Universität Ulm
Institut für Virologie
Prof. Dr. Thomas Mertens

Charakterisierung des viralen UL24-Genprodukts des humanen Zytomegalievirus (HCMV)

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
an der medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

vorgelegt von
Volker Kleining
aus Ostercappeln

2007

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: PD Dr. Michael Winkler

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Paul Walther

Tag der Promotion: 20. Juni 2008

Inhaltsverzeichnis:

Abkürzungsverzeichnis 5

1 Einleitung 7
1.1 Herpesviridae 7
1.2 Epidemiologie des HCMV 7
1.3 Klinik 8
1.4 Genomorganisation und Struktur des Virions 9
1.5 Infektion und Partikelreifung 11
1.6 Zelltropismus 14
1.7 US22-Genfamilie 15
1.8 Zielsetzung der Arbeit 15

2 Material und Methoden 17
2.1 Geräte 17
2.2 Chemikalien 18
2.3 Antikörper 19
2.3.1 Primäre Antikörper 19
2.3.2 Sekundäre Antikörper 19
2.4 Zellen 19
2.5 BAC's (bacterial artificial chromosome) 20
2.6 Plasmide 20
2.7 Sonstige Verbrauchsmaterialien 21
2.8 Medien und Standardlösungen 21
2.8.1 Zellkultur 21
2.8.2 Western Blot 22
2.9 Zellkultur 24
2.10 Wachstumskurven 25
2.11 Immunfluoreszenz 26
2.12 Western Blot 27
2.13 Elektronenmikroskopie 28

3 Ergebnisse 29
3.1 Charakterisierung des Genprodukts von UL24 29
3.1.1 Expressionskinetik des UL24-Proteins 29
3.1.2 Lokalisation des UL24-Proteins 30
3.2 Charakterisierung von UL24-Deletionsmutanten 32
3.2.1 Expression der Nachbargene 32
3.2.2 Replikation in Fibroblasten 34
3.2.3 Ultrastrukturelle Analyse infizierter Zellen 35
3.2.4 Replikation in Endothelzellen 37

4 Diskussion 40
4.1 pUL24 als Late-Protein 40
4.2 Lokalisation von pUL24 40
4.3 Biologische Bedeutung der Deletionsmatanten 42
4.4 Replikation in Fibroblasten 43
4.5 Ultrastrukturelle Analyse 44
4.6 UL24 und Endothelzelltropismus 44
4.7 Ausblick 46

5 Zusammenfassung 47

6 Literaturverzeichnis 48

Abkürzungsverzeichnis

AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
AIDS	Aquired immunodeficiency syndrome
AK	Antikörper
Ap	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BAC	Bacterial artifical chromosome
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	Complementary DNA
CPE	Cytopathic effect
DEAE	Diethylaminoethyl
DMF	Dimethylformamid
DNA	Deoxyribonucleic acid
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindole
Dpi	Dies post infectionem
DTT	1,4-dithio-DL-threitol
E	Early
EBM	Endothelial basal medium
EBV	Epstein-Barr Virus
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
HA	Influenzavirus-Hämagglutinin
HCL	Chlorwasserstoff
HCMV	Humanes Zytomegalievirus
HFF	Human foreskin fibroblast
HHV	Humanes Herpesvirus
HIV	Human immunodeficiency virus
hpi	Hour(s) past infection
HRP	Horseraddish peroxidase
HSV	Herpes simplex Virus
HUVEC	Humane umbilikal-venöse Endothelzellen
IE	Immediate early
IR	Inverted repeat
kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L	Late
m.o.i.	Multiplicity of infection
MCMV	Murines Zytomegalievirus
MEM	Minimal essential medium
MetOH	Methanol
MM	Mastermix
MP	Milchpulver
NIEP	Noninfectious enveloped particle
ORF	Open reading frame
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
Pen	Penicillin
PFA	Paraformaldehyd
PFU	Plaque forming unit

p.i.	Post infectionem
PVDF	Polyvinyliden Difluorid
RNA	Ribonucleic acid
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raum Temperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
Strep	Streptomycin
TEMED	N,N,N',N' - Tetramethylethylendiamin
TR	Terminal repeat
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UL	Unique long
US	Unique short
VZV	Varicella Zoster Virus
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Herpesviridae

Von den knapp 100 Herpesvirenarten sind gegenwärtig acht Vertreter bekannt, die den Menschen als natürlichen Wirt haben. Sie werden nach ihren Replikationseigenschaften und ihrem Organtropismus in α-, β- und γ-Herpesviren unterteilt.[32] Das humane Zytomegalievirus (HCMV) zählt zur Gruppe der β-Herpesviren. Diese zeichnen sich durch eine ausgeprägte Wirtsspezifität und einen langen Replikationszyklus aus. Der Name Zytomegalie nimmt Bezug auf die zytopathischen Veränderungen, wobei sich menschliche Zellen, die mit HCMV infiziert sind, vergrößern und abkugeln. Oft sieht man unter dem Mikroskop sowohl zytoplasmatische als auch nukleäre Einschlüsse, die die Pathologen zu der Bezeichnung „Eulenaugenzellen“ veranlasste. Wie alle Herpesviren etabliert auch HCMV nach der Primärinfektion eine Latenz, jedoch ist der genaue Ort der Latenz gegenwärtig noch umstritten.

1.2 Epidemiologie des HCMV

HCMV wird ausschließlich von Mensch zu Mensch übertragen und gelangt über Schleimhautkontakte oder parenteral, d.h. über Blut, Blutprodukte, Organ- oder Stammzelltransplantationen, in den Körper. Man unterscheidet zwischen Primärinfektion eines zuvor nicht infizierten Organismus, Reaktivierung einer latenten Infektion und Sekundär-, bzw. Zweitinfektion eines schon infizierten Organismus mit einer zusätzlichen Virusvariante, z.B. bei Organtransplantationen. Das Virus kann diaplazentar oder intrauterin noch vor der Geburt des Kindes übertragen werden (kongenitale Infektion). Neugeborene können sich bei der Geburt über zervikale und vaginale Sekrete der Mutter, sowie nach der Geburt über Speichel und die Muttermilch mit dem Virus infizieren (peri- und postnatale Infektion). Während sich Kinder untereinander vor allem über Speichel und Urin anstecken, infizieren sich Erwachsene außer durch Speichel hauptsächlich durch Samen und zervikale Sekrete. Die primäre oder sekundäre Infektion bei Transplantierten erfolgt zumeist über die transplantierten Gewebe bzw. Organe oder zellhaltige Blutprodukte.[35] Wie bei allen Herpesviren spielt auch hier die

lebenslange Persistenz im infizierten Organismus eine wichtige Rolle. Besonders immundefiziente Patienten (Patienten mit angeborenen Immundefekten, AIDS-Patienten, Transplantatempfänger, Tumorpatienten, Frühgeborene und Feten) sind durch eine Reaktivierung gefährdet.

Die Durchseuchung der Bevölkerung mit dem ubiquitär vorkommenden HCMV weist eine große Variationsbreite in Abhängigkeit von dem sozioökonomischen Standard eines Landes auf.[24,40] Generell ist die Rate an Primärinfektionen in den Industriestaaten Amerikas, Westeuropas und Australiens niedriger als in den Ländern der Dritten Welt. Für viele Länder in Afrika und Asien wird die Prävalenz HCMV-spezifischer Antikörper im Erwachsenenalter mit bis zu 100% angegeben, während sie in den Industriestaaten durchschnittlich zwischen 40 und 70% liegt.[25] Die Durchseuchung in den Industriestaaten nimmt mit dem Lebensalter zu und erreicht bis zum 6. Lebensjahr Raten zwischen 5 und 30%. Dabei erfolgt sie zweiphasig: Einen ersten Gipfel bilden in den ersten zwei bis drei Lebensjahren peri- und früh-postnatale Schmierinfektionen durch Speichel und Urin sowie Infektionen über die Muttermilch. Ein zweiter geringerer Gipfel kommt in der Jugend und im jungen Erwachsenenalter - etwa zwischen 16 und 30 Jahren - durch Sexualkontakte zustande.[31]

1.3 Klinik

Bei der Betrachtung der verschiedenen klinischen Manifestationen ist vor allem zwischen immunkompetenten und immundefizienten Personen zu unterscheiden. Außerdem ist es von Bedeutung, ob es sich um eine endogene Reaktivierung einer latenten HCMV-Infektion oder eine Primärinfektion handelt.

Die Inkubationszeit bei einer Primärinfektion beträgt wahrscheinlich 20-60 Tage.[17] Beim Immunkompetenten verläuft die Primärinfektion fast immer symptomlos. Mitunter kommt es zu Mononukleose-ähnlichen Krankheitsbildern mit Lymphadenopathie, Pharyngitis, Tonsillitis, Splenomegalie, Fieber und Thrombozytopenie.[17,49]

Auch die endogene Reaktivierung während der Schwangerschaft zeigt meist einen benignen Verlauf. Intrauterin infizieren sich zwischen 0,2 und 2,2% der Kinder. Bei Primärinfektion einer Schwangeren ist dagegen bei 40-50% der Kinder mit einer kongenitalen Infektion zu rechnen, wovon 5-18% bei der Geburt Symptome zeigen. Bei den symptomatischen Neugeborenen liegt die Leta-

lität bei 30%. Bei ca. 80% der Überlebenden treten bleibende neurologische Spätschäden wie mentale Retardierung, Schwerhörigkeit, Sehstörungen oder psychomotorische Entwicklungsstörungen auf. Zum Teil werden auch schwere Schädigungen, darunter Mikrozephalie, intrazerebrale Verkalkungen, Chorioretinitis, kardiovaskuläre Defekte und Hepatosplenomegalie mit Ikterus beobachtet. Die Prognose dieser Kinder ist schlecht. Bei postnatalen Infektionen durch die Muttermilch beobachtet man insbesondere bei Frühgeborenen gehäuft atypische Pneumonien, Hepatosplenomegalien und Blutbildveränderungen wie Anämien und Thrombozytopenien.[7,29]

Die Krankheitsbilder bei Transplantatempfängern sind von Art und Ausmaß der Immunsuppression abhängig.[18] Nach einer Knochenmarkstransplantation (KMT) verläuft die HCMV-Infektion oft dramatischer als nach Organtransplantationen. KMT-Patienten erkranken eher an einer interstitiellen Pneumonie. Bei Nierentransplantierten wurden Transplantatabstoßungen in Zusammenhang mit HCMV-Erkrankungen gebracht. Möglich ist bei Organtransplantationen auch eine Zweitinfektion, die durch eine andere HCMV-Variante des Spenders hervorgerufen wurde.

Bei AIDS-Patienten sind sowohl Erstinfektionen als auch Reaktivierung von großer klinischer Bedeutung. Hier stehen Chorioretiniden, Enzephalitiden, Hepatiden und Gastroenteritiden im Vordergrund.[21] Schließlich wird HCMV auch mit Atherosklerose und Restenose koronarer Arterien in Zusammenhang gebracht.[37,57,36]

1.4 Genomorganisation und Struktur des Virions

Das lineare doppelsträngige DNA-Genom des HCMV-Laborstamms AD169 umfasst 230 kb und gehört zu den größten unter den Herpesviren. Es enthält 208 Leserahmen mit jeweils mindestens 80 Codons, die für über 200 Proteine kodieren.[9,10] Das Genom besteht aus zwei Einzelkopiesequenzen („unique long“, UL und „unique short“, US), die jeweils von repetitiven Sequenzen flankiert werden. Dabei enthält der UL-Abschnitt 132 „open reading frames“ (ORF), die von UL1 bis UL 132 durchnummeriert sind, und der US-Abschnitt 36 ORF (US1 bis US36).[32] Da die beiden Bereiche UL und US relativ zueinander gedreht werden können, sind vier verschiedene Genom-Isomere möglich.

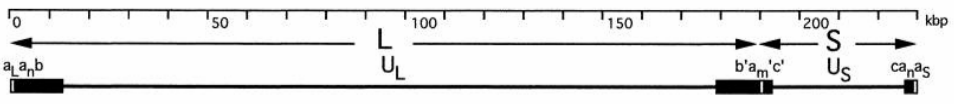

Abbildung 1: Genomstruktur des Laborstamms AD169 des humanen Zytomegalievirus
Oben ist eine Größenskala in Kilobasenpaaren dargestellt. Die UL- und US-Bereiche des Genoms sind mit Pfeilen symbolisiert. Einzelkopiesequenzen werden von *inverted repeats* (a-, b-, c-Bereiche) flankiert. a_L: L-terminale A-Sequenzwiederholung; a_n,a_m: zusätzliche, unterschiedlich lange a-Sequenzen; b': *inverted repeat* der b-Sequenz; c' *inverted repeat* der c-Sequenz; a_S: S-terminale A-Sequenzwiederholung; in: Fields Virology, 4. Edition, 2001.

Das Genom wird von einem Kapsid umgeben, das 100nm misst und aus 150 im äußeren Abschnitt röhrenförmigen hexagonalen und 12 pentagonalen Kapsomeren in ikosaedrischer Anordnung besteht.[11] Genom und Kapsid werden zusammen auch als Nukleoid oder Core bezeichnet. Es schließt sich das Tegument an. Dabei handelt es sich um eine heterogene Gruppe von über 25 Proteinen. Die Leserahmen liegen bei den β-Herpesviren konserviert vor, wobei einige bei allen Herpesviren, andere nur in bestimmten Gruppen konserviert und wieder andere artspezifisch sind. Zu den Tegumentproteinen zählen u.a. UL24, UL25, UL26, UL82 (pp71), UL32 (pp150), UL35, UL48, UL83 (pp65), UL97, UL99 (pp28) und pTRS1/IRS1. Tegument-Proteine erfüllen zahlreiche Funktionen: Erstens sind sie von entscheidender Bedeutung für die Zusammensetzung reifer Viruspartikel. Zweitens sind sie sowohl für den intrazellulären Partikeltransport nach Fusion des Virions mit der Kernmembran, als auch für den Transport der neuen reifen Partikel bis zur Freisetzung in den Extrazellularraum zuständig.[44] Des Weiteren gibt es Tegument-Proteine, die in den Kern wandern, wo sie immediate early (IE) Gene transaktivieren. Das erste beschriebene regulatorische Protein war ppUL82 (pp71), für welches das humane Daxx Protein (hDaxx) als Interaktionspartner identifiziert wurde. Zusammen aktivieren sie synergistisch den IE Enhancer.[28,19] Auch bei pUL26 scheint es sich um ein Protein zu handeln, das den Major-Immediate-Early-Enhancer transaktiviert.[47] Darüber hinaus gibt es Virusproteine, die die Virusreplikation vor der Abwehr des Immunsystems schützen. Am Beispiel von ppUL83 (pp65) konnte gezeigt werden, dass dieses Protein für die selektive Blockierung der Prozessierung von ppUL123 (IE72), welches das Hauptziel der zytotoxischen T-Lymphozyten ist, verantwortlich ist.[15] Die virale DNA-Polymerase und die UL97-Kinase wurden ebenfalls dem Tegument zugeordnet.[27,51] Die äußerste Schicht des Virions

bildet die von zellulären Membranen abgeleitete Lipid-Doppelmembran, in der die für den Infektionsvorgang notwendigen Glyko-proteine eingelagert sind.[17]

