

**Molekulare Charakterisierung und Aufklärung der
intrazellulären Lokalisation des ORF*m164*
Genprodukts des Murinen Cytomegalovirus**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Torsten Däubner
aus Wiesbaden

Frankfurt 2007

Vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation
angenommen.

Dekan:	Prof. Dr. H. Schwalbe
Gutachter:	Prof. Dr. M. J. Reddehase
	Prof. Dr. B. Ludwig

Datum der Disputation:	31.05.2007
------------------------	------------

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Virologie der Universität Mainz unter Anleitung von Prof. Dr. M. J. Reddehase durchgeführt.



Für meine Eltern und Großeltern

Zusammenfassung

Das humane Cytomegalovirus (hCMV) ist ein ubiquitär verbreitetes Pathogen. Die CMV-Infektion ist eine nicht selten lebensbedrohliche Komplikation bei immunsupprimierten Organ- und Knochenmarktransplantat-Empfängern. Bei immunkompetenten Individuen hingegen verläuft eine CMV-Infektion in der Regel asymptomatisch. Wie am Beispiel der murinen CMV (mCMV)-Infektion gezeigt werden konnte, erfolgt die Immunkontrolle durch CD8 T-Zellen. Im Infektionsmodell der BALB/c (H-2^d) Maus dominieren CD8 T-Zellen mit Spezifität für zwei antigene Peptide: Ein L^d-restringiertes Peptid aus dem *immediate early* (IE1)-Protein m123, sowie ein D^d-restringiertes Peptid aus dem *early* (E)-Protein m164. Der konzertierten Aktion der viralen Immunevasionsproteine von mCMV gelingt es nicht, die Expression dieser beiden Peptide auf der Oberfläche infizierter Zellen zu verhindern.

Der ORF*m164* wurde 1996 von Rawlinson et al. vorhergesagt und umfasst demnach 1284 Nukleotide, die für ein Protein von 46,6 kDa kodieren. Über die mRNA und das tatsächliche Genprodukt des ORF*m164* war zu Beginn dieser Arbeit jedoch nichts bekannt. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Transkriptions- und Translations-Analysen zeigten, dass der eigentliche ORF*m164* kürzer ist als vorhergesagt. So konnte mittels 5'/3' RACE eine ungespleißte, 2004 Nukleotide große mRNA identifiziert werden, die einen 1011 Nukleotide langen ORF, sowie 5' und 3' flankierende UTRs umfasst. Das eigentliche Start-AUG der m164-mRNA liegt in einer Kozak-ähnlichen Konsensussequenz, wobei dieses Startcodon nicht dem von Rawlinson vorhergesagten ersten AUG entspricht. Vielmehr startet die Translation am dritten AUG und generiert ein m164 Genprodukt mit einer apparenten molekularen Masse von 38 kDa. Schließlich konnte m164 als Typ-I Membranglykoprotein charakterisiert werden.

Das Protein ist ein frühes E-Phase Protein, das bereits ab 2 h p.i. und während der gesamten E-Phase abundant exprimiert wird. Pulse-Chase Experimente wiesen darauf hin, dass m164 relativ instabil ist. Mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz konnte neben einer ER-Lokalisation auch eine Kolo-kalisation von m164/gp38 mit den Proteinen der inneren Kernmembran Emerin und LaminB2 nachgewiesen werden. Eine direkte Interaktion zwischen diesen Proteinen und m164/gp38 konnte durch Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET)-Experimente allerdings ausgeschlossen werden. FRAP (*Fluorescence recovery after photobleaching*)-Analysen haben ergeben, dass m164/gp38 in der äußeren Kernmembran lokalisiert ist. Somit könnte m164/gp38 eine Rolle beim Prozess des *De-envelopments* der im Perinuklearraum lokalisierten primären Virionen spielen, indem es die Fusion zwischen primärer Virushülle und äußerer Kernmembran unterstützt und dadurch die Freisetzung der Kapside ins Zytoplasma ermöglicht. Diese Hypothese soll in weiterführenden Arbeiten überprüft werden.

Summary

Human Cytomegalovirus (hCMV) is a ubiquitous pathogen. In immunocompetent individuals CMV infection is usually asymptomatic, although it often causes life-threatening complications in immunosuppressed organ and bone marrow transplant recipients. In the case of murine CMV (mCMV) immune control in immunocompetent individuals is mediated primarily by CD8 T cells. In the infection model of the BALB/c (H-2^d) mouse, CD8 T cells with specificities for two antigenic peptides dominate, namely those with specificity for an L^d-restricted peptide derived from the immediate early protein m123 (IE1) and those with specificity for a D^d-restricted peptide from the early protein m164. Despite the concerted action of all viral immune evasion proteins, both peptides are presented at the cell surface of infected cells, thereby enabling the host immune system to control the infection.

Originally, Rawlinson et al. (1996) predicted ORF*m164* to be 1284 nucleotides in length, encoding a protein with a molecular mass of 46.6 kDa. At the beginning of the present study, nothing was known about the ORF*m164* RNA transcript or gene product. The transcription and translation assays performed here show that ORF*m164* is actually shorter than first thought. Using 5'/3' RACE it was possible to identify an unspliced 2004 nucleotide mRNA, which contained the ORF (1011bp) as well as flanking 5' and 3' untranslated regions (UTR). The start codon was found to be incorporated into a Kozak consensus sequence, different from the one predicted by Rawlinson *et al.* (1996). In fact, translation was initiated at the third AUG downstream from that previously predicted, with the resultant m164 protein having an apparent molecular mass of 38 kDa.

This study demonstrates that m164 is a type I membrane glycoprotein containing one transmembrane domain. It is an early E-phase protein, being abundantly expressed during the entire E-phase starting 2 h post infection. Pulse-chase experiments revealed a relative instability of the m164 protein. Using indirect immunofluorescence it was possible to detect not only the ER localization of the m164 protein but also a colocalization with two proteins of the inner nuclear membrane - Emerin and LaminB2. However, a direct interaction between these proteins and m164 was excluded by Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) experiments. Subsequent Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) assays showed that m164 localizes to the outer nuclear membrane. Because of its localization to the outer nuclear membrane, it is tempting to speculate that m164 plays a role during the de-envelopment process of primary virions. Theoretically, it could facilitate the fusion between primary virions and the outer nuclear membrane that leads to a transition of capsids into the cytoplasm. This hypothesis will be addressed in continuing studies.

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	I	
SUMMARY	II	
INHALTSVERZEICHNIS	III	
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VIII	
1	EINLEITUNG	1
1.1	Die Familie der Herpesviren und die Eigenschaften der Cytomegaloviren	1
1.2	Übertragung und klinische Relevanz des humanen Cytomegalovirus	2
1.3	Morphologie des Cytomegalovirus	3
1.4	Verlauf der produktiven CMV-Infektion	3
1.4.1	Penetration der Wirtszelle	3
1.4.2	Genexpression und DNA-Synthese	4
1.4.3	Virion-Morphogenese und Austritt der Virionen aus der Zelle	4
1.5	Das Cytomegalovirus-Genom	6
1.6	Das Cytomegalovirus-Proteom	8
1.7	Das murine Cytomegalovirus als Modellsystem	9
1.8	Die Immunkontrolle der murinen Cytomegalovirus-Infektion	9
1.9	Das m164-Protein des murinen Cytomegalovirus	12
1.10	Ziel der Arbeit	13
2	MATERIAL und METHODEN	15
2.1	MATERIAL	15
2.1.1	Antikörper und Seren	16
2.1.2	Plastikwaren und Verbrauchsmaterialien	17
2.1.3	Viren	18
2.1.4	Chemikalien und andere Reagenzien	18
2.1.5	Enzyme	20
2.1.6	Oligonukleotide	21
2.2	METHODEN	27
2.2.1	Proteinbiochemische Methoden	27
2.2.1.1	Gelelektrophorese	27
2.2.1.2	Nachweis der getrennten Proteine	28
2.2.1.3	Western Blot	28
2.2.1.4	Detektion des Western Blot-Signals	29
2.2.1.5	Coomassie Färbung der PVDF Membran	29
2.2.1.6	Proteinquantifizierung	30
2.2.1.7	Casein Kinase II Assay	30

2.2.1.8	Protein Kinase C Assay	31
2.2.1.9	<i>Pulse-Chase</i> Labeling	32
2.2.1.10	<i>In vitro</i> Transkription	33
2.2.1.11	<i>In vitro</i> Translation	33
2.2.1.12	Gesamtproteinextraktion aus transfizierten COS-7 Zellen	34
2.2.1.13	Fraktionierung von Zellextrakten in Zytoplasma- und Membranfraktion	35
2.2.1.14	Gewinnung des α -m164 Antikörpers	35
2.2.1.15	Immunpräzipitation	36
2.2.1.16	Baculovirus Expressionssystem	36
2.2.1.17	Suspensionskultur	37
2.2.1.18	Transfektion der Sf-9 Zellen mit Baculovirus	37
2.2.1.19	Protein-Isolierung über Magnetbeads	38
2.2.1.20	PNGase F Behandlung der Proteine	39
2.2.2	Molekularbiologische Methoden	39
2.2.2.1	Bakterienstämme	39
2.2.2.2	Vektoren	40
2.2.2.3	Umgang mit Bakterien	43
2.2.2.4	Anzucht von Flüssigkulturen	43
2.2.2.5	Vereinzlungsausstrich	43
2.2.2.6	Dauerkulturen	44
2.2.2.7	Herstellung elektrokompenter Zellen	44
2.2.2.8	Elektroporation	44
2.2.2.9	Plasmidpräparation (Schnellpräparation)	45
2.2.2.10	Plasmid-Minipräparation	45
2.2.2.11	Plasmid-Midipräparation	46
2.2.2.12	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	46
2.2.2.13	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	46
2.2.2.14	Gerichtete Mutagenese	48
2.2.2.15	Restriktion	49
2.2.2.16	Agarose-Gelelektrophorese	50
2.2.2.17	DNA Isolierung aus Agarose-Gelen	50
2.2.2.18	Ligation	50
2.2.2.19	5'/3' RACE	51
2.2.2.20	Umgang mit RNA	53
2.2.2.21	Isolierung von RNA	53
2.2.2.22	RT-PCR	54
2.2.2.23	RNA-Gelelektrophorese	55
2.2.2.24	Herstellung DIG-dUTP markierter Sonden	55
2.2.2.25	Northern Blot	56
2.2.2.26	Detektion der RNA auf Northern Blot Membranen	57

2.2.3	Zellbiologische Methoden	58
2.2.3.1	Medien und Lösungen	58
2.2.3.2	Zelllinien	59
2.2.3.3	Gewinnung von murinen embryofetalen Fibroblasten	60
2.2.3.4	Kultivierung	60
2.2.3.5	Passagieren	60
2.2.3.6	Zellzahlbestimmung	61
2.2.3.7	Transfektion	61
2.2.3.8	Kryokonservierung	62
2.2.3.9	Fixierung von COS-7-Zellen und MEF	62
2.2.3.10	Indirekte Immunfluoreszenzfärbung	63
2.2.3.11	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie	64
2.2.3.12	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET) Analysen	65
2.2.3.13	FRAP (<i>Fluorescence recovery after photobleaching</i>)	66
2.2.3.14	MEF-Infektion	67
2.2.3.15	Zusatz von Phosphonoessigsäure und Actinomycin D	68
2.2.4	MALDI-TOF-Massenspektrometrie	68
2.2.4.1	Grundlagen	68
2.2.4.2	Probenvorbereitung für die MALDI-TOF-Massenspektrometrie	71
2.2.4.3	Proteinverdau im Gel	72
3	ERGEBNISSE	73
3.1	Charakterisierung der m164-mRNA	73
3.1.1	5' RACE	74
3.1.2	3' RACE	76
3.1.3	Überprüfung des 5'/3' RACE Ergebnisses	78
3.2	<i>In vitro</i> Transkription und Translation der ORF <i>m164</i> - und der RACE <i>m164</i> - Sequenz	79
3.3	Northern Blot Analysen	82
3.3.1	Kinetik der m164-Genexpression unter Cycloheximid-Einfluss	82
3.3.2	Kinetik der m164-Genexpression unter Phosphonoessigsäure und ActinomycinD Einfluss	86
3.4	Expressionskinetik des m164-Proteins	88
3.5	Indirekte Immunfluoreszenzfärbung zur Verifizierung der m164-Expression	89
3.6	Western Blot Analysen unter Verwendung des α -m164 Antikörpers	91
3.6.1	Überprüfung des α -m164 Antikörpers	91
3.6.2	Überprüfung der Expressionskinetik von m164 mit Hilfe des α -m164 Antikörpers	93
3.6.3	Überprüfung des m164HA3'-Virions hinsichtlich m164	94

3.7	<i>Pulse-Chase</i> zur Ermittlung der m164 Stabilität in der Zelle	95
3.8	Das m164-Protein wird in infizierten Zellen als 38 kDa-Protein exprimiert	96
3.9	Expression des m164-Proteins in <i>Sf-9</i> Insektenzellen	97
3.10	MALDI-TOF-MS Analysen des in Insektenzellen exprimierten m164	100
3.11	Vorhersage über mögliche m164 Proteinfunktionen	102
3.12	Überprüfung der putativen Phosphorylierungsstellen von m164 durch Casein Kinase II und Protein Kinase C	102
3.13	Glykosylierung des m164-Proteins	104
3.13.1	PNGase F Behandlung des m164-Proteins	105
3.13.2	Ortsspezifische Mutagenese der Asparaginreste 300 und 418 des m164-Proteins	106
3.14	Überprüfung der putativen Transmembrandomänen von m164	108
3.15	Überprüfung der Funktionalität der Kernlokalisationssequenz von m164	111
3.15.1	Lokalisation der GFP/m164-Fusionsproteine in transfizierten Zellen	111
3.15.2	Lokalisation von m164 in transfizierten und infizierten Zellen	114
3.15.3	Zerstörung des NLS von m164 durch Mutagenese	116
3.16	Bedeutung des C-Fragments mit Transmembrandomäne für die m164 Lokalisation in der Zelle	118
3.17	Ursache der 38 kDa-Form von m164	120
3.18	Kokolisationsexperimente	122
3.19	Überprüfung einer möglichen Protein-Protein Interaktion zwischen m164 und LaminB2 sowie Emerin mittels Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer	126
3.19.1	Expression der für die Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer Experimente vorgesehenen Fusionsproteine in COS-7-Zellen	127
3.19.2	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer Analyse des Kontrollproteins YFP-CFP	130
3.19.3	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer Analyse zwischen Emerin-CFP und m164-YFP	133
3.20	<i>Fluorescence recovery after photobleaching</i> Analysen: Ist m164 ein Protein der inneren oder äußeren Kernmembran?	135
4	DISKUSSION	141
4.1	Die m164-mRNA	142
4.1.1	Die m164-mRNA wird nicht gespleißt	142
4.1.2	Die m164-mRNA besitzt an ihrem 3'- und 5'-Ende untranslatierte Regionen	143
4.2	Das m164-Protein	145
4.2.1	Translationsinitiation des ORF <i>m164</i> -Genproduktes	145
4.2.2	Der neu definierte ORF <i>m164</i>	149
4.2.3	Laut des neu definierten ORF <i>m164</i> existiert kein Kernlokalisierungssignal im m164-Protein	152

4.2.4	Die m164-Glykosylierung ist für die Lokalisation von m164 nicht essentiell	152
4.2.5	Eine mögliche Funktion von m164 im <i>De-envelopment</i> -Prozess von mCMV	153
4.2.6	Eine mögliche Funktion von m164 als Antifusionsprotein	155
4.3	Ausblick	159
5	LITERATUR	162
6	VERÖFFENTLICHUNGEN	176
7	LEBENS LAUF	177
8	DANKSAGUNG	178

Abkürzungsverzeichnis

A	Einbuchstabencode für Aminosäure Alanin, nach IUPAC-IUB, 1984
A	Ampère
Abb.	Abbildung
Act D	Actinomycin D
A. dest.	Einfach destilliertes Wasser
Ak	Antikörper
Amp.	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
α	Alpha, ansonsten im Kontext mit Antikörper anti-
BCA	<i>Bichinchoninic Acid</i> (Bicinchonin Säure)
bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
Cam	Chloramphenicol
cDNA	<i>copy DNA</i>
Ci	<i>Curie</i> (1 Ci = $3,7 \times 10^{10}$ Becquerel)
CIP	<i>Calf Intestinal Phosphatase</i>
CKII	Casein Kinase II
CMV	Cytomegalovirus
CSPD	Dinatrium-3-(4-methoxy Spiro(1,2-dioxyethan-3,2'-(5'-chloro)tricyclodecan)-4-yl)phenylphosphat
CTP	Cytosin-5'-Triphosphat
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindoldihydrochlorid
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DIG	Digoxigenin
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
E	<i>Early</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtBr	Ethidiumbromid
FCS	Serum fötaler Rinder (<i>fetal calf serum</i>)
for	<i>forward</i>
FRAP	<i>Fluorescence recovery after photobleaching</i>

FRET	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>
g	Erdbeschleunigung (9,8 m/s ²)
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde(n)
sec	Sekunde(n)
HA	Hämagglutinin
HAc	Essigsäure
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-ethylsulfonsäure
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horse radish peroxidase</i>)
IE	<i>Immediate early</i>
Ig	Immunglobulin
INM	Innere Kernmembran (<i>inner nuclear membrane</i>)
KAc	Kaliumacetat
Kan	Kanamycin
kbp	Kilobasenpaar
kDa	1000 Dalton
L	<i>Late</i>
LB	Luria - Bertani
Lsg.	Lösung
M	Molar
mAk	Monoklonaler Antikörper
MALDI	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
mCi	milli Curie
mCMV	Murines Cytomegalovirus
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
MEF	Murine Embryonale Fibroblasten
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
min	Minute
ml	Milliliter
MMP	Magermilchpulver
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MOPS	2-(N-morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS	Massenspektrometrie
NCS	<i>Newborn Calf Serum</i>
Neo	Neomycin
OD	optische Dichte
ONM	Äußere Kernmembran (<i>outer nuclear membrane</i>)
ORF	Offenes Leseraster (<i>open reading frame</i>)
p.a.	<i>pro analysi</i>
PAA	Phosphonoessigsäure
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pAk	Polyklonaler Antikörper
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDB	Phorbol-12,13-dibutytrat
PFA	Paraformaldehyd

PFU	<i>Plaque-forming unit(s)</i>
PI	Protease-Inhibitor
p.i.	<i>post infection</i>
PKC	Protein Kinase C
POD	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rev	<i>reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROI	<i>Region of interest</i>
rRNA	Ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptions-PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
sec.	Sekunde
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetraethyl-methyldiamin
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
TOF	<i>Time of flight</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween®20	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat
U	Unit (µmol umgesetztes Substrat pro Minute)
ü.N.	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen

International übliche Terminologie auf Englisch wurde beibehalten und kursiv gesetzt.

1 Einleitung

1.1 Die Familie der Herpesviren und die Eigenschaften der Cytomegaloviren

Herpesviren sind in der Natur ubiquitär verbreitet. Die Familie der Herpesviridae lässt sich in drei Unterfamilien einteilen, wobei man die α -, die β - und die γ -Herpesvirinae unterscheidet. Diese Einteilung wurde anhand des Wirtsspektrums, der Replikationsgeschwindigkeit und des Zelltropismus vorgenommen. α -Herpesviren (z.B. Herpes Simplex Virus Typ 1 und 2, Varicella Zoster Virus) besitzen ein breites Wirtsspektrum, kurze Replikationszeiten und persistieren in sensorischen Ganglienzellen des Wirts. Die β -Herpesviren (z.B. Cytomegaloviren, humanes Herpesvirus 6 und 7), ebenso wie die γ -Herpesviren (z.B. Epstein-Barr Virus, humanes Herpesvirus 8), zeichnen sich hingegen durch ein enges Wirtsspektrum und lange Replikationszeiten aus. Die Zielzellen der Viruspersistenz von γ -Herpesviren sind B- und T-Lymphozyten. Die β -Herpesviren besitzen die Fähigkeit Speicheldrüsenzellen, lymphoretikuläre Zellen, Nierenzellen und Zellen anderer Gewebe zu infizieren und dort zu persistieren (Mocarski & Courcelle, 2001; Roizman & Pellet, 2001).

Die Herpesvirus-Infektion einer Zelle zeichnet sich durch eine Vergrößerung, sowohl des Kerns als auch der gesamten Zelle aus. Cytomegalovirus (CMV)-induzierte Zellvergrößerungen sind besonders ausgeprägt, daher der Name für das Virus: Cyto (griech.: kytos), Zelle und megalos (griech.: megas), groß. Nach Formalin-Fixierung und Paraffineinbettung infizierter Gewebe können in betroffenen Zellen, zusätzlich zur Zellvergrößerung noch nukleäre Einschlusskörperchen sichtbar sein, die zu der Bezeichnung „Eulenaugenzellen“ (am Beispiel des murinen CMV, mCMV, siehe Abb. 1) für infizierte Zellen geführt hat (Weller et al., 1960).

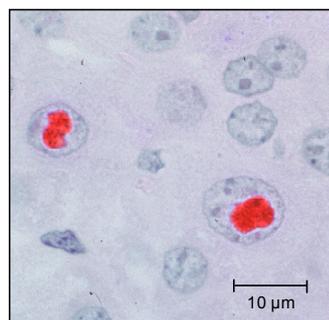


Abb. 1: Intranukleäre Einschlusskörperchen nach einer WT-mCMV-Infektion. Die Anfärbung der nukleären Einschlusskörperchen (rot) erfolgte in einem Paraffinschnitt einer Mausleber (12 Tage p.i.) mittels *in situ* Hybridisierung. Die Sonde der *in situ* Hybridisierung war gegen gB-mCMV-DNA gerichtet (Bild freundlicherweise von Dr. J. Podlech zur Verfügung gestellt).

Eine Eigenschaft aller Herpesviren ist die Fähigkeit zur Ausbildung von Latenz. Roizman und Sears definierten die Latenz bei α -Herpesviren; dabei bezeichnet Latenz das Überdauern des viralen Genoms in einem nicht replikativen Zustand (zur Übersicht siehe Roizman &

Sears, 1987). Trotzdem ist das virale Genom auch im Zustand der Latenz transkriptionell aktiv. So scheint es, dass aus vereinzelt exprimierten Proteinen antigene Peptide prozessiert werden, die vom Immunsystem des Wirts erkannt werden können. Ein Nachweis dieser Proteine bzw. Peptide ist allerdings bisher aufgrund fehlender Sensitivität biochemischer Methoden nicht möglich (Slobedman & Mocarski, 1999; Holtappels et al., 2000; Grzimek et al., 2001; Simon et al., 2006b).

1.2 Übertragung und klinische Relevanz des humanen Cytomegalovirus

Das humane CMV (hCMV) ist ein weltweit verbreitetes Pathogen, das meist im Kindesalter übertragen wird. Etwa 60-80% der erwachsenen Bevölkerung in Mitteleuropa und Nordamerika sind sero-positiv (Pass, 2001; Trincado & Rawlinson, 2001). Zur Übertragung von CMV ist ein direkter Kontakt (Tröpfchen- oder Schmierinfektion) mit virus-haltigem Material notwendig. Körperflüssigkeiten wie Speichel, Sperma, Zervixsekret, Muttermilch, Urin und Blut sind bei akuten Infektionen sowie Reaktivierungen potentiell infektiös.

Die klinische Symptomatik ist abhängig vom Immunstatus des Wirts. Bei immunkompetenten Individuen verläuft eine hCMV-Infektion in der Regel asymptomatisch. Treten bei Jugendlichen und Erwachsenen Symptome auf, ähneln diese einer Mononukleose mit Fieber, leichter Hepatitis und allgemeinem Krankheitsgefühl. Als Folge einer Primärinfektion von Schwangeren kann es zu schweren kongenitalen Infektionen des Embryos oder Fötus kommen. Etwa 10% der kongenital infizierten Neugeborenen entwickeln eine symptomatische hCMV-Infektion mit zum Teil schweren Symptomen (Petechien, Hepatosplenomegalie, Hypotonie, Krämpfe). 10-20% der symptomatischen Kinder versterben und etwa 90% der überlebenden Kinder entwickeln chronische Komplikationen wie Hörverlust und mentale Entwicklungsstörungen (Peckham et al., 1983; Boppana et al., 2001; zur Übersicht siehe Reddehase, 2002; Wintergerst et al., 2006). Bei Kleinkindern können in Folge einer hCMV-Primärinfektion eine interstitielle Pneumonie und Hepatosplenomegalie auftreten (Boppana et al., 1997).

Im Falle immunsupprimierter Patienten (Transplantation, Chemotherapie, AIDS) können sich bei einer CMV-Infektion schwere Verlaufsformen entwickeln (zur Übersicht siehe Reddehase, 2002). Eine Primärinfektion von Organtransplantat-Empfängern kann durch die Reaktivierung von latentem Virus im Transplantat ausgelöst werden, wodurch es zu klinischen Symptomen wie Hepatitiden und Pneumonien kommen kann (zur Übersicht siehe Reinke et al., 1999). Bei AIDS-Patienten kann eine Primärinfektion oder Reaktivierung zu einer Entzündung der Netzhaut (Retinitis) führen. Andere Manifestationen einer disseminierten CMV-Infektion sind in AIDS-Patienten eher selten, können aber jedes Organ betreffen. Lunge (Pneumonie), Ösophagus (Ulzera), Colon (Colitis) und das Zentrale

Nervensystem (Enzephalitis) sind dabei am häufigsten betroffen (zur Übersicht siehe Drew, 1992).

Da hCMV in der menschlichen Bevölkerung endemisch ist, war das CMV schon in der Vergangenheit Schwerpunktthema der virologischen Forschung. Zahlreiche Fakten hinsichtlich genetischer und struktureller Eigenschaften sind bei CMV bekannt und werden im Folgenden näher beschrieben.

1.3 Morphologie des Cytomegalovirus

Morphologisch sind die CMV den anderen Mitgliedern der Herpesvirusfamilie sehr ähnlich. Das CMV ist ein großes DNA-Virus mit einem Durchmesser von 150-200 nm. Die lineare, doppelsträngige DNA liegt spindelförmig in einem ikosaedrischen Nucleokapsid vor, welches von einer elektronendichten Phosphoproteinschicht, dem Tegument, umgeben wird. In die das Virion umgebende Hüllmembran (*envelope*) sind virale Glykoproteine eingelagert. Man vermutet, dass diese Glykoproteine für die Bindung an einen spezifischen Wirtszellrezeptor verantwortlich sind (Mocarski & Courcelle, 2001; Streblow et al., 2006).

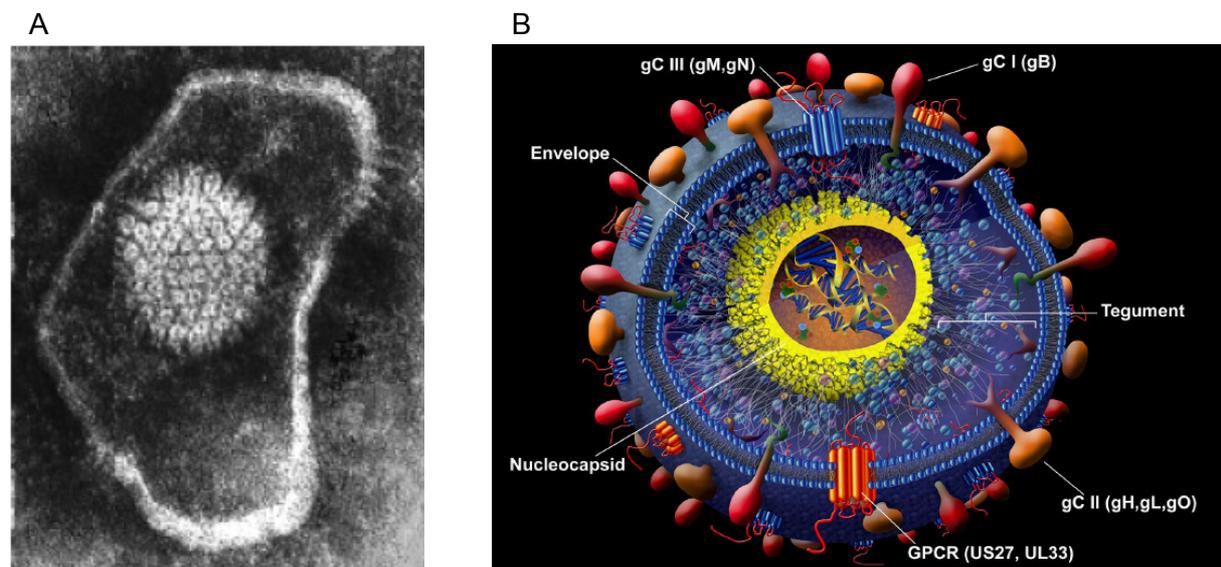


Abb. 2: Die Struktur des CMV. A: Elektronen-mikroskopische Aufnahme eines Virions (aus: D. Djandji, Doktorarbeit, 2004). B: Schematische Darstellung der Virionstruktur von Cytomegaloviren (aus: Streblow et al., 2006).

1.4 Verlauf der produktiven CMV-Infektion

1.4.1 Penetration der Wirtszelle

Die produktive Infektion von CMV beginnt mit der Adsorption des Virions an der Zelloberfläche (Compton, 1993). An welchen Oberflächenrezeptor das Virion auf der Wirtszelle bindet, ist bislang unbekannt. Es konnte aber bereits gezeigt werden, dass das

Virus über den virus-kodierten Glykoproteinkomplex gM/gN mit einem Proteoglykankomplex auf der Zelloberfläche interagiert (Boyle & Compton, 1998). Auch wurde eine Bindung des viralen Glykoproteins gB an den EGF- (*epithelial growth factor*) Rezeptor auf der Wirtszelloberfläche nachgewiesen (Wang et al., 2003).

