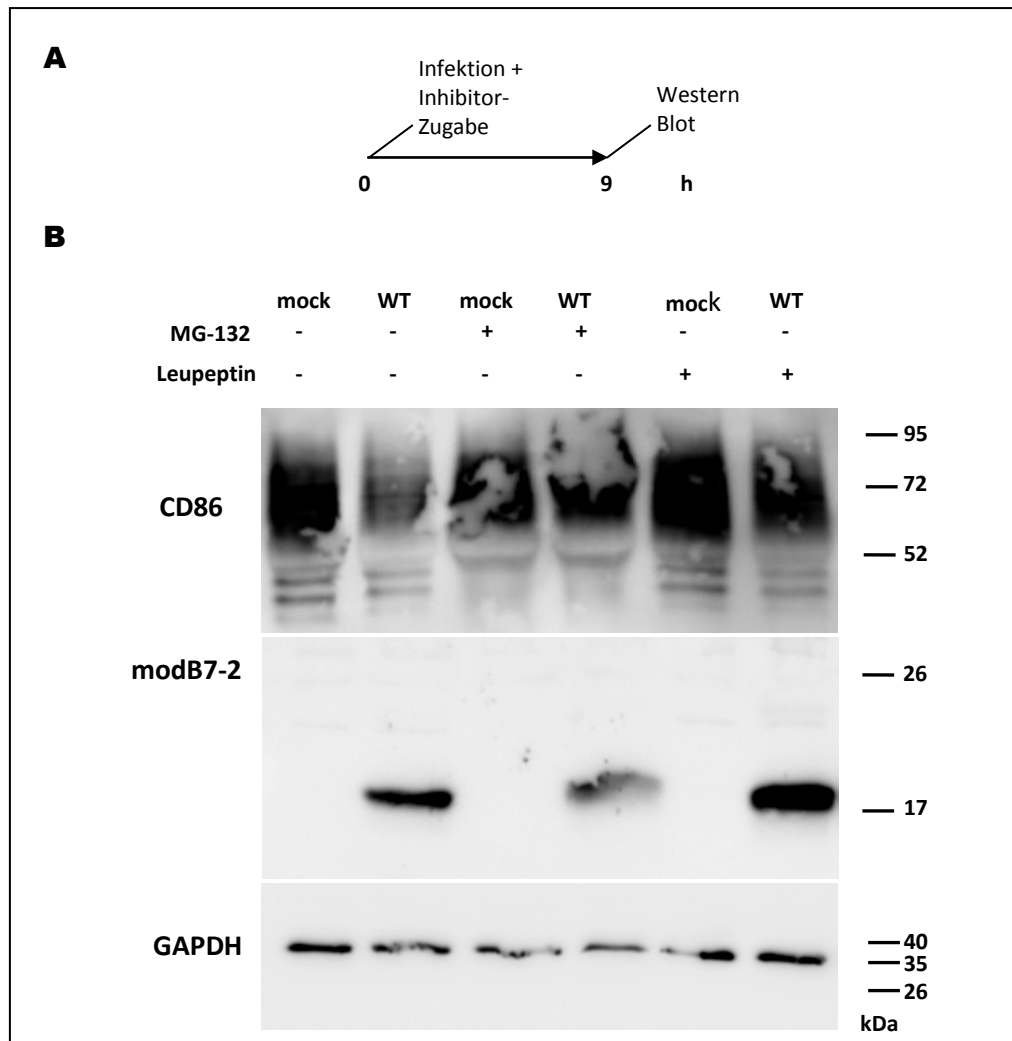


Abbildung 3.32 MG-132 und Leupeptin verhindern die Degradation von CD86 in MCMV-WT infizierten DC2.4-Zellen bei Inhibitorzugabe zum Infektionszeitpunkt

Versuchsaufbau (A) und Western Blot (B) zur Rettung der CD86-Degradation in MCMV-WT infizierten DC2.4-Zellen. Zu DC2.4-Zellen wurden 5 μ M MG-132 bzw. 175 μ M Leupeptin direkt zum Zeitpunkt der Infektion zugegeben. 9 h nach der Infektion wurden die Zellen geerntet im Western Blot wurden dann CD86, modB7-2 und GAPDH detektiert

Abbildung 3.31 zeigt, dass die Zugabe der Inhibitoren 19 h p. i. keinen Effekt auf die CD86-Degradation hatte, es war kein Unterschied zur Infektion ohne Inhibitor-Zugabe feststellbar. Unter allen Bedingungen wurde CD86 nach Infektion abgebaut. Anders war es 9 h nach Infektion (Abbildung 3.32): Hier war sichtbar, dass die CD86-Menge nach Zugabe von sowohl Leupeptin als auch von MG-132 größer war als die CD86-Menge nach Infektion ohne Inhibitor-Zugabe. Der Effekt von MG-132 war stärker als der von Leupeptin. Bei Zugabe von MG-132 war aber auch die modB7-2-Expression beeinträchtigt; Leupeptin dagegen hatte keinen Einfluss auf die Expression von modB7-2.

Zusammengefasst wurde gezeigt, dass CD86 in MCMV-infizierten DC2.4-Zellen nach Internalisation abgebaut und nicht intrazellulär zurückgehalten wird. Weiterhin wurde geschlossen, dass es sich bei dem verbleibenden CD86-Signal, welches durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie und Western Blot-Analyse auch nach Infektion noch detektiert werden konnte, um ER-residentes und von MCMV bzw.

modB7-2 nicht beeinflusste CD86-Moleküle handelt. Die Inhibition der Degradation durch lysosomale und proteasomale Inhibitoren ist ein weiteres, starkes Indiz für eine modB7-2-abhängige Degradation von CD86.

3.14 DIE CD86-INTERNALISATION INFIZIERTER DC2.4-ZELLEN ERFOLGT ÜBER CLATHRIN-ABHÄNGIGE ENDOZYTULOSE

Damit CD86 zum Ort seiner Degradation – möglicherweise den Lysosomen - gelangen kann, muss CD86 zunächst dorthin transportiert werden. Es gibt verschiedene Mechanismen, die an der Internalisation von Zelloberflächenmolekülen beteiligt sind. Sehr gut charakterisiert ist die Clathrin-abhängige Endozytose, aber auch Clathrin-unabhängige Mechanismen wie *lipid raft*-/Calveolae-, Arf6- oder Flotillin-abhängige Mechanismen sowie Endozytose durch Clathrin unabhängige Transporter (clathrin-independent carrier, CLIC) oder über GPI-Ankerproteine, welche in frühen endosomalen Kompartimenten angereicht sind (GPI-anchor protein enriched early endosomal compartments; GEEC), sowie der „IL2R β -Pathway“ und „circular dorsal ruffles“ werden beschrieben (zusammengefasst im Übersichtsartikel von Doherty und McMahon, 2009).

Um zu untersuchen, welche Mechanismen an der CD86-Internalisation in MCMV-infizierten Zellen beteiligt sind, wurde durch Inkubation mit Inhibitoren verschiedener Endozytosewege analysiert, ob die Verminderung der CD86-Oberflächenexpression in Gegenwart der Inhibitoren noch stattfinden kann. Dabei wurden primär die Clathrin-vermittelte und die *lipid raft*-/Calveolae-abhängige Endozytose näher betrachtet. Im Versuch wurden DC2.4-Zellen mit MCMV-WT infiziert und zeitgleich mit den Inhibitoren versetzt. 9 h nach Infektion wurden die Zellen dann geerntet und die CD86-Oberflächenexpression im FACS und die modB7-2-Expression im Western Blot analysiert (Abbildung 3.33).

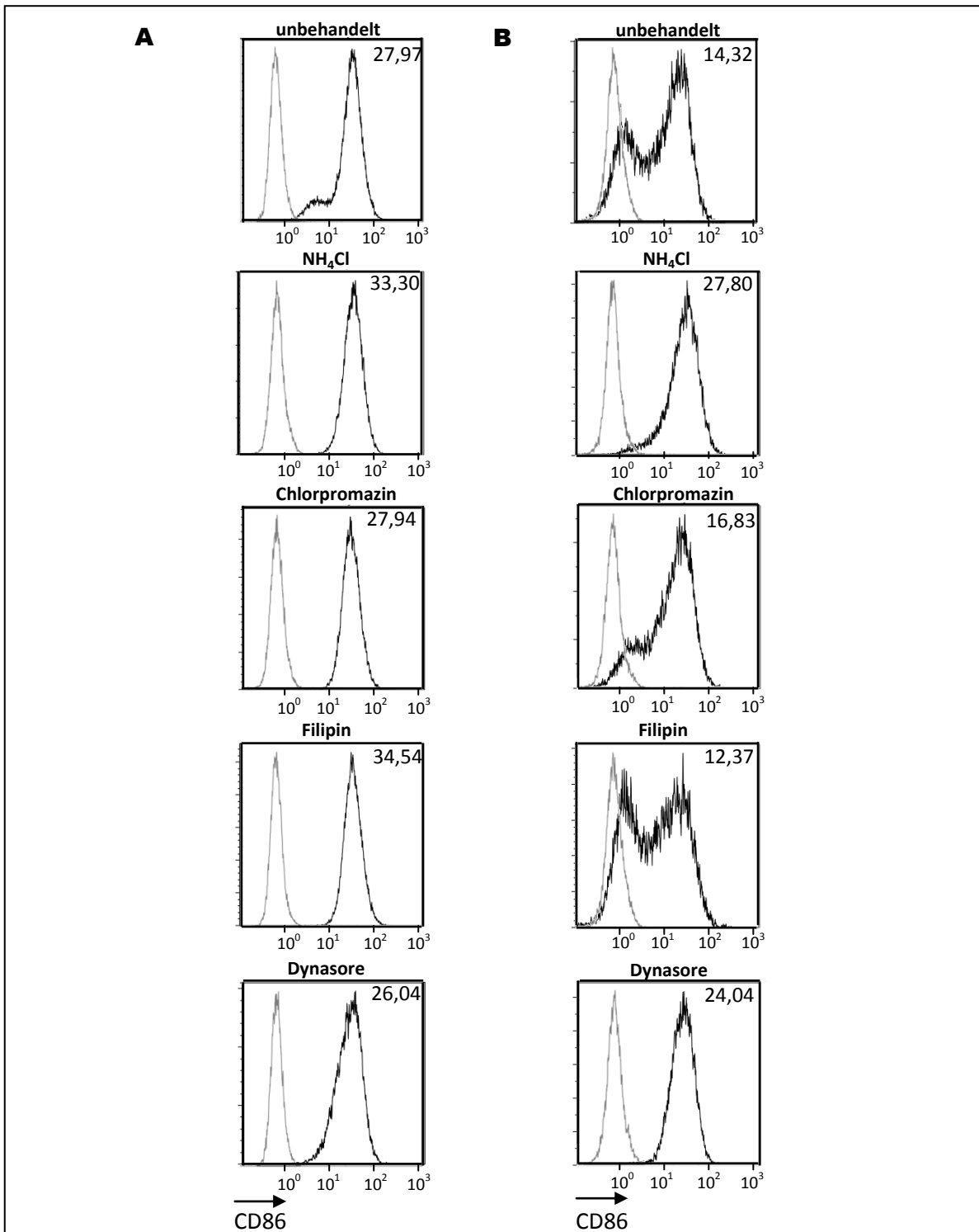


Abbildung 3.33 CD86-Internalisation nach Infektion von DC2.4-Zellen mit MCMV erfolgt durch Clathrin-vermittelte Endozytose

CD86-Oberflächenexpression 9 h p. i. in nicht-infizierte DC2.4-Zellen (A) und DC2.4-Zellen infiziert mit MCMV-WT (B) nach Zugabe von NH₄Cl (50 mM), Chlorpromazin (30 μM), Filipin (16 nM) oder Dynasore (40 mM) zum Infektionszeitpunkt. In grau ist jeweils die Färbung mit einer unspezifischen Isotypkontrolle dargestellt, während schwarze Histogramme die CD86-Oberflächenexpression zeigen. Die Zahlen geben die mittlere Fluoreszenzintensität der CD86-Messung an.

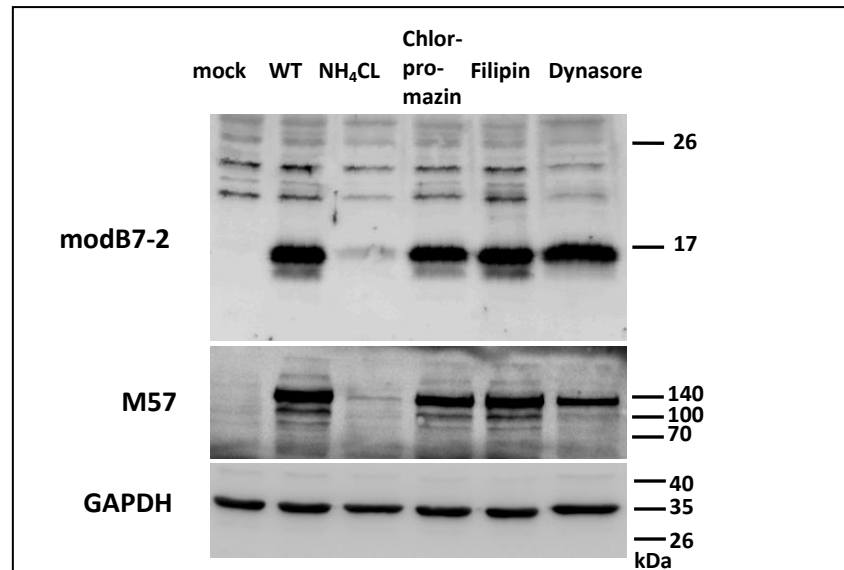


Abbildung 3.34 CD86-Internalisation bei Infektion von DC2.4-Zellen mit MCMV erfolgt über Clathrin-vermittelte Endozytose

Gesamt-CD86-Expression 9 h p. i. in DC2.4-Zellen, infiziert mit MCMV-WT nach Zugabe von NH₄Cl (50 mM), Chlorpromazin (30 μM), Filipin (16 nM) oder Dynasore (40 mM) zum Infektionszeitpunkt. Im Western Blot wurden die viralen Proteine modB7-2 und M57 sowie GAPDH mit spezifischen Antikörpern detektiert.

Als Inhibitoren wurden Ammoniumchlorid (NH₄Cl), Chlorpromazin, Filipin und Dynasore verwendet. NH₄Cl führt als schwache Base zu einer pH-Erhöhung in endozytotischen Vesikeln sowie in Lysosomen (Ohkuma und Poole, 1978; Maxfield et al., 1982). Dies hat blockierende Effekte auf die Rezeptor-vermittelte Endozytose, z. B. auf die Pinozytose (Tietze et al. 1980; Sando et al. 1979). Außerdem führt die Inkubation mit NH₄Cl zu Veränderungen in der Sortierung und Lokalisation von Rezeptor-Molekülen (Brown et al., 1986). Chlorpromazin ist wie Dynasore ein Inhibitor der Clathrin-abhängigen Endozytose: Die Inkubation mit Chlorpromazin führt zu dem Verlust von *clathrin-coated pits* an der Zellmembran und zur Ausbildung von Clathrin-Netzwerken an Endosomenmembranen, wobei Clathrin mit dem Adaptormolekül AP-2 komplexiert ist (Wang et al., 1993). Dynasore dagegen unterbindet die Vesikelabschnürung an der Zellmembran durch nicht-kompetitive Inhibition der GTPase-Aktivität von Dynamin-1 und -2 (Macia et al., 2006); Dynamin ist u. a. für die Clathrin-vermittelte Endozytose und die Ligandenaufnahme über *Calveolae* essentiell (Damke et al., 1994; Nabi und Le, 2003). Filipin inhibiert *calveolae*-vermittelten intrazellulären Transport sowie die *calveolae*-abhängige Trans- und Endozytose (Schnitzer et al., 1994).

In Abbildung 3.33 A ist der Einfluss der Inhibitoren auf die CD86-Expression auf der Zelloberfläche nicht-infizierter DC2.4-Zellen dargestellt. Außer Dynasore hatte keiner der Inhibitoren einen merklichen Einfluss auf die CD86-Oberflächenexpression; Dynasore führte zu einer minimalen Reduktion der CD86-Menge an der Zelloberfläche.

Nach Infektion von DC2.4-Zellen mit MCMV-WT (Abbildung 3.33 B) sah das anders aus: Zwar wurde 9 h nach Infektion noch nicht das komplette Ausmaß der Reduktion der CD86-Oberflächenexpression erreicht, dennoch konnte man feststellen, dass Chlorpromazin die CD86-Internalisation partiell und NH_4Cl sowie Dynasore vollständig blockierten. Filipin schien im Gegensatz dazu sogar die CD86-Internalisation geringfügig zu erhöhen.

Im Western Blot wurde untersucht, ob modB7-2 auch in Gegenwart der Inhibitoren in ähnlicher Menge wie in unbehandelten Zellen exprimiert wird (Abbildung 3.34). In den mit Chlorpromazin-, Filipin- und Dynasore-versetzten Zellen war modB7-2 vergleichsweise stark exprimiert wie in den unbehandelten infizierten Zellen. Nach Inkubation mit NH_4Cl war dagegen nur noch eine schwache modB7-2-Expression nachweisbar. In den FACS-Analysen war ersichtlich, dass die Infektion durch die Inhibitoren nicht geblockt war, da GFP-exprimierende Zellen - also infizierte Zellen - gefunden wurden. Der Nachweis der GFP-Expression schließt jedoch nicht aus, dass die Infektion nicht komplett ablief und somit nur Viruseintritt in die Zelle, aber keine produktive Infektion mit der Generierung neuer infektiöser Viruspartikel stattfand. Somit könnte evtl. auch ein nicht vollständiger Durchlauf des Infektionszyklus die Ursache für den beobachteten Block der CD86-Internalisation sein. Um dies zu prüfen, wurde ein Western Blot zur Detektion von M57 durchgeführt. M57 ist das *Major DNA-binding Protein* von MCMV - ein frühes (*early*) Protein - welches Homologien zum UL57 von HCMV und zum *ssDNA binding protein* von HSV-1 aufweist (Messerle et al., 1992; Rawlinson et al. 1996). Die Expression von M57 sollte einen weiteren Hinweis darauf geben, ob die Infektion durch die Inhibitoren gestört wird oder produktiv ablaufen kann.

In der Tat spiegelte die M57-Expression die Expression von modB7-2 wider (Abbildung 3.34): Nur in Gegenwart von NH_4Cl war die M57-Expression gestört, die anderen Inhibitoren Chlorpromazin, Filipin und Dynasore hatten keinen Einfluss auf die M57-Expression.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Chlorpromazin teilweise und Dynasore komplett die Verringerung der CD86-Oberflächenexpression blockierten. Der Block durch NH_4Cl war nicht aussagekräftig, da hier modB7-2 kaum exprimiert wurde und die Infektion nicht vollständig abzulaufen schien. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass CD86 hauptsächlich durch Clathrin-vermittelte Endozytose internalisiert wird.

Kapitel 4 DISKUSSION

In dieser Arbeit wurden Untersuchungen zur Expression und Funktionsweise des immunmodulatorischen MCMV-Proteins modB7-2 durchgeführt. Dazu wurden u. a. die Expression von modB7-2 in verschiedenen Zelltypen analysiert, das für die Translationsinitiation benötigte Startkodon im modB7-2-ORF identifiziert und die Lokalisation des modB7-2-Proteins in der Zelle untersucht. Experimente zum Mechanismus der modB7-2-abhängigen CD86-Internalisation gaben zudem Hinweise, wie durch die Expression von modB7-2 die Verringerung der CD86-Oberflächenexpression in APCs erreicht wird.

Es konnte gezeigt werden, dass in MCMV-infizierten, CD86 exprimierenden Fibroblasten keine modB7-2-spezifische CD86-Internalisation erfolgt. Bei Infektion von DC2.4-Zellen unterschied sich die Auswirkung auf die CD86-Oberflächenexpression gegenüber dem Effekt in infizierten RAW264.7-Zellen: Hier zeigte die Infektion von DC2.4-Zellen mit der modB7-2-Deletionsmutante MCMV- Δ modB7-2 noch eine Verringerung der CD86-Expression auf der Zelloberfläche, was bei Infektion von RAW264.7-Zellen nicht festgestellt werden konnte (Loewendorf et al., 2004). Die lentivirale Expression von modB7-2 in DC2.4-Zellen unabhängig vom MCMV-Kontext führte zu keiner Internalisation von CD86 von der Zelloberfläche. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Translation der modB7-2-mRNA am dritten im modB7-2-ORF vorhandenen Startkodon initiiert wird. Das modB7-2-Protein ist bei Infektion von DC2.4-Zellen mit MCMV hauptsächlich im Golgi-Apparat lokalisiert; das Vorhandensein eines Golgi-Retentionssignals konnte allerdings nicht bestätigt werden. Eine posttranslationale Modifikation des modB7-2-Proteins konnte durch biochemische Methoden nicht festgestellt werden.

Die Experimente zur CD86-Internalisation zeigten, dass die modB7-2-Expression einen Effekt auf CD86-Moleküle hat, die schon zum Zeitpunkt der Infektion auf der Zelloberfläche von DC2.4-Zellen vorhanden sind. CD86 wird nach Infektion über Clathrin-abhängige Mechanismen internalisiert, zu den Lysosomen transportiert und dort degradiert.

4.1 AUSWIRKUNG DER MODB7-2-EXPRESSION AUF DIE CD86-OBERFLÄCHENEXPRESSION BEI MCMV-INFEKTION VON WT3-FIBROBLASTEN UND DC2.4-ZELLEN

In einem ersten Experiment wurden die Ergebnisse von Loewendorf et al. überprüft (Loewendorf et al., 2004): Es konnte bestätigt werden, dass die CD86-Expression auf der Zelloberfläche MCMV-infizierter RAW264.7-Zellen vermindert wird.

Die Infektion von Fibroblasten, die CD86 stabil exprimieren, zeigte auch eine CD86-Internalisation. Allerdings kann bis jetzt nur angenommen werden, dass dieser Effekt eine Folge der Infektion mit MCMV-WT an sich ist. Die Infektion mit einer MCMV-Mutante, die modB7-2 exprimiert (MCMV- Δ 6 modB7-2 FL) als auch mit einer Mutante, der das modB7-2-Gen fehlt (MCMV- Δ modB7-2) resultierten in beiden Fällen auch in einer Reduktion der CD86-Oberflächenexpression, wobei sich die CD86-Level auf der Zelloberfläche zwischen den Infektionen beider Virusmutanten nicht unterschieden (siehe Abbildung 3.4). Folglich ist die CD86-Internalisation in infizierten WT3-Fibroblasten nicht modB7-2-spezifisch. Möglich wäre deshalb, dass in Fibroblasten ein weiteres Protein additiv zu modB7-2 auf gleichem oder anderen Wege die CD86-Internalisation bewirkt. Da sich MCMV-WT von der Mutante MCMV- Δ 6 modB7-2 FL nur durch Anwesenheit der ORFs m144-m157 unterscheidet, bei Infektion mit MCMV-WT aber eine stärkere Verringerung der CD86-Oberflächenexpression als bei Infektion mit MCMV- Δ 6 modB7-2 FL auftritt, ist dieses Protein wahrscheinlich in der MCMV-Genomregion zwischen den ORFs m144- m157 kodiert.

Natürlich ist es denkbar, dass in dem artifiziellen Fibroblasten-Zellsystem die CD86-Überexpression so stark war (siehe Abbildung 3.3), dass ein möglicher modB7-2-Effekt nicht detektiert werden konnte. Möglicherweise wird CD86 schneller exprimiert und zur Zelloberfläche transportiert, als die modB7-2-abhängige CD86-Internalisierung abläuft.