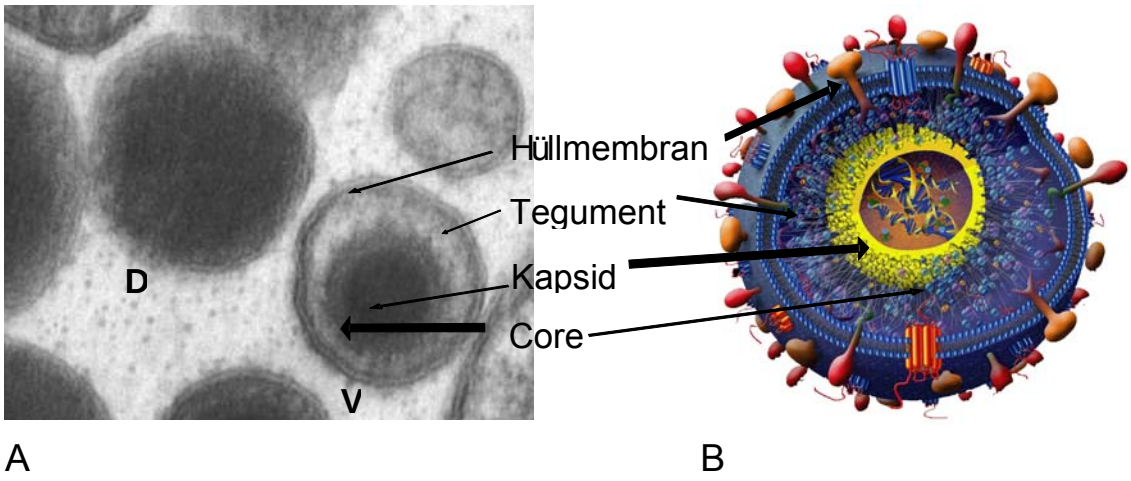

Abbildung 2: Humanes Zytomegalievirus (HCMV) -Partikel

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

1.5 Infektion und Partikelreifung

Die Infektion der Zelle beginnt, indem spezifische Glykoproteine, die in die Lipidhülle des Virus eingelagert sind, an passende Rezeptoren der Zelle binden (Adsorption). Haan et al. zeigten für das Epstein-Barr-Virus (EBV), dass für die Penetration des Virus in B-Lymphozyten ein Komplex aus gp85, gp25 und gp42 verantwortlich ist, der mit dem HLA DR Protein, welches Teil der HLA II Familie ist, interagiert. gp85 und gp25 entsprechen dabei gH und gL beim HCMV.[16] Die anschließende Fusion von Virushülle und Zytoplasma-Membran wird ebenfalls durch spezifische Glykoproteinstrukturen der Virushülle bewirkt. Sie ermöglicht die Penetration des Nukleokapsids mitsamt dem Tegument in die Zelle. Das Nukleokapsid erreicht über Mikrotubuli-Strukturen die Kernporen, an denen es möglicherweise die Virus-DNA in den Kern freigibt. Diese nimmt, nachdem sie in das Kernplasma gelangt ist, eine Ringform an. Die für die Initiation der Virusreplikation wichtigen Tegumentproteine werden wahrscheinlich mit Hilfe ihrer Kerntransportsignale in den Zellkern eingeschleust.[30]

Die viralen Proteine werden kaskadenartig in drei aufeinander folgenden Stufen gebildet: immediate early (IE), early (E) bzw. late (L) Antigene.[48] Die Einteilung

erfolgt zum einen nach dem zeitlichen Ablauf der Genexpression im viralen Replikationszyklus. Zum anderen lässt sich dieser durch die Verwendung der beiden Wirkstoffe Cycloheximid, einem Inhibitor der Proteinbiosynthese, und Phosphonoessigsäure (PAA), einem Inhibitor der DNA-Polymerase, in charakteristische Phasen einteilen. mRNA-Transkripte, deren Bildung nicht durch die Behandlung der Zellen mit Cycloheximid gehemmt wird, sind IE-Genen zuzuschreiben. Die Bildung von L-Proteinen ist erst nach viraler DNA-Replikation möglich und kann mit PAA unterdrückt werden.

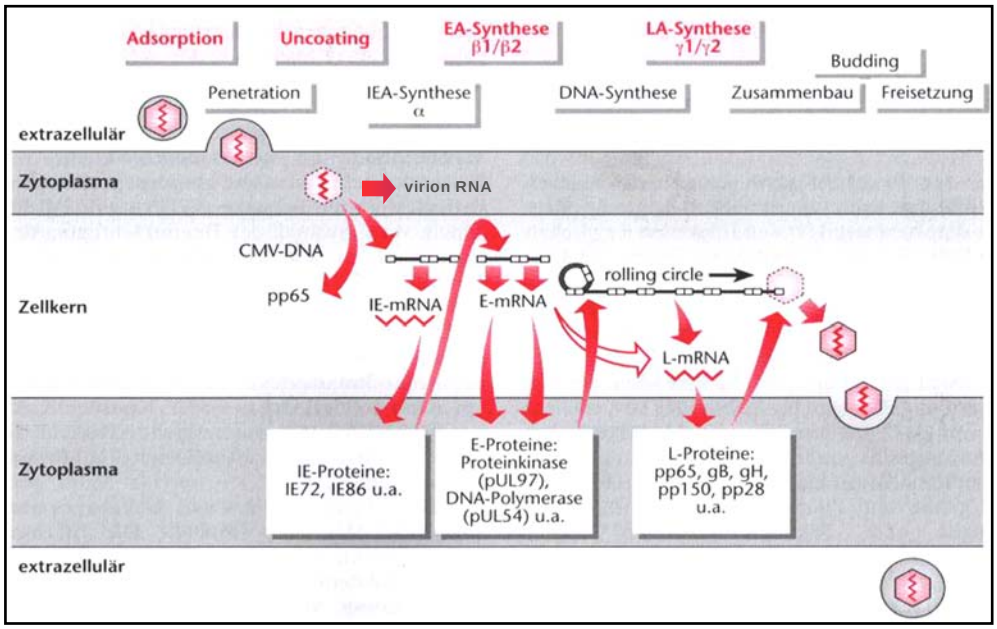

Abbildung 3: Schema des Replikationszyklus vom humanen Zytomegalievirus (HCMV)
Hier ist der zeitlich gestaffelte Ablauf der HCMV-Vermehrung von links nach rechts dargestellt bzw. der Weg des Virus duch die Zelle von oben nach unten. (nach Hampl und Mertens 2001)

Die IE-Proteine sind durchweg Transaktivatoren der E-Gene. Beim Nachweis von CMV mittels Kurzzeitkultur nach Inokkulation von Zellkultur mit Patientenproben ist deren Nachweis in virusinfizierten Zellen eine wesentliche Hilfe für eine beschleunigte Diagnose. Die E-Proteine sind häufig Enzyme der viralen Replikationsmaschinerie, darunter z.B. die für die antivirale Therapie wichtigen Enzyme (pUL97-Kinase, DNA-Polymerase). Erst die L-Proteine sind die eigentlichen Virusstruktur-Proteine. Ein Beispiel ist das Phosphoprotein ppUL83 (pp65), ein Tegument-Protein des CMV, das eine große Rolle bei der Schnelldiagnose der CMV-Infektion spielt.

Die Partikelbildung beginnt mit der Zusammensetzung der Kapside im Zellkern. In infizierten Zellen kann man dort drei unterschiedliche Kapsidformen unterscheiden. Typ A Kapside besitzen keine DNA und entstehen aufgrund eines Fehlers beim Verpacken des viralen Genoms. Typ B Kapside findet man vor allem im Kern infizierter Zellen. Bei ihnen handelt es sich um Vorläufer der reifen Kapside, denen ebenfalls die DNA fehlt. Statt dessen enthalten sie Gerüst- oder Strukturprotein.[8,26] Typ C Kapside sind vollständig ausgereifte Kapside, die das virale Genom enthalten.

Die Anlagerung des Teguments beginnt zunächst im Zellkern und ermöglicht dem Kapsid das Andocken an die innere Kernmembran. Das nun von einer Membran umhüllte Kapsid passiert den Raum zwischen innerer und äußerer Kernmembran, um mit letzterer zu verschmelzen und auf diese Weise mit einem ihm anhaftenden Rest an Tegumentproteinen ins Zytoplasma freigegeben zu werden. Dort wird dasTegument in zwei weiteren Schritten vervollständigt: Nach dem Durchtritt des Kapsids durch die Kernmembran lagern sich zunächst ppUL32 (basic phosphoprotein) (pp150), pUL48 (high molecular weight protein) (HMWP), ppUL82 (pp71) und ppUL83 (pp65) als erste Schicht dem Kapsid an, wobei ppUL32 im Zytoplasma kumuliert und mit dem Kapsid direkt interagiert.[4,50] Ko-Immunopräzipitationen zeigten eine Assoziation zwischen pUL47, pUL48 (HMWP), ppUL69 und dem wichtigsten Kapsidprotein pUL86 (major capsid protein) (MCP), die unabhängig von der Interaktion mit ppUL32 ist und von Bechtel und Shenk et al. zuerst beschrieben wurde.[5] Die zweite Schicht besteht aus ppUL83 (pp65), pUL25, pUL26 und ppUL99 (pp28), die sich in Golgi-assoziierten Strukturen dem Kapsid anlagern. Sanchez et al. zeigten 2000, dass ppUL32 zusammen mit ppUL99, ppUL83 und den drei Hüllproteinen gB, gH und gp65 in der Spätphase der Infektion in dem Trans-Golgi Netzwerk akkumuliert, welches sich in direkter Nachbarschaft zum Mikrotubulus-Organisationszentrum befindet. Dieses stabile Kompartiment scheint eine weitere bedeutende Station der Virion-Zusammensetzung zu sein.[39] ppUL83, pUL35 und pUL24 wiederum interagieren mit ppUL32.[41] Für den letzten Schritt der Partikelreifung, die Rekrutierung der lipidhaltigen Virushülle, ist offenbar ppUL99 verantwortlich. Eine große Anzahl an tegumentierten Kapsiden, die nicht umhüllt werden konnten sammelte sich bei Infektion mit einer Deletionsmutante im Zytoplasma an.[42] Nach dem Erwerb der Virushülle im Zytoplasma

wird das infektiöse Partikel aus der Zelle ausgeschleußt und kann weitere Zellen infizieren.

Neben den infektiösen Virionen werden in HCMV-infizierten Zellen noch zwei weitere nicht-infektiöse Partikelformen gebildet, NIEP's (noninfectious enveloped particles) und Dense-Bodies. Letztere bestehen zum größten Teil aus ppUL83 (pp65), haben eine Hülle und weder Nukleokapsid noch DANN.[20] Auf Grund der großen Menge, mit der pp65 produziert wird, eignet es sich hervorragend als diagnostischer Marker in der Klinik. NIEP's sind Viruspartikel, die scheinbar durch die Umhüllung von Typ B Vorläufer-Kapsiden entstehen. Sie unterscheiden sich elektronenmikroskopisch von den Virionen dadurch, dass ihnen der elektronendichte DNA-Kern fehlt.

1.6 Zelltropismus

Durch Doppelfärbungen wies C. Sinzger 1995 IE-, E- und L-Antigene des HCMV in Biopsieproben aus Lunge und Magen-Darm-Trakt von akut an HCMV erkrankten Patienten nach. Er zeigte so, dass in vivo Endothelzellen in Kapillaren und Venolen, glatte Muskelzellen, Drüsen- und Alveolarzellen epithelialen Ursprungs, neutrophile Granulozyten, Makrophagen sowie Fibroblasten des Bindegewebes infiziert werden.[43] Nach Einleitung einer antiviralen Therapie mit Ganciclovir waren die viralen Antigene nur noch in den Epithelzellschichten nachweisbar.[45] Anscheinend sind Endothelzellen und Makrophagen entscheidend für die hämatogene Streuung des Virus, während Fibroblasten, glatte Muskelzellen und Epithelzellen für die eigentliche Virusproduktion, das Aufrechterhalten der Infektion sowie eine effiziente Infizierung der verschiedenen Gewebe verantwortlich sind.[43]

Nun stehen der Forschung verschiedene Virusstämme zur Verfügung, die sich u.a. in der Fähigkeit unterscheiden, bestimmte Zelltypen zu infizieren. Dazu gehören AD169, Towne und klinische Isolate wie TB40E und F. Da AD169 der älteste Virusstamm ist, ist er auch der am besten untersuchte und der (noch) am häufigsten verwendete. Er wurde 1956 von Smith beschrieben.[46] 1996 konnten Cha et al. zeigen, dass ihm im Vergleich zum Toledo-Stamm 19 Gene fehlen, die durch die jahrzehntelange Passagierung in Fibroblasten abhanden kamen. Mit der Mutation eines der Gene UL128 - UL131 verlor er wahrscheinlich die Fähigkeit Endothelzellen und Makrophagen zu infizieren. Tatsächlich

konnten Wang und Shenk 2005 zeigen, dass ein Glykoprotein-Komplex aus pUL128, pUL130, gH und gL für die Infektion von Endothel- und Epithelzellen verantwortlich ist.[2] Ein alternativer Komplex aus gH, gL und gO scheint hingegen die Infektion von Fibroblasten zu ermöglichen.[54] Auch Towne wird schon seit langem passagiert und hat ebenfalls die Fähigkeit verloren, Endothelzellen zu infizieren. Dieser Stamm hat vier Gene mehr als AD169. Bei TB40 handelt es sich wie bei allen HCMV-Stämmen um ein Patientenisolat. Dieses wurde von C. Sinzger auf Fibroblasten isoliert und anschließend getrennt sowohl auf Fibroblasten als auch auf Endothelzellen passagiert.[44] So entstanden die beiden Virusstämme TB40F, der nur Fibroblasten infizieren kann, und TB40E, der zusätzlich noch Endothelzellen und Makrophagen infizieren kann.

1.7 US22-Genfamilie

Neben Glykoproteinen haben sich auch bestimmte Mitglieder der US22-Genfamilie als entscheidend für den Organ- bzw. Zelltropismus herausgestellt; so z.B. M139 – M141 beim Zytomegalievirus der Maus (MCMV). Mehrere Proteine sind Tegumentproteine. Daher soll an dieser Stelle kurz auf diese Gruppe von Genen eingegangen werden. Die US22-Genfamilie besteht sowohl bei HCMV als auch bei MCMV aus 12 Mitgliedern (UL23, UL24, UL28, UL29, UL36, UL43, TRS1, IRS1, US22, US23, US24 und US26) und wurde zuerst bei HCMV beschrieben. Alle Mitglieder der Genfamilie kodieren für Genprodukte, die zumindest eines von vier konservierten Aminosäuresequenz-Motiven besitzen.[12] Für die Motive I und II wurden Konsensussequenzen identifiziert, die kurze Abschnitte mit hydrophoben und geladenen Aminosäuren beinhalten. Die Funktion dieser Abschnitte ist noch nicht bekannt.

Die von der US22-Genfamilie kodierten Proteine erfüllen unterschiedliche Aufgaben. Einige haben transaktivierende Eigenschaften (z.B. TRS1/IRS1), andere können Einfluss auf den Wirtszelltropismus nehmen (z.B. MCMV M139, M140 und M141). Für UL36 wurde beschrieben, dass es für einen Supressor des programmierten Zelltodes (Apoptose) kodiert.