Nach der Adsorption kommt es zum Verschmelzen von Wirtszellmembran und viraler Hüllmembran (Penetration), (Navarro et al., 1993). Dadurch wird das Kapsid mit Tegument in das Zytoplasma der Wirtszelle entlassen. Von dort wird das Kapsid wahrscheinlich über Mikrotubuli zum Zellkern transportiert (Sodeik et al., 1997; Ogawa-Goto et al., 2003) und bindet an den Kernporenkomplex. Während das Kapsid an diesen gebunden bleibt, gelangt die virale DNA in das Nukleoplasma. Die lineare Virus-DNA zirkularisiert dort zu einem Histon-assoziierten Episom und die Transkription viraler Gene beginnt (Marks & Spector, 1988). Das leere Kapsid löst sich wahrscheinlich wieder von dem Kernporenkomplex und gelangt zurück ins Zytoplasma (Tognon et al., 1981; Sodeik et al., 1997; Ojala et al., 2000).

1.4.2 Genexpression und DNA-Synthese

Die Genexpression von CMV wird koordiniert reguliert, was zur Definition von drei aufeinander folgenden Phasen führte, welche als *Immediate-Early* (IE), *Early* (E) und *Late* (L) bezeichnet werden (Emery & Griffiths, 1990). Die IE-Genexpression ist unabhängig von viraler *de novo* Genexpression und beginnt unmittelbar nachdem die virale DNA den Zellkern erreicht hat (Misra et al., 1978). Daran schließt sich 1,5-2 Stunden nach Infektion die Expression der E-Gene an, gefolgt von der Expression der L-Genprodukte, die ab 16 Stunden nach Infektion gebildet werden.

Ein Teil der IE-Genprodukte stellt Transkriptionsfaktoren dar, die die Expression der E-Gene induzieren, welche wiederum mehrheitlich für die Synthese viraler DNA verantwortlich sind (Messerle et al., 1992). Die DNA-Synthese erfolgt nach dem Mechanismus des *rolling-circle*, wobei ein einzelner DNA-Doppelstrang entsteht, der aus mehreren Einheiten des viralen Genoms aufgebaut ist; Konkatemer (Marks & Spector, 1988). Mit der DNA-Synthese setzt auch die Expression der L-Gene ein, die hauptsächlich für virale Strukturproteine kodieren. Der gesamte Replikationszyklus von hCMV dauert *in vivo* 48-72 Stunden (Mocarski & Courcelle, 2001), bei mCMV sind es 24-36 Stunden (Moon et al., 1976).

1.4.3 Virion-Morphogenese und Austritt der Virionen aus der Zelle

Trotz der biologischen Diversität der Herpesviridae scheinen viele Schritte in der Herpesvirus-Morphogenese konserviert zu sein. Am besten untersucht ist die Kapsid-Morphogenese des Herpes Simplex Virus (HSV) und des hCMV. Über Elektronen-

mikroskopische Studien konnte gezeigt werden, dass der Zusammenbau der leeren Kapside im Zellkern stattfindet. Die Insertion der viralen DNA in das leere Kapsid (*Encapsidation*) erfolgt in spezifischen Kompartimenten des Zellkerns. Bei dem *Encapsidation*-Prozess wird die konkatemere Virus-DNA in Einzelmoleküle geschnitten und diese werden in jeweils ein Kapsid verpackt (Roizman & Pellet, 2001).

Inwieweit sich das Tegument bereits im Zellkern an das Kapsid anlagern kann, ist noch nicht vollkommen geklärt. Als allgemein anerkannt gilt die Knospung (*Budding*) der Nukleokapside an der inneren Kernmembran in den Perinuklearraum. Dazu wandern die Nukleokapside nach ihrem Zusammenbau zunächst aktinabhängig zur inneren Kernmembran (Forest et al., 2005; Feierbach et al., 2006). Um Kontakt mit der Kernmembran aufnehmen zu können, muss zuvor die an die innere Kernmembran angelagerte Kernlamina aufgelöst werden. Diese Aufgabe übernehmen virale Kinasen (Muranyi et al., 2002; Reynolds et al., 2004). Durch *Budding* an der inneren Kernmembran erhalten die Kapside eine Hülle (*primary envelopment*) und liegen daher im Perinuklearraum als primäre Virionen vor. Zum Austritt dieser Virionen aus dem Perinuklearraum existieren verschiedene Modelle:

1. Modell: Nach der *double envelopment theory*, die auch als *Stackpole pathway* bezeichnet wird (Stackpole, 1969), tritt das Herpesvirion mit der äußeren Kernmembran in Kontakt und die Virionhülle fusioniert mit ihr (*De-envelopment*). Dadurch wird das nackte, unbehüllte Kapsid in das Zytoplasma entlassen (Darlington & Moss, 1968; Campadelli-Fiume et al., 1991; Gershon et al., 1994; Granzow et al., 1997; zur Übersicht siehe Mettenleiter, 2006). Dort erfolgt das sogenannte *secondary envelopment* an Vesikeln des Trans-Golgi-Netzwerk (TGN). An der Assoziation und Modifikation von Glykoproteinen an der neu gebildeten, viralen Doppelmembran ist ebenfalls das TGN beteiligt. Nach abgeschlossener Reifung kann das Virion durch Verschmelzen seiner äußeren Membran mit der zellulären Plasmamembran in den extrazellulären Raum entlassen werden (Mettenleiter, 2006; Mettenleiter et al., 2006). Für hCMV, Varicella Zoster Virus (VZV), HSV-1 und Pseudorabies Virus (PRV) wurde dieser Weg der Virion-Morphogenese bereits beschrieben (Radsak et al., 1995; Zhu et al., 1995; Gibson, 1996; Schröder & Keil, 1999).

2. Modell: Entgegen der *De-envelopment*-Theorie haben Wild et al. (2005) eine alternative Hypothese bezüglich des Virion-Austritts aus dem Perinuklearraum entwickelt. Danach kommt es wie im *Stackpole pathway* zu einem *Budding* der Nukleokapside an der inneren Kernmembran, wobei ein primäres Virion entsteht. Allerdings fusioniert es nicht mit der äußeren Kernmembran, sondern wird über raue ER-Zisternen aus dem Perinuklearraum zu den Golgi-Zisternen transportiert. Dort werden die Virionen in Transportvakuolen verpackt, zur Plasmamembran gebracht und über Exozytose ausgeschleust. Bei diesem Transport der Virionen aus dem Perinuklearraum in Transportvakuolen wird eine spontane Fusion der

viralen Hülle mit zellulären Membranen durch Antifusionsproteine verhindert (Leuzinger et al., 2005; Wild et al., 2002, 2005).

Nach Wild et al. sind Nukleokapside aber auch in der Lage, den Kern über vergrößerte Kernporen zu verlassen, wobei dieser Prozess parallel zum *Budding* der Nukleokapside an der inneren Kernmembran in den Perinuklearraum stattfindet (Haines & Baerwald, 1976; Leuzinger et al., 2005; Wild et al. 2002, 2005). Nachdem die Kapside den Kern über die Kernporen verlassen haben, erhalten sie durch Knospung am Golgi oder an der äußeren Zellkernmembran eine doppelte Lipidhülle. In Übereinstimmung mit dem ersten Modell (*Stackpole pathway*) verschmilzt die äußere Membran der Virionen bei der Freisetzung mit der Plasmamembran.

Die von Wild et al. (2002, 2005) und Leuzinger et al. (2005) entwickelten Hypothesen wurden für das Rinder Herpes Virus Typ 1 (BHV-1) und für HSV-1 aufgestellt. Aufgrund der Verwandtschaft innerhalb der Familie der Herpesviren kann davon ausgegangen werden, dass dieses Modell auch auf andere Mitglieder der Familie übertragbar ist.

1.5 Das Cytomegalovirus-Genom

Cytomegaloviren besitzen eine hohe genomische Kodierungskapazität, wobei die exakte Summe aller ORFs je CMV-Genom variieren kann. So weisen zum einen die CMV verschiedener Wirte eine unterschiedliche Zahl von ORFs auf. Für das Ratten-CMV wurden 166 ORFs nachgewiesen (Vink et al., 2000), während für den mCMV-Stamm *Smith* 172 ORFs identifiziert werden konnten (Rawlinson et al., 1996; Tang et al., 2006). Aber auch verschiedene CMV-Stämme eines Wirtes differieren in der Anzahl ihrer ORFs. Für hCMV wurden bei verschiedenen Stämmen zwischen 167 und 225 ORFs vorhergesagt (Chee et al., 1990; Cha et al., 1996; Murphy et al., 2003; Dolan et al., 2004). Trotz der Vielzahl der ORFs gibt es jedoch innerhalb der β -Herpesviren genetische Gemeinsamkeiten.

Im Laufe der Evolution sind durch Verdopplung von ORFs Genfamilien entstanden, deren Vertreter nicht nur innerhalb einer Virusspezies eine ausgeprägte Homologie zeigen, sondern auch unter den Herpesviren konserviert sind. Durch Genomanalysen konnte gezeigt werden, dass sieben in Herpesviren konservierte Blöcke von Genen (insgesamt etwa 40 Gene) existieren, die u.a. am Prozess der Replikation des Virus beteiligt sind (Mocarski & Courcelle, 2001; Dunn et al., 2003). Diese Sequenzblöcke können bei den verschiedenen Herpesviren unterschiedlich angeordnet sein (zur Übersicht siehe Davison et al., 2002). In Abb. 3 ist exemplarisch die Verteilung dieser Blöcke bei den β -Herpesviren hCMV und mCMV dargestellt. Zusätzlich zu den konservierten sieben Blöcken aller Herpesviren

existieren in β -Herpesviren etwa 40 weitere konservierte Gene (schraffierter Bereich), (Mocarski & Courcelle, 2001).

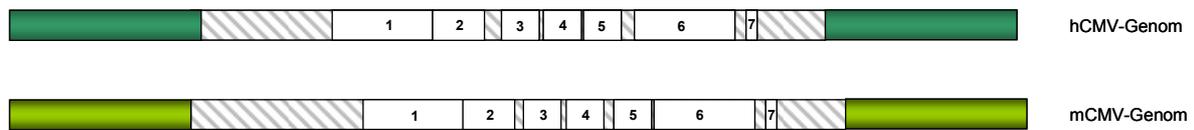


Abb. 3: Konservierte Sequenzblöcke in hCMV und mCMV. Die nummerierten Boxen zeigen die sieben in allen Herpesviren konservierten Gen-Blöcke, die zusammen etwa 40 Gene umfassen. Der schraffierte Bereich stellt den etwa 80 Gene umfassenden konservierten Bereich der β -Herpesviren dar. Die farbigen Bereiche zeigen die für hCMV und mCMV spezifischen Gene (zur Übersicht siehe Mocarski, 2004).

Diese Region großer Homologie befindet sich im zentralen Bereich des CMV-Genoms (Kattenhorn et al., 2004), (Abb. 3: schraffierter Bereich, Abb. 4: grau unterlegter Bereich). Die ORFs, die sich an den äußeren Rändern des Genoms befinden, variieren stark zwischen den CMV (Abb. 3: farbiger Bereich). Sie stellen Errungenschaften dar, die durch Anpassung an den jeweiligen Wirt ins Genom integriert worden sind.

Bezüglich der Funktion der ORFs weiß man heute, dass etwa 70% der hCMV-ORFs für die Replikation *in vitro* entbehrlich sind (Dunn et al., 2003). Während ein Teil dieser Gene für den Zelltropismus verantwortlich ist und andere Gene für anti-apoptotische Faktoren kodieren, dient ein Großteil dieser Gene der Modulation der antiviralen Immunantwort des Wirtsorganismus (*immune escape*).

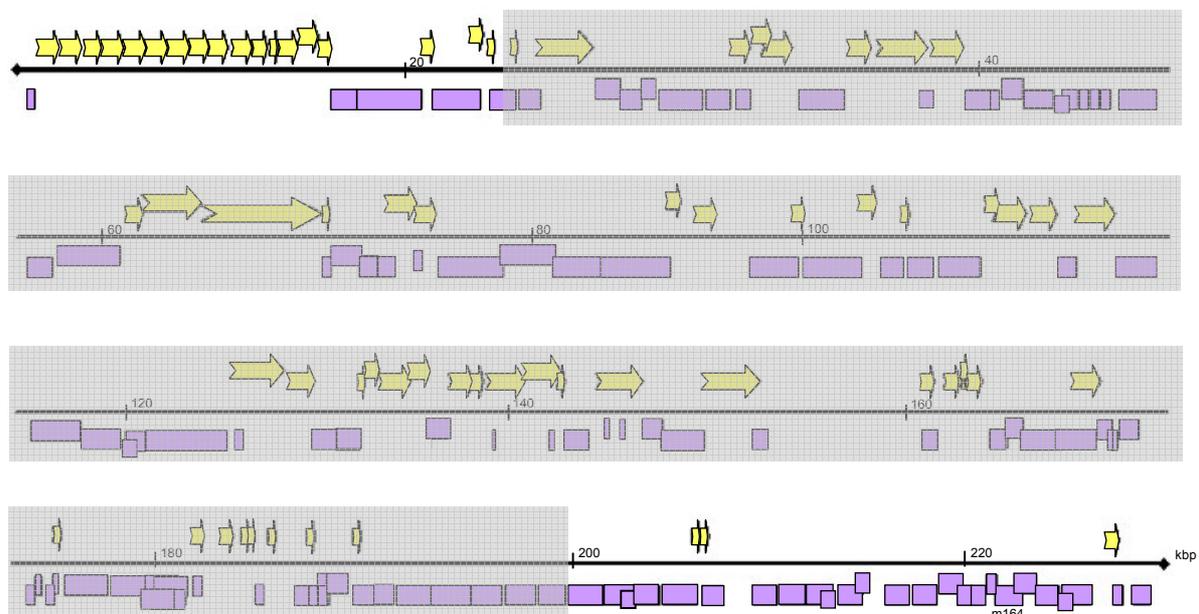


Abb. 4: Genkarte von mCMV. Das Genom umfasst 230.278 bp. Die über der Linie dargestellten ORFs (gelbe Pfeile) liegen auf dem direkten Strang (kodieren von links nach rechts), die ORFs unter der Linie (lila Rechtecke) liegen auf dem komplementären Strang des viralen Genoms (kodieren von rechts nach links). Die grau unterlegte Fläche markiert den Bereich, der die 78 zu hCMV homologen

ORFs enthält, die Randbereiche enthalten mCMV-spezifische ORFs (Rawlinson et al., 1996, modifiziert nach Tang et al., 2006).

1.6 Das Cytomegalovirus-Proteom

Zum Nachweis der Expression aller bisher bestätigten und der nur vorhergesagten ORFs entwickelten Tang und Maul einen mCMV-DNA-Microarray (Tang et al., 2006), der alle Transkriptionsprodukte dieser ORFs enthält. Mit seiner Hilfe wurde überprüft, ob alle vorhergesagten ORFs auch tatsächlich transkribiert werden. Somit konnte erstmals ein detailliertes Genexpressions-Profil für mCMV erstellt werden. Demnach gibt es acht ORFs, die nicht transkribiert werden. Weiterhin wurden sieben bisher unbekannte ORFs identifiziert, die sowohl in Fibroblasten als auch in Makrophagen exprimiert werden. Zwei weitere Gene werden ausschließlich in Makrophagen transkribiert. Somit konnten für mCMV insgesamt 172 ORFs identifiziert werden, die in Fibroblasten und Makrophagen exprimiert werden (Tang et al., 2006).

Einen weiteren Meilenstein bei der Aufklärung und Charakterisierung der CMV-spezifischen Expressionsprodukte stellt die Proteomanalyse der Virionen dar.

Unter Proteomanalyse versteht man die Untersuchung des Proteinprofils einer Zelle. Die klassische Form der Proteomanalyse beschäftigt sich mit der Identifizierung und Quantifizierung von Proteinen in Zelllysaten. Hierzu werden die Proteine proteolytisch fragmentiert, um von ihnen charakteristische *Fingerprints*, also protein-typische Bandenmuster enzymatisch verdauter und über Gelelektrophorese getrennter Proteine, darstellen zu können. Ein weiteres gängiges Verfahren zur Ermittlung eines Proteinprofils kombiniert eine 2D-Gelelektrophorese mit einer massenspektrometrischen Analyse der Protein-*Spots* im Gel.

Bei der Proteomanalyse von gereinigten hCMV-Virionen wurden die im Virion enthaltenen Proteine zunächst über Flüssigchromatographie getrennt und schließlich über Massenspektrometrie analysiert (LC-MS-Analyse), (Varnum et al., 2004; Streblow et al., 2006). Über dieses Verfahren konnten 71 virale Proteine identifiziert werden. Zusätzlich wurden zahlreiche Peptide aus bislang nicht identifizierten ORFs nachgewiesen. Allein 50% der identifizierten Proteine werden dem Tegument (siehe Abb. 2) zugeordnet. Obwohl nur fünf Proteine von hCMV an der Kapsidbildung beteiligt sind, machen diese Proteine 30% der Gesamtproteinmenge des Virions aus. Die am häufigsten nachgewiesenen Proteine im hCMV-Virion sind pp65 (UL83) und das Glykoprotein gM. Im Verhältnis zu gB ist gM etwa zehn Mal häufiger zu finden; beide Proteine befinden sich in der Virionhülle (Abb. 2). Neben viralen Proteinen wurden auch mehr als 75 Wirtszellproteine im hCMV-Virion nachgewiesen. Darunter waren Zytoskelettproteine wie α/β Aktin, Tubulin und Annexin, sowie Clathrin. Auch Proteine der Translationskontrolle, sowie Initiations- und Elongationsfaktoren konnten

identifiziert werden. Sogar Signalproteine wie RasGAP und CKII wurden in den Virionen nachgewiesen. Allerdings wird noch diskutiert, ob wirklich alle detektierten zellulären Proteine zum Virion gehören oder ob es sich dabei nur um Kontaminationen handelt, die durch die Virion-Reinigung in die Proben gelangt sind (Streblow et al., 2006).

Für das mCMV-Virion wurden ebenfalls Proteomanalysen durchgeführt. Im mCMV-Virion konnten neben zellulären Proteinen auch 58 virale Proteine nachgewiesen werden, wovon 20 Proteinen bisher keine Funktion zugeordnet werden konnte (Kattenhorn et al., 2004).

1.7 Das murine Cytomegalovirus als Modellsystem

Die bisherigen Untersuchungen haben gezeigt, dass sich mCMV und hCMV in ihren strukturellen wie auch biologischen Eigenschaften sowie in ihrer genetischen Organisation sehr ähneln und dass das Maussystem als geeignetes Modell für Studien der akuten, chronischen und latenten hCMV-Infektion herangezogen werden kann. Der vergleichbare Verlauf der CMV-Infektionen unter Immunsuppression hinsichtlich Organtropismus und klinischer Symptomatik, wie die Entwicklung einer Pneumonie (Brody & Craighead, 1974; Reddehase et al., 1985), Hepatitis (Bolger et al., 1999) und Adrenalitis (Smith & Wehner, 1980), erlaubt die detaillierte Erforschung der CMV-Pathogenese im Tiermodell. Darüber hinaus ermöglicht das CMV-Infektionsmodell der Maus übertragbare Rückschlüsse auf die hCMV-Reaktivierung aus der Latenz (Mayo et al., 1977; Gonczol et al., 1985; Simon et al., 2006a), sowie der Immunkontrollmechanismen bei CMV-Infektionen (zur Übersicht siehe Reddehase, 2002).

1.8 Die Immunkontrolle der murinen Cytomegalovirus-Infektion

Im Allgemeinen erfolgt die Kontrolle einer viralen Infektion im immunkompetenten Organismus durch verschiedene Komponenten sowohl der angeborenen als auch der adaptiven Immunabwehr. Zur angeborenen Immunabwehr zählen Effektorzellen wie Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und Makrophagen. Hochspezifische Effektorzellen wie Antikörper-produzierende B-Lymphozyten sowie T-Lymphozyten, die eine hohe Diversität für die Antigenerkennung haben, sind typische Vertreter der adaptiven Immunabwehr. Eine erste Verteidigungslinie gegen virale Infektionen stellen die NK-Zellen dar (zur Übersicht siehe Lanier & Phillips, 1992; Arase et al., 2002), da die spezifische T-Zellantwort einige Tage benötigt, um ausreichend aktiviert zu werden (zur Übersicht siehe Welsh, 1986; Andoniou et al., 2006).

Die Bedeutung der zellvermittelten adaptiven Immunität für die Kontrolle der CMV-Infektion wurde eindrucksvoll im Mausmodell nachgewiesen (Koszinowski et al., 1993). Ferner konnte

auch eine Schutzfunktion von NK-Zellen gezeigt werden (Quinnan et al., 1978). Ein dauerhafter Schutz wird jedoch nicht durch NK-Zellen vermittelt, sondern durch die T-Zellimmunantwort, die etwa drei Tage nach mCMV-Infektion hochreguliert wird und ihr Maximum nach etwa 10 Tagen erreicht (Reddehase et al., 1985; Reddehase et al., 1988). Die herausragende Bedeutung der zellvermittelten Immunität bei der Kontrolle der mCMV-Infektion zeigt sich nach Auslöschung aller zellulären Komponenten des Immunsystems durch γ -Bestrahlung, was zu einer massiven Infektion aller lebenswichtigen Organe wie Lunge, Leber, Nebenniere, sowie Gastrointestinaltrakt (Reddehase et al., 1985; Podlech et al., 1998) führt. Als protektive Komponente der adaptiven Immunität in genetisch suszeptiblen Mausstämmen wurden die CD8 T-Zellen identifiziert (Reddehase et al., 1985, Lathbury et al., 1996). Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der akuten mCMV-Infektion. Zudem limitieren sie die Reaktivierung von latentem Virus. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass CD8 T-Zellen aus akut oder latent infizierten, immunkompetenten Tieren alleine ausreichend sind, um nach adoptivem Zelltransfer eine ansonsten letale mCMV-Infektion in immundepletierten Indikatorrezipienten zu verhindern (Reddehase et al., 1985; Reddehase et al., 1988). Die Identifizierung und Charakterisierung der viralen Proteine, die eine protektive antivirale CD8 T-Zellantwort induzieren, ist deshalb ein zentrales Thema der CMV-Immunologie mit Relevanz für die Entwicklung einer Vakzine.

CD8 T-Zellen sind in allen drei Phasen des Replikationszyklus die wichtigsten Effektorzellen bei der Immunkontrolle von CMV. Um diese Kontrolle zu unterlaufen, kodieren CMV für Immunevasionsproteine, sogenannte Immunevasine. Dies sind Proteine, welche an verschiedenen Stellen mit der Immunkontrolle interferieren, unter anderem auch mit dem MHC-Klasse-I Weg der Antigenprozessierung und -präsentation.

Für mCMV sind drei Proteine beschrieben, die Einfluss auf den MHC-Klasse-I Weg der Antigenprozessierung und -präsentation nehmen. Das *m152*-Genprodukt gp40, ein E-Phase-Protein, ist in der Lage, peptidbeladene MHC-Klasse-I Komplexe im ER/cis-Golgi Kompartiment zu retendieren (Ziegler et al., 1997; Ziegler et al., 2000). Dies hat zur Folge, dass prozessierte antigene Peptide nicht an der Zelloberfläche präsentiert werden, um eine Immunantwort zu induzieren (Del Val et al., 1992). Zusätzlich kodiert mCMV noch für zwei weitere Proteine, die an der Regulation der Immunkontrolle beteiligt sind. Es sind die Membranglykoproteine m04/gp34 und m06/gp48. Die Proteine m04/gp34 und m06/gp48 sind in der Lage stabile Komplexe mit peptidbeladenen MHC-Klasse-I Molekülen zu bilden. m06/gp48 dirigiert die MHC-Klasse-I Peptidkomplexe über ein Dileucin-Motiv im zytoplasmatischen Teil von m06 zu den Lysosomen (Reusch et al., 1999). Dort wird sowohl m06/gp48 als auch das MHC-Klasse-I Molekül degradiert.

Der m04/MHC-Klasse-I Peptidkomplex hingegen gelangt über den sekretorischen Weg an die Zelloberfläche. Ungebundenes, nicht an MHC-Klasse-I assoziiertes m04 bleibt im ER (Kleijnen et al., 1997).

Man ging bis vor kurzem davon aus, dass m04 ebenso wie m152 und m06 die Erkennung der infizierten Zelle durch CD8 T-Zellen verhindert, indem es die Erkennung des MHC-Klasse-I Peptidkomplexes durch den T-Zell-Rezeptor (TCR) sterisch inhibiert, oder eine Konformationsänderung des Komplexes induziert (zur Übersicht siehe Lilley & Ploegh, 2005). Diese Annahme konnte kürzlich widerlegt werden (Holtappels et al., 2006); m04/gp34 hemmt nicht die Erkennung Peptid-beladener MHC-Klasse-I Komplexe an der Zelloberfläche. Zusätzlich hebt es die Wirkung von m152 auf und wirkt somit als Anti-Immunevasin. Deshalb wurde m06/gp48 als direkter funktioneller Gegenspieler von m04/gp34 interpretiert (Wagner et al., 2002; Holtappels et al., 2006). Um der Doppelfunktion gerecht zu werden, wurde ein neuer Begriff geprägt: vRAP (*viral regulator of antigen presentation*), (Holtappels et al., 2006). Er bezeichnet virale Proteine, welche die Antigenpräsentation sowohl negativ (m06/gp48 und m152/gp40) als auch positiv (m04/gp34) modulieren. Obwohl die konzertierte Aktion dieser drei Proteine die Präsentation einiger viraler Peptide verhindern kann, entkommen andere konditional oder konstitutiv diesem Einfluss und stellen so die molekulare Basis der Immunkontrolle dar.

Aus Arbeiten der Arbeitsgruppe Reddehase und Holtappels an unserem Institut sind für mCMV in der BALB/c Maus (Haplotyp H-2^d) die beiden immundominanten Peptide IE1 und m164 bekannt.

Das IE1-Peptid stammt aus dem Gen *m123*, Exon 4 (Reddehase et al., 1989) und wird auch während der Latenz präsentiert (Simon et al., 2006a). So kommt es während der Latenz zu einer Anreicherung von IE1-spezifischen CD8 T-Zellen (Holtappels et al., 2000). Eine mögliche Erklärung für die Anreicherung IE1-spezifischer CD8 T-Zellen während der Latenz liefert die *Desilencing*-Hypothese: Als *Desilencing* werden genregulatorische Prozesse bezeichnet, die zu einer Expression viraler Gene führen können und durch offene Chromatinstrukturen am viralen Genom ausgelöst werden. Während der Latenz in infizierten Lungen von BALB/c Mäusen kann es nun zufällig zu lokalen *Desilencing* Ereignissen kommen (Simon et al., 2006a; Simon et al., 2006b). Beim Prozess des *Desilencing* kann es zu einer Aktivierung des *major immediate early* (MIE) Locus kommen, was letztlich zur Präsentation des antigenen IE1-Peptids an der Zelloberfläche führt. Dadurch werden IE1-spezifische CD8 T-Zellen aktiviert, welche IE1-peptidpräsentierende Zellen erkennen.

Das von Holtappels und Kollegen identifizierte m164-Peptid besitzt die Eigenschaft, der Wirkung der Immunevasine zu entkommen (Holtappels et al., 2002a). Das m164-Peptid war über Epitopvorhersage-Algorithmen aus der genomischen Sequenz identifiziert worden (Reverse Immunologie). Tatsächlich induziert das antigene Peptid (²⁵⁷AGPPRYSRI²⁶⁵) des ORF*m164 in vivo* eine protektive antivirale CD8 T-Zellantwort. Dieses antigene Peptid wird in der E- und L-Phase der viralen Genexpression auf der Zelloberfläche infizierter Zellen präsentiert und von CD8 T-Zellen erkannt. Aufgrund der Expressionskinetik des *m164*-Gens wurde postuliert, dass es sich bei dem *m164*-Gen um ein E-Gen handelt (Holtappels et al., 2002b).

Außer dem Befund, dass der ORF*m164* für ein dominantes E-Peptid kodiert, lagen keine weiteren Daten über das Gen und seine Genprodukte vor.

1.9 Das m164-Protein des murinen Cytomegalovirus

In einer Arbeit der Arbeitsgruppe Koszinowski wurde eine rekombinante mCMV-Deletionsmutante hergestellt (mCMVΔ94.5), in der die Gene *m151* bis *m165* deletiert sind (Thäle et al., 1995). Es konnte lediglich *in vitro* gezeigt werden, dass keine Unterschiede in der Replikationskinetik zwischen diesem rekombinanten Virus und WT-mCMV besteht. Um den Einfluss von m164 auf die mCMV-Replikationskinetik auch *in vivo* zu untersuchen, wurde an unserem Institut eine Deletionsmutante mit Hilfe der BAC-Mutagenese erstellt und im WT-mCMV-Genom *m164* deletiert (J. Müller, Diplomarbeit, 2005). Selbst *in vivo* zeigte diese mCMVΔ*m164* Mutante dieselbe Replikationskinetik wie WT-mCMV. Somit war klar, dass das m164-Protein für die Virusreplikation *in vitro* und *in vivo* nicht essentiell ist.