Möglich ist aber eher, dass modB7-2 nicht in Fibroblasten, sondern möglicherweise nur in Zellen mit hämatopoetischem Ursprung, die natürlicherweise CD86 exprimieren, eine Verringerung der CD86-Oberflächenexpression erreicht. Dies würde Regulationsmechanismen für CD86 postulieren, deren Komponenten nur in hämatopoetischen Zellen vorhanden sind. Möglich wäre dabei, dass die modB7-2-Expression die CD86-Oberflächenexpression indirekt beeinflusst: Durch Modulation der Expression von Molekülen, welche eine Rolle in der CD86-Expression und seiner Regulation spielen, wie z.B. der *nerve growth factor* (NGF), das Calcitoningen-verwandte Peptid (CGRP), die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), NF- κ B oder LIGHT (Bracci-Laudiero et al., 2005; Carucci et al., 2000; Marshall-Clarke et al., 2003; Zou und Hu, 2005;), könnte die Expression von modB7-2 die CD86-Oberflächenexpression

manipulieren. Denkbar wäre auch, dass die modB7-2-Expression die IL-10-Produktion steigert und so abhängig von der MAP-Kinase p38 die CD86-Oberflächenexpression senkt; besagter Einfluss von IL-10 auf CD86 wurde von Lim und Kollegen gezeigt (Lim et al., 2002). Man könnte sich auch vorstellen, dass über eine modB7-2-abhängige Steigerung der IL-10-Expression die Produktion von MARCH-1 stimuliert wird. MARCH-1 ist eine E3-Ubiquitin-Ligase, die nach Bindung an CD86 dessen Ubiquitinierung und die darauffolgende Degradation in Lysosomen bewirkt (Corcoran et al., 2011; Baravalle et al., 2011). Tatsächlich wurde gezeigt, dass IL-10 autokrin die MARCH-1-Expression stimulieren kann und so die CD86-Degradation auslösen kann; dies wurde sowohl für Monozyten als auch dendritische Zellen gezeigt (Baravalle et al., 2011; Tze et al., 2011, Thibodeau et al., 2008). IL-10 wird hauptsächlich in T-Helfer-Zellen, CD8⁺ T-Zellen, dendritischen Zellen, Mastzellen, Granulozyten sowie Makrophagen und Monozyten produziert - in Fibroblasten wird von keiner IL-10-Produktion berichtet. Folglich wäre dies ein möglicher Mechanismus, wie modB7-2 die Verminderung der CD86-Oberflächenexpression bei MCMV-Infektion bewirken und warum in Fibroblasten keine modB7-2-abhängige Reduktion der CD86-Oberflächenexpression detektiert werden konnte (de Waal Malefyt et al., 1991; Del Prete et al., 1993, Sabat et al., 2010).

Neben MARCH-1 führt auch die Expression der Proteine MARCH-2 und MARCH-8 zur Reduktion der CD86-Expression an der Zelloberfläche. Bei Untersuchungen zur Funktion von MARCH-8 konnte gezeigt werden, dass auch MARCH-8 die Ubiquitinierung von CD86 und die anschließende CD86-Internalisation sowie Degradation in den Lysosomen bewirkt (Bartee et al., 2004; Goto et al., 2003). MARCH-1 und MARCH-8 sind in den sekundären lymphoiden Geweben wie Milz und Lymphknoten exprimiert, eine Expression dieser Proteine in Fibroblasten ist nicht bekannt (Wang et al., 2009; Goto et al., 2003; Bartee et al., 2004; Matsuki et al., 2007; Ohmura-Hoshino 2006). Von MARCH-2 wird berichtet, dass dieses Protein ubiquitär in Endosomen exprimiert wird und als Regulator des Transports zwischen trans-Golgi-Netzwerk (TGN) und Endosomen aktiv ist (Nakamura et al., 2005). Folglich könnte modB7-2 die Mechanismen von MARCH-1 oder MARCH-8 benutzen, um die CD86-Reduktion auf der Zelloberfläche zu bewerkstelligen. Die Tatsache, dass das modB7-2-Protein selbst keine RING-CH-Domäne besitzt - wie z. B. die viralen MARCH-Proteine K3 und K5 von KSHV (Dodd et al., 2004; Lehner et al., 2005) - unterstützt die Annahme, dass modB7-2 eine Verringerung der CD86-Expression an der Zelloberfläche indirekt über eines der MARCH-Proteine auslösen könnte. Tatsächlich führt die Überexpression von MARCH-1 in CD86-exprimierenden Fibroblasten zur einer Verringerung der CD86-Oberflächenexpression (Jabbour et al., 2009). Die Beteiligung eines MARCH-Proteins an der CD86-Internalisation in der MCMV-Infektion ist allerdings bisher hypothetisch und müsste erst noch gezeigt werden. Deshalb kann gegenwärtig auch nicht ausgeschlossen werden, dass die MARCH-Proteine in der Reduktion der CD86-Oberflächenexpression gar keine Rolle spielen und bei diesem Prozess andere zelluläre oder virale Proteine eine essentielle Funktion haben.

Die Ergebnisse in Abbildung 3.5 zeigten einen Unterschied zu den bekannten Ergebnissen in RAW264.7-Zellen auf (Loewendorf et al., 2004): Durch das Einfügen von Stop-Kodons in den ORF von modB7-2 wurde eine *nonsense*-Mutante hergestellt, welche die Fähigkeit zur Verminderung der CD86-Oberflächenexpression in RAW264.7-Zellen komplett verloren hat. Die Infektion von DC2.4-Zellen mit dieser MCMV- Δ modB7-2-Mutante resultierte dennoch in einer CD86-Internalisation, die jedoch schwächer war als bei Infektion mit MCMV-WT. Dies deutet daraufhin, dass DC2.4-Zellen (dendritische Zelllinie) und RAW264.7-Zellen (Monozyten/Makrophagen-Zelllinie) andere Mechanismen der CD86-Regulation bzw. -Internalisation haben. Bei Infektion von RAW264.7-Zellen war die CD86-Internalisation modB7-2-spezifisch und wird allein durch die modB7-2-Expression bewirkt. Auch bei Infektion von DC2.4-Zellen war der Effekt modB7-2-spezifisch, da die Integration des modB7-2-ORFs in das Virusgenom der MCMV- Δ 6-Mutante (welche keine Verminderung der CD86-Oberflächenexpression bewirkt), wieder eine CD86-Reduktion an der Zelloberfläche bewirkte (Abbildung 3.5). Da bei Infektion mit MCMV- Δ modB7-2 eine stärkere CD86-Internalisation als nach Infektion mit MCMV- Δ 6 zu beobachten war, ist zu vermuten, dass bei Infektion von DC2.4-Zellen noch andere MCMV-Genprodukte (kodierend für die ORFs m144-m157) an der Reduktion der CD86-Oberflächenexpression beteiligt sind. Das genannte Experiment wurde mindestens dreimal mit vergleichbarem Ergebnis wiederholt, allerdings wurde die gleiche Viruspräparation benutzt. Eine gute Kontrolle der These einer Beteiligung eines weiteren MCMV-Proteins wäre die Reproduktion mit unabhängig hergestellten Viruspräparationen. Weiterhin sollte die DNA-Sequenz von MCMV- Δ modB7-2 im Bereich der *nonsense*-Mutation überprüft werden, um eine mögliche Rückmutation zur Wildtyp-Sequenz auszuschließen. Zu Überprüfung, ob weitere MCMV-Proteine einen Einfluss auf die Verringerung der CD86-Oberflächenexpression haben, könnte man die ORFs m144 bis m157 einzeln in das Virusgenom von MCMV- Δ 6 integrieren. So könnte eventuell ein zweites virales Protein detektiert werden, das den CD86-Level an der Zelloberfläche reduzieren kann. Zusätzlich könnte man die DNA-Sequenzen für modB7-2 FL und für weitere virale Proteine in das Genom von MCMV- Δ 6 einfügen, um eine mögliche stärkere Reduktion der CD86-Oberflächenexpression infizierter DC2.4-Zellen gegenüber MCMV- Δ 6 modB7-2 FL-infizierten Zellen zu prüfen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die CD86-Internalisationsmechanismen bei Infektion mit MCMV in verschiedenen Zelltypen unterscheiden: Bei Infektion von RAW264.7-Zellen resultiert die Expression des modB7-2-Proteins in einer spezifischen CD86-Internalisation, während bei Infektion von DC2.4-Zellen wahrscheinlich weitere virale Proteine an der Verringerung der CD86-Oberflächenexpression beteiligt sind, welche durch einen oder mehrere der ORFs m144 bis m157 kodiert sind. In infizierten CD86-exprimierenden Fibroblasten konnte kein modB7-2-spezifischer Effekt auf die CD86-Oberflächenexpression festgestellt werden. Dies deutet auf die Beteiligung weiterer, in hämatopoetischen Zellen vorhandener zellulärer Faktoren hin.

4.2 STARTKODONS FÜR DIE INITIATION DER MODB7-2-PROTEINSYNTHESE

Für die spätere Expressionsklonierung von modB7-2 war es notwendig, das richtige Startkodon des ORFs zu bestimmen (Abschnitt 3.4). Da eine Expression des modB7-2-Proteins nur detektiert werden konnte, wenn Plasmide verwendet wurden, deren ORF entweder für alle drei *in frame* vorhanden ATG-Kodons kodiert (Variante modB7-2 FL) oder aber in deren ORF das 3. ATG-Kodon vorhanden war (Variante modB7-2 3.ATG), wurde geschlossen, dass es sich bei dem 3. ATG um das eigentliche Startkodon handelt. Die Möglichkeit, dass hier die Transfektionseffizienz bei den anderen modB7-2-Varianten zu gering war, um deren Expression feststellen zu können, ist sehr unwahrscheinlich, da die Expression anhand der Luciferaseaktivität eines ko-transfizierten Plasmides normalisiert worden war.

Nach Transfektion von HEK 293T-Zellen mit den modB7-2 FL- und modB7-2 3.ATG-kodierenden Vektoren wurden zwei modB7-2-spezifische Protein-Banden nachgewiesen, während nach Infektion von APCs mit MCMV-WT nur eine Bande feststellbar war. Dies könnte ein spezifischer Effekt von HEK 293T-Zellen sein. Möglich wäre, dass in diesen Zellen das modB7-2-Protein anders als in infizierten DC2.4-Zellen posttranslational modifiziert wird.

Um die Funktion der unterschiedlichen modB7-2-Varianten im Viruskontext untersuchen zu können, wurden die entsprechenden Virusmutanten hergestellt und der Effekt auf die CD86-Expression in DC2.4-Zellen untersucht. Nach Infektion mit MCMV- Δ 6 modB7-2 FL und mit MCMV- Δ 6 modB7-2 3.ATG war die CD86-Expression gleich stark verringert, während nur eine partielle CD86-Internalisation bei Infektion mit MCMV- Δ 6 modB7-2 1.ATG beobachtet wurde. Dies legt nahe, dass das modB7-2-Protein, dessen Synthese am dritten Start-Kodon der jeweiligen mRNA beginnt, voll funktionell ist und die Proteinfunktion nicht beeinflusst ist. Ist nur das 1. ATG-Kodon für die Translationsinitiation verfügbar, ist die Funktion der resultierenden modB7-2-Proteinvariante stark eingeschränkt. Folglich scheidet das erste Start-Kodon als Startpunkt der Translation der viral exprimierten modB7-2-mRNA aus. Bei Betrachtung des Western Blots in Abbildung 3.8 B gab es einen weiteren Hinweis darauf: Nach Infektion von DC2.4-Zellen mit MCMV-WT war nur eine modB7-2-spezifische Protein-Bande zu sehen, welche die gleiche Gel-Mobilität zeigte wie das Protein, das aus der Expression des modB7-2 3.ATG-ORFs resultiert. Dies bestärkt die Vermutung, dass die Synthese des viral exprimierten modB7-2-Proteins durch Translationsbeginn am dritten Start-Kodon der mRNA beginnt, da bei Translationsstart an einem anderen Start-Kodon das resultierende modB7-2-Protein aufgrund seines höheren Molekulargewichts mit anderer Mobilität in der SDS-PAGE wandern würde (siehe unterschiedliche Molekulargewichte der modB7-2Varianten; Abbildung 3.6).

Die Hauptbande des modB7-2 FL-Proteins lief im SDS-Gel mit der gleichen Mobilität wie das modB7-2-Protein, das bei Infektion mit MCMV-WT exprimiert wird, aber es war zusätzlich eine langsamer wandernde Bande auf Höhe der modB7-2-Variante, die bei Infektion mit MCMV- Δ 6 modB7-2 1.ATG exprimiert wird, zu erkennen. Dies deutet darauf hin, dass bei Expression der modB7-2-Variante, die bei Infektion mit MCMV- Δ 6 modB7-2 FL exprimiert wird, das erste Start-Kodon der modB7-2-mRNA zu einem geringen Anteil zum Beginn der Translation benutzt wird, hauptsächlich allerdings das 3. ATG-Kodon.

Da es sich beim modB7-2-Protein um ein putatives Transmembranprotein handelt, könnte eine N-terminale Verlängerung des Proteins, wie sie aus einem Translationsstart der modB7-2-mRNA am 1. ATG/2. ATG resultieren würde, eine Fehlfaltung des Proteins verursachen und somit die Degradation in die Wege leiten. Denkbar wäre auch, dass ein potentiell Signalpeptid am N-Terminus durch die Verlängerung des Proteins bei Translationsinitiation am ersten oder zweiten putativen Start-Kodon maskiert wird. Die resultierende Misslokalisierung könnte zur schnellen Degradation der jeweiligen modB7-2-Proteinvarianten führen, was die schwache modB7-2-Expression bei Infektion von MCMV- Δ 6 modB7-2 1.ATG erklären würde.

Für die Translationsinitiation wird postuliert, dass die kleine ribosomale Untereinheit am 5'-Ende an die mRNA herantritt und dann linear über die mRNA wandert (Shatkin, 1985). Bei diesem als „*ribosome scanning*“ bezeichneten Modell (Kozak, 2002; Hershey et al., 1991) gibt es verschiedene Faktoren, die bestimmen, welches Start-Kodon vom Ribosom benutzt wird. Meistens wird das 1. Start-Kodon benutzt, welches beim *Scannen* der mRNA vom Ribosom vom 5'-Ende beginnend erreicht wird.

Des Weiteren kann auch die Sekundär-Struktur der mRNA die Translationsinitiation beeinflussen: Durch Ausbilden einer *Stem-loop*-Struktur kann das Binden der 40S-Untereinheit an die mRNA inhibiert werden (Kozak, 1989); ist diese Sekundärstruktur weit genug vom 5'-Ende entfernt und kann das Ribosom an die mRNA binden, so kann die Sekundärstruktur vom Ribosom aufgelöst werden; die 80S-Untereinheit ist in dieser Hinsicht allerdings potenter als die 40S-Untereinheit (Kozak et al., 1989; Lingelbach und Dobberstein, 1988). Ausschlaggebend für die Ausbildung einer inhibierenden Sekundärstruktur sind GC-reiche Sequenzen im 5'-*Leader* (Jiang und Lucy, 2001; Tang und Tseng; 1999). Das Ausbilden einer Sekundärstruktur stromabwärts eines ATGs kann aber auch positive Effekte auf die Translationsinitiation haben: Die *stem-loop*-Struktur verlangsamt das Ribosomenscanning und erleichtert so das Erkennen eines Start-Kodons (Kozak, 1990). Die nicht-translatierte Region des modB7-2-ORFs hat einen GC-Gehalt von 48,9%, ob dies allerdings ausreicht, um eine Sekundärstruktur ausbilden zu können, müssen weitere Versuche zeigen.

Eine interessante Beobachtung war in diesem Zusammenhang die unterschiedliche Expression der verschiedenen modB7-2-Varianten nach lentiviraler Transduktion (Abbildung 3.12). Anders als bei den MCMV-Infektionsexperimenten wurde die Variante modB7-2no1Exon bei Transduktion von DC2.4-Zellen am schwächsten exprimiert, obwohl die Kozak-Sequenz vor dem modB7-2-ORF im lentiviralen Vektor eine starke Translationsinitiation bewirken sollte. Die Variante modB7-2 FL führte nach Transduktion zu einer starken Expression. Das exprimierte Protein zeigte im Protein-Gel jedoch ein langsames Laufverhalten als das modB7-2-Protein, das in der MCMV-Infektion exprimiert wird. Aufgrund der Kozak-Sequenz startet die Translation hier wahrscheinlich am 1. ATG-Kodon (siehe Abbildung 3.13). Nach Transduktion mit der Variante modB7-2 KodOP waren zwei Banden zu sehen, da wahrscheinlich die Translation der mRNA am 1. und 3. Start-Kodon beginnt. In den vorherigen Transfektions- und Infektionsexperimenten wurde stets nur eine schwache Expression der modB7-2 1.ATG-Variante festgestellt (Abbildung 3.7 und 3.8). Dies deutet weniger auf ein instabiles Protein bei Translationsstart am ersten Start-Kodon hin, sondern eher auf einen speziellen Mechanismus zur Regulation der modB7-2-Translation.

Denkbar ist, dass sich eine RNA-Sekundärstruktur ausbildet, die bei Fehlen des 1. Exons des modB7-2-Gens eine starke Translationsinitiation der mRNA verhindert. Man sollte dabei bedenken, dass hier der ORF von modB7-2 zusammen mit dem ORF von GFP und einer IRES-Sequenz auf einer mRNA vorhanden ist, wodurch eine andere Struktur der mRNA als bei Expression von modB7-2 im MCMV-Kontext entstehen könnte. Ist das 1. Exon vorhanden, bildet sich womöglich eine andere, schwächere RNA-Sekundärstruktur und das Ribosom könnte die Sekundärstruktur auflösen. Ein Modell, wie man sich diese Strukturen vorstellen könnte, ist in Abbildung 4.1 gezeigt. RNA-Struktur-Analysen sowie lentivirale Vektoren ohne IRES-GFP-Kassette könnten darüber Aufschluss geben, ob die RNA-Struktur die modB7-2-Translation bei lentiviraler Transduktion beeinflusst. Zur vollständigen Beantwortung der Frage, ob eine Sekundärstruktur der modB7-2-mRNA für den Start der Proteinsynthese am 3. Startkodon verantwortlich ist müssen Vorhersagen erstellt werden und diese dann durch Mutationsexperimente getestet werden.

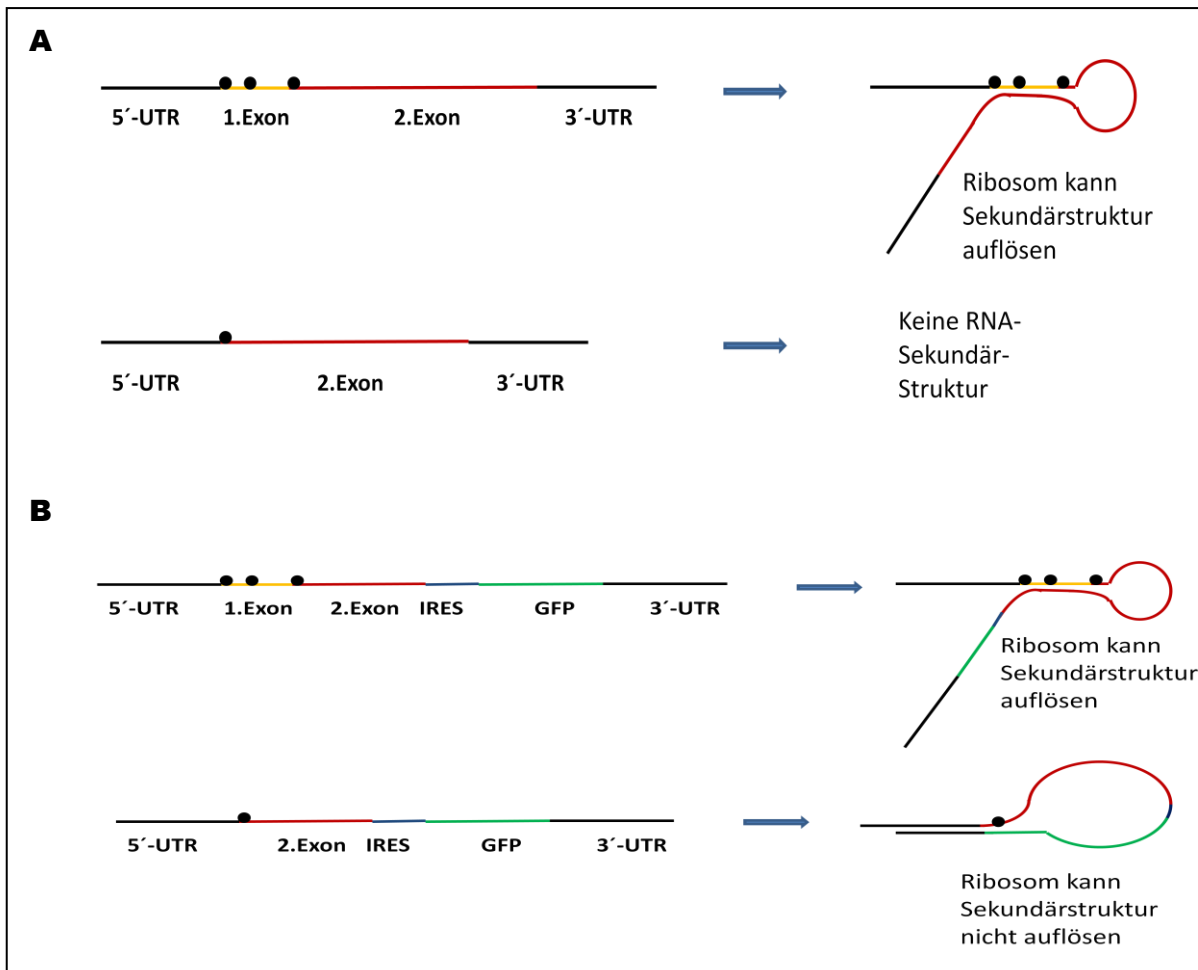


Abbildung 4.1 Modell möglicher RNA-Sekundärstrukturen der verschiedenen modB7-2-Konstrukte

(A) Im MCMV-Kontext bildet sich bei Vorhandensein des 1.Exons im modB7-2-ORF eine RNA-Sekundärstruktur auf der modB7-2-mRNA, die vom Ribosom aufgelöst werden kann. Fehlt das 1.Exon, kann sich keine Sekundärstruktur ausbilden

(B) Im lentiviralen Kontext bildet sich bei Fehlen des 1.Exons eine RNA-Sekundärstruktur zwischen 5'-UTR und 3'-UTR, die vom Ribosom nur schwer aufgelöst werden kann und so zu einer geringen Translationseffizienz der modB7-2-mRNA führt. Schwarze Punkte stellen putative Startkodons (AUG) auf der mRNA dar.

Ein anderer wichtiger Faktor, der die Translationsinitiation bestimmt, stellt der Kontext dar, in dem sich das Startkodon befindet. Die optimale Umgebung dafür, dass ein Ribosom ein ATG-Kodon als „Start“ annimmt, ist die Konsensussequenz GCCRCCatgG. Von höchster Relevanz sind dabei A und G an Position -3 zu sehen (wobei A stärker den Translationsstart initiiert als G); aber auch das G an Position +4 ist stark konserviert (Kozak, 1986; Kozak, 1997; Kozak, 2002). Tatsächlich hat das Nukleotid an Position -3 gefolgt von dem Guanin bei +4 die stärksten Effekte und erhöht die Translation um mindestens das Zehnfache; die restlichen Nukleotide haben dabei marginale Auswirkungen.

Betrachtet man nun die Sequenzumgebung der drei in der cDNA-Sequenz von modB7-2 vorhandenen potentiellen Startkodons, so stellt man fest, dass keines der drei möglichen Startkodons von der optimalen Konsensussequenz GCCRCCatgG umgeben wird (siehe Abbildung 4.2). Auch der Sequenzkontext des 1.ATGs des modB7-2-ORF im Wildtypvirus ist nicht optimal.

Sequenzkontext des 1.ATGs im modB7-2- ORF von MCMV-WT	Sequenzkontext des 1.ATGs im modB7-2- ORF im Vektor pcDNA3	Sequenzkontext des 2.ATGs im modB7-2- ORF	Sequenzkontext des 3.ATGs im modB7-2- ORF
TGGCTCatgA GCCRCCatgG	CGGCTCatgA GCCRCCatgG	TTCTTGatgA GCCRCCatgG	AATAAGatgC GCCRCCatgG

Abbildung 4.2 Sequenzkontext der jeweiligen ATG-Kodons im modB7-2-ORF

Dargestellt sind die Sequenzumgebungen der ATG-Kodons im modB7-2-ORF in MCMV-WT sowie in pcDNA3 im Vergleich zur optimalen Konsensussequenz (grau) für eine erhöhte Translationsinitiation an diesem ATG. Umrahmt ist das stark konservierte Purin an Position -3, welches eine gesteigerte Translationsinitiation bewirkt.

