

Aus dem Robert Koch-Institut,
Fachgebiet Virale Infektionen

DISSERTATION

**Untersuchungen zur Struktur und Funktion von
Cytomegalovirus - kodierten Fc γ -Rezeptoren**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)
vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Arndt Bigl
aus Schlema

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. H. Hengel
2. Prof. Dr. med. G. Schönrich
3. Prof. Dr. M. Messerle

Datum der Promotion: 19.11.2010

Gliederung

1	Abkürzungen	6
2	Zusammenfassung	8
3	Einleitung.....	10
3.1	Herpesviren.....	10
3.1.1	Struktur und Größe von Herpesviren	12
3.1.2	Infektion, Replikation und Latenz	13
3.2	Cytomegaloviren als Prototypen der β -Herpesviren	14
3.2.1	Epidemiologie und Übertragungswege	15
3.2.2	Risikogruppen	16
3.2.3	Klinische Symptomatik von CMV Infektionen	17
3.2.4	Diagnostik und Therapie von CMV Infektionen	20
3.3	MCMV als Modell für HCMV	22
3.4	Abwehr von viralen Erregern durch das Immunsystem	22
3.5	Immunantwort gegen CMV.....	24
3.6	Fc γ -Rezeptoren	24
3.7	Virale Fc γ -Rezeptoren.....	27
4	Zielsetzung der Arbeit.....	29
5	Material & Methoden	32
5.1	Material	32
5.1.1	Antikörper.....	32
5.1.2	Bakterien.....	32
5.1.3	Bakterielle Nährmedien.....	32
5.1.4	Chemikalien und Reagenzien	33
5.1.5	Enzyme	35
5.1.6	Geräte	35
5.1.7	Kits.....	36
5.1.8	Lösungen und Puffer.....	37
5.1.9	Oligonukleotide	39
5.1.10	Plasmide und BACmide	42
5.1.11	Software.....	42
5.1.12	Viren.....	42
5.1.13	Zelllinien.....	43

5.1.14	Zellkultur Nährmedien	43
5.2	Methoden	44
5.2.1	Mikrobiologische Methoden.....	44
5.2.1.1	Kultivierung von <i>E.coli</i>	44
5.2.1.2	Herstellen von kompetenten Bakterien	44
5.2.2	Molekularbiologische Methoden.....	45
5.2.2.1	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	46
5.2.2.2	Klonierung von Plasmiden	46
5.2.2.3	Agarose Gelelektrophorese	47
5.2.2.4	Restriktionsverdau	47
5.2.2.5	Reinigung von DNA Fragmenten und Gelelution.....	48
5.2.2.6	Ligation von DNA Fragmenten	49
5.2.2.7	Transformation von Plasmid - DNA	49
5.2.2.8	Präparation von Plasmid - DNA.....	50
5.2.2.9	Präparation von viraler und BACmid DNA.....	51
5.2.2.10	Kontrollen.....	51
5.2.2.11	Sequenzierung.....	52
5.2.2.12	BAC Mutagenese.....	52
5.2.3	Zellbiologische Methoden	53
5.2.3.1	Kultivierung / Handhabung	53
5.2.3.2	Herstellung von Vaccinia Rekombinaten	54
5.2.3.3	Transfektion von BACmid - DNA in eukaryotische Zellen.....	55
5.2.3.4	Infektion	56
5.2.3.5	Herstellung von Virusstocks	56
5.2.3.6	Titration.....	56
5.2.4	Immunchemische Methoden	57
5.2.4.1	Immunpräzipitation	57
5.2.4.2	FACS - Analyse	58
5.2.5	Proteinchemische Methoden.....	59
5.2.5.1	Western Blot	59
5.2.5.2	Proteinase K Verdau	60
5.2.5.3	SDS - Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS PAGE).....	61
6	Ergebnisse	62

6.1	Sequenzvergleiche von <i>m138</i> und RCMV Homologen mit zellulären Fc γ -Rezeptoren	62
6.2	Vergleich der Fc γ -bindenden Funktion von <i>r138</i> und <i>m138</i>	70
6.2.1	Klonierung und Herstellung von rekombinanten Vaccinia Viren zur Expression von <i>r138</i> und <i>m138</i>	71
6.2.2	Funktionalität und IgG Spezifität von <i>m138</i> fcr-1, <i>r138</i> NL und <i>r138</i> UK in der FACS Analyse und der Immunpräzipitation.....	74
6.3	Punktmutation der putativen IgSF Domänen des viralen vFc γ R <i>m138</i> von MCMV	79
6.3.1	PCR Mutagenese.....	80
6.3.2	Klonierung des Shuttle Vektors.....	83
6.3.3	BACmid Mutagenese	89
6.3.4	Rekonstitution rekombinanter MCMV.....	91
6.4	Funktionsanalyse der vFc γ R <i>m138</i> Mutanten.....	92
6.4.1	Durchflusszytometrie (FACS).....	92
6.4.2	Immunpräzipitation	94
7	Diskussion	97
7.1	Struktur des vFc γ R <i>m138</i>	98
7.2	Funktionen viraler Fc γ -Rezeptoren HSV, MCMV, RCMV	99
7.3	Immunmodulation und Immunevasionsmechanismen von CMV	101
8	Literatur	103
9	Danksagung	109
10	Lebenslauf	111
11	Publikationsliste	112
12	Erklärung	113

1 Abkürzungen

ADCC	<i>Antibody dependent cellular cytotoxicity (cytolysis)</i> / AK- abhängige zelluläre Immunantwort (z.B. durch NK oder T-Zellen)
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfatlösung
BAC	<i>Bacterial artificial chromosome</i> / künstliches Bakterienchromosom
bp	<i>Base pairs</i> / Basenpaare
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> / Rinderserumalbumin
BrdU	Bromdeoxyuridin (5-Bromo-2-desoxyuridin)
CD	<i>Cluster of differentiation</i> bzw. <i>cluster determinants</i> / internationales System für Differenzierungsantigene
CD 16, 32, 64	Zelluläre Fc-Rezeptoren
CDS	<i>Coding sequence</i> / <i>m138</i> kodierende DNA Sequenz
E-Phase	<i>Early phase</i> / frühe Replikationsphase von Herpesviren
EDTA	<i>Ethylene diamine tetra acetic acid</i> / Ethylendiamintetraessigsäure
Endo H	Endoglykosidase H
Episom	Zirkuläre Virus-DNA im Zellkern
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i> / Durchflusszytometrie
Fc γ R	Fc γ -Rezeptor
FCS	<i>Fetal calf serum</i> / fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FLAG-tag	<i>Flag</i> / Fahne, <i>to tag</i> / markieren, beschildern; bezeichnet eine Polypeptidsequenz aus den Aminosäuren DYKDDDDK
FSH	<i>Frame shift</i> / Verschiebung des Leserahmens
gp	Glykoprotein
gE & gI	Glykoprotein E und I (virale Fc γ -Rezeptoren von HSV)
HCMV	Humanes Cytomegalovirus
HSV-1	Herpes Simplex Virus Typ1
HSV-2	Herpes Simplex Virus Typ2
ICOS	<i>Inducible costimulator</i> / induzierbarer Kostimulator
IE-Phase	<i>Immediate early phase</i> / sehr frühe Replikationsphase von Herpesviren

IgG	Immunglobulin der Klasse G
IgSF	Immunglobulinsuperfamilie
kDa	Kilodalton
LDL	<i>Low density lipoprotein</i> / Lipoprotein niederer Dichte
L-Phase	<i>late phase</i> / späte Phase Replikationsphase von Herpesviren
MCMV	Maus - Cytomegalovirus
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> / Haupthistokompatibilitätskomplex
Mock - Kontrolle	<i>mock, to mock</i> / Attrappe, vortäuschen, Kontrolle bei dem in einem Infektionsmodell die verwendeten Zellen nicht infiziert bzw. nur mit einem Leervektor behandelt werden.
MOI	<i>Multiplicity of infection</i> / Vielfachheit der Infektion (Zahlenverhältnis von infektiösen Partikeln zu deren Zielzellen)
MULT-1	<i>Murine UL16 - binding protein - like transkript</i> / NK G2D Ligand
orf	<i>Open reading frame</i> / offener Leserahmen
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> / Polymerase Ketten Reaktion
pfu	<i>Plaque forming unit</i> / Plaque-bildende Einheit
p.i.	<i>Post infection</i> / nach Infektion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
rVV	Rekombinantes Vaccinia Virus
rMCMV	Rekombinantes Maus - Cytomegalovirus
RCMV	Ratten - Cytomegalovirus
SDS-PAGE	<i>Sodium-dodecylsulfate-polyacrylamide-gel-electrophoresis</i> / Natriumdodecylsulfat - Polyacrylamidgelelektrophorese
TAE	Tris - Acetat - EDTA
TBE	Tris - Borsäure - EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
UAW	Unerwünschte Arzneimittelwirkung
vFc γ R	Viraler Fc γ - Rezeptor
VZV	Varizella Zoster Virus
wt	Wildtyp

2 Zusammenfassung

Das Gen *m138* des Maus Cytomegalovirus (MCMV) kodiert für ein Glykoprotein, welches den Fc Teil von IgG bindet und auf der Zelloberfläche von infizierten Zellen lokalisiert ist und daher einen virus-kodierten Fc γ -Rezeptor bildet. Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass *m138* Homologe von Cytomegaloviren der Ratte (RCMV) gleichfalls diese Eigenschaft besitzen und somit Fc γ -Rezeptoren darstellen. Um weitere Aussagen über die Struktur des *m138* Glykoproteins treffen zu können, wurde ein Sequenzvergleich mit den RCMV kodierten Homologen, sowie der zellulären Fc γ -Rezeptoren CD16, CD32 und CD64 durchgeführt. Aus den sich ergebenden Homologien wurde ein hypothetisches Modell des MCMV kodierten Fc γ -Rezeptors entwickelt, in dem die Fc γ Bindung durch drei putative Immunoglobulinsuperfamilien (IgSF)-artige (Ig) Domänen vermittelt werden könnte. IgSF Domänen werden typischerweise durch Disulfidbrücken, die durch zwei positionskonservierte Cysteine ausgebildet werden, strukturell stabilisiert. Veränderungen in der Sekundärstruktur sollten ein verändertes Fc γ -Bindungsverhalten zu Folge haben.

Um die hypothetische Sekundärstruktur des *m138* experimentell untersuchen zu können, wurden die positionshomologen Cysteine systematisch mutagenisiert und durch Alanin ersetzt. Das Einfügen der Punktmutationen wurde durch PCR Mutagenese und Klonierung dieser Produkte in verschiedene Vektoren realisiert. Rekombinante Vaccinia Viren wurden zur Prüfung der Fc γ Bindung der *m138* Mutanten durch Durchflusszytometrie und Fc γ Präzipitation verwendet. Parallel dazu wurden die gleichen Punktmutationen mittels BACmid Mutagenese ins MCMV Genom eingeführt, um eine anschließende *in vivo* Analyse in der Maus zu ermöglichen.

Es konnte gezeigt werden, dass sich bei den verschiedenen Punktmutationen die Fc γ -Bindungsfähigkeit in unterschiedlicher Intensität ändert. Der erwartete dominante Einfluss der generierten Punktmutationen auf die Fc γ Bindungsfähigkeit von *m138* konnte nicht gezeigt werden.

Summary

Mouse cytomegalovirus (MCMV) *m138* encodes for a surface resident glycoprotein that binds the Fc γ part of IgG, thus constituting a viral Fc γ receptor (Fc γ R). In this dissertation it is shown for the first time that *m138* homologues of rat cytomegaloviruses (RCMV) encode also for an Fc γ binding glycoprotein. To gain deeper insight into the structure of the *m138*, glycoprotein sequence alignments with gene homolog's of RCMV and cellular Fc γ Rs of the mouse, i.e. CD16, CD 32 and CD64 were performed. From the resulting homologies a hypothetical model of MCMV encoded Fc γ R was developed in which Fc γ binding is mediated by 3 putative immunoglobulin supergene family (IgSF) like-domains. These IgSF domains are characterized by 2 positionally conserved cysteins, stabilizing the protein structure through disulphide bonds. Changes in the secondary structure should lead to a modified Fc γ binding capability.

To validate the hypothetical secondary structure of *m138*, in a comprehensive approach positionally conserved cysteins were replaced by alanin. The construction of the point mutants was achieved by PCR mutagenesis and subcloning of the resulting products into different vectors. Recombinant vaccinia viruses were used for testing point mutants for Fc γ binding in cytofluorometry and protein precipitation. In parallel the point mutants were integrated to the MCMV genome via BACmid based mutagenesis to allow future *in vivo* analysis in the mouse.

It could be demonstrated that the some of the point mutants exhibited a loss of Fc γ binding capabilities at various intensities. However the expected strong effect of the generated point mutants on the Fc γ binding could not demonstrated.

3 Einleitung

3.1 Herpesviren

Der Name „Herpesviren“ leitet sich von Beschreibungen der charakteristischen klinischen Hautmanifestationen (griechisch *herpein*: kriechen, schleichen) einer Herpes simplex Virus (HSV) Infektion ab. Die ersten Beschreibungen stammen von Gelehrten aus der griechischen Antike und des römischen Reiches (Wildy 1973). Der erste eindeutige Nachweis einer infektiösen Genese wurde 1919 von Löwenstein erbracht. (Löwenstein 1919) Bei den verschiedenen Säugerspezies sind inzwischen über 100 verschiedene Typen von Herpesviren bekannt.

Die bisher als humanpathogen identifizierten Herpesviren zeigt die Tabelle 1.

Virusfamilie	humanpathogene Typen	assoziierte Erkrankungen	Latenzort
α-Herpesviren	Herpes simplex Virus 1 (HSV-1 bzw. HHV-1)	Herpes labialis, Stomatitis aphtosa, Konjunktivitis, Enzephalitis	Trigeminusganglien
	Herpes simplex Virus 2 (HSV-2 bzw. HHV-2)	Herpes genitalis, Herpes neonatorum	Ganglion sacrale
	Varizella Zoster Virus (VZV bzw. HHV-3)	Windpocken, Herpes zoster	Trigeminus-, Spinalganglien
β-Herpesviren	Cytomegalievirus (CMV bzw. HHV-5)	Mononukleose-ähnliche Erkrankung, assoziiert mit Arteriosklerose und Restenose, generalisierte Infektionen bei immunsupprimierten Patienten (Pneumonie, Enzephalitis, Hepatitis, Meningitis), kongenitale Infektion	latent in Endothelzellen und in Vorläuferzellen von Monozyten / Makrophagen
	Humanes Herpesvirus 6 (HHV-6)	Exanthema subitum	B- und T-Zellen

Virusfamilie	humanpathogene Typen	assoziierte Erkrankungen	Latenzort
β -Herpesviren	Humanes Herpesvirus 7 (HHV-7)	Exanthema subitum? (Tanaka, Kondo et al. 1994), Pityriasis Rosea? (Offidani, Pritelli et al. 2000; Watanabe, Kawamura et al. 2002)	T-Zellen (?)
γ -Herpesviren	Epstein Barr Virus (EBV bzw. HHV-4)	Infektiöse Mononukleose, Lymphadenopathie, Burkitt-Lymphom (NHL), Nasopharynxkarzinom	B-Zellen
	Humanes Herpesvirus 8 (HHV-8 bzw. KSHV <i>Kaposi sarcoma Herpesvirus</i>) (Moore and Chang 1995)	Kaposi Sarkom, primäres Effusionslymphom (B-NHL), multizentrische Castleman'sche Erkrankung (Hengge, Ruzicka et al. 2002)	B-Zellen, T-Zellen (?)

Tabelle 1

Die Einteilung der *Herpesviridae* in die drei Unterfamilien, α -, β - und γ -*Herpesvirinae*, beruht auf ihren verschiedenen Eigenschaften hinsichtlich Pathogenität, Zelltropismus und Replikationseigenschaften.

- α -Herpesviren besitzen ein breites Wirtsspektrum und einen kurzen Replikationszyklus *in vitro*. Während ihrer Latenzperiode *in vivo* persistieren sie in den Nervenzellen der Ganglien.
- β -Herpesviren besitzen ein enges Wirtsspektrum und einen langen Replikationszyklus (48 – 72 h).
- γ -Herpesviren besitzen ebenfalls ein enges Wirtsspektrum, haben aber unterschiedlich lange Replikationszeiten und vermehren sich in lymphoblastischen Zellen, besonders in T-, und B- Lymphozyten.

Auf Genomebene lassen sich zwischen allen Herpesviren deutliche Homologien im Bereich von essentiellen Genregionen nachweisen, was für die phylogenetische Entwicklung aus einem „Ursprungs-Herpesvirus“ spricht. Weiterhin besitzt jeder einzelne Herpesvirustyp eine große Anzahl von *uniquen* Genregionen, was die hohe Spezifität der einzelnen Herpesviren erklären könnte.

3.1.1 Struktur und Größe von Herpesviren

Viren der Gruppe *Herpesviridae* gehören zur Gruppe der behüllten doppelsträngigen DNA Viren (*dsDNA*-Viren).

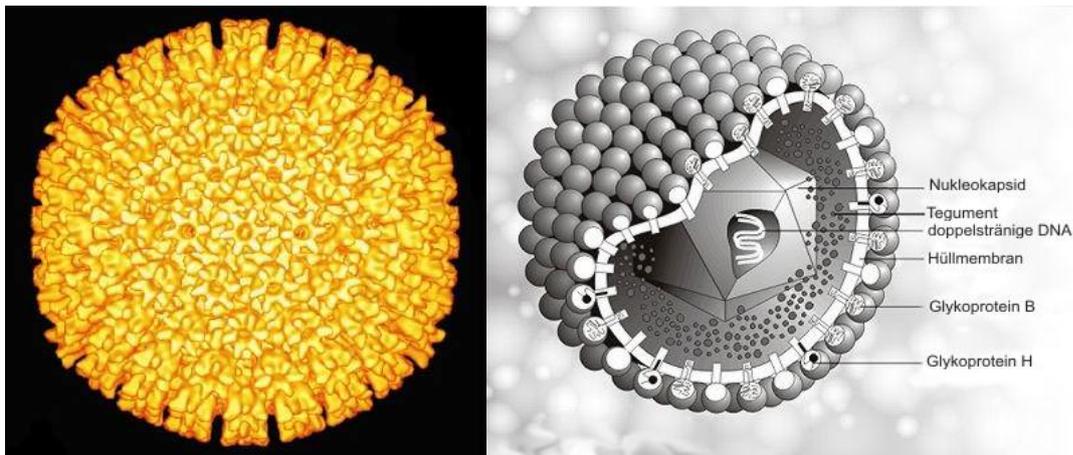


Abbildung 1: Cytomegalievirus, Oberflächenstruktur (Sarah Butcher, Universität Helsinki, Finnland) und Aufbau (Dr. Marko Reschke, Universität Marburg, Deutschland)

Die Virionen der Herpesviren haben einen Durchmesser von 150-200 nm und lassen sich elektronenmikroskopisch sehr schwer differenzieren, da sie sich im äußeren Aufbau kaum unterscheiden. Das lineare doppelsträngige DNA-Genom ist mit einer *Core* genannten fibrillären Proteinmatrix assoziiert und von einem ikosaedrischen Kapsid bestehend aus 162 Kapsomeren umgeben. Sein Durchmesser beträgt 130nm. (Butcher, Aitken et al. 1998)

Die Hüllmembran der Herpesviren besteht aus einer Lipid-Doppelschicht, die von Membranbestandteilen der Wirtszelle abgeleitet ist, sowie *spikeförmig* angeordneten viralen Glykoproteinen. Zwischen äußerer Hüllmembran und dem Kapsid befindet sich das Tegument, eine unstrukturierte Proteinmatrix, die regulatorische Proteine enthält.

Die verschiedenen Glykoproteine der Hüllmembran sind wichtige Interaktionspartner des Virus bei Infektion der Wirtszelle, (Wang, Huong et al. 2003) sowie bei der Replikation.

3.1.2 Infektion, Replikation und Latenz

Nach der Adsorption des Virus an die Wirtszelle erfolgt die Penetration der Zellmembran. Beide Prozesse werden durch verschiedene Rezeptoren und Glykoproteine vermittelt. Dabei gelangt das Genom schließlich über das Zytoplasma, die Mikrotubuli und die Kernporen in den Zellkern. Dort wird die lineare DNA zu einem ringförmigen Genom, einem sogenannten Episom, umgewandelt und verbleibt so als extrachromosomale genetische Information über einen langen Zeitraum im Zellkern. Die nachfolgende Expression der viralen Proteine von Herpesviren erfolgt typischerweise in drei Phasen.

In der sehr frühen Phase (α / *immediate early*, IE, 0-3h) werden regulatorische Gene (Transaktivatoren) transkribiert. Diese schalten die frühe Genexpression (β_1 und β_2 / *early*, E, 3-24h) an, wobei keine virale DNA synthetisiert wird. Die Genprodukte der frühen Phase sind für die Vorbereitung und Durchführung der Replikation verantwortlich. Die späte (γ_1 und γ_2 / *late*, L, 24-72h) Transkription von Genen geschieht nach der viralen DNA - Synthese und dient dem Aufbau der an der Virusstruktur beteiligten Strukturproteine.

Die Synthese der Virus DNA sowie deren Verpackung erfolgt im Zellkern. Ein weiteres spezifisches Merkmal aller Herpesviren ist die irreversible Zerstörung der infizierten Zelle durch Lyse im Zuge der Virusreplikation. Bei CMV ist diese Eigenschaft geringer ausgeprägt als bei anderen Herpesviren (z.B. HSV) und für die Zerstörung der Wirtszelle wird ein längerer Infektionszeitraum benötigt. Auch die Fähigkeit nach einer Primärinfektion eine Latenz auszubilden und lebenslang im Organismus zu persistieren, ist typisch für alle Herpesviren. Dabei wird die Synthese von viralen Proteinen auf ein Minimum beschränkt. Das Genom liegt dabei als Episom im Kern vor. Eine Aktivierung der latenten Infektion kann durch verschiedene Faktoren wie Stress, UV-Exposition oder allgemeine Immunsuppression ausgelöst werden. Eine Reinfektion mit verschiedenen antigenen Varianten einer Herpesvirenspezies ist möglich. (Fields, Knipe et al. 1996)

3.2 Cytomegaloviren als Prototypen der β -Herpesviren

Die durch nukleäre und zytoplasmatische Einschlüsse gekennzeichneten charakteristischen CMV – infizierten Zellen wurden erstmals 1904 von Jesionek und Ribbert sowie 1905 von Tietze beschrieben. Dabei wurde allerdings an eine Infektion mit Protozoen gedacht. Der Name „Cytomegalie“ wurde 1921 von Goodpasture eingeführt und leitet sich von der Größenzunahme durch die Virusreplikation in der infizierten Zellen ab (Weller 2000). Diese sogenannten „Eulenaugenzellen“, führten auch zu der klinischen Bezeichnung „Cytomegalic Inclusion Disease“ (CID).

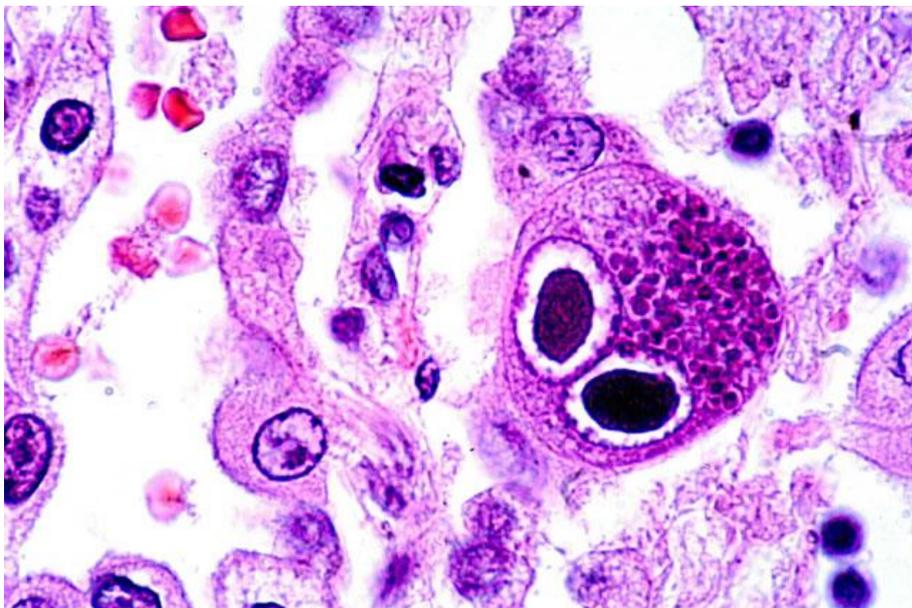


Abbildung 2: typische Einschlusskörperchen, so genannte Eulenaugen, bei einer CMV-Infektion der Lunge. 480x Vergrößerung, HE-Färbung.

(Dan Wiedbrauk, Ph.D., Warde Medical Laboratory, Ann Arbor, MI, USA)

Allen Cytomegalieviren ist gemein, dass ihre Genome zu den größten der Herpesviren und der Viren insgesamt zählen. Genauer wird unterschieden zwischen:

Bezeichnung und Referenz	Basenpaare
Humanem CMV (HCMV, Stamm AD169) (Chee, Bankier et al. 1990)	229354
Humanem CMV (HCMV, klinische Isolate) (Cha, Tom et al. 1996)	bis zu 250000
Murinem CMV (MCMV) (Rawlinson, Farrell et al. 1996)	230278
Ratten CMV (RCMV) (Vink, Beuken et al. 2000)	229896
Rhesus CMV (RhCMV) (Hansen, Strelow et al. 2003)	211456

Tabelle 2

CMV besitzt damit eine geschätzte kodierende Kapazität für bis zu 220 Genprodukte. Das Genom besteht aus jeweils einmal vorkommenden Sequenzen *unique long*, U_L -Region und *unique short*, U_S -Region und sich wiederholenden Sequenzen. Diese Wiederholungen werden *Terminal repeat* (TR) und *internal repeat* (IR) genannt und befinden sich jeweils am Ende und in der Mitte des Genoms. Befindet sich die U_L -Region zwischen den Wiederholungssequenzen, so nennt man diesen Bereich TR_L bzw. IR_L umgekehrt bei der U_S -Region TR_S bzw. IR_S . Bei den Wiederholungssequenzen handelt es sich um *inverted repeats*, was eine intramolekulare Rekombination des Genoms erlaubt, wobei vier isomere Stränge gebildet werden können.

3.2.1 Epidemiologie und Übertragungswege

Die frühe Kindheit ist der wichtigste Infektionszeitraum von CMV. Bis zu einem Alter von 5 bis 6 Jahren erfolgt die Übertragung hauptsächlich von der Mutter auf das Kind. Dies kann pränatal, perinatal, oder postnatal geschehen, wobei der Übertragung durch Muttermilch und Speichel eine besondere Bedeutung zukommt. Weiterhin kommt es zu Infektionen bei Kontakt mit virusausscheidenden Kindern (Urin), z.B. in Kindergärten oder anderen Tageseinrichtungen.

Im jungen Erwachsenenalter wird die endgültige Seroprävalenzrate einer Bevölkerungsgruppe erreicht. Die Übertragung erfolgt dabei hauptsächlich sexuell, wobei CMV in Samen, sowie im männlichen und weiblichen Genitale nachgewiesen werden kann.

Die Prävalenzraten sind in den verschiedenen geographischen Gebieten der Erde und in differierenden Bevölkerungsgruppen unterschiedlich verteilt. So schwanken die Angaben für Deutschland zwischen 43.3 und 64.4%. (Ludwig and Hengel 2009)

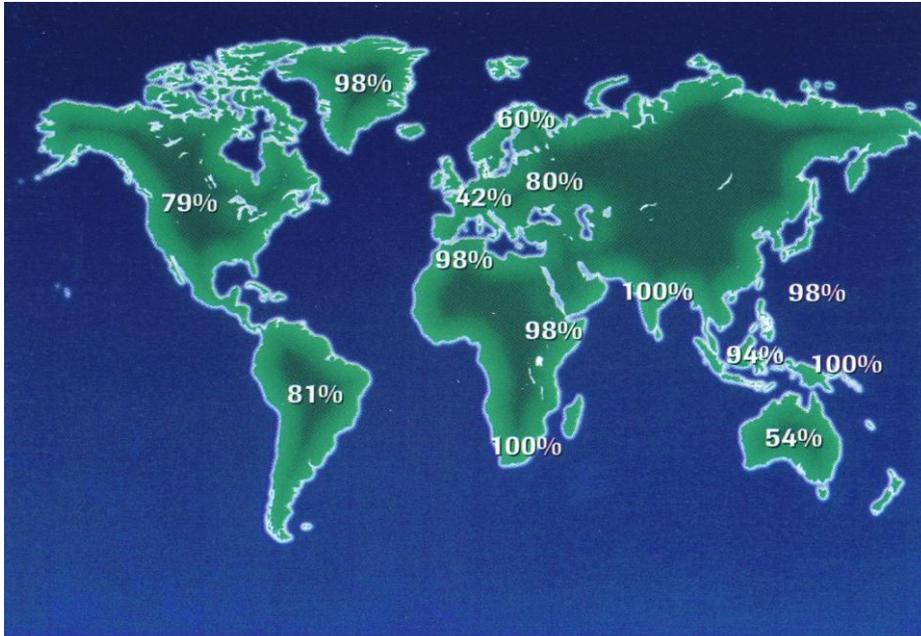


Abbildung 3: Weltweite Seroprävalenz von CMV. (Bull. WHO 49: 103-6, 1973)

Enger sozialer Kontakt und ein niedriger sozialer und ökonomischer Standard scheinen dabei eine wichtige Rolle für eine hohe Prävalenz zu spielen. Anhaltspunkte hierfür finden sich in Unterschieden zwischen verschiedenen sozialen Schichten mit unterschiedlichem sozioökonomischem Status. So liegen die Seropositivitätsraten in Westeuropa und den USA bei Erwachsenen aus höheren sozialen Schichten bei ca. 40-50%, wogegen sie bei Erwachsenen aus niedrigen sozialen Schichten bei ca. 90-100% liegt.

3.2.2 Risikogruppen

Als besonders gefährdete Bevölkerungsgruppen gelten Schwangere, Früh- und Neugeborene, Empfänger von Bluttransfusionen, immunsupprimierte Personen, z.B. mit HIV Infektion oder nach Transplantation (Knochenmark/Stammzellen und solide Organe).

Die CMV Infektion ist die häufigste kongenitale (= prä-, und perinatal) Infektion überhaupt. Die Inzidenz beträgt zwischen 0,15% und 2,2% (Trincado and Rawlinson 2001; Gaytant, Steegers et al. 2002) was z.B. in den Vereinigten Staaten ca. 30000-40000 infizierten Kindern pro Jahr entspricht. Als Infektionsfolge können sowohl milde als auch lebensbedrohliche Symptome resultieren. Auch Langzeitschäden, wie Hörverlust, Taubheit oder Entwicklungsstörungen können auftreten.

Bei AIDS - Patienten ist CMV eine der wichtigsten opportunistischen Infektionen. Ca. 90% der Patienten zeigen Anzeichen einer aktiven CMV - Infektion und 40% entwickeln symptomatische, generalisierte Infektionen mit CMV, die lebensbedrohlich sein können. Bei Transplantationspatienten besteht die besondere Gefahr in der Auslösung einer Primärinfektion von CMV durch das Transplantat selbst (solides Organ), oder die Infektion des Transplantates (Knochenmark) bei seropositiven Empfänger. Auch die Reaktivierung einer vorhandenen latenten Infektion durch die posttransplantativ notwendige medikamentöse Immunsuppression ist möglich.

Die Übertragung von CMV durch Bluttransfusionen ist seit über 30 Jahren bekannt. Um Infektionen zu vermeiden, kommen bei besonders gefährdeten Patientengruppen, wie Frühgeborenen, Patienten unter Chemotherapie, oder nach Transplantationen leukozytendepletierte und bestrahlte Blutkonserven zum Einsatz. Die Leukozytendepletion bietet dabei einen hinreichend sicheren Schutz (Ljungman, Larsson et al. 2002), wobei aber eine 100%ige Entfernung von CMV aus Blutkonserven nicht erreicht wird (Rios, Pennington et al. 2003) was eine Infektion theoretisch möglich erscheinen lässt.

3.2.3 Klinische Symptomatik von CMV Infektionen

Infektionen mit CMV verlaufen bei immunkompetenten Personen in der Regel asymptomatisch. In seltenen Fällen kann ein Mononukleose - ähnliches Krankheitsbild auftreten, wobei dieses klinisch nicht von einer EBV - assoziierten Mononukleose zu unterscheiden ist. 7-16% aller Mononukleososen (Klemola and Kaariainen 1965; Lajo, Borque et al. 1994; Taylor 2003) werden durch CMV verursacht.

Sehr seltene Komplikationen sind Pneumonien, Hepatitis, aseptische Meningitiden und immunologische Veränderungen (Leukozytopenie, atypische Lymphozytose).

Über die Bedeutung von CMV - Infektionen für die Genese der Arteriosklerose wird noch diskutiert. Der Nachweis von CMV - DNA in der Arterienwand (Horvath, Cerny et al. 2000), eine erhöhte Aufnahme von LDL in die Zellen der Gefäßwand bei CMV Infektion (Zhou, Guetta et al. 1996) und die Expression eines HCMV Chemokin – Rezeptors (Hengel and Weber 2000), sprechen für eine ursächliche Beteiligung von CMV. Weiterhin gibt es zunehmend Hinweise auf eine Assoziation von CMV mit Restenosen bei Koronararterien, wobei hier aber die Bewertung in der Literatur nicht einheitlich ist (Speir, Modali et al. 1994; Pauletto, Pisoni et al. 1996).