1.8 Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit werden zwei Aspekte des zur US22-Genfamilie gehörenden pUL24 näher untersucht. Zum einen soll der Expressionszeitpunkt von pUL24 in

infizierten Zellen sowie die Lokalisation des Proteins in transfizierten Zellen analysiert werden. Zum anderen wird das Wachstumsverhalten von Wildtyp-Virus und UL24-Deletionsmutanten auf Fibroblasten und Endothelzellen miteinander verglichen. Als Ausgangsmaterial dienten hierzu die zwei Virusstämme AD169 und TB40E und ihre entsprechenden Deletionsmutanten Delta UL24.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

- Zentrifugen:

Eppendorf Zentrifuge 5415C und D	Eppendorf, Hamburg
Heraeus Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau
Beckman J2-21	Beckman, München

- Ultrazentrifuge Beckman L7-65 — Beckman, München
- Brutschränke — Heraeus, Hanau
- Elektrophoreseapparaturen — Biometra, Göttingen
- Eppendorf Mixer 5432 — Eppendorf, Hamburg
- Eppendorf Thermomixer compact — Eppendorf, Hamburg
- Eppendorf Thermostat 5320 — Eppendorf, Hamburg
- Heizblock — Liebisch, Bielefeld
- Thermorührer IKA Mag Ret — IKA Labortechnik, Staufen
- Schüttler Reax 2 — Heidolph
- Pipetten Eppendorf — Eppendorf, Hamburg
- Pipetten Gilson — Middleton, WI, USA
- Mikroskope und Zubehör:

Invertmikroskop Nikon TMS	Nikon, Düsseldorf
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200	Zeiss, Jena
Fluoreszenzmikroskop Axioskop 2	Zeiss, Jena
Digitale Kamera Axio Cam MRc	Zeiss, Jena

- Bakterienschüttler Certomat IS — B. Braun Biotech, Melsungen
- Photometer:

Gene Quant	Pharmacia, Uppsala, Schweden
LKB NOVASPEC II	Pharmacia, Uppsala, Schweden

- Sterilbänke:

Lamin Air HBB 2472S	Heraeus, Hanau
Lamin Air HB 2472	Heraeus, Hanau

- Vortex VF 2 — Bachofer, Reutlingen
- Wasserbäder: — Köttermann, Hängsingen

Schüttelwasserbad GFL 1083	GFL, Burgwedel

Wasserbad (16°C)	LKB, Bromma, Schweden
• Waagen:	
PJ Precisa junior 500c	Digitana AG, Hamburg
Feinwaage AJ 100	Mettler
• Mikrowelle Bosch MG 800	Bosch
• Elektroporationsgerät:	
Pulse Controller	Biorad, Hercules CA, USA
Gene Pulser	Biorad, Hercules CA, USA
Nucleofector™ Device	Amaxa Biosystems, Köln
• Ultraschallgerät Sonifier B-12	Branson Sonic Power Company, Dansbury, CC,USA
• Semidryblotter Transblot SD	Biorad, Hercules CA, USA
• SDS-PAGE-Kammer	Biometra, Göttingen

2.2 Chemikalien

Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (30% und 0,8% w/v)	National Diagnostics, Hessle Hull, England
3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC)	Sigma, Deisenhofen
Agar	Difco, Detroit, USA
Ammoniumpersulfat	Bio-Rad Laboratories, München
BSA (Rinderserumalbumin)	Serva, Heidelberg
N,N-Dimethylformamid (DMF)	Merck, Darmstadt
ECL-Reagenz	Amersham, Buckinghamshire, England
EDTA-Lösung	Biochrom KG, Berlin
FCS (fötales Kälberserum)	Gibco BRL, Eggenstein
L-Glutamin (200 mM)	Biochrom KG, Berlin
Wasserstoffperoxid (30%)	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Saliter, Obergünzburg
Nickel-NTA-Agarose	Qiagen, Hilden
SDS	Serva, Heidelberg
TEMED	Serva, Heidelberg
Tris	USB, Cleveland, Ohio, USA
Trypsin-EDTA-Lösung	Gibco BRL, Eggenstein

Tween 20	Sigma, Deisenhofen
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
DTT	Roth, Karlsruhe

2.3 Antikörper

2.3.1 Primäre Antikörper

α-UL69 Antiserum: eingesetzt in 1:2000 (Immunfluoreszenz) bzw. 1:5000 (Western Blot) Verdünnungen	Winkler et al., 1994 [56]
α-pUL69, Mab 69-66, Maus	W. Britt, nicht publiziert
α-ppUL82 bzw. pp71, Mab CMV 355, Maus	Nowak et al., 1984 [34]
α-Vimentin, Mab Ab-1, Maus, Stock:100ng/µl, WB: 1µg/ml	Oncogene, Boston
α-HA, Mab 12CA5, Maus, WB: 1:1000	Niman et al.,1983 [33]
α-Myc, Mab 9E10, Maus	Evan et al., 1985 [13]
α-UL25, Mab CK25, aufgereinigt, Maus, WB : 1 :400	Battista et al.,1999 [3]
α-UL23, Mab266, Maus, unverdünnt	Adair et al., 2002 [1]
α-UL24, Mab116, Maus, unverdünnt	Adair et al., 2002 [1]
α- UL32 bzw. pp150, Mab XP-1, Maus, WB: 1:2000	Ripalti et al., 1994 [38]
α-His, Mab AH6, Maus	Qiagen, Hilden
α-UL83 bzw. pp65, Mab AAC10, Maus	DAKO, Glostrup, Dänemark
α-UL99, Mab 41-18, unverdünnt	Waldo et al., 1989 [53]

2.3.2 Sekundäre Antikörper

Kaninchen-anti-Maus, HRP-gekoppelt, polyklonal,	DAKO, Glostrup, Dänemark
FITC-konjugiertes F(ab')-anti-Maus Fragment	Dako, Glostrup, Dänemark

2.4 Zellen

HFF: primäre humane Vorhautfibroblasten

HUVEC: humane umbilikal-venöse Endothelzellen Cambrex Company, Verviers, Belgium

2.5 BAC's (bacterial artificial chromosome)

- TB4 UL24-EYFP 11-1: Virus mit C-terminaler Fusion eines EYFP-Proteins mit UL24 Winkler, 2003, nicht veröffentlicht
- TB4 d24 1-1 Winkler, 2003, nicht veröffentlicht
- pHB15 Hobom et al.,2000, hergestellt aus dem gut charakterisierten attenuierten Laborstamm AD169 Rowe et al., 1956
- TB40E4 Dr. G.Hahn, LMU München, nicht publiziert, hergestellt aus dem von einem Knochenmarkstransplantatempfänger isolierten Stamm TB40E Sinziger et al., 2000
- HCMV-AD169-UL24-HA: Mutierter Laborstamm AD169 mit HA-Epitop am C-Terminus von UL24 Pretsch, 2002, nicht publiziert
- TB40E4-delta24 Winkler, 2003, nicht publiziert
- pHB15-delta24 Pretsch, 2002, nicht publiziert
- Baculo-His-UL24: rekombinantes Baculovirus, das für ein His-UL24 Fusionsprotein kodiert Pretsch, 2002, nicht publiziert
- Baculo-UL69: rekombinantes Baculovirus das für das virale Protein UL69 kodiert Pretsch, 2003, nicht publiziert

2.6 Plasmide

- pcDNA3: Eukaryoter Expressionsvektor mit CMV-Promotor, SV40 ori, Apr und Neor Invitrogen GmbH, Karlsruhe
- pcDNA3-UL24: Der UL24-ORF aus pBK-UL24-full wurde über EcoRI und BamHI in pcDNA3 kloniert Pretsch, 2002, nicht veröffentlicht
- pcDNA3-Myc-N: pcDNA3-basierendes Plasmid, in das über EcoRI/HindIII ein N-terminales Myc-tag (EcoRI/HindIII-Fragment aus pJ3M) einkloniert wurde Pretsch, 2002, nicht veröffentlicht
- pcDNA3-Myc-N-UL24: Enthält den UL24-Leserahmen aus pBK-UL24-full, der nach EcoRI/BamHI-Verdau in pcDNA3-Myc-N ligiert wurde. Pretsch, 2002, nicht veröffentlicht
- pEYFP-C1: Eukaryoter Expressionsvektor mit CMV-Promotor, SV40-Promotor und Knr Clontech, Pao Alto, CA, USA
- pEYFP-C1-UL24: Auf pEYFP-C1-basierendes Expressionsplasmid zur eukaryoten Expression eines UL24-EYFP-Fusionsproteines Pretsch, 2002, nicht veröffentlicht

2.7 Sonstige Verbrauchsmaterialien

Polymax RT Entwickler/Fixierer (Kodak)	Sigma, Deisenhofen
Kodak X-Omat Röntgenfilme	Sigma, Deisenhofen
Superfect™ Transfection Reagent	Qiagen, Hilden
Zellkultur Plastikwaren	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Vectashield Mounting Medium	Vector, Burlingame, CA, USA
Falcon Röhrchen	Becton Dickinson, NJ, USA
Whatman Filterpapier 3MM	Whatman, Maidstone, GB
Precision Plus ProteinTM All Blue	Biorad, Hercules, CA, USA #161-0373
Immun-BlotTM PVDF Membran	Biorad, Hercules, CA, USA #162-0177
Deckgläser (13mm ∅) Assistent	Glaswarenfabrik Karl Knecht KG, Sondheim

2.8 Medien und Standardlösungen

2.8.1 Zellkultur

- MEM-komplett:
  500 ml MEM (Gibco BRL, Eggenstein)
  10 % FCS (v/v)
  1% Penicillin/Streptomycin (v/v)
  1% Glutamin (v/v)
- Sucrose-Phosphatpuffer:
  74,62 g Sucrose
  1,218 g K_2HPO_4
  0,52 g KH_2PO_4
  ad 1 l bidest H_2O, autoklaviert.
- 0,01 M PBS:
  150 mM NaCl
  1 mM KH_2PO_4
  mit NaOH auf pH 7,8 eingestellt
- 0,01 M PBS / EDTA:
  0,01 M PBS
  1% EDTA Stammlösung (v/v) (Biochrom, Berlin)
- 0,01 M PBS / BSA:
  0,01 M PBS
  1% BSA (v/v) (Serva, Heidelberg)

- Trypsin Seromed, Berlin
- Trypsin für Endothelzellen Cambrex Company, Verviers, Belgium
- EBM: Medium für Endothelzellen Cambrex Company, Verviers, Belgium
- Trypsin-Neutralisations-Puffer Cambrex Company, Verviers, Belgium
- Kollagen SIGMA-ALDERICH Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

2.8.2 Western Blot

- 5x SDS-Probenpuffer:
  200 mM Tris
  5 mM EDTA
  1 M Sucrose
  0,1 % Bromphenolblau (w/v)
  1 mM DTT
  pH 8,8 mit HCl eingestellt.
- Semi Dry Puffer:
  2,9 g Glycin
  5,8 g Tris
  3,3 ml 10% SDS (v/v)
  200 ml Methanol
  1L H_2O
- 10x Laufpuffer (Laemmli):
  20 g SDS
  288 g Glycin
  60,6 g Tris
  2L H_2O
  zum verdünnen bidest-Wasser nehmen
- 1fach PBS/0,1%Tween:
  900 ml H_2O (bidest)
  100 ml 10fach PBS
  1 ml Tween

Tabelle 1: Zusammensetzung von Natriumdodecylsulfat (SDS)- Polyacrylamidgelelektrophorese (Page)-Gelen zur Durchführung von Westernblots

Ammoniumpersulfat (APS); Chlorwaaserstoff (HCL); N,N,N',N' – Tetramethylethylendiamin (TEMED); Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)

Lösungen	10 % (1x)	12,5 % (1x)	Sammelgel (2x)
30 % Acrylamid/ 0,8 % Bisacrylamid	2,7 ml	3,37 ml	1,3ml
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	2 ml	2 ml	-
1,0 M Tris/HCl pH 6,8	-	-	0,5 ml
10 % SDS	80 µl	80 µl	80 µl
H_2O	3,28 ml	2,51 ml	6,0 ml
TEMED	4 µl	4 µl	8 µl
10 % APS	40 µl	40 µl	80 µl

2.9 Zellkultur

Für die Experimente wurden menschliche Vorhaut-Fibroblasten männlicher Neugeborenen (human foreskin fibroblasts, HFF) verwendet. Die Zellen wurden nicht mehr als 25 Mal passagiert. Sie wuchsen mit Hilfe von Minimal Essential Medium (MEM), dem fötales Kälberserum, Penicillin/Streptomycin und Glutamin hinzugefügt wurde, in 75cm^2 großen sterilen Kunststoffflaschen bei 37°C, 5% CO_2 und 90% relativer Luftfeuchtigkeit. Das Medium wurde alle 7 bis 10 Tage gewechselt.

Für die Wachstumskurven wurde zusätzlich mit humanen umbilikal-venösen Endothelzellen (HUVEC) gearbeitet, die kommerziell erworben wurden. Sie wurden in „endothelial basal“ Medium (EBM), dem ebenfalls fötales Kälberserum, Penicillin/Streptomycin und Glutamin zugesetzt wurde, gehalten. Die Kulturgefäße, in denen die Zellen wachsen sollten, wurden mit Kollagen vorbeschichtet indem sie mit einer 1:100 verdünnten Kollagenlösung (SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH) für 30 min bei 37°C inkubiert wurden. So konnten die Zellen adhärieren und einen konfluenten Zellrasen bilden. Das Medium wurde hier alle 2 Tage gewechselt.

Um die Zellen zu passagieren, mussten sie zuerst vom Boden der Flasche abtrypsiniert werden. Danach wurden die Zellen in 10ml Medium aufgenommen. Je nach weiterem Vorgehen konnten die Zellen nun in neue 75 cm^2 große Kunststoffflaschen ausgesät (neue Passage), in 24-Loch-Platten (Wachstumskurven/Immunfluoreszenz/Elektronenmikroskopie) oder in Petrischalen à 10 cm Durchmesser (Western Blot) ausgesät werden.

Zur Infektion wurden die Zellen 1:1,4 verdünnt ausgesät. Die Infektion selbst verlief wie folgt: Man berechnete die benötigte Virusmenge anhand der geschätzten Zellzahl (ca. 10^5 pro well) sowie des Titers des Virusstocks. Da letzterer Sucrosephosphat enthält, wurde er mindestens 1:60 verdünnt, damit die Zellen keinen Schaden nehmen. Für die Western Blots, die Elektronenmikroskopie und die Immunfluoreszenz wurden die Zellen mit einer multiplicity of infection (MOI) von 1 infiziert, d.h., auf eine Zelle kommt ein infektiöses Partikel. Für die Wachstumskurven wurde mit verschiedenen MOI’s experimentiert. Der Mastermix, bestehend aus Virus mit Sucrosephosphat und MEM, wurde auf die Zellen gegeben und bei RT für 30 min mit 1800 rpm zentrifugiert. Nach weiteren

2-4h Inkubation wurde das Medium erneut gewechselt. Parallel dazu wurden Zellen zur Kontrolle Mock-infiziert, d.h. anstelle des Mastermixes wurden den Zellen nur MEM gegeben. Im Folgenden werden sie jedoch wie die infizierten Zellen behandelt, inklusive Waschschritte, Antikörperinkubationen und Färbereaktionen. Nach der Infektion wurden die Zellen bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

2.10 Wachstumskurven

Die HFF wurden wie oben beschrieben in 24-Loch-Platten im Doppelansatz (A und B) ausgesät und mit dem Wildtyp des TB4-Stammes (TB40E-4 vom 08.10.02; Titer: $5x10^6$) sowie mit der Deletionsmutante (TB4Δ24 vom 26.04.04; Titer: $3x10^7$) infiziert. Der Stamm TB40E leitet sich von einem Patientenisolat ab und verfügt noch über die Fähigkeit, Endothelzellen zu infizieren. An den Tagen 1, 3, 5, 7 und 10 post infectionem (p.i.) wurde der Überstand (450µl) von den entsprechenden Löchern abgenommen, zu 450µl vorpipettiertem Sucrosephosphat gegeben, durchmischt und dann bei –70°C eingefroren. Nach Ernte aller Überstände wurden sie titriert, um die enthaltene Virusmenge zu bestimmen. Dazu wurden die Überstände in 10fach Verdünnungsreihen verdünnt und für die Infektion von 96-Loch-Platten in 3fach Ansätzen verwendet. Anschließend wurden die Zellen für 30 min mit 2000 rpm zentrifugiert und 5 Tage im Brutschrank inkubiert. Nach Fixation mit eiskaltem Methanol wurden die Zellen zuerst mit dem kommerziellen Maus-Primärantikörper Mab AAC10, der gegen das „späte“ Protein pp65 gerichtet ist, für eine halbe Stunde bei 37°C inkubiert, um nach mehrmaligem Waschen mit PBS mit einem Horseraddish-peroxidase (HRP) -gekoppelten Kaninchen-Sekundärantikörper, der gegen Maus-Antikörper gerichtet ist, abermals für 30min bei 37°C inkubiert zu werden. Die Färbelösung, bestehend aus 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC), N,N-Dimethylformamid (DMF), Acetatpuffer (pH 5) und H_2O_2, machte den Protein-Antikörperkomplex in den infizierten Zellen sichtbar. Die ausgezählten plaque forming units (PFU) entsprachen der im Überstand enthaltenen Virusmenge und wurden auf das entsprechende Kulturvolumen umgerechnet.