Das dritte ATG-Kodon befindet sich in der Sequenzumgebung AATAAGatgC und zeigt das stark konservierte A an der Stelle -3, welches auch stark die Translationseffizienz erhöht. Das dritte ATG-Kodon zeigt somit trotz nicht optimaler Konsensussequenz die wohl stärkste der drei potentiellen Startkodons. Befinden sich mehrere Start-Kodons auf einer mRNA und liegt das erste Start-Kodon in einem suboptimalen Kontext, stoppen hier einige Ribosomen und starten die Translation, wobei der Großteil der Ribosomen allerdings weiter an der mRNA entlangscannt, um dann an dem stromabwärts liegenden, in einen besseren Kontext eingebetteten ATG-Kodon die Translation zu initiieren (Kozak, 2002). Dieses sogenannte *leaky scanning* ist ein Regulationsmechanismus der Translation, mit dem die synthetisierte Menge eines Proteins gesteuert werden kann (Tucker et al., 2001). Auch Viren nutzen das Prinzip des *leaky scanings*: die schwache Sequenzumgebung des Startkodons in der für das HIV-1-Protein Vpu kodierenden Sequenz gewährleistet, dass die Ribosomen teilweise am Vpu-Start vorbeilaufen und somit die für das Env-Protein stromabwärtsliegende kodierende Region translatiert werden kann (Schwartz et al., 1992; Kozak, 1991; Kozak, 2002).

Die Transfektionsexperimente mit den modB7-2-Plasmiden, bei denen die Translation von einem bestimmten ATG-Kodon erzwungen wird, deuten auf einen *leaky scanning*-Mechanismus hin. Beim forcierten Start der Translation am 1. oder 2. ATG-Kodon war kein modB7-2-Protein zu detektieren. Nur wenn das 3. ATG-Kodon im modB7-2-ORF vorhanden war, ließ sich modB7-2-Protein detektieren, sowohl bei Vorhandensein als auch bei Fehlen der beiden anderen putativen Start-Kodons stromaufwärts vom 3. ATG-Kodon. Bei Infektion von DC2.4-Zellen mit MCMV-Δ6 modB7-2 FL wurde das 1. ATG-Kodon wahrscheinlich minimal, das 3. ATG-Kodon jedoch am häufigsten zur Translationsinitiation von modB7-2 genutzt. Weiterhin ist gemäß der Theorie des *leaky scanings* nicht auszuschließen, dass die Translation am 1. oder 2. Start-Kodon in geringem Maße begonnen wird; die modB7-2-Varianten waren allerdings nur in geringer Menge nachzuweisen (siehe Abbildung 3.8 B).

Insgesamt decken sich die experimentellen Ergebnisse mit den Erwartungen aufgrund des Sequenzkontextes der ATG-Kodons. Auch die FACS-Experimente (Abbildung 3.8 A) zeigten, dass das modB7-2-Protein, welches durch Translationsbeginn am 1. ATG-Kodon entsteht, in der Funktion der Verringerung CD86-Oberflächenexpression gegenüber der Proteinvariante modB7-2 3.ATG deutlich eingeschränkt war. Da die modB7-2-Protein-Variante, die bei Infektion mit MCMV- Δ 6 modB7-2 3.ATG exprimiert wird, gleich funktionell war wie diejenige, die bei Infektion mit MCMV- Δ 6 modB7-2 FL hergestellt wird, lässt sich daraus schließen, dass die Translation tatsächlich am 3. ATG-Kodon startet, bedingt durch die Sequenzumgebung und potentieller Sekundärstrukturen der modB7-2-mRNA.

4.3 POTENTIELLE FUNKTION DES ERSTEN EXONS DES MODB7-2-GENS

Da die Synthese des modB7-2-Proteins am 3. Start-Kodon der modB7-2-mRNA initiiert wird, stellt sich die Frage, warum das modB7-2-Gen zwei Exons besitzt, obwohl die Sequenz des 1. Exons nicht translatiert wird. Das 1. und das 2. ATG-Kodon befinden sich im 1. Exon und die Konsensus-Sequenz des dritten ATG-Kodons wird durch das Spleißen nicht verändert.

Die Ergebnisse in Abbildung 3.10 B zeigten, dass bei Fehlen des 1. Exons gemäß der *first-ATG-rule* translatiert wird; die exprimierte Menge des modB7-2-Proteins war hier sogar etwas höher als bei Infektion mit MCMV- Δ 6 modB7-2 FL, d.h. wenn das 1. Exon vorhanden ist.

Die DNA-Sequenz der Variante modB7-2no1Exon befindet sich im Sequenzkontext CGGCTcatgC, die auch kaum mit der Konsensussequenz GCCRCCatgG übereinstimmt. Trotzdem wurde das modB7-2-Protein, das bei der Infektion mit MCMV- Δ 6 modB7-2no1Exon entsteht, im Gegensatz zur MCMV- Δ 6 modB7-2 1.ATG-Infektion stark exprimiert. Wie in Abbildung 3.10 B zu sehen, entstehen noch weitere kleinere, schwächer exprimierte Proteine, wenn das 1. Exon fehlt. Dies deutet daraufhin, dass das 1. Exon einen Einfluss auf die modB7-2-Expression hat und dass bei seinem Fehlen eventuell Degradationsprodukte des modB7-2-Proteins entstehen. Dass es sich bei diesen Banden um Proteine handelt, die von einem im modB7-2-Gen weiter stromabwärts liegenden potentiellen Start-Kodon aus translatiert werden könnten, ist praktisch ausgeschlossen: Stromabwärts vom 3. ATG-Kodon gibt es nur noch ein weiteres ATG, welches nicht *in frame* liegt. Ein eventuell daraus resultierendes Protein könnte von dem spezifischen modB7-2-Antiserum nicht erkannt werden.

Auch die Verringerung der CD86-Oberflächenexpression des modB7-2-Proteins ist beeinträchtigt, wenn das 1. Exon fehlt. Die Daten in Abbildung 3.10 A zeigen, dass sich zwei Zellpopulationen

gebildet hatten: eine, in der die Verminderung der CD86-Oberflächenexpression wie bei Infektion mit MCMV- $\Delta 6$ modB7-2 FL abläuft, während in der zweiten Population der Effekt nicht eintrat. Folglich ist das 1. Exon des modB7-2-Gens für die volle Funktionalität essentiell.

Eine RNA-Sekundärstruktur, die sich mit dem ersten Exon der modB7-2-mRNA bilden könnte und so das Scanning des Ribosoms verlangsamt, könnte den Translationsstart am dritten Start-Kodon erleichtern (Siehe Abschnitt 4.2 und Kozak, 1990). Durch Vergleich der Kinetik der modB7-2-Expression und der Veränderung der CD86-Oberflächenexpression nach Infektion mit der Mutante MCMV- $\Delta 6$ modB7-2no1Exon und MCMV- $\Delta 6$ modB7-2 FL könnte man auf eine solche Veränderung der modB7-2-Expression schließen.

Es gibt Hinweise darauf, dass 5'-nicht-translatierte Exons Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren oder interne Promotorelemente enthalten (Zou et al., 1995; Edens und Talamantes, 1998). Die meisten dieser 5'-UTRs beinhalten ein oder mehrere ATG-Kodons, die stromaufwärts des ersten kodierenden ATG-Kodons liegen. Weniger als 10 % der eukaryotischen 5'-UTRs besitzen ein oder mehrere ATG-Kodons, allerdings liegt der Prozentsatz höher in 5'-UTRs von Wachstumsfaktoren, Oberflächenrezeptoren und Protoonkogenen (Pekhletsky et al., 1992; Edens und Talamantes, 1998)

Simari et al. konnten mit Transfektionsexperimenten zeigen, dass die Expression eines Reporters verstärkt wird, wenn das 5'-nicht-translatierte erste Exon und das erste Intron des HCMV-IE1-ORFs vor das Reportergen kloniert wurde (Simari et al., 1998). Ghazal und Nelson fanden ähnliche Effekte für das 1. Exon des HCMV-IE1-Gens. Sie konnten ein Sequenzelement (TGACCTCCATAGAAGACA) im 5'-nicht-translatierten ersten Exon identifizieren, welches in MCMV und SCMV (simian CMV) konserviert ist. Möglicherweise binden an diese Sequenzen Transkriptionsfaktoren, welche die Transkription unter der Kontrolle des humanen *major immediate early promotor* (MIEP) verstärken (Ghazal und Nelson, 1991). Dieses konservierte Motiv (TGACCTCCATAGAAGACA) ist nicht im modB7-2-Gen zu finden. Möglicherweise befinden sich hier andere transaktivierende Sequenzen, die spezifisch Einfluss auf die Transkription des modB7-2-Gens nehmen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass das modB7-2-Gen das 1. Exon für seine volle Aktivität benötigt. Ob tatsächlich die Sequenz des ersten Exons des modB7-2-Gens in der Lage ist, die Expression von Genen zu erhöhen, können sensitive Reporterassays mit der DNA-Sequenz des ersten modB7-2-Exons zeigen, idealerweise mit dem modB7-2-eigenen Promotor.

4.4 EXPRESSION UND AKTIVITÄT VON MODB7-2 AUßERHALB DES VIRUSKONTEXTES

In Kapitel 3.6 wurde modB7-2 mittels lentiviraler Transduktion unabhängig vom MCMV-Kontext exprimiert, um zu prüfen, ob das modB7-2-Protein auch allein die Reduktion der CD86-Oberflächenexpression bewirkt, oder ob dazu weitere virale Proteine benötigt werden. Die gewonnenen Ergebnisse ließen Rückschlüsse über mögliche weitere, für die Beeinflussung der CD86-Expression essentielle MCMV-Proteine zu. Es wurde gezeigt, dass bei lentiviraler Transduktion von DC2.4-Zellen mit den verschiedenen modB7-2-Varianten entweder gar keine oder nur eine sehr schwache Expression (im Fall des Konstrukts modB7-2 KodOP) festgestellt werden konnte (Abbildung 3.12 B). Erst nach Zugabe des Proteasom-Inhibitors MG-132 wurde eine modB7-2-Expression detektiert, wenn auch in unterschiedlichem Maße. Bei der HIV-1-Infektion hat MG-132 einen positiven Effekt auf die Infektion - wahrscheinlich zu frühen Zeitpunkten im Infektionszyklus (Schwartz et al., 1998). Santoni de Sio et al. konnten zeigen, dass durch MG-132-Zugabe bei der lentiviralen Transduktion die Effizienz erhöht wird; dieser Effekt war besonders stark bei hämatopoetischen Stammzellen (Santoni de Sio et al., 2006). Ein Effekt von MG-132 auf die Transduktionseffizienz ist bei dem in Abb. 3.12 B gezeigten Experiment unwahrscheinlich, da MG-132 erst 69 h nach der Transduktion zugegeben wurde. MG-132 stabilisiert hier eher das modB7-2-Protein, das sehr schnell durch das Proteasom degradiert zu werden scheint, wenn es unabhängig von anderen MCMV-Proteinen exprimiert wird.

Die Expression von modB7-2 nach lentiviraler Transduktion von DC2.4-Zellen hatte keinen Effekt auf die CD86-Oberflächenexpression (Abbildung 3.12 B und C), gleichgültig welches der verschiedenen modB7-2-Konstrukte verwendet wurde. Dass dies an einer zu geringen Menge an exprimiertem modB7-2-Protein lag, konnte ausgeschlossen werden (Abbildung 3.13). Somit liegt die Vermutung nahe, dass für die modB7-2-abhängige CD86-Internalisation in DC2.4-Zellen weitere MCMV-Proteine benötigt werden. Folglich muss modB7-2 einen anderen Wirkungsmechanismus besitzen als das KSHV-Protein K5, welches unabhängig von anderen KSHV-Proteinen die CD86-Degradation bewirken kann (Ishido et al., 2000; Coscoy und Ganem, 2001).

Bekannt ist, dass die CD86-Internalisation durch Ubiquitinierung von CD86 über MARCH-1 induziert wird (Jabbour et al., 2009). Denkbar wäre deshalb, dass modB7-2 ein weiteres virales Protein benötigt, welches CD86 ubiquitiniert oder in anderer Weise für die Internalisation markiert. ModB7-2 hat im Gegensatz zu K3 und K5 von KSHV keine RING-Domäne (Dodd et al., 2004; Lehner et al., 2005), und es ist somit unwahrscheinlich, dass modB7-2 selbst CD86 ubiquitiniert. Diese Ubiquitinierung könnte das unbekannte MCMV-Protein durchführen. Möglich wäre auch, dass MCMV zelluläre

Proteine (z. B. MARCH-1, -2 oder -8) für die CD86-Internalisation rekrutiert werden. Das unbekannte MCMV-Protein könnte modB7-2 zu einem MARCH-Protein eskortieren und anschließend könnte sich ein ternärer Komplex aus MARCH, modB7-2 und dem unbekanntem MCMV-Protein bilden. modB7-2 bringt diesen Komplex zu CD86, welches dann von MARCH ubiquitiniert und anschließend internalisiert wird.

Um die Beteiligung weiterer MCMV-Proteine zu bestätigen, ist in weiterführenden Versuchen zu testen, ob eine Infektion lentiviral transduzierter DC2.4-Zellen mit MCMV- $\Delta 6$ die CD86-Internalisation wieder herstellen kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurden erste Versuche dazu durchgeführt. Es wurden DC2.4-Zellen hergestellt, die nach lentiviraler Transduktion stabil modB7-2 zusammen mit GFP exprimieren. Es muss nun noch eine MCMV- $\Delta 6$ -Mutante kreiert werden, die anstatt GFP einen anderen Marker exprimiert, um modB7-2-exprimierende und MCMV- $\Delta 6$ -infizierte Zellen detektieren zu können. Außerdem könnte man Koimmunopräzipitations—Experimente mit Antikörpern gegen modB7-2 und CD86 durchführen. Möglicherweise ließe sich so das postulierte weitere MCMV-Protein koimmunopräzipitieren und identifizieren. Die Bestätigung eines dritten MCMV-Proteins unterstützt die weiterführende Analyse des Mechanismus, wie CD86 durch modB7-2 für die Internalisierung markiert wird. Dies könnte dann auch Erkenntnisse zum unterschiedlichen Mechanismus in RAW264.7- und DC2.4-Zellen liefern.

4.5 SUBZELLULÄRE LOKALISATION VON MODB7-2 UND POTENTIELLE FUNKTION DES ACIDIC CLUSTERS

Für das modB7-2-Protein wurde vorhergesagt, dass es sich um ein Transmembranprotein des Typs IIIb mit zwei membrandurchspannenden Domänen handelt (Loewendorf, 2005). Somit sollte sich modB7-2 in Membranen befinden und zumindest in einer der Organellen des sekretorischen Weges detektierbar sein.

Zunächst ließ sich ein Unterschied in der Lokalisation der Marker Calnexin und EEA-1 zwischen nicht-infizierten und infizierten Zellen feststellen. Die Lokalisation des Markerproteins für den Golgi-Apparat war dagegen nicht verändert. Für HCMV ist bekannt, dass es nach Infektion zu einer Umstrukturierung der Zellorganelle kommt: Perinukleär bildet sich der *virion assembly complex*, hier findet das letzte Stadium der Virusassemblierung und –reifung statt. Bei diesen Einschlüssen handelt sich um umgelagerte Zellorganellen des sekretorischen Weges, die sich in konzentrischen Ringen aufbauen: Im Zentrum dieses *virion assembly complex* befinden sich EEA-1-positive Strukturen;

außerhalb davon findet man TGN-positive Strukturen. Geht man innerhalb dieses Komplexes weiter nach außen findet man ER-Strukturen (Sanchez et al., 2000; Das et al., 2007). In der vorliegenden Arbeit konnte auch eine solche Umlagerung der Zellorganellen nach MCMV-Infektion von DC2.4-Zellen beobachtet werden; ob dies auch einen in konzentrischen Ringen aufgebauten *virion assembly complex* darstellt, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Zu allen untersuchten Zeitpunkten konnte man eine Kolo­kalisierung von GM130 mit einem Großteil der modB7-2-Protein-Population beobachten, während eine Kolo­kalisierung mit Calnexin eher schwach war. Die Hauptmenge des modB7-2-Proteins ist folglich im Golgi-Apparat lokalisiert; modB7-2 ist also in DC2.4-Zellen wie erwartet in Organellen des sekretorischen Weges exprimiert.

Da sich das modB7-2-Protein größtenteils im Golgi-Apparat aufhält, wurde die modB7-2-Aminosäuresequenz auf mögliche Motive untersucht, welche diese Lokalisation erklären könnten. Es wurde ein *Acidic Cluster* ⁴⁹EEDE⁵² gefunden (Abbildung 3.17), ähnlich dem *Acidic Cluster* des HIV-Proteins Nef (Greenberg et al., 1998). Die Mutation dieses *Acidic Clusters* führte allerdings zu keiner Änderung der Lokalisation von modB7-2 (Abbildung 3.19). Bei Infektion von DC2.4-Zellen mit der Mutante MCMV-Δ6 modB7-2 ΔAC wurde auch die CD86-Oberflächenexpression ähnlich stark verringert wie bei Infektion mit MCMV-Δ6 modB7-2 FL. Somit ist die Lokalisation sowie Funktion von modB7-2 nicht von dem Motiv ⁴⁹EEDE⁵² abhängig. Denkbar wäre, dass noch weitere Aminosäuren zum sauren Motiv dazugehören: In der Sequenzumgebung von ⁴⁹EEDE⁵² befinden sich weitere saure Reste ⁴¹KDRRDADR⁴⁸ (Abbildung 3.17). Bei Nef hat die Mutation des ACs ⁶²EEEE⁶⁵ in ⁶²AAAA⁶⁵ die Reduktion von MHC-I von der Oberfläche komplett aufgehoben; allerdings nur bei vollständiger Mutation des *Acidic Clusters*. Die Mutation einzelner oder zweier saurer Aminosäuren hat kaum einen Effekt; die Mutation von drei der vier sauren Reste führt zu einer Reduzierung des Effektes um 50 % (Greenberg et al., 1998; Baugh et al., 2008). Durch Mutation aller sauren Cluster könnte man feststellen, ob diese *Acidic Cluster* verantwortlich sind für die Lokalisation von modB7 2 im Golgi-Apparat. Führt diese Mutation zu einer Misslokalisierung von modB7-2, könnte man feststellen, ob die Lokalisation von modB7-2 im Golgi-Apparat essentiell für seine Funktion ist. Zudem könnte man auch modB7-2 durch Einfügen anderer Lokalisierungssignale in die modB7-2-Aminosäuresequenz, wie z. B. eines ER-Retentionssignales, in andere Kompartimente rekrutieren und dann analysieren, inwieweit modB7-2 noch funktionell ist.

Ob das modB7-2-Protein auch an die Zelloberfläche gelangt, konnte durch die verwendete Technik der Immunfluoreszenzmikroskopie nicht festgestellt werden. Daher wurde durch Degradation der Zelloberflächenproteine durch Pronase untersucht, ob modB7-2-Protein an die Zelloberfläche gelangt.

modB7-2 erwies sich als Pronase-sensitiv und könnte sich folglich an der Zelloberfläche aufhalten. Allerdings war der kleine Shift von nur 1-2 kDa in der molekularen Masse unerwartet: Für modB7-2 wurde ein Typ IIIb-Transmembranprotein vorhergesagt. Entsprechend würden sich N- und C-Terminus auf einer Seite der Zellmembran befinden und ein kleiner *loop* auf der anderen Seite (vgl. Abbildung 1.7). Würde der kleine *loop* außen liegen und durch Pronase abgebaut, blieben zwei transmembranverankerte Proteinfragmente zurück. Da das modB7-2-Antiserum gegen den C-Terminus gerichtet ist, sollte das C-terminale Proteinfragment von ca. 4,3 kDa erkannt werden. Die beobachtete Veränderung ist mit der erwarteten Membrantopologie von modB7-2 nicht erklärbar. Wenn der C-Terminus außen liegen und von Pronase degradiert werden würde, wäre im Western Blot kein Signal mehr detektierbar. Da auch dies nicht der Fall ist, muss eine andere Struktur von modB7-2 angenommen werden.

Eventuell könnte die Beobachtung erklärt werden, wenn man annimmt, dass bei der Pronasebehandlung posttranslationale Modifikationen entfernt wurden. Deshalb wurden *in silico*-Analysen für N- und O-Glykosylierung sowie Phosphorylierung durchgeführt. Da weder O- noch N-Glykosylierung von modB7-2 vorhergesagt wurden (Abbildung 3.22) und auch experimentell keine Hinweise für Glykosylierungen gefunden wurden (Abbildung 3.24), ist modB7-2 wahrscheinlich nicht glykosyliert. *In silico* wurden vier putative phosphorylierbare Reste gefunden; experimentell ergaben sich auch keine Hinweise auf Phosphorylierung (Abbildung 3.23 und 3.24). Möglich ist, dass modB7-2 eine andere Membrantopologie besitzt, und deshalb andere modB7-2-Fragmente in der Pronasebehandlung entstehen können.

Letztlich Aufschluss über die gewonnenen Erkenntnisse werden Experimente zur Orientierung von modB7-2 in der Membran geben und die Bestätigung, ob modB7-2 tatsächlich zwei Transmembrandomänen besitzt. Da modB7-2 keine Glykosylierung aufweist, könnte man dies durch Einfügen künstlicher Glykosylierungsstellen an verschiedenen Stellen innerhalb der Aminosäuresequenz von modB7-2 herausfinden (Chavez und Hall, 1991; Popov et al., 1997; Liu et al., 2002): Wird das Protein glykosyliert befindet sich die entsprechende Domäne im luminalen Teil im ER/Golgi und damit später außerhalb der Zelle. Wird die Domäne nicht glykosyliert, befindet sie sich im Zytoplasma. Durch Einfügen dieser künstlichen Glykosylierungsstellen an unterschiedlichen Positionen innerhalb der modB7-2-Sequenz könnte so die Topologie von modB7-2 erforscht werden.

Des Weiteren ist anzumerken, dass im Western Blot bei den Pronase-behandelten Proben auch zwei GAPDH-spezifische Proteinbanden detektiert wurden, während in den nicht behandelten Proben nur eine GAPDH-spezifische Proteinbande nachzuweisen war. Dies deutet darauf hin, dass Pronase eventuell in geringen Mengen auch in das Zellinnere gelangen konnte und so auch die intrazellulär lokalisierten GAPDH- und modB7-2-Proteine teilweise spalten konnte.

Auch wenn die Ergebnisse der Pronasebehandlung noch Fragen offenlassen und diese durch weitere Versuche geklärt werden müssen, deuten die vorhandenen Ergebnisse darauf hin, dass ein Teil der modB7-2-Moleküle die Zelloberfläche erreicht. Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse, dass modB7-2 sich hauptsächlich im Golgi aufhält. Da 12 h p. i. modB7-2 mit EEA-1 kolokalisiert und sich somit in frühen Endosomen aufhält, ist es denkbar, dass modB7-2 zwischen Golgi und Zelloberfläche pendelt, um die CD86-Internalisation zu bewirken. Es ist möglich, dass modB7-2 dabei CD86 an die Zelloberfläche begleitet und dieses dann in die frühen Endosomen eskortiert. Von hier wandert modB7-2 dann zurück in den Golgi. Denkbar ist auch, dass sich im Golgi der in Kapitel 4.4 postulierte ternäre Komplex aus MARCH-Protein, modB7-2 und eventuell einem weiteren beteiligten MCMV-Protein bildet. Dieser Komplex könnte dann zur Zelloberfläche transportiert werden und an der Zelloberfläche CD86 für die Internalisation markieren. Die meisten der zellulären MARCH-Proteine halten sich in endosomalen-lysosomalen Kompartimenten der Zelle auf, wobei MARCH-1 und MARCH-8 zudem an der Plasmamembran zu finden sind (Bartee et al., 2004; Eyster et al., 2011). Jabbour et al. konnten auch eine Lokalisation von MARCH-1 in trans-Golgi-Strukturen nachweisen (Jabbour et al., 2009). Somit wäre ein Komplex aus MARCH-Protein und modB7-2 sowohl im Golgi-Apparat als auch an der Zellmembran denkbar.