Bei der kongenitalen CMV - Infektion hängen die Übertragungshäufigkeit, die Schwere der Erkrankung und die resultierenden klinischen Symptome zu einem erheblichen Teil vom Infektionsstatus der Mutter ab. Die Zugehörigkeit zu einer bestimmten sozialen Schicht spielt für kongenitale CMV-Syndrome eine wichtige Rolle (Trincado and Rawlinson 2001). So kommt es bei Frauen aus sozial besseren Schichten häufiger zu einem schwereren angeborenen CMV Syndrom, da hier die CMV-Seroprävalenz niedriger ist (Enders, Bäder et al. 2003). Weiterhin kommt es bei einer Primärinfektion der Mutter in 35-50% der Fälle zu einer Transmission des Virus auf den Föten, während es bei Reaktivierung nur in 0,2 - 2,0% der Fälle zu einer Übertragung kommt (Stagno, Pass et al. 1982; Griffiths and Baboonian 1984). Das zeigt, dass die mütterliche Immunität einen wichtigen Schutz vor einer Transmission des Virus darstellen kann. Allerdings ist dieser Schutz unvollständig und kann nicht immer vor einer symptomatischen Infektion schützen. Die genauen Mechanismen dieser Schutzfunktion sind unbekannt. So könnten der Antikörpertiter, die aktuelle Viruslast und die Virulenz des infizierenden Stammes eine Rolle spielen. In einer nicht randomisierten Studie konnte gezeigt werden, dass die Gabe von CMV spezifischem Hyperimmunglobulin das Risiko einer kongenitalen Infektion senken kann (Nigro, Adler et al. 2005).

Eine besondere Bedeutung hat die mütterliche Immunität für den Verlauf der Infektion. Allgemein lässt sich sagen, dass bei Neugeborenen von Müttern mit bestehender Immunität (also einer Infektion oder Superinfektion durch Reaktivierung) seltener klinische Symptome auftreten als bei Müttern mit einer Primärinfektion und diese milder sind. Allerdings gibt es hierzu keine einheitlichen Befunde. So wurde beschrieben, (Stagno, Pass et al. 1982; Fowler, Stagno et al. 1992) dass mütterliche Antikörper Schutz vor einer kongenitalen CMV Infektion bieten und nur bei Kindern mit mütterlicher Primärinfektion und einer symptomatischen CMV Infektion mit ernsteren Folgeschäden für das Neugeborene zu rechnen ist. In neueren Untersuchungen (Boppana, Fowler et

al. 1999; Gaytant, Steegers et al. 2002) konnten allerdings keine unterschiedlichen Schweregrade der kongenitalen Infektion und der Folgeschäden in den zwei verschiedenen Gruppen (Infektion bei mütterlicher Primärinfektion vs. Reaktivierung) festgestellt werden.

Die Bandbreite der klinischen Symptome reicht von leichten Formen der Hepatosplenomegalie über Thrombozytopenie, Petechien, Mikrozephalie, Retinitis und Hepatitis bis hin zu schwersten Schädigungen mit letalem Ausgang (11 bis 20% der Fälle).



Abbildung 4: Schwere kongenitale CMV-Infektion mit petechialen Blutungen, so genanntes „blueberry muffin syndrom“. (Prof. Dr. G. Jahn, Institut für Medizinische Virologie, Tübingen, Deutschland)

Als langfristige Folgeschäden wurden Hörminderung (5-15%), Taubheit und eine verzögerte geistige und motorische Entwicklung beobachtet. Da infizierte Kinder infektiöses Virus oft sehr lang und in hohen Dosen ausscheiden, stellen sie eine bedeutende Infektionsquelle für ihre Umgebung dar.

Bei Transplantationspatienten ist die Infektion mit CMV ein großes Problem, wobei der Grad der Immunsuppression eine wichtige Rolle für die Entstehung einer symptomatischen Infektion spielt. Primärinfektionen mit einer schweren, generalisierten CMV Infektion kommen bei Übertragung von seropositiven, soliden Transplantaten auf seronegative Spender vor.

Umgekehrt kann es bei Knochenmarktransplantationen (KMT) bei Übertragung von Knochenmark eines seronegativen Spenders auf einen seropositiven Empfänger zu Symptomen einer Primärinfektion kommen, da die transplantierten spezifischen Immunzellen mit einer Immunantwort auf die CMV - Infektion des Empfängers

reagieren. Die klinische Diagnose wird dabei durch das zusätzliche Auftreten der „*graft versus host disease*“ (GvHD) erschwert. Auch dabei kommt es durch die transplantierten immunkompetenten Zellen zu einer Immunantwort gegen verschiedene Empfängerstrukturen. Da ähnliche klinische Symptome auftreten, kann eine Unterscheidung von GvHD vs. CMV – Infektion schwierig sein. Eine gefürchtete Komplikation ist die interstitielle CMV – Pneumonie, die bei autologer / autogener KMT eine Inzidenz von bis zu 8,6% und bei allogener KMT von bis zu 15% hat. Die sehr hohe Letalität (50-82%) macht sie zu einem der größten Probleme bei Knochenmarktransplantationen (Ljungman, Engelhard et al. 1992; Ljungman, Biron et al. 1994).

Das Spektrum der Infektion bei Transplantation von soliden Organen reicht von einer leichten Symptomatik mit Fieber, Leukozytopenie, atypischer Lymphozytose, Thrombozytopenie, Myalgien und Arthralgien bis hin zu schweren Infektionen des Gastrointestinaltrakts, interstitiellen Pneumonien, Retinitiden, Enzephalitiden und Hepatitiden. Kompliziert werden diese Infektionen durch eine vermehrte Superinfektion mit Pilzen, Protozoen und Bakterien, was die Behandlung zusätzlich erschwert. Chronische Gefäßveränderungen und eine beschleunigte Entwicklung von Arteriosklerose in den Transplantaten können zum Organverlust führen.

Klinische Symptome bei HIV infizierte Personen können fast jedes Organ betreffen, wobei die Retinitis die häufigste Manifestation ist. Diese kann zur Erblindung des betroffenen Auges führen, wobei aber durch die Einführung der HAART Therapie (*highly active antiretroviral therapy*) eine deutliche Verbesserung der Prognose erreicht werden konnte (Holbrook, Jabs et al. 2003). Weiterhin besonders betroffen sind Lunge, ZNS und der Gastrointestinaltrakt.

3.2.4 Diagnostik und Therapie von CMV Infektionen

Diagnostische Methoden zur Bestätigung einer CMV Infektion sind der Nachweis

- von spezifischen Antikörpern (IgG, IgM) mit ELISA/EIA oder Immunoblot,
- von infektiösem Virus über den cytopathischen Effekt (CPE) in der Zellkultur, mit anschließender Bestätigung durch eine der nachgenannten Methoden
- von viralem Protein pp65 mit Methoden der Immunfluoreszenz und

- von viraler Nukleinsäure durch die Amplifikation mit verschiedenen Formen der PCR (*onestep* PCR, *nested* PCR, RT-PCR).

Antiviral wirksame Substanzen in der Therapie von CMV Infektionen sind

- Ganciclovir (Cymeven[®], Hoffman-LaRoche (Lode 1990) Guanosinanalogue mit zyklischem Zuckerrest, Hemmung der viralen DNA-Polymerase),
- Valganciclovir (Valcyte[®], Hoffman-LaRoche (Lode 2003)),
- Foscarnet (Foscavir[®], ASTRA Chemicals (Lode 1990) Pyrophosphatanalogue, Hemmung der viralen DNA-Polymerase),
- Cidofovir (Vistide[®], Gilead Sciences, Inc. (Lode 1997)) und
- Fomivirsin (Vitracene[®], Novartis (Lode 2000)).
- 1263W94 (Maribavir[®], GlaxoSmithKline, jetzt ViroPharma Inc. (Wang, Peck et al. 2003))

Der prophylaktische Einsatz von Virostatika bei CMV assoziierten Erkrankungen wird kontrovers diskutiert. Die Gabe von Hyperimmunglobulinpräparaten (z.B. Cytotect[®]) wird praktiziert, eine eindeutige Empfehlung für den regelrechten Einsatz gibt es aber noch nicht (Nigro, Adler et al. 2005). Problematisch ist die Entwicklung von resistenten Virusstämmen nach längerer Behandlung, besonders bei Ganciclovir (Gilbert, Bestman-Smith et al. 2002). Durch die Einführung der neuen antiviralen Substanzen Cidofovir, Fomivirsin und 1263W94 ergeben sich erweiterte Behandlungsmöglichkeiten resistenter Virusstämmen, wobei aber auch hier schon neue Resistenzen beschrieben worden sind (Komazin, Ptak et al. 2003). Durch das breite antivirale Spektrum von Cidofovir ist es außerdem erstmals möglich, zusätzliche Infektionen mit Viren aus der Gruppe der Poxviridae, Papovaviridae, Adenoviridae, sowie andere Herpesviren chemotherapeutisch zu behandeln (De Clercq 2003).

Anwendungsbeschränkungen ergeben sich durch die Toxizität der Substanzen, die entweder stark myelotoxisch (GCV) oder nephrotoxisch (Foscarnet, Cidofovir) wirken. Die geringsten Nebenwirkungen wurden bisher für 1263W94 (Maribavir[®]) beschrieben. Bei einer Behandlung traten als häufigste unerwünschte Arzneimittelwirkungen (UAW) lediglich Geschmacksirritationen und Kopfschmerzen auf.

Weitere Substanzen, die sich in der Entwicklungs- und Erprobungsphase befinden und möglicherweise bei CMV Infektionen eingesetzt werden können, sind Adefovir und Lobucavir (Sia and Patel 2000).

3.3 MCMV als Modell für HCMV

Cytomegalieviren haben ein enges Wirtsspektrum und können nur ihren natürlichen Wirt infizieren. Diese Spezifität führt dazu, dass sich z.B. ein Mensch nur mit dem humanen CMV (HCMV) infizieren kann, nicht aber mit CMV von Maus (MCMV), Ratte (RCMV) oder Rhesusaffe (RhCMV). Somit gibt es keine Möglichkeit, HCMV Infektionen experimentell *in vivo* zu untersuchen. Da der Infektionsverlauf und die Etablierung der Latenz bei MCMV mit dem von HCMV vergleichbar ist, kann die Infektion mit MCMV als Modellsystem genutzt werden (Hudson 1979; Krmpotic, Bubic et al. 2003).

Die großen molekularen und biologischen Ähnlichkeiten machen MCMV zu einem geeigneten Modellsystem für HCMV und bieten so einen wichtigen Ansatzpunkt für eine Hypothesenbildung von Infektionen des Menschen mit CMV.

Inzwischen stehen vielfältige Möglichkeiten zur Veränderung des Genoms zur Verfügung. So kann sowohl der Wirt, als auch das Virus genetisch verändert werden, um Antworten auf verschiedene Fragestellungen zu erhalten. Ein wichtiger Schritt war dabei die Klonierung des gesamten Genoms von MCMV (Messerle, Crnkovic et al. 1997) und HCMV (Borst, Hahn et al. 1999) in ein künstliches bakterielles Genom (bacterial artificial chromosome, BAC) (Brune, Messerle et al. 2000) in *Escherichia coli* (*E.coli*). Der große Vorteil dieses Systems ist die einfache Handhabung von kompletten viralen Genomen und die Möglichkeit, mit molekularbiologischen Methoden gezielte oder ungezielte Mutationen in das Genom einzubringen. Eine Rekonstitution von infektiösen Viren ist nach Transfektion des BACmids in permissive Zellen ebenfalls zu erreichen. Das Erzeugen und Untersuchen von Virusmutanten wird durch dieses System erheblich erleichtert.

3.4 Abwehr von viralen Erregern durch das Immunsystem

Das Immunsystem reagiert auf das Eindringen von viralen Erregern mit verschiedenen Abwehrmechanismen. In der frühen Phase einer Infektion spielt die angeborene, unspezifische Immunantwort die wichtigste Rolle. Dieser Teil des Immunsystems besteht aus zellulären Komponenten wie Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und NK-Zellen sowie extrazellulären löslichen Proteinen, zu denen das Komplementsystem,

Typ1 Interferone / Zytokine und das C-reaktive Protein zählen. All diese Komponenten bewirken, dass Viren und virusinfizierte Zellen erkannt und durch verschiedene Effektormechanismen zerstört werden.

Makrophagen, neutrophile Granulozyten und T-Lymphozyten können virale Pathogene über spezifische Rezeptoren (z.B. *Toll like Receptors*, MHC) erkennen und diese dann direkt bekämpfen. Zusätzlich wird das Komplementsystem aktiviert. Die Makrophagen werden aktiviert, sezernieren dann verstärkt Zytokine und präsentieren virale Antigene. Das Komplementsystem kann nach seiner Aktivierung zur Bildung von Poren und damit zur Lyse der infizierten Zellen führen. Die sezernierten Zytokine (Interferon $\alpha+\beta+\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, IL1, IL6) fördern die Aktivierung von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und hemmen die virale Replikation durch Inhibition der Transkription von viraler mRNA sowie durch Degradation des viralen Genoms. Weiterhin werden Proteasomen, TAP (transporter associated with antigen processing) und andere Gene stimuliert, wodurch die Antigenpräsentation durch MHC I Moleküle verbessert wird.

Die angeborene Immunantwort führt so zur verbesserten Aktivierung der adaptiven (erworbenen bzw. antigenspezifischen) Immunität, allerdings nicht zu einer langanhaltenden Immunität mit Gedächtnisbildung. Die Entwicklung der erworbenen Immunität benötigt einige Zeit, da die T-, B-Lymphozyten ihren spezifischen Antigenen erst begegnen müssen. Danach werden sie im lymphatischen Gewebe aktiviert und differenzieren sich zu Effektorzellen. Intrazelluläre virale Antigene werden proteolytisch gespalten und können dann auf der Zelloberfläche via MHC I Moleküle präsentiert werden. Dort können sie von zytotoxischen CD8^+ T-Lymphozyten erkannt werden und so zur Zerstörung der infizierten Zelle beitragen. CD4^+ T-Helferzellen werden durch auf MHC II Molekülen präsentierte Antigene stimuliert, produzieren dann Zytokine und wirken somit stimulierend auf Makrophagen und B-Zellen, was wiederum eine vermehrte Phagozytoseaktivität und eine erhöhte Antikörperproduktion zur Folge hat. Eine langanhaltende Immunität wird durch die Differenzierung von B- und T-Zellen zu Gedächtniszellen erreicht. Bei erneutem Kontakt mit dem Antigen sind diese Zellen in der Lage, den benötigten, spezifischen Antikörper oder T-Zell Klon schnell und in großen Mengen zu produzieren. Damit kann eine Infektion verhindert, oder aber zumindest der Verlauf gemildert werden (Nairn and Helbert 2002).

3.5 Immunantwort gegen CMV

Bei der Kontrolle einer Primärinfektion mit CMV spielt die zelluläre Immunantwort in Form von NK-Zellen und zytotoxischen CD8⁺ T-Lymphozyten eine wichtige Rolle, wobei CD4⁺ T-Lymphozyten die CD8⁺ T-Zell Funktion verbessern, aber nicht essentiell sind (Lucin, Jonjic et al. 1994). Interferon-gamma (IFN- γ) kann die Antigenpräsentation verstärken und wirkt so Immunmodulationsmechanismen des Virus entgegen, die die Antigenpräsentation reduzieren (Hengel, Lucin et al. 1994).

Antikörper spielen bei der primären CMV Infektion keine entscheidende Rolle, da Mäuse mit normaler Antikörperproduktion denselben Infektionsverlauf zeigen wie Mäuse ohne Antikörperproduktion. Bei Reaktivierung führt das Fehlen von Antikörpern allerdings zu erhöhten Virustitern. (Jonjic, Pavic et al. 1994) Durch einen Transfer von Gedächtniszellen kann dieser Mangel jedoch ausgeglichen werden (Klenovsek, Weisel et al. 2007).

CMV hat eine Vielzahl weiterer Mechanismen entwickelt, die Immunantwort seines Wirtes zu verändern oder zu umgehen. (Hengel, Koopmann et al. 1997; Hengel, Brune et al. 1998) Mit diesen verschiedenen Strategien kann CMV die Immunantwort seines Wirtes umgehen und lebenslang im Organismus persistieren.

3.6 Fc γ -Rezeptoren

Das Immunsystem von Säugern verfügt über verschiedene Formen von zellulären Fc-Rezeptoren, wobei es für jede Immunglobulinklasse (IgA, IgD, IgE, IgG, IgM) mindestens einen Fc-Rezeptor gibt. Fc-Rezeptoren gehören zur Immunglobulin-Superfamilie (IgSF) und sind mögliche Bindungspartner verschiedener Immunglobuline. IgSF Domänen enthalten ca. 70-110 Aminosäuren und besitzen eine charakteristische Ig-Domäne die aus zwei antiparallelen β -Faltblattstrukturen besteht. Zwischen den hydrophoben Aminosäuren auf der inneren Seite des *Sandwiches* befinden sich hochkonservierte Disulfidbrücken, die durch 2 Cysteine zwischen dem B und F strand gebildet werden. Diese Brücken stabilisieren die Ig-Domäne. Es wird unterschieden zwischen variablen (IgV), konservierten (IgC) und intermediären (IgL) Domänen. IgV-Domänen sind länger und besitzen 9 β -Faltblätter, die IgC-Domänen sind kürzer und

besitzen nur 7 β -Faltblätter. Manche Ig-Domänen ähneln in der Aminosäuresequenz IgV, besitzen aber nur die Größe einer IgC und werden deshalb IgC2 genannt (Harpaz and Chothia 1994). Die Affinität der IgG Bindung der einzelnen IgSF Domänen bei den verschiedenen Fc-Rezeptoren ist in Abbildung 5 dargestellt. Einzelheiten für IgG - bindende Fc γ -Rezeptoren zeigt Tabelle 3.

Fcγ-Rezeptor	Größe (kDa)	Affinität / Avidität	Expressionsort / Effektorzelle	Signal / Wirkung
Fc γ RI (CD64)	72	hoch für monomeres IgG	Makrophagen, Neutrophile, Eosinophile, dendritische Zellen	stimulierend, Endozytose / Phagozytose
Fc γ RII-A (CD32)	40	niedrig für monomeres IgG, hoch für Immun-komplexe	Makrophagen, Neutrophile, Eosinophile,	stimulierend, Endozytose, Freisetzung von sekret. Granula
Fc γ RII-B2 (CD32)			Makrophagen, Neutrophile, Eosinophile,	inhibierend, senkt die Schwelle,
Fc γ RII-B1 (CD32)			B-Zellen, Mastzellen	ab der Immun-komplexe Effektorzellen aktivieren können
Fc γ RIII (CD16)	50-80	Niedrig für monomeres IgG, hoch für Immun-komplexe	NK-Zellen, Mastzellen, Makrophagen, Neutrophile, Eosinophile,	stimulierend für NK-Zellen, infizierte Zellen mittels IgG zu lysieren (ADCC)
Fc γ RIV	75	Mittel für IgG2a und IgG2b	Neutrophile, Eosinophile,	stimulierend für NK-Zellen, infizierte Zellen mittels IgG zu lysieren (ADCC) (Nimmerjahn, Bruhns et al. 2005)

Tabelle 3

Immunglobuline können mit ihrem variablen F_{ab} -Teil (*fragment antigen binding*) verschiedene Antigene erkennen und werden dann mit dem konservierten Fc-Teil (*fragment constant / crystallizable*) von der α -Kette des Fc-Rezeptors gebunden. Zelluläre Effektorzellen, wie T-Zellen oder Makrophagen, können so Pathogene erkennen und dann in der ihnen eigenen Weise an deren Bekämpfung mitwirken. Die anderen Ketten des Fc-Rezeptor - Komplexes (z.B. die γ -Kette) sorgen dabei für die Signalübermittlung und den Transport an die Zelloberfläche. Verschiedene Effektorfunktionen von zellulären $Fc\gamma R$ sind:

- die antikörperabhängige Lyse von infizierten Zellen (ADCC) durch NK-Zellen, die von $Fc\gamma R$ via Antikörper gebundenes virales Antigen auf der Oberfläche erkennen,
- Phagozytose und Endozytose von Immunkomplexen, die nach Bindung an $Fc\gamma R$ und Komplexierung in der Zelle durch MHC Moleküle (*major-histocompatibility-complex*) der Klassen I und II CD8 positiven und CD4 positiven T-Zellen auf der Zelloberfläche präsentiert werden
- Stimulierung oder Hemmung von Immunzellen, dadurch Veränderungen bei der Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren
- Stimulation der Antikörperproduktion in B-Zellen

$Fc\gamma$ -Rezeptoren sind damit ein integraler Bestandteil des Immunsystems. Sie verbinden Antikörper mit den Zellen des spezifischen und unspezifischen Immunsystems, die humorale Immunantwort mit der zellulären Immunantwort und die erworbene Immunität mit der angeborenen Immunität. Damit sorgen sie für eine verbesserte Erkennung und Elimination von Mikroorganismen.

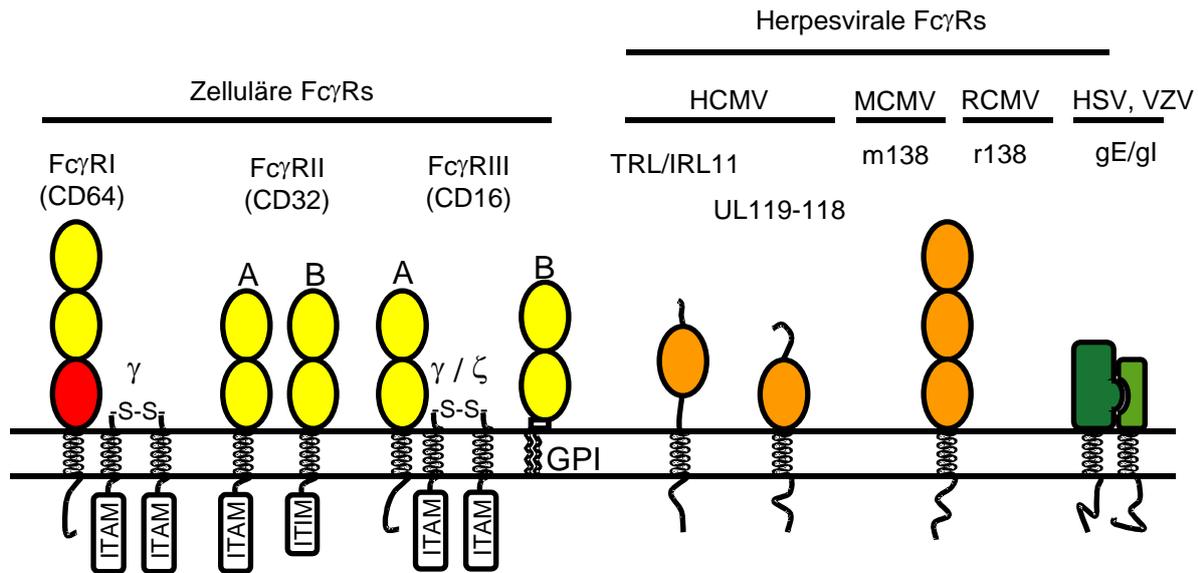


Abbildung 5: zelluläre und herpesvirale Fc γ -Rezeptoren. Die Rolle für die Affinität der IgG Bindung der einzelnen IgSF Domänen ist durch die Farben rot (hochaffine Bindung), gelb (niedrigaffine Bindung) und orange (unklar) dargestellt. gE und gI besitzen keine IgSF Domäne.

ITAM: *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*, ITIM: *immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*, GPI: *Glycosylphosphatidylinositol anchor*, geändert nach Budt et al.

3.7 Virale Fc γ -Rezeptoren

Herpesviren besitzen verschiedene Möglichkeiten zur Modulation des wirtseigenen Immunsystems und können damit eine Verbesserung der eigenen Replikationseffizienz und Persistenz erreichen. Zelluläre Immunmechanismen können beispielsweise durch Hemmung der Antigenpräsentation über MHC I Moleküle inhibiert werden (Hengel, Reusch et al. 1999). Auch humorale Immunmechanismen sind Ziel herpesviraler Immunevasion. So können wirtseigene Komplementproteine (z.B. CD46, CD55, CD59) in die Virushülle eingebaut werden, um einem Angriff des Komplementsystems zu entgehen (Abb. 6A). Weiterhin exprimieren fast alle Herpesviren Fc γ -bindende Proteine mit potentiell immunevasiver Funktion.

Bei den α -Herpesviren HSV-1, HSV-2 und VZV wurden die heterodimeren Glykoproteine E (gE) und I (gI) beschrieben. Die viralen Typ I Transmembranglykoproteine E (gE) und I (gI) von HSV-1 bilden mit dem Fc γ -Teil von IgG einen Komplex und schützen so die Zelle vor antikörperabhängiger Zerstörung durch zytotoxische Effektorzellen (Dubin, Socolof et al. 1991) und komplementvermittelter Neutralisierung (Frank and Friedman 1989). gI und gE werden

dabei auf der Zelloberfläche HSV infizierter Zellen exprimiert und in Viruspartikel eingebaut. Wird nur gE exprimiert, so ändert sich die Affinität des Rezeptors und es können nur noch IgG-Aggregate, aber kein monomeres IgG mehr gebunden werden. Isoliertes gl kann weder Monomere noch Aggregate von IgG binden, sondern wirkt nur in Verbindung mit gE, wo es die IgG Bindung verstärkt. Erklärt wird dieser Schutz HSV-infizierter Zellen mit *antibody bipolar bridging* (Abb. 6C).

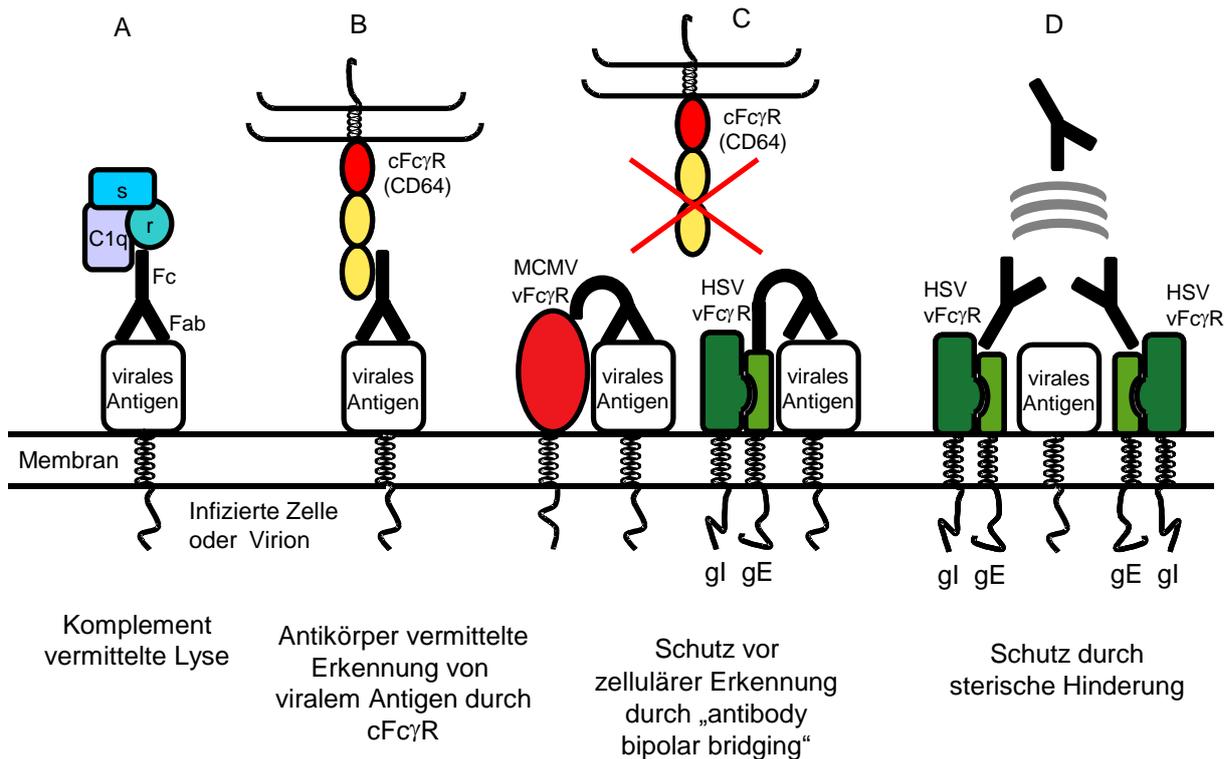


Abbildung 6: Modelle zur Funktion von viralen Fc γ -Rezeptoren, geändert nach Budt et al.

Dabei wird der freie Fc-Teil eines IgG, der ein HSV-1 Antigen erkannt hat, vom viralen Fc γ -Rezeptor (gI/gE) gebunden und steht so nicht mehr für die Effektorcomponenten des Immunsystems, wie Komplement oder zytotoxische Effektorzellen zur Verfügung (Nagashunmugam, Lubinski et al. 1998). Durch die Kristallisierung des Rezeptors konnte diese These inzwischen bestätigt werden (Sprague, Wang et al. 2006). Die Antwort des wirtseigenen Immunsystems kann auf diese Weise zum Teil inhibiert werden. Eine weitere Hypothese besagt, dass virale Fc γ -Rezeptoren durch gebundene Antikörper eine sterische Hinderung erzeugen und so das virale Antigen vor der Erkennung durch das Immunsystems geschützt wird (Chapman, You et al. 1999) (Abb. 6D).

Bei den β -Herpesviren sind $Fc\gamma$ -bindende Proteine bzw. $Fc\gamma$ -Rezeptoren von MCMV (*m138 / fcr-1*) (Thäle, Lucin et al. 1994), RCMV (Bruggeman, Reinders et al. 1984) und HCMV (Lilley, Ploegh et al. 2001; Atalay, Zimmermann et al. 2002) bekannt. Sehr früh wurden Fc-bindende Eigenschaften bei HCMV infizierten Fibroblasten beschrieben (Furukawa, Hornberger et al. 1975; Keller, Peitchel et al. 1976; Sakuma, Furukawa et al. 1977). Der molekulare Mechanismus war aber lange Zeit unbekannt. Inzwischen konnten die dafür verantwortlichen viralen $Fc\gamma$ -Rezeptoren ($vFc\gamma R$) genetisch identifiziert und molekular charakterisiert werden. (Atalay, Zimmermann et al. 2002) Hierbei handelt es sich um die Typ I Transmembranglykoproteine gp34 und gp68 die den Fc-Teil von humanem, monomerem IgG binden können. Der 68 kDa $vFc\gamma R$ gp68 wird durch ein Spleißprodukt der Genregion *UL119-118* kodiert, der 34 kDa $vFc\gamma R$ gp34 von dem sequenzhomologen ORF *TRL11/IRL11*. Beide Gene sind nicht essentiell für die HCMV-Virusreplikation *in vitro* und werden unabhängig voneinander in der E- und L-Phase exprimiert, wobei die Expression 72-96h p.i. maximal ist. gp34 und gp68 findet man auf der Zelloberfläche von infizierten Zellen und gp68 zusätzlich im Viruspartikel. Verschiedene Glykosylierungsformen von gp34 und gp68 zeigen eine Reifung der $vFc\gamma R$ -Glykoproteine auf dem Weg durch die Zelle. So kommt gp34 mit Molekulargewichten von 31 kDa und 34 - 41 kDa vor, gp68 mit 68 kDa und 95-105 kDa. Im Gegensatz zum HSV $Fc\gamma R$ konnte die funktionelle Bedeutung der CMV kodierten $Fc\gamma$ -Rezeptoren noch nicht eindeutig geklärt werden.

Es konnte jedoch gezeigt werden, dass der $vFc\gamma R$ *m138* als immunosives Protein wirkt, indem er die immunologisch wichtigen NK-Liganden MULT-1 und H60 auf der Zelloberfläche herunterreguliert und damit für eine schlechtere Erkennung der CMV infizierten Zelle durch das Immunsystem sorgt (Lenac, Budt et al. 2006).

4 Zielsetzung der Arbeit

Wie in Kapitel 3.3 beschrieben, ist MCMV ein wichtiges Modell für die experimentelle Analyse und das Verständnis von CMV-Infektionen. Da auch MCMV einen Fc-Rezeptor besitzt (Thäle, Lucin et al. 1994), kann hier seine Rolle in allen Phasen der CMV - Infektion *in vivo* studiert werden. Untersuchungen mit einer MCMV $\Delta m138$ Deletionsmutante (Insertion eines *E. coli lacZ* Gens und einer *m138* Deletion mittels *cre*

Rekombinase) ergaben einen massiv attenuierten Phänotyp *in vivo*, was für eine wichtige immunmodulatorische Rolle von *m138* spricht. Allerdings konnte in T-Zell und NK-Zell depletierten Mäusen kein Einfluß von Antikörpern auf die Replikationsfähigkeit *in vivo* nachgewiesen werden. Sowohl in Mäusen mit als auch ohne Antikörper war die Replikationsfähigkeit der MCMV *m138* Deletionsmutante vermindert (Crnkovic-Mertens, Messerle et al. 1998). Dabei wurde die Replikation von MCMV allerdings in der Phase der Primärinfektion studiert, in der Antikörper für die Abwehr einer viralen Infektion keine wesentliche Rolle spielen (Jonjic, Pavic et al. 1994). Da *m138* *in vitro* keinen Einfluß auf die Replikation hat, könnte es sein, dass die *in vivo* gesehene Attenuierung auf andere Funktionen von *m138* zurückzuführen sind, die durch die komplette Deletion von *m138* mit ausgeschaltet wurde.

So wurde nicht überprüft, ob die benachbarten Genregionen der $\Delta m138$ Deletionsmutante korrekt transkribiert werden. So spielen *m139*, *m140* und *m141* eine wichtige Rolle für die *in vivo* Replikationsfähigkeit von MCMV in Makrophagen. Es konnte gezeigt werden, daß bei einer Deletion der open reading frames (ORF) *M139*, *M140* und *M141* eine effiziente Replikation von MCMV nicht möglich ist und die Deletionsmutanten *in vivo* stark attenuiert waren (Hanson, Slater et al. 1999; Hanson, Slater et al. 2001). Eine Deletion des ORF *m137* führte *in vivo* ebenfalls zu einem attenuierten Phänotyp von MCMV (Visalli, Fairhurst et al. 2002).

Die Struktur der *m138* Genomregion wurde deshalb eingehend untersucht. Es wurden *Alignments* mit anderen viralen und zellulären Fc-Rezeptoren durchgeführt, um die hypothetische Struktur des vFc γ R *m138* zu belegen. Aus den gewonnenen Homologiedaten wurde ein Strukturmodell entwickelt, das als Grundlage für die weiteren Überlegungen diente. Um den Zusammenhang zwischen Struktur und Funktion von *m138* zu untersuchen, wurde nach einer Möglichkeit gesucht, die Fc-Rezeptor - codierende Region *m138* so minimal zu modifizieren, dass die Transkription der benachbarten Genregionen nicht beeinträchtigt war. Das Einfügen von Punktmutationen bietet diese Möglichkeit. Durch den gezielten Austausch einer einzigen Aminosäure wird die Sekundärstruktur des Fc γ -Rezeptors möglicherweise so verändert, dass sich dabei die Fc γ - Bindungsfähigkeit ändert, ohne alle andere Strukturen des Proteins pauschal zu zerstören. Durch die Herstellung rekombinanter *m138* MCMV Punktmutanten mit dem BAC System und die Konstruktion von

rekombinanten Vaccinia-Viren kann das veränderte Fc-Bindungsverhalten des Rezeptors dann *in vitro* und *in vivo* untersucht werden.