Bei der HUVEC-Wachstumskurve erfolgte die Infektion analog zu den HFF. Allerdings wurden die Zellen nach Infektion nicht zentrifugiert, da sonst der Defekt der UL24-Deletionsmutante nicht nachweisbar war. Die HUVEC-spezi-

fischen Besonderheiten in der Zellkultur wurden wie oben beschrieben berücksichtigt. Das Medium wurde alle zwei Tage abgenommen, mit der gleichen Menge Sucrosephosphat vermischt und auf –70°C eingefroren. Anschließend wurde das entnommene Volumen mit frischem Medium aufgefüllt. Um die im Überstand enthaltene Virusmenge zu bestimmen, wurden wieder HFF in 96-Loch-Platten ausgesät und im Dreifachansatz in 10 Verdünnungsstufen mit dem Überstand infiziert. Nach der Methanolfixierung und sich anschließender Färbung wurden die PFU ausgezählt und die PFU der einzelnen Zeitpunkte kumulativ addiert.

Bei der Infektion der Zellen wurden immer konstante Volumina des Virusstocks eingesetzt. Bei der Rücktitration ergaben sich in Bezug auf die absolute Menge der eingesetzten Viruspartikel geringfügige Unterschiede. So erklären sich die leicht unterschiedlichen MOI's.

2.11 Immunfluoreszenz

Mit der indirekten Immunfluoreszenz kann man die intrazelluläre Lokalisation von Proteinen sichtbar machen. Dabei spielt es keine Rolle, ob es sich um infizierte oder transfizierte Zellen handelt. Wir führten die Versuche an transfizierten Zellen durch. Dazu wird ein Gen, das für ein virales Protein kodiert, mittels eines Vektors in die Zelle eingeschleust, die es sodann exprimiert. Da es viele verschiedene Vektoren gibt, die zum Teil auf ganz unterschiedlichen Mechanismen beruhen und oft kontrovers diskutiert werden, haben wir im Vorfeld einige Transfektionsverfahren getestet: Fugene und Superfect als lipophile Transkektionsagenzien, DEAE-Dextran, Polyethylenimin und die Elektroporation. Letztere hat sich als am effizientesten erwiesen: Dabei werden abtrypsinierte Zellen zusammen mit der zu transfizierenden DNA in eine Küvette gegeben und diese für den Bruchteil einer Sekunde einer Spannung von 280V ausgesetzt. Anschließend wurden die transfizierten Zellen in die mit den Deckgläsern vorbereitete 24-Loch-Platte ausgesät.

5 Tage nach Infektion, bzw. 2 Tage nach Transfektion wurden die Zellen für 10 Minuten mit Paraformaldehyd fixiert und nach 4-maligem Waschen mit 0,01M PBS für 2 Minuten mit PBS/Triton permeabilisiert. Nach drei weiteren Waschgängen mit 0,01M PBS wurden die unspezifischen Bindungsstellen mit Pferdeserum abgesättigt. Sodann wurden die Zellen für mindestens eine halbe Stunde

mit dem ersten Antikörper α-myc (9E10, Maus) bzw. α-UL24 (Mab116, Maus) inkubiert. Nach drei Waschschritten wurden die Zellen parallel mit dem 2. Antikörper (α-Maus FITC) und DAPI zur Darstellung des Zellkerns wieder für mind. eine halbe Stunde inkubiert. Um überschüssigen nicht gebundenen Antikörper zu entfernen, wurden sie weitere drei Male gewaschen, bevor sie, mit einem Tropfen Mounting Medium Vector H-1000 versehen, auf Objektträger aufgebracht wurden.

2.12 Western Blot

Mittels Western Blot kann man Proteine elektrophoretisch in einem Gel nach ihrer Größe auftrennen und später sichtbar machen. Dazu wurden HFF in Petrischalen à 10cm Durchmesser ausgesät und nach einer Nacht in der Zellkultur mit einer MOI von 1 infiziert. Zum jeweiligen Erntezeitpunkt wurden die Zellen in den Petrischalen zunächst mit 2-4ml sterilem PBS gewaschen, anschließend unter Zugabe von 1ml PBS abgeschabt und schließlich in PBS aufgenommen. Nachdem die Zellen 5 min mit 5000 rpm zentrifugiert worden waren, konnte man den Überstand abnehmen und die Zellen entweder sofort weiterverarbeiten oder aber vorläufig einfrieren.

Für die elektrophoretische Auftrennung wurde das Zell-Pellet in PBS resuspendiert, das halbe Volumen an 5fachem SDS-Probenpuffer zugegeben und für 1 min bei 95°C aufgekocht. Das gewonnene Zelllysat wurde bei 40V über Nacht in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das eigentliche Blotten des Gels auf die PVDF-Membran geschah im Semi-Dry-Verfahren bei 23V über 50 min. Dabei wurde der Blot von unten nach oben wie folgt aufgebaut: 3 in Semi-Dry-Puffer getränkte Whatman-Papiere, Immunblot™ PVDF Membran, Proteingel und 3 weitere Lagen in Semi-Dry-Puffer getränkte Whatman-Papiere.

Nach dem Blot wurde die PVDF-Membran in 3%ige Magermilchlösung mit PBS/Tween als Basis eingelegt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Die Membran wurde für mindestens eine Stunde mit Primärantikörpern, die mit 1%iger Milchpulverlösung verdünnt wurden, inkubiert. Bei den Primärantikörpern handelte es sich um AK gegen UL23, UL24, UL25, UL99 sowie gegen Vimentin. Nach drei Waschschritten wurden auch die Sekundärantikörper, die entweder HRP-gekoppelt oder Alkaline Phosphatase (AP)-gekoppelt waren, mit 1%iger Milchlösung verdünnt und die PVDF-Membran für eine weitere

Stunde darin inkubiert. Drei weitere Waschschritte später wurde der Protein-Antikörperkomplex dann mittels des Enhanced Chemilumineszenz Westernblot Detektionssystems (ECL) (Amersham) sichtbar gemacht. Dazu wurden je 2,5ml von beiden Lösungen vermischt und auf die Membran geträufelt und 1 min inkubiert. Je nach Signalstärke wurde der Röntgenfilm anschließend unterschiedlich lang belichtet.

2.13 Elektronenmikroskopie

Auch hier wurden konfluente HFF in 6-Loch-Platten mit einer MOI von 1 infiziert. Nach 5 Tagen Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen mit 1ml 2,5%igem Glutaraldehyd pro Loch fixiert und für mindestens 20 Minuten nicht bewegt. Die Einbettung in Kunstharz und das Anfertigen der Schnitte übernahm freundlicherweise die Zentrale Einrichtung Elektronenmikroskopie der Universität Ulm unter der Leitung von Prof. Walther. Die fertigen Schnitte wurden dann 5 Minuten mit 2%igem Uranylacetat kontrastiert, drei Mal in Wasser gewaschen, 1 Minute mit 0,3%igem Bleicitrat kontrastiert und schließlich weitere drei Male in Wasser gewaschen, bevor sie unter dem Elektronenmikroskop ausgewertet werden konnten.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung des Genprodukts von UL24

3.1.1 Expressionskinetik des UL24-Proteins

Zunächst wurde untersucht, wann das UL24-Protein während des Replikationszyklus von HCMV exprimiert wird. Dazu wurden humane Fibroblasten mit HCMV UL24-HA infiziert, das auf dem Laborstamm AD169 basiert und ein UL24 enthält, das am C-Terminus mit einem HA-Epitop fusioniert worden war. Nach 24, 48, 72 und 96 Stunden wurden Zellextrakte geerntet, mittels PAGE aufgetrennt und geblottet. Die Membran wurde mit dem Antikörper gegen das HA-Epitop des UL24-HA-Fusionsprotein inkubiert. Nach 96 Stunden sah man eine Bande bei 40 kD, der erwarteten Größe von pUL24 (s.Abb.4a). In den nicht infizierten Zellen (Mock) waren keine Bande dieser Größe zu erkennen. Die restlichen sichtbaren Banden waren unspezifisch, da sie auch bei den nicht infizierten Zellen auftraten. Sie beruhten wahrscheinlich auf einer Kreuzreaktion des Antikörpers mit zellulären Proteinen.

Um die Kinetik der pUL24-Expression mit einem anderen späten, viralen Protein zu vergleichen, wurde die Membran mit einem monoklonalen Antikörper gegen ppUL99 (pp28), 41-18, inkubiert (s.Abb.4b). Nach 72 Stunden sah man eine schwache Bande bei 28 kD und nach 96 Stunden eine stärkere. Auch hier waren in den nicht infizierten Zellen keine Bande bei 28 kD zu erkennen.

Um zu überprüfen, ob die einzelnen Spuren gleichmäßig mit Protein beladen waren, wurde die Membran mit einem Antikörper gegen Vimentin, ein Intermediärfilament mesenchymalen Ursprungs, das als zellulärer Marker dient, inkubiert. Die entsprechenden Banden waren in gleicher Stärke nach 24, 48, 72 und 96 Stunden zu sehen (s.Abb.4c). Bei den nicht infizierten Zellen (Mock) war die Bande ein wenig stärker ausgeprägt.

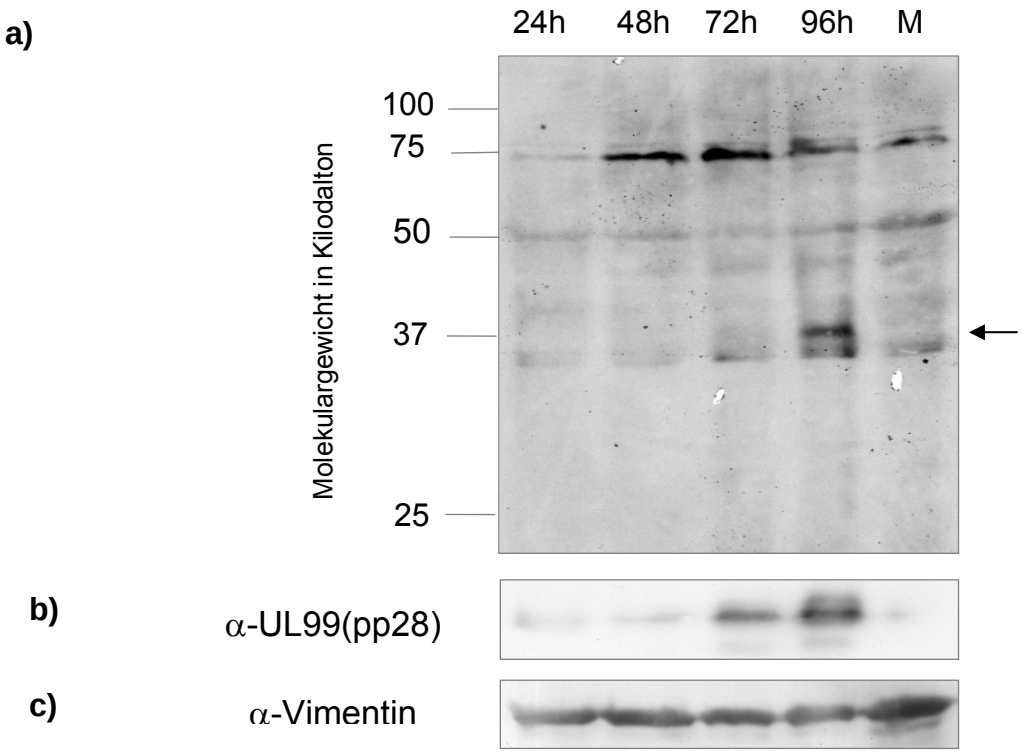

Abbildung 4: Expressioskinetik von UL24

mit Humanem Zytomegalievirus (HCMV) UL24-HA infizierte und zur Kontrolle nicht infizierte (M) Humane Fibroblasten (HFF) wurden 24, 48, 72 und 96 Stunden (h) nach Infektion geerntet. Die Zeitpunkte sind über der Abbildung angegeben. Ein Pfeil zeigt die für pUL24 spezifische Bande. Das Molekulargewicht ist links angegeben. Zur Kontrolle wurde der Blot auch mit Antikörpern gegen ein spätes Protein (α-UL99; b) und ein zelluläres protein (α-Vimentin; c) gefärbt.

So zeigten wir, dass UL 24 mit später Kinetik exprimiert wird. Dabei konnten wir sowohl ein vermeintliches Hervortreten der 40 kD (pUL24) und der 28kD (ppUL99) Banden durch ein eventuell ungleichmäßiges Beladen der Spuren ausschließen, als auch den spezifischen Charakter dieser Banden für die infizierten Zellen bestätigen.

3.1.2 Lokalisation des UL24-Proteins

Mit Hilfe der Immunfluoreszenz sollte ermittelt werden, wo genau in der Zelle pUL24 lokalisiert ist. Dazu wurden HFF-Zellen mittels Elektroporation mit dem Plasmid pcDNA3-UL24 transfiziert und so eine Überexpression von UL24 induziert und diese mit dem Antikörper α-UL24 sichtbar gemacht. Des Weiteren habe ich die Expressionsplasmide pcDNA3-Myc-N-UL24 und pEYFP-C1-UL24, die für die Fusionsproteine MycUL24 bzw. EYFP-UL24 kodieren, transfiziert.

Myc ist ein Epitop mit einer Länge von ca. 10 Aminosäuren. EYFP ist eine spektrale Variante des grün-fluoreszierenden Proteins (GFP) und hat eine Länge von ca. 240 Aminosäuren. Die Transfektion mit pcDNA3-Myc-N-UL24 und die anschließende Darstellung mit α-Myc lieferten die gleichen Ergebnisse wie die Transfektion mit pcDNA3-UL24 mit der anschließenden Darstellung durch α-UL24. Die Transfektion mit pEYFP-C1-UL24 zeigte eine ausschließlich zytoplasmatische Lokalisation. Das Fusionsprotein besitzt eine Größe, die eine einfache Diffusion durch die Kernporen nicht mehr erlaubt, so dass wahrscheinlich der nukleozytoplasmatische Transport beeinträchtigt ist. Daher haben wir uns entschlossen diese Aufnahmen nicht zu zeigen.

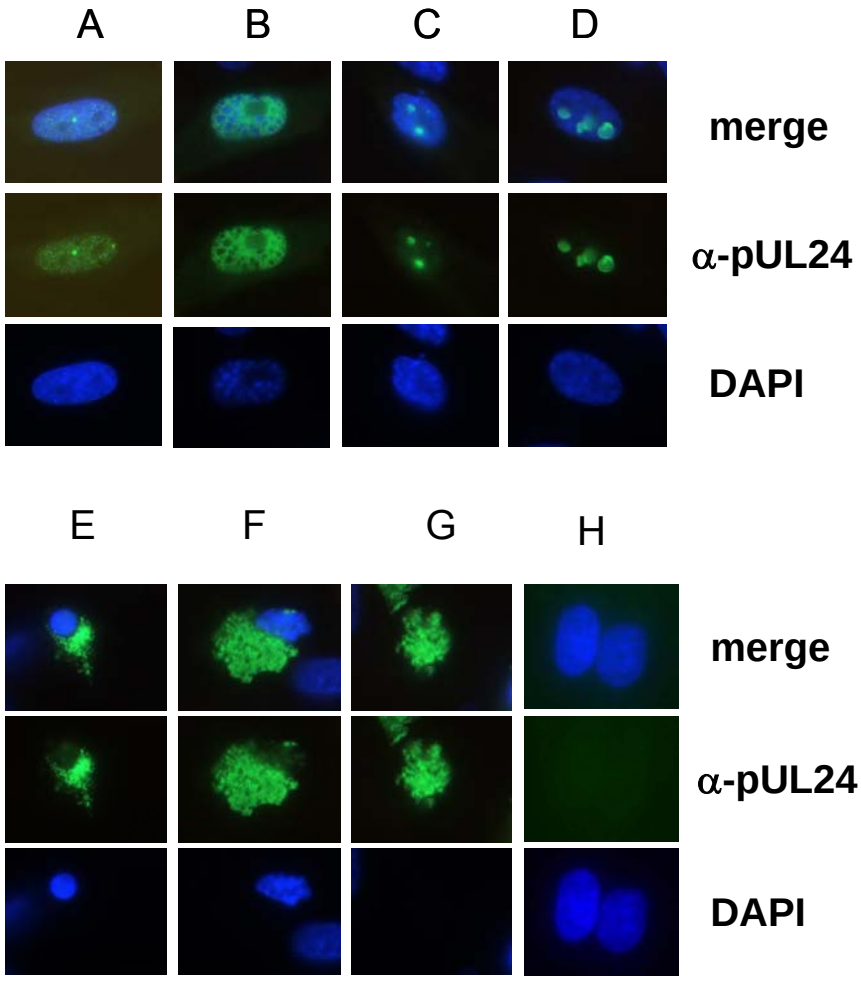

Abbildung 5: Lokalisation von UL24 in transfizierten humanen Fibroblasten (HFF)

Die Abbildungen A bis H zeigen Ausschnitte aus Aufnahmen von mit pcDNA3-Myc-N-UL24 transfizierten HFF, die wir gleichzeitig nebeneinander beobachteten. Nach der Transfektion wurde UL24 mit α-pUL24 (grün) als 1. Antikörper - hier in der mittleren Zeile - und der Zellkern mit DAPI (blau) - hier in der unteren Zeile - dargestellt. Die obere Zeile (merge) zeigt die Fusion der Aufnahmen aus der unteren mit denen aus der mittleren Zeile.