4.6 EINFLUSS VON MODB7-2 AUF DIE ZUM ZEITPUNKT DER INFESTION AUF DER ZELLOBERFLÄCHE VORHANDENEN CD86-MOLEKÜLE

Da modB7-2 sich sowohl im Golgi-Apparat als auch an der Plasmamembran aufhält, könnte das modB7-2-Protein schon im Golgi-Apparat CD86 beeinflussen, mit CD86 interagieren und CD86 für die Internalisation markieren. Es ist aber auch denkbar, dass CD86 die Zelloberfläche nicht mehr erreicht und entweder im Golgi zurückgehalten wird oder vielleicht direkt zu den Lysosomen transportiert wird. Der Verlust der CD86-Moleküle auf der Zelloberfläche würde dann indirekt entstehen, da keine neuen CD86-Moleküle mehr die Zelloberfläche erreichen. ModB7-2 könnte allerdings auch an die Zelloberfläche transportiert werden, um direkt oder indirekt mit C86 zu interagieren. Um Hinweise über den Mechanismus der Reduktion der CD86-Oberflächenexpression zu erlangen, wurde der Einfluss von modB7-2 auf die zum Zeitpunkt der Infektion auf der Zelloberfläche vorhandene CD86-Population untersucht (siehe Abbildung 3.26): Bei Infektion von DC2.4-Zellen mit MCMV-WT, MCMV- $\Delta 6$ und MCMV- $\Delta 6$ modB7-2 FL konnte ein Effekt auf die CD86-Population, die sich zum Zeitpunkt der Infektion auf der Zelloberfläche befand, festgestellt werden. Die Infektion an sich hatte schon Auswirkungen auf diese CD86-Fraktion, allerdings waren diese stärker bei Infektion mit MCMV-WT

bzw. MCMV- $\Delta 6$ modB7-2 FL und folglich überwiegend von modB7-2 gesteuert. Bei Infektion mit MCMV- $\Delta 6$ erhöhte sich die CD86-Menge auf der Zelloberfläche im Vergleich zu mock-infizierten Zellen (siehe Abbildung 3.26 „normale Färbung“). Möglicherweise führt die Infektion an sich zur Neusynthese von CD86-Molekülen oder einem schnellen Transport von CD86-Molekülen aus einem Speicherorganell an die Zelloberfläche. In dendritischen Zellen wird die CD86-Oberflächenexpression durch bakterielle oder virale Stimuli aktiviert (Mellman und Steinman, 2001). In humanen Monozyten und humanen dendritischen Zellen wurde ein intrazelluläres Reservoir für CD86 identifiziert (Smyth et al., 1998; Smyth et al., 2004). Bei Bedarf - z. B. bei inflammatorischen Stimuli - kann dann CD86 sehr schnell zur Oberfläche transportiert werden. Schon auf der Oberfläche vorhandene CD86-Moleküle könnten dann vielleicht einem schnellen *turnover* unterliegen bzw. sehr schnell recycelt werden. Diese aufgrund der Infektion stattfindende Steigerung der CD86-Expression auf der Zelloberfläche kann jedoch von modB7-2 kompensiert werden, da modB7-2 nicht nur vorhandene CD86-Moleküle internalisiert, sondern auch entweder die Stimulation der CD86-Oberflächenexpression unterbindet oder neu an der Zelloberfläche ankommenden CD86-Moleküle effizient und schnell zur Internalisierung zwingt. Dass modB7-2 spezifisch einen Effekt auf die zum Infektionszeitpunkt auf der Zelloberfläche vorhandenen CD86-Moleküle hat und dass der Effekt auf diese CD86-Population stärker ist als der unspezifische in der MCMV- $\Delta 6$ -Infektion, unterstützt die Hypothese, dass modB7-2 direkt oder indirekt mit CD86 an der Zelloberfläche interagiert und dass CD86-Moleküle nicht im Golgi zurückgehalten werden.

4.7 DEGRADATION INTERNALISierter CD86-REZEPTOREN IN DEN LYSOSOMEN

In den weiteren Experimenten wurde untersucht, was mit CD86 nach seiner modB7-2-abhängigen Internalisation geschieht. Unter anderem könnte CD86 zum Einen intrazellulär in dem genannten Reservoir (Smyth et al., 1998; Smyth et al., 2004) oder wie für Nef beschrieben im Golgi gespeichert werden (Chaudhry et al., 2005; Chaudhry et al., 2008), zum Anderen könnte CD86 zu den Lysosomen transportiert und abgebaut werden.

Interessant war die Feststellung, dass CD86 nach 24 h nach Infektion durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie noch detektierbar war (Abbildung 3.27). Da diese Technik nur eine qualitative und keine quantitative Aussage zulässt, wurde die CD86-Expression nach Infektion in sortierten Zellen in der Western Blot-Analyse untersucht: Hier wurde deutlich, dass CD86 nach Infektion nach Internalisation von der Zelle abgebaut wird (siehe Abbildung 3.28). Die Diskrepanz dieser beiden Ergebnisse ließ sich durch die beiden folgenden Experimente klären: Die Behandlung der Zelloberflächenproteine mit

Pronase bestätigte, dass CD86 nach Internalisation nicht intrazellulär gespeichert wird. Die EndoH-Behandlung legte nahe, dass es sich bei den nach Pronase-Behandlung verbleibenden Proteinen um ER-residente CD86-Moleküle handelt. Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass das CD86-Signal, das durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie in infizierten Zellen detektiert werden konnte, CD86-Moleküle im ER und möglicherweise im Golgi-Apparat repräsentiert, welche noch nicht die Zelloberfläche erreicht haben und noch nicht von modB7-2 modifiziert wurden.

Eine weitere Bestätigung, dass CD86 nach Infektion degradiert wird, zeigte die Behandlung mit Inhibitoren proteasomaler und lysosomaler Proteasen: Bei Zugabe des Inhibitors zum Infektionszeitpunkt waren 9 h p. i. die CD86-Moleküle noch vorhanden, während bei Abwesenheit der Inhibitoren eine Degradation von CD86 in infizierten Zellen detektiert werden konnte (Abbildung 3.32 B). 19 h nach Infektion hatte die fünfständige Inhibitorzugabe keinen Effekt auf die CD86-Degradation (Abbildung 3.31). Wahrscheinlich waren zu diesem Zeitpunkt alle CD86-Moleküle schon modB7-2-abhängig degradiert worden.

Die Zugabe der Inhibitoren zum Infektionszeitpunkt stellte die CD86-Expression wieder her, wobei der Effekt bei Proteasom-Inhibition stärker war als bei der Inhibition der lysosomalen Proteasen (Abbildung 3.32 B). Auffallend war, dass bei Anwesenheit von MG-132 modB7-2 schwächer exprimiert wurde, so dass dies wahrscheinlich einen Grund für den stärkeren Effekt von MG-132 darstellt. In der Tat beeinflussen Proteasom-Inhibitoren den Replikationszyklus verschiedener Viren: Der Zelleintritt von Influenza-Viren ist bei Anwesenheit von proteasomalen Inhibitoren behindert und die Viren verbleiben in Endosomen (Khor et al., 2003). Für HCMV wurde ein negativer Einfluss der proteasomalen Inhibition auf die HCMV-Replikation, auf die Expression sehr früher und später Proteine sowie auf die Immunmodulation beschrieben (Prösch et al., 2004; Kaspari et al., 2008).

Der Effekt von MG-132 ist also u. a. auf die verringerte modB7-2-Expression und wahrscheinliche Beeinträchtigung des MCMV-Replikationszyklus zurückzuführen. Möglich ist allerdings auch, dass aufgrund indirekter Effekte durch die Inhibition des Proteasoms auch eine Inhibition der CD86-Internalisation auftritt. Auch für das MCMV-Protein m155 ist bekannt, dass m155 die Expression des Proteins H60 von der Zelloberfläche vermindert; dabei kann die Inkubation mit Proteasom-Inhibitoren die Verringerung der H60-Oberflächenexpression blocken (Lodoen et al., 2002). Bei der KSHV-Infektion führt die Proteasom-Inhibition zu einem Verlust der K3-abhängigen MHC-I-Degradation (Lorenzo et al., 2002). Tatsächlich wurde aber auch eine direkte Beteiligung des Proteasoms an der Degradation von Zelloberflächenrezeptoren beschrieben; ebenfalls wurde ein Zusammenwirken zwischen Lysosom und Proteasom bei diesem Prozess vorgeschlagen (Jeffers et al., 1997; Mori et al., 1995).

Der Effekt von MG-132 ist deshalb wahrscheinlich indirekt und deutet nicht auf eine Rolle des Proteasoms beim Abbau von CD86 hin. Die stärkere CD86-Expression bei Anwesenheit von Leupeptin ist dagegen ein guter Hinweis auf die lysosomale Degradation von CD86. Deshalb sollte weiterführend untersucht werden, ob durch Zugabe von Leupeptin auch die CD86-Internalisation inhibiert wird.

4.8 MECHANISMEN DER CD86-INTERNALISATION IN MCMV-INFIZIERTEN DC2.4-ZELLEN

Mittels verschiedener Inhibitoren wurde untersucht, über welchen Weg CD86 bei MCMV-Infektion internalisiert wird: NH_4Cl führt zu einer pH-Erhöhung endozytotischer Vesikel und inhibiert die Rezeptorvermittelte Endozytose (Ohkuma und Poole, 1978; Maxfield et al., 1982; Tietze et al. 1980; Sando et al. 1979). Chlorpromazin inhibiert die Clathrin-vermittelte Endozytose und Filipin blockiert die *Calveolae*-abhängige Endozytose (Wang et al., 1993; Schnitzer et al., 1994). Dynasore hemmt Dynamin-1 und -2 und unterbindet damit die Clathrin-vermittelte Endozytose sowie durch *Calveolae* (Macia et al., 2006; Damke et al., 1994; Nabi und Le, 2003). Die Wirkung der Inhibitoren ist schematisch nochmal in Abbildung 4.3 zusammengefasst.

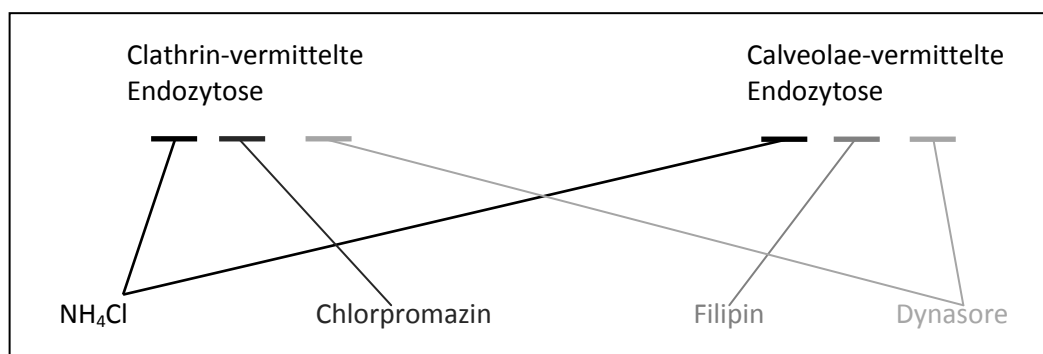


Abbildung 4.3 Inhibierende Wirkung der Substanzen Ammoniumchlorid, Chlorpromazin, Filipin und Dynasore auf die Clathrin-abhängige und die Calveolae-vermittelte Endozytose

Zunächst wurde festgestellt, dass die neunstündige Inkubation nicht-infizierter Zellen mit den verwendeten Inhibitoren keinen Einfluss auf die CD86-Oberflächenexpression zeigte (Abbildung 3.33 A). Somit haben die verwendeten Inhibitoren keinen Einfluss auf die CD86-Oberflächenexpression in nicht-infizierten Zellen, und der Effekt der Inhibitoren in MCMV-infizierten Zellen ist somit nicht auf unspezifische Wirkung der Inhibitoren auf die CD86-Lokalisation zurückzuführen.

In infizierten DC2.4-Zellen blockierten NH_4Cl und Dynasore die Reduktion der CD86-Expression auf der Zelloberfläche komplett, während Chlorpromazin einen schwachen Einfluss auf die CD86-Internalisation hatte. Filipin verstärkte dagegen die CD86-Oberflächenexpression (Abbildung 3.33 B).

Kontrollexperimente zeigten, dass bei Inkubation mit NH_4Cl kaum Expression von modB7-2 und M57 stattfand und folglich der Infektionszyklus beeinträchtigt war. Dieses Ergebnis konnte deshalb für die Bewertung des Endozytosemechanismus nicht berücksichtigt werden. Bei den drei anderen Inhibitoren war kein Einfluss auf den Infektionszyklus feststellbar.

Beim Blick auf die FACS-Ergebnisse zeigt sich, dass die Blocker der Clathrin-vermittelten Endozytose die CD86-Internalisation hemmten, während der Inhibitor der *calveolae*-vermittelten Endozytose die CD86-Oberflächenexpression eher verstärkte. Deshalb wird auf eine Clathrin-abhängige Aufnahme von CD86 bei Infektion von DC2.4-Zellen mit MCMV geschlossen. Experimente, die diese Ergebnisse verifizieren könnten, wären z. B. Co-IP-Experimente, hier könnte man Proteine der Clathrin-vermittelten Endozytose (wie z. B. AP-1 oder Clathrin) präzipitieren und untersuchen, ob CD86 ko-präzipitiert. Auch ein *knock down* von Proteinen dieses Endozytoseweges durch Transfektion von siRNA könnte bestätigen, dass CD86 über Clathrin-abhängig Endozytose internalisiert wird.

Außerdem sollte untersucht werden, ob CD86 in der MCMV-Infektion ubiquitiniert wird und ob durch die Ubiquitinierung das Signal für die Endozytose gegeben wird. Monoubiquitinierung ist ein gut charakterisiertes Signal für die Endozytose (Haglund et al., 2003). CD86 kann z. B. durch MARCH-1 und MARCH-8 ubiquitiniert werden. Die Ubiquitinierung findet an mehreren Lysinresten in cytoplasmatischen Teil von CD86 statt, und für die Interaktion der beiden MARCH-Proteine sind die Transmembrandomäne und der cytoplasmatische Teil von CD86 essentiell (Corcoran et al., 2011; Baravalle et al., 2011; Bartee et al., 2004; Goto et al., 2003).

4.9 MODB7-2-ABHÄNGIGE CD86-INTERNALISATION – EIN MODELL

Zusammenfassend wird anhand der in dieser Arbeit gewonnen Ergebnisse und der in der Literatur dargestellten Erkenntnisse ein Modell postuliert, wie die Verringerung der CD86-Expression an der Zelloberfläche durch modB7-2 von statten gehen könnte (siehe Abbildung 4.4).

modB7-2 wird im MCMV-Infektionszyklus früh exprimiert; nach der Transkription wird die modB7-2-mRNA gespleißt, wodurch die Expression von modB7-2 wahrscheinlich verstärkt wird (Loewendorf et al., 2004; Loewendorf, 2005). Die folgende Translation der modB7-2-mRNA beginnt am 3. ATG-

Kodon; das 5'-nicht-translatierte Exon dient möglicherweise zur Regulation der Translation. Das modB7-2-Protein wird als putatives Transmembranprotein in den sekretorischen Weg der Zelle eingebracht, die Hauptmenge ist im Golgi-Apparat anzutreffen (Abbildung 4.4, ① + ②); im Laufe der Infektion ist modB7-2 im endoplasmatischen Retikulum sowie in EEA-1-positiven (=frühen endosomalen) Strukturen zu finden. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass das modB7-2-Protein mit einem weiteren, bisher unbekanntem MCMV-Protein interagiert, welches für die modB7-2-abhängige Internalisation von CD86 benötigt wird. modB7-2 wird im Komplex mit diesem MCMV-Protein an die Zelloberfläche transportiert (Abbildung 4.4, ③), und trifft dort auf die CD86-Moleküle sowie die dort residenten MARCH-Proteine (Bartee et al., 2004; Eyster et al., 2011) oder andere Ubiquitin-E3-Ligasen. Man könnte sich vorstellen, dass modB7-2 die Bindung an CD86 vermittelt, während das andere MCMV-Protein die Interaktion zu MARCH herstellt. Auf diese Weise würde das MARCH-Protein in räumliche Nähe zu CD86 gebracht um CD86 zu ubiquitinieren.

Das ubiquitinierte CD86 wird über Clathrin-abhängige Mechanismen endozytiert (Abbildung 4.4, ④), potentiell zusammen mit dem modB7-2-Komplex. CD86 wird über frühe Endosomen zu den Lysosomen transportiert und dort degradiert (Abbildung 4.4, ⑤), während sich der modB7-2-Komplex in den frühen Endosomen von CD86 trennt und wieder zurück zum Golgi-Apparat transportiert wird (Abbildung 4.4, ⑥).

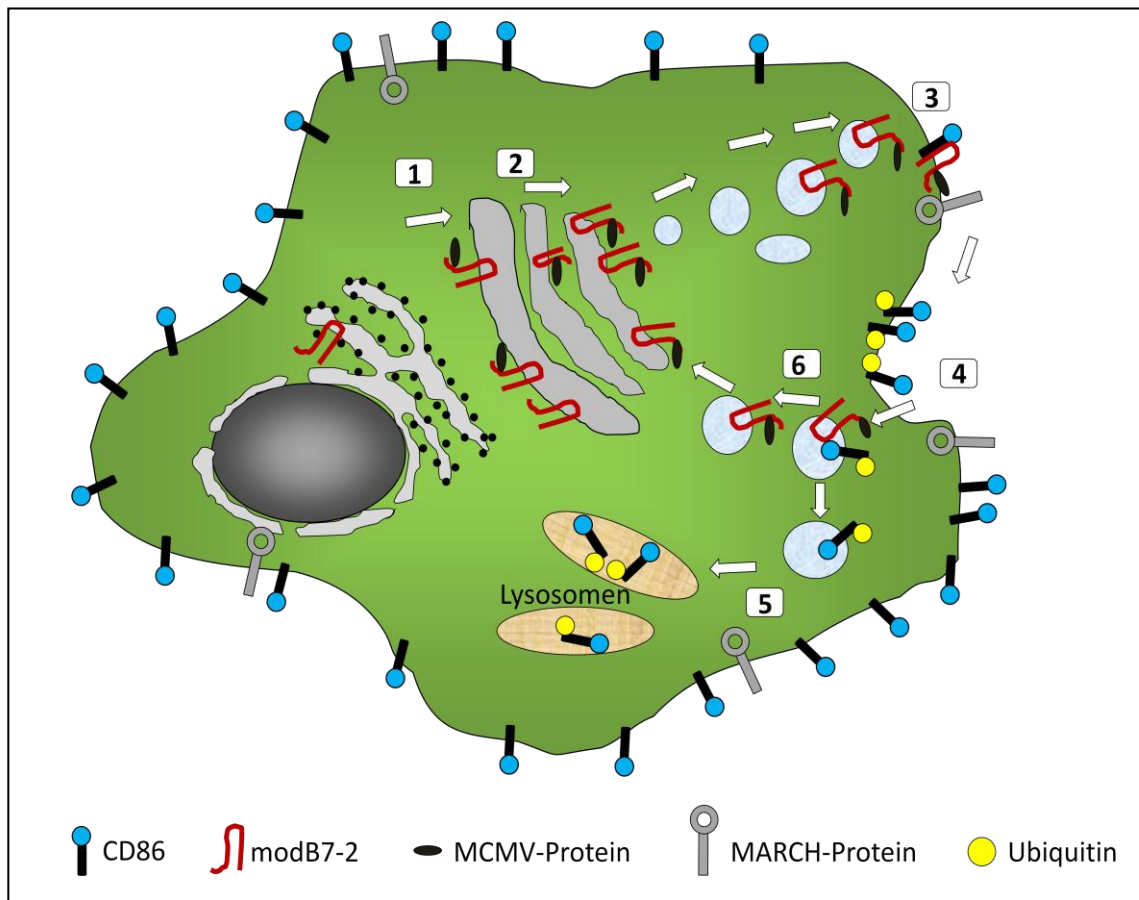


Abbildung 4.4 Modell der modB7-2-abhängigen Reduktion der CD86-Oberflächenexpression auf der Zelloberfläche infizierter DC2.4-Zellen

modB7-2 (rot) wird als putatives Transmembranprotein in den sekretorischen Weg der Zelle eingebracht über das endoplasmatische Retikulum in den Golgi-Apparat transportiert (1), wo es möglicherweise mit einem weiteren unbekanntem MCMV-Protein (dunkelgrau) interagiert und einen Komplex bildet (2). Dieser Komplex wird dann an die Zelloberfläche transportiert (3), wo er ein MARCH-Protein stabilisiert und in die räumliche Nähe zu CD86 bringt (4). MARCH ubiquitiniert CD86, woraufhin CD86 zu den Lysosomen transportiert und abgebaut wird (5); modB7-2 wird zum Golgi-Apparat zurückgebracht (6).

Kapitel 5 LITERATURNACHWEISE

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

Ahn,K., Gruhler,A., Galocha,B., Jones,T.R., Wiertz,E.J., Ploegh,H.L., Peterson,P.A., Yang,Y., and Fruh,K. (1997). The ER-luminal domain of the HCMV glycoprotein US6 inhibits peptide translocation by TAP. *Immunity.* 6, 613-621.

Alegre,M.L., Frauwirth,K.A., and Thompson,C.B. (2001). T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat. Rev. Immunol.* 1, 220-228.

Andrews,D.M., Andoniou,C.E., Granucci,F., Ricciardi-Castagnoli,P., and Degli-Esposti,M.A. (2001). Infection of dendritic cells by murine cytomegalovirus induces functional paralysis. *Nat. Immunol.* 2, 1077-1084.

Arase,H. and Lanier,L.L. (2004). Specific recognition of virus-infected cells by paired NK receptors. *Rev. Med. Virol.* 14, 83-93.

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

Asberg,A., Humar,A., Rollag,H., Jardine,A.G., Mouas,H., Pescovitz,M.D., Sgarabotto,D., Tuncer,M., Noronha,I.L., and Hartmann,A. (2007). Oral valganciclovir is noninferior to intravenous ganciclovir for the treatment of cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *Am. J. Transplant.* 7, 2106-2113.

Atherton,S.S. and Cathcart,H.M. (2010). Anterior segment mechanisms of protection during herpes simplex virus 1 infection. *Jpn. J. Ophthalmol.* 54, 182-186.

Baravalle,G., Park,H., McSweeney,M., Ohmura-Hoshino,M., Matsuki,Y., Ishido,S., and Shin,J.S. (2011). Ubiquitination of CD86 is a key mechanism in regulating antigen presentation by dendritic cells. *J. Immunol.* 187, 2966-2973.

Barreira,d.S. and Munz,C. (2011). Natural killer cell activation by dendritic cells: balancing inhibitory and activating signals. *Cell Mol. Life Sci.* 68, 3505-3518.

Barriere,H., Nemes,C., Du,K., and Lukacs,G.L. (2007). Plasticity of polyubiquitin recognition as lysosomal targeting signals by the endosomal sorting machinery. *Mol. Biol. Cell* 18, 3952-3965.

Barriere,H., Nemes,C., Lechardeur,D., Khan-Mohammad,M., Fruh,K., and Lukacs,G.L. (2006). Molecular basis of oligoubiquitin-dependent internalization of membrane proteins in Mammalian cells. *Traffic.* 7, 282-297.

Barry,A.P., Silvestri,G., Safrit,J.T., Sumpter,B., Kozyr,N., McClure,H.M., Staprans,S.I., and Feinberg,M.B. (2007). Depletion of CD8+ cells in sooty mangabey monkeys naturally infected with

simian immunodeficiency virus reveals limited role for immune control of virus replication in a natural host species. *J. Immunol.* **178**, 8002-8012.

Bartee,E., Mansouri,M., Hovey Nerenberg,B.T., Gouveia,K., and Fruh,K. (2004). Downregulation of major histocompatibility complex class I by human ubiquitin ligases related to viral immune evasion proteins. *J. Virol.* **78**, 1109-1120.

Baugh,L.L., Garcia,J.V., and Foster,J.L. (2008). Functional characterization of the human immunodeficiency virus type 1 Nef acidic domain. *J. Virol.* **82**, 9657-9667.

Baum,C., Hegewisch-Becker,S., Eckert,H.G., Stocking,C., and Ostertag,W. (1995). Novel retroviral vectors for efficient expression of the multidrug resistance (mdr-1) gene in early hematopoietic cells. *J. Virol.* **69**, 7541-7547.