Daher sollten folgende Aspekte überprüft werden:

- Zunächst sollte die mRNA von m164 untersucht werden. Mögliche Spleißvarianten und/oder untranslatierte Bereiche der m164-RNA sollten detektiert werden. Die Expressionskinetik des *m164*-Gens sollte in Infektions- und Transfektionsexperimenten ermittelt werden.
- Über die *in silico* Analyse waren zahlreiche Struktureigenschaften vorhergesagt worden. Aufgrund der putativen Phosphorylierungsstellen lag die Vermutung nahe, dass m164 eine Rolle in Signaltransduktionprozessen spielen könnte. Dies sollte überprüft werden. Zudem sollte die Funktionalität der vorhergesagten Transmembrandomänen und somit die Membrantopologie von m164 bestimmt werden. Hinweise darauf sollte auch die Untersuchung der genutzten Glykosylierungsstellen liefern.
- Lokalisationsstudien sollten zeigen, ob das vorhergesagte NLS funktionell und somit das m164-Protein tatsächlich im Kern lokalisiert ist. Zudem sollten Koloalisationsstudien Aufschluss über mögliche Interaktionspartner geben, um weitere Hinweise auf eine mögliche Funktion von m164 im Kontext einer mCMV-Infektion zu erhalten.

2 Material und Methoden

2.1 Material

In der folgenden Tabelle sind alle Firmen mit Firmensitz dargestellt, bei welchen Material für diese Arbeit erworben wurde.

Firma	Sitz
Abcam	Cambridge, UK
Acris	Hiddenhausen
Ambion	Austin, TX, USA
Amersham Biosciences	Freiburg
AppliChem	Darmstadt
Baker	Deventer, Holland
BD Transduction Laboratories	Franklin Lakes, NJ USA
Becton Dickinson	Heidelberg
Biochrom	Berlin
BioRad	München
BioWhittaker Molecular Applications	Rockland, ME, USA
Braun	Melsungen
Calbiochem	(Merck) Darmstadt
Chemicon International	(Millipore) Schwalbach
DAKO	Dänemark
Difco	Detroit, MI, USA
Eppendorf	Hamburg
Fermentas	St. Leon-Rot
Fluka	Buchs, Schweiz
Kodak	Stuttgart
Gibco	Karlsruhe
Greiner	Nürtingen
HISS Diagnostics	Freiburg

Firma	Sitz
Ibidi	München
Marienfeld Lab. Glassware	Lauda
Merck	Darmstadt
Meridian Bioscience	Cincinnati, OH, USA
Millipore	Schwalbach
Mundo OHG	Mainz
MP Biomedicals	Irvine, CA, USA
Miltenyi Biotec	Bergisch-Gladbach
Nunc International	Dänemark
New England Biolabs (NEB)	Frankfurt/Main
PAA Laboratories	Pasching, Österreich
PeqLab	Erlangen
Pierce	Rockford, IL, USA
Promega	Mannheim
Qiagen	Hilden
Roche Diagnostics GmbH	Mannheim
Roth	Karlsruhe
Sarstedt	Nümbrecht
Serva	Heidelberg
Sigma-Aldrich Chemie GmbH	München
VWR	Poole, UK
Whatman, Schleicher&Schuell	Middlesex, UK
Zymed Laboratories	San Francisco, CA, USA

2.1.1 Antikörper und Seren

Die hier in alphabetischer Reihenfolge aufgeführten Primär- und Sekundärantikörper wurden für Western Blot Analysen, Immunpräzipitation und Immunfluoreszenzfärbungen verwendet.

Antikörper	Typ & Klon	Immunisierte Spezies	Subtyp	Verdünnung	Bezugsquelle und Bestellnummer
α -Calnexin (ER)	mAk AF18	Maus Ascites	IgG1	IF 1:100	Abcam, ab2798
α -Digoxigenin	AP	Schaf	Fab	1:10000	Roche Diagnostics GmbH 1093274
α -Emerin	pAk	Kaninchen		IF 1:500 WB 1:2000	Acris, BP4518
α -GFP	pAk	Kaninchen		WB 1:5000 IP 1:250	Abcam, ab1218
α -GM 130 (Cis-medialer Golgi)	mAk 35	Maus	IgG1	IF 1:100	BD Transduction Laboratories, 610822
α -HA	mAb 16B12	Maus Acites	IgG1	WB 1:2000 IP 1:250	HISS Diagnostics, MMS-101R
α -HA	pAb	Kaninchen		WB 1:2000 IP 1:250	HISS Diagnostics, PRB-101R
α -Kaninchen	POD	Schwein		WB 1:1000	DAKO, P0217
α -Kaninchen	AF ₅₄₆	Ziege		IF 1:200	MoBiTec, A11010
α -Kaninchen	AF ₄₈₈	Ziege		IF 1:200	MoBiTec, A11008
α -Lamin A/C	mAk 131C3	Ratte	IgG1 κ	1:100	Chemicon International, MAB3538
α -Lamin B1	mAk L1	Maus	IgG1 κ	IF 1:100	Zymed Laboratories, 33-2000
α -Lamin B2	mAk E-3	Maus	IgG1 κ	IF 1:25	Zymed Laboratories, 33-2100
α -Maus	POD	Kaninchen		WB 1:1000	DAKO, P0260
α -Maus	AF ₅₄₆	Ziege		IF 1:200	MoBiTec, A11003
α -Maus	AF ₄₈₈	Ziege		IF 1:200	MoBiTec, A11001
α -myc	mAb 9E10	Maus Ascites	IgG1	WB 1:1000	HISS Diagnostics, MMS-150R
α -m164	pAk	Kaninchen	IgG1	IF 1:200 WB 1:2000 IP 1:250	Dr. Dennis Strand
α -Ratte	POD	Kaninchen		WB 1:1000	DAKO, P0162
α -Ratte	AF ₅₄₆	Ziege		IF 1:200	MoBiTec, A11081
α -TGN38 (TGN)	mAk 2	Maus	IgG1	IF 1:50	BD Transduction Laboratories, 610898
α -Tubulin (Mikrotubuli)	mAk DM1A/B	Maus	IgG1 κ	IF 1:1000	Abcam, ab3194
α -Vimentin (Intermediärfilamente)	mAk VI-10	Maus SDS-Page	IgM	IF 1:200	Abcam, ab20346
α -Ziege	POD	Kaninchen	IgG	WB 1:1000	DAKO, P0449
Hoechst 33342	-	-	-	IF 1:5000	MoBiTec, H-3570

Tab. 1: In den Klammern hinter den Primärantikörpern steht die Art des Antikörpers (pAk: polyklonal; mAk: monoklonal) bzw. hinter den Sekundärantikörpern das konjugierte Enzym Peroxidase (POD), alkalische Phosphatase (AP) oder der Fluoreszenz Marker AlexaFluor (AF).

2.1.2 Plastikwaren und Verbrauchsmaterialien

Einfrierröhrchen	1,8 ml <i>CryoTube</i> Vials (Nunc International, Nr. 375418)
Einmal-Plastikpipetten	10 ml (Greiner, Nr. 607180) 25 ml (Greiner, Nr. 760180)
Einmal-Spritzen	1 ml (Braun, Nr. 916140/6) 2 ml (Braun, Nr. 04606027) 10 ml (Braun, Nr. 04606108) 50 ml (Becton Dickinson, Nr. 308500)
Elektroporations-Küvetten	Peqlab, Kat.-Nr. 71-2020-lange Elektroden, 2mm
Deckgläser	12 mm Ø (Marienfeld Lab. Glassware, Nr. 0111520)
Mikrotiterplatten	96- <i>Well</i> -Flachbodenplatten (Greiner, Nr. 655180) 96- <i>Well</i> -Rundbodenplatten (Greiner, Nr. 650180)
Reaktionsgefäße	1,5 ml (Sarstedt, Nr. 72.690) 2,0 ml Safe Seal (Sarstedt, Nr. 72.695)
Reaktionsgefäße (PCR)	0,5 ml Safe Lock (Eppendorf, Nr. 35325)
Sterilfilter	FP 030/3 Einmal-Filterhalter 0,2 µm, Rotrand Schleicher & Schuell; Nr. 462200 FP 030/2 Einmal-Filterhalter 0,45 µm, Weißrand (Schleicher & Schuell; Nr. 462200) 150 ml Easy Flow™ Filter 0,22 µm (Falcon, Becton Dickinson, Nr. 357107)
µ MACS Säulen	20 µl Säulen, Miltenyi Biotec, Nr. 130-042-701
Zellkulturflaschen	25 cm ² (Falcon, Becton Dickinson, Nr. 353014) 75 cm ² (Falcon, Becton Dickinson, Nr. 353135)
Zellkulturplatten	6- <i>Well</i> -Flachbodenplatten (Falcon, Becton Dickinson, Nr. 353046) 24- <i>Well</i> -Flachbodenplatten (Falcon, Becton Dickinson, Nr. 353047)
Zellkulturschalen	60/15 mm (Falcon, Becton Dickinson, Nr. 353004) 100/20 mm (Falcon, Becton Dickinson, Nr. 353003) 150/25 mm (Falcon, Becton Dickinson, Nr. 353025) Tunnel (Ibidi µ-Slide VI, Nr.80606)

Zentrifugenröhrchen	50 ml Spitzboden (Falcon, Becton Dickinson, Nr. 353070)
	14 ml Spitzboden (Falcon, Becton Dickinson, Nr. 352096)
	5 ml Rundboden (Greiner, Nr. 115261)

2.1.3 Viren

WT-mCMV: Die Infektion von Zellkulturen und Versuchstieren erfolgte mit dem Laborstamm des murinen Cytomegalovirus (mCMV, *Smith strain*; Smith (1956); ATCC VR-194, neue Bezeichnung VR-1399). Ausgehend von diesem Virusstamm wurde das gesamte mCMV-Genom sequenziert (Rawlinson et al., 1996).

m164HA3'-mCMV: Virusmutante, die am 3'-Ende des m164-Proteins eine HA-Epitop-Sequenz (YPYDVPDYA) aus dem Hämagglutininprotein des Influenza-A-Virus enthält (C. Simon, Doktorarbeit, 2006).

2.1.4 Chemikalien und andere Reagenzien

Acetonitril (HPLC analyzed)	Baker, Nr. 9017
Acrylamid	Rotiphorese [®] Gel30, Roth, Nr. 3029.1
Agarose (SeaKem LE)	BioWhittaker Molecular Applications, Nr. 840.004
Ammoniumbicarbonat (NH ₄ HCO ₃)	Fluka, Nr. 40867
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nr. A-9164
Bacto Agar	Difco
Bromphenolblau	Roth
Bovines Serum Albumin (BSA)	Serva
Calciumchlorid (CaCl ₂ ×2H ₂ O)	Roth
Casein	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nr. C-4765
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nr. C-0378
Dimethylpimelimidat (DMP)	Pierce, Nr. 21667
n,n-Dimethylformamid (DMF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nr. D-4254
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Roth
Dodecyl-β-D-maltosid	AppliChem, Nr. A0819
EGTA	Roth, Nr. 3054.1
Essigsäure 100% (v/v) (HAc)	Roth
Ethanol 100% (v/v)	Roth

Ethanol 96% (v/v)	Mundo, Nr. UN 1170
Ethidiumbromid (100ml)	Roth
Ethylendiamin-tetra-essigsäure	
Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA)	Roth
Formaldehyd säurefrei 37% (v/v)	Roth
Glycin ($C_2H_5HO_2$)	Roth, Nr. 3908.3
Glycerin ($C_3H_8O_3$)	Roth, Nr. 7533.3
Histon III S	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nr. H-5505
Isopropanol	Hedinger, Stuttgart über Apotheke Universitäts- Klinikum Mainz
Kaliumacetat (KAc)	Roth
Kaliumchlorid (KCl)	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck
Kanamycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nr. K-4000
Magermilchpulver	AppliChem, Nr. A0830
Magnesiumchlorid ($MgCl_2 \times 6H_2O$)	Roth
2-Mercaptoethanol (ME)	Roth
Methanol	VWR, Nr. 10158BG
Mounting Medium	Merian Bioscience, Nr. 2914.032
MitoTracker	Invitrogen, Nr. M22425
Natriumacetat (NaAc)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nr. S-8625
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Roth
Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	Roth
Natriumhydrogencarbonat (Na_2HCO_3)	Roth
Natriumdihydrogenphosphat ($NaH_2PO_4 \times H_2O$)	Roth
Natriumphosphat ($Na_2PO_4 \times H_2O$)	Roth
Desoxyribo-Nukleotidtri- phosphate (dNTP)	Roche Diagnostics GmbH
Phalloidin, FITC markiert	Invitrogen, Nr. F432
Phorbol-12,13-dibutyrat (PBS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Phosphatidylserin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Protein A-Glaskugeln, (ProSep-vAUltra)	Millipore, Nr. 115115822
Protein Standard, (PageRuler TM Prestained Protein Ladder)	Fermentas, Nr. SM0671

Polyoxoethylensorbitan Monolaurat (Tween®20)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nr. P-1379
Salzsäure (HCl) 25%	Merck
Saccharose	Merck
Technischer Ethanol	Mundo OHG
TEMED	Roth Nr. 2367.3
Triton X-100	
(Iso-octylphenoxy-polyethoxyethanol)	Amersham Biosciences, Nr.17-1315-01
Trypsin/EDTA	PAA
Yeast extract Servabacter	Serva

Radioaktive Materialien:

[γ - ³² P]ATP, 250 μ Ci	Amersham Biosciences, Nr. PB171-250UCI
Redivue™ PRO-MIX™ L-[³⁵ S] 2,5 mCi	Amersham Biosciences, Nr. AGQ0080
Redivue™ L-[³⁵ S] Methionin 2,5 mCi	Amersham Biosciences, Nr. AG1094

2.1.5 Enzyme

Casein Kinase II	Promega, Nr. V5621
<i>Calf Intestinal Phosphatase</i> (CIP)	New England Biolabs GmbH
Endo H	New England Biolabs GmbH, Nr. P0702
Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs GmbH, Nr. F553L
Proteinase K	Roche Diagnostics GmbH
Protein Kinase C	Promega, Nr. V526A
PNGase F	New England Biolabs GmbH, Nr. P0704
Restriktionsendonukleasen	Fermentas; New England Biolabs GmbH
T4 DNA Ligase	New England Biolabs GmbH, Nr. M0202
Trypsin	Roche Diagnostics GmbH, Nr. 11418025001
Chymotrypsin	Sigma, Australien

2.1.6 Oligonukleotide

Sonde zum Nachweis von *HPRT*, Amplifikatgröße: 817 bp

Hprt_for 5'-CCT CAC TGC TTT CCG GAG CGG-3'
Hprt_rev 5'-GGA CTA GAA CAC CTG CTA ATT TTA CTG G-3'

Sonde zum Nachweis von *m164*, Amplifikatgröße: 858 bp

Sonde_for 5'-AAC AAG ATC TAT CCC GAC CAG-3'
Sonde_rev 5'-TGG CTG ATG GT TGCG CGA CAC-3'

Sonde zum Nachweis von *m123*(Exon4), Amplifikatgröße: 1461 bp

m123_for 5'-GCT CTT CTT CTT GGG CTG-3'
m123_rev 5'-CCT GTA AGA TTG CAC ACC-3'

Sonde zum Nachweis von *m04*, Amplifikatgröße: 786 bp

m04_for 5'-CGT ATG TCG GCT GGT GTT GG -3'
m04_rev 5'-CTC TTA AGC GGT TTG AAG TTC G -3'

ORF *m164* Primer für 5' RACE PCR

Flank_1 5'-CAC GAA GGC GGC GAG GAA AC -3'
Nested Flank_2 5'-GAC GAC GAC CGA TAC GCA GAC-3'

ORF *m164* Primer für 3' RACE PCR

Nested Flank_5 5'-CTC ATC TAC GCG GCG GCT TCA G -3'

Primer zur Überprüfung des RACE-Ergebnisses

mRNAfor 5'-CGC ACA TCA CCA GTG -3'
mRNArev 5'-GTT TAG TCG GGA GCG TG -3'
mRNArevout 5'-GTA TCT ATC CAC CAC CTC AC -3'

Template für *in vitro* Transkription, langes Fragment mit RACE-Größe,

Amplifikatgröße: 2023 bp

SP6_for 5'-ATT TAG GTG ACA CTA TAG AAG GTT TAG TCG GGA GCG TG-3'
SP6

SP6_rev 5'-TAC GCA CAT CAC CAG TGT TTT ATT AG-3'

Template für *in vitro* Transkription, kurzes Fragment mit ORF*m164* Größe,

Amplifikatgröße: 1303 bp

m164full_for 5'-ATT TAG GTG ACA CTA TAG AAT GTT TCT CCG CGG CTG TCG-3'
SP6

m164full_rev 5'-TCA TGA CGA ACG TCC GAC GC-3'

Primer für gerichtete Mutagenese an putativer N-Glykosylierungsstelle in m164, AS Position 418 N→Q. Amplifikatgröße: 1306 bp

SDM_for (*EcoRI*) 5'-ACA GAA TTC GCC GCC ATG TTT CTC CGC GGC TG-3'
EcoRI

SDM_N418Q_rev (*XbaI*) 5'-CCT CTA GAT GAC GAA CGT CCG ACG CGC GAC
XbaI

GA AGC TTG CCG TTG CGG CC-3'
N→Q

Primer für gerichtete Mutagenese an putativer N-Glykosylierungsstelle in m164, AS Position 300 N→Q. PCR 1, Amplifikatgröße: 946 bp

SDM_N300Q_for 5'-GAG GGT TTT ACC GTC CAA GCA TCC GAC CTG GCC -
3' N→Q

SDM_N300Q_rev (*XbaI*) 5'-CCT CTA GAT GAC GAA CGT CCG ACG CGC GAC
XbaI

GAA GCG TGC CGT TGC GGC C-3'

Primer für gerichtete Mutagenese an putativer N-Glykosylierungsstelle in m164, AS Position 300 N→Q. PCR 2, Amplifikatgröße: 413 bp

SDM2_N300Q_rev 5'-GGC CAG GTC GGA TGC TTG GAC HHT AAA ACC CTC -
3' N→Q

SDM_for (*EcoRI*) 5'-ACA GAA TTC GCC GCC ATG TTT CTC CGC GGC TG-3'
EcoRI

Primer für Transferplasmid pAcGP67 und pAcGHLT, Amplifikatgröße: 1309 bp

m164_Bacu_for 5'-CGC TCG G AAT TCG CCT TTC TCC GCG GCT GTC G -3'
EcoRI

m164_Bacu_rev 5'-CGA TGC TGC AGT CAT GAC GAA CGT CCG A-3'

Sequenzierprimer für Transferplasmid pAcGP67 und pAcGHLT

Seq_pAcG_for 5'-CTC TCG GCA TCG AAC GTG -3'

Seq_pAcG_rev 5'-GTA CTC GCG CAT CTT CTG-3'

Primer um Emerin aus mRNA in cDNA zu schreiben, Amplifikatgröße: 780 bp.

Emerin_for: 5'-ATG GAC GAC TAT GCG GTT TTG-3'

Emrin_rev: 5'-TTAG GGA TCC ATC CAC AAG G-3'

Primer für m164 mit N-terminalem myc-Tag, in pcDNA 6/V5 His. Amplifikatgröße: 1341 bp.

m164_myc_*HindIII*_for: 5'-CGC AAG CTT CCA CCA TGG AAC AAA AAC TTA TTT
HindIII

CTG AAG AAG ATC TGT TTC TCC GCG GCT GTC G-3'

m164_myc_*XbaI*_rev: 5'-GCG TCT AGA TCA TGA CGA ACG TCC GAC GCG CGA
XbaI

CGA AGC CG-3'

Primer für m164 mit alternativer Startstelle an Methioninrest 27 und N-terminalem myc-Tag, in pcDNA 3.1 (+). Amplifikatgröße: 1280 bp.

m164alt_myc_HindIII_for: 5'-CGC **AAG CTT** CGC CAC CAT GGA ACA AAA ACT TAT
HindIII

TTC TGA AGA AGA TCT GTG CCG ACG ACG CGT TG-3'

m164alt_myc_XbaI_rev: 5'-GCG **TCT AGA** CTC ATG ACG AAC GTC CGA CGC GCG
XbaI

ACG AAG C3'

Primer für m164 mit alternativer Startstelle an Methioninrest 91 und N-terminalem myc-Tag, in pcDNA 3.1 (+). Amplifikatgröße: 1070 bp.

m164altII_myc_HindIII_for: 5'-CGC **AAG CTT** CGC CAC CAT GGA ACA AAA ACT TAT
HindIII

TTC TGA AGA AGA TCT GCT CGC CCT CAT CTA CGC GG-3'

m164alt_myc_XbaI_rev: 5'-GCG **TCT AGA** CTC ATG ACG AAC GTC CGA CGC GCG
XbaI

ACG AAG C3'

Primer für m164 mit C-terminalem HA-Tag, in pcDNA 3.1 myc/His.

Amplifikatgröße: 1338 bp.

m164_C_EcoRI_for: 5'-ACA **GAA TTC** GCC GCC ATG GTT CTC CGC GGC TG-3'
EcoRI

m164_HAC_XbaI_rev: 5'-GAG **TCT AGA** CTA AGC GTA GTC TGG GAC GTC GTA
XbaI

TGG GTA TGA CGA ACG TCC GAC GCG-3'

Primer für m164 mit N-terminalem HA-Tag, in pcDNA 3.1 myc/His.

Amplifikatgröße: 1350 bp.

m164_N_EcoRI_for: 5'-GCA **GAA TTC** GCC ACC ATG GCA TAC CCA TAC GAC
EcoRI

GTC CCA GAC TAC GCT TTT CTC CGC GGC TGT CGG-3'

m164_XbaI_rev: 5'-TCA **TCT AGA** TGA CGA ACG TCC GAC GCG-3'
XbaI

Primer für gerichtete Mutagenese an putativer Signalpeptidsequenz (NLS) in m164, PCR 1, Amplifikatgröße: 223 bp

A_EcoRI_for: 5'- CGT **GGA ATT CTC** GCC GCC ATG TTT CTC CGC GGC-3'
EcoRI

NLS_mut_rev: 5'- CGC TGC GTA TGC TGC TGC CGG CGC TGC GGA
N→Q N→Q N→Q N→Q N→Q N→Q

AGA GGT CGG TAC ACA G-3'

Primer für gerichtete Mutagenese an putativer Signalpeptidsequenz (NLS) in m164, PCR 2, Amplifikatgröße: 1033 bp.

NLS_mut2_for: 5'- GCA GCG CCG GCA GCA GCA TAC GCA GCG CGA
N→A N→A N→A N→A N→A
 CTC CCG TTC TGT ATC C- 3'

C_BamHI_rev: 5'- AAG GGA TCC TCT GAC GAA CGT CCG ACG C-3'
BamHI

Sequenzierprimer für pEGFP/YFP/CFP/DsRED-N1:

N1_for: 5'- GGT AGG CGT GTA CGG-3'
 N1_rev: 5'- CAG CTC GAC CAG GAT G-3'

Sequenzierprimer für pEGFP/YFP/CFP-C1:

C1_for: 5'- GCC CTG AGC AAA GAC- 3'
 C1_rev: 5'- GTG GTA TGG CTG ATT ATG-3'

Primer für die Klonierung des C-Fragmentes von m164 in pEGFP-C1 mit TMD,

Amplifikatgröße: 246 bp.

Cmit_EcoRI_for: 5'- CT ACG AAT TCA CAG TTG GAG CGT TTC CTC-3'
EcoRI

C_BamHI_rev: 5'- G CCA GGA TCC TCA TGA CGA ACG TCC GAC G-3'
BamHI

Primer für die Klonierung des C-Fragmentes von m164 in pEGFP-C1 ohne TMD,

Amplifikatgröße: 161 bp.

Cohne_EcoRI_for: 5'- CT ACG AAT TCA GAC GTC AGG CCG TCG CTG
EcoRI
 TTC-3'

C_BamHI_rev: 5'- G CCA GGA TCC TCA TGA CGA ACG TCC GAC G-3'
BamHI

Primer für die Klonierung des A-Fragmentes von m164 in pEGFP-N1,

Amplifikatgröße: 304 bp.

A_EcoRI_for: 5'- CGT GGA ATT CTC GCC GCC ATG TTT CTC CGC GGC-3'
EcoRI

A_BamHI_rev: 5'- AAG GGA TCC TCG AGC ATC CCG GCC TTG-3'
BamHI

Primer für die Klonierung des A-Fragmentes mit TMD von m164 in pEGFP-N1,

Amplifikatgröße: 378 bp.

A_EcoRI_for: 5'- CGT GGA ATT CTC GCC GCC ATG TTT CTC CGC GGC-3'
EcoRI

A_TMD_BamHI_rev: 5'- GAT GGA TCC TCT CCG TCG ACG CAG CTT CC-3'
BamHI

Primer für die Klonierung des B-Fragmentes von m164 in pEGFP-N1,Amplifikatgröße: 775 bp.B_ *EcoRI*_for: 5'- CGT GGA ATT CTC GCC GCC ATG GCC GTC GGA AGC
EcoRI

TGC -3'

B_ *BamHI*_rev: 5'- AAG GGA TCC TCG AAA CGC TCC AAC TGA C-3'
*BamHI*Primer für die Klonierung des C-Fragmentes von m164 in pEGFP-N1,Amplifikatgröße: 163 bp.C_ *EcoRI*_for: 5'- CGT GGA ATT CTC GCC GCC ATG GAC GTC AGG CCG
EcoRI

TCG-3'

C_ *BamHI*_rev: 5'- AAG GGA TCC TCT GAC GAA CGT CCG ACG C-3'
*BamHI*Primer für die Klonierung des AB-Fragmentes von m164 in pEGFP-N1,Amplifikatgröße: 1102 bp.A_ *EcoRI*_for: 5'- CGT GGA ATT CTC GCC GCC ATG TTT CTC CGC GGC-3'
*EcoRI*B_ *BamHI*_rev: 5'- AAG GGA TCC TCG AAA CGC TCC AAC TGA C-3'
*BamHI*Primer für die Klonierung von LaminB2 in pECFP-C1 und pEYFP-C1,Amplifikatgröße: 1820 bp.LaB2_ *HindIII*_for: 5'- CTG CTA AGC TTA GGC CAC CAT GGC GTC TCT
HindIII

GC-3'

LaB2_ *BamHI*_rev: 5'- CGC GGA TGG ATC CCA TCA GTC GGC AGC C -3'
*BamHI*Primer für die Klonierung von LaminB2 in pECFP-N1 und pEYFP-N1,Amplifikatgröße: 1824 bp.LaB2_ *Sall*_for: 5'- CTG CAG TGC ACG GCC ACC ATG GCG TCT CTG CC -3'
*Sall*LaB2_ *AgeI*_rev: 5'- CATGGT GGC GAC CGG TAT CAT CAG TCG GCA GCC
AgeI

C -3'

Primer für die Klonierung von m164 in pEGFP/YFP/CFPsRED-N1,Amplifikatgröße: 1309 bp.A_ *EcoRI*_for: 5'- CGT GGA ATT CTC GCC GCC ATG TTT CTC CGC GGC-3'
*EcoRI*C_ *BamHI*_rev: 5'- AAG GGA TCC TCT GAC GAA CGT CCG ACG C-3'
BamHI

Primer für die Klonierung von m164 in pEGFP/CFP/YFP-C1, Amplifikatgröße: 1308 bp.

m164_ *EcoRI*_for: 5'- GTC ACG CGA ATT CGT TTC TCC GCG GCT GTC GC-3'
EcoRI

m164_ *BamHI*_rev: 5'- GTC TGC TGG ATC CTG ACG AAC GTC CGA CGC-3'
BamHI

Primer um Emerin in pECFP-N1 und pEYFP-N1 zu klonieren, Ampifikatgröße: 811 bp

Em_N1_ *Sall*_for: 5'- C GT G TCG ACG GCC ACC ATG GAC GAC TAT GCG
Sall
GTT TTG-3'

Em_N1_ *AgeI*_rev: 5'- CAT GGT GGC GAC CGG TCG GGG ATC CAT CCA
AgeI
GAA GG-3'

Primer um Emerin in pECFP-C1 und pEYFP-C1 zu klonieren, Ampifikatgröße: 797bp

Em_C1_ *HindIII*_for: 5'- CGT AAG CTT CGG ACG ACT ATG CGG TTT TG -3'
HindIII

Em_N1_ *Sall*_rev: 5'- GTC GTC GAC TTA GGG ATC CAT CCA GAA GG-3'
Sall

2.2 Methoden

2.2.1 Proteinbiochemische Methoden

2.2.1.1 Gelelektrophorese

SDS-PAGE

Material:

- 4 x Trenngelpuffer: 0,4% SDS; 1,5 M Tris/HCl [pH 8,8]
- Acrylamid: Rotiphorese®Gel30, Roth, Nr. 3029.1
- 4 x Sammelgelpuffer: 0,4% SDS; 0,5 M Tris/HCl [pH 6,8]
- 5 x Elektrodenpuffer: 960 mM Glycin; 0,5% SDS; 125 mM Tris/HCl [pH 8,3]
- 5 x Laemmli-Probenpuffer: 1,5 M β -Mercaptoethanol; 4% SDS; 20% Glycerin; 0,04% Bromphenolblau; 0,125 Tris/HCl [pH 6,8]
- 10% APS: In A. dest. gelöst
- TEMED: Roth, Nr. 2367.3
- Protein-Standard: PageRuler™Prestained Protein Ladder, Nr. SM0671

Durchführung:

In dieser Arbeit wurde ausschließlich die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) eingesetzt. Hierbei wurden die aufzutrennenden Proteine mit dem Detergenz SDS versetzt, welches die Eigenladung der Proteine effektiv überdeckt. Es bilden sich Mizellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit, so dass eine Trennung der Proteine nach deren molekularen Massen erfolgt.

Die Proben wurden mit 1/5 Volumen 5x Laemmli-Probenpuffer (Laemmli, 1970) versetzt und vier Minuten bei 95°C gekocht. Die Auftrennung erfolgte in selbst gegossenen Polyacrylamidgelen wie in Tabelle 2 dargestellt.