Die Lokalisationen bei den mit pcDNA3-Myc-N-UL24 transfizierten und anschließend mit α-UL24 Antikörper inkubierten Zellen waren sehr uneinheitlich. Auf den Abbildungen 5a und b sieht man ein diffus über den ganzen Kern verteiltes Signal, das auf 5b bestimmte nukleäre Strukturen ausspart. Bei 5c und d sieht man einige wenige intranukleäre Einschlüsse. Auf 5e und f kann man eine fast ausschließlich extranukleäre Lokalisation erkennen. Zudem erscheinen die Kerne durchweg deformiert zu sein. Die Lokalisation in der Abbildung 5g ist nicht klar zu beschreiben. Die Struktur des gefärbten Materials entspricht der zytoplasmatischen Lokalisation von pUL24 in Abb. 5f. Allerdings konnte in der Umgebung kein Zellkern dargestellt werden, so dass man nicht mit letzter Sicherheit sagen kann, ob es sich um eine zytoplasmatische oder extrazelluläre Lokalisation handelt. Bei 5h handelt es sich um eine Zelle, die keine DNA aufgenommen hat und somit UL24 nicht exprimiert. Verteilungsmuster, wie sie auf den Abbildungen 5c,d und 5e,f zu sehen sind, konnten ungefähr zu gleichen Teilen beobachtet werden und überwogen insgesamt bei weitem. Zellen, wie sie in den Abbildungen 5a,b und 5g,h zu sehen sind, waren eher selten und machten jeweils ca. 5% der dargestellten Zellen aus. Zur Kontrolle wurden parallel dazu Transfektionen mit pUL69 durchgeführt, die die erwartete nukleäre Lokalisation zeigten.

Somit zeigte sich pUL24 in transfizierten Zellen sowohl intranukleär als auch zytoplasmatisch lokalisiert. Daneben beobachten wir häufig eine Zellkerndegeneration, dies jedoch vor allem, wenn sich pUL24 im Zytoplasma befand.

3.2 Charakterisierung von UL24-Deletionsmutanten

Um mehr über die biologische Bedeutung von UL24 zu erfahren, wurden rekombinante Viren mit Deletion des UL24-Leserahmens charakterisiert.

3.2.1 Expression der Nachbargene

Zunächst wurde untersucht, ob und wie sich die Deletion von UL24 auf die Expression der Nachbargene UL23 und UL25 auswirkt. Dazu wurden HFF-Zellen mit dem Wildtypvirus und der Deletionsmutante (AD169) infiziert, nach 96 Stunden geerntet, lysiert und auf einem Proteingel aufgetrennt. Anschließend wurde die geblottete Membran je einmal mit einem α-UL23, α-UL24, α-UL25 sowie mit α-UL99 (pp28) Antikörper inkubiert. Bei α-UL24 sah man beim Wildtyp eine

Bande von 40kD (s.Abb.6a), keine entsprechende bei Δ24 und Mock. Bei α-UL25 sah man beim WT eine Bande, die der Größe von pUL25 entspricht (s.Abb.6b) und wiederum keine entsprechende Bande bei Δ24 und Mock. Der Nachweis von UL23 mit dem Antikörper α-UL23 ist nicht gelungen, da kein Signal detektiert wurde. Die Arbeitsgruppe um Derrick J. Dargan, von der wir den Antikörper hatten, hatte mit diesem Antikörper auch keine Ergebnisse erhalten (Persönliche Mitteilung von Derrick J. Dargan). Entweder wurde das Protein in zu geringer Menge exprimiert oder aber der Antikörper war fehlerhaft.

Um ausschließen zu können, dass die Deletion nicht auch weiter entfernt liegende Gene in ihrer Expression beeinflusst, wurde wie schon bei der Expressionskinetik ppUL99 als klassisches Lateprotein nachgewiesen, dessen Lage im HCMV-Genom weit von UL24 entfernt liegt, so dass seine Expression durch die Deletion nicht beeinflusst werden sollte. Tatsächlich sah man sowohl beim Wildtyp als auch bei der Deletionsmutante eine Bande bei 28 kD (s.Abb.6c).

Die Ergebnisse zeigen, dass die die Expression von UL25 durch die Deletion von UL24 zum Erliegen kommt, während die Expression von einem im HCMV-Genom weiter entfernten Gen wie UL99 nicht beeinträchtig wird. Die Rolle der Deletion von UL24 für die Expression von UL23 konnte nicht geklärt werden.

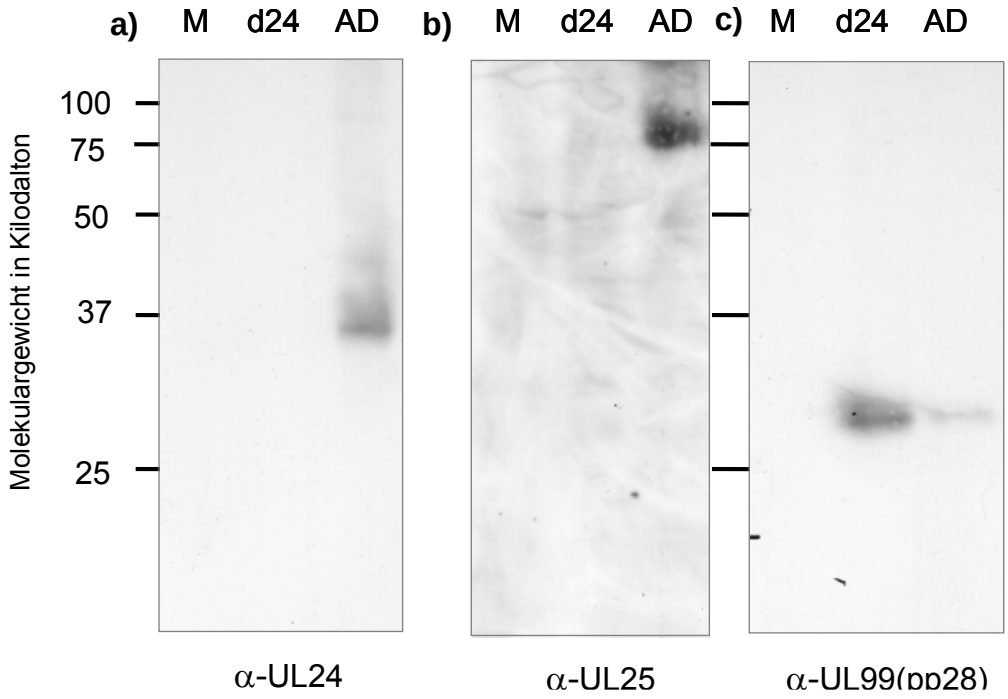

Abbildung 6: Auswirkung der Deletion von UL24 auf die Expression von UL25 und UL99

Humane Fibroblasten wurden mit dem Wildtyp (AD) und der Deletionsmutante (d24) des humanen Zytomegalievirus sowie - zur Kontrolle - nicht (M) infiziert. Die Zellen wurden 96 Stunden nach Infektion geerntet, aufgetrennt und die viralen Proteine pUL24 bei a) mit α-pUL24, pUL25 bei b) mit α-pUL25 und pUL99 bei c) mit α-pUL99 als erstem Antikörper dargestellt.

3.2.2 Replikation in Fibroblasten

Um herauszufinden, ob die Deletionsmutante langsamer oder genauso schnell wächst wie der WT, wurde eine Wachstumskinetik durchgeführt. Außerdem wollten wir wissen, ob es einen Unterschied zwischen dem Laborstamm AD169 und dem klinischen Isolat TB40E gibt. Dazu wurden HFF jeweils mit einer MOI von 1 infiziert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Infektion wurden Überstände geerntet und titriert. Bei der Wachstumskurve der mit AD169 und dem Deletionsvirus AD169 ΔUL24 infizierten HFF sah man 7 Tage nach Infektion (d.p.i.) eine geringfügige Differenz der absoluten Virusmenge, die von den infizierten Zellen ins Medium abgegeben worden war. Nach 10 Tagen p.i. betrug diese Differenz ca. eine Log-Stufe (s.Abb.7).

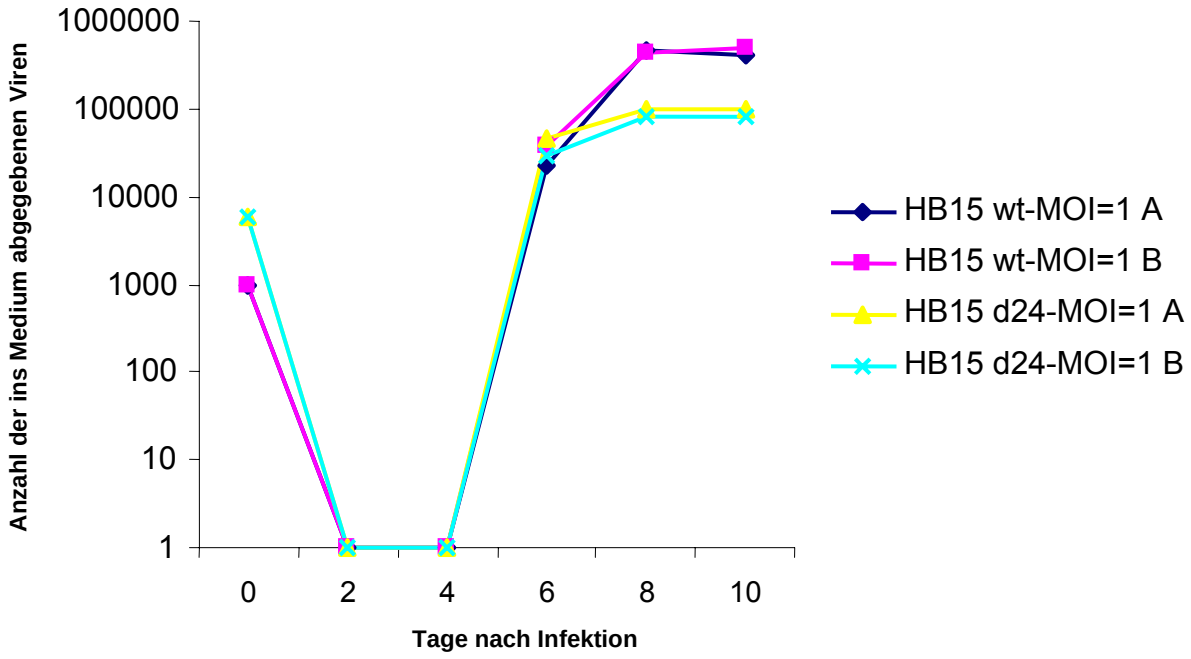

Abbildung 7: Auswirkung der Deletion von UL24 im Laborstamm AD169 auf das Replikationsverhalten in Humanen Fibroblasten (HFF)

HFF wurden mit dem Wildtyp (wt) und der Deletionsmutante (d24) des Stamms AD169 (HB15) des humanen Zytomegalievirus im zweifach-Ansatz (A und B) mit einer Multiplizität der Infektion (MOI) gleich 1infiziert. Die Überstände wurden 2,4,6,8 und 10 Tage nach Infektion geerntet und titriert. Die schwarze und rote Kurve stellen die über die Zeit aufgetragenen Viruspartikel dar, die in den Überständen der mit dem wt infizierten HFF vorhanden waren. Die gelbe und blaue Kurve geben den Verlauf der von den mit der Deletionsmutante infizierten HFF ins Medium abgegebenen Viren wieder.

Bei der Wachstumskurve der mit TB40E und der entsprechenden Deletionsmutante TB40E-Δ24 infizierten HFF bot sich ein ähnliches Bild. Allerdings war das Virus hier auch an den Tagen 1 und 3 im Überstand nachweisbar, obwohl

noch kein Virus neu repliziert sein konnte, da der Replikationszyklus ca. 96 Stunden dauert (s.Abb.8). Dies könnte zum einen auf ungenügendes Waschen der Zellen nach der Infektion, zum anderen auf von den Zellen bei der Infektion aufgenommene Viruspartikel, die in den ersten Tagen unverändert wieder ins Medium abgegeben werden, zurückzuführen sein. Insgesamt zeigten die Deletionsviren keinen signifikanten Wachstumsdefekt in HFF, und zwischen den beiden Stämmen waren keine nennenswerten Unterschiede zu erkennen.

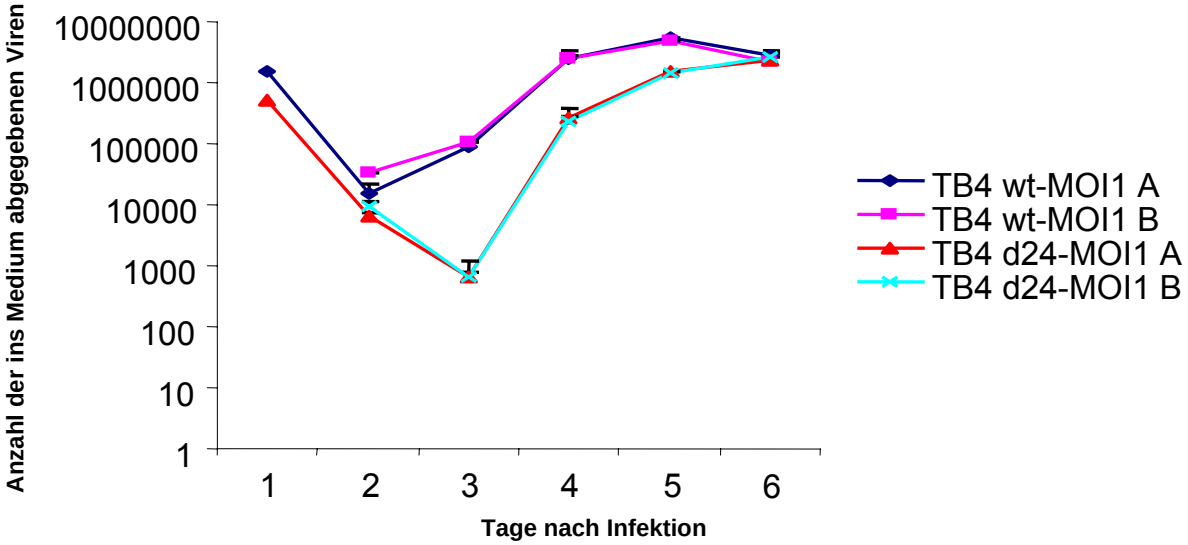

Abbildung 8: Auswirkung der Deletion von UL24 im Stamm TB40E auf das Replikationsverhalten in Humanen Fibroblasten (HFF)

HFF wurden mit dem Wildtyp (wt) und der Deletionsmutante (d24) des Stamms TB40E (TB4) des humanen Zytomegalievirus im zweifach-Ansatz (A und B) mit einer Multiplizität der Infektion (MOI) gleich 1infiziert. Die Überstände wurden 2,4,6,8 und 10 Tage nach Infektion geerntet und titriert. Die blaue und rosa Kurve stellen die über die Zeit aufgetragenen Viruspartikel dar, die in den Überständen der mit dem wt infizierten HFF vorhanden waren. Die rote und türkisfarbene Kurve geben den Verlauf der von den mit der Deletionsmutante infizierten HFF ins Medium abgegebenen Viren wieder.