Ziele dieser Arbeit waren daher:

- Die hypothetische Struktur der viralen Fc γ -Rezeptoren von MCMV und RCMV durch Sequenzvergleiche und phylogenetische Untersuchungen zu modellieren und vorherzusagen
- geeignete Genorte in *m138* für die Veränderung der Sekundärstruktur zu identifizieren und dort Punktmutationen einzufügen
- diese Punktmutationen in den ORF *m138* von MCMV einzufügen, sie dann in geeigneten Systemen (rVV, rMCMC) zu exprimieren
- in funktionellen *in vitro* Essays die Fc γ -Bindungsfähigkeit der Punktmutanten zu überprüfen und
- rekombinante MCMV Mutanten für zukünftige *in vivo* Versuche zu konstruieren.

5 Material & Methoden

5.1 Material

5.1.1 Antikörper

Name	Katalog - Nr.	Hersteller
mouse IgG Fc - Fragment FITC	010-0203	Rockland Inc., Gilbertsville, USA
mouse IgG Fc - Fragment	010-0103	Rockland Inc., Gilbertsville, USA
rat IgG Fc - Fragment	012-0103	Rockland Inc., Gilbertsville, USA
rat IgG	012-0102	Rockland Inc., Gilbertsville, USA
anti rat IgG FITC (goat)	F-6258	Sigma, Steinheim, Deutschland
anti FLAG [®] M2 monoclonal AK	F-3165	Sigma, Steinheim, Deutschland

Alle Antikörper von Rockland wurden über Biotrend, Köln, Deutschland bezogen.

5.1.2 Bakterien

Escherichia coli, Stamm XL1blue: Stratagene, Heidelberg, Deutschland

Escherichia coli, Stamm DH10B: RecA⁻, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Escherichia coli, Stamm DH5 α : Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

5.1.3 Bakterielle Nährmedien

LB - Medium: pH 7,5

- 1 % Bacto - Hefeextrakt (w/v)
- 0,5 % Bacto - Trypton (w/v)
- 1 % NaCl (w/v)

LB - Agar: pH 7,5

- 1 % Bacto - Hefeextrakt (w/v)
- 0,5 % Bacto - Trypton (w/v)
- 1 % NaCl (w/v)
- 1,5 % Bacto - Agar (w/v)

Je nach Anforderung wurden unter sterilen Bedingungen Ampicillin (100 µg/ml), Chloramphenicol (25 µg/ml), Kanamycin (30 µg/ml), oder 5 % Sucrose zu Selektionszwecken zugegeben.

5.1.4 Chemikalien und Reagenzien

Produkt / Bezeichnung	Hersteller
Acrylamid, Rotiphorese [®] Gel 30	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose, SeaKem [®] LE (840.004)	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Agarose, NuSieve [®] 3:1	
Ammoniumpersulfatlösung (APS)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Amphotericin B	Sigma, Steinheim, Deutschland
Ampicillin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bacto – Agar	Sigma, Steinheim, Deutschland
Bacto – Hefeextrakt	Sigma, Steinheim, Deutschland
Bacto – Trypton	Difco, Detroit, USA
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
Calciumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Chloramphenicol	Sigma, Steinheim, Deutschland
Ciprofloxacin	ICN Biomedicals Inc., Aurora, USA
DTT	Sigma, Steinheim, Deutschland
Endoglykosidase H	Roche, Mannheim, Deutschland
Ethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure 96 %	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma, Steinheim, Deutschland
Filme, Biomax MR	Eastman Kodak, Rochester, USA
Glycin	Sigma, Steinheim, Deutschland
L – Glutamin	Gibco BRL / Lifetech / Invitrogen, Karlsruhe Deutschlands
Igepal	Sigma, Steinheim, Deutschland
Iodoacetamid	Sigma, Steinheim, Deutschland

Produkt / Bezeichnung	Hersteller
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kanamycin	Sigma, Steinheim, Deutschland
Leupeptin	Sigma, Steinheim, Deutschland
Nitrocellulosemembran Protran B85	Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
Nystatin	Sigma, Steinheim, Deutschland
Marker, Hyper Ladder I	Bioline, Luckenwalde, Deutschland
Marker, 1kb DNA Ladder	Gibco BRL / Lifetech / Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
β - Mercaptoethanol	Sigma, Steinheim, Deutschland
Methanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin	Gibco BRL / Lifetech / Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Phenol, Roti [®] Phenol / C / I	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pepstatin	Sigma, Steinheim, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Protein - A - Sepharose [™] CI 48	Amersham Biosciences AB, Uppsala, Schweden
Quicksafe A Puffer	Zinsser Analytic, Berkshire, UK
radioaktiver Marker, ¹⁴ C Methylated Proteins, CFA626	Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK
radioaktives Cystein, Redivue ³⁵ S Cystein	
Saponin	Sigma, Steinheim, Deutschland
SDS	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Serum, FCS, fetal calf serum	Gibco BRL / Lifetech / Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Serum, NCS, newborn calf serum	Gibco BRL / Lifetech / Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Streptomycin	Gibco BRL / Lifetech / Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Sucrose	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Produkt / Bezeichnung	Hersteller
Tetramethylethylendiamine (TEMED)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Tris	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin	Gibco BRL / Lifetech / Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

5.1.5 Enzyme

Die verwendeten Restriktionsenzyme, sowie andere DNA modifizierende Enzyme wurden von:

- 1 Gibco BRL / Life Technologies / Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
- 2 New England Biolabs Inc., Beverly, USA
- 3 MBI Fermentas, Vilnius, Litauen
- 4 Roche, Mannheim, Deutschland

bezogen und nach den jeweiligen Herstellerangaben mit den dazugehörigen Reaktionspuffern verwendet.

Ase I (1); *Avr II* (2); *BamH I* (1); *Bgl II* (1); CIP [alk. Phosphatase] (1); *EcoRI* (1,2,3); *EcoRV* (1,3); *Hpa I* (2); *Hind III* (1,2); *Kpn I* (1,3); *Msc I* (2); *Nco I* (2); *Not I* (1); *Nhe I* (1); Polymerase (4); *Pst I* (1); *Pvu I* (1); *Sac I* (2); *Sac II* (2); *Sma I* (2); *SnaBI* (2); *Spe I* (1); *Sph I* (1); *Sst I* (1); *Sst II* (1); T4 DNA Ligase (4); *Vsp I* (1); *Xba I* (1); *Xho I* (1)

5.1.6 Geräte

Gerät	Typ	Firma
Sterilbank	Heraeus Typ LaminAir 2472	Kendro, Langenselbold, Deutschland
Zellkulturzentrifuge	Heraeus Megafuge 1.0R	
Schwenkrotor	Heraeus Sepatech #2704	
Kühlzentrifuge	Heraeus Biofuge 15R	
Zellkulturinkubator	Heracell 150	
Elektroporator	EasyJetPlusD2000	EquiBio, Needham Heights, USA
Gelkammer	Agagel Mini, Midi, Maxi	Biometra, Göttingen, Deutschland

Gerät	Typ	Firma
Netzteil für Gelkammern	Power Supply EPS 301 und EPS601	Amersham / Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Pipetten	5 - 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl	Gilson Inc., Middleton, USA
Pipetten	0,5 - 10µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Thermoblock	Thermomixer comfort	
Tischzentrifuge	Centrifuge 54150	
Kühlzentrifuge	Sorvall RC5C plus	Kendro, Langenselbold, Deutschland
Rotoren für Kühlzentrifuge	Sorvall SM 24 Rotor, 20000 U/min. Sorvall GSA Rotor, 13000 U/min.	
Geltrockner	Model 583 Gel Dryer	BioRad, Hercules, USA
Szintigraph	Liquid Scintillation Counter, Wallac 1409	Wallac Oj., Turku, Finnland
Thermocycler	GeneAmp PCR System 2400	Perkin Elmer, Wellesley, USA

5.1.7 Kits

Verwendung	Name	Hersteller
DNA Präparation	QIAprep [®] Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
DNA Präparation	Concert [™] Rapid Plasmid MiniPrep System	LifeTech, Detroit, USA
DNA Präparation	QIAfilter Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Gel - Extraktion	QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
BAC DNA Präparation	Nucleobond [®] AX Kit	Macherey - Nagel, Düren, Deutschland
Transfektion	SuperFect [®] Transfection Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
PCR	Expand High Fidelity PCR – System	Roche, Mannheim, Deutschland

Verwendung	Name	Hersteller
PCR	Deoxynucleoside - triphosphate Set	Roche, Mannheim, Deutschland
Western Blot	ECL plus Western Blotting Detection System	Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK
Sequenzierung	ABI Prism BigDye terminator cycle sequencing kit	Applied Biosystems / Perkin Elmer

Alle Kits wurden nach den Herstellervorschriften verwendet.

5.1.8 Lösungen und Puffer

TAE - Puffer: 40 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0

(Ansatz 50x, 1l: 242 g Tris; 57,1 ml Essigsäure; 100 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0; H₂O)

TBE - Puffer 0,5x: 45 mM Tris, 45 mM Borsäure, 1 mM EDTA

(Ansatz 5x, 1l: 54 g Tris; 27,5 g Borsäure; 40 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0; H₂O)

6x Probenpuffer TAE: 6x TAE, 10 % Glycerol (v/v), Bromphenolblau

(400 µl Glycerol 100%, 200µl 50x TAE, 1000µl H₂O, Spitze Bromphenolblau)

6x Probenpuffer TBE: 3x TBE, 10 % Glycerol (v/v), Bromphenolblau

Immunpräzipitation / IP

Lysispuffer:

140 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 20 mM Tris pH 7,6, 1 % Igepal (v/v), 1 mM PMSF, 100 µM Leupeptin; 1 µM Pepstatin

(Ansatz 10 ml: 100 µl Igepal, 100 µl 100 mM PMSF, 10 µl 10 mM Leupeptin, 10 µl 1 mM Pepstatin)

Waschpuffer B:

0,15 M NaCl; 10 mM Tris pH 7,6; 2 mM EDTA pH 8,0; 0,2 % Igepal (v/v)

Waschpuffer C:

0,5 M NaCl; 10 mM Tris pH 7,6; 2 mM EDTA pH 8,0; 0,2 % Igepal (v/v)

Waschpuffer D:

10 mM Tris pH 8,0

Fixationspuffer:

10 % Essigsäure (v/v), 40% Methanol (v/v)

(Ansatz 0,5l: 250 ml H₂O, 50 ml 100 % Essigsäure, 200 ml Methanol)

SDS - Gele

1x Probenpuffer: 0,2 M Tris pH 6,8; 5 mM EDTA, 34 % Sucrose, 4 % SDS, Bromphenolblau (Ansatz: 16 ml 0,5 M Tris pH 6,8; 22,7 ml 60 % Sucrose, 0,4 ml 0,5 M EDTA, 0,9 ml H₂O, 0,4 g Bromphenolblau)

vor Gebrauch 1 ml mit 50 µl 1 M DTT (1,4- Dithiothreit), 200 µl 20 % SDS

5x IP - Laufpuffer: 0,25 M Tris, 2 M Glycin, 0,1% SDS

(Ansatz: 300 ml 5x IP - Laufpuffer, 1200 ml H₂O, 7,5 ml 20 % SDS)

Sammelgel:

5 % Acrylamid (v/v); 125 mM Tris pH 6,8; 14 % Sucrose (w/v); 0,1 % SDS (w/v); TEMED; 0,05 % APS

Trenngel:

10 % Acrylamid; 0,5 M Tris pH 8,8; 15 % Sucrose; 0,1 % SDS; TEMED; 0,03 % APS

Endo H - Puffer:

0,5 M Natriumcitrat pH 5,5; 10 % PMSF (w/v)

Probenpuffer Endo H 4x:

0,5 M Tris pH 6,8; 0,5 M EDTA, 60 % Sucrose (w/v), 12 % SDS (w/v), Bromphenolblau

Western Blot:RIPA - Puffer:

1 % NP40, 0,5 % Natriumdesoxycholat, 0,1 % SDS, mit 1 x PBS auffüllen, 10 µl/ml PMSF (100 µM) 10 µl/ml Leupeptin, 2 µl/ml Pepstatin

Blotting - Puffer:

48 mM Tris, 39 mM Glycin, 20 % Methanol (v/v)

1x TBST:

10 mM Tris pH 8,0; 150 mM NaCl; 0,05 % TWEEN 20

Sammelgel:

6,5 % Acrylamid; 125 mM Tris pH 6,8; 0,1 % SDS; TEMED; 0,15 % APS

(1,2 ml 30% Acrylamid, 2,5 ml 0,5 M Tris pH 6,8; 6,2 ml H₂O, 0,1 ml 10 % SDS, sowie 10 µl TEMED und 100 µl APS)

Trenngel:

10 % Acrylamid, 0,5 M Tris pH 8,8; 0,1 % SDS; TEMED; 0,15 % APS

(3 ml 30% Acrylamid, 2,5 ml 2 M Tris pH 8,8; 4,3 ml H₂O, 0,1 ml 10 % SDS, sowie 10 µl TEMED und 100 µl APS)

Laufpuffer 1x Laemmli:

25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS

2x Probenpuffer:

100 mM Tris pH 6,8; 20 % Glycerol; 8 % SDS; 0,2 % β - Mercaptoethanol

DNA Präparation

Lösung 1: 50 mM Glucose; 10 mM EDTA pH 8; 25 mM Tris

Lösung 2: 0,2 M NaOH, 1 % SDS (w/v)

Lösung 3: 3 M KAc, pH 4,6

FACS

FACS Puffer:

1x PBS + 2,5 % FCS + 0,05 % Na – Azid

FACS Permeabilisierungspuffer:

1x PBS + 2,5 % FCS + 0,05 % Na – Azid + 0,05% Saponin

FACS Fixationsspuffer:

PBS + 3% Paraformaldehyd

Sonstige

Proteinase K - Puffer:

5 mM Tris pH 8,0; 5 mM EDTA; 0,5 % SDS (w/v)

5.1.9 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech, Ebersberg b. München, Deutschland synthetisiert. In der folgenden Tabelle sind alle Primer zusammengefasst, die zum Einbringen der Punktmutationen, zum Amplifizieren der flankierenden Sequenzen und Klonieren der Genregion *m138* von MCMV benutzt wurden. Gerade Nummerierung der Primer bedeutet „Vorwärtsprimer“ (3'→5') eine ungerade Nummerierung „Rückwärtsprimer“ (5'→3')

Legende: K = Primer zum Klonieren, M = Primer mit **Punktmutation**, RS = Primer mit zusätzlicher Restriktionsschnittstelle, S = Primer zum Sequenzieren, FLAG = Primer mit FLAG – tag

Name	Sequenz	Typ
ab-fcr-up2	5'CGCGAC <u>TCTAGAC</u> CCTACGTAAGTCATCGACTACT AACACTT3' (<i>Xba I</i>)	K
ab-fcr-up1	5'CAATTAG <u>GTACCA</u> AGTTAACGCCGTCTCGATCTTCTGGG TGTCC3' (<i>Kpn I</i>)	K, RS
ab-fsh-1	5'GAATTCGAGCT <u>CGCTAGCGGCC</u> _TGACGGCGCATCAAT TAC3' (<i>Nhe I</i>)	M
ab-fshBam	5'CTCTT <u>GGATCC</u> ATGGCGCCTTCGACGCTGATCGCACTC TGCCTGCTAGCGGCCTGACGGCGCATCAATTA3' (<i>BamH I</i>)	K, M, RS
ab-fcr-do6	5'TTAAC <u>GCA</u> TGCTCCTAGGGAGATCACGGGGCGA CTGTG3' (<i>Sph I</i>)	K
ab-fcr-do5	5'CCGTT <u>TCTAGA</u> AAGCTAGCAGGCAGAGTGCGAT CAGCG3' (<i>Xba I</i>)	K
ab-fcr-do4	5'TTAAC <u>GCA</u> TGCTCCTAGAGCCGATGAAACTGCTGGGTG GCG3' (<i>Sph I</i>)	K
ab-fcr-do2	5'TTAAC <u>GCA</u> TGCTCCTAGGTCGCGCTGTACACCCCGGA TTC3' (<i>Sph I</i>)	K
ab-fcr-do1	5'CCGTT <u>TCTAGA</u> AAGCTAGCAGGCAGAGTGCGATCAGCGT CGAAG3' (<i>Xba I</i>)	K
ab-fcr-cds4	5' <u>GCA</u> TGCTTACTTGTGTCGTCGTCCTTGTAGTCCGTGTT ACGTACGCCAGTGTTACAACCAATTAACC3' (<i>Sph I</i>)	K
ab-fcr-cds3	5'CTCTTGGATCCATGGCGCCTTCGACGCTGATCGCACTC TGCCTGCTAGCGCGATTTATTCAACAAAGCCACG3'	K
ab-fcr-cds2	5'CGATCCG <u>AAGCTT</u> TACGTATGACGTACGCAACCCGGCA GGTTA3' (<i>Hind III</i>)	K
ab-fcr-cds1	5'ATATAT <u>GAGCTC</u> GCTAGCGGCCGTGACGGCGCATCAAT TACCT3' (<i>Sst I / Sac I</i>)	K
ab-cysxm-1	5'GTCGCCAACAGAGTC_ <u>GCCGCT</u> AAGCTCGATGATTAC3'	M

Name	Sequenz	Typ
ab-fcr-flagHind	5' <u>GAGAGAGAAGCTTTTACTTGTCTGTCGTCGTCCTTGTAGT</u> <u>CAGCAGCCGTATGACGTACGCAACCCGGCAG3'</u>	K, RS
ab-fcr-cdsHind	5' <u>GAGAGAGAAGCTTTTACGTATGACGTACGCAACCCGGC</u> AG3'	K, RS
ab-fcr-cdsBam	5' <u>CTCTTGGATCCATGGCGCCTTCGACGCTGATCGCACTC</u> TGCCTGCTAGCGGCCGTGACGGCGCATCAATTA3'	K, RS
ab-cys6m-2	5'TCCCGAGCGGACGCGG <u>GCC</u> CCTAAACCGGCCGAT3'	M
ab-cys6-1	5'GACTCCATCTCGATCAACG3'	K
ab-cys5m-2	5'CACCGCGTCTGAAGGTAG <u>GCC</u> CGTTATTTGGATCTC3'	M
ab-cys5-1	5'AAATTCGGGTGAGTACCAGTGTATCTTC3'	K, S
ab-cys4m-1	5'ATTCCGGGTGAGTACCAG <u>GCT</u> TATCTTCGAGAG AGAG3'	M
ab-cys3m-1	5'AGAACGACCGTCCAG <u>GCC</u> CGCAGAACCCAGTTC3'	M
ab-cys3-2	5'CGATTCCAGCGGCTTTTCCA3'	K, S
ab-cys2m-2	5'GAGGAGTCATGATG <u>GCC</u> TGATATTTACGTGC3'	M
ab-cys2-1	5'CTAGACCTCTCACATCGCAACGG3'	K, S
ab-cys1m-1	5'GAGACTTTGTCTC <u>GCC</u> CACCGTGACGGGCATC3'	M
ab-cys1-2	5'TCCGGGTTTTGTGAAGTTGAC3'	K, S

Weiterhin wurden die *m138* Homologe von RCMV, die Stämme Maastricht und England kloniert. Die dazu benutzen Primer finden sich in der folgenden Tabelle.

Name	Sequenz	Typ
NL-fcr1	5'CTCTC <u>AAGCTT</u> GGCGGGATGGGAAAAATGG3' (<i>Hind III</i>)	K, RS
NL-fcr2	5'CTCTC <u>GAGCTC</u> TTATATACAGCTTTT TTTATTGAG3' (<i>Sst I / Sac I</i>)	K
NL-fcrF1	5'CTCTC <u>GAGCTC</u> TACTTGTCTGTCGTCGTCCTTGTAGTC AGCAGCTATACAGCTTTTTTTATTG3' (<i>Sst I / Sac I</i>)	K, FLAG
SV-fcr1	5'CTCTC <u>AAGCTT</u> GCCAAGATGATGCCTTCCG3' (<i>Hind III</i>)	K
SV-fcr2	5'CTCTC <u>GAGCTC</u> TTATACATGACGTAG GTTCTGG3' (<i>Sst I / Sac I</i>)	K

Name	Sequenz	Typ
SV-fcrF1	5'CTCTC <u>GAGCTCTTACTTGT</u> CGTCGTCGTCCTTGTAGTC AGCAGCTACATGACGTAGGTTCTGG3' (<i>Sst I</i> / <i>Sac I</i>)	K, FLAG

Legende: K = Primer zum Klonieren, FLAG = Primer mit FLAG - tag, RS = Primer mit Restriktionsschnittstelle, NL = Ratten - CMV, Stamm Maastricht, SV = Ratten - CMV, Stamm England

5.1.10 Plasmide und BACmide

pUC19: Gibco BRL / Lifetech / Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Die folgenden Plasmide / BACmide wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt:

p7.5k131: von Dr. Hans - Jürgen Schlicht, Universität Ulm, Deutschland

pST76KSR: von Prof. Dr. Martin Messerle, Universität Hannover, Deutschland

MCMV - BAC (MW97.01): von Dr. Markus Wagner, z.Zt. Harvard Medical School, Boston, MA, USA

5.1.11 Software

Software	Programm	Hersteller
für Sequenzvergleiche	DNASStar / Lasergene	DNA Star Inc., Madison, WI, USA
für Klonierung, Alignments, phylogenetische Analyse	MacVector 7.0	Accelrys, Cambridge, UK

5.1.12 Viren

Folgende Viren wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

MCMV Wildtyp Stamm C3X: von Dr. Martin Messerle, Universität Halle / Wittenberg, Deutschland

MCMV Wildtyp Stamm Smith: American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA (ATCC, VR-1399)

RCMV Wildtyp Stamm Maastricht: von Dr. Sebastian Voigt, Charité, Berlin, Deutschland

RCMV Wildtyp Stamm England: von Dr. Sebastian Voigt, Charité, Berlin, Deutschland

Vaccinia Wildtyp Stamm Kopenhagen: von Dr. Hans - Jürgen Schlicht, Universität Ulm, Deutschland

Temperatursensitiver Vaccinia Stamm ts7: von Dr. Hans - Jürgen Schlicht, Universität Ulm, Deutschland

5.1.13 Zelllinien

CV1: Nierenzelllinie aus der Grünen Meerkatze(ATCC, CCL-70)

NIH 3T3: Fibroblastenzelllinie aus der Maus (ATCC, CRL-1658)

MEF: Embryonale Fibroblasten aus der Maus (mouse embryonal fibroblast)

REF: Embryonale Fibroblasten aus der Ratte (rat embryonal fibroblast)

143B tk: Humane Osteosarkomzelllinie, (ATCC, CRL-8303) Deletion des Enzyms Thymidinkinase, resistent gegenüber 5-Bromo-2-desoxyuridin (BrDU)

5.1.14 Zellkultur Nährmedien

Alle Stammlösungen (DMEM, Glutamin, Penicillin, Streptomycin, Trypsin), sowie die Seren wurden von Gibco / BRL (Gibco / BRL, Life Lab., Paisley, Scotland jetzt Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Die Seren wurden vor Verwendung hitzeinaktiviert. (30 min, 56°C).

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) pH 7,2

Zusätzlich: Glutamin 2 mM; Penicillin 100 U/ml; Streptomycin 100 µg/ml; Ciprofloxacin 25 µg/ml; fötales Kälberserum (*fetal calf serum*, FCS) oder neugeborenen Kälberserum (*newborne calf serum*, NCS) 10 % ig, hitzeinaktiviert

Um die Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen zu verringern, kann die Konzentration von FCS / NCS im Nährmedium auf 5 % gesenkt werden.

Phosphatpuffer Salzlösung pH 7,2 (PBS)

Zum Waschen bei Zellkulturarbeiten:

9,1 mM Na₂HPO₄, 1,7 NaH₂PO₄, 150 mM NaCl

5.2 Methoden

5.2.1 Mikrobiologische Methoden

5.2.1.1 Kultivierung von *E.coli*

Die Anzucht von *E.coli* (Stämme XL1 blue, DH10b und DH5 α) erfolgte bei 37°C auf LB - Agarplatten oder in LB - Medium Schüttelkulturen (200 U/min.) im Inkubator oder Brutraum.

Mit dem Shuttle Plasmid pST76KSR transformierte *E.colis* wurden zur Selektion des temperatursensitiven Plasmids bei einer Temperatur von 30°C kultiviert.

Eine Selektion erfolgte über Antibiotika - Resistenzgene. (Ampicillin, Chloramphenicol und Kanamycin)

Ausgangsmaterialien zum sterilen Beimpfen von Kulturen waren Einzelklone von einer LB - Agarplatte.

Die Lagerung über längere Zeiträume erfolgte bei -20/-70°C mit Zusatz von 15 % Glycerin.

5.2.1.2 Herstellen von kompetenten Bakterien

Die folgende Prozedur beschreibt die Herstellung von chemisch kompetenten *E.coli* zur Transformation von Plasmid - DNA. Hierzu wurden die *E.coli* Stämme XL1 blue, DH10b, DH5 α , sowie Klone von *E.coli* XL1 blue mit BACmid, verwendet.

1. In 5 ml LB Medium wird bei 37°C über Nacht eine Mini Kultur vom gewünschten *E.coli* Stamm aus einem Glycerolstock oder einem kontrollierten *E.coli* Klon angelegt.

2. Am nächsten Tag werden 100 – 200 ml LB Medium mit 1 – 2 ml aus der Übernachtskultur angeimpft.
3. Diese Bakterienkultur läßt man bei 37°C bis zu einer optischen Dichte (OD_{590}) von 0,4 - 0,5 wachsen. (Kontrolle nach ca. 2 h, LB Medium als Nullwert)
4. Die Bakterien werden durch Zentrifugation bei 4°C, 4000 U/min., 10 Minuten in geeigneten Gefäßen (z.B. 50 ml Falcons) geerntet.
5. Das entstandene Pellet wird auf Eis mit 50 ml kaltem 0,1 M $MgCl_2$ resuspendiert und 10 Minuten auf Eis inkubiert.
6. Die Bakterien werden durch Zentrifugation bei 4°C, 4000 U/min., 10 Minuten pelletiert.
7. Das entstandene Pellet wird auf Eis mit 50ml kaltem 0,05 M $CaCl_2$ resuspendiert und 20 Minuten auf Eis inkubiert.
8. Die Bakterien werden durch Zentrifugation bei 4°C, 4000 U/min., 10 Minuten pelletiert.
9. Das entstandene Pellet wird auf Eis mit 2 ml kaltem 0,05 M $CaCl_2$ + 15 % Glycerol resuspendiert und aliquotiert.
10. Die Aliquots werden im Stickstoff schockgefroren und dann zur Lagerung in eine – 70°C Truhe etc. überführt.

Bei der Herstellung von elektrisch kompetenten *E.coli* zur Transformation von Plasmid - DNA via Elektroporation wurde $MgCl_2$ und $CaCl_2$ durch steriles aqua bidest ersetzt und das Resuspendieren erfolgt dann mit sterilem aqua bidest + 10 % Glycerol. Der Rest des Protokolls bleibt gleich.

5.2.2 Molekularbiologische Methoden

Es wurden molekularbiologische Standardmethoden verwendet.

Planungen für Klonierung sowie Kontrolle von Primern und Plasmiden wurden mit dem Programm Mac Vector durchgeführt.

5.2.2.1 *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Alle PCRs wurden mit dem Expand High Fidelity PCR - System von Roche durchgeführt. Polymerase und PCR Puffer aus dem Kit wurden nach Angaben des Herstellers verwendet. Weiter wurden Nukleotide (dNTP) 100 mM von Roche und steriles, gefiltertes H₂O benutzt. Oligonukleotide / Primer wurde nach den entsprechenden Bedürfnissen synthetisiert und in einer Konzentration von 5 - 10 µM pro Ansatz verwendet.

Folgendes Programm wurde zum Amplifizieren genutzt.

touch down PCR:

1. Denaturierung: 95°C, 5 Minuten; 40°C 1 Minute
2. Denaturierung: 94°C, 80 s; Annealing: 62°C->43°C, 2 Minuten; Elongation: 72°C, 3 Minuten; 20 Zyklen (nach jedem Zyklus sinkt die Annealingtemperatur um 1°C)
3. Denaturierung: 94°C, 1 Minuten; Annealing: 43°C, 2 Minuten; Elongation: 72°C, 150s; 15 Zyklen
4. 10 min 72°C; dann 4°C ∞

Bei einigen PCR Produkten, wurde die Annealingtemperatur (siehe 2.) variiert: 65°C -> 46°C, 63,5°C -> 44,5°C, 60°C -> 41°C, um bessere Ergebnisse zu erhalten.

5.2.2.2 *Klonierung von Plasmiden*

Bei der Klonierung von Plasmiden wurden sowohl Vektor als auch die einzufügende DNA (Insert) mit spezifischen Restriktionsenzymen geschnitten. Je nach verwendetem Restriktionsenzyme entstehen DNA - Fragmente mit überhängenden (sticky end) oder geraden (blunt end) Enden. Blunt end Restriktionsverdauung wurden nach Möglichkeit vermieden, da diese die Tendenz besitzen zu re-ligieren und keine gerichtete Klonierung erlauben.

Es folgte die Aufreinigung im TAE – Agarose - Gel mit anschließendem Ausschneiden der benötigten Banden / DNA Fragmente und deren Eluation aus der Agarose. Danach wurde zur DNA Mengenbestimmung ein weiteres TAE - Agarose - Gel gefahren und die benötigten Mengen an Vektor und Insert für die Ligation ermittelt. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16°C im Wasserbad. Der fertige Ligationsansatz wurde dann in

kompetente *E.coli* transformiert (chemisch oder elektrisch) und auf LB - Agaroseplatten mit entsprechendem Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 30°C / 37°C inkubiert. Die so entstandenen Einzelkolonien wurden gepickt und daraus Mini - LB - Übernachtkulturen angesetzt, aus welchen am folgenden Tag die Plasmid - DNA präpariert wurde. Diese wurde mit entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten und zur Kontrolle auf ein TAE - Agarose - Gel aufgetragen. Bei korrektem Bandenmuster konnte eine Midi oder Maxi LB - Übernachtkultur angesetzt werden, aus der wiederum die Plasmid - DNA isoliert und für die nächsten Klonierungsschritte verwendet wurde.

5.2.2.3 Agarose Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA durch Elektrophorese erfolgte zur Größenbestimmung nach Restriktionsverdau, zur Isolierung und Aufreinigung von DNA Fragmenten, zu Kontrollzwecken und zu DNA Mengenbestimmungen bei Klonierungen. Es wurden hauptsächlich horizontale TAE Agarose - Gele in einem Konzentrationsbereich von 0,8 % bis 1,5 % (w/v) in verschiedenen Größen eingesetzt. Dabei wurde die Agarose mit TAE - Puffer in der Mikrowelle gelöst, in den Gelschlitten gegossen und in die mit 1x TAE - Puffer gefüllte Elektrophoresekammer eingesetzt. Alle Gele wurden beim Gießen mit Ethidiumbromid versetzt (0,5 – 1 µg/ml Gel). Die DNA - Proben wurden mit einer entsprechenden Menge Probenpuffer (TAE 6x oder TBE 8x) versetzt und zusammen mit einem Marker (z.B. von Bioline, 1 µl) auf das Gel aufgetragen. Die Auswertung erfolgte unter UV - Licht, wobei das Bandenmuster dokumentiert und benötigte Banden ausgeschnitten wurden.

Für die präzise Größenunterscheidung von kleinen DNA Fragmenten (Unterschied < 40bp) wurden 3 % NuSieve Gele genutzt.

BACs und aus MCMV isolierte DNA wurden in 0,5 % igen TBE Gelen überprüft.

5.2.2.4 Restriktionsverdau

Die Spaltung von DNA - Doppelsträngen mit Restriktionsendonukleasen wurde bei der Analyse, Klonierung und Fragmentisolierung von DNA eingesetzt. Es wurden jeweils ca.

500ng - 50µg DNA aus PCR oder DNA Präparation verwendet und dann mit Enzym, sowie dem jeweiligen Puffer nach Herstellerangaben für 1 - 5h inkubiert. Reaktionstemperatur (25°C / 30°C / 37°C) und Menge des Enzyms (Grundregel:1 Einheit (U) Enzym pro µg DNA) wurden je nach Enzymtyp variiert.

Wenn die Pufferbedingungen es erlaubten, wurden teilweise auch 2 verschiedene Restriktionsenzyme gleichzeitig eingesetzt (Doppelverdau). Bei Problemen mit dem Doppelverdau erfolgte der Einsatz der Enzyme nacheinander, oder es wurde zwischenzeitlich eine Ethanolfällung durchgeführt. Bei größerem Probenaufkommen, wie bei der Kontrolle von Mini - Preps wurde ein „Master - Mix“ mit Enzym und Puffer hergestellt und dann gleichmäßig auf alle Proben verteilt.

Mit alkalischer Phosphatase dephosphorylierte DNA wurde bei 65°C 30 Minuten inaktiviert.

Die geschnittene DNA wurde auf Agarose - Gele (1 %TAE + EtBr oder 0,5 %TBE + EtBr) aufgetragen. Es folgte die Kontrolle des Bandenmusters unter UV - Licht und das Ausschneiden der benötigten Banden. Die ausgeschnittenen Banden wurden aus der Agarose eluiert und weiterverwendet.

5.2.2.5 Reinigung von DNA Fragmenten und Gelelution

Die Reinigung von DNA Fragmenten erfolgte über Auftrennung auf Agarose - Gelen oder durch Ethanolfällung. Es wurden hauptsächlich 1 % ige TAE Agarose - Gele verwendet.

Um die DNA nach Reinigung oder Restriktionsverdau aus dem Agarose - Gel zu lösen, wurde das QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers genutzt.

Das Prinzip beruht auf der Verflüssigung des Agarose - Gels durch speziellen salzhaltigen Puffer und die Bindung der enthaltenen DNA an Silica - Gel - Säulen. Diese DNA Bindung ermöglicht die Entfernung von unerwünschten Verunreinigungen, wie Enzymen, BSA, Agarose, Ethidiumbromid, und anderen Detergentien, da diese nicht an das Silica - Gel binden. Salze werden durch einen ethanolhaltigen Waschpuffer quantitativ entfernt. Die Elution erfolgt dann unter basischen Bedingungen mit wenig Salz.