	Sammelgel		Trenngel	
	4%	10%	12,5%	
Acrylamidlösung (30%)	1,5 ml	6 ml	7,2 ml	
4x Sammelgelpuffer	2,82 ml	-	-	
4 x Trenngelpuffer	-	4,5 ml	4,5 ml	
A. dest.	6,93 ml	7,5 ml	6,3 ml	
APS (10%)	150 μ l	144 μ l	144 μ l	
TEMED	20 μ l	14,4 μ l	14,4 μ l	

Tabelle 2. Zusammensetzung eines 4% Sammelgels und verschiedener Trenngele einer SDS-PAGE.

Zunächst wurde an das Gel eine Spannung von 100 Volt angelegt, bis die Proben ins Trenngel eingelaufen waren. Dann wurde die Spannung auf bis zu 170 V erhöht. Sobald das Bromphenolblau des Probenpuffers am unteren Ende des Trenngels herauslief, wurde die Auftrennung beendet. Parallel zu den Proben wurde ein Protein-Standard aufgetragen, um das Molekulargewicht detektierter Proteinbanden zuordnen zu können.

2.2.1.2 Nachweis der getrennten Proteine

Coomassie-Brilliant-Blau Färbung von Polyacrylamidgelen

Material:

- Färbelösung: 0,1% Coomassieblau (CBB G250); 10% Essigsäure; 50% technischer Ethanol
- Entfärber: 7,5% Essigsäure; 25% technischer Ethanol

Durchführung:

Die Proteine konnten direkt im Gel angefärbt werden. Die einfachste Möglichkeit stellt die Verwendung des Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brilliant-Blau dar. Dieser Farbstoff bindet unspezifisch an kationische, nichtpolare und hydrophobe Aminosäuren. Er wurde in geringen Mengen mit 10% Essigsäure verwendet, um die Proteine im Gel zu fixieren. Ungebundener Farbstoff wurde durch Waschen mit Entfärber entfernt. Die Nachweisgrenze (ca. 100 ng) liegt - verglichen mit anderen Färbemethoden - relativ hoch. Jedoch haben Coomassie-basierte Färbemethoden den Vorteil, dass die Signalintensität zu der Proteinkonzentration proportional ist. Das Gel wurde 10 min mit Färbelösung inkubiert und anschließend wurde ungebundener Farbstoff entfernt, indem dreimal 15 min in Entfärber oder über Nacht bei 4°C gewaschen wurde. Die Gele wurden auf dem Gelrockner unter Anlegen eines Vakuums für 90 min bei 65°C getrocknet oder in A. dest. oder 5% Essigsäure im Kühlschrank gelagert.

2.2.1.3 Western Blot

Material:

- 100% Methanol p.a. VWR, Nr. 10158BG
- Bjerrum-Schäfer-Nielsen Transferpuffer: 39 mM Glycin; 20% Methanol; 1,3 mM SDS; 48 mM Tris/HCl [pH 9,2]
- 10 x PBS: 140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 6,5 mM Na₂PO₄; 1,5 mM KH₂PO₄ [pH 7,4]
- Blockierungslösung: 5% Magermilchpulver (MMP); 0,1% Triton X-100 in PBS
- Antikörperverdünnungslösung: 1% MMP; 0,1% Triton X-100 in PBS
- Waschlösung 1: 1% MMP; 0,1% Triton X-100 in PBS
- Waschlösung 2: 0,1% Triton X-100 in PBS
- PVDF-Membran: Immobilon-P, Nr. IPVH00010

Durchführung:

Nach der kompletten Gel-elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine im Semidry-Verfahren auf eine PVDF Membran (Pluskal, 1986) übertragen. Hierbei wurden Whatmanpapierstreifen in Transferpuffer getränkt und jeweils 3 Lagen Whatmanpapier unter und über Membran und Gel gelegt. Der Transfer erfolgte bei 0,8 mA/cm² für 40 min. Durch die Verwendung des vorgefärbten Markers ließ sich der Transfererfolg überprüfen.

Nach dem Blotvorgang wurde die Membran für eine Stunde in Blockierungslösung blockiert. Der Primärantikörper wurde in einem kleinen Volumen von etwa 7 ml Antikörperverdünnungslösung aufgenommen und mit der Membran eingeschweißt. Die Inkubation erfolgte auf einem Schütteltisch über Nacht bei 4°C. Anschließend wurde fünfmal 10 min mit Waschlösung 1 gewaschen. Der Sekundärantikörper wurde 1:10.000 in Antikörperverdünnungslösung verdünnt und für eine Stunde appliziert. Nach dem anschließenden Waschen mit Waschlösung 2 erfolgte die Detektion.

2.2.1.4 Detektion des Western Blot-Signals

Material:

- ECL Plus Western Blotting Detecting Reagents: Amersham Biosciences, Nr. RPN2132
- Autoradiographiefilm: Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film, Roche, Nr. 11666657001

Durchführung:

Für die Detektion der Western Blot-Signale wurde das *ECL Plus Western Blotting Detecting Reagent* verwendet. Die Detektion erfolgte über Chemilumineszenz. Durch die Oxidation des zyklischen Diacylhydrazids Luminol in Gegenwart von H₂O₂ und Meerrettichperoxidase entsteht als Zwischenprodukt ein Acridinium-Ester. Dieser Ester wird durch H₂O₂ weiter oxidiert; das Produkt emittiert Licht mit einem Emissionsmaximum bei 430nm, welches mit einem Autoradiographiefilm detektiert werden kann.

PVDF Membranen wurden laut Arbeitsanweisung behandelt und das Signal wurde schließlich auf einem Röntgenfilm detektiert:

[http://www5.amershambiosciences.com/aptrix/upp00919.nsf/\(FileDownload\)?OpenAgent&docid=139B41E53EDC6210C1256EB40044ACE3&file=RPN2132PLB.pdf](http://www5.amershambiosciences.com/aptrix/upp00919.nsf/(FileDownload)?OpenAgent&docid=139B41E53EDC6210C1256EB40044ACE3&file=RPN2132PLB.pdf)

2.2.1.5 Coomassie Färbung der PVDF Membran

Material:

- Färbelösung: 0,1% Coomassieblau (G250); 10% Essigsäure; 50% technischer Ethanol
- Entfärber: 7,5% Essigsäure; 25% technischer Ethanol

Durchführung:

Die Proteine auf der PVDF Membran konnten durch die Inkubation mit Färbelösung sichtbar gemacht werden (Hancock & Tsang, 1983). Dazu wurde die Membran 10 min mit Färbelösung inkubiert und anschließend wurde überschüssiger Farbstoff durch dreimaliges Waschen für 15 min in etwa 50 ml Entfärberlösung entfernt. So konnte eine gleichmäßige

Beladung des SDS-Gels überprüft werden. Auch konnten detektierte Immunsignale entsprechenden Banden auf der Membran zugeordnet werden.

2.2.1.6 Proteinquantifizierung

Material:

- BCA Protein Assay Kit Pierce, Nr. 23225

Durchführung:

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte mit dem *BCA Protein Assay Kit* (Smith et al., 1985) Der Proteingehalt wurde photometrisch bestimmt. Grundlage ist die Biuret Reaktion - die Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} durch Cystein, Tryptophan und Tyrosin unter alkalischen Bedingungen. Bicinchonimin-Säure (BCA) bildet mit Cu^{1+} ein Chelat, dessen Absorptionsmaximum bei 562nm liegt. Die Absorption steigt in einem Konzentrationsbereich von 20 $\mu\text{g/ml}$ bis 2mg/ml linear zur Proteinkonzentration. Deswegen wurde zu jeder Proteinbestimmung eine Standardreihe mit BSA als Eichgerade erstellt. Da es sich bei dieser Reaktion um keine echte Endpunktmethode handelt, läuft die Farbreaktion auf unbestimmte Zeit weiter. Deshalb ist es wichtig alle Proben wie auch den Standard zeitgleich zu pipettieren. Um die Pipettierverzögerung auszugleichen folgte ein 30-minütiger Inkubationsschritt bei 37°C, bevor die Farbreaktion in einem Photometer detektiert wurde.

Die Proteinkonzentrationsbestimmung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt:

<http://www.piercenet.com/files/1296dh4.pdf>

2.2.1.7 Casein Kinase II Assay

Material:

- Casein Kinase II: Promega, Nr. V5621, 100 U
- Casein Kinase II Substrat: 1% Casein, Sigma, Nr.C4765
- Assay-Puffer: 25 mM Tris/HCl [pH 7,4]; 0,2 M NaCl; 10 mM MgCl_2 ; 100 μM ATP Dinatriumsalz; 1 μCi $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$
- Waschpuffer: 20 mM Tris [pH 7,5]
- Casein II Inhibitor: 1 $\mu\text{g/ml}$ Heparin
- Röntgenfilm: BioMax XAR Film, Kodak, Nr. 8532665
- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$: Amersham Biosciences, Nr. PB171-250UCI

Reagenzmix pro Ansatz: 4,8 µl Assay-Puffer
0,006 U CKII
 40 µl Gesamtvolumen

Durchführung:

Die µMacs Säulen wurden zunächst mit 100 µl Assay-Puffer (ohne [γ -³²P]ATP) gewaschen. Infizierte Sf-9 Insektenzellen wurden über den *µMacs His Tag Kit* nach der Anleitung des Herstellers behandelt. Die aus der Zellyse gewonnenen Proteine wurden in der Säule an *µMacs-beads* immobilisiert (siehe 2.2.1.19). Die gebundenen Proteine wurden mit 40 µl Assay-Puffer, mit 0,006 U CKII und [γ -³²P]ATP, für 30 min bei 37°C inkubiert. Der Reaktionsmix wurde anschließend durch dreimaliges Waschen mit Waschpuffer entfernt. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte mit 50 µl kochendem Elutionspuffer.

Zur Aktivitätskontrolle der CKII wurde das spezifische Substrat Casein in einem Eppendorfgesäß parallel inkubiert.

Im Anschluss wurden 10 µl des Eluats über Gelelektrophorese separiert. Das Gel wurde anschließend in Entfärber 30 min fixiert, schließlich wurde das Gel getrocknet. Das trockene Gel wurde zwischen 2 und 10 Tagen bei -70°C auf einem für Radioaktivität sensitiven Röntgenfilm aufgelegt.

2.2.1.8 Protein Kinase C Assay

Material:

- Protein Kinase C: Promega, Nr. V526A
- Protein Kinase C Substrat: Histon III S, Sigma, Nr. H5505
- Assay-Puffer: 12,5 mM MgCl₂; 100 µM ATP Dinatriumsalz; 750 µM CaCl₂; 1µCi [γ -³²P]ATP; PKC in Puffer III (1:200)
- Puffer I: 2 mM EGTA; 0,2 M HEPES [pH 7,5]
- Puffer II: 1% Triton X-100; 20 mM HEPES, pH 7,5
- Puffer III: 2 mM EDTA; 1 mM DTT; 0,02% Triton X-100; 20 mM Tris/HCl [pH 7,5]
- PDB-Stammlösung: 100 µg/ml in DMSO:H₂O (1:10)
- α-Phosphatidyl-L-Serin (PS): 10 mg/ml in Chloroform
- [γ -³²P]ATP Amersham Biosciences, Nr. PB171-250UCI

Durchführung:

Zunächst wurden pro Standard-Ansatz 0,5 µl PDB und 5 µl PS unter Stickstoff vollständig eingedampft, in Puffer II aufgenommen und 5 min bei 30°C gelöst. Zur Bildung von Lipidvesikeln, sog. Mizellen, wurde zwischendurch mehrmals für 10 sec. gemischt.

Die µMacs Säulen wurden zuvor mit 100 µl Puffer I gewaschen. Infizierte Sf-9 Insektenzellen wurden über den *µMacs His Tag Kit* nach der Anleitung des Herstellers behandelt und in der Säule an *µMacs-beads* immobilisiert (siehe 2.2.1.19). Die gebundenen Proteine wurden mit 40 µl Assay-Puffer für 30 min bei 37°C inkubiert. Der Reaktionsmix wurde anschließend

durch dreimaliges Waschen mit Waschpuffer entfernt. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte mit 50 µl kochendem Elutionspuffer.

Zur Aktivitätskontrolle der PKC wurde das spezifische Substrat Histon mit und ohne Aktivatoren (PDB/PS) in einem Eppendorfgefäß parallel inkubiert.

Im Anschluss wurden 10 µl des Eluats über Gelelektrophorese separiert. Das Gel wurde anschließend in Entfärber 30 min fixiert, schließlich wurde das Gel getrocknet. Das trockene Gel wurde zwischen 2 und 10 Tagen bei -70°C auf einem Röntgenfilm aufgelegt.

2.2.1.9 *Pulse-Chase Labeling*

Material:

- Minimalmedium : Earle´s MEM ohne L-Glut/Cys/Met Glutamin.
MP Biomedicals, Nr. 1641449
- Earle´s MEM: 10% (v/v) FCS; 100 U/ml Penicillin;
0,1 mg/ml Streptomycin
- Redivue™ PRO-MIX™ L-[³⁵S]: *In vitro cell labelling Mix*, Amersham Biosciences, Nr. AGQ0080
- Entfärber: 7,5% Essigsäure; 25% technischer Ethanol
- Röntgenfilm: BioMax XAR Film, Kodak, Nr. 8532665
- Filterpapier: *Whatman glasmicrofibre Filters*

Durchführung:

Mit diesem Versuch sollte die Stabilität des m164-Proteins in Zellen ermittelt werden.

MEF wurden auf 10 cm Zellkulturschalen kultiviert und in der dritten Passage mit mCMV-m164-HA3' infiziert (siehe 2.2.3.14) und 120 min im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 5 ml warmem PBS gewaschen und mit 7 ml Minimalmedium überschichtet. Die Hungerphase dauerte 35 min, schließlich wurden 250 µCi Redivue™ PRO-MIX™ L-[³⁵S] zugesetzt und wiederum für 3 H. inkubiert. Nach Ablauf der dreistündigen Inkubation wurden die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet. Anschließend wurde eine Gesamtproteinextraktion (siehe 2.2.1.12) durchgeführt.

Die Bestimmung der in Protein eingebauten (säurefällbaren) Radioaktivität erfolgte durch Fällung von 10 µl Gesamtproteinlysate in 10% TCA, 5% TCA, vergälltem Ethanol p.a. und Diethyl-Ether für jeweils 5 min. Dazu wurde Zelllysate auf Filterpapier aufgetragen und in die entsprechende Lösung getaucht. Anschließend wurde das Filterpapier in einem Kunststoffgefäß mit 4 ml Scintillations-Flüssigkeit eingetaucht und die darauf befindlichen Proteine im Scintillationszähler gemessen. Nach einer Normierung über alle Gesamtproteinextrakte wurde eine Immunpräzipitation (siehe 2.2.1.15) der Proteine aller Zeitpunkte mit der jeweils selben Menge an radioaktiv markiertem Protein durchgeführt.

Im Anschluss wurden die Proteine über Gelelektrophorese separiert, in Entfärber 30 min fixiert und schließlich wurde das Gel getrocknet. Das trockene Gel wurde zwischen 2 und 10 Tagen bei -70°C auf einem für Radioaktivität sensitiven Röntgenfilm aufgelegt.

2.2.1.10 *In vitro* Transkription

In einer *in vitro* Transkription kann außerhalb der Zelle DNA in RNA umgeschrieben werden. Dazu ist eine RNA-Polymerase notwendig; außerdem muss das Template einen RNA-Polymerase Promotor tragen. Dies kann T7, T3 oder SP6 sein. Im Falle des hier verwendeten Ambion Kits ist es ein SP6 Promotor mit der Sequenz ATT TAG GTG ACA CTA TAG, der über PCR Primer in das Template eingefügt wird.

Material:

- *In vitro* Transkriptionskit: MEGAscript™ High Yield Transcription Kit, Ambion, Nr. 1330

Durchführung:

PCR Produkte mit SP6 RNA-Polymerase Promoter wurden als Template für die *in vitro* Transkription eingesetzt. Der SP6 Promotor wurde über PCR in die Transkripte eingefügt. Die PCR Produkte wurden über eine Gelelektion gereinigt und nach folgendem Pipettierschema in dieser Reihenfolge hinzugegeben:

Reagenz	Ansatz
H ₂ O	6 µl
ATP Lösung	2 µl
CTP Lösung	2 µl
GTP Lösung	2 µl
UTP Lösung	2 µl
10x Reaktionspuffer	2 µl
PCR Template (1 µg)	2 µl
Enzym Mix	2 µl
Gesamt	20 µl

Der Ansatz wurde für 4 Stunden bei 37°C inkubiert; die entstandene RNA wurde mittels denaturierendem Agarose-Gel überprüft.

2.2.1.11 *In vitro* Translation

Die aus der *in vitro* Transkription hergestellte mRNA wurde mit dem *Wheat Germ Extract Kit* in Protein translatiert. Das Weizenkeimlysat enthält nur tRNA, Ribosomen, Initiations-, Elongations- und Terminationsfaktoren.

Material:

- Wheat Germ Extract: Promega, Nr. L4380
- Redivue™ L-[³⁵S] Methionin: Amersham Biosciences, Nr. AG 1094

Durchführung:

Die Zusammensetzung des *in vitro* Translationsansatzes war wie folgt:

Reagenz	Ansatz
Weizenkeimextrakt	25 µl
Aminosäuremixtur, ohne Methionin, 1mM	4 µl
RNA Template (30µg/ml)	1 µl
Kalium-Acetat, 1M	2 µl
[³⁵ S]-Methionin	2,5 µl
Nuclease - freies Wasser	15,5 µl
Gesamt	50 µl

Die RNA wurde zunächst 10 min bei 67°C erhitzt und anschließend bis zur Zugabe auf Eis gehalten. Die *in vitro* Translationsreaktion wurde 90 min bei 25°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Proteine über Gelelektrophorese separiert, in Entfärber 30 min fixiert und schließlich wurde das Gel getrocknet. Das trockene Gel wurde zwischen 2 und 10 Tagen bei -70°C auf einem für Radioaktivität sensitiven Röntgenfilm aufgelegt.

2.2.1.12 Gesamtproteinextraktion aus transfizierten COS-7 Zellen

Material:

- Lysepuffer: 0,2 M NaCl; 1,5 mM MgCl₂; 4 mM EDTA; 1% Triton X-100; 0,5 mM DTT; 20 mM HEPES [pH 7,7]
- Proteaseinhibitor Mix: Complete, Roche, Nr. 1697498

Durchführung:

Die hier gemachten Angaben beziehen sich auf 10 cm Kulturschalen.

48 Stunden nach Transfektion wurden die Kulturschalen auf Eis gestellt, das Medium wurde abgesaugt und die Zellen zweimal mit 10 ml PBS gewaschen. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen von der Oberfläche der Kulturschale abgelöst und mit dem verbliebenen Rest PBS in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Nach der Zentrifugation mit 10.000xg bei 4°C für 10 min wurde der Überstand entfernt, die Zellen in Lysepuffer M resuspendiert und schließlich für 15 min zur Zellyse auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde nun 30 min bei 10.000xg und 4°C zentrifugiert. Im Überstand befanden sich alle gelösten Proteine, auch Membranproteine, die durch das Detergenz Triton X-100 aus der Membran gelöst werden. Das Pellet enthielt unlösliche Zelltrümmer, DNA und Zytoskelettbestandteile. Die Fraktionen wurden getrennt, von der löslichen Fraktion wurde eine BCA-Proteinbestimmung durchgeführt und schließlich bei -20°C gelagert.

2.2.1.13 Fraktionierung von Zellextrakten in Zytoplasma- und Membranfraktion

Material:

- Puffer Z (Zytoplasma-Proteine): 0,2 M NaCl; 1,5 mM MgCl₂; 4 mM EDTA; 4 mM EGTA; 0,5 mM DTT; 20 mM HEPES [pH 7,5]
- Puffer M (Membran-Proteine): 0,2 M NaCl; 1,5 mM MgCl₂; 4 mM EDTA [pH 8,0]; 4 mM EGTA [pH 8,0]; 0,5 mM DTT; 20 mM HEPES [pH 7,5]; 1% Triton X-100
- Proteaseinhibitor Mix: Complete, Roche, Nr. 1697498

Durchführung:

Zur subzellulären Fraktionierung wurden COS-7 Zellen verwendet, die 48 h zuvor transfiziert wurden. Nach Abnahme des Mediums wurden die adhärennten Zellen zweimal mit je 10 ml eiskaltem PBS gewaschen. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen von der Oberfläche der Kulturschale abgelöst und mit dem verbliebenen Rest-PBS in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach der Zentrifugation mit 10.000xg bei 4°C für 10 min wurde der Überstand entfernt und die Zellen in 200 µl Puffer Z resuspendiert, durch 50faches Auf- und Abbewegen eines Pestilles in einem *Douncer* homogenisiert und anschließend 15 min auf Eis inkubiert. Die Zellhomogenate wurden 30 min bei 10.000xg und 4°C zentrifugiert. Der Überstand mit der zytoplasmatischen Proteinfraction wurde bei -20°C eingefroren. Das Zellpellet wurde in 100 µl Puffer M resuspendiert, erneut im *Douncer* homogenisiert, 15 min auf Eis inkubiert und schließlich 30 min bei 10.000xg und 4°C zentrifugiert. Der Überstand mit den gelösten Membranproteinen wurde bei -20°C gelagert.

2.2.1.14 Gewinnung des α-m164 Antikörpers

Material:

- N-terminales m164 Peptid: MFLRGCRRGRRRAATVSLAGCGELPMC
- C-terminales m164 Peptid: CGVVSРНHQPWRAATNASSRVGRSS

Durchführung:

Der verwendete α-m164 Antikörper ist ein Peptidantikörper aus Kaninchen. Die Immunisierung sowie die Gewinnung des Serums wurden von Herrn Dr. Dennis Strand durchgeführt. Je zwei Tiere wurden entweder mit dem N-terminalen oder dem C-terminalen Peptid des m164-Proteins immunisiert. Die Gewinnung des polyklonalen Antikörpers erfolgte über eine Affinitätsreinigung (Harlow & Lane, 1988). Dazu wurde das entsprechende Peptid irreversibel an Protein A-Sepharose gebunden (von D: Strand durchgeführt) und schließlich mit dem gewonnenen Kaninchenserum 15 min bei Raumtemperatur in einem Rotationsschüttler inkubiert. Der Durchfluss wurde gesammelt und die Säule mit PBS

gewaschen. Die Elution der Antikörper erfolgte durch eine Änderung des pH-Wertes mit 100 mM Glycin auf pH 2,8. Im Anschluss wurde das Eluat mit 1 M Tris, pH 9, neutralisiert. Das Eluat wurde in 1 ml Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen mit dem höchsten Proteingehalt (siehe 2.2.1.6) wurden vereint.

2.2.1.15 Immunpräzipitation

Material:

- Waschpuffer: 1% Triton X-100 in PBS
- Protein A-Glaskugeln: ProSep-vAUltra, Millipore, Nr.: 115115822
1,5 M β -Mercaptoethanol; 4% SDS; 20% Glycerin; 0,04% Bromphenolblau; 0,125 M Tris/HCl [pH 6,8]
- 5x Laemmli-Probenpuffer:

Durchführung:

Die Immunpräzipitation dient der spezifischen Anreicherung von Protein. Zu diesem Zweck wurden 500 μ g der unter Abschnitt 2.2.1.12 beschriebenen Zellysate mit 20 μ l Protein A-Glaskugeln 1 Std. bei 4°C in einem rotierenden Ständer inkubiert, um unspezifisch an Protein A bindende Proteine aus dem Zellysat zu entfernen. Anschließend wurden die Proben 1 min mit 11000xg bei 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden mit Antikörper der entsprechenden Verdünnung versetzt und ü.N. bei 4°C in einem Überkopf-Roller inkubiert. Danach wurden die Immunkomplexe mit 20 μ l Protein A-Glaskugeln für 1 H unter den gleichen Bedingungen präzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden anschließend viermal mit eiskaltem Waschpuffer bei 4°C gewaschen und schließlich in 50 μ l 5x Laemmli-Probenpuffer aufgenommen und im Western Blot analysiert.

2.2.1.16 Baculovirus Expressionssystem

Das Baculovirus Expressionssystem stellt ein eukaryontisches Expressionssystem dar. Es basiert auf einem viralen System, das Insektenzellen zur Expression nutzt. Die verwendete Baculovirus DNA stammt aus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV).

Material:

- Medium Sf-900II Medium with L-Glutamin, Gibco, Nr. 10902-088
- Penicillin / Streptomycin (100x) PAA Laboratories, Nr. P11-010
- Pluronic F68 Gibco, Nr. 24040-032
- Transfer-Vektor pAcGP67 BD Biosciences, Nr. 21223P
- Transfer-Vektor pAcGHLT BD Biosciences, Nr. 554789
- BaculoGold™ transfection system: BD Biosciences, Nr. 21100K

Durchführung:

Zellkultur von Sf-9 Insektenzellen

In dieser Arbeit wurden Sf-9 Insektenzellen verwendet. Diese Zellen entstammen dem Ovariumgewebe der Puppe des Heerwurmes *Spodoptera frugiperda* (Vaughn et al., 1977). Die Zellen wurden von Herrn Dr. J. Piehler (Johann Wolfgang Goethe Universität, Institut für Biochemie) zur Verfügung gestellt.

Die Zellen haben eine Verdopplungszeit von 18-24 Stunden und wuchsen in TNM-FH Medium sowohl als Monolayer als auch als Suspensionskultur. Die Zellen wurden alle drei Tage etwa 1:3 passagiert, wobei eine Wachstumstemperatur von 27°C einzuhalten war. Eine CO₂ Supplementierung war nicht notwendig.

2.2.1.17 Suspensionskultur

Um eine Suspensionskultur anzulegen, wurden die Zellen in einer Dichte von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml in einem Schüttelkolben oder in einer Spinner-Flasche ausgesät. Das Volumen sollte 1/3 der maximalen Füllmenge des Gefäßes nicht überschreiten. Die Inkubation erfolgte bei 27°C unter konstantem Schütteln (100 Upm) bzw. Rühren (50 Upm). Nach Erreichen einer Zelldichte von $2-3 \times 10^5$ Zellen/ml wurden die Zellen auf die ursprüngliche Dichte passagiert. Die Zellen wurden wie unter 2.4.1.6 beschrieben gezählt. Gesunde Zellen sahen im Lichtmikroskop gleichmäßig rund aus und hefteten sich innerhalb von 10 min an den Zellkulturflaschenboden. Infizierte oder transfizierte Zellen erschienen größer, waren ungleichmäßig geformt und bildeten größere Zellkerne.

2.2.1.18 Transfektion der Sf-9 Zellen mit Baculovirus

Zur Herstellung rekombinante Baculoviren wurden Sf-9 Zellen mit Wildtyp-AcNPV-DNA und rekombinanter DNA kotransfiziert. Die Transposition des Transferplasmids erfolgte innerhalb der Sf-9 Zellen. Zu diesem Zweck wurden Sf-9 Zellen mit einer Dichte von $0,5 \times 10^6$ Zellen pro Vertiefung in einer 12-Well Kulturschale ausgesät. Nach 10 min Absetzzeit waren die Zellen zu ca. 90% konfluent. Das Volumen betrug 500 µl. 1,25 µl Viren-DNA (Baculogold) wurde mit 1 µg pAC-Plasmid, das vorher 20 min bei 75°C inkubiert wurde, vermischt und für 5 min bei RT inkubiert.

Das Medium wurde entfernt und durch 250 µl Puffer A ersetzt. Nun wurde tropfenweise die DNA hinzugegeben. Anschließend wurde die 12-Well Platte mit Parafilm luftdicht verschlossen und in einer feuchten Kammer für 5 Stunden bei 27° inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml Medium gewaschen und mit 1 ml Medium 5 Tage inkubiert. Dies war Passage 0 (P0). 500 µl des Ansatzes wurden auf eine 5 ml Standkultur frischer Zellen

($0,4 \times 10^7$ Zellen in T25 Flasche) übertragen (P1). Nach 7 Tagen wurde der Überstand mittels Zentrifugation geerntet und 500 μ l Überstand auf eine frische 10 ml Standkultur ($1,2 \times 10^7$ Zellen in T75-Flasche) überimpft. Nach 7 Tagen wurde erneut der Überstand mittels Zentrifugation geerntet und wiederum 500 μ l Überstand auf eine frische 10 ml Standkultur ($2,9 \times 10^7$ Zellen in T75-Flasche) überimpft. Der Überstand dieser Kultur eignete sich nach 6-7 Tagen zur Infektion einer Sf-9 Schüttelkultur im Verdünnungsverhältnis 1:100. Die Viren wurden bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

2.2.1.19 Protein-Isolierung über Magnetbeads

In Sf-9 Insektenzellen kann m164 Protein rekombinant mit His-Tag erzeugt werden. Die Isolierung des rekombinanten Proteins wurde mit Hilfe des *μ MACS His Tagged Protein Isolation Kit* vorgenommen. Hierbei werden magnetische Kugeln verwendet, an die α -His Antikörper gebunden sind. Diese Antikörper erkannten das His-Epitop an m164 und banden daran. Die magnetischen Kugeln wurden in einem Magnetständer immobilisiert und Zelltrümmer sowie unspezifische Proteine abgewaschen.