3.2.3 Ultrastrukturelle Analyse infizierter Zellen

Auf der Abbildung 9 sieht man Schnitte von humanen Fibroblasten, die mit TB40E und der entsprechenden Deletionsmutante TB40E-Δ24 infiziert worden waren. In vergleichbaren Aufnahmen wurden der WT und die Deletionsmutante einander gegenübergestellt. Die großen Übersichtsaufnahmen in 4.600 facher Vergrößerung zeigen Anteile des Zellkerns mit elektronendichtem Chromatin sowie Anteile des Zytosols. Die kleinen schwarzen Punkte im Zellkern stellen mit DNA beladene Viruskapside dar. Im Zytosol erkennt man neben reifen Viruspartikeln auch verschiedene Zwischenstufen der Virusreifung und Dense-

Bodies. Sowohl im Zellkern, als auch im Zytoplasma sind keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich Zahl und Verteilung der Partikel zu erkennen. Auch im Extrazellulärraum sieht man reife Partikel, die hier jedoch nicht gezeigt werden. In Abbildung 9 oben rechts haben wir repräsentative reife Viruspartikel des WT und der Deletionsmutante ausgewählt und einander gegenüber gestellt. Sie zeigen den typischen Aufbau des Virus aus Kapsid mit Virus-DNA, Tegument und Virushülle. In Detailaufnahmen des Zellkerns sind bei 100.000 facher Vergrößerung A-, B- und C-Kapside nebeneinander dargestellt (Abbildungen 9 unten rechts). Auch hier sind keine ultrastrukturellen Unterschiede feststellbar.
Somit führt die Deletion von UL24 bei der Vermehrung in Fibroblasten zu keinem ultrastrukturell erkennbaren Defekt.

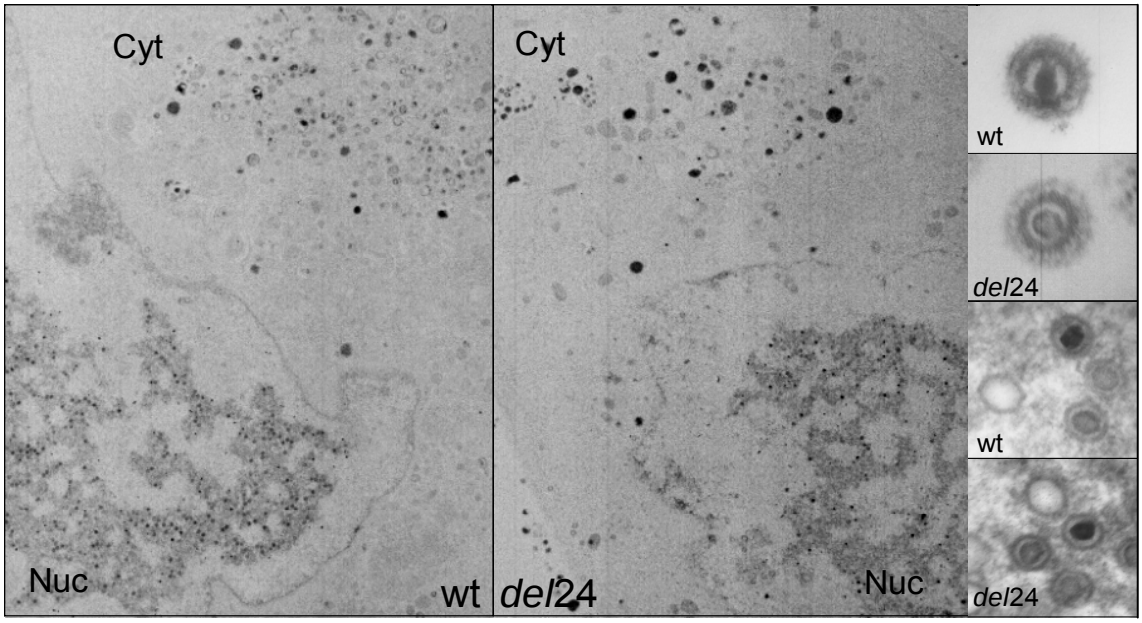

Abbildung 9: Elektronenmikroskopische (EM) Aufnahmen von mit humanem Zytomegalievirus (HCMV) infizierten humanen Fibroblasten (HFF)

HFF wurden 5 Tage nach Infektion mit dem Wildtyp (wt) und der Deletionsmutante (del24) des HCMV-Stammes TB40E mit Glutaraldehyd fixiert und in Kunstharz gebettet. Anschließend wurden die Schnitte unter dem Elektronenmikroskop ausgewertet. Auf den großen Übersichtsaufnahmen erkennt man Anschnitte des Zytoplasmas (Cyt) und des Nukleus (Nuc) - links wt und rechts del24 - in 4.600 facher Vergrößerung. Rechts oben wurden ein wt- und ein del24-Virion einander gegenüber gestellt, rechts unten sieht man A-, B- und C-Kapside des wt und der Deletionsmutante im Vergleich. Virions und Kapside sind in 100.000 facher Vergrößerung dargestellt.

3.2.4 Replikation in Endothelzellen

Da sich weder bei den HFF noch bei den elektronenmikroskopischen Bildern signifikante Unterschiede zeigten, stellte sich die Frage, ob es einen Unterschied zwischen der Infektion von Fibroblasten und der von Endothelzellen gibt. Um das Wachstumsverhalten von HCMV im Vergleich zur Deletionsmutante auf Endothelzellen zu untersuchen, haben wir HUVEC-Zellen in zwei parallelen Ansätzen mit dem Wildtyp des TB4-Stammes sowie mit der Deletionsmutante TB4Δ24 infiziert. Da der Laborstamm AD169 die Fähigkeit verloren hat, Endothelzellen zu infizieren, konnte er für diese Fragestellung nicht verwendet werden. Die MOI's (Verhältnis von Viruspartikeln zu Zellzahl) betrugen etwa 1, 4 und 10. Der Überstand wurde alle zwei Tage abgenommen und weggefroren sowie die gleiche Menge frisches Medium zu den Zellen gegeben. Nach Abschluss der Wachstumskurve wurden die Überstände einzeln titriert und in der Graphik kumulativ aufgetragen.

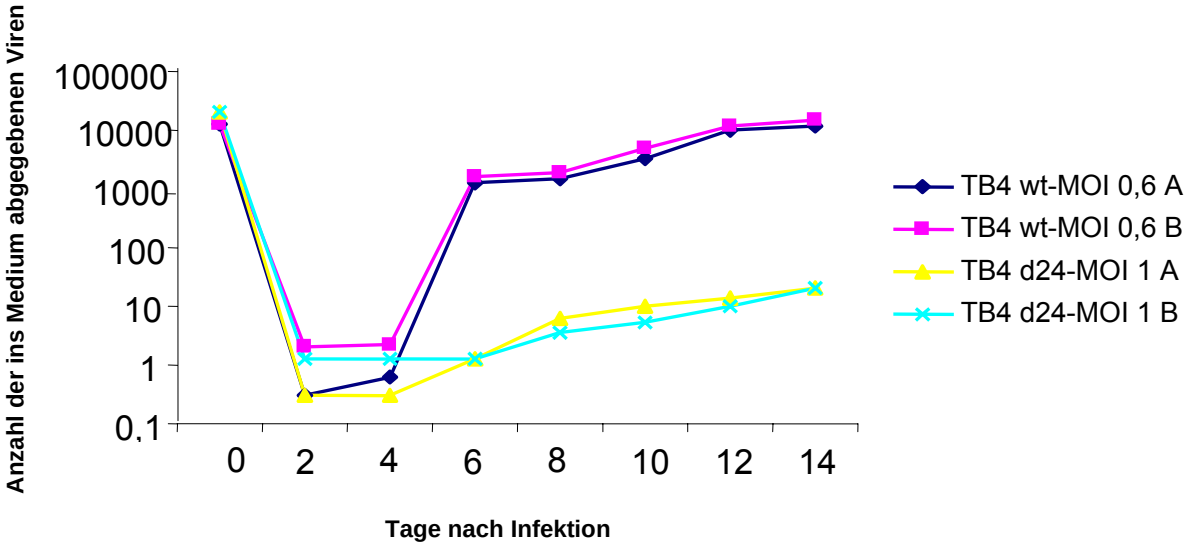

Abbildung 10: Auswirkung der Deletion von UL24 im Stamm TB40E auf das Replikationsverhalten in humanen umbilikal-venösen Endothelzellen (HUVEC)

HUVEC wurden mit dem Wildtyp (wt) und der Deletionsmutante (d24) des Stamms TB40E (TB4) des humanen Zytomegalievirus im zweifach-Ansatz (A und B) mit einer multiciply of infection (MOI) von ungefähr 1 infiziert. Die Überstände wurden 2,4,6,8,10,12 und 14 Tage nach Infektion geerntet, einzeln titriert und schließlich in der Graphik kumalativ aufgetragen. Die schwarze und rote Kurve stellen die über die Zeit aufgetragenen Viruspartikel dar, die in den Überständen der mit dem wt infizierten HUVEC vorhanden waren. Die gelbe und blaue Kurve geben den Verlauf der von den mit der Deletionsmutante infizierten HUVEC ins Medium abgegebenen Viren wieder.

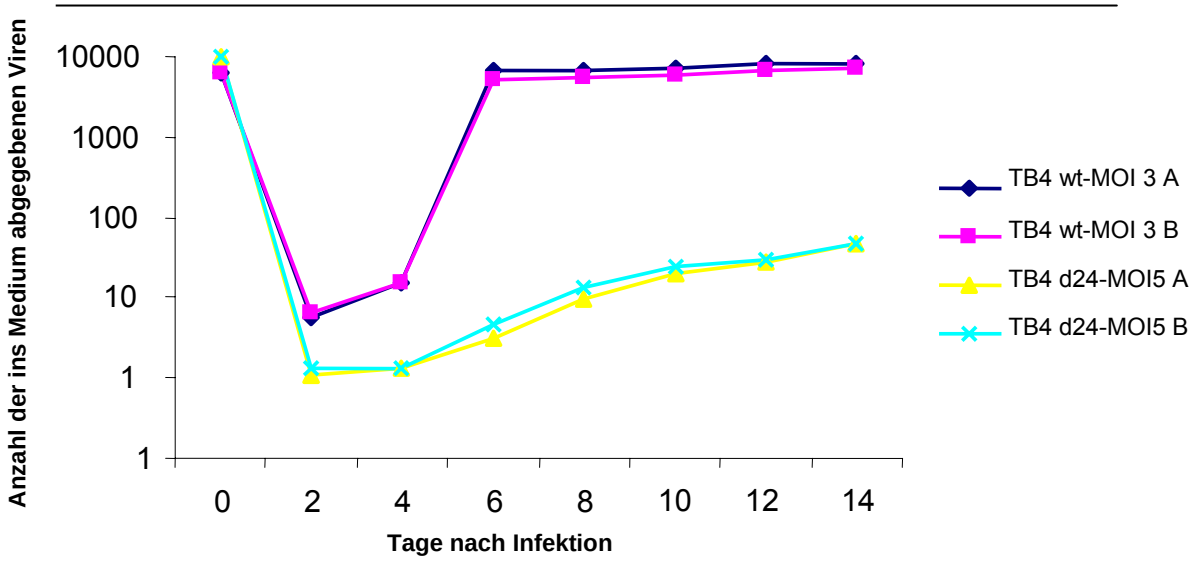

Abbildung 11: Auswirkung der Deletion von UL24 im Stamm TB40E auf das Replikationsverhalten in humanen umbilikal-venösen Endothelzellen (HUVEC)

HUVEC wurden mit dem Wildtyp (wt) und der Deletionsmutante (d24) des Stamms TB40E (TB4) des humanen Zytomegalievirus im zweifach-Ansatz (A und B) mit einer multiciply of infection (MOI) von ungefähr 4 infiziert. Die Überstände wurden 2,4,6,8,10,12 und 14 Tage nach Infektion geerntet, einzeln titriert und schließlich in der Graphik kumalativ aufgetragen. Die schwarze und rote Kurve stellen die über die Zeit aufgetragenen Viruspartikel dar, die in den Überständen der mit dem wt infizierten HUVEC vorhanden waren. Die gelbe und blaue Kurve geben den Verlauf der von den mit der Deletionsmutante infizierten HUVEC ins Medium abgegebenen Viren wieder.

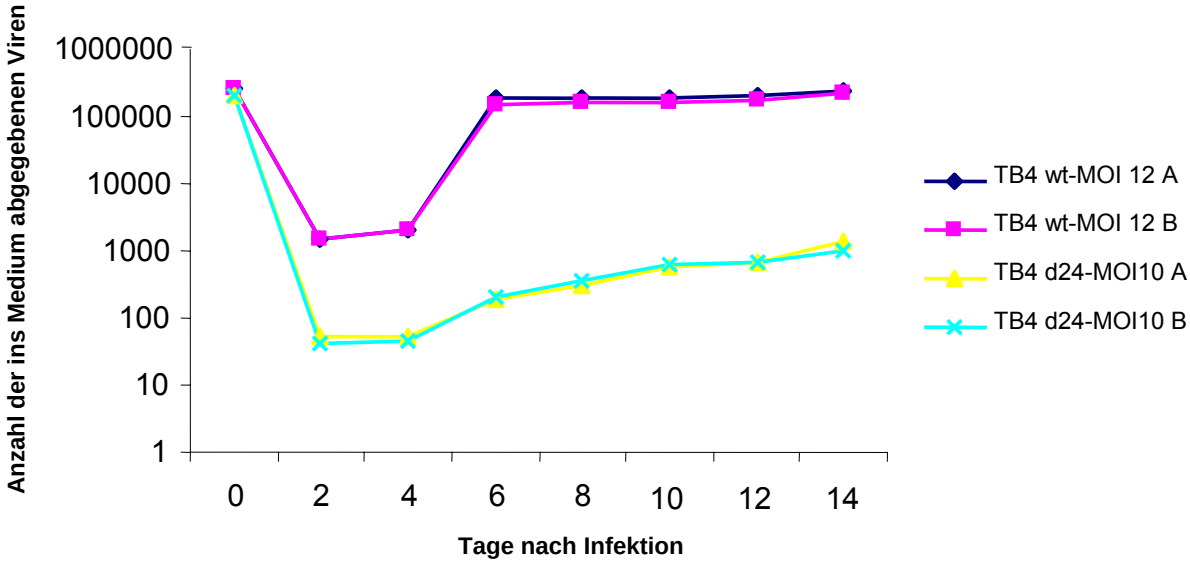

Abbildung 12: Auswirkung der Deletion von UL24 im Stamm TB40E auf das Replikationsverhalten in humanen umbilikal-venösen Endothelzellen (HUVEC)

HUVEC wurden mit dem Wildtyp (wt) und der Deletionsmutante (d24) des Stamms TB40E (TB4) des humanen Zytomegalievirus im zweifach-Ansatz (A und B) mit einer multiciply of infection (MOI) von ungefähr 11 infiziert. Die Überstände wurden 2,4,6,8,10,12 und 14 Tage nach Infektion geerntet, einzeln titriert und schließlich in der Graphik kumalativ aufgetragen. Die schwarze und rote Kurve stellen die über die Zeit aufgetragenen Viruspartikel dar, die in den Überständen der mit dem wt infizierten HUVEC vorhanden waren. Die gelbe und blaue Kurve geben den Verlauf der von den mit der Deletionsmutante infizierten HUVEC ins Medium abgegebenen Viren wieder.

Wie man auf den Abbildungen 10, 11 und 12 sehen kann, begannen nach 5 Tagen die absoluten Virusmengen beim WT stark anzusteigen, während sie bei der Deletionsmutante nur schwach anstiegen. Nach 8 Tagen betrug die Differenz ca. 3 Größenordnungen, was einer 1000-fachen Menge an produzierten Viren des WT im Vergleich zur Deletionsmutante entspricht. Dieser Unterschied war bei allen eingesetzten MOI's signifikant.