5.2.2.6 Ligation von DNA Fragmenten

Als Ligation bezeichnet man die Verknüpfung von DNA Fragmenten mit überhängenden (sticky end) oder glatten Enden (blunt end) mit Hilfe des Enzyms Ligase. Es wurde T4 DNA Ligase mit dem entsprechenden Puffern nach Angaben des Herstellers (Roche, Mannheim) verwendet. Dabei wurden 500ng - 1µg Vektor und die fünf- bis zehnfache Menge Insert benutzt. Die richtigen Mengenverhältnisse wurden vorher mit einem TAE - Agarose - Gel kontrolliert. Bei einigen Ligationen, insbesondere bei großen Plasmiden und blunt - end - Ligationen, wurde die DNA vorher mit alkalischer Phosphatase (CIP) behandelt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 16°C im Wasserbad. Die ligierte DNA wurden dann in chemisch oder elektrisch kompetente Bakterien transformiert. Bei Verwendung der elektrischen Transformation wurde der Ligationsansatz mit Ethanol gefällt, oder auf eine Dialysemembran aufgebracht, um die Salze zu entfernen.

5.2.2.7 Transformation von Plasmid - DNA

Das Einbringen von DNA in Bakterien erfolgte über verschiedene Stimuli, durch die Bakterien befähigt werden, DNA aufzunehmen.

Bei der chemischen Methode geschieht dies durch Auflockerung der Bakterienwand und Bildung von „Ca²⁺ - DNA - Komplexen“, die dann bei kurzzeitiger Temperaturerhöhung (heat shock) aufgenommen werden.

Bei der elektrischen Methode erfolgt die Auflockerung der Bakterienwand durch das Einbringen der Bakterien in ein elektrisches Feld. Dabei wird die DNA in das Bakterium „hineingeschossen“.

chemische Transformation:

1. chemisch kompetente *E.coli* XL1blue Aliquots (50 µl) auf Eis auftauen
2. 5 µl DNA / Ligationsansatz (100 ng bis 1 µg) in die Bakterien pipettieren und 30 Minuten auf Eis inkubieren
3. heat shock bei 42°C für 60 bis 90 Sekunden
4. 2 bis 5 Minuten auf Eis inkubieren
5. 1 ml LB Medium dazu und 30 - 60 Minuten bei 37°C (30°C) auf dem Schüttler inkubieren

6. 30 Sekunden bei 12000 U/min zentrifugieren
7. 900 µl Überstand verwerfen, Rest resuspendieren und auf Agarplatten ausspateln
8. über Nacht bei 37°C (30°C) im Brutraum inkubieren

elektrische Transformation:

1. elektrokompente *E.coli* XL1blue oder DH10b (50µl) auf Eis auftauen
2. 2,5 µl DNA / Ligationsansatz in die Bakterien und dann in die Elektroporationsküvette pipettieren
3. Elektroporieren, mit folgenden Parametern: 2500 V, 25 µF, 200 Ω, 5 ms (Gerät: EasyJetPlusD2000)
4. sofort 1 ml LB Medium dazu und 30 - 60 Minuten bei 37°C (30°C) auf dem Schüttler inkubieren
5. 900µl Überstand verwerfen, Rest resuspendieren und auf Agarplatten ausspateln
6. über Nacht bei 37°C (30°C) im Brutraum inkubieren

Bei temperatursensitiven Plasmiden, wie dem Shuttle Plasmid pST76KSR erfolgten die Inkubationsschritte bei 30°C statt bei 37°C.

Die Selektion erfolgt durch die im transformierten Plasmid enthaltene Antibiotika - Resistenz.

Nach erfolgreicher Transformation wurden Klone gepickt, LB - Übernachtskulturen angesetzt und daraus die Plasmid - DNA isoliert. Nach anschließendem Restriktionsverdau und der Auftrennung im TAE - Agarose - Gel konnte das Bandenmuster und damit der Erfolg der Transformation kontrolliert werden.

5.2.2.8 Präparation von Plasmid - DNA

Die Präparation von Plasmid DNA erfolgte je nach benötigter Menge mit den entsprechenden Kits aus LB - Übernachtskulturen (2 - 5 ml für Mini Preps und 50 – 200 ml für Midi / Maxi Preps), wobei die Protokolle der Hersteller verwendet wurden.

BAC - Plasmid - DNA wurde mit Phenol / Chloroform und Isopropanol extrahiert. (10 ml LB Übernachtskulturen) Größere Mengen BAC Plasmid DNA wurden aus 200 ml LB - Übernachtskulturen mit dem Nucleobond[®] AX Kit nach Herstellerangaben gewonnen.

Die DNA wurde zum Schluß in einem geeigneten Volumen TE (Lifetech), EB (Qiagen) Puffer oder Bideest gelöst.

5.2.2.9 Präparation von viraler und BACmid DNA

DNA wurde aus Viren und Bakterien isoliert, die mit verschiedenen Plasmiden und BACmiden transformiert worden waren. Dies geschah mit Hilfe einer Phenol- / Chloroformextraktion und anschließender Reinigung durch Fällung mit Isopropanol.

Bei Bakterien wurde die DNA zuerst unter Verwendung verschiedener kommerzieller Lösungen (Qiagen, Lifetech) oder der Lösungen 1 - 3 von den zellulären Bestandteilen getrennt und anschließend 1:1 mit Phenol / Chloroform behandelt. Es wurde gemischt, 3 Minuten bei 13000 U/min. zentrifugiert und die obere Wasserphase vorsichtig abpipettiert. Danach erfolgte die Zugabe von kaltem Isopropanol (0,7x Volumen). Anschließend wurde gemischt und 20 Minuten zentrifugiert. Das so gewonnene Pellet wurde durch Zentrifugation mit 70 % igem Ethanol 10 Minuten gewaschen, dann getrocknet und zum Schluß in einem geeigneten Volumen TB (Lifetech), EB (Qiagen) Puffer oder Bideest gelöst.

5.2.2.10 Kontrollen

Alle Plasmide wurden nach jedem Klonierungsschritt mit spezifischen Restriktionsenzymen verdaut und zuerst im Agarose - Gel (1 % TAE + EtBr oder 0,5 % TBE + EtBr) auf das korrekte Bandenmuster überprüft. Wenn nötig wurden größere Mengen eines Plasmids hergestellt und wiederum überprüft.

Die Kontrolle der eingeführten Punktmutationen erfolgte durch Sequenzierung mit spezifischen Primern.

Um die Insertion des *m138* Genoms in Vaccinia Viren zu bestätigen wurde eine Kontroll - PCR mit den Primern ab-cys2-1 und ab-cys3-2 durchgeführt. Bei vorhandenem *m138* resultierte ein ca. 350bp Fragment.

Die Klone des Shuttle Plasmids pST76KSR und seine Konstrukte wurden einem Wachstumstest auf Agarplatten mit 5 % Sucrose unterzogen.

5.2.2.11 Sequenzierung

Alle Sequenzierungen wurden nach der Kettenabbruchmethode durchgeführt. Es wurden die vorhandenen technischen Möglichkeiten am Robert Koch - Institut genutzt. Dabei wurde das ABI Prism BigDye terminator cycle sequencing kit von Applied Biosystems / Perkin Elmer verwendet.

Punktmutation	verwendeter Primer
FSH, M1	ab-cys1-2
M2, M4	ab-cys2-1
M3, XM	ab-cys3-2
M5, M6	ab-cys5-1

Ein Gesamtansatz von 10 µl, bestehend aus 4 µl Kit, 1 µl Template DNA (ca. 0,5 µg), 0,5 µl spezifischen Primer (max. 5 pmol) und 4,5 µl H₂O wurde hergestellt und mit folgendem Programm im Thermocycler amplifiziert.

96°C, 30 Sekunden Denaturierung; 54°C, 15 Sekunden Annealing; 60°C, 4 Minuten Elongation, 25 Zyklen

Danach erfolgte die Aufarbeitung und Analyse durch eine automatisierte Sequenziereinrichtung im institutseigenen Labor.

Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte mit der Software DNASTar.

5.2.2.12 BAC Mutagenese

Die BAC Mutagenese basiert auf einem modifizierten Protokoll von O'Connor (O'Connor, Peifer et al. 1989). Dieses wurde dann weiterentwickelt und für verschiedene Viren etabliert. (Messerle, Crnkovic et al. 1997; Borst, Hahn et al. 1999)

Dabei werden Mutationen durch gerichtete, homologe Rekombination in das MCMV Genom eingebracht. Durch verschiedene Selektionschritte ist es möglich die einzelnen Konstrukte voneinander zu trennen und so nur die gewünschte Insertion zu erhalten.

Vorraussetzung für die BAC Mutagenese ist das Vorhandensein von homologen Sequenzen in Form eines Shuttle Plasmids. (Siehe Kapitel Ergebnisse: Klonierung der *m138* vF_{cy}R Punktmutationen in verschiedene Plasmide) Weiterhin werden *E.coli* benötigt, die das BACmid enthalten, um eine Transformation mit dem Shuttle Plasmid ermöglichen. Hierfür wurden *E.coli* mit MCMV Wildtyp BAC und *E.coli* mit dem MCMV

BAC ohne *m138* Sequenz ($\Delta m138$ - BACmide) kompetent gemacht. (Siehe Kapitel Material und Methoden: Herstellen von kompetenten Bakterien)

Nach der elektrischen oder chemischen Transformation mit dem entsprechenden Shuttle Plasmid, wurden die verschiedenen Selektionsschritte durchgeführt.

Der erste Selektionsschritt erfolgt bei 43°C, mit Chloramphenicol (30 µg/ml) und Kanamycin (30 µg/ml) auf LB - Agarplatten.

Der zweite Selektionsschritt erfolgt bei 30°C mit Sucrose (5 %) und Chloramphenicol auf LB - Agarplatten.

Zwischen den einzelnen Arbeitsschritten und am Ende wurden jeweils 12 Klone gepickt, Mini Übernachtkulturen angelegt und die BACmid - DNA isoliert. Zur Überprüfung wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt, die DNA auf einem 0,5 %igem TBE Agarose - Gel aufgetrennt und das Bandenmuster kontrolliert.

Die Kontrolle der einzelnen Punktmutationen in den BACmiden erfolgte durch Sequenzierung mit entsprechenden Primern. Von korrekten BACmiden wurden Übernachtkulturen angelegt und aus 500ml LB Medium Kulturen die BACmid - DNA isoliert. Die Präparation erfolgte mit dem Nucleobond[®] AX Kit der Firma Macherey - Nagel.

Die gewonnene BACmid - DNA mit den Punktmutation wurden später in eukaryotische Zellen transfiziert (Siehe Kapitel Material und Methoden: Transfektion von BACmid - DNA in eukaryotische Zellen) Nach erfolgreicher Rekonstitution wurden die rekombinanten MCMV 7x passagiert, um die BACmid - Sequenz aus dem Virus zu entfernen. (Wagner, Jonjic et al. 1999)

5.2.3 Zellbiologische Methoden

5.2.3.1 Kultivierung / Handhabung

Die Kultivierung der verschiedenen Zelltypen erfolgte bei 37°C im begasteten Brutschrank (5 % CO₂) in *Dulbecco's Modified Eagles Medium* D-MEM-Vollmedium mit 1 % Penicillin, 1 % Streptomycin und 2 mM Glutamin. Je nach Zelltyp und Anforderungen wurden dem Medium 5 - 10 % fötales Kälberserum (FCS) oder 10 % neugeborenen

Kälberserum (NCS), sowie Ciprofloxacin (1:1000 / 10 µg/ml), Nystatin (1:2000 / 0,5 µg/ml) oder Amphotericin B (1:500 / 0,5 µg/ml) zugesetzt.

Bei Erreichen einer 100 % igen Konfluenz wurde das Medium abgenommen, 1 mal mit PBS gewaschen und die Zellen mit 1 ml Trypsin bei 37°C abgelöst. Die Zellen wurden in Medium resuspendiert und im gewünschten Verhältnis auf neue Zellkulturflaschen oder Platten verteilt.

Vor Gebrauch wurden Medien, Waschpuffer und andere Lösungen im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

5.2.3.2 Herstellung von Vaccinia Rekombinaten

Die Herstellung von Vaccinia - Rekombinanten erfolgte in 6 well Zellkulturschalen auf CV1 Zellen. Nachdem diese 80 - 90 % konfluent waren, wurden sie mit einer MOI von 0,005 bis 0,008 mit Vaccinia ts7 infiziert und für eine Stunde bei Raumtemperatur und dann zwei Stunden bei 33°C inkubiert. Vaccinia ts7 ist ein temperatursensitiver Vacciniastamm, der für die nichtinfektiöse Vaccinia Wildtyp DNA die IE Phase Proteine liefert. Danach wurde der Transfektionsmix, bestehend aus 0,5 µg Vaccinia Wildtyp DNA, 62µl 2M CaCl₂, 1 µg des Rekombinations Plasmids (p7.5k131), einer entsprechenden Menge Bidest (500 µl Gesamtvolumen) und 500µl 2xHBS (pH 7,15) hergestellt, dieser 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann zu den Zellen gegeben und 3 bis 6 Stunden bei 39,5°C inkubiert. Nach Waschen mit PBS und Zugabe von frischem Medium wurden die Zellen bei 39,5°C so lange inkubiert bis Plaques sichtbar wurden. Während dieser Zeit wurden in 6 well Zellkulturschalen 143B tk⁻ Zellen mit 100 µg/ml Bromdesoxyuridin (BrDU) vorbereitet und bis zu einer Zelldichte von 70 - 80 % kultiviert. Um eine Scherung der DNA zu vermeiden, wurde Vaccinia - DNA immer mit abgeschnittenen Spitzen pipettiert. Die Inkubationsschritte bei 33°C, 37°C oder 39,5°C wurden im Brutschrank bei 5 % CO₂ durchgeführt.

1. Selektion

Waren bei den CV1 Zellen Plaques sichtbar wurden sie bei -20°C für min. 1 Stunde eingefroren, dann aufgetaut, resuspendiert und 3 mal 5 Sekunden im Ultraschallbad behandelt. Diese Zellsuspension wurde in verschiedenen Verdünnungsstufen (1:10 oder 1:5) zusammen mit 100 µg BrDU/ml auf die 143B tk⁻ Zellen gegeben und 1 Stunde

bei RT inkubiert. Das Medium wurde dann abgesaugt und durch frisches (mit BrDU) ersetzt und bei 37°C inkubiert, bis Plaques sichtbar wurden.

2. Selektion

Die neuen Plaques wurden markiert, mit 50 µl PBS gepickt, 3 mal 5 Sekunden ultrabeschallt und wiederum in verschiedenen Verdünnungsstufen (1:10 oder 1:5) zusammen mit 100 µg BrDU/ml auf 143B tk⁻ Zellen gegeben, 1 Stunde bei RT inkubiert, das Medium gewechselt und wiederum bei 37°C inkubiert bis Plaques sichtbar wurden.

Herstellen eines Ministocks

Einzelstehende Plaques aus der höchsten Verdünnungsstufe wurden gepickt, 3 mal 5 Sekunden ultrabeschallt und komplett auf zwischenzeitlich vorbereitete CV1 Zellen gegeben. Nach 2 - 4 Tagen Inkubation bei 37°C zeigte sich bei allen Zellen ein zytopathischer Effekt und der Virusstock konnte geerntet werden. Die Zellsuspension wurde wiederum 3 mal 5 Sekunden im Ultraschallbad behandelt und konnte dann für weitergehende Analysen eingesetzt (PCR, Western Blot, FACS, IP) werden. Ergab die Rekombination das gewünschte rekombinante Vaccinia Virus (rVV) wurde ein größerer Stock angelegt, dieser titriert und bei -70°C eingelagert.

5.2.3.3 Transfektion von BACmid - DNA in eukaryotische Zellen

Zum Zweck der Transfektion wurden MEF oder 3T3 Zellen verwendet und die BACmide mit dem SuperFect[®] Transfection Kit der Firma Qiagen in die Zellen eingebracht. Dieses Reagenz bildet Micellen, wodurch die BACmid - DNA in die Zellen gelangen kann.

Hierfür wurden MEF oder 3T3 Zellen in 60 mm Zellkulturschalen ausgesät und bis zu einer 60 - 80 % igen Konfluenz kultiviert. Der Transfektionsmix bestand aus BACmid - DNA (5 µg), 30 µl SuperFect[®] Reagenz und 145 µl Medium ohne Serumzusatz und wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Da BACmid - DNA sehr groß ist, wurden abgeschnittenen Pipettenspitzen verwendet, um eine Scherung der DNA zu vermeiden. Vor der Zugabe des Transfektionsmixes wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen, dann der Transfektionsmix sowie 1 ml Medium mit Serum zu den Zellen gegeben und 2 – 3 h im Brutschrank (37°C 5 % CO₂) inkubiert. Es folgte ein

Mediumwechsel mit 1x PBS waschen und nach einer Woche Inkubationszeit die Umsetzung in eine neue Zellkulturflasche T25 (25 cm²), wobei 50 % neue nicht infizierte Zellen zugegeben wurden. Nach einer weiteren Woche wurden Herde von infizierten Zellen (Plaques) sichtbar und konnten dann in eine größere Zellkulturflasche T75 (75 cm²) umgesetzt werden. Es wurde abgewartet bis alle Zellen infiziert waren und sich ein vollständiger cytopathischer Effekt (CPE) ausbildete. Zum Schluß wurden die Zellen geerntet und titriert.

5.2.3.4 Infektion

Die Infektionsdosis (MOI: *multiplicity of infection*) wird in pfu (*plaque forming units*, Plaquebildende Einheiten) / Zelle angegeben. Sie beschreibt das Verhältnis zwischen der Menge infektiöser Einheiten und der Zellzahl. Bei einer MOI von 1 kommt auf jede Zelle ein infektiöses Viruspartikel.

5.2.3.5 Herstellung von Virusstocks

In 14,5er Schalen (175 cm²) wurden NIH3T3 Zellen subkonfluent (ca. 75 %) ausgesät und die Infektion so lange mikroskopisch weiterverfolgt, bis alle Zellen einen zytopathischen Effekt zeigen. Dies dauert in der Regel 4 - 6 Tage. Danach wurde der virushaltige Überstand abgeerntet, aliquotiert und bei -70°C gelagert.

5.2.3.6 Titration

MCMV

Die MEF – Zellen wurden so auf eine 96 Loch Mikrotiterplatte ausgesät, dass sie am nächsten Tag subkonfluent (ca. 75 %) waren.

Dann wurde eine 12 stufige Verdünnungsreihe (log₁₀) des Virusstocks angelegt. In der 1. Verdünnungsstufe wurden 10 µl Virussuspension und 990 µl Nährmedium resuspendiert. In jede weitere Verdünnungsstufe (die bereits 1350 µl Medium enthält) wurden dann je 150 µl der vorherigen Verdünnungsstufe übertragen und resuspendiert.

Danach wurde das Medium der 96 Loch Mikrotiterplatte abgesaugt und 100 µl neues Medium zugegeben. Von den 8 Verdünnungsstufen 10^{-5} – 10^{-12} , wurden je 100 µl auf eine Reihe (12 Löcher) der Mikrotiterplatte übertragen und dann 30min, 2000 U/min bei RT zentrifugiert.

Nach 4 Tagen Inkubation im Zellkulturinkubator wurden die infizierten Plaques in jeder Verdünnungsreihe gezählt und über eine Tabelle (Margarita del Val) kann daraus der Titer (pfu/ml) bestimmt werden.

Vaccinia-Viren

Vaccinia Viren wurden auf CV1 – Zellen in 24 oder 48 Loch Mikrotiterplatte titriert. Dann wurde ebenfalls eine Verdünnungsreihe des Virusstocks angelegt. Damit wurden die Zellen infiziert und nach 24 – 36 Stunden Inkubationszeit konnten die Plaques abgelesen und daraus der Titer bestimmt werden.

5.2.4 Immunchemische Methoden

5.2.4.1 Immunpräzipitation

Immunpräzipitationen wurden unter Verwendung von Protein A - Sepharose und radioaktivem ^{35}S – Cystein / Methionin durchgeführt. Die präzipitierten und markierten Immunkomplexe wurden in einem 10 % igen SDS - Polyacrylamidgel aufgetrennt.

Im ersten Schritt wurden Zellen ausgesät und infiziert. Dabei wurden CV1 und NIH 3T3 Zellen sowie rekombinante Vaccinia Viren und MCMV eingesetzt. Zur Kontrolle wurde jeweils eine Probe nicht infiziert (MOCK) und von jedem Virustyp eine Probe mit dem Wildtyp Virus infiziert. Nach Übernachtinfektion wurden die Zellen gewaschen und im zweiten Schritt 1 – 2 h mit Methionin und Cystein freiem Medium (37°C, P/S, 5 % FCS) ausgehungert. Nach einem Hungermediumwechsel wurde radioaktives ^{35}S – Cystein / Methionin zugegeben, was dann von der Zelle verstärkt aufgenommen wird und so die Markierung von Proteinen ermöglicht. Die Markierungszeit (Pulse) betrug 1 Stunde. Danach wurden die Zellen gewaschen, lysiert (1% NP-40 mit PMSF und Leupeptin) und die Zellreste abzentrifugiert (15 Minuten, 13000 U/min, 4°C). Im dritten Schritt wurde Antikörper zugegeben (5 µg) und rotierend 45 - 60 Minuten bei 4°C inkubiert. Die dabei

entstandenen Immunkomplexe werden dann an die Protein A - Sepharose gekoppelt. Dieses Protein aus *Staphylococcus aureus* hat eine hohe Affinität zum Fc - Teil von Antikörpern. Damit werden die von spezifischen Antikörpern gebundenen markierten Proteine von anderen Proteinen separiert. Dies geschieht wiederum durch rotierende Inkubation bei 45 - 60 Minuten, 4°C. An diesem Punkt wurde in den Lysaten die Menge des radioaktiv markierten Proteins bestimmt. Dazu wurden je 3 µl Lysat und 1 ml Quicksave A Puffer (Zinsser Analytic) verwendet und in einem Szintigraph (Wallace) gemessen. Dies ermöglicht das Angleichen von verschiedenen Proteinmengen und damit ein gleichmäßiges Bandenmuster in den verschiedenen Proben. Im vierten Schritt werden die PAS - Pellets mehrfach mit verschiedenen Puffern (Waschpuffer B, C, D) gewaschen. Vor dem Auftragen des Überstandes auf das SDS - Gel wurden die PAS - Pellets mit 40 µl Probenpuffer versetzt und 5 Minuten bei 95°C erhitzt. Dabei lösen sich die Immunkomplexe von der Sepharose.

Um verschiedenen Glykosilierungsstufen von Glykoproteinen darstellen zu können, erfolgte ein Endoglykosidase H (Endo H) Verdau. Dazu wurden die Protein - A - Sepharose - Pellets mit 30 µl Endo H Puffer, 6 µl 0,1 M β - Mercaptoethanol und 2 µl Endo H bei 37°C über Nacht verdaut und dann mit Endo H Probenpuffer 4x auf das SDS - Gel aufgetragen. Dabei ist zu beachten, dass auch Proben, die nicht mit Endo H verdaut wurden mit Endo H Probenpuffer 4x versetzt werden müssen, da sonst unterschiedliche Spurdicken im SDS - PAGE resultieren.

Die Laufzeit des SDS - PAGE betrug je nach Größe des gesuchten Proteins 12 bis 14 Stunden bei 60 V und 20 mA.

Zur Detektion wurde das Gel auf dem Wiegeschüttler 1 h mit Fixationspuffer inkubiert und dann 2 h bei 80°C unter Vakuum getrocknet. Es wurde ein Film auf das getrocknete Gel aufgelegt und dieser nach einem Tag oder länger Inkubationszeit (bis zu 2 Monate) entwickelt.

5.2.4.2 FACS - Analyse

Zur Analyse der Expression (extra- oder intrazellulär) von Proteinen wurden Zellen in 6well Lochplatten ausgesät und mit verschiedenen Viren (MOI 5-10) infiziert. Bei der Verwendung von Vaccina Viren wurden CV1 Zellen benutzt, bei der Verwendung von MCMV MEF oder NIH3T3 Zellen und bei RCMV REF Zellen. Nachdem alle Zellen

infiziert waren wurden sie mit Trypsin abgelöst, gewaschen, in eine 96well Lochplatte überführt und schließlich mit PFA fixiert. Sollte nicht ausschließlich die Oberflächenexpression bestimmt werden wurden die Zellen an diesem Punkt permeabilisiert. Dies erfolgte mit FACS Permeabilisierungspuffer für 10 Minuten auf Eis. Anschließend wurden sie auf Eis für 45 Minuten mit dem spezifischen Antikörper inkubiert und dann 3x mit FACS Puffer gewaschen. Bei indirekter Färbung, die einen zweiten Antikörper erfordert, wiederholen sich die zuvor aufgeführten Schritte. Es wurden FITC gekoppelte Primär- oder Sekundäantikörper verwendet. Nach beendeter Färbung wurden die Zellen nochmals mit PFA fixiert. Dies garantiert eine Meßbarkeit der gefärbten Zellen von bis zu 2 Wochen. Die Fluoreszenz wurde dann in einem FACS - Excalibur der Firma Becton - Dickenson bestimmt und ausgewertet.

5.2.5 Proteinchemische Methoden

5.2.5.1 Western Blot

Probengewinnung und -vorbereitung

Es wurden CV1 oder NIH 3T3 Zellen ausgesät und bei 80 % Konfluenz mit den verschiedenen Vaccinia Viren mit einer MOI 1 infiziert und über Nacht im Brutschrank inkubiert (37°C, 5 % CO₂). Danach wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und dann mit 1 ml PBS abgelöst und eine Minute bei 13000U/min und 4°C. zentrifugiert. Das Pellet wurde zum Lysieren in 100 µl RIPA Puffer aufgenommen und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Um die Membranbestandteile abzutrennen wurde bei 4°C 10 Minuten und 13000 U/min zentrifugiert. Der gewonnene Überstand wurde mit 100 µl 2x Probenpuffer versetzt und 5 Minuten auf 95°C erhitzt und konnte dann auf das Gel aufgetragen werden.

Western Blot Polyacrylamidgelelektrophorese

Für Western Blot Analysen wurden 10 % ige Gele mit einer Größe von 8,6 x 6,8 cm verwendet. Zuerst wurde das Trenngel bis ca. 1,5 cm unterhalb des unteren Kammtaschenrandes gegossen. Das Gel wurde mit 1 - 2 ml 0,1 % SDS überschichtet und die Polymerisierung abgewartet. Nach 5 - 10 min konnte das SDS abgesaugt und

das Sammelgel gegossen werden. Die Proben wurden aufgetragen und das Gel lief bei 20 mA für 45 Minuten. Leere Gel - Taschen wurden mit Probenpuffer aufgefüllt.

semi dry Blotting

Zuerst wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel auf einer Seite mit 3 passenden, mit Blotting Puffer angefeuchteten Filterpapieren (Whatman), versehen. Auf der anderen Seite wurde die Nitrocellulosemembran (Protran B85, Schleicher & Schuell) und wiederum 3 Lagen Filterpapier aufgelegt. Alle Schichten wurden mit Blotting Puffer angefeuchtet und ohne Luftblasen aufeinandergelegt und dann in der Blotting - Apparatur (Biorad) 40 Minuten bei 12 Volt und 2 Ampere geblottet.

Blocken

Um unspezifischen Bindungen zu adsorbieren, wurde die Membran 1 h auf dem Wiegeschüttler in einer Lösung aus 5 % Milchpulver in TBST inkubiert.

Die Membran wurde für 1 h mit dem Primärantikörper (in 0,5 % Milchpulver / TBST 1:1000 verdünnt) auf dem Wiegeschüttler inkubiert und anschließend 3x 10 Minuten in TBST gewaschen. Der Sekundärantikörper (Peroxidasegekoppelt, in 0,5 % Milchpulver / TBST 1:5000 verdünnt) wurde ebenfalls 1 h auf die Membran gegeben und anschließend 3 - 6 mal 10 Minuten mit TBST gewaschen. Zum Schluß wurde die Membran zwischen 2 Filterpapieren getrocknet und dann mit 2 ml ECL+plus - Detektionslösung (Amersham Biosciences) überschichtet. Danach wurde überschüssige Lösung entfernt, ein Film (Biomax MR, Kodak) aufgelegt und nach verschiedenen langen Expositionszeiten entwickelt.

5.2.5.2 Proteinase K Verdau

Um DNA aus Viren zu präparieren, wurden Zellkulturflaschen (175 cm²) mit 1 ml Virusstock infiziert und bei 100 % igem zytopathischen Effekt (cpe) geerntet, bei 1200 U/min. 10 min zentrifugiert und das Pellet mit PBS gewaschen. In einem 2 ml Reaktionsgefäß wurde das Pellet in 760 µl Proteinase K - Puffer resuspendiert, dann mit 20 µl Proteinase K (20 mg/ml, 50 U/ml, Roche) und 20 µl SDS (20 %) versetzt und bei 56°C über Nacht inkubiert.

Danach erfolgte die DNA Extraktion mittels Phenol / Chloroform und Isopropanol- bzw. Ethanolfällung. Am Schluß wurde das DNA - Pelett in einem geeigneten Volumen mit TE Puffer (Qiagen), EB Puffer (LifeTech) oder Bidest gelöst.

5.2.5.3 SDS - Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS PAGE)

Um Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen, wurden 10 % ige Gele gegossen. Zur Polymerisierung werden Ammoniumpersulfatlösung (APS) und TEMED zugegeben. Zuerst wird das Trenngel gegossen bis zu einer Höhe von 3 - 4 cm unterhalb der Kammtaschen, der Kamm zwischen die Glasplatten geschoben und mit 2 ml 0,1 % SDS überschichtet. Nach ca. 30 Minuten Polymerisierungszeit wird das SDS entfernt und das Sammelgel bis zum Rand eingefüllt. Nach einer weiteren halben Stunde ist das Sammelgel vollständig polymerisiert. Nach dem Auftragen der Proben lief das Gel, je nach Größe des gesuchten Proteins, 12 - 14 h bei 60 Volt und 20 mA. Nicht genutzte Gel - Taschen wurden mit Probenpuffer aufgefüllt.

6 Ergebnisse

6.1 Sequenzvergleiche von *m138* und RCMV Homologen mit zellulären Fc γ -Rezeptoren

Die kodierende Sequenz der zellulären Fc γ -Rezeptoren der Maus (CD16, CD32, CD64) und des viralen Fc γ -Rezeptors von MCMV (*m138*) und dessen Homologen RCMV (*r138* NL / Maastricht, *r138* UK / England) wurden verglichen und verschiedene Sequenzmerkmale überprüft.

Die Genregionen der viralen Fc γ -Rezeptoren (vFc γ R) besitzen eine ähnliche Größe: der vFc γ R von MCMV *m138* ist 569 Aminosäuren lang, der vFc γ R von RCMV Maastricht, *r138* NL ist 562 Aminosäuren lang und der vFc γ R von RCMV England *r138* UK ist 523 Aminosäuren lang.

Die Struktur der zellulären Fc γ -Rezeptoren ist größtenteils bekannt. Zelluläre Fc γ -Rezeptoren besitzen eine charakteristische Domänenstruktur, die aus zwei oder drei IgSF Domänen besteht. Es wird unterschieden zwischen variablen (IgV, auch *V-type Ig-like domains*), konservierten (IgC1, auch *C-type Ig-like domains*) und intermediären (Igl) Domänen. IgV-Domänen sind länger und besitzen 9 β -Faltblätter, die IgC-Domänen sind kürzer und besitzen nur 7 β -Faltblätter. Manche Ig-Domänen ähneln in ihrer Aminosäuresequenz IgV, besitzen aber nur die Größe einer IgC und werden deshalb IgC2 genannt (Harpaz and Chothia 1994).

Fc γ -Rezeptoren enthalten *C-type Ig-like domains* aus ca. 70-110 Aminosäuren und besitzen eine charakteristische Ig-Domäne die aus zwei antiparallelen β -Faltblattstrukturen und α -Helices bestehen. β -Faltblatt Strukturen sind Sekundärstrukturelemente, bei denen die Aminosäureketten ziehharmonikaähnlich dreidimensional angeordnet sind. Bei den Polypeptidketten unterscheidet man eine antiparallele, eine parallele und eine gemischte Verknüpfung der β -Stränge (Internet5 2010). α -Helices sind ebenfalls Sekundärstrukturelemente, wobei es sich hier um eine rechtshändig gedrehte Spirale mit durchschnittlich 3,6 Aminosäureseitenketten pro Umdrehung handelt (Internet6 2010).

Zwischen den hydrophoben Aminosäuren auf der inneren Seite des *Sandwiches* befinden sich hochkonservierte Disulfidbrücken, die durch 2 Cysteine zwischen dem B und F strand gebildet werden. Diese Brücken stabilisieren die Ig-Domäne.

Beim Sequenzvergleich zwischen viralen und zellulären Fc γ -Rezeptoren wurde nach IgSF ähnlichen Strukturen gesucht und auf Homologien im Bereich der einzelnen IgSF Domänen geachtet.

Die Bezeichnung der homologen Domänen orientiert sich an der Nomenklatur für zelluläre Fc γ -Rezeptoren (Barclay, Brown et al. 1997). Die putativen IgSF Domänen wurden in Anlehnung an diese Nomenklatur C2 Domänen (für zweimal Cystein) genannt, wobei C2-1 die am weitesten N-terminal gelegene Domäne und C2-3 die am weitesten C-terminal gelegene Domäne ist. C2-2 befindet sich dazwischen. (Siehe Abbildungen 8 und 20) Diese Domänen sind charakterisiert durch Cysteinpaare in einem Abstand von ca. 65 Aminosäuren und an einer Seite flankiert von benachbart liegenden Tyrosin oder Phenylalanin. Diese Cysteine bilden in jeder Domäne die schon oben beschriebenen stabilisierenden Disulfidbrücken.

Nicht zu verwechseln sind diese Domänen mit der funktionellen Membranproteinstruktur die *c2-domain* genannt wird, aus 8 β -Faltblättern und zwei bis drei zentral angeordneten Kalzium-Ionen besteht und enzymatische Funktionen in der Protein-Zellmembran-Interaktion (z.B. der Kalzium abhängigen Phospholipid-Bindung) hat (Sutton, Davletov et al. 1995).