Material:

- *μ MACS His Tagged Protein Isolation Kit:* Miltenyi Biotec, Nr. 130-091-124
- *μ Macs Separator:* Miltenyi Biotec, Nr. 130-042-602
- *μ Macs Säulen:* Miltenyi Biotec, Nr. 130-042-701
- *Proteaseinhibitor Mix:* Complete, Roche, Nr. 1697498

Durchführung:

Zur Zellyse wurden 5×10^6 Sf-9 Zellen 5 min mit 300xg bei 4°C pelletiert. Zu dem Pellet wurde 1 ml Lysepuffer gegeben und die Zellen für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 10 min bei 10.000xg und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 50 μ l α -His MicroBeads 30 min auf Eis inkubiert. Um die μ Macs Säulen zu befeuchten, wurden diese mit 200 μ l Lysepuffer gespült. Anschließend wurde das markierte Zellysat auf die μ Macs Säulen appliziert und mit 4 x 200 μ l Waschpuffer 1 gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Nach dem Waschen mit 100 μ l Waschpuffer 2 wurden die MicroBeads durch die Zugabe von 50 μ l 95°C heißem Elutionspuffer von der Säule eluiert. Der Reinigungserfolg wurde über eine SDS-PAGE bestätigt. Die hier gewonnenen m164 Proteine wurden für MALDI-TOF-MS Analysen eingesetzt. Auch wurden mit den immobilisierten Proteinen auf der Säule Casein Kinase II (CKII) und Protein Kinase C (PKC) Aktivitätstests durchgeführt.

2.2.1.20 PNGase F Behandlung der Proteine

Die Peptid:N-Glykosidase F (PNGase F) ist eine Amidase des Bakteriums *Flavobacterium meningosepticum* und hydrolysiert N-glykosydisch gebundene Zuckerketten von Glykoproteinen. Das Enzym spaltet Oligosaccharideinheiten zwischen dem Stickstoffatom der Seitenkette des Asparaginrestes und dem N-Acetylglukosamin der Zuckerketten ab.

Material:

- PNGase F Kit (1000U/μl) New England Biolabs GmbH, Nr. P0704
- Denaturierungspuffer (10x)
- PNGase F-Puffer (10x)
- 10% NP-40

Durchführung:

Im Anschluß einer Immunpräzipitation konnte eine PNGase F Behandlung durchgeführt werden. Dazu wurden die Protein A-Glaskugeln nach dem letzten Waschschrift trocken gelegt, d.h. mit der Pipette wurde versucht, möglichst die gesamte Flüssigkeit aus den Glaskugeln zu entfernen. Zur Denaturierung der Proteine wurden 12 μl A. dest., 2 μl Denaturierungspuffer (10x) und 2 μl 10% NP-40 hinzupipettiert. Der Ansatz wurde 10 min bei 100°C gekocht, auf Eis abgekühlt und kurz abzentrifugiert. Das Enzym PNGase F (1000 U/μl) wird mit A. dest. 1:5 verdünnt. Nach Zugabe von 2 μl PNGase F-Puffer (10x) und 2 μl PNGase F (200 U/μl) wurde der Ansatz eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde Laemmli-Puffer zugegeben. Der Ansatz konnte nun wie die Proben nach der Immunpräzipitation behandelt und schließlich auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen werden.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Bakterienstämme

Alle Arbeiten wurden mit dem Wirtstamm DH10B durchgeführt, da dieser besonders für die Transformation geeignet ist.

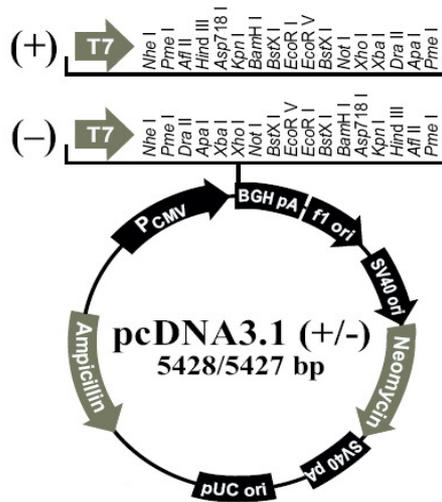
DH10B (Invitrogen):

Genotyp: F- *mcrA* D(*mrr-hsdRMS-mcrBC*)₈₀*dlacZDM15 DlacX74 deoR*
recA1 endA1 araD139 D(ara, leu)7697 galU galL l- *rpsL nupG* l-

2.2.2.2 Vektoren

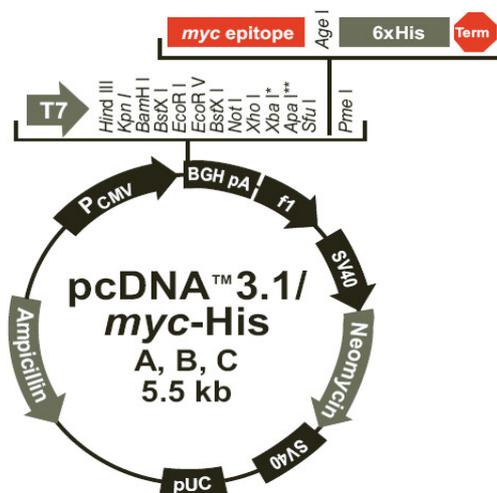
pcDNA3.1 (+):

(Invitrogen) 5428 bp, *Amp^{Res}*, *Neo^{Res}*, Tag-freies Expressionsplasmid für eukaryontische Zellen.



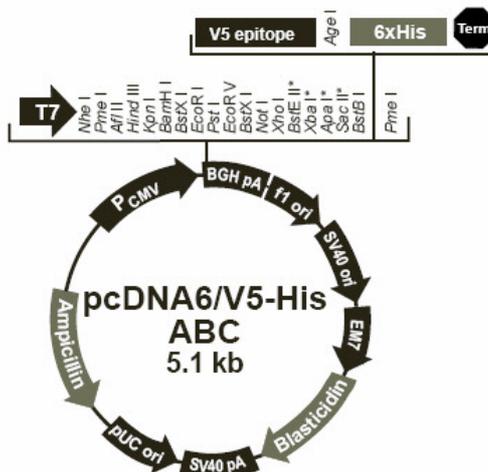
pcDNA3.1/myc-His A:

(Invitrogen) 5493 bp, *Amp^{Res}*, *Neo^{Res}*, Expressionsplasmid für eukaryontische Zellen.



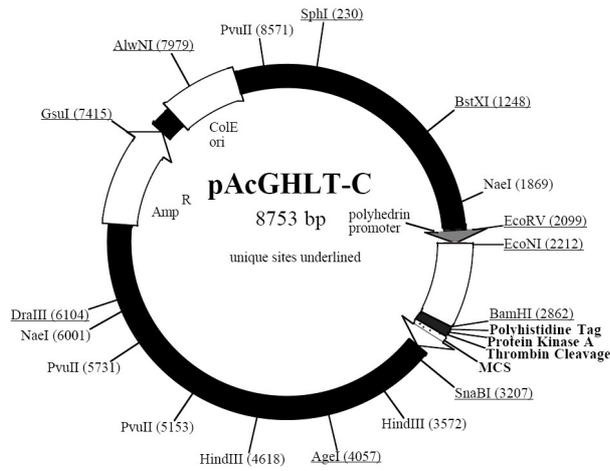
pcDNA6/V5 His:

(Invitrogen) 5144 bp, *Amp^{Res}*, *Plas^{Res}*, Expressionsplasmid für eukaryontische Zellen.



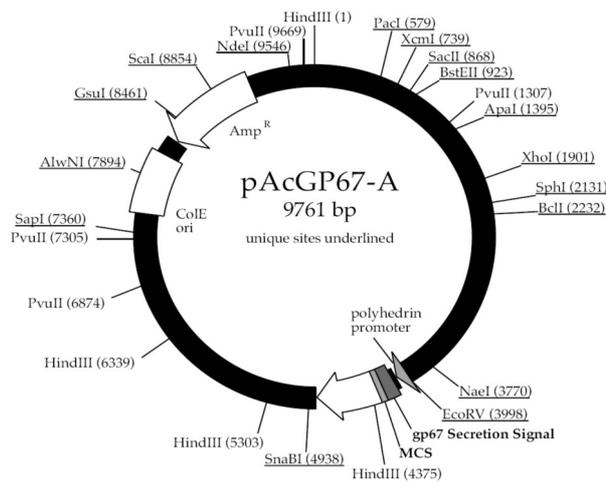
pAcGHLT-C:

(BD Biosciences) 8757 bp, *Amp^{Res}*, Transfervektor für *Sf-9* Insektenzell-Expression.

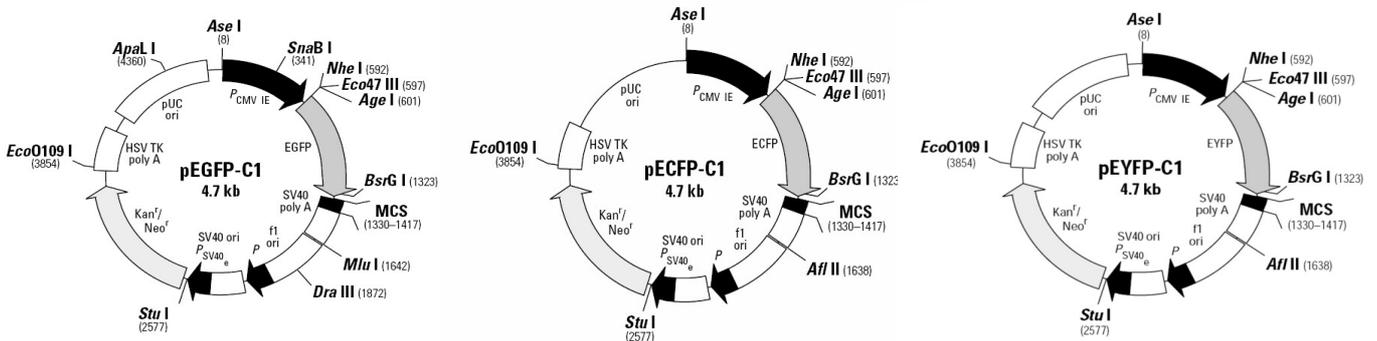


pAcGP67:

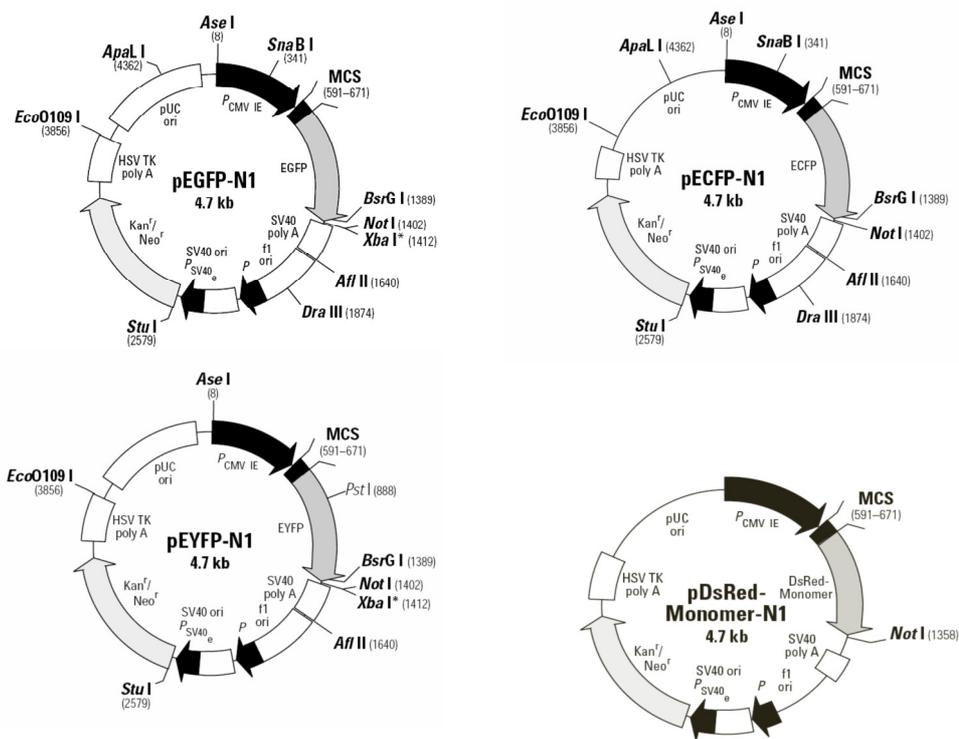
(BD Biosciences) 9761 bp, *Amp^{Res}*, Transfervektor für *Sf-9* Insektenzell-Expression.



pEGFP oder CFP oder YFP-C1:
(BD Biosciences) 4700bp, *Kan^R*, *Neo^R*, Expressionsvektor für eukaryontische Zellen.



pEGFP oder CFP oder YFP oder DsRED-N1:
(BD Biosciences) 4700bp, *Kan^R*, *Neo^R*, Expressionsvektor für eukaryontische Zellen.



2.2.2.3 Umgang mit Bakterien

Generell wurde bei der Arbeit mit Bakterien auf eine sterile Handhabung sowie auf ein steriles Arbeitsumfeld geachtet, um Kontaminationen mit anderen Bakterien oder mit Hefen und anderen Pilzen auszuschließen. Dies umfasste das Autoklavieren aller Medien und Lösungen bzw. das Sterilfiltrieren von nicht autoklavierbaren Lösungen, sowie den Einsatz von Antibiotika, Arbeiten an der Bunsenbrennerflamme und die Desinfektion der Arbeitsflächen mit 70%igem Ethanol. Alle verwendeten Glasgeräte wurden durch Heißluft sterilisiert (180°C, 3 Stunden).

Antibiotikumlösungen

- Ampicillin (Amp): in H₂O; Stammlösung 100 mg/ml, Arbeitskonzentration 100 µg/ml.
- Chloramphenicol (Cam): in EtOH; Stammlösung 34 mg/ml, Arbeitskonzentration 17 µg/ml.
- Kanamycin (Kan): in H₂O; Stammlösung 10 mg/ml, Arbeitskonzentration 25 µg/ml.

Die Stammlösungen wurden sterilfiltriert und bei -20°C gelagert. Die Zugabe erfolgte immer nach dem Autoklavieren des Mediums.

2.2.2.4 Anzucht von Flüssigkulturen

Material:

- LB-Medium: 10% NaCl; 10% Bacto-Trypton; 5%; Hefeextrakt; [pH 7,5]; autoklavieren.

Durchführung:

Zur Erstellung einer Flüssigkultur wurde eine Kolonie von einer Plattenkultur mittels einer sterilen Pipettenspitze gepickt und die Spitze samt Kolonie in 5 ml LB-Medium überführt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C und unter ständigem Schütteln mit 220 U/min.

Wurden größere Flüssigkulturen (> 10 ml) benötigt, so wurde über Tag (8 Stunden) eine 5 ml Vorkultur herangezogen. Mit 700 µl der Vorkultur wurde eine 70 ml Kultur angeimpft und über Nacht inkubiert.

2.2.2.5 Vereinzelausstrich

Material:

- LB-Agar: LB-Medium mit Zusatz von 15% (w/v) Bacto-Agar

Die LB-Agar Suspension wurde autoklaviert. Nach Abkühlung auf 40-45°C wurde Antibiotikum zugesetzt und schließlich die noch flüssige Agarlösung in sterile Einweg-Plastik-Petrischalen gegossen. Die Lagerung der Agarplatten erfolgte bei 4°C.

Durchführung:

Um Einzelkolonien zu erhalten, wurden Bakterien aus einer Dauerkultur mit einer sterilen Impföse auf einer Agarplatte ausgestrichen. Die Dichte der Bakterien nimmt mit jedem Ausstrich über die Platte ab, bis schließlich nur noch Einzelzellen vorhanden sind.

2.2.2.6 Dauerkulturen

Material:

- Glycerin: Roth, Nr. 7533.3

Um Bakterien auch über längere Zeiträume hinweg stabil lagern zu können wurde eine frische LB-Kultur mit 20% Glycerin versetzt, gut gemischt und anschließend bei -70°C gelagert.

2.2.2.7 Herstellung elektrokompenter Zellen

Material:

- 10% (v/v) Glycerin: Vorgekühlt 4°C
- Steriles Wasser: Aqua B., Braun

Durchführung :

Um Bakterien des Stammes DH10B elektrokompent zu machen wurden diese bis zu einer OD₅₉₅ von 0,6 kultiviert und anschließend sofort 15 min auf Eis gestellt. Danach wurden die Zellen 15 min bei 2.600xg zentrifugiert. Das Pellet wurde in 150 ml 10% Glycerin resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Nach erfolgter Zentrifugation wurde der Überstand quantitativ abgenommen und das Pellet in 1x Pelletvolumen eiskaltem 10% Glycerin aufgenommen und schließlich aliquotiert à 50 µl. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

2.2.2.8 Elektroporation

Material:

- Elektroporationsküvetten: Peqlab, Nr. 71-2020 (lange Elektroden, 2mm)

Durchführung:

Bei der Elektroporation wird die Bakterienmembran durch einen kurzen elektrischen Puls (4-6 ms) hoher Feldstärke transient permeabel für DNA.

Elektrokompente Zellen wurden auf Eis aufgetaut und 50 µl Zellen in eiskalte Elektroporationsküvetten überführt. Dazu wurde 1 ng der zu transformierenden DNA hinzugegeben. Die Bakterien wurden bei 2,5 kV, 400 Ohm und 25 mF perforiert. Nach

Zugabe von 450 µl LB-Medium wurden die Bakterien für 60 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert und anschließend auf eine Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen. Diese wurde über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.2.9 Plasmidpräparation (Schnellpräparation)

Diese Methode diente der schnellen Isolierung von Plasmid-DNA zur anschließenden Überprüfung der Anwesenheit des Inserts. Die isolierte DNA wurde auch zur Sequenzierung eingesetzt.

Material:

- Lösung 1: 50 mM Glucose; 50 mM EDTA; 25 mM Tris/HCl [pH 8,0]
- Lösung 2: 1% SDS; 0,2 N NaOH
- Lösung 3: 3 M K-Acetat [pH 5,2]
- Lithium-Chlorid-Lösung: 5 M LiCl; Tris/HCl [pH 7,5]

Durchführung :

Einzelne Kolonien der transformierten Bakterien wurden mit sterilen Spitzen gepickt und in 3 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum über Nacht bei 37°C in einem Schüttler inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde 1 min bei 6.500xg abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 150 µl Lösung 1 resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 min auf Eis wurden 300 µl Lösung 2 und gleich darauf Lösung 3 zugesetzt und das Eppendorfgefäß invertiert. Es folgte eine 10 minütige Inkubation auf Eis. Anschließend wurde der Ansatz 10 min bei 11.000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 700 µl Isopropanol gemischt. Nach 10 min Zentrifugation bei 11.000xg wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 250 µl A. dest. gelöst. Nach Zugabe von 250 µl Lithium-Chlorid-Lösung wurde der Ansatz 10 min auf Eis inkubiert, 10 min bei 1.100xg zentrifugiert und der Überstand in ein mit 1 ml Ethanol gefülltes Eppendorfgefäß überführt. Nach 5 min Zentrifugation bei 11.000xg wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen. Nach 5 min Zentrifugation bei 11.000xg wurde der Überstand verworfen und anschließend getrocknet. Das Pellet wurde schließlich in 40 µl A. dest. aufgenommen.

2.2.2.10 Plasmid-Minipräparation

DNA Plasmid-Isolierungen wurden im kleinen Maßstab mit dem *Metabion Miniprep Kit* ausgeführt, wenn Plasmid in möglichst reiner Form benötigt wurde.

Material:

- mi-Plasmid Miniprep-Kit: Metabion, Nr. mi-PM200

Durchführung:

Die Durchführung erfolgte gemäß den Herstellerangaben:

<http://www.metabion.de/downloads/manuals/purificationkits/miPM200.pdf>

2.2.2.11 Plasmid-Midipräparation

Diese Methode wurde verwendet, wenn DNA in besonders reiner Form und hoher Menge, wie etwa für Transformationen oder Klonierungen, benötigt wurde.

Material:

- NucleoBond® Xtra Midi: Macherey Nagel, Nr. 740410.50

Durchführung :

Die Durchführung erfolgte laut Herstellerangaben:

[https://www.mn-net.de/web/MN-WEB-](https://www.mn-net.de/web/MN-WEB-BioKatalog.nsf/web/PROXTRA/$File/PlasmidDNA_NuBoXTRA_R01.pdf)

[BioKatalog.nsf/web/PROXTRA/\\$File/PlasmidDNA_NuBoXTRA_R01.pdf](https://www.mn-net.de/web/MN-WEB-BioKatalog.nsf/web/PROXTRA/$File/PlasmidDNA_NuBoXTRA_R01.pdf)

2.2.2.12 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die hier verwendete Methode macht sich die Absorption der Purine und Pyrimidine bei 260 nm zunutze. Reine DNA hat bei einer optischen Dichte von 1 eine Konzentration von 50 µg/ml, reine RNA eine Konzentration von 40 µg/ml. Die Extinktion bei 260 nm wurde mittels Photometer ermittelt und die Messwerte wurden in die Konzentration umgerechnet. Zusätzlich ließ sich die Reinheit der Nukleinsäurelösung überprüfen, da aromatische Aminosäuren bei 280 nm absorbieren. Das Verhältnis der Messwerte bei 260 nm und bei 280 nm gibt Aufschluss über den Grad der Verunreinigung durch Proteine, wobei Werte von 1,9 bis 2,1 auf reine DNA oder RNA schließen lassen.

2.2.2.13 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Material:

- DNA Polymerase: Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase, NEB, Nr. F553L

Die PCR ermöglicht eine hohe Amplifikationszahl spezifischer Sequenzbereiche einer DNA (Saiki et al., 1988). Dazu werden sequenzspezifische Primer benötigt, welche die zu amplifizierende Sequenz definieren. Der typische PCR-Verlauf besteht aus drei unterschiedlichen Temperaturschritten. Zuerst wird die doppelsträngige DNA bei etwa 94°C thermisch denaturiert. Nun folgt eine Temperaturreduktion auf die Primersequenzspezifische Annealingtemperatur, bei der die Bindung der Primer an die DNA erfolgt. Anschließend folgt die DNA-Extension bei der für die thermostabile DNA-Polymerase

optimalen Temperatur von 72°C. Diese drei Zyklen wurden 30 bis 35 mal wiederholt, wobei eine exponentielle Amplifikation des die Primer umfassenden DNA-Stückes erfolgte.

Die Pufferbedingungen sind für eine erfolgreiche Amplifikation sowie für die Spezifität der Primerbindung entscheidend. Die verwendete Phusion DNA-Polymerase besitzt eine DNA-Bindedomäne und eine 3'→5' Exonuklease-Aktivität, die falsch eingebaute Nukleotide korrigieren kann, so dass die Fehlerrate bei einer falschen Base pro $4,4 \times 10^7$ eingebauter Basen liegt.

Komponente	Reaktion	Endkonzentration
5xPhusion HF Puffer	20 µl	1x
dNTP-Mix (je 10 mM)	1,5 µl	300 µM je dNTP
Primer for/rev (je 10 pmol/µl)	1,5 µl	0,3 µM je Primer
Template DNA	1 µl	10-100 ng Plasmid DNA
H ₂ O	71 µl	
DMSO	3 µl	
Phusion DNA Polymerase	0,5 µl	1 U
Gesamtvolumen	100 µl	

Der Ansatz wurde abschließend mit zwei Tropfen Mineralöl überschichtet.

Standard Phusion PCR-Profil, für Biometra Trioblock:

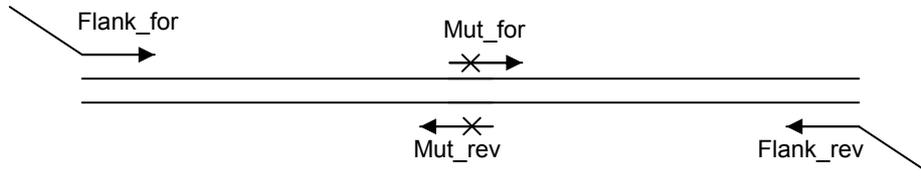
Zyklus	Reaktion	Temperatur	Zeit
	Initial-Denaturierung	95°C	2 min
35	Denaturierung	95°C	30 sec
	Annealing	60°C	30 sec
	Extension	72°C	40 sec
	Finale Extension	72°C	7 min
	Haltetemperatur	4°C	∞

Die Annealingtemperatur ist abhängig von der Primersequenz; für die Extensionszeit gilt 20s/1kbp.

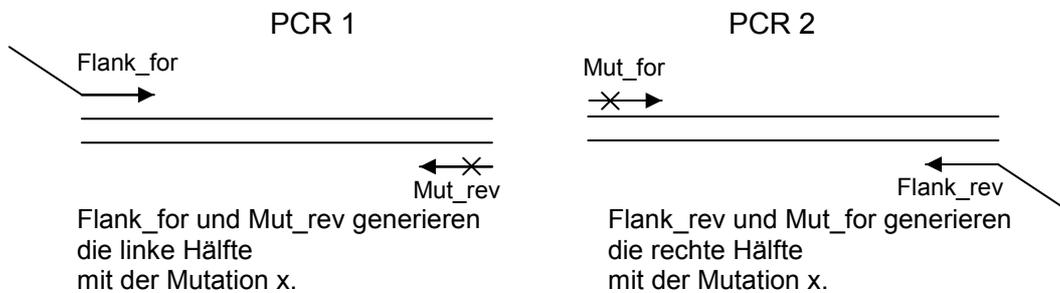
Der erste 95°C Schritt (*Hot-Start* Schritt) dient zur Aktivierung der Polymerase. Dadurch werden unspezifische Amplifikationen bei niedrigeren Temperaturen verhindert.

2.2.2.14 Gerichtete Mutagenese

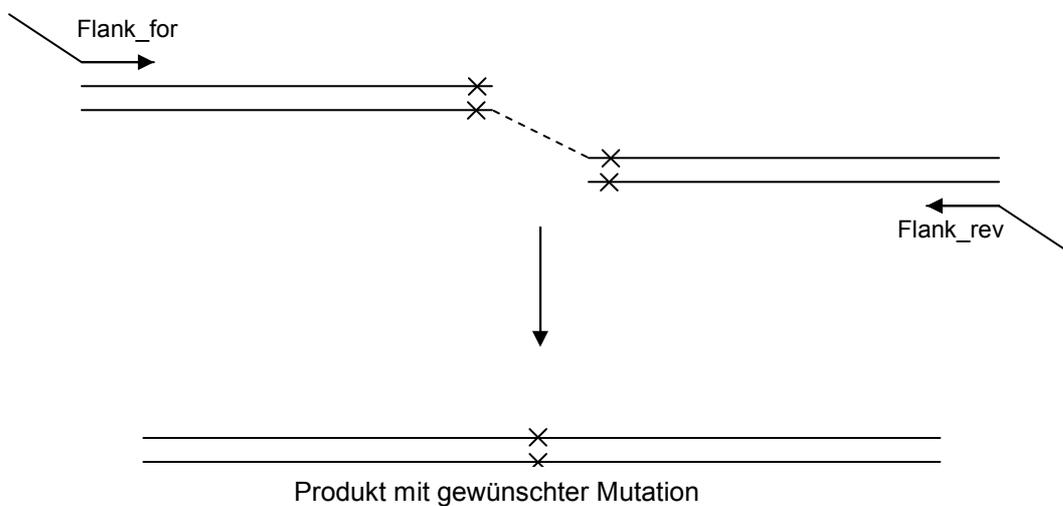
Mit der von Ho et al. (1989) beschriebenen Methode der Kombinations-PCR ist es möglich, DNA-Punktmutationen durchzuführen. Dazu sind lediglich vier Oligonukleotide notwendig: Zwei Primer, die das Template flankieren, sowie zwei Primer, die die Mutation tragen.



In zwei voneinander unabhängigen PCR-Reaktionen wurden die zwei Hälften des Endproduktes hergestellt:



In einer dritten PCR-Reaktion wurden die zwei gereinigten Hälften vereint, unter Verwendung der zwei flankierenden Primer Flank_for und Flank_rev. Während des PCR Prozesses diente die rechte Seite des ersten Moleküls als Ansatzpunkt für die Synthese der linken Seite des zweiten Moleküls:



Das entstandene Produkt wurde über eine Gelelution gereinigt, mit Restriktionsenzymen geschnitten und in den entsprechenden Vektor kloniert. Die PCR-Reaktionen wurden wie unter 2.2.2.13 beschrieben durchgeführt.

2.2.2.15 Restriktion

Restriktionsenzyme binden und schneiden sequenzspezifisch doppelsträngige DNA. So entstandene Fragmente können beispielsweise in Ligationsreaktionen verwendet werden.

Material:

- Mini Elute PCR Purification Kit: Qiagen, Nr. 28004
- mi-PCR Purification Kit: Metabion, Nr. mi-PP200

Durchführung:

Die zu analysierende DNA - meist 500-1000 ng Plasmid-DNA - wurde in 10 µl Ansätzen unter definierten Bedingungen restringiert. Bei präparativen DNA-Restriktionen wurden durchschnittlich 10 µg DNA verwendet. Die verwendeten Puffer basierten meist auf Tris Puffer und enthielten ein divalentes Kation wie Mg^{2+} für die Enzymaktivität. Pro µg DNA wurden 1 U – 5 U Enzym eingesetzt. Die Reaktion erfolgte für mindestens 3 h bei 37°C, besser über 12 h. Allerdings war bei einem 12 stündigem Verdau darauf zu achten, dass das Enzym keine *Staractivity* (Verlust der Sequenzspezifität) besitzt. Hier würde das Enzym bei längerer Inkubation unspezifisch schneiden. Bei der Klonierung eines Inserts in einen Vektor muss der Vektor mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten werden. Dieser Verdau erfolgte sequenziell; nach jedem Verdau wurde der Ansatz über den *mi-PCR Purification Kit* gereinigt. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers:

<http://www.metabion.de/downloads/manuals/purificationkits/miPP200.pdf>.