Benkartek, C. Eigenschaften und Funktion der M25-Proteine des murinen Cytomegalovirus - Schlüsselfaktoren des viral induzierten cytopathischen Effekts. Doktorarbeit, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, 2010

Bhatia,S., Edidin,M., Almo,S.C., and Nathenson,S.G. (2005). Different cell surface oligomeric states of B7-1 and B7-2: implications for signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**, 15569-15574.

Boeckh,M. and Ljungman,P. (2009). How we treat cytomegalovirus in hematopoietic cell transplant recipients. *Blood* **113**, 5711-5719.

Boehme,K.W. and Compton,T. (2004). Innate sensing of viruses by toll-like receptors. *J. Virol.* **78**, 7867-7873.

Boehme,K.W., Guerrero,M., and Compton,T. (2006). Human cytomegalovirus envelope glycoproteins B and H are necessary for TLR2 activation in permissive cells. *J. Immunol.* **177**, 7094-7102.

Boehmer,P.E. and Nimonkar,A.V. (2003). Herpes virus replication. *IUBMB. Life* **55**, 13-22.

Bracci-Laudiero,L., Aloe,L., Caroleo,M.C., Buanne,P., Costa,N., Starace,G., and Lundeberg,T. (2005). Endogenous NGF regulates CGRP expression in human monocytes, and affects HLA-DR and CD86 expression and IL-10 production. *Blood* **106**, 3507-3514.

Brown,M.G., Dokun,A.O., Heusel,J.W., Smith,H.R., Beckman,D.L., Blattenberger,E.A., Dubbelde,C.E., Stone,L.R., Scalzo,A.A., and Yokoyama,W.M. (2001). Vital involvement of a natural killer cell activation receptor in resistance to viral infection. *Science* **292**, 934-937.

Brown,W.J., Goodhouse,J., and Farquhar,M.G. (1986). Mannose-6-phosphate receptors for lysosomal enzymes cycle between the Golgi complex and endosomes. *J. Cell Biol.* **103**, 1235-1247.

Bukowski,J.F., Warner,J.F., Dennert,G., and Welsh,R.M. (1985). Adoptive transfer studies demonstrating the antiviral effect of natural killer cells in vivo. *J. Exp. Med.* **161**, 40-52.

Bukowski,J.F., Woda,B.A., Habu,S., Okumura,K., and Welsh,R.M. (1983). Natural killer cell depletion enhances virus synthesis and virus-induced hepatitis in vivo. *J. Immunol.* **131**, 1531-1538.

Bunde,T., Kirchner,A., Hoffmeister,B., Habedank,D., Hetzer,R., Cherepnev,G., Proesch,S., Reinke,P., Volk,H.D., Lehmkuhl,H., and Kern,F. (2005). Protection from cytomegalovirus after transplantation is correlated with immediate early 1-specific CD8 T cells. *J. Exp. Med.* **201**, 1031-1036.

Carucci,J.A., Ignatius,R., Wei,Y., Cypess,A.M., Schaer,D.A., Pope,M., Steinman,R.M., and Mojsov,S. (2000). Calcitonin gene-related peptide decreases expression of HLA-DR and CD86 by human dendritic cells and dampens dendritic cell-driven T cell-proliferative responses via the type I calcitonin gene-related peptide receptor. *J. Immunol.* *164*, 3494-3499.

Casazza,J.P., Betts,M.R., Price,D.A., Precopio,M.L., Ruff,L.E., Brenchley,J.M., Hill,B.J., Roederer,M., Douek,D.C., and Koup,R.A. (2006). Acquisition of direct antiviral effector functions by CMV-specific CD4+ T lymphocytes with cellular maturation. *J. Exp. Med.* *203*, 2865-2877.

Cepeda,V., Esteban,M., and Fraile-Ramos,A. (2010). Human cytomegalovirus final envelopment on membranes containing both trans-Golgi network and endosomal markers. *Cell Microbiol.* *12*, 386-404.

Cesarman,E., Chang,Y., Moore,P.S., Said,J.W., and Knowles,D.M. (1995). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-related body-cavity-based lymphomas. *N. Engl. J. Med.* *332*, 1186-1191.

Chang,Y., Cesarman,E., Pessin,M.S., Lee,F., Culpepper,J., Knowles,D.M., and Moore,P.S. (1994). Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* *266*, 1865-1869.

Chaudhry,A., Das,S.R., Hussain,A., Mayor,S., George,A., Bal,V., Jameel,S., and Rath,S. (2005). The Nef protein of HIV-1 induces loss of cell surface costimulatory molecules CD80 and CD86 in APCs. *J. Immunol.* *175*, 4566-4574.

Chaudhry,A., Das,S.R., Jameel,S., George,A., Bal,V., Mayor,S., and Rath,S. (2008). HIV-1 Nef induces a Rab11-dependent routing of endocytosed immune costimulatory proteins CD80 and CD86 to the Golgi. *Traffic.* *9*, 1925-1935.

Chavez,R.A. and Hall,Z.W. (1991). The transmembrane topology of the amino terminus of the alpha subunit of the nicotinic acetylcholine receptor. *J. Biol. Chem.* *266*, 15532-15538.

Cherepanov,P.P. and Wackernagel,W. (1995). Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of F1p-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* *158*, 9-14.

Collins,T.M., Quirk,M.R., and Jordan,M.C. (1994). Biphasic viremia and viral gene expression in leukocytes during acute cytomegalovirus infection of mice. *J. Virol.* *68*, 6305-6311.

Compton,T., Kurt-Jones,E.A., Boehme,K.W., Belko,J., Latz,E., Golenbock,D.T., and Finberg,R.W. (2003). Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. *J. Virol.* *77*, 4588-4596.

Corcoran,K., Jabbour,M., Bhagwandin,C., Deymier,M.J., Theisen,D.L., and Lybarger,L. (2011). Ubiquitin-mediated regulation of CD86 protein expression by the ubiquitin ligase membrane-associated RING-CH-1 (MARCH1). *J. Biol. Chem.* *286*, 37168-37180.

Coscoy,L. and Ganem,D. (2001). A viral protein that selectively downregulates ICAM-1 and B7-2 and modulates T cell costimulation. *J. Clin. Invest* *107*, 1599-1606.

Cosman,D., Mullberg,J., Sutherland,C.L., Chin,W., Armitage,R., Fanslow,W., Kubin,M., and Chalupny,N.J. (2001). ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity.* *14*, 123-133.

- Craig,A.W., Haghighat,A., Yu,A.T., and Sonenberg,N. (1998). Interaction of polyadenylate-binding protein with the eIF4G homologue PAIP enhances translation. *Nature* 392, 520-523.
- Cretney,E., Degli-Esposti,M.A., Densley,E.H., Farrell,H.E., Davis-Poynter,N.J., and Smyth,M.J. (1999). m144, a murine cytomegalovirus (MCMV)-encoded major histocompatibility complex class I homologue, confers tumor resistance to natural killer cell-mediated rejection. *J. Exp. Med.* 190, 435-444.
- Crough,T. and Khanna,R. (2009). Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 76-98, Table.
- Dallas,P.B., Lyons,P.A., Hudson,J.B., Scalzo,A.A., and Shellam,G.R. (1994). Identification and characterization of a murine cytomegalovirus gene with homology to the UL25 open reading frame of human cytomegalovirus. *Virology* 200, 643-650.
- Damke,H., Baba,T., Warnock,D.E., and Schmid,S.L. (1994). Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation. *J. Cell Biol.* 127, 915-934.
- Das,S., Vasanji,A., and Pellett,P.E. (2007). Three-dimensional structure of the human cytomegalovirus cytoplasmic virion assembly complex includes a reoriented secretory apparatus. *J. Virol.* 81, 11861-11869.
- Davis-Poynter,N.J., Degli-Esposti,M., and Farrell,H.E. (1999). Murine cytomegalovirus homologues of cellular immunomodulatory genes. *Intervirology* 42, 331-341.
- Davison,A.J., Dolan,A., Akter,P., Addison,C., Dargan,D.J., Alcendor,D.J., McGeoch,D.J., and Hayward,G.S. (2003). The human cytomegalovirus genome revisited: comparison with the chimpanzee cytomegalovirus genome. *J. Gen. Virol.* 84, 17-28.
- de Waal,M.R., Haanen,J., Spits,H., Roncarolo,M.G., te,V.A., Figdor,C., Johnson,K., Kastelein,R., Yssel,H., and de Vries,J.E. (1991). Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J. Exp. Med.* 174, 915-924.
- Del Prete,G., De Carli,M., Almerigogna,F., Giudizi,M.G., Biagiotti,R., and Romagnani,S. (1993). Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *J. Immunol.* 150, 353-360.
- Dodd,R.B., Allen,M.D., Brown,S.E., Sanderson,C.M., Duncan,L.M., Lehner,P.J., Bycroft,M., and Read,R.J. (2004). Solution structure of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K3 N-terminal domain reveals a Novel E2-binding C4HC3-type RING domain. *J. Biol. Chem.* 279, 53840-53847.
- Doherty,G.J. and McMahon,H.T. (2009). Mechanisms of endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 857-902.
- Dooms,H. and Abbas,A.K. (2010). Revisiting the role of IL-2 in autoimmunity. *Eur. J. Immunol.* 40, 1538-1540.
- Duncan,L.M., Piper,S., Dodd,R.B., Saville,M.K., Sanderson,C.M., Luzio,J.P., and Lehner,P.J. (2006). Lysine-63-linked ubiquitination is required for endolysosomal degradation of class I molecules. *EMBO J.* 25, 1635-1645.
- Eddleston,M., Peacock,S., Juniper,M., and Warrell,D.A. (1997). Severe cytomegalovirus infection in immunocompetent patients. *Clin. Infect. Dis.* 24, 52-56.

Edens,A. and Talamantes,F. (1998). Alternative processing of growth hormone receptor transcripts. *Endocr. Rev.* *19*, 559-582.

Elkington,R., Shoukry,N.H., Walker,S., Crough,T., Fazou,C., Kaur,A., Walker,C.M., and Khanna,R. (2004). Cross-reactive recognition of human and primate cytomegalovirus sequences by human CD4 cytotoxic T lymphocytes specific for glycoprotein B and H. *Eur. J. Immunol.* *34*, 3216-3226.

EPSTEIN,M.A., ACHONG,B.G., and BARR,Y.M. (1964). VIRUS PARTICLES IN CULTURED LYMPHOBLASTS FROM BURKITT'S LYMPHOMA. *Lancet* *1*, 702-703.

Eyster,C.A., Cole,N.B., Petersen,S., Viswanathan,K., Fruh,K., and Donaldson,J.G. (2011). MARCH ubiquitin ligases alter the itinerary of clathrin-independent cargo from recycling to degradation. *Mol. Biol. Cell* *22*, 3218-3230.

Fruh,K., Bartee,E., Gouveia,K., and Mansouri,M. (2002). Immune evasion by a novel family of viral PHD/LAP-finger proteins of gamma-2 herpesviruses and poxviruses. *Virus Res.* *88*, 55-69.

Gad,H., Low,P., Zotova,E., Brodin,L., and Shupliakov,O. (1998). Dissociation between Ca²⁺-triggered synaptic vesicle exocytosis and clathrin-mediated endocytosis at a central synapse. *Neuron* *21*, 607-616.

Gamadia,L.E., Remmerswaal,E.B., Weel,J.F., Bemelman,F., van Lier,R.A., and ten Berge,I.J. (2003). Primary immune responses to human CMV: a critical role for IFN-gamma-producing CD4+ T cells in protection against CMV disease. *Blood* *101*, 2686-2692.

Gardella, C., Brown ZA. "Managing varicella zoster infection in pregnancy." *Cleve Clin. J. Med.* *74.4* (2007):290-6

Gerna,G., Percivalle,E., Lilleri,D., Lozza,L., Fornara,C., Hahn,G., Baldanti,F., and Revello,M.G. (2005). Dendritic-cell infection by human cytomegalovirus is restricted to strains carrying functional UL131-128 genes and mediates efficient viral antigen presentation to CD8+ T cells. *J. Gen. Virol.* *86*, 275-284.

Gewurz,B.E., Gaudet,R., Tortorella,D., Wang,E.W., and Ploegh,H.L. (2001). Virus subversion of immunity: a structural perspective. *Curr. Opin. Immunol.* *13*, 442-450.

Ghazal,P. and Nelson,J.A. (1991). Enhancement of RNA polymerase II initiation complexes by a novel DNA control domain downstream from the cap site of the cytomegalovirus major immediate-early promoter. *J. Virol.* *65*, 2299-2307.

Ghogawala,Z., Choi,E., Daly,K.R., Blanco,L.R., Griffith,I.J., and Glimcher,L.H. (1989). An intronic 10-base-pair deletion in a class II A beta gene affects RNA processing. *Mol. Cell Biol.* *9*, 4402-4408.

Gillespie,G.M., Wills,M.R., Appay,V., O'Callaghan,C., Murphy,M., Smith,N., Sissons,P., Rowland-Jones,S., Bell,J.I., and Moss,P.A. (2000). Functional heterogeneity and high frequencies of cytomegalovirus-specific CD8(+) T lymphocytes in healthy seropositive donors. *J. Virol.* *74*, 8140-8150.

Gnann,J.W., Jr. and Whitley,R.J. (2002). Clinical practice. Herpes zoster. *N. Engl. J. Med.* *347*, 340-346.

Goto,E., Ishido,S., Sato,Y., Ohgimoto,S., Ohgimoto,K., Nagano-Fujii,M., and Hotta,H. (2003). c-MIR, a human E3 ubiquitin ligase, is a functional homolog of herpesvirus proteins MIR1 and MIR2 and has similar activity. *J. Biol. Chem.* *278*, 14657-14668.

- Greenberg,M.E., Iafrate,A.J., and Skowronski,J. (1998). The SH3 domain-binding surface and an acidic motif in HIV-1 Nef regulate trafficking of class I MHC complexes. *EMBO J.* 17, 2777-2789.
- Haglund,K., Di Fiore,P.P., and Dikic,I. (2003). Distinct monoubiquitin signals in receptor endocytosis. *Trends Biochem. Sci.* 28, 598-603.
- Hahn,G., Revello,M.G., Patrone,M., Percivalle,E., Campanini,G., Sarasini,A., Wagner,M., Gallina,A., Milanesi,G., Koszinowski,U., Baldanti,F., and Gerna,G. (2004). Human cytomegalovirus UL131-128 genes are indispensable for virus growth in endothelial cells and virus transfer to leukocytes. *J. Virol.* 78, 10023-10033.
- Hanson,L.K., Slater,J.S., Karabekian,Z., Virgin,H.W., Biron,C.A., Ruzek,M.C., van Rooijen,N., Ciavarra,R.P., Stenberg,R.M., and Campbell,A.E. (1999). Replication of murine cytomegalovirus in differentiated macrophages as a determinant of viral pathogenesis. *J. Virol.* 73, 5970-5980.
- Harb,G.E., Bacchetti,P., and Jacobson,M.A. (1991). Survival of patients with AIDS and cytomegalovirus disease treated with ganciclovir or foscarnet. *AIDS* 5, 959-965.
- Hathcock,K.S., Laszlo,G., Pucillo,C., Linsley,P., and Hodes,R.J. (1994). Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function. *J. Exp. Med.* 180, 631-640.
- Hawryluk,M.J., Keyel,P.A., Mishra,S.K., Watkins,S.C., Heuser,J.E., and Traub,L.M. (2006). Epsin 1 is a polyubiquitin-selective clathrin-associated sorting protein. *Traffic.* 7, 262-281.
- Hayashi,K., Kurihara,I., and Uchida,Y. (1985). Studies of ocular murine cytomegalovirus infection. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 26, 486-493.
- Hengel,H., Brune,W., and Koszinowski,U.H. (1998). Immune evasion by cytomegalovirus--survival strategies of a highly adapted opportunist. *Trends Microbiol.* 6, 190-197.
- Hengel,H., Koopmann,J.O., Flohr,T., Muranyi,W., Goulmy,E., Hammerling,G.J., Koszinowski,U.H., and Momburg,F. (1997). A viral ER-resident glycoprotein inactivates the MHC-encoded peptide transporter. *Immunity.* 6, 623-632.
- Hengel,H., Reusch,U., Gutermann,A., Ziegler,H., Jonjic,S., Lucin,P., and Koszinowski,U.H. (1999). Cytomegaloviral control of MHC class I function in the mouse. *Immunol. Rev.* 168, 167-176.
- Henne,W.M., Boucrot,E., Meinecke,M., Evergren,E., Vallis,Y., Mittal,R., and McMahon,H.T. (2010). FCHO proteins are nucleators of clathrin-mediated endocytosis. *Science* 328, 1281-1284.
- Hershey,J.W. (1991). Translational control in mammalian cells. *Annu. Rev. Biochem.* 60, 717-755.
- Heuser,J.E. and Anderson,R.G. (1989). Hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation. *J. Cell Biol.* 108, 389-400.
- Higgins,M.K. and McMahon,H.T. (2002). Snap-shots of clathrin-mediated endocytosis. *Trends Biochem. Sci.* 27, 257-263.
- Hladik,W., Dollard,S.C., Mermin,J., Fowlkes,A.L., Downing,R., Amin,M.M., Banage,F., Nzaro,E., Kataaha,P., Dondero,T.J., Pellett,P.E., and Lackritz,E.M. (2006). Transmission of human herpesvirus 8 by blood transfusion. *N. Engl. J. Med.* 355, 1331-1338.

Hlavaty,J., Schittmayer,M., Stracke,A., Jandl,G., Knapp,E., Felber,B.K., Salmons,B., Gunzburg,W.H., and Renner,M. (2005). Effect of posttranscriptional regulatory elements on transgene expression and virus production in the context of retrovirus vectors. *Virology* 341, 1-11.

Ho,M. (2008). The history of cytomegalovirus and its diseases. *Med. Microbiol. Immunol.* 197, 65-73.

Ho,M., Suwansirikul,S., Dowling,J.N., Youngblood,L.A., and Armstrong,J.A. (1975). The transplanted kidney as a source of cytomegalovirus infection. *N. Engl. J. Med.* 293, 1109-1112.

Homman-Loudiyi,M., Hultenby,K., Britt,W., and Soderberg-Naucler,C. (2003). 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.

Honing,S., Ricotta,D., Krauss,M., Spate,K., Spolaore,B., Motley,A., Robinson,M., Robinson,C., Haucke,V., and Owen,D.J. (2005). Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate regulates sorting signal recognition by the clathrin-associated adaptor complex AP2. *Mol. Cell* 18, 519-531.

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

Isaacson,M.K. and Compton,T. (2009). Human cytomegalovirus glycoprotein B is required for virus entry and cell-to-cell spread but not for virion attachment, assembly, or egress. *J. Virol.* 83, 3891-3903.

Ishido,S., Choi,J.K., Lee,B.S., Wang,C., DeMaria,M., Johnson,R.P., Cohen,G.B., and Jung,J.U. (2000). Inhibition of natural killer cell-mediated cytotoxicity by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K5 protein. *Immunity.* 13, 365-374.

Jabbour,M., Campbell,E.M., Fares,H., and Lybarger,L. (2009). Discrete domains of MARCH1 mediate its localization, functional interactions, and posttranscriptional control of expression. *J. Immunol.* 183, 6500-6512.

Jacobson,M.A., Maecker,H.T., Orr,P.L., D'Amico,R., Van Natta,M., Li,X.D., Pollard,R.B., and Bredt,B.M. (2004). Results of a cytomegalovirus (CMV)-specific CD8+/interferon- gamma+ cytokine flow cytometry assay correlate with clinical evidence of protective immunity in patients with AIDS with CMV retinitis. *J. Infect. Dis.* 189, 1362-1373.

Janeway, C., Murphy, K., Travers, P., Walport, M. (2008) Chapter 8 "T-cell Mediated Immunity, in Janeway's Immunobiology, 7th edition, pp 323-377, Murphy, K., Travers, P., Walport, editors, Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, 2008

Jeannin,P., Delneste,Y., Lecoanet-Henchoz,S., Gauchat,J.F., Ellis,J., and Bonnefoy,J.Y. (1997). CD86 (B7-2) on human B cells. A functional role in proliferation and selective differentiation into IgE- and IgG4-producing cells. *J. Biol. Chem.* 272, 15613-15619.

Jeffers,M., Taylor,G.A., Weidner,K.M., Omura,S., and Vande Woude,G.F. (1997). Degradation of the Met tyrosine kinase receptor by the ubiquitin-proteasome pathway. *Mol. Cell Biol.* 17, 799-808.

Jiang,H. and Lucy,M.C. (2001). Variants of the 5'-untranslated region of the bovine growth hormone receptor mRNA: isolation, expression and effects on translational efficiency. *Gene* 265, 45-53.

Jones,T.R., Hanson,L.K., Sun,L., Slater,J.S., Stenberg,R.M., and Campbell,A.E. (1995). Multiple independent loci within the human cytomegalovirus unique short region down-regulate expression of major histocompatibility complex class I heavy chains. *J. Virol.* 69, 4830-4841.

- Jones,T.R., Wiertz,E.J., Sun,L., Fish,K.N., Nelson,J.A., and Ploegh,H.L. (1996). Human cytomegalovirus US3 impairs transport and maturation of major histocompatibility complex class I heavy chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 11327-11333.
- Jonjic,S., Babic,M., Polic,B., and Krmpotic,A. (2008). Immune evasion of natural killer cells by viruses. *Curr. Opin. Immunol.* 20, 30-38.
- Jonjic,S., Pavic,I., Lucin,P., Rukavina,D., and Koszinowski,U.H. (1990). Efficacious control of cytomegalovirus infection after long-term depletion of CD8+ T lymphocytes. *J. Virol.* 64, 5457-5464.
- Jonjic,S., Pavic,I., Polic,B., Crnkovic,I., Lucin,P., and Koszinowski,U.H. (1994). Antibodies are not essential for the resolution of primary cytomegalovirus infection but limit dissemination of recurrent virus. *J. Exp. Med.* 179, 1713-1717.
- Juckem,L.K., Boehme,K.W., Feire,A.L., and Compton,T. (2008). Differential initiation of innate immune responses induced by human cytomegalovirus entry into fibroblast cells. *J. Immunol.* 180, 4965-4977.
- Kalejta,R.F. (2008). Tegument proteins of human cytomegalovirus. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72, 249-65, table.
- Kappes,J.C. and Wu,X. (2001). Safety considerations in vector development. *Somat. Cell Mol. Genet.* 26, 147-158.
- Kashiwai,A., Kawamura,N., Kadota,C., and Tsutsui,Y. (1992). Susceptibility of mouse embryo to murine cytomegalovirus infection in early and mid-gestation stages. *Arch. Virol.* 127, 37-48.
- Kaspari,M., Tavalai,N., Stamminger,T., Zimmermann,A., Schilf,R., and Bogner,E. (2008). Proteasome inhibitor MG132 blocks viral DNA replication and assembly of human cytomegalovirus. *FEBS Lett.* 582, 666-672.
- Kaye,S. and Choudhary,A. (2006). Herpes simplex keratitis. *Prog. Retin. Eye Res.* 25, 355-380.
- Khan,N., Hislop,A., Gudgeon,N., Cobbold,M., Khanna,R., Nayak,L., Rickinson,A.B., and Moss,P.A. (2004). Herpesvirus-specific CD8 T cell immunity in old age: cytomegalovirus impairs the response to a coresident EBV infection. *J. Immunol.* 173, 7481-7489.
- Khor,R., McElroy,L.J., and Whittaker,G.R. (2003). The ubiquitin-vacuolar protein sorting system is selectively required during entry of influenza virus into host cells. *Traffic.* 4, 857-868.
- Kledal,T.N., Rosenkilde,M.M., and Schwartz,T.W. (1998). Selective recognition of the membrane-bound CX3C chemokine, fractalkine, by the human cytomegalovirus-encoded broad-spectrum receptor US28. *FEBS Lett.* 441, 209-214.
- Kleijnen,M.F., Huppa,J.B., Lucin,P., Mukherjee,S., Farrell,H., Campbell,A.E., Koszinowski,U.H., Hill,A.B., and Ploegh,H.L. (1997). A mouse cytomegalovirus glycoprotein, gp34, forms a complex with folded class I MHC molecules in the ER which is not retained but is transported to the cell surface. *EMBO J.* 16, 685-694.
- Klemola,E. and Kaariainen,L. (1965). Cytomegalovirus as a possible cause of a disease resembling infectious mononucleosis. *Br. Med. J.* 2, 1099-1102.