Die Deletion des UL24-Leserahmens aus dem endotheliotropen HCMV-Stamm TB4 führt somit zu einem Defekt bei der Vermehrung in Endothelzellen.

4 Diskussion

Mit dieser Arbeit sollte ein Beitrag zum besseren Verständnis sowohl der Expression und Lokalisation von UL24, als auch der biologischen Bedeutung von UL24 geleistet werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass es sich bei UL24 um ein klassisches Late-Protein handelt, das sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma lokalisiert sein kann. Während UL24 für die Vermehrung in Fibroblasten überflüssig ist, wird es für die Infektion von Endothelzellen benötigt.

4.1 pUL24 als Late-Protein

Immunoblot-Experimente mit infizierten Fibroblasten zeigten, dass pUL24 sein Expessionsmaximum 96 Stunden post infectionem (p.i.) erreicht. Diese Ergebnisse decken sich mit denen von Dargan et al. (2002), die pUL24 mit early-late(γ_1) Kinetik nachwiesen.[1] Mit dem polyklonalen AK 675 detektierten sie unter u.a. ein Protein, das mit ca. 40kD der errechneten Größe von pUL24 und der hier beschriebenen Molekularmasse entspricht. Bei der kinetischen Einordnung von pUL24 setzte Dargan's Arbeitsgruppe im Gegensatz zu uns Inhibitoren ein, die zu Verfälschungen in der Expressionsmenge führen können. Wir haben mit zusätzlichen Zeitwerten die natürliche Kinetik von pUL24 bestimmt und unsere Versuchsbedingungen durch den Vergleich mit dem bekannten Late-Protein ppUL99 kontrolliert. Üblicherweise können Late-Proteine ab 72 Stunden p.i. detektiert werden. Dies traf auch für ppUL99 zu, jedoch erreichte es sein Expressionsmaximum wie pUL24 erst nach 96 Stunden. Allerdings war pUL24 bei 72 Stunden p.i. noch nicht nachweisbar. Diese späte Expression passt zu der Beschreibung von pUL24 als Tegumentprotein. So konnte pUL24 in NIEP's, in an Kapsiden haftender Tegument-Matrix, sowie in Material von Dense-Bodies, deren Hülle beschädigt war, nachgewiesen werden.[1] Auch Varnum et al. detektierten pUL24 in aufgereinigten Virionen mittels Massenspektrometrie.[52]

4.2 Lokalisation von pUL24

Die Lokalisation von pUL24 wurde an transfizierten Zellen ermittelt. Dabei lieferten sowohl die Immunfluoreszenzaufnahmen der mit MycUL24-DNA transfizierten, als auch die mit pcDNA3-UL24 transfizierten Fibroblasten und die

anschließende Darstellung beider mit α-UL24 die gleichen Ergebnisse und boten mit dem Nebeneinander von nukleärer und zytoplasmatischer Lokalisation, sowie partiellen Kerndeformierungen ein durchaus heterogenes Bild.

Die intranukleäre Lokalisation von pUL24 zeigt sich in den Abbildungen 5a, b, c und d. Während man auf den Abb. 5a und b eine diffuse Verteilung im Kern beobachtet, die viele kleine und eine prominentere Region ausspart, konzentriert sich pUL24 in c und d auf wenige scharf begrenzte intranukleäre Strukturen. Bei den Aussparungen könnte es sich um nukleäre Organisationszentren, z.B. PML-onkogene Domänen (PODs, ND10 Domänen) handeln.

Zytoplasmatisch lokalisiert findet man pUL24 auf den Abb. 5e und f. Die Aufnahmen von Dargan bestätigen dies. Es ist allerdings zu beachten, dass seine Aufnahmen von infizierten und nicht wie bei uns von transfizierten Zellen gemacht wurden, so dass sowohl die Gegenwart von, als auch die Interaktion mit anderen viralen Proteinen die Lokalisation von pUL24 beeinflussen kann. Auf Dargan's Aufnahmen erkennt man eine deutlich zytoplasmatische Lokalisation von pUL24, die der Verteilung von Abb. 5e entspricht. Leider sind dem Artikel keine Kernfärbungen beigefügt, so dass man die Morphologie des Kerns nur ungenügend beurteilen kann.[1] Die zytoplasmatische Lokalisation passt auch zur Verteilung von ppUL32, dem Interaktionspartner von pUL24.[39] Die Lokalisation von pUL24 stimmt in Abb. 5e am ehesten mit der Lokalisation von ppUL32 144h p.i. bei Sanchez überein. Zwar ist ppUL32 auf seinen Aufnahmen von Beginn der Expression an im Zytoplasma lokalisiert, allerdings konnten auch Hensel et al. zu Beginn der Expression eine nukleäre und 72 Stunden p.i. eine zytoplasmatische Lokalisation von ppUL32 nachweisen und in diesem Punkt unsere Ergebnisse bestätigen.

Die Interpretation der Aufnahmen führte uns zu dem Schluss, es lege möglicherweise ein dynamisches Geschehen vor, und sämtliche Stadien eines Prozesses liefen nebeneinander ab. Am Anfang dieses Prozesses stehen die Abbildungen 5a und b oder 5c und d. In Abb. 5e reichert sich pUL24 im Zytoplasma und dort vor allem perinukleär an. Der Zellkern wirkt kompakt. In Abb. 5f nimmt die Verteilung von pUL24 schon mehr Platz ein als der Zellkern; dieser schrumpft und erscheint zunehmend deformiert. In Abb. 5f ist schließlich kein Zellkern mehr zu erkennen.

Wie es zu der Schrumpfung des Zellkerns kommt ist unklar. Eine Möglichkeit wäre, dass die Überexpression von UL24 toxisch wirkt und in den Zellen möglicherweise eine Apoptose auslöst. Eventuell kann die Interaktion von pUL24 mit einem anderen viralen Protein die Kerndegeneration aufheben. Tatsächlich konnte Robert Pretsch zwischenzeitlich beobachten, dass pUL24 bei Kotransfektion von UL24 und UL32 ins Zytoplasma und dort mit ppUL32 in den perinukleären Bereich wandert (Daten noch nicht veröffentlicht). Für die Hemmung der Degeneration durch Interaktion mit anderen viralen Proteinen spricht auch die Tatsache, dass in mit HCMV infizierten Zellen bislang keine Kerndegenerationen beobachtet wurden. Eine alternative Möglichkeit ergibt sich aus einem yeast two hybrid Screen (M. Winkler, nicht publiziert), bei dem eine Interaktion zwischen UL24 und einem noch nicht näher charakterisierten Cohesin gefunden wurde. Cohesine sind zelluläre Proteine, die DNA komprimieren. Es könnte sein, dass das Virus dieses Protein nutzt, um das virale Genom in Kapside zu verpacken. DNA wird so lange unspezifisch komprimiert, bis die Funktion der Zelle derart gestört ist, dass sie zugrunde geht. Um diese These zu verifizieren, wäre es interessant zu prüfen, inwiefern eine Überexpression oder die Hemmung von Cohesinen zu Kerndegenerationen führen kann.

Um mehr Klarheit zu erlangen, sollten weitere Immunfluoreszenz- und elektronenmikroskopische Aufnahmen von transfizierten, aber auch vor allem von infizierten Fibroblasten und Endothelzellen gemacht werden. Hier erscheinen mir Kolokalisationsexperimente mit zellulären Markern gegen das Endoplasmic Reticulum-Golgi Intermediate Compartment (ERGIC) (α-ERGIC53), den Golgi-Apparat (α-GM130) und das Trans-Golgi-Netzwerk (α-TGN46) als besonders aufschlussreich, weil gerade diese Strukturen durch die Infektion mit HCMV verändert werden und sowohl pUL24 als auch ppUL32 an diesen Strukturen lokalisierbar sein könnten. Anscheinend induziert das Virus eigene Kompartimente für die Partikelzusammensetzung, indem es schon vorhandene Organellen umbaut oder verdrängt.[39]

4.3 Biologische Bedeutung der Deletionsmatanten

Um die biologische Bedeutung des UL24-Genes zu untersuchen, wurde das Gen im Genom deletiert. Die Deletion umfasste den Bereich vom Start-Kodon

bis zum Stop-Kodon von UL24. Zunächst wurde die Expression von UL24 und benachbarten Genen kontrolliert. UL24 wurde erwartungsgemäß beim Wildtyp exprimiert, jedoch nicht bei der Deletionsmutante. UL25 wurde wie erwartet beim Wildtyp exprimiert, allerdings wie UL24 ebenfalls nicht bei der Deletionsmutante. Das bedeutet, dass die Deletion von UL24 zu einem gleichzeitigen Ausschalten von UL25 führt. Das hat weit reichende Konsequenzen: Jeder beobachtete Effekt kann auch auf das nicht exprimierte UL25 zurückzuführen sein. Eine mögliche Erklärung für die fehlende Expression ist, dass das Transkriptionsinitiationssignal (TATA-Box) von UL25 im UL24-Leserahmen liegt. Die Kartierung des Transkriptionsstarts von UL25 macht diese Annahme sehr wahrscheinlich (R. Pretsch, unveröffentlicht). Das UL23-Protein konnte mit dem verfügbaren Antikörper weder in Wildtyp-infizierten Zellen noch in Zellen, die mit der Deletionsmutante infiziert wurden, nachgewiesen wurden. Die Expression des in einem anderen Bereich des Genoms kodierten ppUL99 wurde durch die Deletion in keiner Weise beeinträchtigt.

4.4 Replikation in Fibroblasten

Bei der Wachstumskurve mit AD169 auf HFF zeigte sich, dass die Deletionsmutante wie der Wildtyp nach 4-5 Tagen p.i. mit der Virusproduktion beginnt; jedoch betrug die Differenz der im Verlauf des Experiments produzierten Viren am Ende nur eine knappe Loggstufe. Die Deletionsmutante wächst hier also ein wenig langsamer als der Wildtyp. Bei der Wachstumskurve auf HFF mit TB40E konnte sich diese Tendenz nur zum Teil bestätigen: Zwar stieg der Titer beim Wildtyp schneller an und lag auch im Verlauf des Experiments ca. eine Titerstufe höher als bei der Deletionsmutante, erreichte jedoch an Tag 10 p.i. den gleichen Endwert. Eine Erklärung für die Diskrepanz der Titer bei TB40 zwischen dem WT und der Deletionsmutante an Tag 3 und 5 p.i. könnte sein, dass die mit dem WT infizierten Zellen zu Beginn des Experiments nur ungenügend gewaschen wurden, so dass die ersten Tage bereits inokuliertes Virus wieder abgegeben wurde. Der fehlende Abstand der Titer am Ende derselben Wachstumskurve könnte darauf zurückzuführen sein, dass das Wachstum beim Wildtyp früher einsetzt als bei der Deletionsmutante. Jedoch holt letztere schnell auf und erreicht nach 10 Tage p.i. den gleichen Titer wie der Wildtyp. Insgesamt kann man sagen, dass sich beim Wachstumsverhalten auf

Fibroblasten zwischen Wildtyp und Deletionsmutante, sowohl bei AD169 als auch bei TB40, keine bedeutenden Unterschiede ergeben.

4.5 Ultrastrukturelle Analyse

Da pUL24 als Tegumentprotein die Reifung von Virionen beeinflussen könnte, wurde die Ultrastruktur von Zellen, die mit Wildtyp oder UL24-Mutante infiziert waren, verglichen. Auch bei annähernd gleicher Vermehrung können hier gelegentlich Unterschiede beobachtet werden. So zeigten Kopp et al. 2003 für das Gen UL11 des Pseudorabies Virus, dass Wildtyp und die entsprechende Deletionsmutante im Wachstumsverhalten zwar auch nur etwa eine Log-Stufe von einander abwichen, jedoch deutliche ultrastrukturelle Unterschiede offenbarten.[23] Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der mit der UL24-Deletionsmutante infizierten Zellen zeigten jedoch keine Abweichungen von den mit dem Wildtyp infizierten Zellen. Sowohl die zytoplasmatischen Zell-Organellen, als auch der Nukleus ließen keine Auffälligkeiten in ihrer Struktur erkennen. Auch die Ultrastruktur der unterschiedlichen nukleären Kapsidformen sowie reifer Partikel zeigte keine Unterschiede. Es ist also sehr wahrscheinlich, dass die Deletion von UL24 nicht zu Änderungen führt, die sich elektronenmikroskopisch erfassen lassen. Andererseits zerstört die Glutaraldehyd-Fixierung besonders lipidhaltige tubuläre zelluläre Strukturen. Wenn die induzierten Veränderungen in diesen Zellkompartimenten stattfinden, was der Vergleich der zytoplasmatischen Lokalisation von pUL24 mit den Aufnahmen von Sanchez nahe legt, sind eventuelle Unterschiede aus eben diesem Grund nicht mehr nachweisbar.[39] Die neue Technik der Cryo-Fixierung in der Elektronenmikroskopie erhält diese Strukturen weitestgehend und könnte gerade für die genauere Untersuchung von Endoplasmic Reticulum-Golgi Intermediate Compartment (ERGIC), Golgi-Apparat und Trans-Golgi-Netzwerk von Interesse sein.

4.6 UL24 und Endothelzelltropismus

Da sich weder im Wachstumsverhalten auf Fibroblasten noch in der elektronenmikroskopischen Betrachtung signifikante Unterschiede offenbarten, interessierte uns die Frage, ob es Unterschiede im Wachstumsverhalten bei Endothelzellen gibt. Diese Experimente wurden mit Viren durchgeführt, die von einem endotheliotropen Virusstamm abgeleitet waren. Tatsächlich wuchs die Deletionsmutante in den Endothelzellen deutlich langsamer als der Wildtyp und

erreichte auch nicht dessen maximale Viruslast. Die Differenz betrug 8 Tage p.i. bei einer MOI von etwa 1 drei Log-Stufen, bei höheren MOI's immerhin noch zwei Log-Stufen. Damit ist die Aussage gerechtfertigt: UL24 spielt eine Rolle im Endothelzelltropismus. Andere für den Endothelzelltropismus erwiesener Maßen essentielle Gene sind UL128, UL130 und UL131. Wang und Shenk zeigten dies für pUL128 und pUL130 als Teil eines Komplexes in Verbindung mit den Glykoproteinen gH und gL.[54] Adler et al. bestätigte die Bedeutung von pUL131A für den Endothelzelltropismus.[2] pUL24 könnte mit einem oder mehreren dieser Proteine interagieren und sich entweder über deren Konformationsänderung oder durch eine erleichterte Aufnahme dieser Proteine ins Viruspartikel auf den Endothelzelltropismus auswirken. Alternativ kann der von uns beobachtete Effekt auch über einen von diesen Proteinen unabhängigen noch unbekannten Mechanismus zustande kommen. Neben UL24 sind auch andere Mitglieder der US22-Genfamilie für den Zelltropismus verantwortlich. So konnten Hanson et al. mittels gleichzeitiger Deletion der Gene M139, M140 und M141 deren besondere Bedeutung bei der Fähigkeit von MCMV, Makrophagen in Mäusen zu infizieren, zeigen.[22] Auf der Suche nach weiteren Mechanismen, die HCMV befähigen, verschiedene Zelltypen zu infizieren, stießen Xin Wang et al. 2003 auf die direkte Interaktion des Hauthüllprotein gB mit dem epithelial growth factor receptor (EGFR).[55] Um der Infektion durch HCMV zu entgehen, könnten die Fibroblasten die Expression von EGFR herunterregulieren. Das legen die Ergebnisse von Thomas Beutler und J.A. Fairley nahe, die eine signifikante - durch HCMV induzierte - Herunterregulierung von EGFR auf Fibroblasten nachwiesen.[6, 14] Da der EGRF ziemlich ubiquitär verbreitet ist und auf vielen unterschiedlichen Zelltypen exprimiert wird, ist die Interaktion zwischen gB und EGRF bei näherer Betrachtung wahrscheinlich weder die entscheidende Determinante für den Epithel- noch für den Endothelzelltropismus. Es ist durchaus möglich, dass es sich hierbei um einen Mechanismus für die sukzessive Durchinfizierung der verschiedensten Gewebe nach hämatogener Streuung handelt. Letztendlich scheinen pUL24 und pUL131A für die Fähigkeit des Virus verantwortlich zu sein, Endothelzellen zu infizieren, der schon erwähnte Komplex aus gH, gL, pUL128 und pUL130 für die Fähigkeit des Virus, Epithel- und Endothelzellen und ein Komplex aus gH, gL und gO für die Fähigkeit des Virus, Fibroblasten zu infizieren.