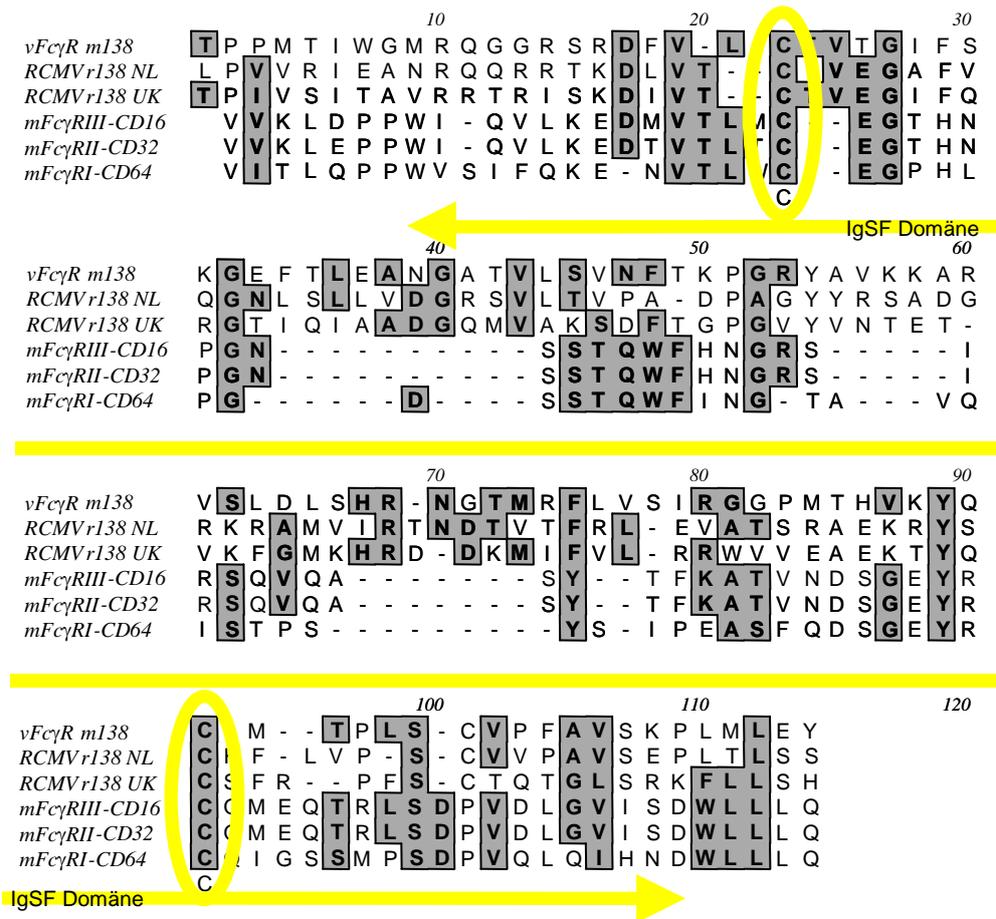


Abbildung 7: Eine IgSF-artige Domäne kann anhand von 2 konservierten Cysteinen postuliert werden. Hier ist diese am Sequenzvergleich der C2-1 Domäne der viralen Fc γ R von MCMV m138, den RCMV r138 Homologen und zellulären Fc γ R CD16, CD32 und CD64 gezeigt. Die grauen Boxen heben Übereinstimmungen hervor. Diese sind besonders zwischen den zellulären Fc γ -Rezeptoren zu finden.

Die folgenden Tabellen zeigen die Vergleiche einzelner C2 Domänen miteinander.

Als C2-Domäne wurde der Bereich zwischen 2 Cysteinen mit jeweils 20 Aminosäuren vor dem Cystein definiert (Abb. 7). Die Untersuchungen wurden mit dem Programm Mac Vector; ClustaW (v.1.4) durchgeführt. (Einstellungen: Pairwise Alignment Mode: Slow; Open Gap Penalty: 10.0; Extended Gap Penalty: 0.1; Similarity Matrix: pam.) Identität bedeutet, dass beim Vergleich genau die gleiche Aminosäure vorkommt, Ähnlichkeit bedeutet, dass beim Vergleich die gefundene Aminosäure zu selben Aminosäuregruppe (basisch / sauer / semisauer / neutral) gehört.

Tabelle 4 zeigt die Aminosäuren beim Vergleich der einzelnen C2 Domänen von verschiedenen Fc-Rezeptoren. „Parallel“ meint, dass z.B. die C2-1 Domäne von CD64 mit der C2-1 Domäne von CD32 verglichen wurde. (Abb. 7) Auffällig ist die fast 100%ige Ähnlichkeit der C2 Domänen C2-1 und C2-2 von CD16 und CD32, die für die

niedrigaffine Bindung von IgG verantwortlich ist. Diese Homologie der Domänen ist auch bei CD64 zu beobachten.

Vergleich C2 Parallel	IgSF Domänen					
	C2-1		C2-2		C2-3	
	Identität	Ähnlichkeit	Identität	Ähnlichkeit	Identität	Ähnlichkeit
CD64 vs. CD32	53%	64%	44%	62%	/	/
CD64 vs. CD16	53%	62%	46%	66%	/	/
CD16 vs. CD32	95%	96%	94%	94%	/	/
<i>m138</i> vs. <i>r138UK</i>	33%	46%	13%	31%	18%	39%
<i>m138</i> vs. <i>r138NL</i>	32%	44%	21%	38%	23%	37%
<i>m138</i> vs. CD64	12%	21%	10%	25%	15%	30%
<i>m138</i> vs. CD32	17%	24%	6%	13%	/	/
<i>m138</i> vs. CD16	17%	24%	7%	13%	/	/
<i>r138UK</i> vs. <i>r138NL</i>	35%	47%	20%	34%	23%	42%

Tabelle 4

Tabelle 5 zeigt die Homologien der verschiedenen C2 Domänen innerhalb eines Fc-Rezeptors. „Intern“ meint, dass z.B. die C2-1 Domäne von CD64 mit der C2-2 Domäne von CD64 verglichen wurde. (Abb. 8) Es kann festgestellt werden, dass die Ähnlichkeiten der C2 Domänen in einem Fc γ -Rezeptor nicht vom einzelnen Rezeptortyp (zellulär / viral) abhängig ist.

Vergleich C2 Intern	Fc γ -Rezeptoren							
	<i>m138</i>		CD 64		CD32		CD16	
	ID	SI	ID	SI	ID	SI	ID	SI
C2-1 vs. C2-2	12%	23%	20%	34%	25%	43%	21%	33%
C2-1 vs. C2-3	14%	30%	19%	35%	<u>Legende</u>			
C2-2 vs. C2-3	18%	31%	16%	31%	ID: Identität, SI: Ähnlichkeit			

Tabelle 5

Tabelle 6 zeigt die Homologien der drei C2 Domänen mit den verschiedenen C2 Domänen der Fc γ -Rezeptoren. „Quer“ meint, dass z.B. die C2-1 Domäne von *m138* mit der C2-2 Domäne von CD64 verglichen wurde. (Abb. 8)

Vergleich C2 Quer	ID	SI	Vergleich C2 Quer	ID	SI
<i>m138</i> C2-1 vs. CD64 C2-2	12%	24%	<i>m138</i> C2-3 vs. CD16 C2-1	10%	23%
<i>m138</i> C2-1 vs. CD64 C2-3	10%	26%	<i>m138</i> C2-3 vs. CD16 C2-2	13%	29%
<i>m138</i> C2-2 vs. CD64 C2-1	11%	23%	<i>m138</i> C2-3 vs. CD32 C2-1	10%	24%
<i>m138</i> C2-2 vs. CD64 C2-3	15%	31%	<i>m138</i> C2-3 vs. CD32 C2-2	15%	24%
<i>m138</i> C2-3 vs. CD64 C2-1	14%	30%	CD64 C2-3 vs. CD32 C2-2	26%	49%
<i>m138</i> C2-3 vs. CD64 C2-2	12%	24%	CD64 C2-3 vs. CD32 C2-1	23%	39%
<i>m138</i> C2-1 vs. CD16 C2-2	12%	24%	CD64 C2-2 vs. CD32 C2-1	21%	39%
<i>m138</i> C2-1 vs. CD32 C2-2	14%	26%	CD32 C2-1 vs. CD16 C2-2	24%	37%
<i>m138</i> C2-2 vs. CD16 C2-1	13%	21%	CD32 C2-2 vs. CD16 C2-1	23%	38%
<i>m138</i> C2-2 vs. CD32 C2-1	14%	21%	<u>Legende</u> ID: Identität, SI: Ähnlichkeit		

Tabelle 6

Eine Übersicht der Verwandtschaftsverhältnisse zeigt die folgende Abbildung.

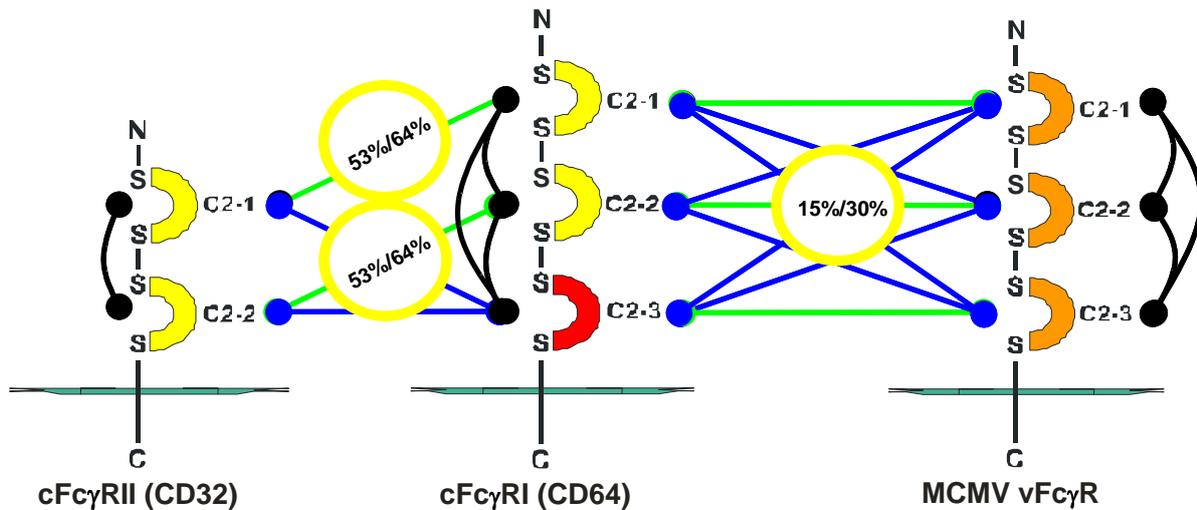


Abbildung 8: Verwandtschaftsverhältnisse (Identität / Ähnlichkeit) zwischen den zellulären Fc γ -Rezeptoren CD32 und CD64, sowie des viralen Fc γ -Rezeptors m138 von MCMV (mit hypothetischer Struktur). Die genauen Zahlen finden sich in den Tabellen 4-6; gelb: C2 Domäne für niedrigaffine Ig-Bindung, rot: C2 Domäne für hochaffine Ig-Bindung, orange: Ig-Bindung unklar; grüne Verbindungsbalken: Vergleich „Parallel“, blaue Verbindungsbalken: Vergleich „Quer“, schwarze Verbindungsbalken: Vergleich „Intern“.

Es wurden weiterhin phylogenetische Analysen durchgeführt, um die Verwandtschaftsverhältnisse der zellulären Fc γ -Rezeptoren und der viralen Fc γ -Rezeptoren zu untersuchen und darzustellen. Dazu wurden die Fc γ -Rezeptor-Sequenzen von CD16, CD32, CD64, MCMV sowie den zwei RCMV Stämmen verwendet.

Method: Neighbor Joining; Best Tree; tie breaking = Systematic
 Distance: Poisson-correction
 Gaps distributed proportionally

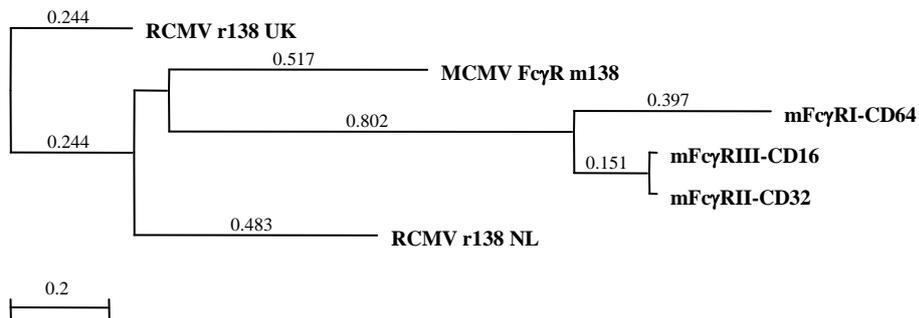


Abbildung 9: Der phylogenetische Baum zeigt die Sequenz-Verwandschaft der viralen Fc γ R von MCMV m138, den RCMV r138 Homologen und zellulären Fc γ R CD16, CD32 und CD64. Die zellulären Homologe bilden dabei eine homogene Gruppe, während die viralen Homologen größere Differenzen aufweisen. Verglichen wurde die gesamte Aminosäuresequenz unter Verwendung des Programms Mac Vector.

Zusätzlich wurde die Proteinsequenz mithilfe verschiedener Software-Algorithmen untersucht, um genauere Vorhersagen über die Struktur der vFc γ Rs treffen zu können. Mit *Scan Prosite* wurde die hypothetische Sekundärstruktur der vFc γ Rs und die Strukturen der bekannten zellulären Fc γ – Rezeptoren untersucht. (Internet1 2004) Erwartungsgemäß wurden bei CD16 und CD32 zwei und bei CD64 drei *Ig - like - domains* abgelesen. Bei den *m138* Homologen von RCMV wurden je eine *Ig - like - domain* (*r138UK* C2-2, Aminosäureposition 243-358, *r138NL* C2-2 Aminosäureposition 228-358) und bei vFc γ R von MCMV wurde keine *Ig - like - domain* gefunden. Auch wenn das Vorhersage-Ergebnis bei *m138* von *r138NL* und *r138UK* bezüglich der Zahl IgSF-artiger Domänen differiert, so finden sich in der Aminosäuresequenz Merkmale, die in den 3 putativen IgSF Domänen bei allen 3 viralen Fc γ Rs gleich sind. Ebenso besitzen alle vFc γ R zwischen putativer IgSF Domäne C2-1 und C2-2 an ähnlicher Position ein zweifaches Cystein (*m138* Position 239/241, *r138 UK* Position 252/253, *r138 NL* Position 261/262).

Die Resultate des „Dipro - Cysteine Disulfide Bond Predictor“ (Internet2 2004) ergaben für alle vFc γ R ähnliche Vorhersagen für Anzahl und Position der Disulfidbrücken, was für eine gemeinsame Grundstruktur spricht. Für *m138* werden insgesamt 7 Disulfidbrücken an den Positionen 10/23, 310/328, 127/194 (=C2-1), 539/565, 201/240, 39/54 und 239/263 vorhergesagt. Bei *r138NL* werden ebenfalls 7 Disulfidbrücken an den Positionen 42/58, 521/561, 325/343, 262/280, 152/218, 449/517 und 378/443

angenommen. Bei *r138UK* finden sich hingegen nur 6 putative Disulfidbrücken an den Positionen 12/27, 317/340, 253/271, 445/502, 139/204 und 43/58. Zusammenfassend ist zu sagen, daß die Domäne C2-1 auch durch Vorhersage putativer Disulfidbrücken aufgefunden wird, während die Position der anderen putativen C2- Domänen hier nicht bestätigt werden konnte.

Zusätzlich wurde die Proteinstruktur mit PSIPRED v2.4 (Internet3 2004) vorhergesagt. So besteht die C2-1 Domäne bei allen *m138* Homologen aus 7 putativen β -Faltblatt Strukturen und ähnelt damit am ehesten einer IgC1 Domäne. Die C2-2 Domäne besteht hingegen bei allen *m138* Homologen aus 6 putativen β -Faltblatt Strukturen. Diese werden von einer unterschiedlichen Anzahl (*r138 NL*: 3, *r138 UK*: 2, *m138*: 3) von α -Helices unterbrochen. Damit könnte diese Domäne eine IgC2 oder eine Igl-Domäne sein. Die C2-3 Domäne besteht bei allen *m138* Homologen aus 8 β -Faltblatt Strukturen, wobei bei *m138* zusätzlich eine α -Helix vorhergesagt wird. Diese Struktur könnte für eine IgC2 Domäne sprechen.

Die Vorhersage mit MEMSAT (Internet4 2004) ergab, dass alle *m138* Homologen eine ähnliche Transmembran Region besitzen: für *m138* von Position 533 bis 552, für *r138UK* von Position 500 bis 516, für *r138NL* von Position 535 bis 550.

Wenn man die Ergebnisse im Zusammenhang betrachtet, weisen signifikante Ähnlichkeiten zwischen allen CMV codierten Fc γ -bindenden Proteinen auf eine gemeinsame Grundstruktur, einen gemeinsamen Ursprung und möglicherweise auf eine ähnliche Funktion hin (Abbildung 10).

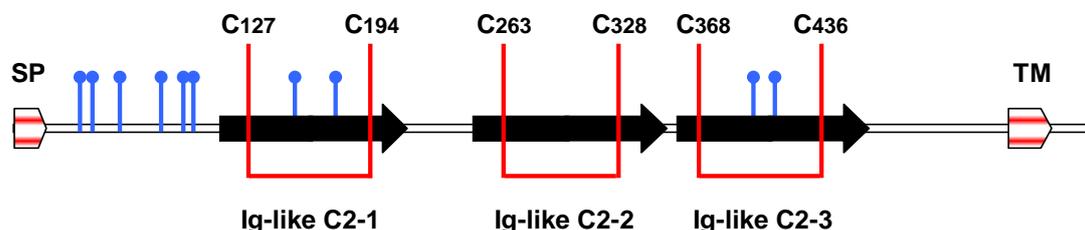


Abbildung 10: Strukturmodell des vFc γ R m138. Gezeigt sind die in dieser Arbeit identifizierten putativen IgSF-artigen Domänen C2-1, C2-2 und C2-3. Weitere Strukturelemente des m138 sind eine Signalsequenz (SP), die Transmembranregion (TM) und 10 in blau dargestellte putative N-Glykosylierungsstellen.

Besonders wichtig sind dabei die signifikanten Ähnlichkeiten in der C2-1 Domäne zwischen Maus Fc γ R und Ratten Homologen. Dies könnte ein Hinweis sein, dass diese

Domäne bei der $Fc\gamma$ -Bindung eine besondere Rolle spielt, wobei natürlich keines der Programme eine 100 %ige Vorhersage für reale Strukturen der $vFc\gamma R$ liefern kann. Dennoch erlauben die hier erhobenen Daten ein Strukturmodell von *m138* zu entwickeln, woraus sich die Möglichkeit ergibt weitere Experimente zu planen, mit denen die genauere Struktur und Funktion untersucht werden kann.

Zusammenfassung:

In der Aminosäuresequenz von *m138* und den *r138* Homologen finden sich signifikante Hinweise, die auf das Vorhandensein von 3 putativen IgSF Domänen schließen lassen.

m138 weist besonders in der C2-1 Domäne signifikante Homologie zu *r138* auf.

Mit den gewonnenen Daten wurde ein Strukturmodell entwickelt, mit dem die weiteren Experimente zur genaueren Bestimmung von Struktur und Funktion geplant wurden.

6.2 Vergleich der $Fc\gamma$ -bindenden Funktion von *r138* und *m138*

m138 wurde als MCMV kodierter $Fc\gamma$ -Rezeptoren beschrieben (Thäle, Lucin et al. 1994). $Fc\gamma$ -bindende Proteine wurden auch im Kontext der RCMV Infektion beobachtet (Bruggeman, Reinders et al. 1984). Das verantwortliche Genprodukt wurde jedoch bisher noch nicht beschrieben.

Aufgrund der oben beschriebenen Sequenzvergleiche erschien es sehr wahrscheinlich, dass die $Fc\gamma$ -Rezeptor Funktion der RCMV von den Sequenzhomologen des *m138* wahrgenommen wird. Daher wurden das *m138* und seine RCMV Homologen der Stämme Maastricht (NL) und England (UK) in ein geeignetes Expressionssystem integriert.

6.2.1 Klonierung und Herstellung von rekombinanten Vaccinia Viren zur Expression von *r138* und *m138*

Das Klonieren der RCMV Wildtyp Stämme Maastricht und England, sowie des Fc γ Rs von MCMV Wildtyp erfolgte im ersten Schritt durch Amplifikation der *r138* und *m138* Sequenzen mit verschiedenen Primern. Als DNA-Matrix wurde isolierte Virus-DNA der verschiedenen Stämme genutzt.

Daraus resultieren bei RCMV 4 PCR-Produkte: Die *r138* Genregion des RCMV Stammes Maastricht (NL), die *r138* Genregion des RCMV Stammes England (UK) und beide Genregionen jeweils mit einem FLAG-Tag (NL FLAG und UK FLAG, C-terminal) Bei MCMV resultierten 2 PCR-Produkte: Die *m138* Sequenz des MCMV Stammes C3x mit und ohne FLAG-Tag (CDS und CDS FLAG).

Tabelle 7 zeigt eine Übersicht der verwendeten Primer, der erhaltenen PCR-Produkte und eine Auswahl der enthaltenen Restriktionsschnittstellen für Klonierung und Kontrolle.

Primer 1	Primer 2	PCR – Produkt	Restriktionsschnittstellen	
			Klonierung	Kontrolle
NL-fcr1	NL-fcr2	NL	Alle mit <i>Hind III</i> + <i>Sst I</i> (<i>Sst I</i> = <i>Sac I</i>)	<i>EcoR I</i> + <i>BamH I</i>
NL-fcrF1	NL-fcr2	NL FLAG		(3177bp+789bp+376bp)
SV-fcr1	SV-fcr2	UK		<i>EcoR I</i> + <i>BamH I</i>
SV-fcrF1	SV-fcr2	UK FLAG		(3460bp+665bp+100bp)
ab-fcr-cds1	ab-fcr-cds2	CDS		<i>EcoR I</i> + <i>BamH I</i>
ab-fcr-cds1	ab-fcr- flagHind	CDS FLAG		(4155bp+1347bp+414bp)

Tabelle 7

Wie Abbildung 11 zeigt, wurden die kodierenden Sequenzen von *m138*, *r138* NL und *r138* UK zuerst in den pUC 19 Vektor kloniert, der eine einfache Insertion von PCR-Produkten und die anschließende Sequenzierung mit Standardprimern erlaubt.

Dann erfolgte die Klonierung in den p7.5k131 Vektor, der für die Gewinnung von Vaccinia Rekombinanten benötigt wird:

Vektor: p7.5k131

Insert: PCR-Produkte aus folgenden Primernpaaren:

1. ab-fcr-cdsBam und ab-fcr-cdsHind
2. ab-fcr-cdsBam und ab-fcr-flagHind

Die Primer ab-fcr-cdsBam und ab-fcr-cdsHind dienten der Einführung von Restriktionsschnittstellen für eine einfachere Klonierung. Mit dem Primer ab-fcr-flagHind war es bei *m138* möglich einen FLAG Tag einzubringen.

Als Template wurden die Vektoren pUC CDS, pUC *r138* NL, pUC *r138* NL FLAG, pUC *r138* UK und pUC *r138* UK FLAG genutzt.

Zur Klonierung wurden die Restriktionsenzyme *BamH I* und *Hind III* (*sticky end*) verwendet. Die Kontrolle erfolgte mit den Restriktionsenzymen *EcoR I* und *BamH I*. Nach Auftrennung auf dem Agarose-Gel ergaben sich folgende Fragmente: 4155bp + 1347bp + 414bp. Abbildung 12 zeigt das Agarose-gel beispielhaft für den Vektor p7.5k CDS.

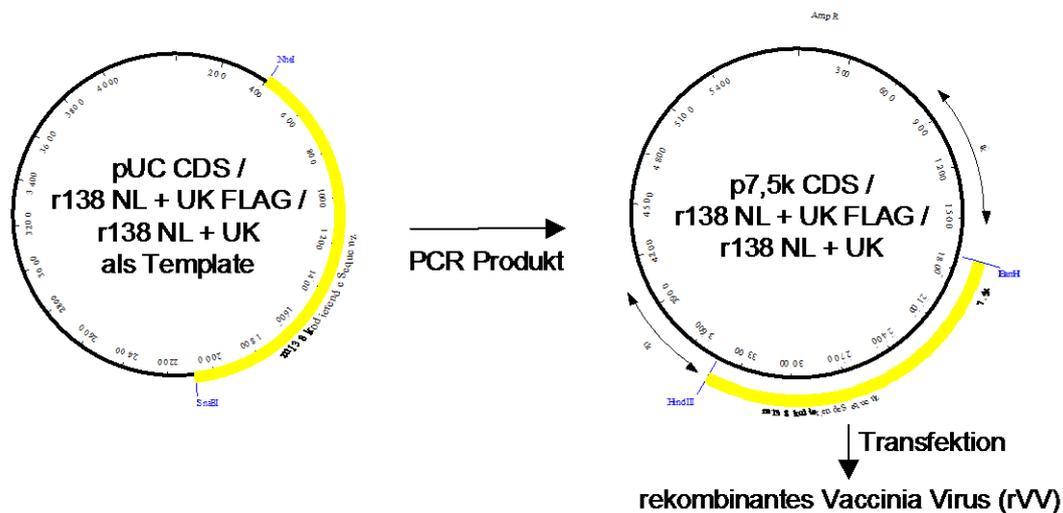


Abbildung 11: Klonierung der vFcyRs von MCMV (CDS) und RCMV Maastricht (NL) und England (UK) Wildtyp in den p7,5k131 Vektor für die Herstellung von rekombinantem Vaccinia Virus

Vor der Erzeugung von rekombinanten Vaccinia Viren (rVV), wurden die dafür verwendeten p7.5k-Plasmide sequenziert, um die Richtigkeit der im Plasmid enthaltenen Punktmutationen zu überprüfen.

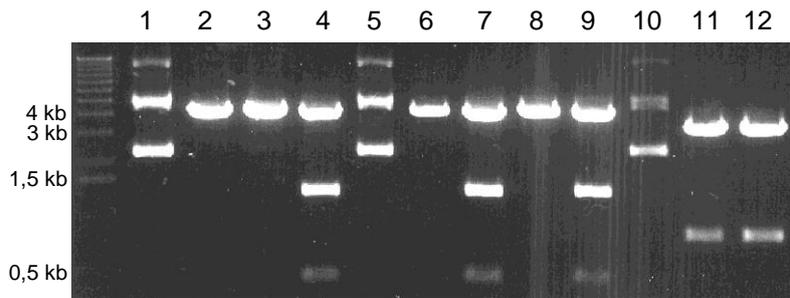


Abbildung 12: Kontrolle des Vektors p7.5k CDS mit den Enzymen *EcoRI* und *BamHI* in den Spuren 1-10 im 1%igen TAE Agarose-Gel. Es finden sich in den Spuren 4, 7 und 9 die korrekten Fragmentgrößen 4155bp+1347bp+417bp. Diese Vektoren wurden später für die Herstellung von rekombinantem Vaccinia Virus verwendet. Die Spuren 11 und 12 zeigen den Leervektor p7.5k nach Verdau mit *XbaI* und *EcoRI* mit den korrekten Fragmentgrößen 3396bp+796bp+15bp.

Die Herstellung von rVV erfolgt wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben und ist in Abbildung 13 graphisch dargestellt.

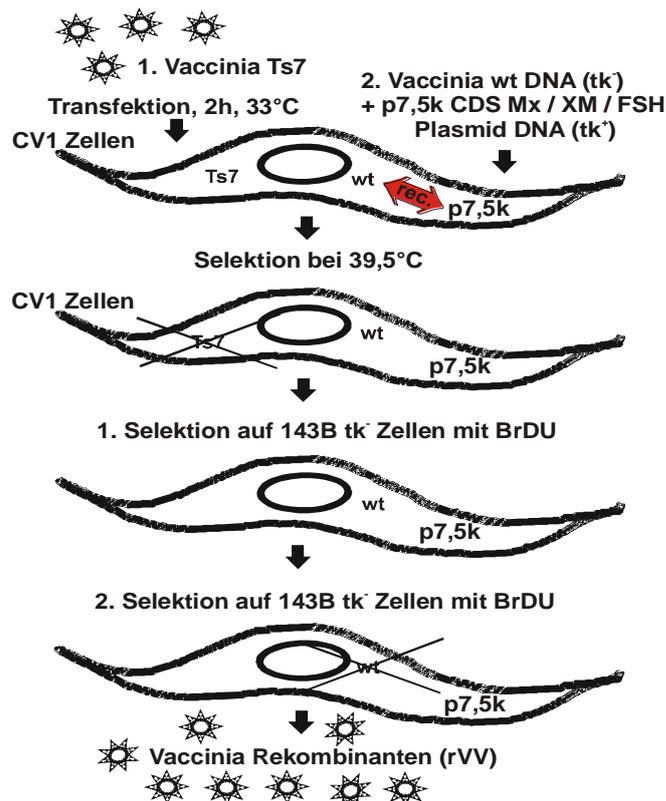


Abbildung 13: Herstellung von rekombinantem Vaccinia Virus (rVV), Vaccinia ts7 ist ein temperatursensitiver Vacciniastamm, tk⁻ und tk⁺ kennzeichnen die Thymidinkinaseaktivität. Die Vektoren p7.5k CDS / XM / FSH enthalten die DNA der m138 Genregion von MCMV und sind jeweils von Thymidinkinastücken flankiert, CV1: Affenierenzellen, 143 B tk⁻: humane Osteosarkomzellen ohne Thymidinkinaseaktivität, BrDU: Bromdesoxyuridin.

6.2.2 Funktionalität und IgG Spezifität von *m138* $\text{Fc}\gamma$ -1, *r138* NL und *r138* UK in der FACS Analyse und der Immunpräzipitation

Die Proteine *m138* und *r138* wurden auf ihre Fähigkeit $\text{Fc}\gamma$ zu binden überprüft. Dazu wurden die zuvor generierten rekombinanten Vaccinaviren (rVV) verwendet und im Falle von *m138* mit Maus $\text{Fc}\gamma$ -Fragment und im Falle von *r138* mit Ratten $\text{Fc}\gamma$ -Fragment und Ratten IgG auf ihre $\text{Fc}\gamma$ -Bindungsfähigkeit geprüft.

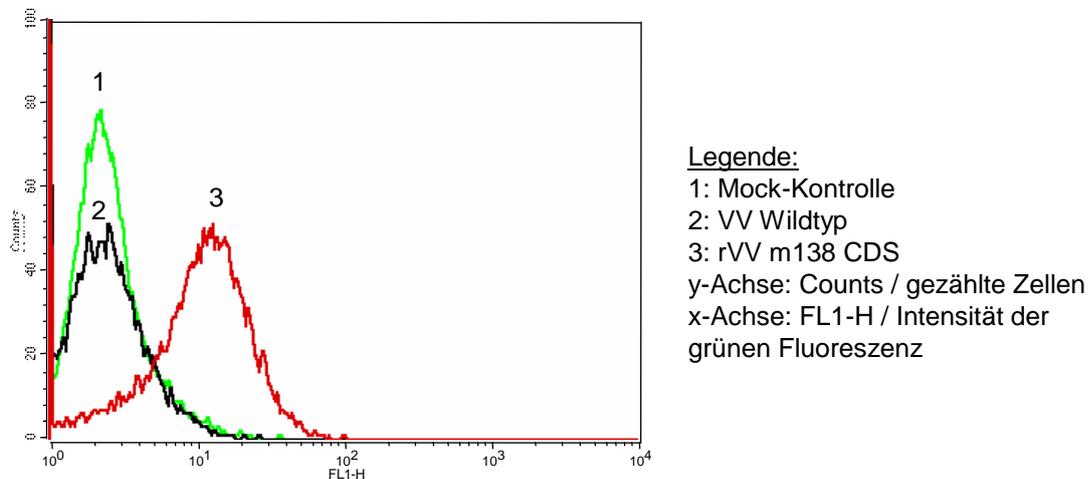


Abbildung 14: FACS Analyse des *m138* $\text{vFc}\gamma$ Rs mit FITC gekoppeltem $\text{Fc}\gamma$ -Fragment der Maus auf CV1 Zellen. *m138* bindet Maus- $\text{Fc}\gamma$ -Fragment, Mock und mit VV Wildtyp Kopenhagen binden kein Maus $\text{Fc}\gamma$ -Fragment.

Wie in Abbildung 14 gezeigt wird, bindet der in rVV klonierte *m138* $\text{Fc}\gamma$ -Rezeptor Maus $\text{Fc}\gamma$ -Fragment. Bei Infektion mit Vaccinia Wildtyp Virus (wt) bzw. in der Mock-Kontrolle konnte hingegen keine $\text{Fc}\gamma$ -Bindung im FACS nachgewiesen werden.

Um zu zeigen, dass die $\text{Fc}\gamma$ -Bindungsfähigkeit des $\text{vFc}\gamma$ R *m138* von einer intakten *m138* Gensequenz abhängt wurde die Deletionsmutante FLANK konstruiert. Bei FLANK wurde die komplette *m138* Genregion entfernt, nur die benachbarten Genregionen sind erhalten. Weiterhin wurde parallel dazu eine Punktmutante mit einem Frameshift (FSH) erzeugt. Diese enthält weiterhin die komplette *m138* Gensequenz, besitzt aber eine veränderte Aminosäuresequenz. (Siehe auch Kapitel 6.3)

In Abbildung 15 wurde die Fc γ -Bindungsfähigkeit mit Hilfe der Immunpräzipitation getestet. Dazu wurde der mit 35 S-Cystein / Methionin radioaktiv markierte Fc γ -Rezeptor nach Fc-Präzipitation mit Protein-A-Sepharose im SDS-PAGE aufgetrennt. Eine genaue Beschreibung des Experimentes findet sich im Teil Material und Methoden auf Seite 56. Wie erwartet resultieren nach der Gelaufftrennung die bereits beschriebenen Glykoproteine gp86/88 und gp105. Diese zeigen die gute Fc γ -Bindungsfähigkeit von *m138*. Bei der Deletionsmutante FLANK zeigt sich keine Fc γ -Bindung.