Kosaka,T. and Ikeda,K. (1983). Reversible blockage of membrane retrieval and endocytosis in the garland cell of the temperature-sensitive mutant of *Drosophila melanogaster*, shibirets1. *J. Cell Biol.* *97*, 499-507.

Kotenko,S.V., Sacconi,S., Izotova,L.S., Mirochnitchenko,O.V., and Pestka,S. (2000). Human cytomegalovirus harbors its own unique IL-10 homolog (cmvIL-10). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *97*, 1695-1700.

Kotton,C.N., Kumar,D., Caliendo,A.M., Asberg,A., Chou,S., Snyderman,D.R., Allen,U., and Humar,A. (2010). International consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Transplantation* *89*, 779-795.

Kozak,M. (1986). Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* *44*, 283-292.

Kozak,M. (1989). Circumstances and mechanisms of inhibition of translation by secondary structure in eucaryotic mRNAs. *Mol. Cell Biol.* *9*, 5134-5142.

Kozak,M. (1990). Downstream secondary structure facilitates recognition of initiator codons by eukaryotic ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *87*, 8301-8305.

Kozak,M. (1991a). An analysis of vertebrate mRNA sequences: intimations of translational control. *J. Cell Biol.* *115*, 887-903.

Kozak,M. (1991b). Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J. Biol. Chem.* *266*, 19867-19870.

Kozak,M. (1997). Recognition of AUG and alternative initiator codons is augmented by G in position +4 but is not generally affected by the nucleotides in positions +5 and +6. *EMBO J.* *16*, 2482-2492.

Kozak,M. (2002). Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation. *Gene* *299*, 1-34.

Krause,H., Hebart,H., Jahn,G., Muller,C.A., and Einsele,H. (1997). Screening for CMV-specific T cell proliferation to identify patients at risk of developing late onset CMV disease. *Bone Marrow Transplant.* *19*, 1111-1116.

Krmpotic,A., Bubic,I., Polic,B., Lucin,P., and Jonjic,S. (2003). Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection. *Microbes. Infect.* *5*, 1263-1277.

Krmpotic,A., Busch,D.H., Bubic,I., Gebhardt,F., Hengel,H., Hasan,M., Scalzo,A.A., Koszinowski,U.H., and Jonjic,S. (2002). MCMV glycoprotein gp40 confers virus resistance to CD8+ T cells and NK cells in vivo. *Nat. Immunol.* *3*, 529-535.

Krug,A., French,A.R., Barchet,W., Fischer,J.A., Dzionek,A., Pingel,J.T., Orihuela,M.M., Akira,S., Yokoyama,W.M., and Colonna,M. (2004). TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. *Immunity.* *21*, 107-119.

Krummel,M.F. and Allison,J.P. (1995). CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J. Exp. Med.* *182*, 459-465.

Kuchroo,V.K., Das,M.P., Brown,J.A., Ranger,A.M., Zamvil,S.S., Sobel,R.A., Weiner,H.L., Nabavi,N., and Glimcher,L.H. (1995). B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell* 80, 707-718.

Kumar,A., Angel,J.B., Aucoin,S., Creery,W.D., Daftarian,M.P., Cameron,D.W., Filion,L., and Diaz-Mitoma,F. (1999). Dysregulation of B7.2 (CD86) expression on monocytes of HIV-infected individuals is associated with altered production of IL-2. *Clin. Exp. Immunol.* 117, 84-91.

Le Roy,E., Muhlethaler-Mottet,A., Davrinche,C., Mach,B., and Davignon,J.L. (1999). Escape of human cytomegalovirus from HLA-DR-restricted CD4(+) T-cell response is mediated by repression of gamma interferon-induced class II transactivator expression. *J. Virol.* 73, 6582-6589.

Lee,S.H., Girard,S., Macina,D., Busa,M., Zafer,A., Belouchi,A., Gros,P., and Vidal,S.M. (2001). Susceptibility to mouse cytomegalovirus is associated with deletion of an activating natural killer cell receptor of the C-type lectin superfamily. *Nat. Genet.* 28, 42-45.

Lehner,P.J., Hoer,S., Dodd,R., and Duncan,L.M. (2005). Downregulation of cell surface receptors by the K3 family of viral and cellular ubiquitin E3 ligases. *Immunol. Rev.* 207, 112-125.

Lehner,P.J., Karttunen,J.T., Wilkinson,G.W., and Cresswell,P. (1997). The human cytomegalovirus US6 glycoprotein inhibits transporter associated with antigen processing-dependent peptide translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 6904-6909.

Lenschow,D.J., Walunas,T.L., and Bluestone,J.A. (1996). CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu. Rev. Immunol.* 14, 233-258.

Leong,C.C., Chapman,T.L., Bjorkman,P.J., Formankova,D., Mocarski,E.S., Phillips,J.H., and Lanier,L.L. (1998). Modulation of natural killer cell cytotoxicity in human cytomegalovirus infection: the role of endogenous class I major histocompatibility complex and a viral class I homolog. *J. Exp. Med.* 187, 1681-1687.

Lewis,M.J. and Pelham,H.R. (1990). A human homologue of the yeast HDEL receptor. *Nature* 348, 162-163.

Lim,W., Ma,W., Gee,K., Aucoin,S., Nandan,D., Diaz-Mitoma,F., Kozlowski,M., and Kumar,A. (2002). Distinct role of p38 and c-Jun N-terminal kinases in IL-10-dependent and IL-10-independent regulation of the costimulatory molecule B7.2 in lipopolysaccharide-stimulated human monocytic cells. *J. Immunol.* 168, 1759-1769.

Lingelbach,K. and Dobberstein,B. (1988). An extended RNA/RNA duplex structure within the coding region of mRNA does not block translational elongation. *Nucleic Acids Res.* 16, 3405-3414.

Liu,F. and Hong,Z.Z. (2007). Chapter 3 "Comparative virion structures of human herpesviruses" in *Human Herpesviruses: Biology, Therapy and Immunoprophylaxis*. Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, Yamanishi K, editors, Cambridge University Press

Liu,X.Y. and Matherly,L.H. (2002). Analysis of membrane topology of the human reduced folate carrier protein by hemagglutinin epitope insertion and scanning glycosylation insertion mutagenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1564, 333-342.

Ljunggren,H.G. and Karre,K. (1985). Host resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma variants. Analysis of the mechanism. *J. Exp. Med.* 162, 1745-1759.

- Ljungman,P. (2002). Beta-herpesvirus challenges in the transplant recipient. *J. Infect. Dis.* *186 Suppl 1*, S99-S109.
- Lodoen,M.B., Abenes,G., Umamoto,S., Houchins,J.P., Liu,F., and Lanier,L.L. (2004). The cytomegalovirus m155 gene product subverts natural killer cell antiviral protection by disruption of H60-NKG2D interactions. *J. Exp. Med.* *200*, 1075-1081.
- Loewendorf,A., Kruger,C., Borst,E.M., Wagner,M., Just,U., and Messerle,M. (2004). Identification of a mouse cytomegalovirus gene selectively targeting CD86 expression on antigen-presenting cells. *J. Virol.* *78*, 13062-13071.
- Loewendorf,A.I., Steinbrueck,L., Peter,C., Busche,A., Benedict,C.A., and Kay-Jackson,P.C. (2011). The mouse cytomegalovirus glycoprotein m155 inhibits CD40 expression and restricts CD4 T cell responses. *J. Virol.* *85*, 5208-5212.
- Lorenzo,M.E., Jung,J.U., and Ploegh,H.L. (2002). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K3 utilizes the ubiquitin-proteasome system in routing class major histocompatibility complexes to late endocytic compartments. *J. Virol.* *76*, 5522-5531.
- Macia,E., Ehrlich,M., Massol,R., Boucrot,E., Brunner,C., and Kirchhausen,T. (2006). Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Dev. Cell* *10*, 839-850.
- Makrigiannis,A.P., Musgrave,B.L., and Hoskin,D.W. (1999). Differential effects of B7-1 and B7-2 on the costimulation of mouse nonspecific cytotoxic T lymphocyte development in response to anti-CD3 antibody. *J. Leukoc. Biol.* *66*, 792-802.
- Marquardt,A., Halle,S., Seckert,C.K., Lemmermann,N.A., Veres,T.Z., Braun,A., Maus,U.A., Forster,R., Reddehase,M.J., Messerle,M., and Busche,A. (2011). Single cell detection of latent cytomegalovirus reactivation in host tissue. *J. Gen. Virol.* *92*, 1279-1291.
- Marshall-Clarke,S., Tasker,L., Heaton,M.P., and Parkhouse,R.M. (2003). A differential requirement for phosphoinositide 3-kinase reveals two pathways for inducible upregulation of major histocompatibility complex class II molecules and CD86 expression by murine B lymphocytes. *Immunology* *109*, 102-108.
- Mathys,S., Schroeder,T., Ellwart,J., Koszinowski,U.H., Messerle,M., and Just,U. (2003). Dendritic cells under influence of mouse cytomegalovirus have a physiologic dual role: to initiate and to restrict T cell activation. *J. Infect. Dis.* *187*, 988-999.
- Matsuki,Y., Ohmura-Hoshino,M., Goto,E., Aoki,M., Mito-Yoshida,M., Uematsu,M., Hasegawa,T., Koseki,H., Ohara,O., Nakayama,M., Toyooka,K., Matsuoka,K., Hotta,H., Yamamoto,A., and Ishido,S. (2007). Novel regulation of MHC class II function in B cells. *EMBO J.* *26*, 846-854.
- Maxfield,F.R. (1982). Weak bases and ionophores rapidly and reversibly raise the pH of endocytic vesicles in cultured mouse fibroblasts. *J. Cell Biol.* *95*, 676-681.
- McMahon,H.T. and Boucrot,E. (2011). Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *12*, 517-533.
- Means,R.E., Lang,S.M., and Jung,J.U. (2007). The Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K5 E3 ubiquitin ligase modulates targets by multiple molecular mechanisms. *J. Virol.* *81*, 6573-6583.
- Mellman,I. and Steinman,R.M. (2001). Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* *106*, 255-258.

- Messerle,M., Keil,G.M., Schneider,K., and Koszinowski,U.H. (1992). Characterization of the murine cytomegalovirus genes encoding the major DNA binding protein and the ICP18.5 homolog. *Virology* *191*, 355-367.
- Mettenleiter,T.C., Klupp,B.G., and Granzow,H. (2006). Herpesvirus assembly: a tale of two membranes. *Curr. Opin. Microbiol.* *9*, 423-429.
- Middeldorp,J.M., Brink,A.A., van den Brule,A.J., and Meijer,C.J. (2003). Pathogenic roles for Epstein-Barr virus (EBV) gene products in EBV-associated proliferative disorders. *Crit Rev. Oncol. Hematol.* *45*, 1-36.
- Mintern,J.D., Klemm,E.J., Wagner,M., Paquet,M.E., Napier,M.D., Kim,Y.M., Koszinowski,U.H., and Ploegh,H.L. (2006). Viral interference with B7-1 costimulation: a new role for murine cytomegalovirus fc receptor-1. *J. Immunol.* *177*, 8422-8431.
- Mocarski,E.S., Jr. (2002). Immunomodulation by cytomegaloviruses: manipulative strategies beyond evasion. *Trends Microbiol.* *10*, 332-339.
- Mocarski, E., T. Shenk, and R. Pass. Cytomegaloviruses. In D. Knipe and P. Howley, editors, *Fields Virology*, volume 2, chapter 69, pp. 2703-2773. Lippincott Williams & Wilkins, 2007.
- Mocroft,A., Katlama,C., Johnson,A.M., Pradier,C., Antunes,F., Mulcahy,F., Chiesi,A., Phillips,A.N., Kirk,O., and Lundgren,J.D. (2000). AIDS across Europe, 1994-98: the EuroSIDA study. *Lancet* *356*, 291-296.
- Molloy,S.S., Anderson,E.D., Jean,F., and Thomas,G. (1999). Bi-cycling the furin pathway: from TGN localization to pathogen activation and embryogenesis. *Trends Cell Biol.* *9*, 28-35.
- Mori,S., Tanaka,K., Omura,S., and Saito,Y. (1995). Degradation process of ligand-stimulated platelet-derived growth factor beta-receptor involves ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *J. Biol. Chem.* *270*, 29447-29452.
- Mullis,K.B. and Faloona,F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* *155*, 335-350.
- Munroe,D. and Jacobson,A. (1990). mRNA poly(A) tail, a 3' enhancer of translational initiation. *Mol. Cell Biol.* *10*, 3441-3455.
- Mutter,W., Reddehase,M.J., Busch,F.W., Buhning,H.J., and Koszinowski,U.H. (1988). Failure in generating hemopoietic stem cells is the primary cause of death from cytomegalovirus disease in the immunocompromised host. *J. Exp. Med.* *167*, 1645-1658.
- Nabi,I.R. and Le,P.U. (2003). Caveolae/raft-dependent endocytosis. *J. Cell Biol.* *161*, 673-677.
- Nakamura,N., Fukuda,H., Kato,A., and Hirose,S. (2005). MARCH-II is a syntaxin-6-binding protein involved in endosomal trafficking. *Mol. Biol. Cell* *16*, 1696-1710.
- Ohkuma,S. and Poole,B. (1978). Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *75*, 3327-3331.
- Ohmura-Hoshino,M., Matsuki,Y., Aoki,M., Goto,E., Mito,M., Uematsu,M., Kakiuchi,T., Hotta,H., and Ishido,S. (2006). Inhibition of MHC class II expression and immune responses by c-MIR. *J. Immunol.* *177*, 341-354.

Parella,F.J., Jr., Delaney,K.M., Moorman,A.C., Loveless,M.O., Fuhrer,J., Satten,G.A., Aschman,D.J., and Holmberg,S.D. (1998). Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N. Engl. J. Med.* *338*, 853-860.

Pandey,K.N. (2009). Functional roles of short sequence motifs in the endocytosis of membrane receptors. *Front Biosci.* *14*, 5339-5360.

Pass,R.F. (2009). Development and evidence for efficacy of CMV glycoprotein B vaccine with MF59 adjuvant. *J. Clin. Virol.* *46 Suppl 4*, S73-S76.

Pass,R.F., Zhang,C., Evans,A., Simpson,T., Andrews,W., Huang,M.L., Corey,L., Hill,J., Davis,E., Flanigan,C., and Cloud,G. (2009). Vaccine prevention of maternal cytomegalovirus infection. *N. Engl. J. Med.* *360*, 1191-1199.

Pekhletsy,R.I., Chernov,B.K., and Rubtsov,P.M. (1992). Variants of the 5'-untranslated sequence of human growth hormone receptor mRNA. *Mol. Cell Endocrinol.* *90*, 103-109.

Pentcheva-Hoang,T., Egen,J.G., Wojnoonski,K., and Allison,J.P. (2004). B7-1 and B7-2 selectively recruit CTLA-4 and CD28 to the immunological synapse. *Immunity.* *21*, 401-413.

Pereyra,F. and Rubin,R.H. (2004). Prevention and treatment of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients. *Curr. Opin. Infect. Dis.* *17*, 357-361.

Plotkin,S.A., Smiley,M.L., Friedman,H.M., Starr,S.E., Fleisher,G.R., Wlodaver,C., Dafoe,D.C., Friedman,A.D., Grossman,R.A., and Barker,C.F. (1984). Towne-vaccine-induced prevention of cytomegalovirus disease after renal transplants. *Lancet* *1*, 528-530.

Polic,B., Hengel,H., Krmpotic,A., Trgovcich,J., Pavic,I., Luccaronin,P., Jonjic,S., and Koszinowski,U.H. (1998). Hierarchical and redundant lymphocyte subset control precludes cytomegalovirus replication during latent infection. *J. Exp. Med.* *188*, 1047-1054.

Popov,M., Tam,L.Y., Li,J., and Reithmeier,R.A. (1997). Mapping the ends of transmembrane segments in a polytopic membrane protein. Scanning N-glycosylation mutagenesis of extracytosolic loops in the anion exchanger, band 3. *J. Biol. Chem.* *272*, 18325-18332.

Prosch,S., Priemer,C., Hoflich,C., Liebenthafer,C., Babel,N., Kruger,D.H., and Volk,H.D. (2003). Proteasome inhibitors: a novel tool to suppress human cytomegalovirus replication and virus-induced immune modulation. *Antivir. Ther.* *8*, 555-567.

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

Reddehase,M.J., Weiland,F., Munch,K., Jonjic,S., Luske,A., and Koszinowski,U.H. (1985). Interstitial murine cytomegalovirus pneumonia after irradiation: characterization of cells that limit viral replication during established infection of the lungs. *J. Virol.* *55*, 264-273.

Redpath,S., Angulo,A., Gascoigne,N.R., and Ghazal,P. (1999). Murine cytomegalovirus infection down-regulates MHC class II expression on macrophages by induction of IL-10. *J. Immunol.* *162*, 6701-6707.

Reusch,U., Muranyi,W., Lucin,P., Burgert,H.G., Hengel,H., and Koszinowski,U.H. (1999). A cytomegalovirus glycoprotein re-routes MHC class I complexes to lysosomes for degradation. *EMBO J.* *18*, 1081-1091.

- Reusser,P., Riddell,S.R., Meyers,J.D., and Greenberg,P.D. (1991). Cytotoxic T-lymphocyte response to cytomegalovirus after human allogeneic bone marrow transplantation: pattern of recovery and correlation with cytomegalovirus infection and disease. *Blood* 78, 1373-1380.
- Revello,M.G. and Gerna,G. (2004). Pathogenesis and prenatal diagnosis of human cytomegalovirus infection. *J. Clin. Virol.* 29, 71-83.
- Revello,M.G. and Gerna,G. (2010). Human cytomegalovirus tropism for endothelial/epithelial cells: scientific background and clinical implications. *Rev. Med. Virol.* 20, 136-155.
- Riddell,S.R., Watanabe,K.S., Goodrich,J.M., Li,C.R., Agha,M.E., and Greenberg,P.D. (1992). Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science* 257, 238-241.
- Sabat,R., Grutz,G., Warszawska,K., Kirsch,S., Witte,E., Wolk,K., and Geginat,J. (2010). Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev.* 21, 331-344.
- Saha,A. and Robertson,E.S. (2011). Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphomas: pathogenesis and clinical outcomes. *Clin. Cancer Res.* 17, 3056-3063.
- Sanchez,V., Greis,K.D., Sztul,E., and Britt,W.J. (2000). 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.
- Sando,G.N., Titus-Dillon,P., Hall,C.W., and Neufeld,E.F. (1979). Inhibition of receptor-mediated uptake of a lysosomal enzyme into fibroblasts by chloroquine, procaine and ammonia. *Exp. Cell Res.* 119, 359-364.
- Sansom,D.M., Manzotti,C.N., and Zheng,Y. (2003). What's the difference between CD80 and CD86? *Trends Immunol.* 24, 314-319.
- Santoni de Sio,F.R., Cascio,P., Zingale,A., Gasparini,M., and Naldini,L. (2006). Proteasome activity restricts lentiviral gene transfer into hematopoietic stem cells and is down-regulated by cytokines that enhance transduction. *Blood* 107, 4257-4265.
- Schambach,A. and Baum,C. (2007). Vector design for expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in hematopoietic cells. *DNA Repair (Amst)* 6, 1187-1196.
- Schnitzer,J.E., Oh,P., Pinney,E., and Allard,J. (1994). Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules. *J. Cell Biol.* 127, 1217-1232.
- Schwartz,O., Marechal,V., Friguet,B., Arenzana-Seisdedos,F., and Heard,J.M. (1998). Antiviral activity of the proteasome on incoming human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 72, 3845-3850.
- Schwartz,O., Marechal,V., Le Gall,S., Lemonnier,F., and Heard,J.M. (1996). Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat. Med.* 2, 338-342.
- Schwartz,S., Felber,B.K., and Pavlakis,G.N. (1991). Expression of human immunodeficiency virus type 1 vif and vpr mRNAs is Rev-dependent and regulated by splicing. *Virology* 183, 677-686.
- Scrivano,L., Sinzger,C., Nitschko,H., Koszinowski,U.H., and Adler,B. (2011). HCMV spread and cell tropism are determined by distinct virus populations. *PLoS. Pathog.* 7, e1001256.

Sengstake, S. Identification of Mouse Cytomegalovirus Factors that determine the tropism for epithelial cells and that induce morphological changes in infected cells . Ph.D. thesis, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, 2009

Sester, M., Sester, U., Gartner, B., Heine, G., Girndt, M., Mueller-Lantzsch, N., Meyerhans, A., and Kohler, H. (2001). Levels of virus-specific CD4 T cells correlate with cytomegalovirus control and predict virus-induced disease after renal transplantation. *Transplantation* 71, 1287-1294.

Sester, M., Sester, U., Gartner, B., Kubuschok, B., Girndt, M., Meyerhans, A., and Kohler, H. (2002). Sustained high frequencies of specific CD4 T cells restricted to a single persistent virus. *J. Virol.* 76, 3748-3755.

Shanley, J.D. (1984). Host genetic factors influence murine cytomegalovirus lung infection and interstitial pneumonitis. *J. Gen. Virol.* 65 (Pt 12), 2121-2128.

Shanley, J.D., Morningstar, J., and Jordan, M.C. (1985). Inhibition of murine cytomegalovirus lung infection and interstitial pneumonitis by acyclovir and 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine. *Antimicrob. Agents Chemother.* 28, 172-175.

Shatkin, A.J. (1985). mRNA cap binding proteins: essential factors for initiating translation. *Cell* 40, 223-224.

Shen, Z., Reznikoff, G., Dranoff, G., and Rock, K.L. (1997). Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules. *J. Immunol.* 158, 2723-2730.

Shlobin, O.A., West, E.E., Lechtzin, N., Miller, S.M., Borja, M., Orens, J.B., Dropulic, L.K., and McDyer, J.F. (2006). Persistent cytomegalovirus-specific memory responses in the lung allograft and blood following primary infection in lung transplant recipients. *J. Immunol.* 176, 2625-2634.

Shukla, D. and Spear, P.G. (2001). Herpesviruses and heparan sulfate: an intimate relationship in aid of viral entry. *J. Clin. Invest* 108, 503-510.

Simari, R.D., Yang, Z.Y., Ling, X., Stephan, D., Perkins, N.D., Nabel, G.J., and Nabel, E.G. (1998). Requirements for enhanced transgene expression by untranslated sequences from the human cytomegalovirus immediate-early gene. *Mol. Med.* 4, 700-706.

Sinclair, J. and Sissons, P. (2006). Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.* 87, 1763-1779.

Sinzger, C., Digel, M., and Jahn, G. (2008). Cytomegalovirus cell tropism. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 325, 63-83.

Smyth, C., Logan, G., Weinberger, R.P., Rowe, P.B., Alexander, I.E., and Smythe, J.A. (1998). Identification of a dynamic intracellular reservoir of CD86 protein in peripheral blood monocytes that is not associated with the Golgi complex. *J. Immunol.* 160, 5390-5396.

Smyth, C.M., Logan, G., Boadle, R., Rowe, P.B., Smythe, J.A., and Alexander, I.E. (2005). Differential subcellular localization of CD86 in human PBMC-derived macrophages and DCs, and ultrastructural characterization by immuno-electron microscopy. *Int. Immunol.* 17, 123-132.

Soroceanu, L., Akhavan, A., and Cobbs, C.S. (2008). Platelet-derived growth factor-alpha receptor activation is required for human cytomegalovirus infection. *Nature* 455, 391-395.