Nach präparativer Restriktion eines Vektors wurde dieser mit alkalischer Phosphatase (CIP) dephosphoryliert, um eine Religation des Vektors zu verhindern. Dabei wurden pro µg gereinigter Vektor-DNA 0,5 U Enzym verwendet, um die terminalen Phosphatgruppen am 5'-Ende zu entfernen. Anschließend wurde der Ansatz über den *MiniElute Kit* gereinigt, um CIP und Plasmid zu trennen. Die Elution erfolgte mit 10 µl EB-Puffer, um eine möglichst hohe Plasmidkonzentration zu erhalten. Die Durchführung erfolgte nach den Herstellerangaben:

http://www1.qiagen.com/literature/handbooks/PDF/DNACleanupAndConcentration/MinElute/1027886_HB_QQ_MinElute_0604.

2.2.2.16 Agarose-Gelelektrophorese

Standardmäßig wurde die Gel-elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren in Agarose-Gelen durchgeführt. Die Auftrennung erfolgte in 1%igen Agarose-Gelen in TAE-Laufpuffer. Die Proben wurden vor dem Gel-Lauf mit 1/10 Probenpuffer versetzt, was ein Einsinken der DNA in die Gel-Taschen ermöglichte.

Zur Detektion der DNA wurde der noch flüssigen Agarose 0,1µg/ml Ethidiumbromid (Phenanthridinium-Farbstoff), zugesetzt. Ethidiumbromid ist ein organischer Farbstoff, der mit den heteroaromatischen Ringen der DNA-Basen interagiert. Die Fluoreszenz des Ethidiumbromids wird durch diese Bindung im Vergleich zur Hintergrundfärbung des Gels verstärkt. Die DNA wurde durch Anregung des Ethidiumbromids auf einem UV-Tisch mit 260nm und Emission bei 590nm sichtbar gemacht und mit Hilfe einer CCD Videokamera dokumentiert.

2.2.2.17 DNA Isolierung aus Agarose-Gelen

Material:

- NucleoSpin® Extract II: Metabion, Nr. 740609.50

Durchführung:

Entsprechende DNA-Banden wurden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die Isolierung der DNA erfolgte mit Hilfe des *NucleoSpin Extract Kit*. Das Versuchsprotokoll wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt ([https://www.mn-net.de/web/MN-WEB-BioKatalog.nsf/web/PROEXTRACTII/\\$File/NSEextractII_R03.pdf](https://www.mn-net.de/web/MN-WEB-BioKatalog.nsf/web/PROEXTRACTII/$File/NSEextractII_R03.pdf)), wobei die DNA mit 50 µl TE Puffer eluiert wurde. Die DNA konnte direkt für Ligationen, Restriktionen, Dephosphorylierung etc. eingesetzt werden.

2.2.2.18 Ligation

Hierbei werden DNA Fragmente miteinander kovalent über eine Phosphodiesterbindung verknüpft.

Material:

- T4 DNA Ligase: New England Biolabs GmbH, Nr. M0202

Durchführung:

Die Reaktion wird durch die T4 DNA Ligase katalysiert, wobei das für die Reaktion benötigte ATP über den Reaktionspuffer bereitgestellt wird. Überwiegend wurde die Ligation zur Herstellung von Standardplasmiden verwendet. Die eingesetzten Mengen richteten sich

nach der Größe der Fragmente, wobei das Verhältnis der Molekül-Enden idealerweise 1:1 sein sollte. Die benötigten DNA Mengen wurden nach folgenden Formeln berechnet:

$$i = \frac{(s_i \cdot t)}{[(s_v / r_{iv}) + s_i]} \quad V = \frac{t \cdot s_v}{s_v + (s_i \cdot r_{iv})}$$

s_i	=	Größe des Inserts (kbp)
s_v	=	Größe des Vektors (kbp)
r_{iv}	=	Molares Verhältnis von Insert:Vektor
t	=	Menge der Gesamt-DNA (ng)
i	=	Benötigte Menge an Insert (ng)
v	=	Benötigte Menge an Vektor (ng)

Das Insert- zu Vektorverhältnis betrug 3:1, die eingesetzte DNA-Menge variierte zwischen 150 ng und 400 ng DNA.

Die Ansätze wurden über Nacht bei 16°C inkubiert. Das Ansatzvolumen betrug 10 µl und setzte sich wie folgt zusammen:

Reagenz	Volumen (µl)
Vektor DNA	x
Insert DNA	y
10x T4 DNA Ligase Puffer	1
T4 DNA Ligase	1
A. dest.	auf 10 µl

2.2.2.19 5'/3' RACE

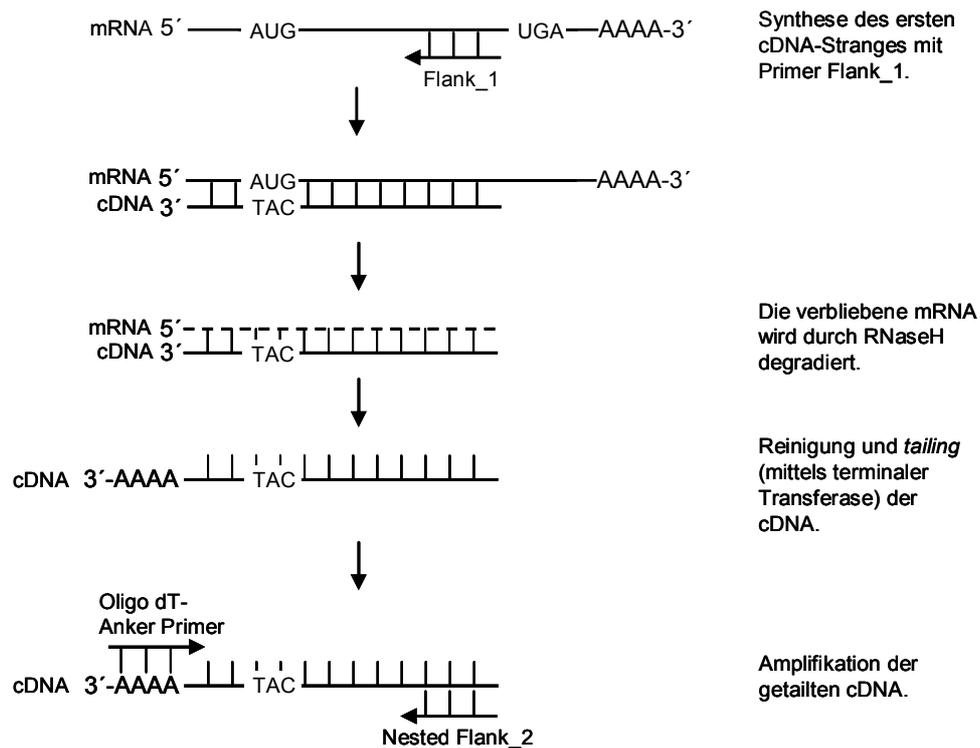
Material:

- 5'/3' RACE Kit: 2nd Generation, Roche, Nr. 03353621

Mittels *RACE Kit (rapid amplification of cDNA end; Frohman et al., 1988)* wurde die mRNA von m164 kartiert. Dazu wurden verschiedene interne Primer (Flank) eingesetzt, die innerhalb des bekannten ORF_{m164} liegen. Mit Hilfe des *Oligo dT-Anchor Primers* aus dem Kit war es möglich, in mehreren getrennten PCR-Reaktionen das 5'- und das 3'-Ende der m164-mRNA zu ermitteln.

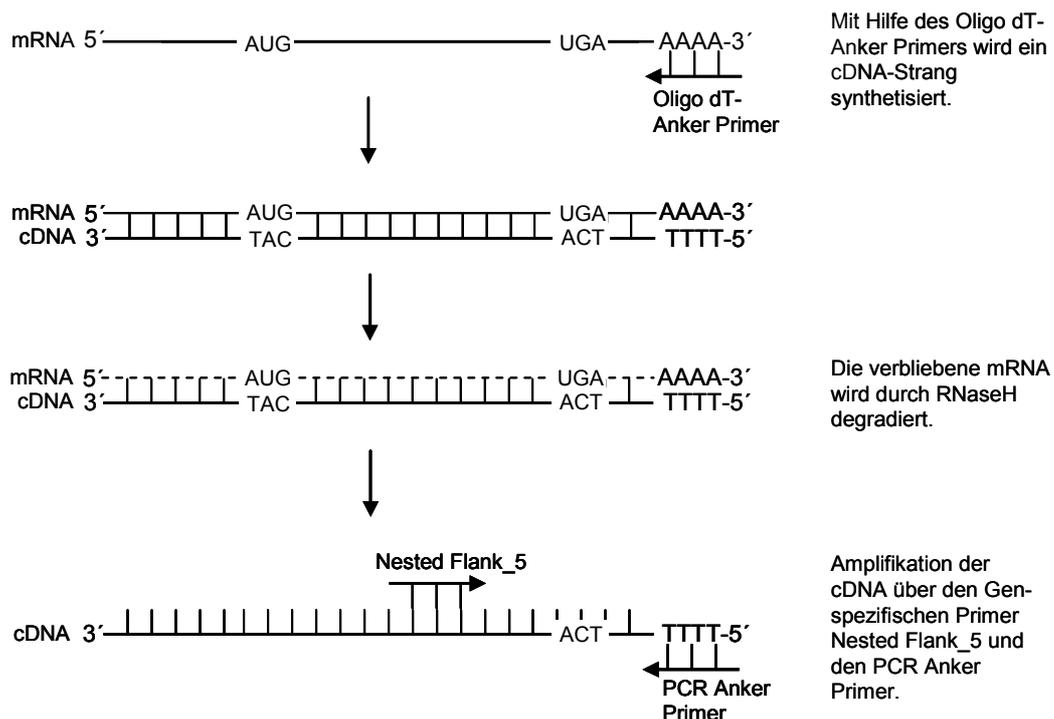
Durchführung:

5' RACE ermöglicht die Amplifikation von unbekannt Sequenzen am 5'-Ende einer mRNA. Das erhaltene PCR-Produkt kann schließlich sequenziert werden. Eingesetzt wurde Poly-(A)⁺-mRNA aus infizierten MEF. Die folgende Darstellung zeigt schematisch die verschiedenen 5' RACE-Reaktionen. Alle PCR-Reaktionen wurden gemäß Herstellerangaben durchgeführt.



Das Produkt der letzten PCR-Reaktion wurde über eine Agarose-Gelelektrophorese gereinigt. Die anschließende Sequenzierung zeigte das 5'-Ende der m164-RNA.

3' RACE ermöglicht die Amplifikation von unbekanntem Sequenzen am 3'-Ende einer mRNA. Das erhaltene PCR-Produkt kann schließlich sequenziert werden. Eingesetzt wurde mRNA aus infizierten MEF. Die folgende Darstellung zeigt schematisch die verschiedenen 3' RACE-Reaktionen. Alle PCR-Reaktionen wurden laut Herstellerangaben durchgeführt.



Das Produkt der letzten PCR-Reaktion wurde über eine Agarose-Gelelektrophorese gereinigt. Die anschließende Sequenzierung zeigte das 3'-Ende der m164 RNA.

2.2.2.20 Umgang mit RNA

Material:

- DEPC: Roth, Nr. K028.1

Der Umgang mit RNA erfordert besondere Reinheit. Die gesamten Arbeitsmaterialien sind RNase-frei zu halten. Glasgeräte wurden sterilisiert und es werden ausschließlich gestopfte Pipettenspitzen verwendet. Alle Lösungen, die keine primären Amine enthalten, wurden mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltem Wasser angesetzt; Plastikgeräte wurden mit 0,1 M SDS gewaschen und mit DEPC Wasser gespült. Alle Arbeiten wurden auf Eis durchgeführt und die Handschuhe regelmäßig gewechselt.

DEPC modifiziert alle -NH, -SH und -OH Gruppen und zerstört somit jede enzymatische Aktivität. Wasser wurde mit 0,1% DEPC über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Da DEPC auch RNA angreifen würde, wurde es nach der Inkubation autoklaviert. Dabei zerfällt es zu CO₂ und Wasser.

2.2.2.21 Isolierung von RNA

Material:

- RNeasy Mini Elute: Qiagen, Nr. 74134
- RNase free DNase Set: Qiagen, Nr. 79254
- Oligotex mRNA Mini Kit: Qiagen, Nr. 70022

Durchführung:

Virale RNA wurde aus infizierten MEF gewonnen. Dazu wurden MEF mit mCMV infiziert (siehe 2.2.3.13) und zu entsprechenden Zeitpunkten lysiert. Standardmäßig erfolgte die RNA-Gewinnung aus 10 cm Kulturschalen. Die Kulturschalen wurden auf Eis gehalten und zweimal mit PBS gewaschen. Mittels Zellschaber wurden die Zellen von der Oberfläche der Kulturschale gelöst und mit dem verbliebenen Rest-PBS in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Nach der Zentrifugation mit 10.000xg bei 4°C für 10 min wurde der Überstand entfernt. Die Zellen wurden in Lysepuffer resuspendiert und für 15 min zur Zelllyse auf Eis inkubiert. Um DNA-Kontaminationen auszuschließen erfolgte im Laufe des Reinigungsprotokolls ein DNase I Verdau. Diese Endonuklease spaltet Phosphodiesterbindungen der DNA. Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte mit Hilfe des *RNeasy* Kits nach der Arbeitsanleitung des Herstellers: (http://www1.qiagen.com/literature/handbooks/PDF/RNAStabilizationAndPurification/FromAnimalAndPlantTissuesBacteriaYeastAndFungi/RNY_Mini/1035969_HB.pdf).

Um mRNA zu isolieren wurde zuerst eine Gesamt-RNA Extraktion mittels des *RNeasy* Kits durchgeführt. Die gewonnene Gesamt-RNA wurde weiter über den *Oligotex mRNA* Kit, nach den Angaben des Herstellers, gereinigt und so die mRNA erhalten:

http://www1.qiagen.com/literature/handbooks/PDF/RNASTabilizationAndPurification/FromAnimalAndPlantTissuesBacteriaYeastAndFungi/RNY_OTX/1019295_HB_OTX052002_WW.pdf

2.2.2.22 RT-PCR

RNA wird durch das Enzym Reverse Transkriptase, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, in cDNA umgeschrieben. Die so hergestellte DNA kann mit sequenzspezifischen Primern und einer DNA-Polymerase in einer PCR amplifiziert werden.

Bei dem hier verwendeten *One Step RT PCR* Kit erfolgten die cDNA Synthese aus RNA und die sequenzspezifische Amplifikation über PCR hintereinander in demselben Gefäß. Durch die Synthese in einem Gefäß entfällt die Notwendigkeit von Oligo(dT)-Primern. Die doppelsträngige DNA, welche für Reverse Transkriptasen zur Initiation der DNA Synthese benötigt wird, wurde mit Gen-spezifischen Primern hergestellt.

Material:

- OneStep RT-PCR Kit: Qiagen, Nr. 210210

Die Durchführung erfolgte laut Herstellerangaben:

http://www1.qiagen.com/literature/handbooks/PDF/PCRandReverseTranscription/KitsAndEnzymes/RTPCR_OneStep/1020892HBRTPCR_05202.pdf

Komponente	Reaktion	Endkonzentration
5xQiagen Puffer	10 µl	1x
dNTP-Mix (je 10mM)	1,5 µl	300 µM je dNTP
Primer for/rev (je 10 pmol/µl)	1,5 µl	0,3 µM je Primer
Template RNA	1 µl	1-5 µg RNA
H ₂ O	34 µl	
RT-PCR Enzym Mix	2 µl	2 U
Gesamtvolumen	50 µl	

Zyklus	Reaktion	Temperatur	Zeit
	Reverse Transkription	50°C	30 min
	Initial-Denaturierung	95°C	15 min
35	Denaturierung	94°C	30 sec
	Annealing	60°C	30 sec
	Extension	72°C	60 sec
	Finale Extension	72°C	10 min
	Haltetemperatur	4°C	∞

Die Annealing Temperatur ist abhängig von der Primersequenz.

2.2.2.23 RNA-Gelelektrophorese

Material:

- 10x Formaldehyd-Gelpuffer: 200 mM MOPS; 50 mM Na-Acetat; 10 mM EDTA [pH 7]
- Formaldehydgel-Laufpuffer: 1xFA-Gelpuffer; 2% 37% Formaldehyd
- 1,2%iges Formaldehyd-Agarose-Gel: 1,2% Agarose; 10% 10xFA-Gelpuffer
- Probenpuffer: 1x MOPS [pH 7,0]; 50% Formamid; 1,8 M Formaldehyd; 3,5% Ficoll 400; 0,025% Bromphenolblau
- DEPC Wasser: 1% DEPC, Inkubation über Nacht, autoklavieren
- RNA Längenstandard III: Roche, Nr. 1062638, 50 µg
- 10x MOPS Puffer: 200 mM MOPS; 50 mM Natriumacetat; 10 mM EDTA [pH 7,0]
- RNA-Probenpuffer: 250 µl Formamid; 83µl 37% Formaldehyd; 50 µl 10x MOPS Puffer mischen; Bromphenolblau zu einer Endkonzentration von 0,01% hinzugeben

Durchführung:

RNA bildet durch intramolekulare Basenpaarung ausgeprägte Sekundärstrukturen und Aggregate aus. Um eine Größenordnung in einem Agarose-Gel zu ermöglichen, wird die RNA unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Dazu wird Formaldehyd verwendet. Es bindet die Aminogruppen von Adenin, Cytosin und Guanin, so dass diese Aminogruppen nicht mehr für die Ausbildung von Sekundärstrukturen und Aggregaten über Wasserstoffbrücken zur Verfügung stehen.

Zur Herstellung des RNA-Gels wurde zunächst die Agarose in 1x FA-Gelpuffer resuspendiert und durch Erhitzen gelöst. Nach Abkühlen auf 60 °C werden Formaldehyd und Ethidiumbromid hinzugegeben. Die RNA-Proben wurden mit 4 Volumen Probenpuffer versetzt, 5 min bei 65°C inkubiert und dann 5 min auf Eis gestellt. Der RNA Längenstandard wurde mit 3 Volumen RNA-Probenpuffer vermischt, 10 min bei 65°C erhitzt und auf Eis gestellt. Die Gelelektrophorese wurde bei 5-7 V/cm für etwa 3-4 Stunden durchgeführt.

2.2.2.24 Herstellung DIG-dUTP markierter Sonden

Material:

- PCR DIG Probe Synthesis Kit: Roche, Nr. 1636090

Durchführung:

Sonden zur Detektion von RNA wurden mit Hilfe des *PCR DIG Probe Synthesis Kit* mit DIG-dUTP markiert (Höltke & Kessler, 1990; Lion & Haas, 1990). Dieses Kit enthält einen speziellen dNTP-Mix, der 0,7 mM DIG-11-dUTP enthält. Das DIG-dUTP wurde während einer PCR-Reaktion in DNA Fragmente eingebaut.

Reagenz	DIG markierte Probe	Unmarkierte DNA Kontrolle
H ₂ O	variabel	variabel
PCR Puffer	5 µl	5 µl
DIG-dNTP-Mix	5 µl	-
dNTP Stocklösung	-	5 µl
Vorwärts-Primer	5 µM	5 µM
Rückwärts-Primer	5 µM	5 µM
Enzym	0,75 µl	0,75 µl
Template DNA	50 ng	50 ng
Gesamt	50 µl	50 µl

Beispiel der Reaktionsbedingungen im Thermocycler

Zyklus	Reaktion	Temperatur	Zeit
	Initial-Denaturierung	95°C	2 min
1-35	Denaturierung	95°C	30 sec
	Annealing	60°C	30 sec
	Extension	72°C	40 sec
	Finale Extension	72°C	7 min
	Haltetemperatur	4°C	∞

2.2.2.25 Northern Blot

Material:

- 10 x SSC (Saline-sodium citrat): 1,5 M NaCl; 0,15 M Na-Citrat [pH 7,0]
- Waschpuffer: 0,2xSSC; 0,2% SDS

Durchführung:

Die Northern Blot Methode wurde von Alwine et al. (1979) für Diazobenzylloxymethyl-(DBM)-Papier eingeführt, und von Thomas (1980) auf Nitrocellulose umgestellt. Nach der Gelelektrophoretischen Auftrennung wurde die RNA aus dem Gel mittels Diffusion auf eine Nylon-Membran transferiert. Eine Glasplatte wurde über eine mit 10 x SSC gefüllte Plastischüssel gelegt. Darüber wurden zwei Lagen mit 10 x SSC befeuchtetes Whatmanpapier so gelegt, dass sie in die Pufferkammer eintauchen. Darauf wurde das mit 10 x SSC befeuchtete RNA-Gel mit der Unterseite nach oben platziert. Die Nylon-Membran wurde in 10 x SSC angefeuchtet und auf das Gel gelegt. Nach zwei weiteren Lagen Whatmanpapier auf der Membran wurden mehrere Lagen saugfähige Tücher aufgelegt. Der Aufbau wurde beschwert, um die Diffusion des Puffers durch das Gel in die Tücher zu erleichtern. Durch die entstehenden Kapillarkräfte wurden die RNA-Moleküle aus dem Gel auf die Membran übertragen. Der Transfer erfolgte über Nacht. Anschließend wurde die Membran in Waschpuffer gewaschen und 5 min mit UV Licht ($0,129\text{J}/\text{cm}^2$) bestrahlt, um die RNA auf der Membran zu immobilisieren.

2.2.2.26 Detektion der RNA auf Northern-Blot Membranen

Material:

- DIG Wasch und Block Puffer Set: Roche, Art.-Nr. 1585762
- Prähybridisierungslösung: *DIG Easy Hyb*, Roche, Nr. 1603558
- Anti-Digoxigenin-AP, Fab-Fragmente: Roche, Nr. 1093274 (150U)
- CSPD: Roche, Nr. 1655884
- Hybridisierungslösung: *DIG Easy Hyb*, Roche, Nr. 1603558
- Waschpuffer 1: 2 x SSC; 0,1% SDS
- Waschpuffer 2: 0,1 x SSC; 0,1% SDS
- Blockierungslösung: Blockierungslösung (10x) aus dem DIG Wasch und Block Puffer Set (Roche) wird mit 1x Maleinsäurepuffer zu einer 1x Lösung verdünnt.
- Waschpuffer 3: Waschpuffer aus dem DIG Wasch und Block Puffer Set (Roche) wird mit A. dest. zu einer 1x Lösung verdünnt.
- Detektionspuffer: Der Detektionspuffer aus dem DIG Wasch und Block Puffer Set (Roche) wird mit A. dest. zu einer 1x Lösung verdünnt.

Durchführung:

Die Membran wurde in vorgewärmter Prähybridisierungslösung (20 ml/100cm) für 30 min bei 50°C inkubiert. Die RNA-Sonde wurde in Hybridisierungslösung resuspendiert (100 ng/ml Lösung) und 10 min bei 95-100°C denaturiert und anschließend in Eiswasser abgekühlt. Nach Abgießen der Prähybridisierungslösung wurde die Sondenlösung sofort auf die Membran gegeben und für 16 Stunden bei 50°C in einem Rollerschrank inkubiert.

Die Sonde kann wiederverwendet werden und wird bei -20°C gelagert. Nach der Hybridisierung wurde die Membran 2 x 5 min in Waschpuffer 1 bei RT gewaschen. Es folgte ein zweiter Waschriff in Waschpuffer 2 für 2 x 15 min bei 68°C, um unspezifisch gebundene Sonde abzuwaschen. Nach dem Abgießen von Waschpuffer 2 wurde die Membran mit Blockierungslösung 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Membran für 30 min in Antikörperlösung (Anti-Digoxigenin) inkubiert. Der Antikörper wurde zuvor bei 10.000xg 5 min abzentrifugiert und 1:10.000 in Blockierungslösung verdünnt. Nach erfolgter Inkubation wurde die Membran 2 x 15 min in Waschpuffer 3 gewaschen, ehe sie 5 min in Detektionspuffer äquilibriert wurde.

CSPD wurde 1:100 in Detektionspuffer verdünnt, bevor es auf die Membran gegeben wurde. In einer eingeschweißten Folie wurde die Membran 15 min bei 25°C inkubiert. Schließlich wurde überschüssiges CSPD aus der Folie entfernt und die Membran nochmals 10 min bei 37°C inkubiert. CSPD wird durch das Enzym alkalische Phosphatase desphosphoryliert, wobei als Zwischenprodukt ein Phenolat-Anion entsteht, welches unter Lichtemission zerfällt. Die Lumineszenz-Detektion erfolgte mittels Röntgenfilm.

2.2.3 Zellbiologische Methoden

Alle Arbeiten mit eukaryontischen Zellen finden unter sterilen Bedingungen statt und werden unter sterilen Werkbänken ausgeführt. Alle verwendeten Medien werden steril gekauft, selbstgefertigte Lösungen werden autoklaviert oder bei hitzeempfindlichen Substanzen sterilfiltriert. Es kommen nur autoklavierte oder sterilisierte Glas- und Plastikgeräte zum Einsatz.

2.2.3.1 Medien und Lösungen

Zellkulturmedien

Die von Gibco erworbenen Zellkulturmedien enthalten L-Glutamin. Spezielle Zusätze sind bei der Aufführung der einzelnen Zellen zu finden.

DMEM	<i>(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)</i> , supplementiert mit: 100 U/ml Penicillin; 0,1 mg/ml Streptomycin; Gibco, Nr. 61965
DMEM	<i>(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)</i> supplementiert mit: 100 U/ml Penicillin; 0,1 mg/ml Streptomycin; PAA, Nr. E15-009. (Wurde für Transfektion verwendet, da kein L-Glutamin enthalten ist)
Earle's MEM	<i>(Minimum Essential Medium)</i> , supplementiert mit: 100 U/ml Penicillin; 0,1 mg/ml Streptomycin; Gibco, Nr. 41090
FCS	<i>(Fetal Calf Serum)</i> . Vor Gebrauch wurde das FCS für 35-40 min bei 56°C im Wasserbad zur Komplement-Inaktivierung inkubiert. Das Hitze-inaktivierte FCS wurde bei 4°C aufbewahrt; PAA.
NCS	<i>(Newborn Calf Serum)</i> . Vor Gebrauch wurde das FCS für 35-40 min bei 56°C im Wasserbad zur Komplement-Inaktivierung inkubiert. Das Hitze-inaktivierte FCS wurde bei 4°C aufbewahrt; PAA, Nr. B15-001
PBS	<i>(Phosphate Buffered Saline, 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 6,5 mM Na₂PO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7,4)</i> ; Gibco, Nr. 14190
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin; 10000 U Penicillin und 10 mg/ml Streptomycin in 0,9% (w/v) NaCl. Die Endkonzentration entspricht 100 U/ml Pen; 0,1 mg/ml Strep.; PAA.

Trypanblau (Vitalfarbstoff, 0,5% (w/v) in 0,9 mM NaCl); Firma Biochrom, Nr. L 6323

Trypsin/EDTA 5 g/l Trypsin; 2 g/l EDTA (10x). Die Arbeitslösung wurde 1:10 in PBS verdünnt; PAA Nr. L11-003.

2.2.3.2 Zelllinien

COS-7

Die Etablierung von COS-Zelllinien wurde von Gluzman (1981) publiziert. Dabei wurde eine CV-1-Zelllinie, eine etablierte Nierenzelllinie von Grünen Meerkatzen, die für die Vermehrung des SV40-Virus permissiv ist, mit einer SV40-Mutante transfiziert, die eine Deletion von 6 bp im Replikationsursprung aufweist und somit nicht mehr replikationsfähig ist. Als Kontrolle wurde Wildtyp-SV40-DNA transfiziert. Die mit Wildtyp-DNA transfizierten CV-1-Zellen lysierten durch die virale Replikation nach ca. 6 Wochen. Bei der Transfektion mit den Mutanten bildeten sich 3 Zellpopulationen (COS-1, -3 und -7). Alle 3 COS-Zelllinien exprimieren das SV40-T-Antigen und sind permissiv für die Infektion und Vermehrung von SV40-Virus. Die Zelllinie lässt sich einfach transfizieren und wird in dieser Arbeit zur transienten Proteinexpression verwendet.

American Type Culture Collection (ATCC); Nr. CRL 1651

Kulturmedium: DMEM + 10% (v/v) FCS

MEF (murine embryofetale Fibroblasten)

Diese primären Zellen stammen aus 14-17 Tage alten Embryonen. Die Zellen werden frühestens in der zweiten und spätestens in der dritten Passage infiziert. Die Primärzellen eignen sich hervorragend für die Infektion durch mCMV sowie alle abgeleiteten rekombinanten Viren.

Kulturmedium: MEM + 10% (v/v) FCS

NIH 3T3

Die NIH 3T3 (embryonale Fibroblasten) Zelllinie wurde ursprünglich von der ATCC, Nr. CRL 1658, bezogen. Die Zellen lassen sich gut mit mCMV infizieren, allerdings ist die Zelldichte in Kultur geringer als die von MEF (starke Kontaktinhibition), weswegen standardmäßig alle Infektionsversuche mit MEF durchgeführt werden.

Kulturmedium: DMEM + 10% (v/v) NCS

2.2.3.3 Gewinnung von murinen embryofetalen Fibroblasten

Einer trächtigen Maus wurden am 14.- 17. Tag der Schwangerschaft die Föten steril entnommen und diese sofort in einer Petrischale auf Eis gestellt. Die inneren Organe sowie die Augenanlagen der Embryonen wurden entfernt. Das verbleibende Gewebe wurde mit einer Schere zerkleinert. Anschließend wurde der Zellbrei in eiskaltem PBS aufgenommen, über ein Metallsieb filtriert und mit PBS gespült, um die Erythrozyten zu entfernen. Der Zellbrei wurde dann in einen mit Glasperlen und Magnetprüher gefüllten Erlenmeyerkolben gegeben. Das Volumen des Zellbreis wurde mit Trypsin/EDTA Lösung auf 30 ml gebracht. Nach langsamem Rühren für 30 min bei 37°C wurden noch zweimal je 30 ml Trypsin/EDTA Lösung hinzugegeben. Nach insgesamt 90 min wurde der Zellbrei erneut über ein Metallsieb filtriert und schließlich das Filtrat 10 min bei 1200 U/min bei 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in Medium aufgenommen und über Gaze filtriert, um Gewebestücke zu entfernen. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen in einer Dichte von $3-5 \times 10^7/30$ ml pro Petrischale (15cm) ausgesät (1. Passage).

Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt, um alle nicht adhärenen Zellen zu entfernen. Sobald die Zellen einen konfluenten Zellrasen gebildet hatten (2-4 Tage), wurden die Zellen in 90% FCS + 10% DMSO eingefroren. Dazu wurde das Medium abgesaugt, 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung zugegeben, wieder abgesaugt, wieder 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung zugegeben und bei RT abgewartet, bis sich die Zellen von der Oberfläche der Petrischale zu lösen begannen.

2.2.3.4 Kultivierung

Gefrorene eukaryontische Zellen werden in einem 37°C Wasserbad zügig aufgetaut und in 15 ml Medium aufgenommen. Um DMSO zu entfernen werden die Zellen bei 300xg für 5 min zentrifugiert, in frischem Medium resuspendiert und in Kultur genommen. DMSO ist wasserlöslich und passiert die Zellmembran. In der Zelle dient es in geringen Konzentrationen als Frostschutzmittel und verhindert so die Entstehung von Eiskristallen.

2.2.3.5 Passagieren

Material:

- Medium: DMEM mit 10% (v/v) FCS; 100 U/ml Penicillin; 0,1 mg/ml Streptomycin
- Trypsin/EDTA: PAA, Nr. L11-003. 1:10 mit PBS verdünnt, Arbeitskonzentration 0,5 g/l Trypsin; 0,2 g/l EDTA [pH 7,5]

Durchführung:

COS-7- und NIH 3T3-Zellen wurden in 75cm² Flaschen in DMEM, das mit 10% FCS supplementiert war, kultiviert. Die Zellen wurden alle drei Tage im Verhältnis 1:8-1:10 passagiert. Dazu wurde das Medium abgenommen und die Zellen zweimal mit 10 ml PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 1 ml Trypsin bei 37°C von der Oberfläche abgelöst. Die Flaschen wurden mehrfach gegen die Tischkante geklopft, um die Zellen mechanisch weiter zu vereinzeln. Die Trypsinierung wurde mit supplementiertem Medium gestoppt und die Zellen darin resuspendiert.

2.2.3.6 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wird der Vitalfarbstoff Trypanblau eingesetzt. Tote Zellen nehmen Trypanblau sofort auf, wodurch sich das Zytoplasma blau färbt. Da die Zellmembran lebender Zellen erst nach ca. 5-10 min für Trypanblau permeabel wird, dringt der Farbstoff entsprechend später in die Zellen ein.

Für die Zellzahlbestimmung wurde ein Aliquot der Zellsuspension in einem bestimmten Verhältnis mit dem Farbstoff gemischt. Das Verhältnis Farbstoff zu Zellsuspension wurde so gewählt, dass etwa 60 Zellen/Großquadrat in der Zählkammer gezählt werden konnten. Die Zählung erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer (Kammertiefe 0,1mm); alle Zellen die sich in einem Großquadrat (geteilt in 25 Kleinquadrate) befanden, wurden erfasst. Bei jeder Zählung wurden die Zellen von zwei Grossquadraten erfasst.

Mit folgender Formel lässt sich die Zellzahl in der Zellsuspension errechnen:

$$N/n \times V \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$$

N	=	Zahl der gezählten Zellen
n	=	Zahl der ausgezählten Grossquadrate
V	=	Verdünnungsfaktor
10 ⁴	=	Kammerfaktor

2.2.3.7 Transfektion

Material:

- Medium: DMEM mit 10% (v/v) FCS; 100 U/ml Penicillin; 0,1 mg/ml Streptomycin
- PolyFect Transfection Reagent: Qiagen, Nr. 301107
- Zellzahl:
 - 10 cm Schale = 5x10⁵ Zellen (2 µg DNA)
 - 24 Well = 2x10⁴ Zellen (0,4 µg DNA)
 - Ibidi Tunnel = 1x10³ Zellen (0,1 µg DNA)

Durchführung:

COS-7 Zellen wurden mit *PolyFect* transfiziert. Damit lassen sich Transfektionseffizienzen von etwa 30% erreichen. Am Vortag der Transfektion wurden COS-7 Zellen mit einer

definierten Zellzahl ausgesät (siehe Material). Pro Kulturschale (Ø 10 cm) wurden 2 µg DNA mit nichtsupplementiertem Medium auf ein Volumen von 300 µl eingestellt. Nach Zugabe von 50 µl *PolyFect* wurde 1 ml Vollmedium zupipettiert. Durch ein dreimaliges Auf- und Abziehen des Mediums mit der Pipette wurde gemischt und schließlich das Medium tropfenweise auf die Zellen gegeben. Zuvor wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 7 ml Vollmedium überschichtet. Nach DNA-Zugabe wurden die Zellen für 48 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Wurden Kotransfektionen von zwei Plasmiden durchgeführt, blieb die Gesamt-DNA-Menge von 2 µg unverändert - pro Plasmid wurde 1 µg DNA zugegeben.

PolyFect besteht aus Dendrimeren, welche durch ihre sphärische Struktur aus Polyamido-Aminpolymeren und positiver Ladung Plasmid-DNA binden können. Diese sehr kleinen Komplexe gelangen wahrscheinlich über Phagozytose in die Zellen. Dort wird aufgrund der Pufferwirkung der Dendrimere ihr Abbau in Endosomen verhindert und sie gelangen schließlich in den Zellkern.

2.2.3.8 Kryokonservierung

Die Kryokonservierung dient der Langzeitlagerung von Zellen bei -196°C in flüssigem Stickstoff. Zu diesem Zweck wird den Zellen das hygroskopische DMSO zugesetzt, welches die Bildung von Eiskristallen minimiert. Konfluente Zellen wurden durch Trypsinierung von der Platte abgelöst, bei 300xg 5 min zentrifugiert und in einer geringen Menge Vollmedium mit 10% DMSO resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen à 1 ml aliquotiert. Die Zellen wurden nun langsam auf -70°C abgekühlt - dies geschieht über Nacht in einer Gefriertruhe. Im Anschluss wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.3.9 Fixierung von COS-7-Zellen und MEF

Material

- 10x PBS: 140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 6,5 mM Na₂PO₄, 1,5 mM KH₂PO₄ [pH 7,4]
- 4% PFA: 8% PFA : 8% Saccharose (1:1)
- Deckglas: 12 mm Ø, Marienfeld Lab. Glassware, Nr. 011152

Durchführung:

Für indirekte Immunfluoreszenzfärbungen wurde in 24-Well-Platten pro Vertiefung ein steriles Deckgläschen gelegt. In die Vertiefungen wurden Zellen mit einer Dichte von 8×10^4 Zellen ausgesät. Je nach verwendeten Zellen wurde entweder transfiziert (COS-7 Zellen) oder infiziert (MEF) und schließlich wurden die auf den Deckgläsern gewachsenen Zellen entweder 90 min mit 70% Methanol bei 4°C fixiert oder 10 min bei Raumtemperatur mit PFA

fixiert. Anschließend wurde die Fixierungslösung abgesaugt und die Zellen wurden zweimal mit 1 ml PBS gewaschen. Schließlich wurden die Zellen in PBS bei 4°C gelagert.

2.2.3.10 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung

Material:

- 10x PBS: 140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 6,5 mM Na₂PO₄; 1,5 mM KH₂PO₄ [pH 7,4]
- Blockierungspuffer: 33% FCS; 40 mM Natriumphosphatpuffer; 900 mM NaCl; 0,6% Triton X-100 [pH 7,4]
- Eindeckmittel: Mowiol®4-88 Reagent, Calbiochem, Nr. 475904

Durchführung:

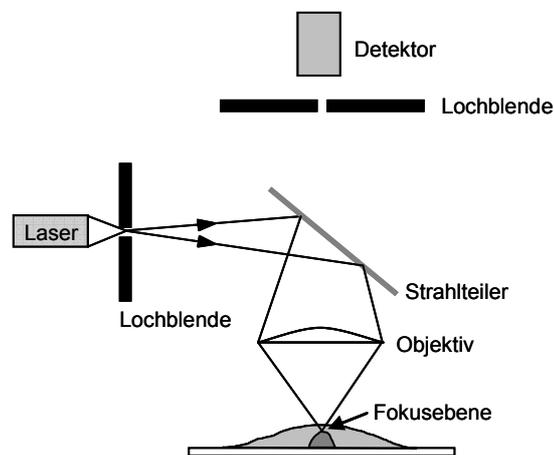
Die fixierten und in PBS gelagerten Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen. Dazu wurden die Deckgläser in einen Halter überführt und in einer Wanne 3 x 5 min mit PBS gewaschen. Zur Permeabilisierung der Zellen und zur Verhinderung unspezifischer Bindungen wurde jedes Deckglas mit 50 µl Blockierungspuffer überschichtet und für 20 min in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert. Nun folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper, der in Blockierungslösung verdünnt wurde. Jedes Deckglas wurde für 1 bis 2 Stunden mit 50 µl Ak-Lösung in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert. Danach wurden unspezifisch gebundene Ak durch drei Waschriffe von je 5 min in PBS entfernt. Der mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelte Sekundärantikörper wurde vor der Verwendung für 5 min bei 6.000xg zentrifugiert und anschließend in einer 1:200 Verdünnung in Blockierungspuffer eingesetzt. Durch die Zentrifugation sollten gebildete Farbstoffkomplexe abgetrennt werden. Um den konjugierten Farbstoff vor dem Ausbleichen zu schützen, wurden die Ak lichtgeschützt aufbewahrt und alle folgenden Inkubationen im Dunkeln durchgeführt. Die Deckgläser wurden mit je 50 µl der Zweitantikörperlösung für 1 bis 2 Stunden in einer feuchten Kammer im Dunkeln inkubiert. Die folgenden Waschriffe von je 5 min in PBS dienten der Entfernung ungebundener Antikörper.

Bei indirekten Doppelimmunfluoreszenzfärbungen wurden den Zellen die beiden Primärantikörper simultan zugesetzt. Bei der Wahl der jeweiligen Sekundärantikörper musste auf die richtige Spezies geachtet werden. Zur Anfärbung des Zellkerns wurden die Zellen nach dem Sekundärantikörper und den darauffolgenden Waschriffen 5 min mit 50 µl 1:10.000 in mit PBS verdünnter Hoechst-Farbstoff-Lösung inkubiert. Anschließend folgten vier Waschriffe in PBS und das Eindecken der Zellen. Zum Eindecken wurde pro Deckglas ein Tropfen des Eindeckmittels auf einem Objektträger aufgetragen und das Deckglas mit der zellbeschichteten Seite nach unten aufgelegt. Anschließend wurden die Ränder der Deckgläser mit farblosem Nagellack abgedichtet und bei 4°C gelagert.

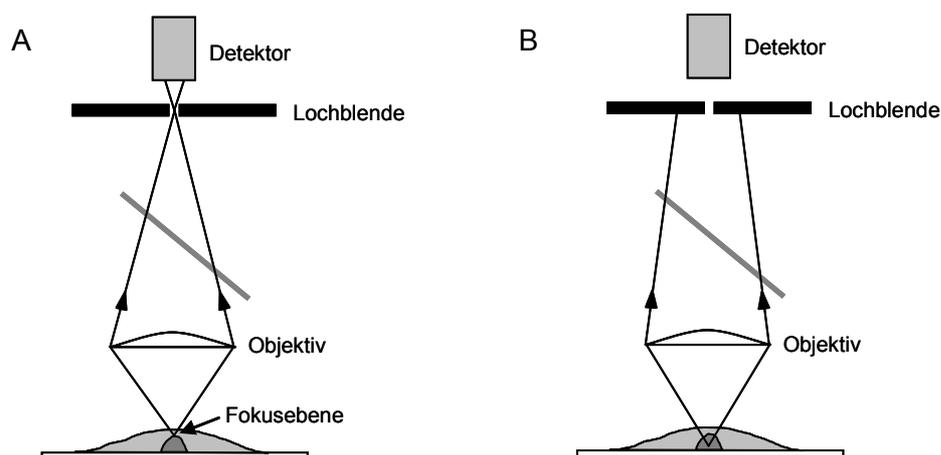
2.2.3.11 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Ein konfokales Laser Scanning Mikroskop (LSM) baut auf dem Prinzip der Auflichtfluoreszenzmikroskopie auf. Mit dem LSM können dicke Präparate (etwa eine Zelle) optisch in eine Vielzahl von Ebenen zerlegt werden. Jede Ebene ergibt ein scharfes Bild, wobei diese Ebenen zu einem dreidimensionalen Bild zusammengefügt werden können. Das Prinzip wurde von Minsky 1955 entwickelt (zur Übersicht siehe Minsky, 1988).

Die heutigen LSM besitzen meist Fluoreszenz-Optiken, d.h. das optische System entspricht dem eines Fluoreszenz-Mikroskops. Anstelle das gesamte Präparat komplett zu beleuchten, wie es übliche Fluoreszenz-Mikroskope machen, kann das optische System des LSM einen Lichtpunkt auf eine bestimmte Stelle in eine beliebige Tiefe des Präparats fokussieren. Dazu ist ein Laser als intensive Lichtquelle notwendig. Das Laserlicht wird mit Hilfe einer Lochblende und eines Objektivs in einem beliebigen Punkt des Präparates abgebildet.



Angeregte Fluoreszenzmoleküle, die sich im Lichtweg des Fokus befinden emittieren Licht. Jedoch nur das emittierte Licht der Fluorophore die sich genau im fokussierten Lichtpunkt befinden, wird an der Lochblende (*pinhole*) des Detektors fokussiert und erreicht den Detektor. Dieses Licht stammt demnach aus der Schärfenebene, es ist kon-fokal (A). Licht was unter oder oberhalb der Brennebene emittiert wird, kann der Detektor aufgrund der Lochblende nicht mehr detektieren: Streulicht bleibt von der Bildentstehung ausgeschlossen (B):



In der folgenden Abbildung ist das optische System eines Fluoreszenzmikroskops, wie es auch im LSM verwendet wird, schematisch dargestellt:

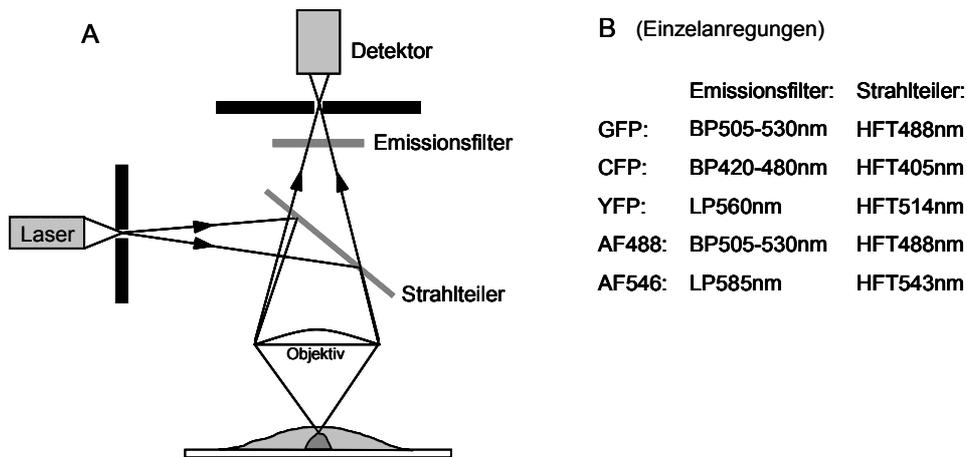


Abb. 6: Das optische System eines Fluoreszenzmikroskops. A: Dargestellt ist das Filterset des Fluoreszenzmikroskops bestehend aus Strahlteiler (Dichromatischer Spiegel) und Emissionsfilter. Der Strahlteiler reflektiert Licht bestimmter Wellenlänge, das über das Objektiv fokussiert wird und auf das Präparat auftrifft. Der Emissionsfilter lässt nur das emittierte Licht des angeregten Fluorophors passieren, andere Fluoreszenzsignale werden zurückgehalten. B: Die Tabelle zeigt die in dieser Arbeit verwendeten Fluorophore mit den dazugehörigen Filtereinheiten.

2.2.3.12 Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET) Analysen

Material:

- 10x PBS: 140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 6,5 mM Na₂PO₄; 1,5 mM KH₂PO₄ [pH 7,4]
- Mounting Medium: Meridian Bioscience, Nr. 2914.
- 4% PFA: 4 g PFA in 50 ml H₂O lösen, 1 ml 1 M NaOH zufügen, bei 65°C mischen, bis alles gelöst ist. 10 ml 10 x PBS zugeben, auf RT abkühlen lassen. Mit 1 M HCl auf pH 7,4 einstellen. Mit H₂O auf 100 ml bringen, sterilfiltrieren, bei -20°C lagern.

Durchführung:

COS-7-Zellen wurden wie unter 2.2.3.7 beschrieben auf Deckgläschen (DG) ausgesät und mit Expressionsvektoren für die CFP- und YFP-Fusionsproteine transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen auf den DG mit PBS gewaschen und mit 4% Paraformaldehyd (PFA) für 30 min bei RT fixiert. Anschließend wurde 3 x mit PBS gewaschen. Je DG wurde ein Tropfen Mountingmedium verwendet und schließlich wurden die Zellen mit klarem Nagellack auf Objektträgern luftdicht fixiert. Für die FRET Messung wurde ein Zeiss LSM 510 Meta mit 63x/1,4 Öl-Immersions-Objektiv verwendet. Konfokale Aufnahmen wurden unter Verwendung der 457 nm (CFP) und der 514 nm (YFP) Argon-Laserlinien vorgenommen.

Im Falle von FRET müssen die FRET-Paare in enger räumlicher Nähe liegen (unter 10 nm) und die richtige Orientierung zueinander haben. Das Emissionsspektrum und das

Exzitationsspektrum von Donor und Akzeptor überlappen. Als Donor wurde CFP, als Akzeptor YFP gewählt. Dieses Fluorophorpaar erfüllt die Eigenschaft der überlappenden Spektren. Wird das Donor-Fluorophor mit der entsprechenden Wellenlänge angeregt, kann ein strahlungsloser Energietransfer von Donor auf den Akzeptor stattfinden (Förster, 1948; Stryer & Haugland, 1967, zur Übersicht siehe Wu & Brand, 1994). Dies führt zu einer Fluoreszenz-Emission des Akzeptors, die Donor Emission hingegen wird gequencht.

FRET wurde über die Akzeptor Fotobleich Methode (*acceptor photo bleaching approach*) detektiert (zur Übersicht siehe Houtsmuller & Vermeulen, 2001). Zellen, welche die CFP- und YFP-Fusionsproteine exprimierten, wurden zuerst einzeln aufgenommen, schließlich wurde spezifisch das Akzeptor Fluorophor (YFP) mittels des 514 nm Argonlasers gebleicht. Der Bleichvorgang wurde in dem zu untersuchenden Bereich 2-10 mal wiederholt, bei einer Laserintensität von etwa 70%. Die Auswertung der Daten erfolgte über die Zeiss LSM 510 Software, wobei die Fluoreszenzintensität des CFP vor und nach dem Fotobleichen ermittelt wurde.

Die FRET Messungen wurden am EMBL in Heidelberg unter Anleitung von Arne Seitz durchgeführt.

2.2.3.13 FRAP (*Fluorescence recovery after photobleaching*)

Material:

- KHM-Puffer: 110 mM Kaliumacetat; 20 mM HEPES;
2 mM MgCl₂
- Zellkulturschale: Ibidi µ-Slide VI, Nr.80606

Als FRAP wird die Regenerierung der Fluoreszenz in einem definierten Probenbereich nach einem Bleichvorgang bezeichnet. Mit dieser Methode lässt sich die Mobilität von fluoreszierenden Molekülen in lebenden Zellen untersuchen (Edidin et al., 1976). Dazu wird das Fluorophor mit einem kurzen, aber energetisch intensivem Laserpuls irreversibel gebleicht. Durch die Diffusion von gebleichten Molekülen aus der zuvor gebleichten Region und die Diffusion von intakten Molekülen in die gebleichte Region, kann die Fluoreszenz dort regeneriert werden. Detektiert wird die Fluoreszenzintensität an einer bestimmten Region (ROI = *region of interest*) über die Zeit.

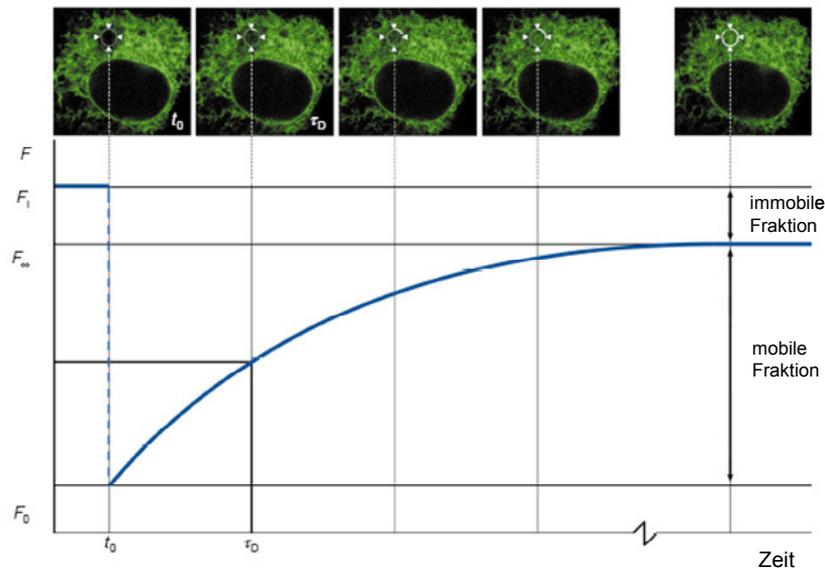


Abb. 7: Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP). Wird eine Region in einem Fluoreszenzbereich (hier das ER) zum Zeitpunkt t_0 gebleicht, reduziert das die Fluoreszenzintensität F von der Ausgangsfluoreszenz F_i zu F_0 . Nach einer gewissen Zeit erreicht die Fluoreszenzintensität durch die Diffusion von ungebleichten Fluorophoren in die zuvor gebleichte Region das Plateau F_∞ . Eine komplette Erholung der Fluoreszenzintensität auf das Niveau der Ausgangsfluoreszenz F_i kann nicht erreicht werden, da immobile Fluorophore nicht durch Diffusion ausgetauscht werden können (immobile Fraktion). Die charakteristische Diffusionszeit τ_0 bezeichnet den Zeitpunkt an dem die Hälfte der Fluoreszenz wiedererlangt ist (aus: Reits & Neefjes, 2001).

Durchführung:

COS-7-Zellen wurden mit m164-GFP Expressionskonstrukten in Ibidi-(Minitunnel) Zellkulturschalen transient transfiziert und kurz vor der Messung mit KHM Puffer gespült. Die Messung erfolgte bei 37°C und unter CO₂ Begasung.

FRAP Experimente wurden an einem Zeiss LSM510 Meta am EMBL in Heidelberg unter Anleitung von A. Seitz durchgeführt.

Die Aufnahmen wurden mit einer Auflösung von 510 x 510 dpi, einem Vergrößerungsfaktor von 2-3 und einem 63x/1,4 Öl Immersions Objektiv durchgeführt. Die Hauptleistung des Argonlasers wurde auf 60% (bei einem Strom von 7,1A) gesetzt, die Anregungsintensität des 488 nm Lasers wurde vor und nach dem Bleichvorgang auf 1-2% reduziert, während des Bleichvorgangs auf 100% erhöht.

Das Bleichen erfolgte bei einer Iteration, d.h. der Laser fuhr nur einmal über die Bleichregion, um eine Radikalbildung und ein ungewolltes Crosslinken der Fluorophore zu vermeiden. Vor und nach dem Bleichen wurden zwischen 200-300 Bilder in konstanten zeitlichen Abständen aufgenommen. Die Auswertung der Daten erfolgte über die Zeiss LSM 510 Software, wobei die Fluoreszenzintensität des GFP vor und nach dem Fotobleichen ermittelt wurde.

2.2.3.14 MEF-Infektion

MEF wurden generell nicht früher als Passage zwei und nie später als in Passage drei infiziert. Zum Zeitpunkt der Infektion sollten die Zellen zu etwa 80% konfluent sein. Die Zellen

wurden gezählt, um die benötigte MOI für das Virus berechnen zu können. Vor der Infektion wurde das Zellmedium gewechselt. Das Virus wurde in Medium aufgenommen und den Zellen eine entsprechende Menge (MOI = 4) zugesetzt. Die Kulturschalen wurden 5 min bei 760xg und nach einer Drehung um 180° weitere 25 min bei 760xg zentrifugiert. Durch die Zentrifugal-Infektion konnte ein PFU- Verstärkungseffekt um den Faktor 20 erreicht werden, so dass die Infektion mit 0,2 PFU/Zelle durchgeführt wurde, um letztlich eine Multiplizität der Infektion (MOI) von 4 zu erreichen (Podlech et al., 2002). Bis zum Zeitpunkt der Ernte wurden die Zellen im Brutschrank inkubiert. Der Zeitpunkt der Viruszugabe gilt als Infektionszeitpunkt.

2.2.3.15 Zusatz von Phosphonoessigsäure und Actinomycin D

Material:

- Phosphonoessigsäure (PAA): 50 mg/ml in A. dest., steril filtriert.
Arbeitskonzentration: 5 µl/ml = 0,25 mg/ml
- Actinomycin D (ActD): 1 mg/ml in 100% EtOH
Arbeitskonzentration: 5 µl/ml = 0,25 mg/ml

Durchführung:

Zur definierten Analyse der Genexpression in der E- bzw. L-Phase der Infektion können für RNA- und Protein-Kinetiken MEF mit Actinomycin D oder Phosphonoessigsäure behandelt werden. Phosphonoessigsäure arretiert den Replikationszyklus durch Hemmung der DNA-Replikation, Actinomycin D hemmt die RNA-Synthese.

Die Zugabe von Phosphonoessigsäure und Actinomycin D erfolgte direkt in das Medium, jeweils 5 µl/ml (Podlech et al., 2002). Das Medium wurde anschließend mit einer 10 ml-Pipette aufgezogen, um eine optimale Durchmischung zu erreichen. Die Zugabe war zeitlich nicht festgelegt und orientierte sich an der Fragestellung des Experiments.

2.2.4 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

2.2.4.1 Grundlagen

Aufbau eines Massenspektrometers

Ein Massenspektrometer besteht aus einer Ionenquelle, einem Massenanalysator und einem Detektor (Abb. 8). In der Ionenquelle wird aus einer Probe ein Strahl gasförmiger Ionen erzeugt. Der Massenanalysator trennt die erzeugten Ionen nach ihrem Masse/Ladungsverhältnis (m/z -Verhältnis). Der Detektor liefert das Massenspektrum, aus dem ersichtlich wird, welche Ionen in welchen relativen Mengen gebildet wurden.

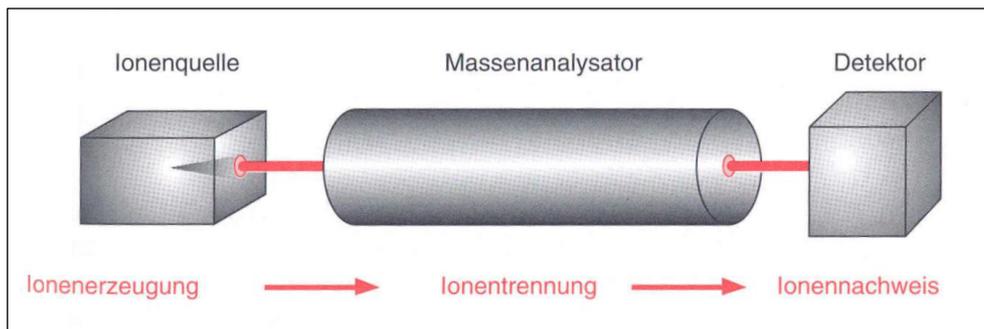


Abb. 8: Schematischer Aufbau eines Massenspektrometers (aus: Lottspeich & Zorbas, 1998).

Ionisierungsprinzip

Bei der MALDI-Massenspektrometrie wird eine Matrix zur Probeneinbettung verwendet, die bei der eingestrahelten Laserwellenlänge eine hohe Absorption zeigt (Karas & Hillenkamp, 1988). Dadurch werden höhere Auflösungsintensitäten und weniger Fragmentationen erreicht.

Die Matrix aus kleinen, organischen Molekülen wird in einem 1.000–10.000-fachen Überschuss verwendet. Durch Verdunstung des Lösungsmittels erfolgt die Kokristallisation von Matrix und Analyt. Dabei werden die Probenmoleküle in das Kristallgitter eingebaut.

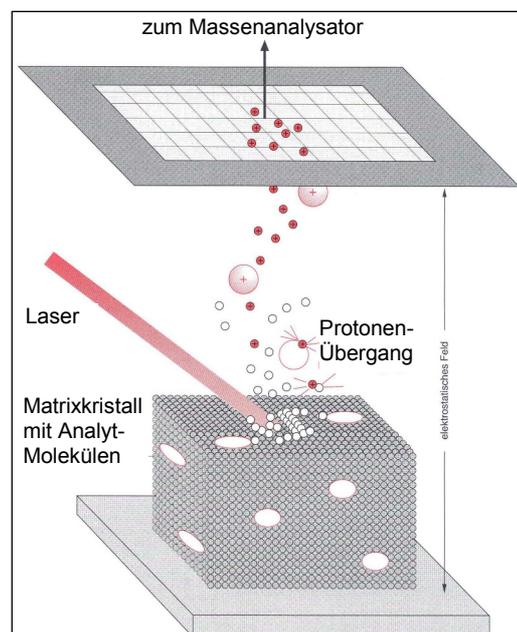


Abb. 9: Schematische Darstellung der matrixunterstützten Laserdesorption/Ionisation (aus: Lottspeich & Zorbas, 1998).