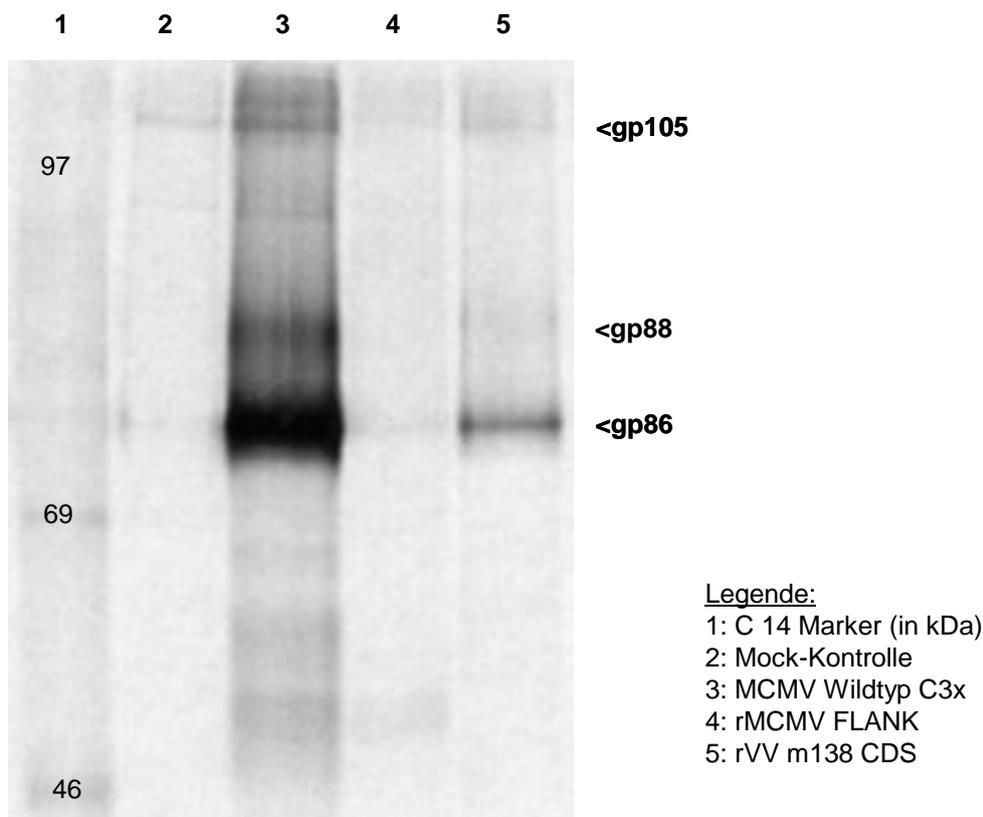


Abbildung 15: Immunpräzipitation des vFc γ R m138 auf 3T3 Zellen. Beim MCMV Wildtyp Stamm C3X und rVV m138 CDS finden sich die Glykoproteine gp86, gp88 und gp105, die eine Bindung des Maus Fc γ -Fragments anzeigen, während bei rMCMV FLANK (Deletionsmutante ohne die m138 Genregion) keine Fc γ -Bindung zu beobachten ist.

In der FACS Analyse von *r138* NL und *r138* UK, den Ratten-Homologen zum *m138*, zeigte sich, dass die exprimierten Proteine von *r138* der Ratte spezifisch nur Ratten-Fc γ binden. Dies ist in Abbildung 16 gezeigt. Dabei wurde Ratten IgG (oder auch Ratten Fc γ -Fragment, Ergebnis hier nicht gezeigt) nur von *r138* UK und *r138* NL gebunden. Eine Bindung in der Mock-Kontrolle oder bei Infektion mit *m138* FSH (der Frameshiftmutante des *m138* Fc γ -Rezeptors) konnte nicht gezeigt werden. Durch die

Infektion mit rVV *m138*FSH konnte gezeigt werden, dass die Bindung von Ratten IgG nicht unspezifisch durch das verwendete Vektorsystem bedingt ist.

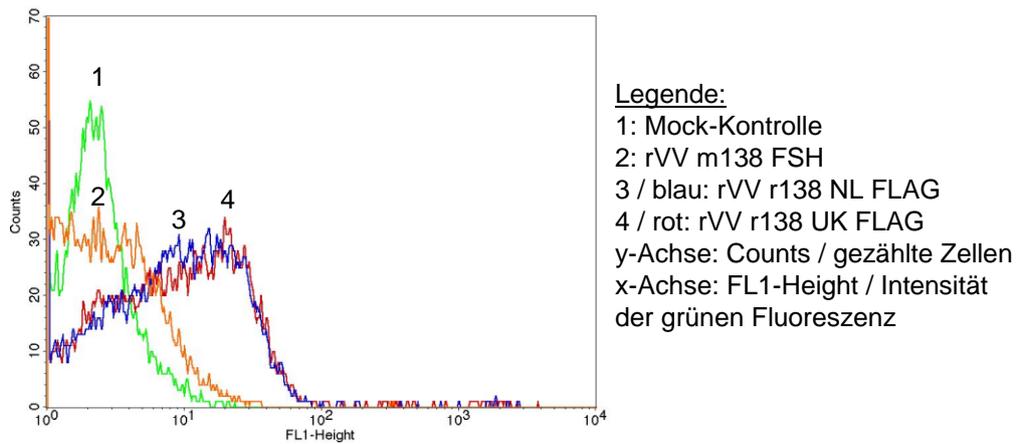


Abbildung 16: FACS Analyse der Homologen vFc γ R von RCMV mit Ratten IgG auf CV 1 Zellen. Die rVV r138 NL FLAG und rVV r138 UK FLAG binden Ratten IgG, was sekundär mit anti-Ratte-FITC detektiert werden kann. In der Mock-Kontrolle und bei rVV m138 FSH ist keine Bindung zu detektieren.

Maus-Fc γ wird hingegen von *r138*UK und *r138* NL nicht gebunden. Dies ist in der Abbildung 17 A gezeigt. Demgegenüber ist der vFc γ R *m138* der Maus in der Lage sowohl Maus-Fc γ (Abbildung 17 C) als auch Ratten-Fc γ (Abbildung 17 B) zu binden.

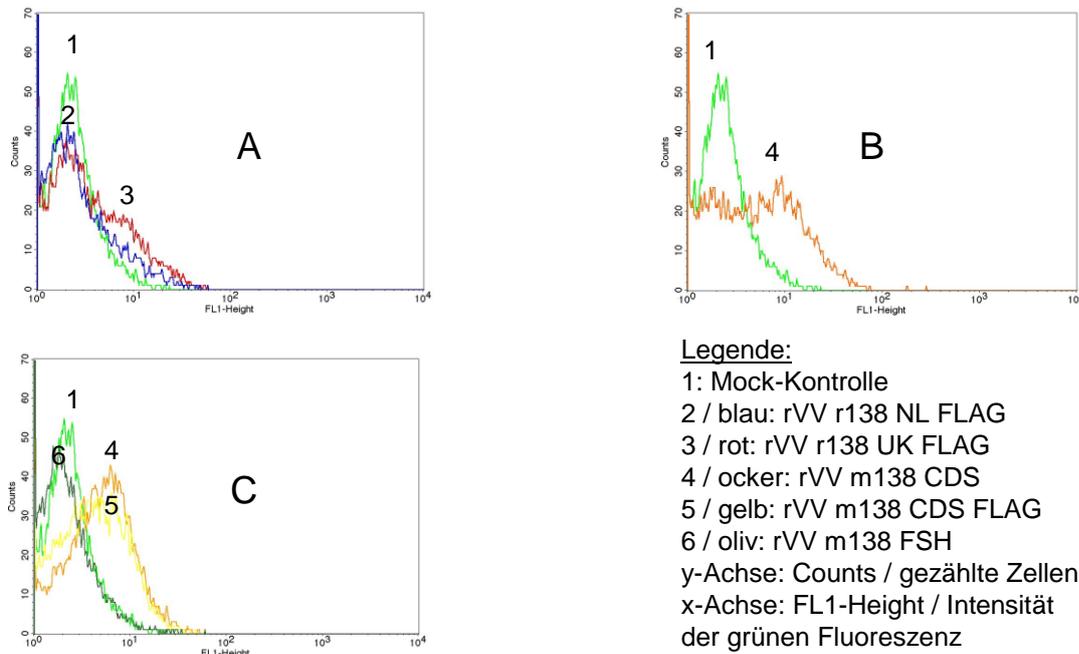


Abbildung 17: Spezifität der Homologen vFc γ R von RCMV und MCMV mit Ratten IgG und Maus-Fc γ Fragment auf CV 1 Zellen in der FACS Analyse:
 A: Die beiden Homologen der Ratte rVV r138 NL FLAG und rVV r138 UK FLAG zeigen, wie die Mock- Kontrolle, keine Bindung bei Färbung mit Maus-Fc γ -FITC.
 B: Der vFc γ R der Maus rVV m138 CDS bindet Ratten-Fc γ -Fragment, welches sekundär mit Anti-Ratte-FITC Antikörpern detektiert wurde.
 C: Der vFc γ R der Maus rVV m138 CDS und m138 CDS FLAG binden Maus-Fc γ -FITC, rVV m138 FSH, die Frameshiftmutante mit verändertem m138, bindet kein Maus Fc γ -FITC mehr.

Um Fc γ -bindende Proteine auch zu detektieren wenn sie ihre Fc γ -Bindungsfähigkeit teilweise oder ganz verloren haben, wurden die rVV r138 UK FLAG und r138 NL FLAG kloniert und in VV rekombiniert. Das Fc γ -bindende Protein wird dabei über anti-FLAG Antikörper erkannt (Expressionskontrolle). Der anti-FLAG Antikörper kann wiederum mit einem sekundären FITC gekoppeltem anti-Maus Antikörper im FACS detektiert werden. Abbildung 18 zeigt, dass der rVV r138 UK FLAG gut erkannt wird.

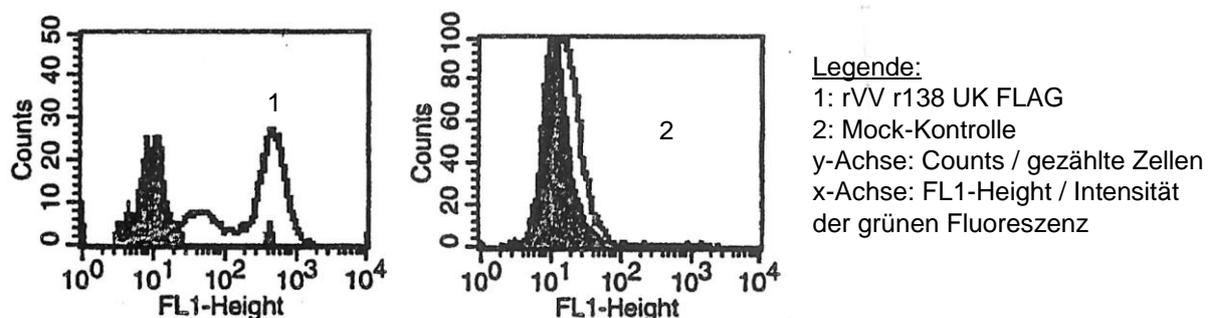
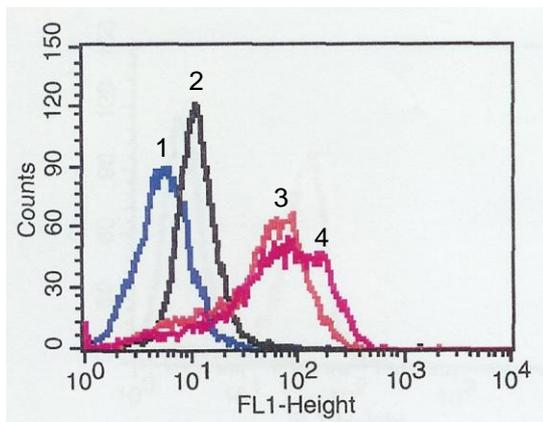


Abbildung 18: Expressionskontrolle von r138 UK im FACS mit einem FLAG-tag auf 3T3 Zellen. rVV r138 UK FLAG kann anti FLAG Antikörper binden, der sekundär mit anti Maus FITC detektiert wird.

Um die Expression des Proteins auch beim Maus $Fc\gamma$ -Rezeptor zeigen zu können, wurde der Vektor *m138* CDS FLAG kloniert. Eine Rekombination in das Vaccinia Virus gelang jedoch nicht. Deshalb wurden an dieser Stelle die Punktmutanten M2 FLAG und M4 FLAG (jeweils als rVV) zur Expressionskontrolle verwendet. Auch hier wird der FLAG-tag mit anti FLAG Antikörpern und sekundär mit FITC gekoppeltem anti Maus Antikörper detektiert. Abbildung 19 zeigt, dass der FLAG-tag bei beiden Punktmutanten gut erkannt wird.



Legende:

1: Mock-Kontrolle

2: VV Wildtyp

3: rVV M2 FLAG

4: rVV M4 FLAG

y-Achse: Counts / gezählte Zellen

x-Achse: FL1-H / Intensität der grünen Fluoreszenz

Abbildung 19: Expressionskontrolle im FACS mit einem FLAG-tag auf CV1 Zellen. rVV M2 FLAG und rVV M4 FLAG binden anti FLAG Antikörper, der sekundär mit anti Maus FITC detektiert wird.

Zusammenfassung:

MCMV $vFc\gamma R$ *m138* bindet erwartungsgemäß Maus IgG und Maus $Fc\gamma$ -Fragment.

MCMV $vFc\gamma R$ *m138* bindet Ratten IgG und Ratten Fc-Fragment.

Es wird erstmals nachgewiesen, dass es sich um $Fc\gamma$ -bindende Oberflächenrezeptoren handelt.

Bei $vFc\gamma R$ *m138* gibt es eine Kreuzbindung von Ratten und Maus $Fc\gamma$.

RCMV $vFc\gamma R$ *r138* UK und *r138* NL binden kein Maus IgG und kein Maus Fc-Fragment.

Die RCMV Homologe *r138* UK und *r138* NL binden Ratten IgG und Ratten $Fc\gamma$ -Fragment.

In der Expressionskontrolle via FLAG Konstrukt kann sowohl der $vFc\gamma R$ *m138* als auch die Homologen *r138* UK und *r138* NL nachgewiesen werden.

6.3 Punktmutation der putativen IgSF Domänen des viralen vFc γ R *m138* von MCMV

Die aus den vorangegangenen Untersuchungen entwickelte hypothetische Struktur der vFc γ R von MCMV und RCMV enthält drei IgSF-artige Domänen, C2-1, C2-2 und C2-3, die jeweils durch eine positionshomologe putative Disulfidbrücke in ihrer Struktur stabilisiert werden. Diese Disulfidbrücken werden von je 2 Cysteinen gebildet, die für die Ausbildung der IgSF-artigen Domänen und die Bindungsfähigkeit von Fc γ an den Rezeptor eine Voraussetzung darstellen könnten. Eine Zerstörung dieser Struktur durch gezielte Punktmutation sollte danach eine Veränderung oder den Verlust der Fc γ -Bindungsfähigkeit zur Folge haben.

Für den Austausch konservierter Cysteine des vFcR von MCMV mit Alanin wurden folgende Positionen ausgewählt:

1. C127 und C194 in der putativen IgSF Domäne C2-1 als Mutanten M1 und M2
2. C263 und C328 in der putativen IgSF Domäne C2-2 als Mutanten M3 und M4
3. C368 und C436 in der putativen IgSF Domäne C2-3 als Mutanten M5 und M6
4. C239 und C240 zwischen den putativen IgSF Domänen C2-1 und C2-2 als potentieller Bindungspartner anderer Cysteine als Mutante XM

Um zu zeigen dass die Fc-Bindungsfähigkeit von *m138* abhängt, wurden zwei Mutanten kloniert, bei der die Fc γ -Bindungsfähigkeit des vFcR nicht mehr vorhanden sein sollte. Dazu wurde an Position V15 eine Mutante mit einem Frameshift (FSH) erzeugt. Diese enthält weiterhin die komplette *m138* Gensequenz. Weiterhin wurde die Deletionsmutante FLANK erzeugt, die nur noch die beiden flankierenden Genregionen *m137* und *m139* enthält.

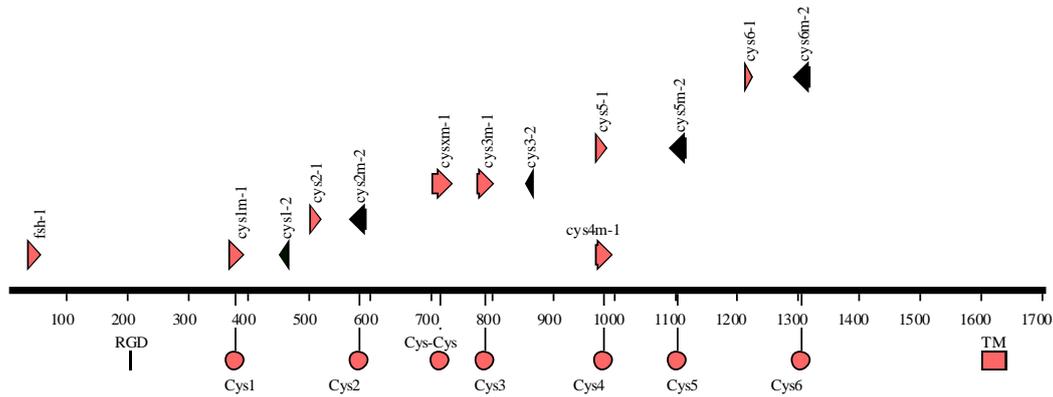


Abbildung 20: Die MCMV m138 Fc γ -Rezeptor Gensequenz mit den verschiedenen Mutationsprimern. Einzelheiten zu den verschiedenen Primern finden sich im Kapitel Material und Methoden (5.1.9)

Ziel der Punktmutationen war die Herstellung von rekombinanten MCMV Mutanten mit Punktmutationen in der FcR Sequenz, mit der perspektivisch die *m138*-Funktion *in vivo* untersucht werden kann.

6.3.1 PCR Mutagenese

Um die ausgewählten Punktmutationen in die *m138*-Sequenz einzubringen, wurden Mutageneseprimer (siehe Tabelle in Kapitel 5.1.9, Spalte „Primer1“, erkennbar am „m“) synthetisiert, bei denen das Codon für die Aminosäure Cystein durch ein Codon für Alanin ersetzt wurde. Mit einem weiteren Primer wurde eine erste PCR durchgeführt. Das entstandene PCR-Produkt wurde im Agarose-Gel überprüft, ausgeschnitten, aufgereinigt und dann in einer zweiten PCR als Primer („pre-primer“) verwendet. Die in dem erzeugten PCR-Produkt enthaltenen Restriktionsschnittstellen (siehe Tabelle in Kapitel 5.1.9) dienten dann zur Klonierung der PCR-Produkte mit den enthaltenen Punktmutationen in dem gewünschten Vektor. Als DNA - Matrize wurde DNA aus dem MCMV Wildtyp Stamm C3X verwendet.

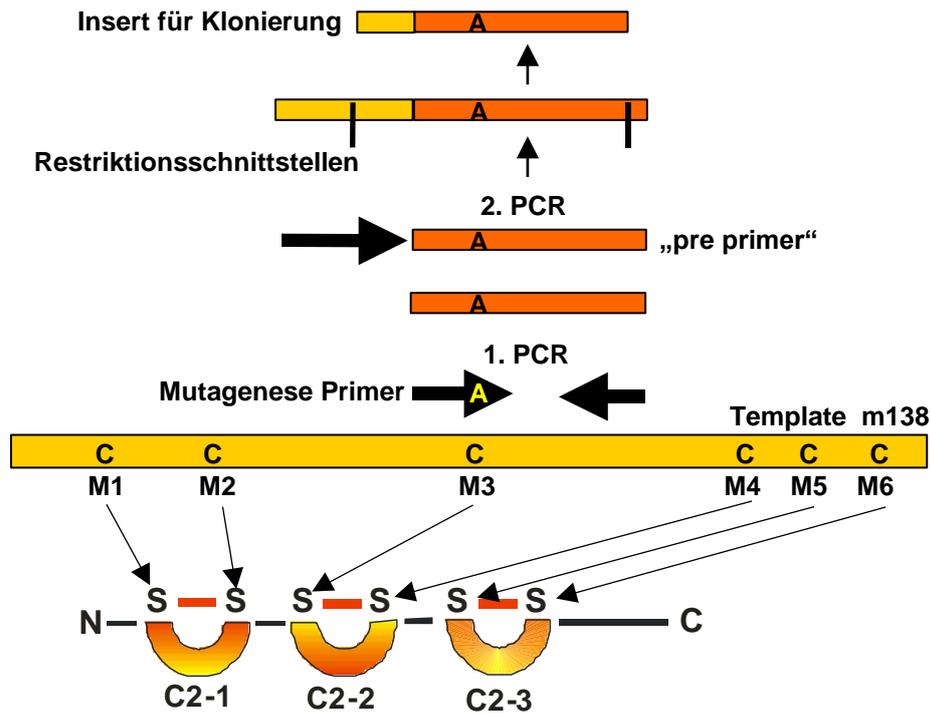


Abbildung 21: Schematischer Ablauf der PCR-Mutagenese mit Austausch von Cystein zu Alanin am Beispiel der Mutation M3. Dargestellt sind die DNA-Matrix m138 (MCMV Wildtype, Stamm C3X, C=Cystein), sowie die verwendeten Primer (A=Alanin) und die resultierenden Produkte. Im unteren Teil ein Modell des MCMV m138 F γ -Rezeptors mit den 3 IgSF-artigen Domänen, der Lokalisation der Punktmutationen und den Disulfidbrücken (rote Striche).

Tabelle 8 zeigt die verwendeten Primerpaare, das erhaltene Produkt und die enthaltenen Restriktionsschnittstellen für spätere Klonierungen. Alle PCR-Produkte wurden mit dem in Kapitel 3 beschriebenen Programm amplifiziert.

Primer 1	Primer 2	PCR – Produkt	Größe (bp)	Restriktionsschnittstellen	
				Klonierung	Kontrolle (Fragment- größe in bp)
ab-fcr-up1	ab-fcr-up2	3'-FLANK/UP	2000	<i>Kpn I + Xba I</i>	<i>EcoR V + Hind III</i> (4611+997+100)
ab-fcr-do1	ab-fcr-do2 / ab-fcr-do4	5'-FLANK / DOWN	2000	<i>Sph I + Xba I</i>	<i>Hind III + Kpn I</i> (3031+2651)
ab-fcr-cds1	ab-fcr-cds2	CDS	1700	<i>Sst I + Hind III</i>	Alle Vektoren pUC CDS Mx / XM / FSH mit <i>EcoR I + Bgl II</i> (3095+841+388)
cys1m-1	cys1-2	pre-primer 1	100	-	
pre-primer1	cys1-2	<i>m138 M1</i>	448	<i>Sst I + Xho I</i>	
cys2m2	cys2-1	pre-primer 2	97	-	
pre-primer2	cds2	<i>m138 M2</i>	1224	<i>Sma I + Hind III</i>	
cys3m-1	cys3-2	pre-primer 3	100	-	
pre-primer3	cds1	<i>m138 M3</i>	870	<i>Sst I + Sst II</i>	
cys4m-1	cds2	<i>m138 M4</i>	760	<i>Kpn I + Hind III</i>	
cys5m-2	cys5-1	pre-primer 5	200	-	
pre-primer5	cds2	<i>m138 M5</i>	700	<i>Sma I + Hind III</i>	
cys6m-2	cys6-1	pre-primer 6	100	-	
pre-primer6	cds2	<i>m138 M6</i>	500	<i>Bgl II + Hind III</i>	
cysxm-1	cys3-2	pre-primer XM	200	-	
pre-primerXM	cds1	<i>m138 XM</i>	870	<i>Sst I + Sst II</i>	
fsh1	cys1-2	<i>m138 FSH</i>	400	<i>Xho I + Nhe I</i>	

Tabelle 8

Um die erhaltenen PCR Produkte zu überprüfen, wurde der in Abbildung 22 gezeigte Kontroll-Restriktionsverdau mit den in Tabelle 8 angegebenen Enzymen durchgeführt. Nach Auftrennung im Agarose Gel kann Anhand der Größe der erhaltenen Fragmente die Korrektheit der PCR-Produkte kontrolliert werden. Die genauen Größenangaben nach Restriktionsverdau finden sich in Tabelle 8.

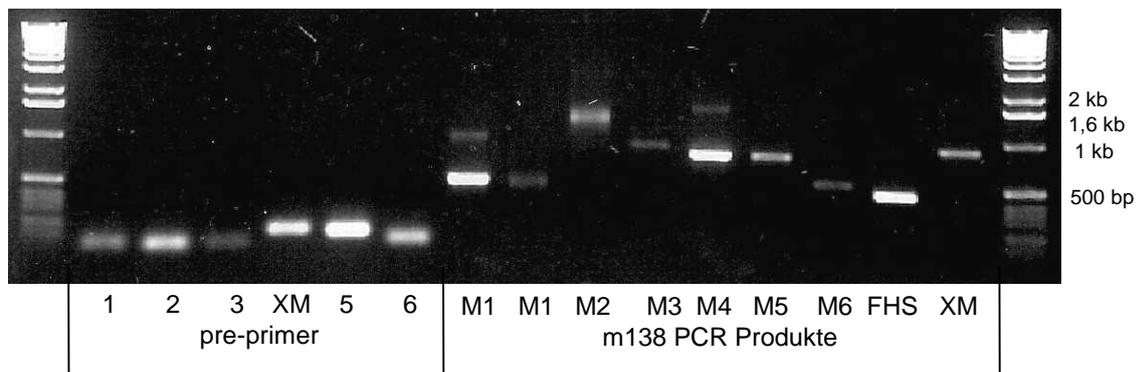


Abbildung 22: Die PCR Fragmente aus der PCR Mutagenese wurden im 1%igen TAE Agarose-Gel auf ihre richtige Größe überprüft. Die Größe der einzelnen Fragmente ist in Tabelle 8 aufgelistet.

6.3.2 Klonierung des Shuttle Vektors

Um die Punktmutationen in das MCMV Genom zu integrieren, war die Subklonierung in verschiedene Plasmide notwendig. Der im Kapitel Material und Methoden beschriebene grundlegende Ablauf war bei allen Klonierungsschritten gleich.

Die einzelnen Klonierungen wurden in verschiedene Schritte aufgeteilt und sind im Folgenden mit verwendetem Vektor, Insert und der zur Klonierung und Kontrolle verwendeten Restriktionsenzyme aufgelistet.

Die unter Kontrolle in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen den resultierenden Fragmentgrößen in Basenpaaren (bp) bzw. dem korrekten Bandenmuster nach dem Kontroll-Restriktionsverdau.

Als Abkürzungen wurden

- „UP“ für die 3' liegende homologe, *m138* flankierende Region,
- „DO“ für die 5' liegende homologe, *m138* flankierende Region,
- „CDS“ für die Fc-Rezeptor kodierende Sequenz *m138*,
- „Mx“ für die Punktmutanten M1 bis M6,

- „FSH“ für den Frameshift und
- „XM“ für die Mutation von 2 Cysteinen zwischen putativer IgSF Domäne C2-1 und C2-2 verwendet.

Die folgenden Klonierungsschritte sind in Abbildung 23 graphisch dargestellt.

Schritt 1: Die Klonierung der verschiedenen PCR Produkte in den pUC19 Vektor (pUC 3' / UP, pUC 5' / DO, pUC CDS Mx, pUC XM, pUC FSH)

Die PCR Produkte wurden zuerst im TAE Gel aufgereinigt, ausgeschnitten und eluiert.

Vektor: pUC19

Insert: PCR Produkte der Tabelle

Restriktionsenzyme: Siehe Tabelle PCR-Mutagenese

Kontrolle: Siehe Tabelle PCR-Mutagenese

Schritt 2: Das Erzeugen des Basisvektors pUC FLANK, der die flankierenden Sequenzen von *m138* enthält.

Vektor: pUC UP

Insert: pUC DO

Restriktionsenzyme: *Sph I* und *Xba I* (sticky end)

Kontrolle: *Sst I* und *EcoR I* (5595bp+1617bp+1041bp+441bp+10bp)

Schritt 3: Das Erzeugen der Vektoren pUC FcR Mx, pUC FcR XM, pUC FcR FSH, der die *m138* kodierende Gensequenz mit den jeweiligen Punktmutationen, sowie den Frameshift mit den 3'- und 5'- flankierenden Regionen der *m138* Gensequenz verbindet.

Vektor: pUC FLANK

Insert: pUC CDS Mx, pUC XM, pUC FSH

Restriktionsenzyme: *Nhe I* und *SnaB I* (sticky end)

Kontrolle: *Bgl II* und *EcoR I* (6128bp+1971bp+969bp+841bp+451bp)

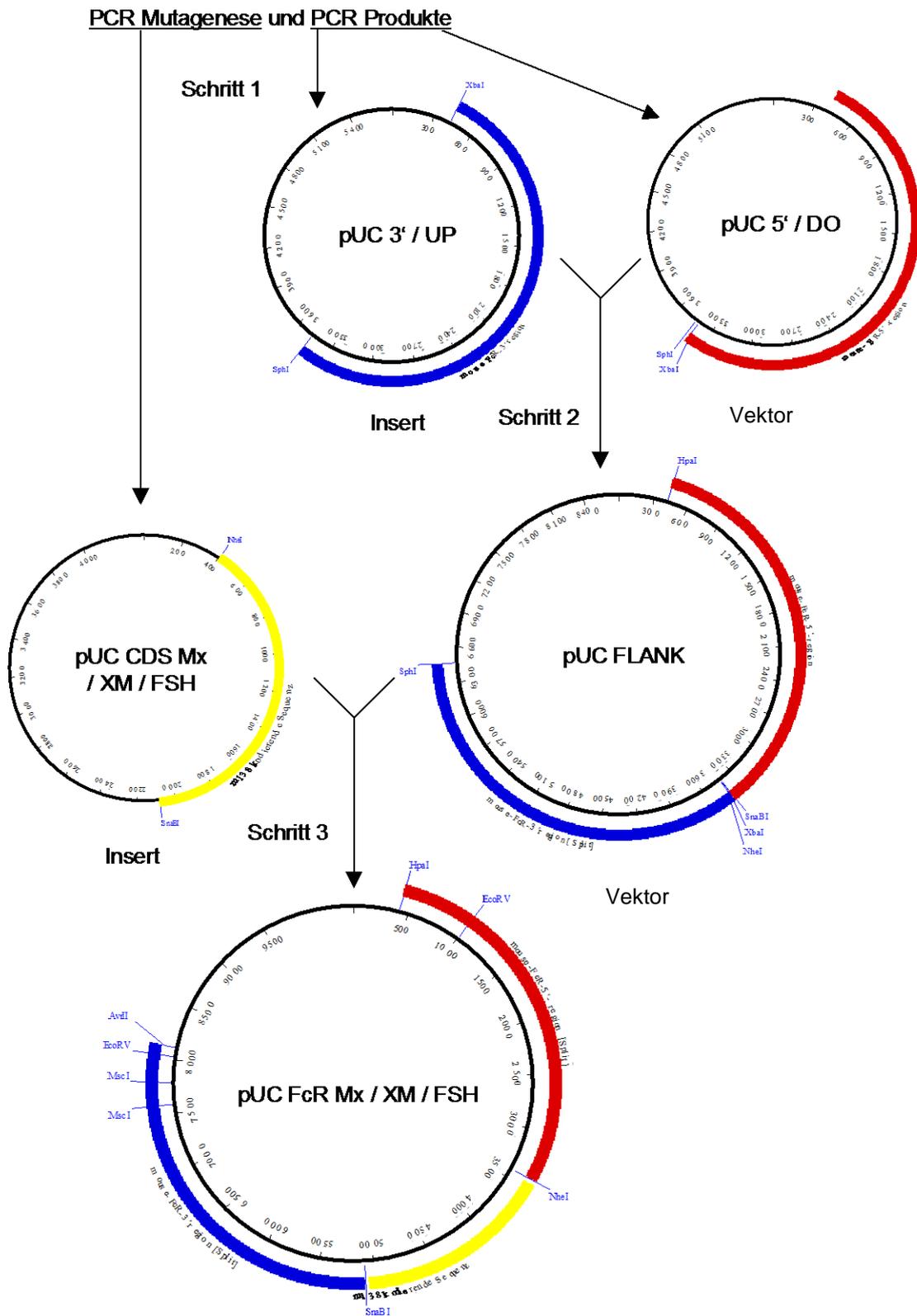


Abbildung 23: Klonierung der Vektoren: Schritt 1, Schritt 2 und Schritt 3
 gelb: m138 kodierende Sequenz mit den verschiedenen Punktmutationen,
 blau: 3' flankierende Sequenzen, rot: 5' flankierende Sequenzen

Die folgenden Klonierungsschritte sind in Abbildung 24 graphisch dargestellt.

Schritt 4a/b: Die Klonierung des Shuttle Plasmids pST76KSR FcR Mx / XM / FSH (4a) für die BAC Mutagenese sowie die Erzeugung der rekombinanten MCMV (rMCMV) Punktmutanten und die Klonierung des Shuttle Plasmids pST76KSR FLANK (4b) für die BAC Mutagenese und Erzeugung der rMCMV *m138* Deletionsmutante.

Vektor: pST76KSR

Insert: pUC FcR Mx / XM / FSH (4a) und pUC FLANK (4b)

Restriktionsenzyme: *Msc I* und *EcoR V* (blunt end). Der Vektor pST76KSR wurde nach dem Restriktionsverdau mit alkalischer Phosphatase (CIP) behandelt.

Um die Korrektheit der erhaltenen Plasmide zu überprüfen, wurden folgende Kontrollen durchgeführt.

Kontrolle pST76KSR FcR Mx / XM / FSH: *EcoR I*,

Orientierung 3'→5' (4160bp+3815bp+3235bp+1676bp),

Orientierung 5'→3' (4260bp+4160bp+2790bp+1676bp)

Kontrolle pST76KSR FLANK: *Pst I*,

Orientierung 3'→5' (4954bp+4628bp+956bp+692bp),

Orientierung 5'→3' (4954bp+4929bp+956bp+391bp)

Die Abbildung 24 zeigt beispielhaft das Agarose-Gel für die Shuttle Plasmide mit den Punktmutationen M1, M2 und M3.