- Soulier,J., Grollet,L., Oksenhendler,E., Cacoub,P., Cazals-Hatem,D., Babinet,P., d'Agay,M.F., Clauvel,J.P., Raphael,M., Degos,L., and . (1995). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in multicentric Castleman's disease. *Blood* 86, 1276-1280.
- Spencer,J.V., Lockridge,K.M., Barry,P.A., Lin,G., Tsang,M., Penfold,M.E., and Schall,T.J. (2002). Potent immunosuppressive activities of cytomegalovirus-encoded interleukin-10. *J. Virol.* 76, 1285-1292.
- Steininger,C., Puchhammer-Stockl,E., and Popow-Kraupp,T. (2006). Cytomegalovirus disease in the era of highly active antiretroviral therapy (HAART). *J. Clin. Virol.* 37, 1-9.
- Stoddart,C.A., Cardin,R.D., Boname,J.M., Manning,W.C., Abenes,G.B., and Mocarski,E.S. (1994). Peripheral blood mononuclear phagocytes mediate dissemination of murine cytomegalovirus. *J. Virol.* 68, 6243-6253.
- Streblow,D.N., Soderberg-Naucler,C., Vieira,J., Smith,P., Wakabayashi,E., Ruchti,F., Mattison,K., Altschuler,Y., and Nelson,J.A. (1999). The human cytomegalovirus chemokine receptor US28 mediates vascular smooth muscle cell migration. *Cell* 99, 511-520.
- Stumptner-Cuvelette,P., Morchoisne,S., Dugast,M., Le Gall,S., Raposo,G., Schwartz,O., and Benaroch,P. (2001). HIV-1 Nef impairs MHC class II antigen presentation and surface expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 12144-12149.
- Sun,J.C. and Lanier,L.L. (2011). NK cell development, homeostasis and function: parallels with CD8 T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 645-657.
- Sutherland,C.L., Chalupny,N.J., and Cosman,D. (2001). The UL16-binding proteins, a novel family of MHC class I-related ligands for NKG2D, activate natural killer cell functions. *Immunol. Rev.* 181, 185-192.
- Suvas,S., Singh,V., Sahdev,S., Vohra,H., and Agrewala,J.N. (2002). Distinct role of CD80 and CD86 in the regulation of the activation of B cell and B cell lymphoma. *J. Biol. Chem.* 277, 7766-7775.
- Sylwester,A.W., Mitchell,B.L., Edgar,J.B., Taormina,C., Pelte,C., Ruchti,F., Sleath,P.R., Grabstein,K.H., Hosken,N.A., Kern,F., Nelson,J.A., and Picker,L.J. (2005). Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *J. Exp. Med.* 202, 673-685.
- Tabeta,K., Georgel,P., Janssen,E., Du,X., Hoebe,K., Crozat,K., Mudd,S., Shamel,L., Sovath,S., Goode,J., Alexopoulou,L., Flavell,R.A., and Beutler,B. (2004). Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 3516-3521.
- Takei,K. and Haucke,V. (2001). Clathrin-mediated endocytosis: membrane factors pull the trigger. *Trends Cell Biol.* 11, 385-391.
- Takei,K., McPherson,P.S., Schmid,S.L., and De Camilli,P. (1995). Tubular membrane invaginations coated by dynamin rings are induced by GTP-gamma S in nerve terminals. *Nature* 374, 186-190.
- Tanaka,K., Kondo,T., Torigoe,S., Okada,S., Mukai,T., and Yamanishi,K. (1994). Human herpesvirus 7: another causal agent for roseola (exanthem subitum). *J. Pediatr.* 125, 1-5.
- Tang,W. and Tseng,H. (1999). A GC-rich sequence within the 5' untranslated region of human basovirus mRNA inhibits its translation. *Gene* 237, 35-44.

- Terhune,S.S., Schroer,J., and Shenk,T. (2004). RNAs are packaged into human cytomegalovirus virions in proportion to their intracellular concentration. *J. Virol.* *78*, 10390-10398.
- Thale,R., Szepan,U., Hengel,H., Geginat,G., Lucin,P., and Koszinowski,U.H. (1995). Identification of the mouse cytomegalovirus genomic region affecting major histocompatibility complex class I molecule transport. *J. Virol.* *69*, 6098-6105.
- Thibodeau,J., Bourgeois-Daigneault,M.C., Huppe,G., Tremblay,J., Aumont,A., Houde,M., Bartee,E., Brunet,A., Gauvreau,M.E., de Gassart,A., Gatti,E., Baril,M., Cloutier,M., Bontron,S., Fruh,K., Lamarre,D., and Steimle,V. (2008). Interleukin-10-induced MARCH1 mediates intracellular sequestration of MHC class II in monocytes. *Eur. J. Immunol.* *38*, 1225-1230.
- Tietze,C., Schlesinger,P., and Stahl,P. (1980). Chloroquine and ammonium ion inhibit receptor-mediated endocytosis of mannose-glycoconjugates by macrophages: apparent inhibition of receptor recycling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *93*, 1-8.
- Tomasec,P., Braud,V.M., Rickards,C., Powell,M.B., McSharry,B.P., Gadola,S., Cerundolo,V., Borysiewicz,L.K., McMichael,A.J., and Wilkinson,G.W. (2000). Surface expression of HLA-E, an inhibitor of natural killer cells, enhanced by human cytomegalovirus gpUL40. *Science* *287*, 1031.
- Tomazin,R., Boname,J., Hegde,N.R., Lewinsohn,D.M., Altschuler,Y., Jones,T.R., Cresswell,P., Nelson,J.A., Riddell,S.R., and Johnson,D.C. (1999). Cytomegalovirus US2 destroys two components of the MHC class II pathway, preventing recognition by CD4+ T cells. *Nat. Med.* *5*, 1039-1043.
- Trgovcich,J., Stimac,D., Polic,B., Krmpotic,A., Pernjak-Pugel,E., Tomac,J., Hasan,M., Wraber,B., and Jonjic,S. (2000). Immune responses and cytokine induction in the development of severe hepatitis during acute infections with murine cytomegalovirus. *Arch. Virol.* *145*, 2601-2618.
- Tucker,P., Laemle,L., Munson,A., Kanekar,S., Oliver,E.R., Brown,N., Schlecht,H., Vetter,M., and Glaser,T. (2001). The eyeless mouse mutation (*ey1*) removes an alternative start codon from the *Rx/rax* homeobox gene. *Genesis.* *31*, 43-53.
- Tze,L.E., Horikawa,K., Domaschenz,H., Howard,D.R., Roots,C.M., Rigby,R.J., Way,D.A., Ohmura-Hoshino,M., Ishido,S., Andoniou,C.E., Degli-Esposti,M.A., and Goodnow,C.C. (2011). CD83 increases MHC II and CD86 on dendritic cells by opposing IL-10-driven MARCH1-mediated ubiquitination and degradation. *J. Exp. Med.* *208*, 149-165.
- Uldrick,T.S. and Whitby,D. (2011). Update on KSHV epidemiology, Kaposi Sarcoma pathogenesis, and treatment of Kaposi Sarcoma. *Cancer Lett.* *305*, 150-162.
- Varnum,S.M., Streblow,D.N., Monroe,M.E., Smith,P., Auberry,K.J., Pasa-Tolic,L., Wang,D., Camp,D.G., Rodland,K., Wiley,S., Britt,W., Shenk,T., Smith,R.D., and Nelson,J.A. (2004). Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome. *J. Virol.* *78*, 10960-10966.
- Venema,H., van den Berg,A.P., van Zanten,C., van Son,W.J., van der,G.M., and The,T.H. (1994). Natural killer cell responses in renal transplant patients with cytomegalovirus infection. *J. Med. Virol.* *42*, 188-192.
- Wagner,M., Jonjic,S., Koszinowski,U.H., and Messerle,M. (1999). Systematic excision of vector sequences from the BAC-cloned herpesvirus genome during virus reconstitution. *J. Virol.* *73*, 7056-7060.

- Wakasugi,K., Slike,B.M., Hood,J., Otani,A., Ewalt,K.L., Friedlander,M., Cheresch,D.A., and Schimmel,P. (2002). A human aminoacyl-tRNA synthetase as a regulator of angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *99*, 173-177.
- Walter,E.A., Greenberg,P.D., Gilbert,M.J., Finch,R.J., Watanabe,K.S., Thomas,E.D., and Riddell,S.R. (1995). Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N. Engl. J. Med.* *333*, 1038-1044.
- Wan,L., Molloy,S.S., Thomas,L., Liu,G., Xiang,Y., Rybak,S.L., and Thomas,G. (1998). PACS-1 defines a novel gene family of cytosolic sorting proteins required for trans-Golgi network localization. *Cell* *94*, 205-216.
- Wang,D. and Shenk,T. (2005a). Human cytomegalovirus UL131 open reading frame is required for epithelial cell tropism. *J. Virol.* *79*, 10330-10338.
- Wang,D. and Shenk,T. (2005b). Human cytomegalovirus virion protein complex required for epithelial and endothelial cell tropism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *102*, 18153-18158.
- Wang,E.C., McSharry,B., Retiere,C., Tomasec,P., Williams,S., Borysiewicz,L.K., Braud,V.M., and Wilkinson,G.W. (2002). UL40-mediated NK evasion during productive infection with human cytomegalovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *99*, 7570-7575.
- Wang,L.H., Rothberg,K.G., and Anderson,R.G. (1993). Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation. *J. Cell Biol.* *123*, 1107-1117.
- Wang,X., Herr,R.A., and Hansen,T. (2008). Viral and cellular MARCH ubiquitin ligases and cancer. *Semin. Cancer Biol.* *18*, 441-450.
- Wang,X., Huang,D.Y., Huang,S.M., and Huang,E.S. (2005). Integrin alphavbeta3 is a coreceptor for human cytomegalovirus. *Nat. Med.* *11*, 515-521.
- Waterhouse,P., Penninger,J.M., Timms,E., Wakeham,A., Shahinian,A., Lee,K.P., Thompson,C.B., Griesser,H., and Mak,T.W. (1995). Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl α -4. *Science* *270*, 985-988.
- Webb,J.R., Lee,S.H., and Vidal,S.M. (2002). Genetic control of innate immune responses against cytomegalovirus: MCMV meets its match. *Genes Immun.* *3*, 250-262.
- Weiner,M.P., Costa,G.L., Schoettlin,W., Cline,J., Mathur,E., and Bauer,J.C. (1994). Site-directed mutagenesis of double-stranded DNA by the polymerase chain reaction. *Gene* *151*, 119-123.
- Wiertz,E.J., Jones,T.R., Sun,L., Bogyo,M., Geuze,H.J., and Ploegh,H.L. (1996a). The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Cell* *84*, 769-779.
- Wiertz,E.J., Tortorella,D., Bogyo,M., Yu,J., Mothes,W., Jones,T.R., Rapoport,T.A., and Ploegh,H.L. (1996b). Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature* *384*, 432-438.
- Wloch,M.K., Smith,L.R., Boutsaboualoy,S., Reyes,L., Han,C., Kehler,J., Smith,H.D., Selk,L., Nakamura,R., Brown,J.M., Marbury,T., Wald,A., Rolland,A., Kaslow,D., Evans,T., and Boeckh,M. (2008). Safety and immunogenicity of a bivalent cytomegalovirus DNA vaccine in healthy adult subjects. *J. Infect. Dis.* *197*, 1634-1642.

Wright,J.F., Kurosky,A., and Wasi,S. (1994). An endothelial cell-surface form of annexin II binds human cytomegalovirus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *198*, 983-989.

Zamora,M.R. (2011). DNA viruses (CMV, EBV, and the herpesviruses). *Semin. Respir. Crit Care Med.* *32*, 454-470.

Zarudnaya,M.I., Kolomiets,I.M., Potyahaylo,A.L., and Hovorun,D.M. (2003). Downstream elements of mammalian pre-mRNA polyadenylation signals: primary, secondary and higher-order structures. *Nucleic Acids Res.* *31*, 1375-1386.

Ziegler,H., Thale,R., Lucin,P., Muranyi,W., Flohr,T., Hengel,H., Farrell,H., Rawlinson,W., and Koszinowski,U.H. (1997). A mouse cytomegalovirus glycoprotein retains MHC class I complexes in the ERGIC/cis-Golgi compartments. *Immunity.* *6*, 57-66.

Zou,G.M. and Hu,W.Y. (2005). LIGHT regulates CD86 expression on dendritic cells through NF-kappaB, but not JNK/AP-1 signal transduction pathway. *J. Cell Physiol* *205*, 437-443.

Zou,L. and Menon,R.K. (1995). A member of the CTF/NF-1 transcription factor family regulates murine growth hormone receptor gene promoter activity. *Endocrinology* *136*, 5236-5239.

Anhang

Abkürzungsverzeichnis

7AAD	7-Aminoactinomycin D
A	Adenin
A	Alanin
A	Ampère
Å	Ångström
AC	<i>Acidic cluster</i> , Ansammlung saurer Aminosäuren innerhalb eines Proteins
AIDS	<i>acquired immune deficiency syndrome</i>
Amp	Ampicillin
AP-1	Adaptorprotein-1
APC	<i>antigen-presenting cell</i> , Antigen-präsentierende Zelle
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i> , artifizielles Bakterienchromosom
bp	<i>basepairs</i> , Basenpaare
C	Cystein
C	Cytosin
Cam	Chloramphenicol
CGRP	Calcitoninen-verwandtes Peptid
CLIC	<i>clathrin-independent carriers</i>
CIP	<i>calf intestine Phosphatase</i>
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalovirus
D	Aspartat
DC	<i>dendritic cell</i> , dendritische Zelle
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
d p.i.	<i>days post infection</i> , Tage nach Infektion

E	<i>Early</i> (-Protein/ -Gen)
E	Glutamat
EBV	Epstein-Barr-Virus
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEA-1	<i>early endosome antigen-1</i>
EMSA	<i>electro-mobility shift assay</i>
Endo H	Endoglykosidase H
ER	Endoplasmatisches Retikulum
F	Farad
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i> , Durchflusszytometrie
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fetales Kälberserum
FL	<i>full length</i>
Flp	Flippase
FRT	<i>Flippase recognition target</i> , Flippase Zielsequenz
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung
gag	gruppenspezifische Antigene
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
gB/gH/gL/gO	Glykoprotein B/H/L/O
GEEC	<i>GPI-enriched endocytic compartment</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i> , grün-fluoreszierendes Protein
GHR	<i>growth hormone receptor</i>
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
h	Stunde
HA	Influenza-Virus Hämagglutinin
HAART	hochaktive antiretrovirale Therapie
HCMV	humanes Cytomegalovirus
HHV	humanes Herpesvirus
HIV	humanes Immundefizienzvirus
h p.i.	<i>hours post infection</i> , Stunden nach Infektion
HSV	Herpes Simplex Virus

IE	<i>Immediate Early</i> (-Protein/ -Gen)
IF	Immunfluoreszenz
IL	Interleukin
IL2R β	Interleukin-2-Rezeptor β
IRES	<i>internal ribosom entry site</i> , interne Ribosomen-Bindestelle
K	Lysin
Kan	Kanamycin
kDa	Kilodalton
KSHV	Kaposi-Sarkom-assoziiertes Herpesvirus
L	<i>Late</i> (-Protein/ -Gen)
LB	Luria Bertani
LTR	<i>long terminal repeats</i>
$\mu\text{g}/\mu\text{l}/\mu\text{m}$	Mikrogramm/Mikroliter/Mikrometer
M	molar
MAP	<i>mitogen-activated protein</i>
MARCH	membrane-associated RING-CH-proteins, Membran-assoziierte RING-CH-Proteine
MCMV	murines Cytomegalovirus
MEF	murine embryonale Fibroblasten
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
MIEP	<i>major immediate early promoter</i>
min	Minute
ml	Milliliter
MOI	<i>multiplicity of infection</i> , Multiplizität der Infektion
mRNA	<i>messenger RNA</i>
ng/nm	Nanogramm/Nanometer
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NIEP	<i>non-infectious enveloped particle</i> , nicht-infektiöses umhülltes Partikel
OD	<i>optical density</i> , optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i> , offenes Leseraster
P	Prolin
PACS-1	<i>phosphofurin acidic cluster sorting protein-1</i>

PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i> , mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PFU	<i>plaque forming units</i> , Plaque-formende Einheiten
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PNGase F	N-Glykosidase F
Pol	Polymerase
PPT	Polypurintrakt
PRE	<i>posttranscriptional regulatory element</i>
R	Arginin
R	Purin
RING	<i>really interesting new gene</i> -Domäne
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rotations per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RRE	<i>Rev response element</i>
RT	Raumtemperatur
S	Serin
SCMV	<i>simian Cytomegalovirus</i> , Affen-Cytomegalovirus
SDS	<i>sodiumdodecylsulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SFFV	<i>spleen foamy forming virus</i>
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
SIN	<i>self-inactivating</i> , selbst-inaktivierend
ssDNA	<i>single-stranded DNA</i> , Einzelstrang-DNA
T	Thymin
TCR	<i>T-cell receptor</i> , T-Zell-Rezeptor
TGN	<i>trans-golgi network</i> , Trans-Golgi-Netz
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

U	Units
UL	<i>unique long region</i> , Unterteilung im HCMV-Genom
ü. N.	über Nacht
US	<i>unique short region</i> , Unterteilung im HCMV-Genom
UTR	<i>untranslated region</i> , nicht-translatierter Bereich
V	Volt
VSV	Vesikuläres Stomatitisvirus
VZV	Varizella-Zoster-Virus
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem
Ω	Ohm
°C	Grad Celsius

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1	Verwendete Laborgeräte und Materialien	27
Tabelle 2.2	In dieser Arbeit verwendete Inhibitoren und eingesetzte Konzentration	29
Tabelle 2.3	Antikörper	30
Tabelle 2.4	Zellkulturmedien und –lösungen	35
Tabelle 2.5	Lösung zur Präparation von Plasmid-DNA	38
Tabelle 2.6	Verwendete Puffer zur Agarose-Gelelektrophorese	41
Tabelle 2.7	Plasmide, welche mit Hilfe der Quick Mutagenese modifiziert wurden	44
Tabelle 2.8	Verwendete Lösungen und Puffer zur SDS-PAGE	50
Tabelle 2.9	Verwendete Lösungen bei der Western Blot-Analyse	51
Tabelle 2.10	In der Westernblot-Analyse verwendete Antikörper und ihre Verdünnungen	51
Tabelle 2.11	In der Immunfluoreszenz verwendete Antikörper, Farbstoffe und ihre Verdünnungen	54
Tabelle 2.12	Lösungen zur FACS-Analyse	55
Tabelle 2.13	Im Rahmen dieser Arbeit modifizierte BACs	60
Tabelle 2.14	In dieser Arbeit verwendete lentivirale Vektoren	62
Tabelle 2.15	Menge der eingesetzten Plasmide in der Lentivirusproduktion	62

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Aufbau und Struktur des HCMV-Virions	3
Abbildung 1.2 Schematische Darstellung des Replikationszyklus von HCMV	5
Abbildung 1.3 Einfluss der MCMV-Genprodukte m04, m06 und m152 auf die CD8 ⁺ T-Zellen und NK-Zellen von BALB/c-Mäusen	15
Abbildung 1.4: Funktion von CD80 und CD86 bei der T-Zellaktivierung	18
Abbildung 1.5 Bildung Clathrin-bedeckter Vesikel	21
Abbildung 1.6: ModB7-2 ist das Gen-Produkt des ORFs m147.5 und seine Expression verringert die Oberflächenexpression von CD86 in RAW264.7-Zellen	23
Abbildung 1.7 Schematische Darstellung der modB7-2-Anordnung in der Membran	24
Abbildung 2.1: Schematische Darstellung über den Ablauf der Quick Mutagenese	43
Abbildung 2.2 Pronase verdaut Oberflächenproteine	47
Abbildung 2.3 Überblick über den Ablauf der Flp-vermittelten Rekombination	60
Abbildung 2.4 Schematischer Aufbau des Vektors pRRL.PPT.SF.I2GFP	61
Abbildung 3.1 Verminderung der CD86-Oberflächenexpression 9 h nach Infektion in RAW264.7-Zellen	65
Abbildung 3.2 Expression von modB7-2 in MCMV-infizierten, CD86-exprimierenden WT3-Fibroblasten	66
Abbildung 3.3 CD86-Oberflächenexpression in CD86 stabil transduzierten Fibroblasten (WT3-Fibroblasten)	67
Abbildung 3.4 Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der CD86-Oberflächenexpression auf WT3-Fibroblasten	68
Abbildung 3.5 CD86-Oberflächenexpression (A) und CD86-Gesamt-Expression (B) in DC2.4-Zellen 24 h nach Infektion mit verschiedenen MCMV-Mutanten	70
Abbildung 3.6 Schematische Darstellung der Genomstruktur (A) und DNA-Sequenz von modB7-2 FL und der Mutanten mit unterschiedlichen Start-Kodons in Vektor pcDNA3(B)	73
Abbildung 3.7 Expression von modB7-2 nach Transfektion von HEK 293T-Zellen mit den verschiedenen Expressionsplasmiden	74
Abbildung 3.8 Verringerung der CD86-Oberflächenexpression von DC2.4-Zellen, die modB7-2-Varianten mit unterschiedlichen Startkodons exprimieren	76
Abbildung 3.9 Ausschnitt aus dem Genom der Mutanten MCMV-Δ6 modB7-2 1.ATG, MCMV-Δ6 modB7-2 3.ATG und MCMV-Δ6 modB7-2no1Exon	78

Abbildung 3.10 CD86-Oberflächenexpression bei Infektion von DC2.4-Zellen mit MCMV- Δ 6 modB7-2 no1Exon	79
Abbildung 3.11 Schematische Darstellung der lentiviralen Konstrukte zur Untersuchung der Expression von modB7-2	81
Abbildung 3.12 Expression und Funktion von modB7-2-Varianten nach Transduktion von DC2.4-Zellen mittels lentiviraler Expression	84
Abbildung 3.13 modB7-2-Proteinmenge nach lentiviraler Transduktion von DC2.4-Zellen mit verschiedenen modB7-2-Varianten im Vergleich zur modB7-2-Proteinmenge nach MCMV-Infektion von DC2.4-Zellen	85
Abbildung 3.14 Lokalisation von modB7-2HA in MCMV-infizierten DC2.4-Zellen 24 h p. i.	87
Abbildung 3.15 Lokalisation von modB7-2HA in MCMV-infizierten DC2.4-Zellen 8 h p. i.	89
Abbildung 3.16 Lokalisation von modB7-2HA in MCMV-infizierten DC2.4 12 h p. i.	90
Abbildung 3.17 Die Aminosäuresequenz von ModB7-2 beinhaltet ein <i>Acidic Cluster</i>	92
Abbildung 3.18 Expression (A) und Funktion (B) von modB7-2 Δ AC nach Infektion von DC2.4-Zellen	93
Abbildung 3.19 Lokalisation von modB7-2 nach Infektion von DC2.4-Zellen mit MCMV- Δ 6modB7-2 FL bzw. MCMV- Δ 6modB7-2- Δ AC	94
Abbildung 3.20 modB7-2 mit und ohne Pronase-Behandlung mock infizierter und MCMV-infizierter Zellen	96
Abbildung 3.21 Schematische Darstellung der theoretisch zu erwartenden modB7-2-Proteinfragmente bei Pronase-Behandlung MCMV-infizierter DC2.4-Zellen bei beiden theoretisch möglichen Membrantopologien von modB7-2	98
Abbildung 3.22 Vorhersage putativer N- und O-Glykosylierungsstellen von modB7-2	99
Abbildung 3.23 Vorhersage putativer Phosphorylierungsstellen von modB7-2	100
Abbildung 3.24 Untersuchung auf mögliche Glykosylierung und Phosphorylierung von modB7-2	101
Abbildung 3.25 Versuchsdurchführung zur Untersuchung des Einflusses von modB7-2 auf die zum Zeitpunkt der Infektion auf der Zelloberfläche vorhandenen CD86-Moleküle ("Aufnahme"-Färbung)	103
Abbildung 3.26 "Aufnahme"-Assay zur Bestimmung des Einflusses der modB7-2-Expression auf die zum Infektionszeitpunkt auf der Zelloberfläche vorhandenen CD86-Moleküle infizierter DC2.4-Zellen	105
Abbildung 3.27 CD86-Expression in mock infizierten und mit MCMV-WT-infizierten DC2.4-Zellen	107

Abbildung 3.28 Detektion der Gesamt-CD86-Expression in MCMV-infizierten DC2.4-Zellen nach Zellsortierung	108
Abbildung 3.29 Schematische Darstellung des Experimentes zur Aufklärung des Schicksals von CD86 nach MCMV-WT-Infektion von DC2.4-Zellen mit Pronase	109
Abbildung 3.30 Pronase- (A) und Endo H-Behandlung (B) von mock infizierten oder mit den verschiedenen Virusmutanten infizierten DC2.4-Zellen	110
Abbildung 3.31 MG-132- und Leupeptin-Zugabe 19 h p. i. verhindern nicht die Degradation von CD86 in infizierten DC2.4-Zellen	112
Abbildung 3.32 MG-132 und Leupeptin verhindern die Degradation von CD86 in MCMV-WT infizierten DC2.4-Zellen bei Inhibitorzugabe zum Infektionszeitpunkt	113
Abbildung 3.33 CD86-Internalisation nach Infektion von DC2.4-Zellen mit MCMV erfolgt durch Clathrin-vermittelte Endozytose	115
Abbildung 3.34 CD86-Internalisation bei Infektion von DC2.4-Zellen mit MCMV erfolgt über Clathrin-vermittelte Endozytose	116
Abbildung 4.1 Modell möglicher RNA-Sekundärstrukturen der verschiedenen modB7-2-Konstrukte	125
Abbildung 4.2 Sequenzkontext der jeweiligen ATG-Kodons im modB7-2-ORF	126
Abbildung 4.3 Inhibierende Wirkung der Substanzen Ammoniumchlorid, Chlorpromazin, Filipin und Dynasore auf die Clathrin-abhängige und die Calveolae-vermittelte Endozytose	136
Abbildung 4.4 Modell der modB7-2-abhängigen Reduktion der CD86-Oberflächenexpression auf der Zelloberfläche infizierter DC2.4-Zellen	139

Primersequenzen

Primer für die Herstellung der modB7-2-Varianten mit unterschiedlichen ATG-Kodons

1 ATG yes: 5'Pho-GACGCATCCTCCGGGGTGATCACTCATGAGCC-3'

1 ATG no: 5'Pho-GACGCATCCTCCGGGGTGATCACTtagGAGCC-3'

2 ATG yes 3 ATG no: 5'Pho-TTCTTGATGACTGATTTGTGGAATAAGctaCAACG-3'

2 ATG no 3ATG yes: 5'Pho-TTCTTGctaACTGATTTGTGGAATAAGATGCAACG-3'

2 ATG no 3ATG no: 5'Pho-TCCTTGctaACTGATTTGTGGAATAAGctaCAACG-3'

Die Primer sind am 5'-Ende phosphoryliert, Kleinbuchstaben kennzeichnen in CTA-Kodons mutierte ATG-Kodons.