4.7 Ausblick

Zur weiteren Charakterisierung von UL24 sollte eine Revertante hergestellt werden, in der UL24 wieder eingefügt wird. Mit dieser müssten weitere Wachstumskinetiken erstellt werden, um zu belegen, dass der beobachtete Effekt auch tatsächlich auf die Deletion zurückzuführen ist. In der Zwischenzeit wurde dieser Schritt vollzogen. Die Wachstumskinetiken entsprachen denen des Wildtyps, was unsere Ergebnisse untermauert. Da wir gezeigt haben, dass die Deletion von UL24 zum gleichzeitigen Ausschalten von UL25 führt, müsste man streng genommen alle Experimente mit einer Deletionsmutante ∆UL25 wiederholen, um sicher zu gehen, dass die Deletion von UL24 und nicht die von UL25 wirklich alle Ergebnisse bedingen. Alternativ dazu könnte man eine Transkomplementation durchführen. Dabei wird mittels Transfektion UL24 in Zellen exprimiert, diese dann mit der Deletionsmutante ∆UL24 überinfiziert und das hieraus geerntete Virus anschließend getestet. Auch Punktmutationen, wie die des ATG's, die die Expression von UL24, jedoch nicht die von UL25 verhindern, sind zur Kontrolle möglich. Beides wurde in der Zwischenzeit erfolgreich durchgeführt (R. Pretsch, unveröffentlicht). Somit ist pUL24 eine wichtige pathogenetische Determinante für den Tropismus von HCMV für Endothelzellen.

5 Zusammenfassung

Das humane Zytomegalievirus (HCMV) hat eine große klinische Bedeutung für Neugeborene und immunsupprimierte Patienten mit zum Teil schwerwiegenden Folgen. Von den über 200 HCMV eigenen Proteinen sind bislang nur wenige detailliert und hinsichtlich ihrer Rolle in der Pathogenese untersucht. Ziel dieser Arbeit war es, das Unique Long (UL)-24-Protein zu charakterisieren. Das pUL24 gehört zu einer auf HCMV und nahe verwandte Viren beschränkten Genfamilie und ist Bestandteil des Teguments im Virion.

Zunächst wurde die Expression und Lokalisation von pUL24 untersucht. Mittels Immunoblot wurde pUL24 in infizierten Fibroblasten erst sehr spät (nach 96 h) im Replikationszyklus nachgewiesen, was seiner Rolle als Strukturprotein entspricht. Im Gegensatz zu der bereits bekannten zytoplasmatischen Lokalisation von pUL24 in infizierten Zellen, war es in transfizierten Zellen zeitweise im Kern und zeitweise im Zytoplasma lokalisiert.

Darüber hinaus wurde die biologische Bedeutung von UL24 mit Hilfe von Deletionsmutanten untersucht. Im Kontext des Laborstammes AD169 wurde gezeigt, dass UL24 für die Vermehrung in Fibroblasten nicht benötigt wird. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten darüber hinaus, dass in diesen Zellen auch die Bildung von Viruspartikeln ohne Beeinträchtigung erfolgt. Um die Rolle von UL24 für den Endothelzelltropismus zu untersuchen, wurde eine Deletionsmutante im endotheliotropen Stamm TB40E analysiert. Dabei wurde beobachtet, dass UL24 für die Replikation in Endothelzellen wichtig ist. Immunoblot-Analysen zeigten allerdings, dass in der Deletionsmutante auch die Expression des benachbarten Genes UL25 fehlt, so dass dieser Phänotyp noch nicht auf UL24 alleine festgelegt werden kann.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass pUL24 ein klassisches spätes Genprodukt ist, welches sowohl nukleär als auch zytoplasmatisch lokalisiert ist. Die Deletion von UL24 im Kontext eines endotheliotropen Stammes zeigte, dass diese Genregion für den pathogentisch wichtigen Phänotyp des Endothelzelltropismus bedeutsam ist. Entsprechend könnten künftige Untersuchungen der Entwicklung neuer antiviraler Strategien oder Impfstrategien dienen.

6 Literaturverzeichnis

1. Adair R, Douglas ER, Maclean JB, Graham SY, Aitken JD, Jamieson FE, Dargan DJ: The products of human cytomegalovirus genes UL23, UL24, UL43 and US22 are tegument components. J. Gen. Virol. 83, 1315-1324 (2002).

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

3. Battista MC, Bergamini G, Boccuni MC, Campanini F, Ripalti A, Landini MP: Expression and characterization of a novel structural protein of human cytomegalovirus, pUL25. J. Virol. 73, 3800-3809 (1999).

4. Baxter MK u. Gibson W: Cytomegalovirus basic phosphoprotein (pUL32) binds to capsids in vitro through its amino one-third. J. Virol. 75, 6865-6873 (2001).

5. Bechtel JT u. Shenk T: Human cytomegalovirus UL47 tegument protein functions after entry and before immediate-early gene expression. J. Virol. 76, 1043-1050 (2002).

6. Beutler T, Höflich C, Stevens PA, Krüger DH, Prösch S: Downregulation of the epidermal growth factor receptor by human cytomegalovirus infection in human fetal lung fibroblasts. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 28, 86-94 (2003).

7. Brown HL u. Abernathy MP: Cytomegalovirus infection. Semin. Perinatol. 22, 260-266 (1998).

8. Butcher SJ, Aitken J, Mitchell J, Gowen B, Dargan DJ: Structure of the human cytomegalovirus B capsid by electron cryomicroscopy and image reconstruction. J. Struct. Biol. 124, 70-76 (1998).

9. Cha TA, Tom E, Kemble GW, Duke GM, Mocarski ES, Spaete RR: Human cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains. J. Virol. 70, 78-83 (1996).

10. Chee MS, Bankier AT, Beck S, Bohni R, Brown CM, Cerny R, Horsnell T, Hutchison CA 3rd, Kouzarides T, Martignetti JA: Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 154, 125-169 (1990).

11. Chen DH, Jiang H, Lee M, Liu F, Zhou ZH: Three-dimensional visualization of tegument/capsid interactions in the intact human cytomegalovirus. Virology 260, 10-16 (1999).

12. Efstathiou S, Lawrence GL, Brown CM, Barrell BG: Identification of homologues to the human cytomegalovirus US22 gene family in human herpesvirus 6. J. Gen. Virol. 73, 1661-1671 (1992).

13. Evan GI, Lewis GK, Ramsay G, Bishop JM.: Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. Mol. Cell Biol. 5, 3610-3616 (1985).

14. Fairley JA, Baillie J, Bain M, Sinclair JH: Human cytomegalovirus infection inhibits epidermal growth factor (EGF) signalling by targeting EGF receptors. J. Gen. Virol. 83, 2803-2810 (2002).

15. Gilbert MJ, Riddell SR, Plachter B, Greenberg PD: Cytomegalovirus selectively blocks antigen processing and presentation of its immediate-early gene product. Nature 383, 720-722 (1996).

16. Haan KM, Kwok WW, Longnecker R, Speck P: Epstein-Barr virus entry utilizing HLA-DP or HLA-DQ as a coreceptor. J. Virol. 74, 2451-2454 (2000).

17. Haller OA u. Mertens T in: Diagnostik und Therapie von Viruskrankheiten. 376-411, Haller O A u. Mertens T (Herausgeber) (1999).

18. Hertenstein B, Hampl W, Bunjes D, Wiesneth M, Duncker C, Koszinowski U, Heimpel H, Arnold R, Mertens T: In vivo/ex vivo T cell depletion for GVHD prophylaxis influences onset and course of active cytomegalovirus infection and disease after BMT. Bone Marrow Transplant. 15, 387-393 (1995).

19. Hofmann H, Sindre H, Stamminger T: Functional interaction between the pp71 protein of human cytomegalovirus and the PML-interacting protein human Daxx. J. Virol. 76, 5769-5783 (2002).

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

21. Jacobson MA u. Mills J: Cytomegalovirus infection. Clin. Chest Med. 9, 443-448 (1988).

22. Karabekian Z, Hanson LK, Slater JS, Krishna NK, Bolin LL, Kerry JA, Campbell AE: Complex formation among murine cytomegalovirus US22 proteins encoded by genes M139, M140, and M141. J. Virol. 79, 3525-3535 (2005).

23. Kopp M, Granzow H, Fuchs W, Klupp BG, Mundt E, Karger A, Mettenleiter TC: The pseudorabies virus UL11 protein is a virion component involved in secondary envelopment in the cytoplasm. J. Virol. 77, 5339-5351 (2003).

24. Krech U: Complement-fixing antibodies against cytomegalovirus in different parts of the world. In: Bull. World Health Organ 49, 103-106 (1973).

25. Lamberson HV u. Dock NL: Prevention of transfusion-transmitted cytomegalovirus infection. Transfusion 32, 196-198 (1992).

26. Lee JY, Irmiere A, Gibson W: Primate cytomegalovirus assembly: evidence that DNA packaging occurs subsequent to B capsid assembly. Virology 167, 87-96 (1988).

27. Mar EC, Patel PC, Huang ES: Human cytomegalovirus-associated DNA polymerase and protein kinase activities. J. Gen. Virol. 57, 149-156 (1981).

28. Marshall KR, Rowley KV, Rinaldi A, Nicholson IP, Ishov AM, Maul GG, Preston CM: Activity and intracellular localization of the human cytomegalovirus protein pp71. J. Gen. Virol. 83, 1601-1612 (2002).

29. Meier J, Lienicke U, Tschirch E, Krüger DH, Wauer RR, Prösch S: Human cytomegalovirus reactivation during lactation and mother-to-child transmission in preterm infants. J. Clin. Microbiol. 43, 1318-1324 (2005).

30. Mettenleiter TC: Herpesvirus assembly and egress. J. Virol. 76, 1537-1547 (2002).

31. Mocarski ES Jr.: Encyclopedia of Virology, Volume 1, 292 (1994).

32. Mocarski ES Jr. u. Courcelle CT: Cytomegaloviruses and Their Replication. In: Fields Virology, fourth edition, 2629-2673 (2001).

33. Murray BA, Niman HL, Loomis WF: Monoclonal antibody recognizing gp80, a membrane glycoprotein implicated in intercellular adhesion of Dictyostelium discoideum. Mol. Cell Biol. 3, 863-870 (1983).

34. Nowak B, Sullivan C, Sarnow P, Thomas R, Bricout F, Nicolas JC, Fleckenstein B, Levine AJ: Characterization of monoclonal antibodies and polyclonal immune sera directed against human cytomegalovirus virion proteins. Virology 132, 325-338 (1984).

35. Pass RF: Cytomegalovirus, fourth edition, 2675-2705 (2001).

36. Reinhardt B, Mertens T, Mayr-Beyrle U, Frank H, Lüske A, Schierling K, Waltenberger J: HCMV infection of human vascular smooth muscle cells leads to enhanced expression of functionally intact PDGF beta-receptor. Cardiovasc. Res. 67, 151-160 (2005).

37. Reinhardt B, Minisini R, Mertens T: Opinion article: cytomegalovirus is a risk factor in atherogenesis. Herpes. 9, 21-23 (2002).

38. Ripalti A, Ruan Q, Boccuni MC, Campanini F, Bergamini G, Landini MP: Construction of polyepitope fusion antigens of human cytomegalovirus ppUL32: reactivity with human antibodies. J. Clin. Microbiol. 32, 358-363 (1994).

39. Sanchez V, Greis KD, Sztul E, Britt WJ: Accumulation of virion tegument and envelope proteins in a stable cytoplasmic compartment during human cytomegalovirus replication: characterization of a potential site of virus assembly. J. Virol. 74, 975-986 (2000).

40. Sarov B, Naggan L, Rosenzveig R, Katz S, Haikin H, Sarov I: Prevalence of antibodies to human cytomegalovirus in urban, kibbutz, and Bedouin children in southern Israel. J. Med. Virol. 10, 195-201 (1982).

41. Schierling K, Buser C, Mertens T, Winkler M: Human cytomegalovirus tegument protein ppUL35 is important for viral replication and particle formation. J. Virol. 79, 3084-3096 (2005).

42. Silva MC, Yu QC, Enquist L, Shenk T: Human cytomegalovirus UL99-encoded pp28 is required for the cytoplasmic envelopment of tegument-associated capsids. J. Virol. 77, 10594-10605 (2003).

43. Sinzger C, Grefte A, Plachter B, Gouw AS, The TH, Jahn G: Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues. J. Gen. Virol. 76, 741-750 (1995).

44. Sinzger C, Kahl M, Laib K, Klingel K, Rieger P, Plachter B, Jahn G: Tropism of human cytomegalovirus for endothelial cells is determined by a post-entry step dependent on efficient translocation to the nucleus. J. Gen. Virol. 81, 3021-3035 (2000).

45. Sinzger C, Plachter B, Stenglein S, Jahn G: Immunohistochemical detection of viral antigens in smooth muscle, stromal, and epithelial cells from acute human cytomegalovirus gastritis. J. Infect. Dis. 167, 1427-1432 (1993).

46. Smith MG: Propagation in tissue cultures of cytopathogenic virus from human salivary gland virus (SGV) disease. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 92, 424-430 (1956).

47. Stamminger T, Gstaiger M, Weinzierl K, Lorz K, Winkler M, Schaffner W: Open reading frame UL26 of human cytomegalovirus encodes a novel tegument protein that contains a strong transcriptional activation domain. J. Virol. 76, 4836-4847 (2002).

48. Stinski MF: Sequence of protein synthesis in cells infected by human cytomegalovirus: early and late virus-induced polypeptides. J. Virol. 26, 686-701 (1978).

49. Sweet C: The pathogenicity of cytomegalovirus. FEMS Microbiol. Rev. 23, 457-482 (1999).

50. Trus BL, Gibson W, Cheng N, Steven AC: Capsid structure of simian cytomegalovirus from cryoelectron microscopy: evidence for tegument attachment sites. J. Virol. 73, 2181-2192 (1999).

51. van Zeijl M, Fairhurst J, Baum EZ, Sun L, Jones TR: The human cytomegalovirus UL97 protein is phosphorylated and a component of virions. Virology 231, 72-80 (1997).

52. Varnum SM, Streblow DN, Monroe ME, Smith P, Auberry KJ, Pasa-Tolic L, Wang D, Camp DG 2nd, Rodland K, Wiley S, Britt W, Shenk T, Smith RD,

Nelson JA: Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome. J. Virol. 78, 10960-10966 (2004).

53. Waldo FB, Britt WJ, Tomana M, Julian BA, Mestecky J: Non-specific mesangial staining with antibodies against cytomegalovirus in immunoglobulin-A nephropathy. Lancet 1, 129-131 (1989).

54. Wang D u. Shenk T: Human cytomegalovirus virion protein complex required for epithelial and endothelial cell tropism. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102, 18153-18158 (2005).

55. Wang X, Huong SM, Chiu ML, Raab-Traub N, Huang ES: Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus. Nature 424, 456-461 (2003).

56. Winkler M, Rice SA, Stamminger T: UL69 of human cytomegalovirus, an open reading frame with homology to ICP27 of herpes simplex virus, encodes a transactivator of gene expression. J. Virol. 68, 3943-3954 (1994).

57. Yi L, Wang DX, Zhao WQ, Feng ZJ: Expression of human cytomegalovirus immediate early gene in the intracranial artery walls of atherosclerosis. In: Zhonghua Shi Yan. He. Lin. Chuang. Bing. Du Xue. Za Zhi. 18, 66-68 (2004).