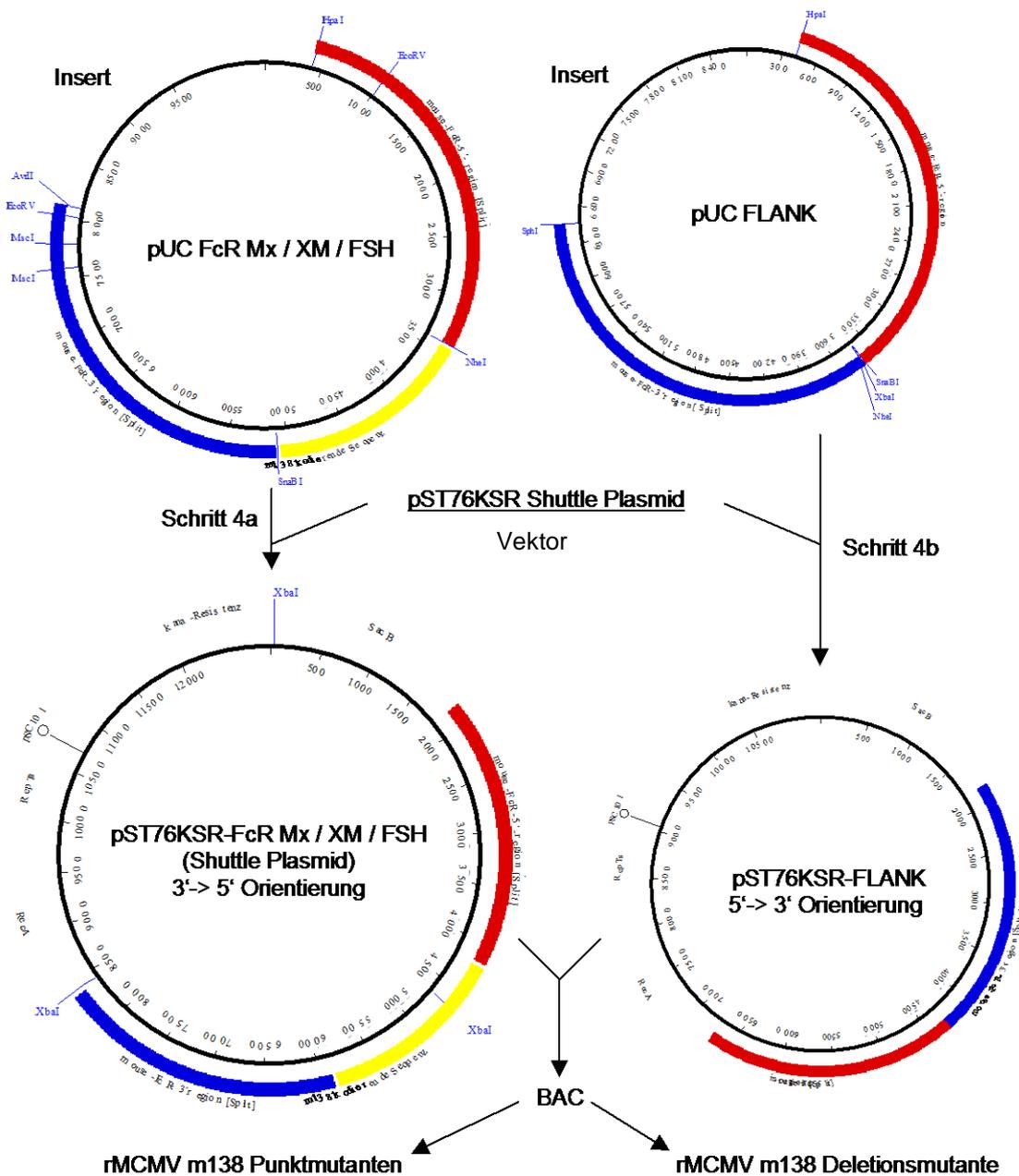


Abbildung 24: Klonierung der Vektoren: Schritt 4a und 4b, Klonierung der Shuttle Vektoren für die BAC-Mutagenese, der BAC dient zur späteren Herstellung von rekombinantem MCMV (rMCMV). Da es in der m138 Region eine Xba Schnittstelle gibt, ist eine frühere Klonierung von m138 in das Shuttle Plasmid nicht möglich. gelb: m138 kodierende Sequenz mit den verschiedenen Punktmutationen, blau: 3' flankierende Sequenzen, rot 5' flankierende Sequenzen.

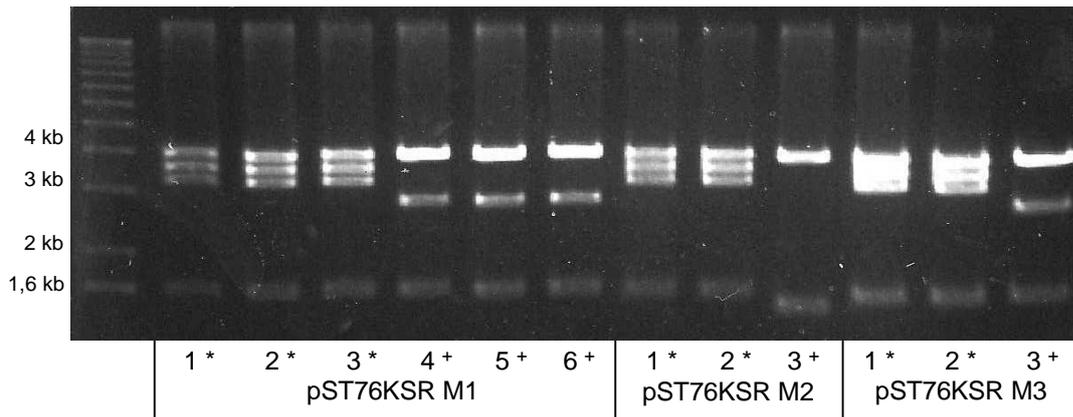


Abbildung 25: Kontrolle der verschiedene Orientierungen und der Korrektheit des Shuttle Plasmids pST76KSR am Beispiel der Punktmutationen M1, M2 und M3 im 1%igem TAE Agarose-Gel. Die Plasmide mit * enthalten die m138 Region mit den flankierenden Sequenzen in 3' -> 5' Orientierung. Nach *EcoR* / Restriktionsverdau ergeben sich folgende Fragmentgrößen: 4160 + 3815 + 3235 + 1676 bp. Die Plasmide mit + enthalten die m138 Region mit den flankierenden Sequenzen in 5' -> 3' Orientierung. Nach *EcoR* / Restriktionsverdau ergeben sich folgende Fragmentgrößen: 4260 + 4160 + 2790 + 1676 bp. Beim Shuttle Plasmid pST76KSR M2 / 3 + konnten nicht alle Banden nachgewiesen werden, weshalb dieser aussortiert wurde.

Der folgenden Klonierungsschritte ist in Abbildung 26 graphisch dargestellt.

Schritt 5: Klonieren der kodierenden Sequenzen in den Vektor p7.5k CDS. Dieser enthält die *m138* Sequenz mit den Punktmutationen sowie zusätzlich einen FLAG -Tag und dient zum Herstellen von rekombinanten Vaccinia Viren.

Vektor: p7.5k131

Insert: PCR-Produkte aus folgenden Primerpaaren:

1. ab-fcr-cdsBam und ab-fcr-cdsHind
2. ab-fshBam und ab-fcr-cdsHind (für die Frameshift-Mutante)
3. ab-fcr-cdsBam und ab-fcr-flagHind
4. ab-fshBam und ab-fcr-flagHind (für die Frameshift-Mutante)

Die Primer ab-fcr-cdsBam und ab-fcr-cdsHind dienen der Einführung von Restriktionsschnittstellen für eine einfachere Klonierung. Mit dem Primer ab-fcr-flagHind war es möglich, zusätzlich einen FLAG Tag in die verschiedenen Mutanten einzubringen.

Als Template wurden die Vektoren pUC CDS Mx, pUC XM, und pUC FSH genutzt.

Restriktionsenzyme: *BamH I* und *Hind III* (*sticky end*)

Kontrolle: *EcoR I* und *BamH I* (4155bp+1347bp+414bp)

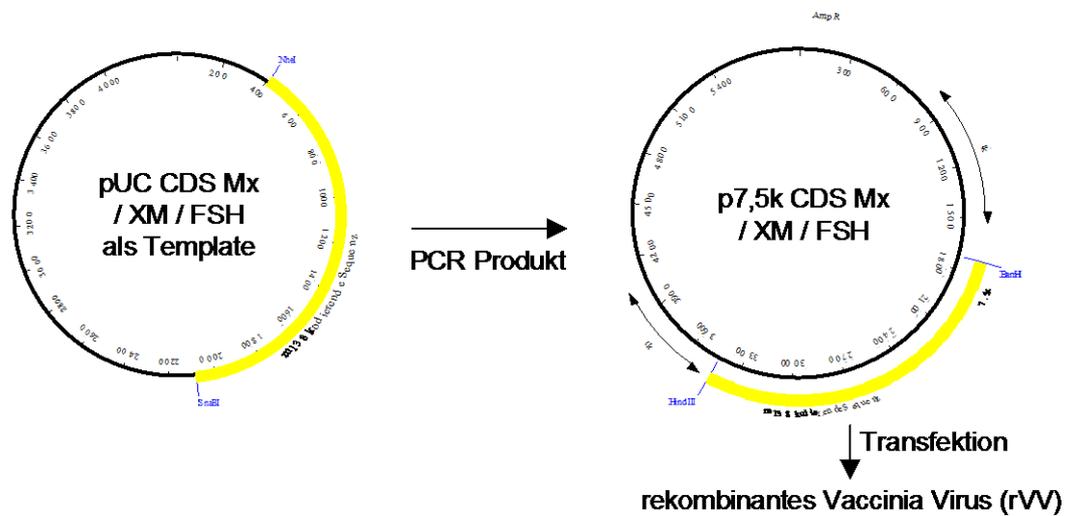


Abbildung 26: Klonierung der Vektoren: Schritt 5, Klonierung der Punktmutationen in den P7.5k131 Vektor für die Herstellung von rekombinantem Vaccinia Virus (rVV)

6.3.3 BACmid Mutagenese

Der schematische Ablauf findet sich in Abbildung 27. Die verschiedenen Punktmutationen wurden durch gerichtete, homologe Rekombination des MCMV Wildtyp BACmid (MW97.01) in *E.coli* mit einem Shuttle Plasmid in das MCMV Genom integriert. Dieses Shuttle Plasmid (pST76KSR) enthält die MCMV *m138* Punktmutationen und ist von jeweils ca. 2-3kb großen homologen Sequenzen flankiert. Weiterhin sind eine Kanamycin Resistenz zur Selektion, das *SacB* Gen für die Sucrose Selektion, das *recA* Gen für Ermöglichung homologer Rekombination in *recA* negativen Bakterien (wie die verwendeten *E.coli* DH10b) und das *rep-ts* Gen für die temperaturabhängige Selektion bei 43°C enthalten.

Eine Voraussetzung für eine erfolgreiche BAC Mutagenese ist das Klonieren eines Shuttle Plasmids. (Siehe Kapitel 4.2.1) Zunächst wurden *E.coli*, die den MCMV Wildtyp BAC und *E.coli* mit dem MCMV BAC ohne *m138* Sequenz ($\Delta m138$ -BACmide) tragen, kompetent gemacht, um eine Transformation mit dem Shuttle Plasmid zu ermöglichen.

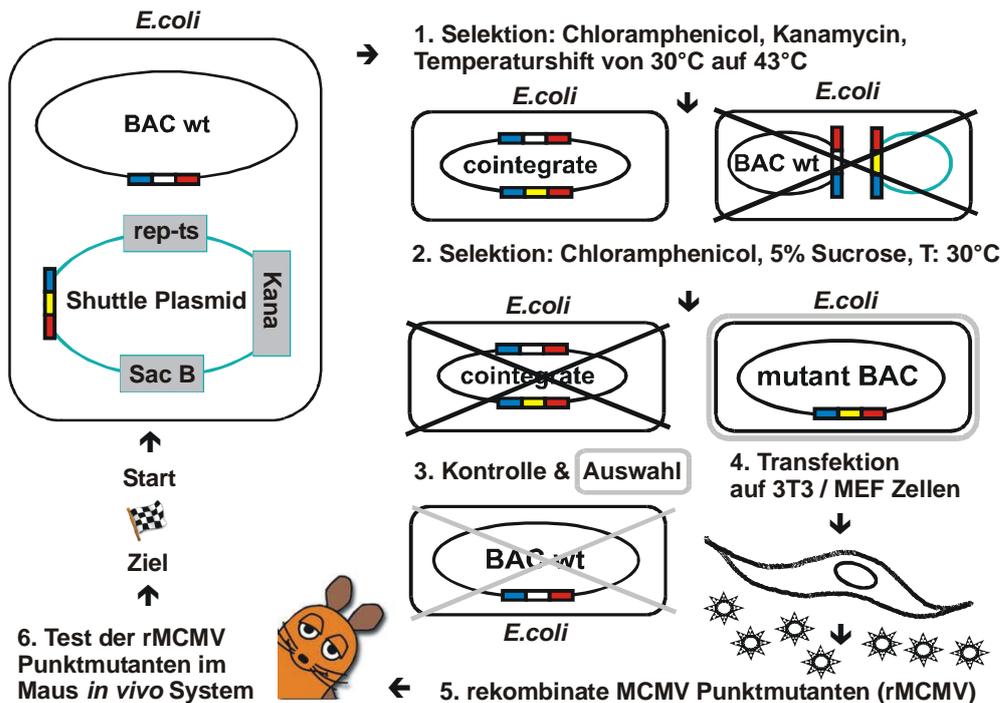


Abbildung 27: Schematischer Ablauf der BACmid Mutagenese

Nach der elektrischen oder chemischen Transformation enthält der *E.coli* nun den MCMV Wildtyp BAC (wt-BACmid) oder das $\Delta m138$ -BACmid, sowie das Shuttle Plasmid mit der gewünschten Punktmutation. Da das $\Delta m138$ -BACmid einfachere Kontrollen durch Restriktionsverdau erlaubt, wurden alle *m138* Punktmutanten damit transformiert. Die im BACmid enthaltenen flankierenden Sequenzen ermöglichen nun eine homologe Rekombination und es entstehen mutierte BACmide. Um die gewünschten, mutierten BACmide zu erhalten sind spezifische Selektionsschritte notwendig (siehe Kapitel 5.2.2.12). Der erste Selektionsschritt erfolgt bei 43°C mit Chloramphenicol (30 $\mu\text{g/ml}$) und Kanamycin (30 $\mu\text{g/ml}$). Dabei werden *E.colis*, die getrennt Shuttle Plasmid und wt-BACmid enthalten, eliminiert. Es bleiben wt-BACmid mit sogenanntem cointegrate erhalten. Diese enthalten in einem großen Plasmid wt-BACmid und Shuttle Plasmid. Im folgenden zweiten Selektionsschritt bei 30°C mit Sucrose (5%) und Chloramphenicol werden die cointegrate eliminiert und es resultieren nur noch zwei Bakterienpopulationen die entweder das gewünschte, mutierte BACmid oder das wt-BACmid enthalten. Das Verhältnis dieser beiden Populationen beträgt zu diesem Zeitpunkt ungefähr 50:50. Zwischen den einzelnen Arbeitsschritten und am Ende wurden jeweils 12 Klone gepickt, Übernachtskulturen angelegt und die BACmid-DNA isoliert. Mit einem Restriktionsverdau (*HindIII*) wurde die gewonnene BACmid-DNA

kontrolliert und dazu in 0,5%igem TBE Agarose-Gel aufgetrennt (Abbildung 28). Die richtigen Klone wurden ausgewählt und eine Maxi Übernachtkultur angesetzt. Die daraus isolierte DNA wurde dann zur Rekonstitution von MCMV eingesetzt.

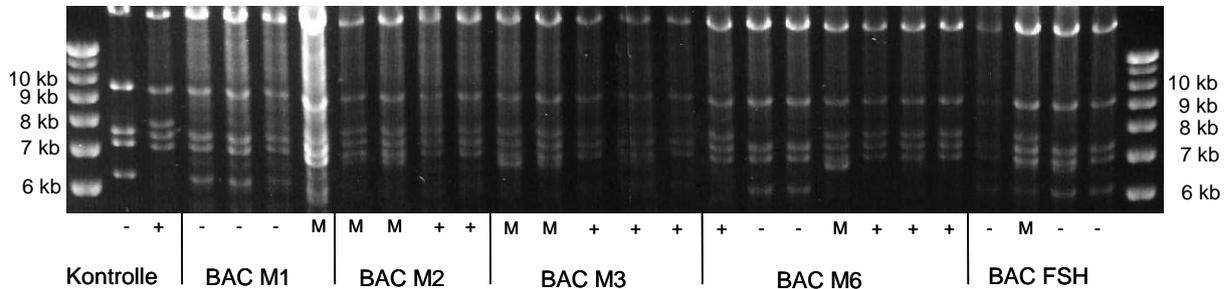


Abbildung 28: Kontrolle der BACs im 0,5%igem TBE Agarose-Gel, *Hind III* Restriktionsverdau. Die Spuren mit – enthalten ein BACmid ohne m138 und wurden nicht weiterverwendet. (sichtbare Fragmente: 6248bp+7161bp+7559bp+9482bp)
Die Spuren mit + enthalten ein BACmid mit integriertem m138 und können für die MCMV Rekonstitution eingesetzt werden. (sichtbare Fragmente: 7161bp+7559bp+7958bp+9482bp)
Die Spuren mit M enthalten beide BACmide und wurden nicht weiterverwendet.

6.3.4 Rekonstitution rekombinanter MCMV

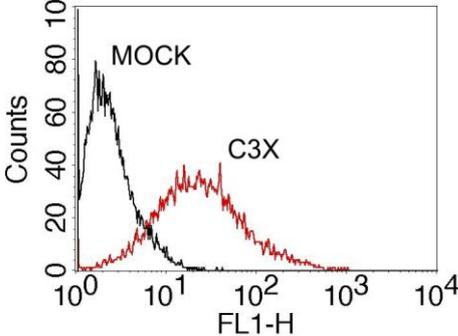
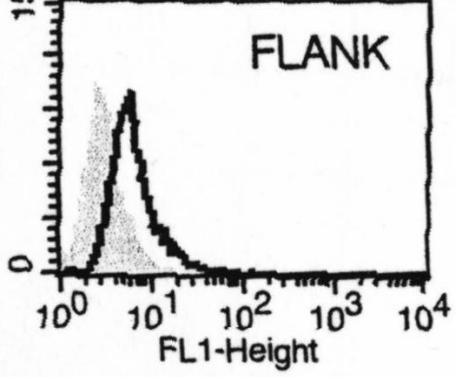
MCMV

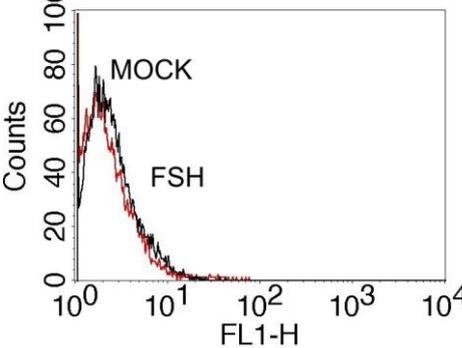
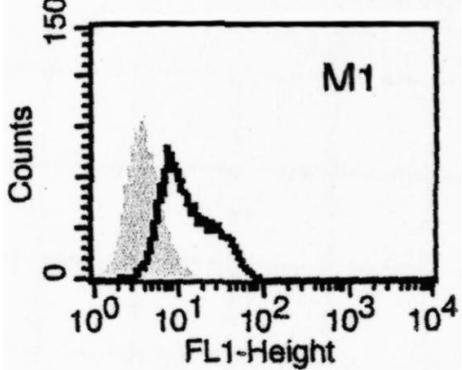
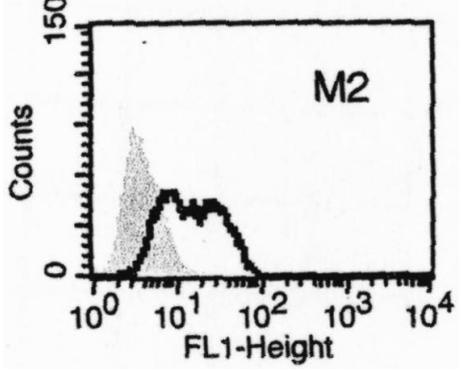
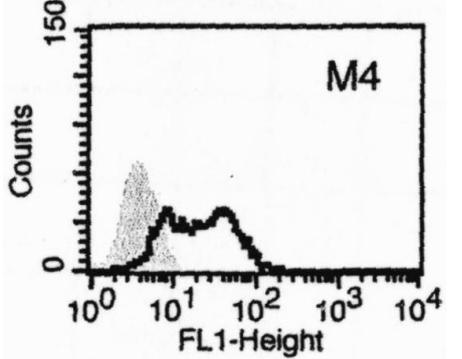
Die gewonnene BACmid-DNA mit der Punktmutation wurde in permissive 3T3 Fibroblasten transfiziert. (Siehe Kapitel Material und Methoden: Transfektion von BACmid-DNA in eukaryotische Zellen) Es besteht so die Möglichkeit rekombinantes MCMV (rMCMV) zu generieren. Nach erfolgreicher Rekonstitution wurden die rMCMV 7x passagiert, um die BAC-Sequenz aus dem Virus zu entfernen (Wagner, Jonjic et al. 1999). Um sicher zu stellen, dass die eingefügten Punktmutationen weiterhin korrekt vorhanden sind, wurde bei allen Mutanten der zentrale Teil des *m138* via PCR amplifiziert und danach sequenziert. Es zeigte sich das die DNA-Sequenzen auch im BACmid korrekt sind.

6.4 Funktionsanalyse der vFc γ R *m138* Mutanten

6.4.1 Durchflusszytometrie (FACS)

Um die *m138* - Expression und Fc γ -Bindungsfähigkeit der verschiedenen Fc γ -Rezeptor-Mutanten zu testen, wurden FACS Analysen durchgeführt. Dazu wurden Zellen mit den rVV *m138* Punktmutanten und den rMCMV *m138* Punktmutanten infiziert und die viralen Fc γ -Rezeptoren exprimiert. Einige rVV *m138* Punktmutanten wurden mit einem FLAG-tag versehen, was eine Detektion des Proteins über FLAG - spezifische Antikörper erlaubt, auch wenn der Fc γ -Rezeptor seine Fc γ -Bindungsfähigkeit teilweise oder ganz verloren hat. Tabelle 9 zeigt die Bindungseigenschaften der Fc γ -Rezeptor Punktmutanten in der FACS-Analyse auf der Zelloberfläche mittels FITC-markiertem Fc γ -Fragment.

Virus / Mutante	Fc γ -Bindung Zelloberfläche	Histogramm
<i>m138</i> Wildtyp (MCMV C3x)	positiv mean peak / mittlere Fluoreszenz: 42	
FLANK (rVV&MCMV)	negativ mean peak / mittlere Fluoreszenz: 7	

Virus / Mutante	Fc γ -Bindung Zelloberfläche	Histogramm
FSH (rMCMV)	negativ mean peak / mittlere Fluoreszenz: 3,7	
M1(rVV, rMCMV)	schwach mean peak / mittlere Fluoreszenz: 8	
M2 (rMCMV)	positiv mean peak / mittlere Fluoreszenz: 28	
M3	nicht untersucht	Rekonstitution der Mutante als rVV nicht erfolgreich, im rMCMV nicht im FACS untersucht.
M4 (rVV, rMCMV)	positiv mean peak / mittlere Fluoreszenz: 45	

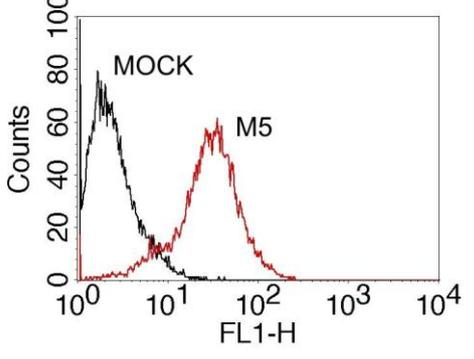
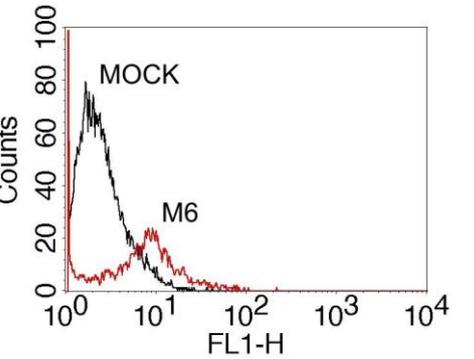
Virus / Mutante	Fc γ -Bindung Zelloberfläche	Histogramm
M5 (rMCMV)	positiv mean peak / mittlere Fluoreszenz: 38	
M6 (rMCMV)	schwach mean peak / mittlere Fluoreszenz: 9	

Tabelle 9

Erwartungsgemäß zeigt der MCMV Wildtyp im FACS eine gute Fc γ -Bindung, während sich bei der Deletionsmutante FLANK und bei der Frameshiftmutante keine Bindung zeigt. Bei den Punktmutanten zeigt sich ein uneinheitliches Bild. M1 und M6 binden nur in sehr geringem Maß Fc γ , M2 zeigte eine intermediäre Bindung mit verminderter Oberflächenfluoreszenz, bei M4 und M5 ist die Fc γ -Bindung mit dem Wildtyp vergleichbar. Somit zeigen nur Punktmutanten der Domänen C2-1 und C2-3 eine Verminderung der Fc γ -Bindungsfähigkeit im FACS.

6.4.2 Immunpräzipitation

Weiterhin wurde die Fc γ -Bindungsfähigkeit der verschiedenen Punktmutanten von *m138* mit Hilfe der Immunpräzipitation getestet. Dazu wurde der mit ³⁵S-Cystein / Methionin radioaktiv markierte Fc γ -Rezeptor nach Fc γ -Präzipitation mit Protein-A-Sepharose im SDS-PAGE aufgetrennt. Eine genaue Beschreibung des Experimentes findet sich im Teil Material und Methoden auf Seite 56.

Dabei zeigt sich das die rMCMV Deletionsmutante FLANK, bei der die komplette kodierende Sequenz für *m138* fehlt und die Punktmutante FSH, bei der nach einem Frameshift kein normales *m138* mehr vorhanden ist, erwartungsgemäß kein Maus Fc γ -Fragment binden (Abbildung 29).

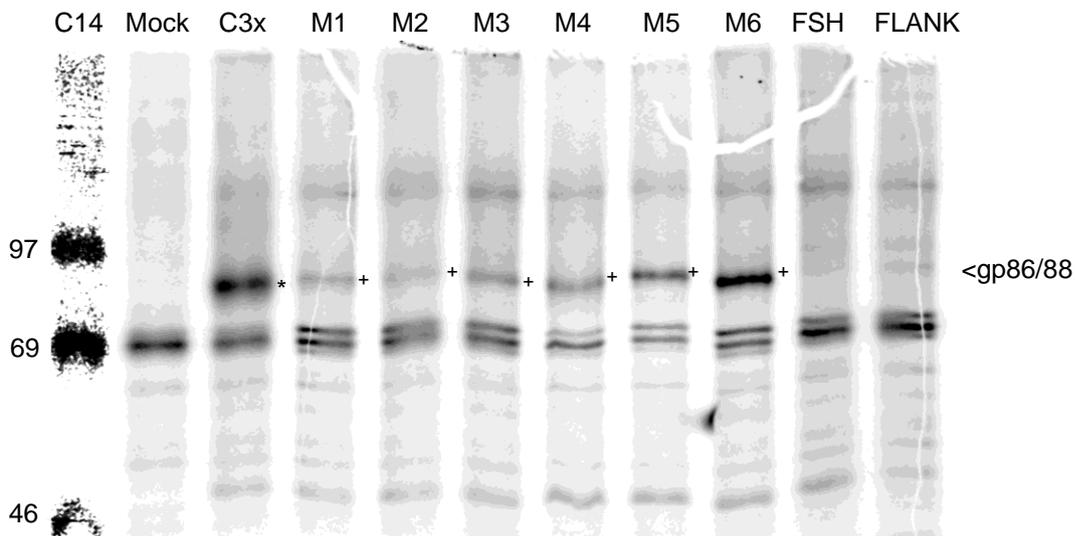


Abbildung 29: Immunpräzipitation mit Maus Fc γ -Fragment im SDS-Gel auf 3T3 Zellen. Verwendet wurden die Punktmutanten rMCMV M1 bis M6, die Frameshiftmutante FSH, die Deletionsmutante FLANK und der MCMV Wildtyp C3x. Die stärkste Fc γ Bindung (*) ist bei MCMV Wildtyp zu erkennen, die Punktmutanten binden in verschiedener Stärke (+) ebenfalls Fc. In der Mock-Kontrolle, bei FSH und FLANK ist keine Fc γ -Bindung zu beobachten.

Bei allen Punktmutanten M1 bis M6 ist eine Bindung von Fc γ -Fragment nachweisbar. Allerdings variiert die Bindungsstärke zwischen den einzelnen Punktmutanten. Bei M1 und M2 zeigt sich eine schwache Bindung bei M3, M4, M5 eine etwas stärkere und bei M6 eine ähnliche Bindung wie bei MCMV Wildtyp.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus dem FACS binden auch hier M1 und M2 und damit die C2-1 Domäne am wenigsten Fc γ . Somit scheint diese Domäne die wichtigste Rolle für die Fc γ -Bindung zu spielen. Da bei M5 eine starke und bei M6 eine Wildtyp-ähnliche Fc γ -Bindung vorliegt, scheint dagegen die C2-3 Domäne bei der Fc γ -Bindung eher keine Rolle zu spielen. Auch im FACS wurde bei M5 eine wildtypähnliche Oberflächenbindung von Fc γ -Fragment beobachtet. Im Gegensatz dazu zeigte M6 kaum eine nachweisbare Oberflächenbindung von Fc γ . Eine Erklärung für diese Beobachtung könnte eine unterschiedliche Oberflächenexpression bei den

verschiedenen Punktmutanten sein, was bei M6 eine verminderte Fc γ -Bindungsfähigkeit zur Folge haben könnte.

Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die C2-1 Domäne den stärksten Einfluss auf die Fc γ -Bindung hat, während die Domänen C2-2 und C2-3 eher eine untergeordnete Bedeutung zu haben scheinen.

Allerdings lässt sich bei keiner der Punktmutanten ein völliger Verlust der Fc γ -Bindung feststellen. Dies spricht dafür, dass der vFc γ R *m138* offensichtlich auch ohne das Vorhandensein der mutagenisierten Disulfidbrücken eine stabile Struktur ausbilden kann, oder aber die beschriebenen Disulfidbrücken doch keine essentielle Struktur für den vFc γ R *m138* sind bzw. eine alternative Struktur vorliegt.

Zusammenfassung:

MCMV vFc γ R *m138* bindet im FACS und der IP erwartungsgemäß Maus Fc γ -Fragment.

Die Deletionsmutante rMCMV FLANK und die Punktmutante mit Frameshift rMCMV FSH binden im FACS und der IP erwartungsgemäß kein Maus Fc γ -Fragment.

Punktmutante M1 bindet in FACS und IP schwach Maus Fc γ .

Punktmutante M2 bindet in FACS und IP schwach Maus Fc γ .

-> C2-1 Domäne mit stärkstem Einfluß auf Fc γ -Bindung.

Punktmutante M3 bindet in der IP Maus Fc γ .

Punktmutante M4 bindet in FACS und IP Maus Fc γ .

-> C2-2 Domäne mit geringem Einfluß auf Fc γ -Bindung.

Punktmutante M5 bindet in FACS und IP Maus Fc γ .

Punktmutante M6 bindet in FACS und IP Maus Fc γ , im FACS aber deutlich schlechter.

-> C2-3 Domäne ohne eindeutigen Einfluß auf Fc γ -Bindung.

Ein kompletter Verlust der Fc γ -Bindungsfähigkeit nach Punktmutation kann für die Frameshift-Punktmutante gezeigt werden. Bei den Punktmutationen M1 bis M6 ändert sich die der Fc γ -Bindungsfähigkeit in verschiedenen Stufen, ein kompletter Verlust der Bindungsfähigkeit wird nicht erreicht.

7 Diskussion

Fc γ -bindende Eigenschaften von CMV infizierten Zellen wurden erstmals 1975 von Furukawa beschrieben (Furukawa, Hornberger et al. 1975). Die erste Hypothese besagte, dass durch eine CMV Infektion zelluläre Gene induziert werden und somit auch ein zellulärer Fc γ -Rezeptor exprimiert wird, der für die beobachtet Fc γ -Bindung verantwortlich ist.

1994 beschrieben Thäle und Mitarbeiter (Thäle, Lucin et al. 1994) erstmals den viralen, von MCMV codierten Fc γ -Rezeptor *fcr-1*. Das verantwortliche Gen *fcr-1/m138* kodiert für 3 „early“ Glykoproteine mit einer molekularen Masse von 86 kDa, 88 kDa und 105 kDa. Bei Deglykosylierung mit Endoglykosidase F erhält man ein Protein mit einer Größe von 64 kDa. Die kodierende Genregion ist im *HindIII J* Fragment von MCMV lokalisiert. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Bindung an diesen Rezeptor nur über den Fc-Teil und nicht über den F(ab)₂-Teil von IgG funktioniert. Es wurden keine signifikanten Homologien zu den FcR der α -Herpesviren (HSV und VZV) gefunden. Ähnlichkeiten mit dem gE Protein von HSV und dem gE Protein von VZV wurden wegen ähnlicher Größenverhältnisse vermutet.

Crnkovic-Mertens et al (Crnkovic-Mertens, Messerle et al. 1998) konnte bei einer MCMV FcR Deletionsmutante eine stark attenuierte Replikation *in vivo* zeigen, welche allerdings unabhängig von der Anwesenheit von Antikörpern auftrat. Es wurden keine signifikanten Homologien zu den FcR der α -Herpesviren (HSV und VZV) gefunden.

Vermutet wurde, dass *fcr-1* ein Mediator bei der Virustransmission in verschiedenen Geweben sein könnte. Auch wenn die eigentliche Funktion noch unklar blieb, konnte davon ausgegangen werden, dass *fcr-1* eine sehr wesentliche Bedeutung für die Virulenz von MCMV besitzt.