Primer für die Insertion der modB7-2Expressionskassette in den Vektor pORI6K

mod Kass PstI for 5'-AAAGTACctgcagAAGAATCTGCTTAGGGTTAG-3'

mod Kass Sall rev 5'-ATAAGTTgtcgacTTCCGCCTCAGAAGCCATA-3'

Kleinbuchstaben kennzeichnen die jeweilige Restriktionsschnittstelle.

Primer für die Mutation der FRT-Stelle im Vektor pORI6K zur im MCMV-Δ6-BAC kompatiblen FRT-Stelle

FRT-mut for: 5'Pho-aaaggtataggaacttcGAATTCGAAGG-3'

FRT-mut rev: 5'Pho-tgaagaataggaacttcGCCAGTTGTTA-3'

Die Primer sind am 5'-Ende phosphoryliert. Kleinbuchstaben kennzeichnen die zu MCMV-Δ6 kompatible FRT-Stelle.

Primer für die Herstellung von pRRL.PPT.SF.I2GFP mit *AgeI*-Schnittstelle

Axel *AgeI* for: 5'Pho-TTATCGATCACGAGACTAGCCTCGAGCT-3'

Axel *AgeI* rev: 5'Pho-AGGGGCGGATCCGTCGACaccggtGATAAGCTTGATT-3'

Die Primer sind am 5'-Ende phosphoryliert. Kleinbuchstaben kennzeichnen die Restriktionsschnittstelle für *AgeI*.

 Primer für die Insertion des ORFs von modB7-2 in pRRL.PPT.SF.I2GFP mit *AgeI*-Schnittstelle

modB7-2 *AgeI* for: 5'-AATGGCaccggtGCCACCATGAGTGATCA-3'

modB7-2 *Bam*HI rev: 5'-TCATAGgatccTTATTCATCGTCGGGACCG -3'

Kleinbuchstaben kennzeichnen die Restriktionsschnittstelle für das jeweilige Enzym, Rot stellt die Kozak-Sequenz da.

 Primer für die Insertion des ORFs von modB7-2no1Exon in pRRL.PPT.SF.I2GFP mit *AgeI*-Schnittstelle

*AgeI*Kozak

modB7-2 3.A: 5'-TTATCaccggtGCCACCATGCAACGAAGACCGGGA-3'

modB7-2HA *Bam*HI: 5'-TTGAGAggatccTTAAGCGTAGTCTGGG-3'

Kleinbuchstaben kennzeichnen die Restriktionsschnittstelle für das jeweilige Enzym, Rot stellt die Kozak-Sequenz da.

 Primer für die Mutation des modB7-2-ORF im Vektor pORI6K zur Variante modB7-2no1Exon

No Exon 1 for: 5'Pho-ATGCAACGAAGACCGGGATCGGA-3'

No Exon 1 rev: 5'Pho-GAGCCGGATCCGAGCTCGGTA-3'

Die Primer sind am 5'-Ende phosphoryliert. In rot ist das 3.ATG-Kodon des modB7-2-ORFs.

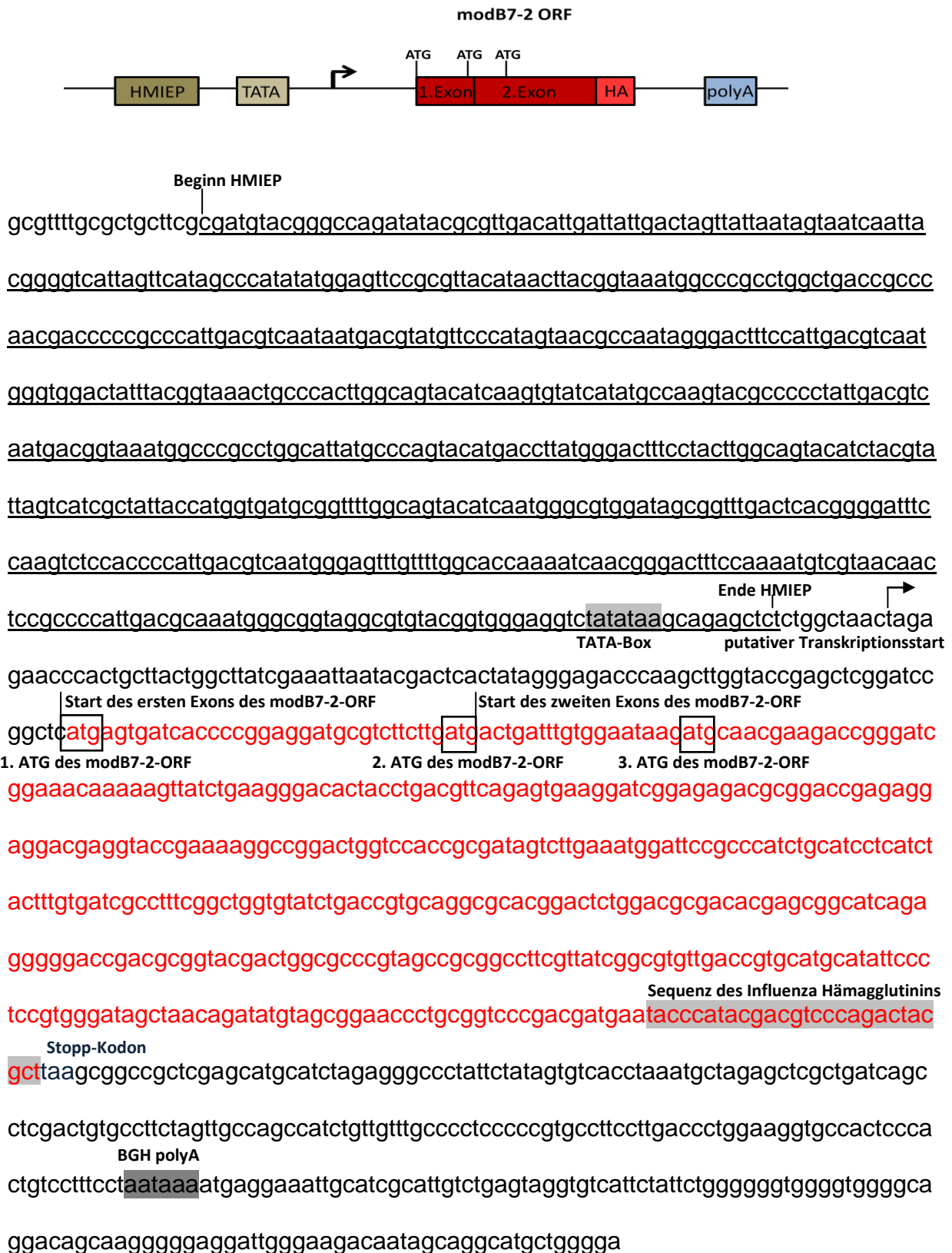
 Primer für die Mutation des modB7-2-ORF im Vektor pORI6K zur Variante modB7-2ΔAC

noAcidic for: 5'Pho-GCGGCGGTACCGaaaaGGCCGGACTGGT-3'

noAcidic rev: 5'Pho-CGCCGCTCGGTCCGCGTCTCTCCGAT-3'

Die Primer sind am 5'-Ende phosphoryliert. Kleinbuchstaben kennzeichnen die modifizierte Sequenz

DNA-Sequenz des modB7-2-ORFs im Expressionsvektor pcDNA3



Aminosäuresequenz des ORFs von modB7-2

Kodiert durch 1.ATG in DNA- Sequenz	Kodiert durch 2.ATG in DNA- Sequenz	Kodiert durch 3.ATG in DNA- Sequenz
<u>MSDHPGGCVFL</u>	<u>MTDLWNI</u>	<u>M</u>
Kodiert vom 1.Exon des modB7-2ORF		Translationsstart auf der mRNA

Putatives Acidic Cluster

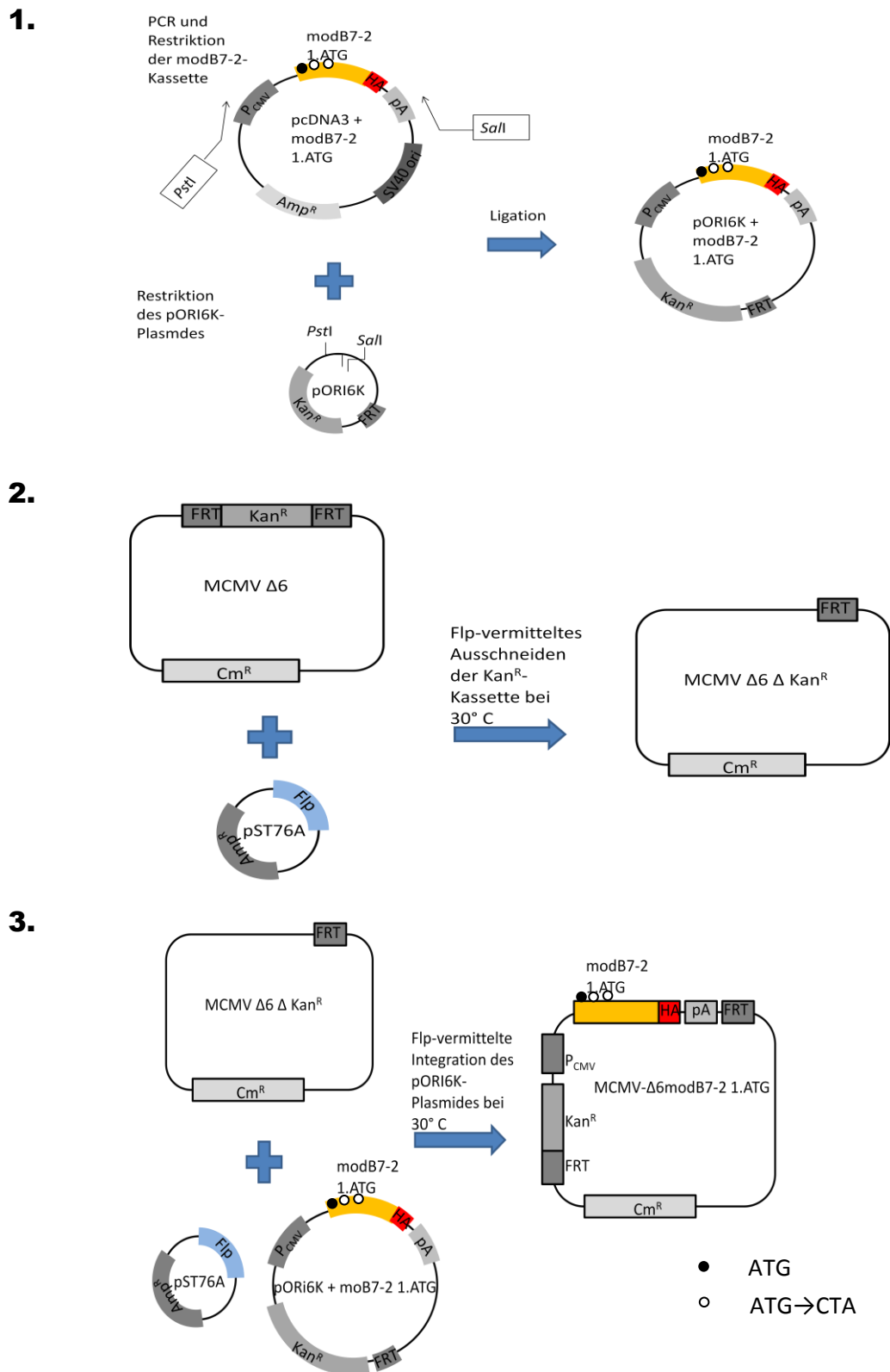
VPKRPDWST **AIVLKWIPPICILYFVIAFRLV** YLTVQAHGLWTRH
 Putative Transmembrandomäne

ERHQ~~R~~GT **DAVRLAPVAAAFVIGVLT VHAYS** LRGIANRYVAEPCGPD
 Putative Transmembrandomäne

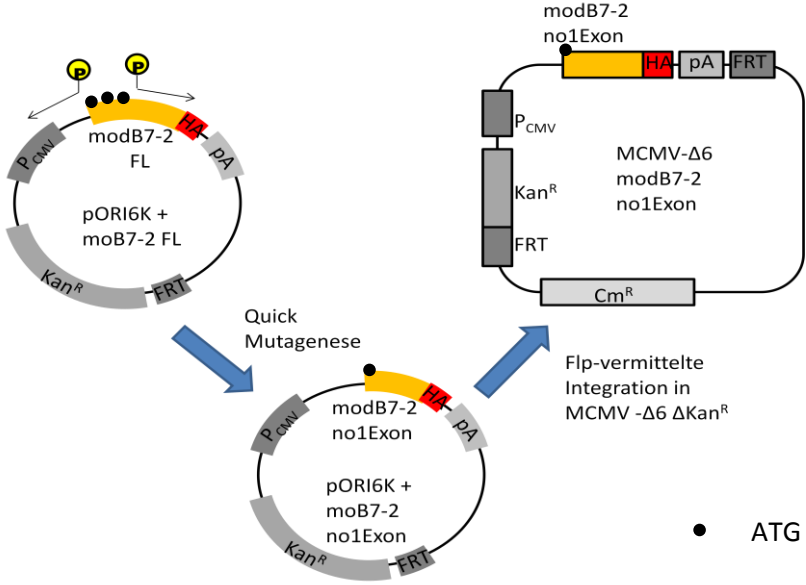
DE*

Klonierungsstrategien

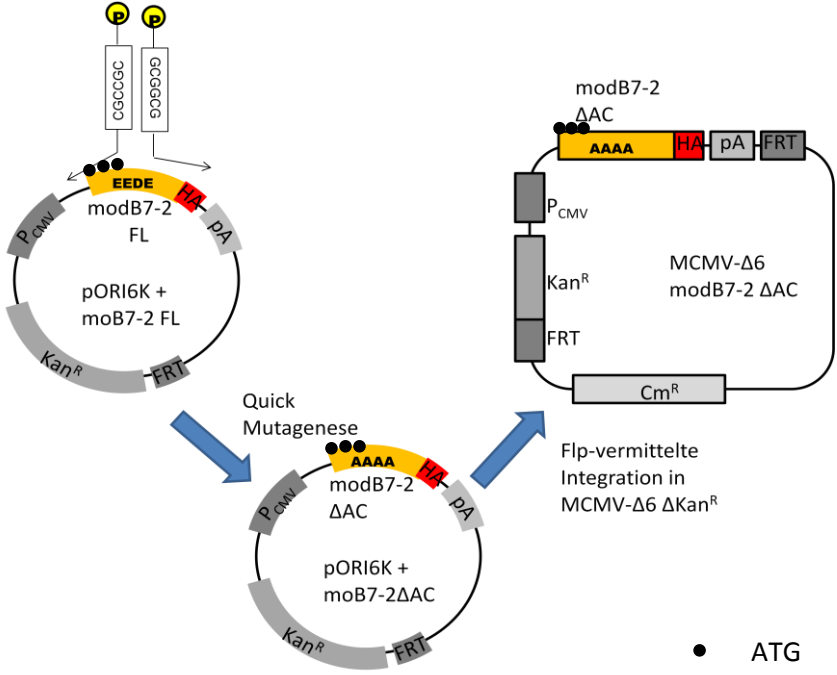
Schematische Darstellung der Herstellung der Virusmutanten mit verschiedenen modB7-2-Varianten am Beispiel von modB7-2 1.ATG



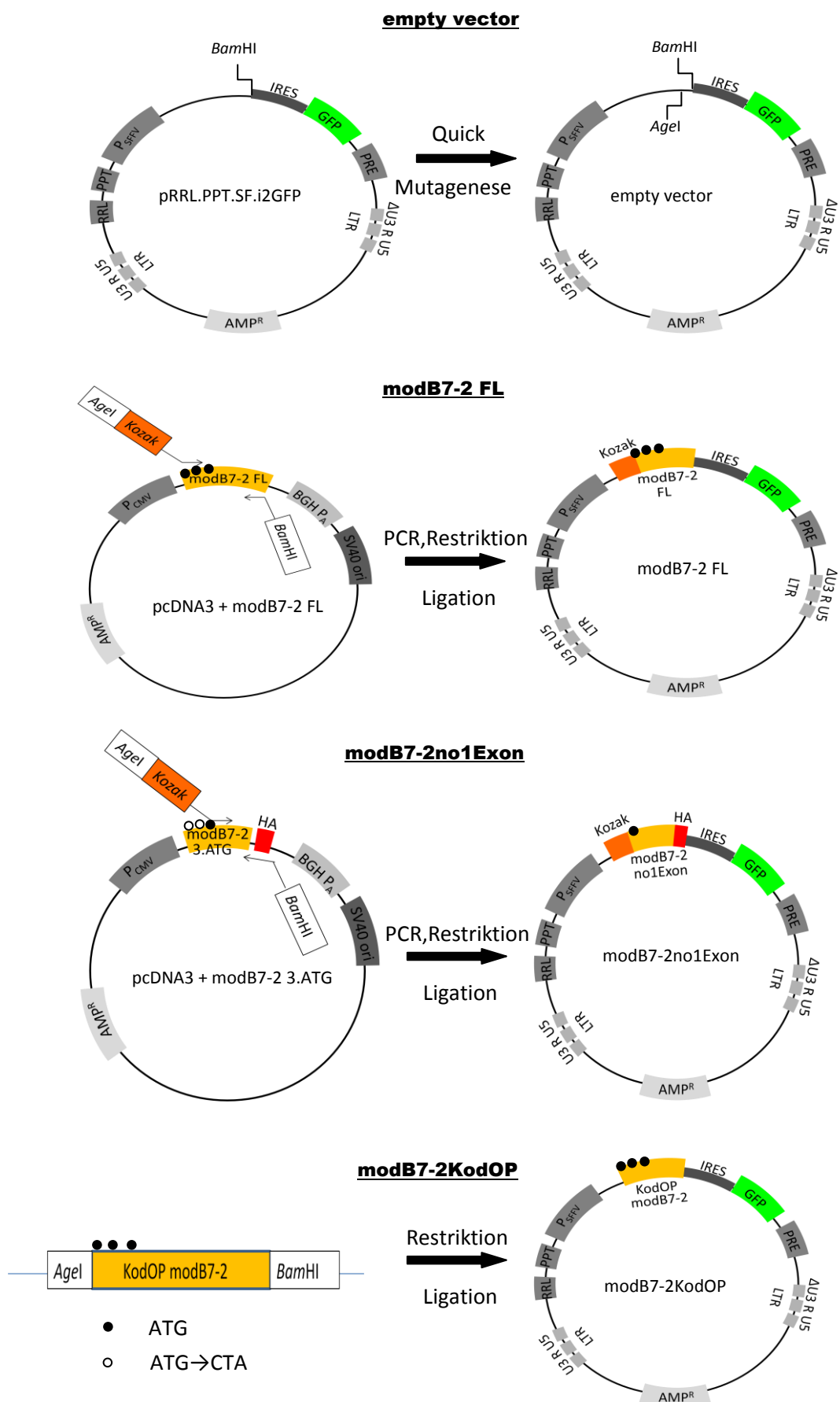
Schematische Darstellung zur Herstellung der Virusmutante MCMV-Δ6 modB7-2no1exon



Schematische Darstellung zur Herstellung der Virusmutante MCMV-Δ6 modB7-2ΔAC



Schematische Darstellung der Konstruktion der verschiedenen lentiviralen Vektoren





Lebenslauf

Name: Christoph Jakob Peter
Geburstag: 09.04.1982 in Wadern
Nationalität: deutsch

Ausbildung

03/2008-06/2012 Doktorarbeit an der Medizinischen Hochschule Hannover; Institut für Virologie

10/2002-10/2007 Studium des Faches „Diplom-Biologie – mit Schwerpunkt Human- und Molekularbiologie“ an der Universität des Saarlandes

Abschluss Diplom

Hauptfach: Genetik

Nebenfächer: Zellbiologie, Virologie

Diplomarbeit am Institut für Genetik, Universität des Saarlandes
Titel der Diplomarbeit: Klonierung, Expression und Funktionsanalyse der putativen Demethylase *activation-induced cytidine deaminase AID*

Zivildienst

07/2001-04/2002 Zivildienst am Jugendgästehaus Tholey

Schulbildung

1992-2001 Besuch des Cusanus-Gymnasiums St. Wendel
Abschluss Abitur

1988-1992 Besuch der Grundschule Theley

Publikationsliste

Wissenschaftliche Publikationen

Loewendorf AI, Steinbrück L, Peter C, Busche A, Benedict CA, Kay-Jackson PC

“The mouse cytomegalovirus glycoprotein m155 inhibits CD40 expression and restricts CD4 T cell responses”

J Virol. 2011 May; 85(10): 5208-12. Epub Mar 2011, 16

Peter C, Steinbrück L, Schulz T, Messerle M, Kay-Fedorov PC

“The modB7-2 protein down regulates the costimulatory molecule CD86 from the surface of MCMV infected cells via clathrin dependent endocytosis and lysosomal degradation”

Manuskript in Vorbereitung

Tagungsbeiträge

Christoph Peter, Penelope Kay-Jackson, Axel Schambach, Daniela Zychlinski und Martin Messerle

„A lentiviral-based transduction approach to investigate the function of a mouse cytomegalovirus protein downregulating CD86 in macrophages and dendritic cells”

Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Leipzig, 2009 (Poster)

Christoph Peter, Penelope Kay-Jackson, Adi Drori, Boaz Tirosh, Martin Messerle

“The immunomodulatory MCMV-protein modB7-2 interacts directly with cell surface protein CD86 and promotes its downregulation in antigen-presenting cells”

Master Class of Virology, Hannover, 2009 (Poster)

Erklärung zur Dissertation

gemäß §6(1) der Promotionsordnung der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Gottfried
Wilhelm Leibniz Universität Hannover

für die Promotion zum Dr. rer. nat.

Hierdurch erkläre ich, dass ich meine Dissertation mit dem Titel

„Charakterisierung des immunmodulatorischen Gens modB7-2 des murinen Cytomegalovirus“

selbständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel und Quellen sowie gegebenenfalls die
zu Hilfeleistungen herangezogenen Institutionen vollständig angegeben habe.

Die Dissertation wurde nicht schon als Masterarbeit, Diplomarbeit oder andere
Prüfungsarbeit verwendet.

Christoph Jakob Peter