Bei meinen Untersuchungen habe ich festgestellt, dass die *m138* kodierte Proteinsequenz signifikante Homologien mit zellulären Fc γ -Rezeptoren und den beiden vFc γ R von RCMV (*r138*) hat. Aus den Sequenzvergleichen wurde daher nun ein Strukturmodell für *m138* entwickelt. Dabei wurde versucht, Strukturelemente zu finden, die durch gezielte Mutation weitere Aufschlüsse über die Funktion und die Fc γ -Bindung von *m138* geben. Da *m138* zu den Typ1 Glykoproteinen gezählt wird, ergab sich der Gedanke die Struktur der einzelnen IgSF Domänen zu verändern, um so etwas über die

Fc γ -Bindung zu erfahren. Bei den verschiedenen eingefügten Punktmutationen ergaben sich hinsichtlich ihrer Fc γ -bindenden Eigenschaften keine einheitlichen Ergebnisse. So kann die Punktmutante M1 im FACS Fc γ nur noch schwach binden und zeigt in der IP ebenfalls eine reduzierte Bindungsfähigkeit. Die Punktmutante M2 bindet in FACS und IP Fc γ , wobei sich auch hier eine etwas verminderte Bindungsfähigkeit zu zeigen scheint. Die Punktmutanten M4 und M5 zeigen eine deutliche Fc γ -Bindung in FACS und IP, M6 zeigt im FACS eine schwache Fc γ -Bindung in der IP eine sehr gute Fc γ -Bindung. Da sich in FACS und IP nur bei M1 eine relative Verminderung der Fc γ Bindungsfähigkeit zeigen lässt, bestand die Vermutung, dass die C2-1 Domäne den wichtigsten Anteil an der Fc γ -Bindung besitzt. Um dies genauer zu überprüfen, wären verschiedene Kombinationen von Punktmutanten, oder die Deletion ganzer IgSF Domänen notwendig gewesen. In der Fortführung meines Projektes wurden die verschiedenen Domänen komplett deletiert (Lenac, Budt et al. 2006)

Bei der Analyse dieser Mutanten stellte sich heraus, dass die C2-1 Domäne alleine Fc γ -Bindung vermittelt und für diese Funktion essentiell ist (M. Budt, unveröffentlichte Daten). Die Homologien zu *r138* lassen einen parallelen Aufbau bei *r138* vermuten, was allerdings noch genauer zu untersuchen wäre.

7.1 Struktur des vFc γ R *m138*

Neue mathematische Algorithmen (PSIPRED) von schon kristallisierten zellulären Fc γ -Rezeptoren und der Vergleich verschiedener Fc γ -Rezeptoren untereinander, deuten auf eine von 3 IgSF-artigen Domänen gebildete Grundstruktur von *m138* hin. Jede dieser IgSF Domänen wird von β -Faltblatt-Strukturen gebildet, die stabil und durch seitliche „loops“ in gewissem Maße variabel sind. Dabei ist die Variabilität aber deutlich geringer als z.B. bei alpha-Helices.

Der virale Fc γ R *m138* hat im Gegensatz zum zellulären CD64 einen anderen topologischen Aufbau. Bei CD64 sind die C2-1 und die C2-2 Domäne für die niedrigaffine Fc γ -Bindung verantwortlich, die C2-3 Domäne dagegen für die hochaffine Bindung von IgG an den Rezeptor. Auch wenn *m138* ebenfalls aus 3 IgSF Domänen besteht, so zeigen die vorhandenen Daten, dass die C2-1 Domäne für die Fc γ -bindung hinreichend ist. Die in dieser Arbeit beschriebenen Punktmutationen zeigten nur einen

teilweisen $Fc\gamma$ -Bindungsverlust. Dies könnte für eine besondere Stabilität der einzelnen Domänen auch ohne intakte Disulfidbrücke sprechen.

Wie bei anderen viralen $Fc\gamma$ -Rezeptoren ist auch bei *m138*, im Gegensatz zu zellulären $Fc\gamma$ -Rezeptoren, eine einzelne IgSF Domäne ausreichend für die Vermittlung der $Fc\gamma$ -Bindung. Inzwischen konnte gezeigt werden, dass bei dem HCMV kodierten $Fc\gamma$ -Rezeptor gp34, für den ebenfalls eine IgSF Struktur vorgeschlagen wurde (Atalay, Zimmermann et al. 2002), die positionshomologen Cysteine für die $Fc\gamma$ -Bindung keine Rolle spielen. Zudem wurde für gp34 eine alternative Struktur vorgeschlagen, die keine IgSF Domäne beinhaltet (Davison, Akter et al. 2003).

Da somit eine IgSF Struktur nicht die einzige Möglichkeit der $Fc\gamma$ -Bindung für virale $Fc\gamma$ -Rezeptoren darzustellen scheint, müssten zukünftige Untersuchungen der C2-1 Domäne beim $vFc\gamma R$ *m138* weitere konsequente Punktmutationen (z.B. homologe Tryptophane (Davison, Akter et al. 2003), weitere Cysteine) beeinhalteten, um detailliertere Informationen über die Struktur zu erhalten die eine Deletion von größeren Bereichen nicht liefern würde.

Die genaue Struktur der beiden weiteren Domänen ist bisher nicht vollständig geklärt.

Da beide Domänen für die $Fc\gamma$ -Bindung nicht notwendig sind (M. Budt, unveröffentlichte Daten), ist nahe liegend, dass diese beiden Domänen weitere, IgG-unabhängige Funktionen vermitteln.

7.2 Funktionen viraler $Fc\gamma$ -Rezeptoren HSV, MCMV, RCMV

Die klassische funktionale Vorstellung von viralen $Fc\gamma$ -Rezeptoren ist von Untersuchungen mit HSV1 abgeleitet und führten zum Modell des bipolar bridging bei dem eine $Fc\gamma$ -Bindung des viralen $Fc\gamma$ -Rezeptors eine Hemmung $Fc\gamma$ -vermittelter Effektorfunktionen (ADCC, Neutralisation) zu Folge hat (Frank and Friedman 1989; Dubin, Socolof et al. 1991).

Dass *m138* $Fc\gamma R$ neben der $Fc\gamma$ -bindenden Funktion noch weitere, antikörperunabhängige Funktionen besitzt, wurde seit längerer Zeit vermutet, da in Mäusen mit als auch ohne Antikörper die Replikationsfähigkeit des MCMV *m138* Deletionsmutante vermindert war (Crnkovic-Mertens, Messerle et al. 1998). Neuere Untersuchungen ergaben, dass ausschließlich die putative C2-1 Domäne für die $Fc\gamma$ -

Bindung verantwortlich ist. (M. Budt, unveröffentlichte Daten) und die putativen Domänen C2-2 und C2-3 nicht für die Fc γ -Bindung benötigt werden.

Das legt nahe, dass der vFc γ R *m138* weitere immunmodulatorischen Funktionen besitzt, die Fc γ bzw. Antikörper unabhängig sind. Dabei käme z.B. eine Interaktion mit anderen Molekülen in Frage (Budt, Reinhard et al. 2004).

Zu den beschriebenen mit *m138* interagierenden Molekülen gehören H60 und MULT-1. H60 reguliert als Ligand am NKG2D Rezeptor die Aktivierung von NK-Zellen, wobei die effektive NK-Zell Antwort für die Virusabwehr entscheidend ist. In CMV infizierten Zellen wird Expression von H60 gedrosselt und somit die NK-Zell Antwort abgeschwächt. Damit wird für das Virus Infektion und Persistenz im Wirt leichter möglich. (Hasan, Krmpotic et al. 2005)

Ein weiterer aktivierender Ligand der von CMV am NKG2D Rezeptor vermindert wird ist MULT-1. Bei einer CMV-Infektion ist die Expression von MULT-1 stark erhöht. Auf der Oberfläche von CMV-infizierten Zellen ist allerdings keine Expression von MULT-1 nachweisbar. (Krmpotic, Hasan et al. 2005)

Eine detaillierte Analyse (Lenac, Budt et al. 2006) der Interaktion von *m138* mit H-60 und MULT-1 ergab:

- die Fc γ -bindende C2-1 Domäne ist für die Herunterregulierung von H60 als auch MULT-1 notwendig.
- die C2-1 Domäne ist in Anwesenheit der Transmembrandomäne hinreichend für die Herunterregulierung von MULT-1
- bei H60 sind dagegen alle drei C2 Domänen bzw. das vollständige *m138* für die Herunterregulierung notwendig
- *m138* Mutanten ohne Transmembrandomäne (lösliches *m138*) sind nicht mehr in der Lage, H60 zu regulieren. Die Expression bleibt auf dem normalen Niveau.

Dies zeigt, dass *m138* auch antikörperunabhängige Funktionen und damit mehr als nur eine Fc γ -bindende Funktion hat.

Es kann somit festgehalten werden, dass der vFc γ R *m138* über die Verringerung der Expression von aktivierenden Liganden eine wichtige Rolle für die Regulierung der NK-Zell Antwort spielt. Die C2-1 Domäne ist dabei multifunktionell und sowohl für die Regulation von NK-Liganden als auch für die Fc γ -Bindung verantwortlich. Um herauszufinden, welchen Einfluß *m138* auf die Modulation der Immunantwort hat und

welche molekularen Mechanismen dabei verwendet werden sind weitergehende Untersuchungen notwendig.

7.3 Immunmodulation und Immunevasionsmechanismen von CMV

Besonders Herpesviren modifizieren zahlreiche Gene, um die Immunantwort des Wirtes zu umgehen. Viral kodierte Fc γ -Rezeptoren sind bei α - und β -Herpesviren nachgewiesen. Sie können somit als typisches Merkmal für diese Herpesviren gelten. Die Co-Evolution im jeweiligen Wirt und die Anpassung an verschiedene weitere Funktionen erklärt die beobachtete Variabilität der vFc γ -Rezeptoren. Damit ist eine besonders gute Anpassung an die besonderen Gegebenheiten des Wirtes möglich.

Der hier untersuchte vFc γ R *m138* kann auf verschiedenste Weise immunmodulatorisch wirken. Einerseits wirkt er als „echter“ Fc γ -Rezeptor direkt auf Antikörper und verhindert auf diesem Weg Eliminierung durch das wirtseigene Immunsystem. Andererseits konnte gezeigt werden, dass der vFcR *m138* auch eine herausragende Rolle bei der Modulation der NK-Zell Antwort spielt (Lenac, Budt et al. 2006). So wird die Aktivität der zwei wichtigen NK-Zell aktivierenden Liganden MULT-1 und H60 verändert. Dabei wird die Oberflächenexpression durch *m138* reduziert, wobei lösliches *m138* weiterhin Fc γ bindet, aber nicht mehr in der Lage ist H60 zu regulieren. Dies spricht dafür, dass diese fcr-1 Funktion einen vFc γ R *m138* mit intakter Transmembranverankerung benötigt. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Oberflächendichte von MULT-1 durch *m138* deutlich reduziert wird. Dies wird durch Behinderung des Recycling von MULT-1 auf der Zelloberfläche erreicht, was im Verlauf zum proteolytischen Abbau im Lysosom führt. Die C2-1 Domäne ist dabei für die Modulation von MULT-1 essentiell.

Der Anteil antikörperabhängiger und antikörperunabhängiger Mechanismen an der vorbeschriebenen Attenuierung der *m138* Deletionsmutante *in vivo* ist nicht vollständig geklärt.

Die Attenuierung durch das Fehlen des vFc γ R *m138* kann durch eine NK-Zell Depletierung aufgehoben werden (Jonjic, Pavic et al. 1994). Daher ist anzunehmen, dass die *m138* abhängige Attenuierung während der Akutinfektion im Wesentlichen durch NK-zellabhängige Mechanismen dominiert wird.

Die bisherigen Ergebnisse schließen dennoch antikörperabhängige Funktionen von *m138*, insbesondere während Latenz und Reaktivierung, nicht aus. Voraussetzung für

die Trennung antikörperabhängiger und antikörperunabhängiger Funktionen auf molekularer Ebene ist somit die Herstellung einer *m138* Mutante, bei der Fc γ -Bindung und NK-Zell Interferenz in der multifunktionalen Domäne C2-1 selektiv deletiert wird. Einen ersten Ansatz stellt die in dieser Arbeit hergestellte Punktmutante M1 dar, da diese ihr Fc γ -Bindungsfähigkeit weitgehend verloren hat. In weiterführenden Untersuchungen (S. Jonjic, unveröffentlichte Daten) zeigt M1 *in vivo* ein „Wildtyp-Verhalten“ und ist nicht attenuiert. Dies deutet darauf hin, das M1 weiterhin zur Regulation von NK-zellabhängigen Funktionen fähig ist. Dies könnte durch die Analyse der MULT-1 und H-60 Regulation in der M1 Punktmutante verifiziert werden.

Mit den erstmals generierten Punktmutanten konnte gezeigt werden, dass es sich bei vFc γ R *m138* um ein multifunktionales Protein handelt, welches Fc γ -abhänige und unabhängige Funktionen besitzt. Damit kann er sowohl durch seine Fähigkeit Fc γ zu binden, als auch durch seine weiteren Funktionen Einfluß auf den Ablauf der Immunreaktion seines Wirtes nehmen und spielt damit für die Überlebens- und Replikationsfähigkeit von MCMV eine entscheidende Rolle.

Eine Optimierung der Punktmutanten könnte weitere *in vivo* Experimente erlauben, bei denen auch antikörperabhängige Funktionen von *m138* z.B. bei sekundärer MCMV Infektion / Reaktivierung untersucht werden können.

8 Literatur

- Atalay, R., A. Zimmermann, et al. (2002). "Identification and expression of human cytomegalovirus transcription units coding for two distinct Fcγ receptor homologs." *J Virol* **76**(17): 8596-608.
- Barclay, A. N., M. H. Brown, et al. (1997). *THE LEUCOCYTE ANTIGEN FactsBook Second Edition*, Academic Press Harcourt Brace & Company, Publishers.
- Boppana, S. B., K. B. Fowler, et al. (1999). "Symptomatic congenital cytomegalovirus infection in infants born to mothers with preexisting immunity to cytomegalovirus." *Pediatrics* **104**(1 Pt 1): 55-60.
- Borst, E. M., G. Hahn, et al. (1999). "Cloning of the human cytomegalovirus (HCMV) genome as an infectious bacterial artificial chromosome in *Escherichia coli*: a new approach for construction of HCMV mutants." *J Virol* **73**(10): 8320-9.
- Bruggeman, C. A., R. Reinders, et al. (1984). "Demonstration of an IgG-Fc receptor in rat cytomegalovirus infected cells." *Arch Virol* **81**(1-2): 79-89.
- Brune, W., M. Messerle, et al. (2000). "Forward with BACs: new tools for herpesvirus genomics." *Trends Genet* **16**(6): 254-9.
- Budt, M., H. Reinhard, et al. (2004). "Herpesviral Fcγ receptors: culprits attenuating antiviral IgG?" *Int Immunopharmacol* **4**(9): 1135-48.
- Butcher, S. J., J. Aitken, et al. (1998). "Structure of the human cytomegalovirus B capsid by electron cryomicroscopy and image reconstruction." *J Struct Biol* **124**(1): 70-6.
- Cha, T. A., E. Tom, et al. (1996). "Human cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains." *J Virol* **70**(1): 78-83.
- Chapman, T. L., I. You, et al. (1999). "Characterization of the interaction between the herpes simplex virus type I Fc receptor and immunoglobulin G." *J Biol Chem* **274**(11): 6911-9.
- Chee, M. S., A. T. Bankier, et al. (1990). "Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169." *Curr Top Microbiol Immunol* **154**: 125-69.
- Crnkovic-Mertens, I., M. Messerle, et al. (1998). "Virus attenuation after deletion of the cytomegalovirus Fc receptor gene is not due to antibody control." *J Virol* **72**(2): 1377-82.
- Davison, A. J., P. Akter, et al. (2003). "Homology between the human cytomegalovirus RL11 gene family and human adenovirus E3 genes." *J Gen Virol* **84**(Pt 3): 657-63.
- De Clercq, E. (2003). "Clinical potential of the acyclic nucleoside phosphonates cidofovir, adefovir, and tenofovir in treatment of DNA virus and retrovirus infections." *Clin Microbiol Rev* **16**(4): 569-96.
- Dubin, G., E. Socolof, et al. (1991). "Herpes simplex virus type 1 Fc receptor protects infected cells from antibody-dependent cellular cytotoxicity." *J Virol* **65**(12): 7046-50.
- Enders, G., U. Bäder, et al. (2003). "Zytomegalievirus-(CMV-) Durchseuchung und Häufigkeit von CMV-Primärinfektionen bei schwangeren Frauen in Deutschland." *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* **46**: 426-432.
- Fields, B. N., D. M. Knipe, et al. (1996). *Fields Virology*. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers.

- Fowler, K. B., S. Stagno, et al. (1992). "The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status." N Engl J Med **326**(10): 663-7.
- Frank, I. and H. M. Friedman (1989). "A novel function of the herpes simplex virus type 1 Fc receptor: participation in bipolar bridging of antiviral immunoglobulin G." J Virol **63**(11): 4479-88.
- Furukawa, T., E. Hornberger, et al. (1975). "Demonstration of immunoglobulin G receptors induced by human cytomegalovirus." J Clin Microbiol **2**(4): 332-6.
- Gaytant, M. A., E. A. Steegers, et al. (2002). "Congenital cytomegalovirus infection: review of the epidemiology and outcome." Obstet Gynecol Surv **57**(4): 245-56.
- Gilbert, C., J. Bestman-Smith, et al. (2002). "Resistance of herpesviruses to antiviral drugs: clinical impacts and molecular mechanisms." Drug Resist Updat **5**(2): 88-114.
- Griffiths, P. D. and C. Baboonian (1984). "A prospective study of primary cytomegalovirus infection during pregnancy: final report." Br J Obstet Gynaecol **91**(4): 307-15.
- Hansen, S. G., L. I. Strelow, et al. (2003). "Complete sequence and genomic analysis of rhesus cytomegalovirus." J Virol **77**(12): 6620-36.
- Hanson, L. K., J. S. Slater, et al. (2001). "Products of US22 genes M140 and M141 confer efficient replication of murine cytomegalovirus in macrophages and spleen." J Virol **75**(14): 6292-302.
- Hanson, L. K., J. S. Slater, et al. (1999). "Replication of murine cytomegalovirus in differentiated macrophages as a determinant of viral pathogenesis." J Virol **73**(7): 5970-80.
- Harpaz, Y. and C. Chothia (1994). "Many of the immunoglobulin superfamily domains in cell adhesion molecules and surface receptors belong to a new structural set which is close to that containing variable domains." J Mol Biol **238**(4): 528-39.
- Hasan, M., A. Krmpotic, et al. (2005). "Selective down-regulation of the NKG2D ligand H60 by mouse cytomegalovirus m155 glycoprotein." J Virol **79**(5): 2920-30.
- Hengel, H., W. Brune, et al. (1998). "Immune evasion by cytomegalovirus--survival strategies of a highly adapted opportunist." Trends Microbiol **6**(5): 190-7.
- Hengel, H., J. O. Koopmann, et al. (1997). "A viral ER-resident glycoprotein inactivates the MHC-encoded peptide transporter." Immunity **6**(5): 623-32.
- Hengel, H., P. Lucin, et al. (1994). "Restoration of cytomegalovirus antigen presentation by gamma interferon combats viral escape." J Virol **68**(1): 289-97.
- Hengel, H., U. Reusch, et al. (1999). "Cytomegaloviral control of MHC class I function in the mouse." Immunol Rev **168**: 167-76.
- Hengel, H. and C. Weber (2000). "Driving cells into atherosclerotic lesions--a deleterious role for viral chemokine receptors?" Trends Microbiol **8**(7): 294-6.
- Hengge, U. R., T. Ruzicka, et al. (2002). "Update on Kaposi's sarcoma and other HHV8 associated diseases. Part 2: pathogenesis, Castlemans disease, and pleural effusion lymphoma." Lancet Infect Dis **2**(6): 344-52.
- Holbrook, J. T., D. A. Jabs, et al. (2003). "Visual loss in patients with cytomegalovirus retinitis and acquired immunodeficiency syndrome before widespread availability of highly active antiretroviral therapy." Arch Ophthalmol **121**(1): 99-107.
- Horvath, R., J. Cerny, et al. (2000). "The possible role of human cytomegalovirus (HCMV) in the origin of atherosclerosis." J Clin Virol **16**(1): 17-24.
- Hudson, J. B. (1979). "The murine cytomegalovirus as a model for the study of viral pathogenesis and persistent infections." Arch Virol **62**(1): 1-29.

- Internet1 (2004). PROSITE - Database of protein families and domains, <http://us.expasy.org/prosite/>. ExPASy proteomics server by Swiss Institute of Bioinformatics. **2004**.
- Internet2 (2004). DIpro - Cysteine Disulfide Bond Predictor, <http://www.ics.uci.edu/~baldig/scratch/>. by Institute for Genomics and Bioinformatics, School of Information & Computer Science, University of California, Irvine, USA. **2004**.
- Internet3 (2004). The PSIPRED protein structure prediction server, Predict Secondary Structure (PSIPRED v2.4), <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/psiform.html>. by UCL Bioinformatics Unit, Department of Computer Science, University College London.
- Internet4 (2004). The PSIPRED protein structure prediction server, Predict Transmembrane Topology (MEMSAT), <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/psiform.html>. by UCL Bioinformatics Unit, Department of Computer Science, University College London.
- Internet5 (2010). Wikipedia Artikel " β -Faltblatt", <http://de.wikipedia.org/wiki/B-Faltblatt>. by Wikimedia Foundation Inc.
- Internet6 (2010). Wikipedia Artikel " α -Helix", <http://de.wikipedia.org/wiki/Alpha-Helix>. by Wikimedia Foundation Inc.
- Jonjic, S., I. Pavic, et al. (1994). "Antibodies are not essential for the resolution of primary cytomegalovirus infection but limit dissemination of recurrent virus." J Exp Med **179**(5): 1713-7.
- Keller, R., R. Peitchel, et al. (1976). "An IgG-Fc receptor induced in cytomegalovirus-infected human fibroblasts." J Immunol **116**(3): 772-7.
- Klemola, E. and L. Kaariainen (1965). "Cytomegalovirus as a possible cause of a disease resembling infectious mononucleosis." Br Med J **5470**: 1099-102.
- Klenovsek, K., F. Weisel, et al. (2007). "Protection from CMV infection in immunodeficient hosts by adoptive transfer of memory B cells." Blood **110**(9): 3472-9.
- Komazin, G., R. G. Ptak, et al. (2003). "Resistance of human cytomegalovirus to the benzimidazole L-ribonucleoside maribavir maps to UL27." J Virol **77**(21): 11499-506.
- Krmpotic, A., I. Bubic, et al. (2003). "Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection." Microbes Infect **5**(13): 1263-77.
- Krmpotic, A., M. Hasan, et al. (2005). "NK cell activation through the NKG2D ligand MULT-1 is selectively prevented by the glycoprotein encoded by mouse cytomegalovirus gene m145." J Exp Med **201**(2): 211-20.
- Lajo, A., C. Borque, et al. (1994). "Mononucleosis caused by Epstein-Barr virus and cytomegalovirus in children: a comparative study of 124 cases." Pediatr Infect Dis J **13**(1): 56-60.
- Lenac, T., M. Budt, et al. (2006). "The herpesviral Fc receptor fcr-1 down-regulates the NKG2D ligands MULT-1 and H60." J Exp Med **203**(8): 1843-50.
- Lilley, B. N., H. L. Ploegh, et al. (2001). "Human cytomegalovirus open reading frame TRL11/IRL11 encodes an immunoglobulin G Fc-binding protein." J Virol **75**(22): 11218-21.
- Ljungman, P., P. Biron, et al. (1994). "Cytomegalovirus interstitial pneumonia in autologous bone marrow transplant recipients. Infectious Disease Working Party of the European Group for Bone Marrow Transplantation." Bone Marrow Transplant **13**(2): 209-12.

- Ljungman, P., D. Engelhard, et al. (1992). "Treatment of interstitial pneumonitis due to cytomegalovirus with ganciclovir and intravenous immune globulin: experience of European Bone Marrow Transplant Group." Clin Infect Dis **14**(4): 831-5.
- Ljungman, P., K. Larsson, et al. (2002). "Leukocyte depleted, unscreened blood products give a low risk for CMV infection and disease in CMV seronegative allogeneic stem cell transplant recipients with seronegative stem cell donors." Scand J Infect Dis **34**(5): 347-50.
- Lode, H. (1990). "Foscarnet - ein neues Virustatikum bei Infektionen durch Zytomegalie-Viren." Zeitschrift für Chemotherapie; Heft 6, 1990 Retrieved 23.10., 2003, from <http://www.zct-berlin.de/neueinfuehrungen/foscarnet.html>.
- Lode, H. (1990). "Ganciclovir - ein Virustatikum zur Behandlung von schweren Zytomegalie-Virus-Infektionen." Zeitschrift für Chemotherapie; Heft 1, 1990 Retrieved 23.10., 2003, from <http://www.zct-berlin.de/neueinfuehrungen/ganciclovir.html>.
- Lode, H. (1997). "Cidofovir - ein neues Virustatikum zur Behandlung der CMV-Retinitis." Zeitschrift für Chemotherapie; Heft 6, 1997 Retrieved 23.10., 2003, from <http://www.zct-berlin.de/neueinfuehrungen/cidofovir.html>.
- Lode, H. (2000). "Fomivirsen - ein neues Therapieprinzip bei CMV-Retinitis." Zeitschrift für Chemotherapie; Heft 3, 2000 Retrieved 23.10., 2003, from <http://www.zct-berlin.de/neueinfuehrungen/fomivirsen.html>.
- Lode, H. (2003). "Valganciclovir – ein Prodrug zur oralen Therapie der Cytomegalie-Retinitis." Zeitschrift für Chemotherapie; Heft 2, 2003 Retrieved 23.10., 2003, from <http://www.zct-berlin.de/neueinfuehrungen/valganciclovir.html>.
- Löwenstein, A. (1919). "Aetiologische Untersuchungen über den fieberhaften Herpes." Munch Med Wochenschr **66. Jahrgang**(Nr. 28, 11. Juli 1919): 769-770.
- Lucin, P., S. Jonjic, et al. (1994). "Late phase inhibition of murine cytomegalovirus replication by synergistic action of interferon-gamma and tumour necrosis factor." J Gen Virol **75 (Pt 1)**: 101-10.
- Ludwig, A. and H. Hengel (2009). "Epidemiological impact and disease burden of congenital cytomegalovirus infection in Europe." Euro Surveill **14**(9): 26-32.
- Messerle, M., I. Crnkovic, et al. (1997). "Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(26): 14759-63.
- Moore, P. S. and Y. Chang (1995). "Detection of herpesvirus-like DNA sequences in Kaposi's sarcoma in patients with and without HIV infection." N Engl J Med **332**(18): 1181-5.
- Nagashunmugam, T., J. Lubinski, et al. (1998). "In vivo immune evasion mediated by the herpes simplex virus type 1 immunoglobulin G Fc receptor." J Virol **72**(7): 5351-9.
- Nairn, R. and M. Helbert (2002). Immunology for Medical Students, Mosby International Ltd.
- Nigro, G., S. P. Adler, et al. (2005). "Passive immunization during pregnancy for congenital cytomegalovirus infection." N Engl J Med **353**(13): 1350-62.
- Nimmerjahn, F., P. Bruhns, et al. (2005). "FcγRIV: a novel FcR with distinct IgG subclass specificity." Immunity **23**(1): 41-51.
- O'Connor, M., M. Peifer, et al. (1989). "Construction of large DNA segments in Escherichia coli." Science **244**(4910): 1307-12.
- Offidani, A., E. Pritelli, et al. (2000). "Pityriasis rosea associated with herpesvirus 7 DNA." J Eur Acad Dermatol Venereol **14**(4): 313-4.

- Pauletto, P., G. Pisoni, et al. (1996). "Human cytomegalovirus and restenosis of the internal carotid artery." Stroke **27**(9): 1669-71.
- Rawlinson, W. D., H. E. Farrell, et al. (1996). "Analysis of the complete DNA sequence of murine cytomegalovirus." J Virol **70**(12): 8833-49.
- Rios, V. M., J. Pennington, et al. (2003). "Assessment of removal of human cytomegalovirus from blood components by leucocyte depletion filters using real-time quantitative PCR." Blood **Oct 2** [Epub ahead of print].
- Sakuma, S., T. Furukawa, et al. (1977). "The characterization of IgG receptor induced by human cytomegalovirus." Proc Soc Exp Biol Med **155**(2): 168-72.
- Sia, I. G. and R. Patel (2000). "New strategies for prevention and therapy of cytomegalovirus infection and disease in solid-organ transplant recipients." Clin Microbiol Rev **13**(1): 83-121, table of contents.
- Speir, E., R. Modali, et al. (1994). "Potential role of human cytomegalovirus and p53 interaction in coronary restenosis." Science **265**(5170): 391-4.
- Sprague, E. R., C. Wang, et al. (2006). "Crystal structure of the HSV-1 Fc receptor bound to Fc reveals a mechanism for antibody bipolar bridging." PLoS Biol **4**(6): e148.
- Stagno, S., R. F. Pass, et al. (1982). "Congenital cytomegalovirus infection: The relative importance of primary and recurrent maternal infection." N Engl J Med **306**(16): 945-9.
- Sutton, R. B., B. A. Davletov, et al. (1995). "Structure of the first C2 domain of synaptotagmin I: a novel Ca²⁺/phospholipid-binding fold." Cell **80**(6): 929-38.
- Tanaka, K., T. Kondo, et al. (1994). "Human herpesvirus 7: another causal agent for roseola (exanthem subitum)." J Pediatr **125**(1): 1-5.
- Taylor, G. H. (2003). "Cytomegalovirus." Am Fam Physician **67**(3): 519-24.
- Thäle, R., P. Lucin, et al. (1994). "Identification and expression of a murine cytomegalovirus early gene coding for an Fc receptor." J Virol **68**(12): 7757-65.
- Trincado, D. E. and W. D. Rawlinson (2001). "Congenital and perinatal infections with cytomegalovirus." J Paediatr Child Health **37**(2): 187-92.
- Vink, C., E. Beuken, et al. (2000). "Complete DNA sequence of the rat cytomegalovirus genome." J Virol **74**(16): 7656-65.
- Visalli, R. J., J. Fairhurst, et al. (2002). "Characterization of the murine cytomegalovirus 38 kDa m137 gene product." Virus Res **84**(1-2): 181-9.
- Wagner, M., S. Jonjic, et al. (1999). "Systematic excision of vector sequences from the BAC-cloned herpesvirus genome during virus reconstitution." J Virol **73**(8): 7056-60.
- Wang, L. H., R. W. Peck, et al. (2003). "Phase I safety and pharmacokinetic trials of 1263W94, a novel oral anti-human cytomegalovirus agent, in healthy and human immunodeficiency virus-infected subjects." Antimicrob Agents Chemother **47**(4): 1334-42.
- Wang, X., S. M. Huong, et al. (2003). "Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus." Nature **424**(6947): 456-61.
- Watanabe, T., T. Kawamura, et al. (2002). "Pityriasis rosea is associated with systemic active infection with both human herpesvirus-7 and human herpesvirus-6." J Invest Dermatol **119**(4): 793-7.
- Weller, T. H. (2000). "Cytomegaloviruses: a Historical Perspective." Herpes **7**(3): 66-69.
- Wildy, P. (1973). Herpes: history and classification. In: Kaplan AS, ed. The herpesviruses, New York: Academic: 1-25.

Zhou, Y. F., E. Guetta, et al. (1996). "Human cytomegalovirus increases modified low density lipoprotein uptake and scavenger receptor mRNA expression in vascular smooth muscle cells." J Clin Invest **98**(9): 2129-38.

9 Danksagung

Diese Seite ist den Personen gewidmet, ohne die diese Arbeit nie entstanden und bis zum Ende gebracht worden wäre.

Meinen Eltern und meiner Familie.

Besonderer Dank gilt Prof. Hartmut Hengel für die Überlassung des Themas, die geduldige Unterstützung bei der Durchführung und die hervorragende Betreuung während der ganzen Arbeit.

Jegliche praktische Arbeit im Labor wäre ohne die Hilfe und Unterstützung der CMV Arbeitsgruppe unmöglich gewesen. Die tolle Arbeitsatmosphäre und der familiäre Umgang waren einfach Klasse!

Die CMV Familie ganz alphabetisch:

Ramazan Atalay
Bettina Bauer,
Dr. Matthias Budt,
Dr. Eugenia Corrales,
Dr. Anne Halenius,
Prof. Dr. Hartmut Hengel,
Stefanie Jeschke,
Dr. Khanh Le,
Min-Hi Lee,
Dr. Henrike Reinhard,
Jan Stindt,
Dr. Mirko Trilling,
Katja Wichmann,
Manuel Wilborn,
Anne Wolpert,
PD Dr. Albert Zimmermann.

Weiterer Dank für die gute Zusammenarbeit geht an die „Nachbarn“:

das NRZ MMR,

das NRZ Influenza,

NG2: Dr. Gunhild Unterstab, Bianca Dauber,

Herrn Emmel und Herrn Pociuli für die Sequenzierung,

sowie vielen weiteren Mitarbeitern des Robert Koch-Instituts.

Für die Reaktivierung und Motivation nach längerer Zeit und die Unterstützung bei der Korrektur geht ein besonderer Dank an Dr. Lutz Müller und PD Dr. Albert Zimmermann.

10 Lebenslauf

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."

11 Publikationsliste

- Publikation „Herpesviral Fcγ receptors: culprits attenuating antiviral IgG?“ Matthias Budt, Henrike Reinhard, Arndt Bigl and Hartmut Hengel, *International Immunopharmacology* 4 (2004) 1135-1148
- Vorträge Study group „Immunbiology of Viral Infections“ der Gesellschaft für Virologie, 1. Workshop Oktober 2002 Schloß Zeilitzheim Thema: „BACmid-based construction and characterisation of Mouse Cytomegalovirus Fc-Receptor *m138* point mutants.“
7. SFB 421 Kolloquium der DFG, April 2003
Thema „Function relationship of a Mouse Fcγ receptor.“
- Poster Jahrestagung der Gesellschaft f. Virologie, März 2003, Berlin
Thema: *IMM 03* „BACmid-based construction and Characterisation of Mouse Cytomegalovirus (MCMV) Fc Receptor *m138* point-mutants.“
17. Jahrestagung der DGPI zusammen mit der GKJR 2009
Posterpreis Rheumatologie
Thema: „Foudroyanter Verlauf der Erstmanifestation eines systemischen Lupus erythematodes bei invasiver Pneumokokkeninfektion“

12 Erklärung

Ich, Arndt Bigl, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Untersuchungen zur Struktur und Funktion von Cytomegalovirus - kodierten Fc γ -Rezeptoren“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum

Unterschrift