Im Hochvakuum wird ein kurzer Laserimpuls auf die kristalline Oberfläche gegeben (Abb. 9). Die eingestrahelte Energie wird zunächst in Form von resonanter, elektronischer Anregung der Matrixmoleküle aufgenommen. Nach kürzester Zeit relaxiert diese Energie ins Festkörpergitter und führt dort zu einer starken Ausdehnung. Darauf folgt ein Phasenübergang, der explosionsartig einen Teil der Festkörperoberfläche auflöst. Dabei werden Matrixmoleküle und einige Probenmoleküle in die Gasphase freigesetzt (Desorption).

Die photoionisierten, radikalischen Matrixmoleküle übertragen Protonen auf die Analytmoleküle (Ionisation). Dem Probeneller gegenüber befindet sich im Abstand weniger Millimeter eine Elektrode. Diese erzeugt ein elektrostatisches Feld von einigen 100 – 1000 V/mm. Je nach Elektrodenpolarität werden positive oder negative Ionen von der Probenoberfläche in Richtung des Analysators beschleunigt.

Massenanalyse der Ionen mit dem Flugzeitmassenspektrometer

Die Zeit, die zwischen dem Start der Ionen in der Quelle bis zum Eintreffen im Detektor vergeht, wird sehr genau elektronisch gemessen. Darüber erfolgt die Massenbestimmung im Hochvakuum. Die während des Laserimpulses gebildeten Ionen werden in der Quelle durch das anliegende elektrostatische Feld beschleunigt. Ihre kinetische Energie E_{kin} beträgt einige Kiloelektronenvolt und kann mit der Formel

$$E_{kin} = \frac{1}{2}mv^2 = zeU$$

beschrieben werden. Dabei ist m die Masse, v die Geschwindigkeit, z die Ladung des Ions, e die Elementarladung und U die Beschleunigungsspannung. Nach Verlassen der Quelle durchlaufen die Ionen eine feldfreie Driftstrecke L , in der sie nach ihrem Masse/Ladungs-Verhältnis (m/z -Verhältnis) aufgetrennt werden. Das Trennungsvermögen besteht darin, dass Ionen mit unterschiedlichen m/z -Verhältnissen auf der Beschleunigungsstrecke in der Quelle auf unterschiedliche Geschwindigkeiten gebracht werden, wobei gilt:

$$v = \frac{L}{t}$$

Das m/z -Verhältnis lässt sich durch Einsetzen der beiden Formeln ineinander aus der Flugzeitmessung errechnen:

$$\frac{m}{z} = \frac{2eU}{L^2}t^2$$

Dabei ist t die Gesamtflugzeit und L die Länge der feldfreien Driftstrecke des Flugrohrs. Das bedeutet, dass in einem TOF-Massenspektrometer das m/z -Verhältnis dem Quadrat der Flugzeit proportional ist. So lässt sich die jeweilige Masse aus der gemessenen Flugzeit ermitteln. Typische Flugzeiten bei MALDI liegen im Bereich von μs , die Driftstrecke beträgt bei dem verwendeten Gerät 1,5 m.

Detektion

Das Detektionssystem besteht aus einem Sekundärelektronenvervielfacher (SEV) mit Konversionsdynode. Die Dynode wandelt den auftreffenden Ionenstrom in einen Strom von Sekundärelektronen um. Es entsteht eine Elektronenkaskade. Das am Ende des SEV erzeugte Signal wird verstärkt, digitalisiert und an einen Computer weitergegeben. Dieser zeigt das MALDI-Spektrum an, in dem die relative Intensität gegen das m/z -Verhältnis

aufgetragen ist. Die erhaltenen Daten werden durch Abgleich mit Datenbanken zur Identifizierung der Probenproteine herangezogen.

2.2.4.2 Probenvorbereitung für die MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Die im Ergebnisteil dargestellten MALDI-TOF-Experimente wurden bei Dr. Kevin Downard, School of Molecular & Microbial Biosciences, University of Sydney, NSW, Australien, durchgeführt. Die dazu verwendeten m164-Proteine wurden in Mainz aus Sf-9 Insektenzellen mittels μ Macs Magnet-beads isoliert und gekühlt mit nach Sydney genommen.

Material:

- Acetonitril: Sigma, Australien
- Ammoniumbicarbonat (NH_4HCO_3): Sigma, Australien
- Dithiothreitol (DTT): Sigma, Australien

Durchführung:

Zur Vermeidung von Keratinkontaminationen werden Proben für die MALDI-TOF-MS Analyse (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time Of Flight*) unter weitgehend sterilen Bedingungen präpariert. Alle verwendeten Lösungen und Puffer werden mit einem Filter der Porengröße 0,2 μm sterilfiltriert. Dieser fängt Hautschuppen oder zusammenhängende Keratinmoleküle $> 200 \text{ nm}$ ab. Einzelne Keratinmoleküle können jedoch hindurchgelangen. Verwendete Glasgeräte werden zunächst mit einer Natriumhydroxid-haltigen SDS-Lösung gereinigt, anschließend mit Ethanol und A. dest. abgewaschen. Es werden sterile Pipettenspitzen und Eppendorfgefäße verwendet. Dadurch wird die Gefahr einer Keratinkontamination minimiert.

Aus dem CBB R250-gefärbten Gel werden in einer Sterilbank Banden ausgeschnitten und in etwa 1 mm^3 große Stücke zerteilt. Die Gelstücke werden in sterile Eppendorfgefäße überführt. Alle folgenden Schritte finden bei Raumtemperatur im Thermomixer statt. Die Gelstücke werden dreimal für 15 min in 50%igem Acetonitril und 25 mM Ammoniumbicarbonat bei pH 8 inkubiert. Anschließend werden die Gelstücke durch zwei 10-minütige Inkubationen in Acetonitril dehydriert. Nach Entfernen des Acetonitrils werden die Gelstücke für 20 min in einer Speed Vac getrocknet.

Die Proben werden anschließend für 1 h bei 56°C in 10 mM DTT in 100 mM Ammoniumbicarbonat inkubiert. Dabei werden die enthaltenen Proteine reduziert. Anschließend wird dreimal für 5 min mit 100 mM Ammoniumbicarbonat gewaschen und für 5 min in Acetonitril inkubiert. Dabei wird den Gelstücken Wasser entzogen. Die Rehydrierung erfolgt durch 5-minütige Inkubation in 100 mM Ammoniumbicarbonat, gefolgt von einer erneuten Dehydrierung durch Acetonitril. Durch dieses abwechselnde Dehydrieren und

Rehydrieren wird die Gelmatrix durchlässig gemacht. Das Acetonitril wird entfernt und die Gelstücke werden für 20 min in einer Speed Vac getrocknet.

2.2.4.3 Proteinverdau im Gel

Material:

- Acetonitril: Sigma, Australien
- Trifluoressigsäure: 0,1% in Acetonitril, Sigma, Australien
- α -Cyanohydroxymizsäure: 2 mg/ml in Wasser/Acetonitril (1:1), Sigma
- Trypsin-Puffer: 50 mM NH_4HCO_3 ; 5 mM CaCl_2 ; 6,75 ng/ μl Trypsin
- Puffer: 50 mM NH_4HCO_3 ; 5 mM CaCl_2
- Chymotrypsin: Sigma, Australien

Durchführung:

Nach dem Trocknen erfolgt der In-Gel-Verdau. Die Gelstücke werden für 45 min auf Eis in Trypsin-Puffer inkubiert. Trypsin ist ein Verdauungsenzym, das zur Klasse der Serin-Proteasen gehört. Diese Proteasen besitzen einen reaktiven Serinrest im aktiven Zentrum. Trypsin hat die größte Spezifität und empfiehlt sich deshalb als Instrument im Arsenal der Peptidasen für die Polypeptidfragmentierung. Es schneidet Peptidbindungen auf der C-terminalen Seite der positiven Reste Arginin und Lysin. Nach Quellen der Gelstücke im Trypsin-Puffer wird der verbleibende Überstand entfernt und durch Puffer ersetzt. Die Proteolyse erfolgt über Nacht bei 37°C. Am nächsten Tag werden die peptidhaltigen Überstände abgenommen und für 1 h in der Speed Vac getrocknet. Alternativ wurden die Gelstücke mit der Endopeptidase Chymotrypsin verdaut, um andere Peptide als mit Trypsin zu erzeugen, da Chymotrypsin bevorzugt an Peptidbindungen schneidet, deren Carbonylgruppe von einem Tyrosin-, Tryptophan- oder Phenylalanin-Rest stammt.

Die MALDI-TOF-Experimente wurden mit einem kalibrierten Applied Biosystems QSTAR-XL Massenspektrometer durchgeführt.

Die getrockneten Peptide wurden dazu in 50%igem Acetonitril und 0,1%iger Trifluoressigsäure (TFA) aufgenommen und 1:1 mit der Matrixsubstanz α -Cyanohydroxymizsäure auf einem Stahltablett (Target) vermischt.

Die Peptide eines Proteins, das mit einer Protease geschnitten wurde, zeigen im Massenspektrum hoch spezifische Peaks (*fingerprint*). Ist die Sequenz des Proteins bekannt, kann über die Datenbanksuche (Mascot, unter expasy.org) das Protein anhand der Peptidmasse zugeordnet werden. Für die Datenbanksuche wurden deisotopierte Peaks verwendet.

3 Ergebnisse

Die Arbeitsgruppe Holtappels identifizierte über „Reverse Immunologie“ aus der genomischen Sequenz des Proteins ORF*m164* ein D^d -restringiertes Peptid ²⁵⁷-AGPPRYSRI-²⁶⁵, das eine hohe Frequenz an antiviralen T-Zellen induziert. Weiter konnte gezeigt werden, dass nahezu 80% aller *Memory* CD8 T-Zellen im Haplotyp $H-2^d$ gegen das IE1- und das m164-Peptid gerichtet sind (Holtappels et al., 2002a). Zu Beginn dieser Arbeit gab es weder über das m164-Protein noch über die m164-mRNA nähere Informationen. Im Folgenden wird eine detaillierte Charakterisierung der m164-mRNA sowie des exprimierten m164-Proteins präsentiert.

3.1 Charakterisierung der m164-mRNA

Der ORF*m164* ist durch die WT-mCMV-Sequenz (Smith Stamm) nach Rawlinson et al. (1996) definiert. Der codogene Strang des ORF*m164* entspricht dem unteren Strang der WT-mCMV-DNA (nach Definition von Rawlinson). Deshalb liegt das Stopcodon an Position 222.366 und das Startcodon an Position 223.649 im WT-mCMV-Genom und überlappt mit den angrenzenden ORFs *m165* (367 bp) und *m163* (46 bp). In der folgenden *Hind*III Genkarte des WT-mCMV-Genoms ist die Lokalisation des ORF*m164* dargestellt:

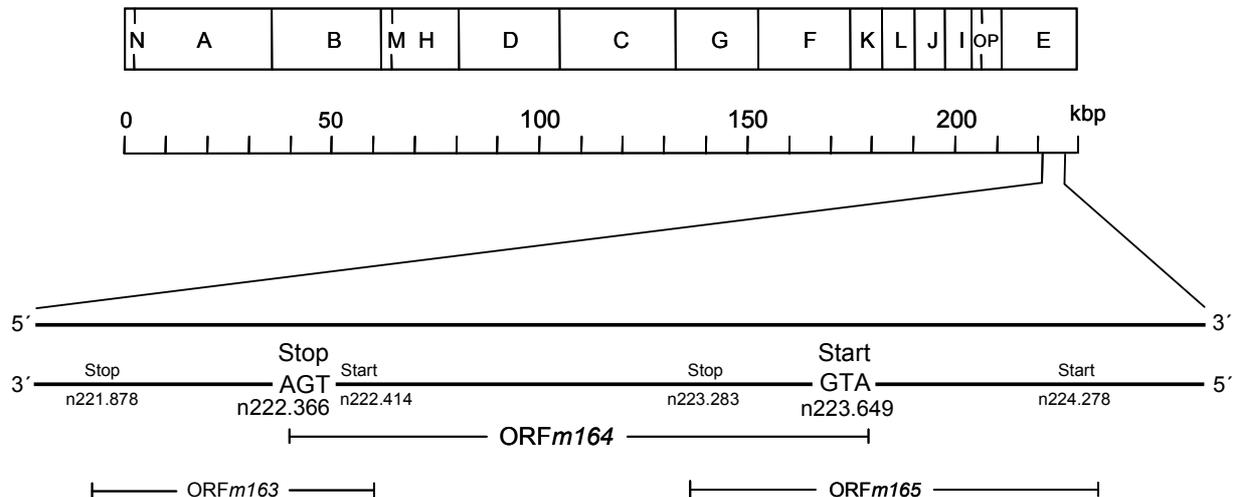


Abb. 10: Lokalisation des vorhergesagten ORF*m164* innerhalb des WT-mCMV-Genoms. Physikalische *Hind*III-Karte des WT-mCMV-Genoms mit Teil-Vergrößerung des E-Fragments. Der ORF*m164* liegt im E-Fragment und umfasst 1284 Nukleotide.

3.1.1 5' RACE

Da der ORF*m164* basierend auf der DNA-Sequenz bisher lediglich vorhergesagt worden war, sollte in dieser Arbeit die vollständige m164-mRNA im Hinblick auf zusätzliche 3'- und 5'-Sequenzbereiche untersucht werden. Dazu wurde zuerst eine 5' und anschließend eine 3' RACE-Analyse durchgeführt.

Anmerkung:

Bei der Erläuterung der 3' und 5' RACE-Experimente wird der ORF*m164* aufgrund des einfacheren Verständnisses invertiert dargestellt, d.h. das Startcodon liegt nun links von dem Stopcodon.

Für die 5' RACE-Reaktion wurden zwei ORF*m164*-interne Primer generiert: Flank_1 zum Umschreiben der mRNA in cDNA und Nested Flank_2 zur Amplifikation der cDNA.

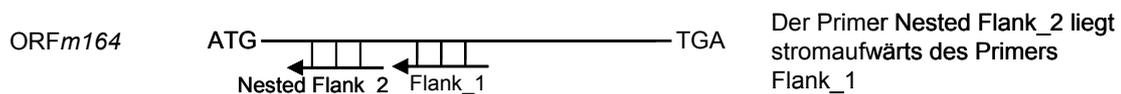
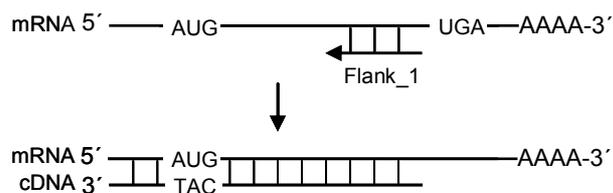
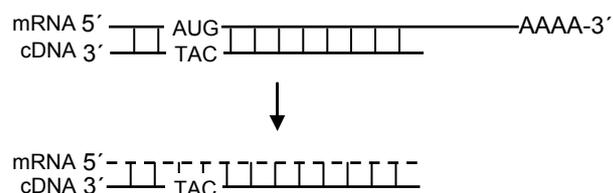


Abb. 11: Schematische Darstellung der Primer-Positionen von Flank_1 und Nested Flank_2 im ORF*m164*. Die Primer Flank_1 und Nested Flank_2 wurden anhand des bereits bekannten ORF*m164* ausgewählt und sind komplementär zur mRNA (*antisense*) (siehe M&M, 2.2.2.19.).

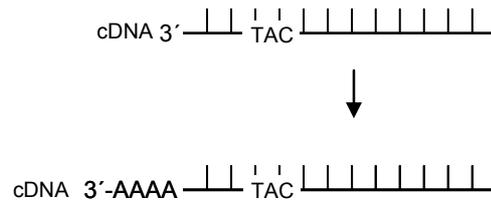
Verwendet wurde Poly (A)⁺-mRNA, die 6 h nach Infektion (p.i.) von MEF mit WT-mCMV aus diesen Zellen isoliert worden war. In einer RT-PCR wurde das unbekannte 5'-Ende der mRNA mit Hilfe des spezifischen m164-Primers (Flank_1) in cDNA umgeschrieben:



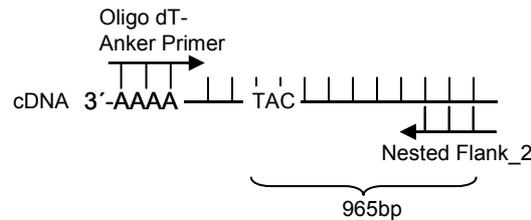
Verbliebene RNA wurde im Anschluss mittels RNase H degradiert:



Mit Hilfe der terminalen Nukleotid-Transferase und dATP wurde an dem 3'-Ende des cDNA-Stanges ein Poly A-Ende angefügt:



In einer darauf folgenden PCR-Reaktion wurde die cDNA mit Hilfe eines Oligo dT-Anker Primers und des zweiten spezifischen m164-Primers (Nested Flank_2) amplifiziert:



Das PCR-Produkt wurde schließlich isoliert und mit Hilfe des Primers Seq5' sequenziert.

Wie in Abb. 11 gezeigt, bindet der Primer Nested Flank_2 im ORF*m164* und gestattet die Amplifikation eines m164-Teilbereiches in Richtung des ORF*m164* Startcodons. Dieser m164-Teilbereich umfasst von Primer Nested Flank_2 bis zum Startcodon 965bp. Es wäre demnach ein mindestens 965bp großes PCR-Produkt bei Amplifikation der cDNA mittels den Primern Oligo dT-Anker Primer und Nested Flank_2 zu erwarten gewesen. Alle zusätzlichen Basen gehören zu einem bisher unbekanntem 5'-Bereich der m164-mRNA.

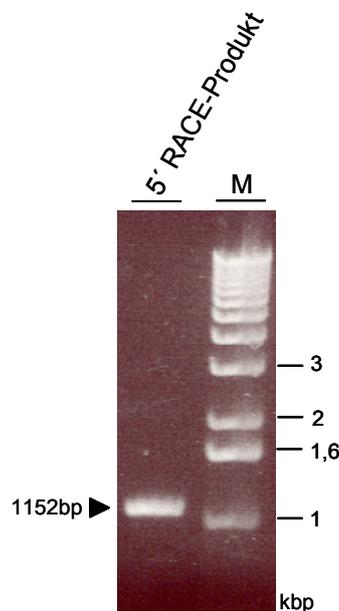
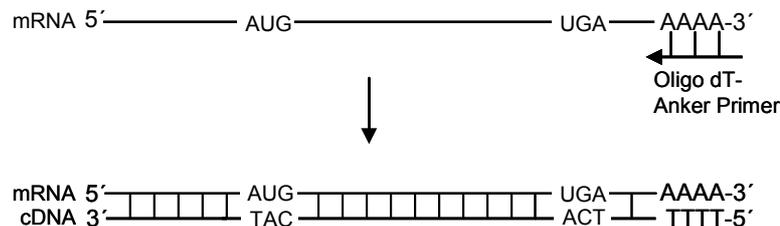


Abb. 12: 5' RACE-PCR Produkt nach Gel-elektrophoretischer Auftrennung. Die Amplifikation erfolgte aus der Poly A-cDNA über die Primer Flank_2 und Oligo dT-Anker Primer, wobei ein Produkt mit einer Größe von 1152bp entstand (Die präzise Länge stammt aus der Sequenzierung). Spur M: 1kbp Marker.

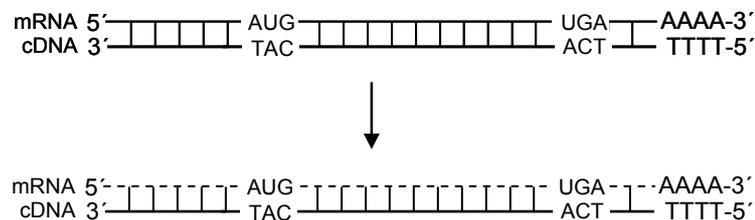
Das PCR-Produkt aus der Amplifikation der Poly A-cDNA hatte, wie in Abb. 12 zu sehen ist, eine Größe von 1152bp. Es beinhaltet die erwartete 965bp lange m164-Teilsequenz und darüber hinaus einen zusätzlichen 187bp langen Bereich.

3.1.2 3' RACE

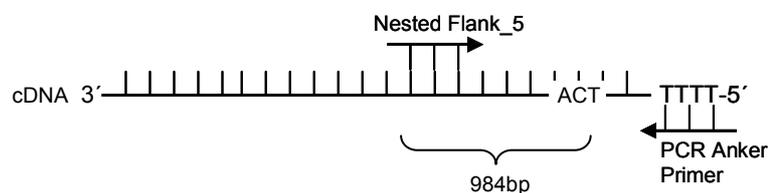
Für die 3' RACE-Reaktion wurde ebenfalls Poly (A)⁺-mRNA aus MEF, die mit WT-mCMV infiziert worden waren, 6 h p.i. isoliert und zur Analyse eingesetzt. Die mRNA wurde in einer RT-PCR mit Hilfe eines Oligo dT-Anker Primers, der an das Poly (A)⁺-Ende der mRNA bindet, in cDNA umgeschrieben:



So wurde sichergestellt, dass der gesamte bisher unbekannte 3'-Überhang zwischen Stopcodon und Poly A-Ende in cDNA translatiert wurde. Verbliebene RNA wurde im Anschluss mittels RNase H degradiert:



Die cDNA wurde über einen PCR Anker Primer, der komplementär zum 5'-Ende der cDNA ist, und einen m164 spezifischen Primer (Nested Flank_5) amplifiziert.



Zu erwarten wäre ein PCR-Produkt mit einer Größe von mindestens 984bp, da dies dem Bereich zwischen dem Primer Nested Flank_5 und dem Stopcodon (TGA) entspricht. Alle zusätzlichen Basen gehören zu dem bisher unbekanntem 3'-Bereich der m164-mRNA. Das erhaltene PCR-Amplifikat wurde isoliert und mit Hilfe des Primers Seq3' sequenziert.

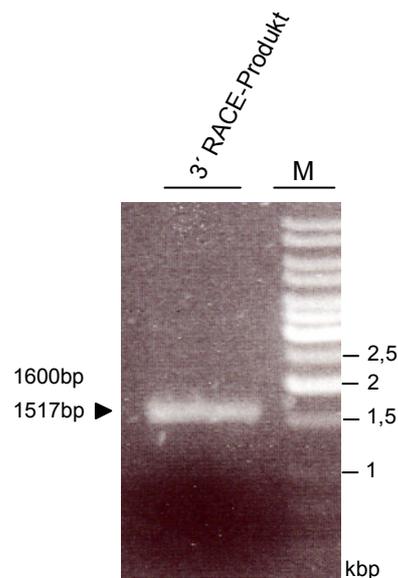


Abb. 13: PCR-Produkt aus der 3' RACE-Analyse. Mittels des Primers Nested Flank_5 und PCR Anker Primer wurde aus dem cDNA-Template ein 1600bp großes Amplifikat generiert. Spur M: 1kbp Marker.

Wie aus Abb. 13 ersichtlich, war das PCR-Produkt aus der Amplifikation der cDNA mit Hilfe der Primer Nested Flank_5 und PCR Anker Primer 1600bp groß. Abzüglich des Poly A-Endes, war das PCR-Produkt 533bp größer als erwartet.

Schlussfolgerung:

Über 5'/3' RACE war es möglich, die *m164*-mRNA zu kartieren. Sie hat insgesamt eine Länge von 2004 Nukleotiden: 187 Nukleotide am 5'-Ende, 1284 Nukleotide des *ORFm164* und 533 Nukleotide am 3'-Ende (ohne Poly A-Ende). Die definierten 5'- und 3'-Bereiche überlappen mit den Sequenzen der angrenzenden *ORFm165*, *ORFm163* und *ORFm162*.

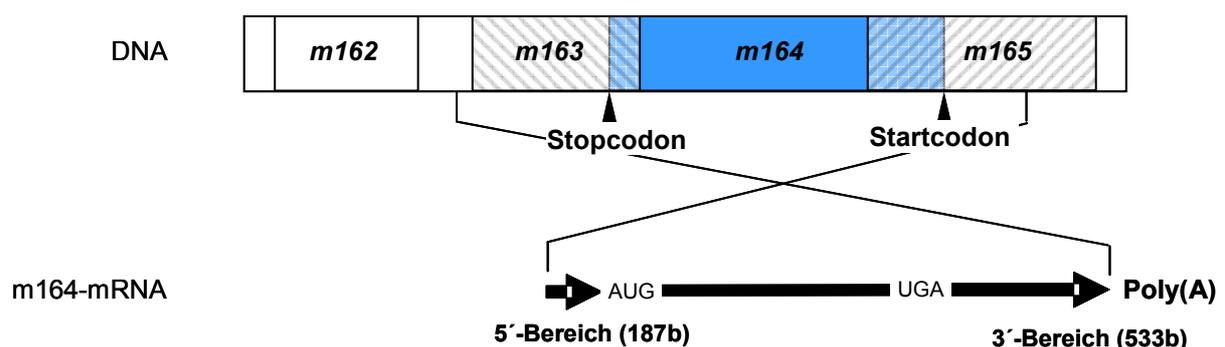


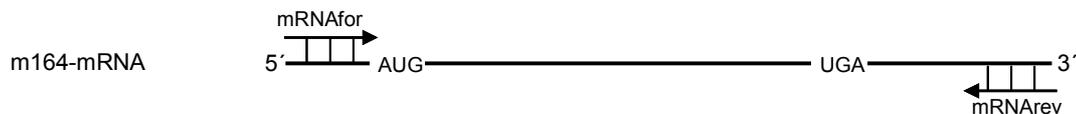
Abb. 14: Darstellung des *ORFm164* mit seinen zusätzlichen 5'- und 3'-Bereichen. Die schraffierten Bereiche zeigen die Überlappung von *ORFm164* mit *ORFm163* sowie *m165*. Die 5'- und 3'- Bereiche sind als Pfeile dargestellt, die in die angrenzenden ORFs hineinreichen.

Anmerkung:

Die *m164*-Sequenz mit einer Länge von 2004 Nukleotiden, wie sie in Abb. 14 dargestellt ist, wird im Folgenden RACEm164 genannt.

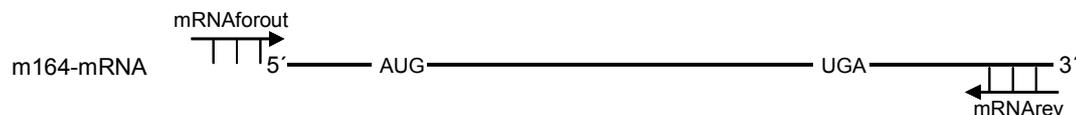
3.1.3 Überprüfung des 5'/3' RACE Ergebnisses

Das Ergebnis des 5'/3' RACE-Experiments sollte nun überprüft werden. Es musste gezeigt werden, ob die RACEm164-mRNA-Spezies tatsächlich im Gesamt-mRNA Pool der Zelle existiert. Dazu bot sich die RT-PCR an, da es mit dem Enzym Reverse Transkriptase möglich ist, mRNA als Template einzusetzen und in DNA umzuschreiben. Für die Verifizierung des 5'/3' RACE Ergebnisses wurden MEF mit WT-mCMV infiziert und 6 h p.i. wurde die Poly (A)⁺-mRNA aus diesen isoliert. Mit den RACEm164-mRNA flankierenden Primern mRNAfor und mRNArev wurde versucht, die gesamte RACEm164-mRNA zu amplifizieren:



Beim Einsetzen dieser Primer sollte ein RT-PCR-Produkt mit einer Größe von 2004bp entstehen, kleinere Produkte sind nicht möglich. Sollte das Produkt größer sein, wäre der 5'- und/oder der 3'- Bereich durch das RACE-Experiment unvollständig erfasst worden.

Als Kontrolle wurde eine RT-PCR mit einem außerhalb des 5'- Bereichs der RACEm164-mRNA liegenden Primers (mRNAforout) durchgeführt:



Bei dieser RT-PCR wurde kein Amplifikat erwartet, da anderenfalls eine m164-mRNA existiert, die einen längeren 5'-Bereich besitzt als den, der durch das RACE-Experiment ermittelt worden war.

Außerdem wurde eine normale PCR (ohne RT-Schritt) mit einer DNA-Polymerase und den mRNAfor/rev Primern durchgeführt, um eine mögliche Kontamination der Poly (A)⁺RNA mit DNA ausschließen zu können.

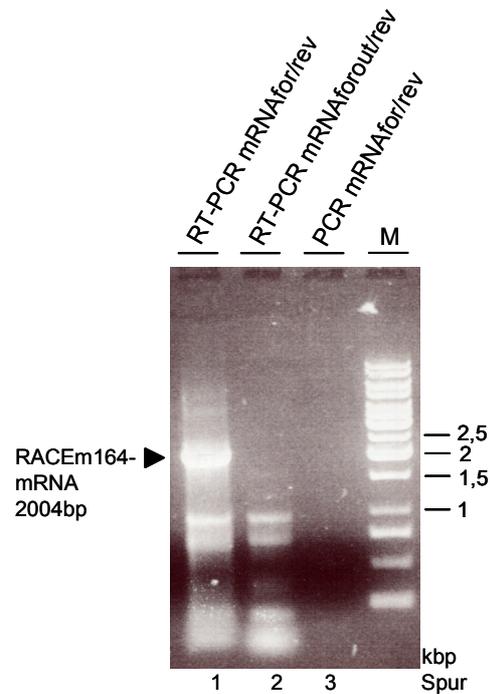


Abb. 15: Überprüfung des 5'/3' RACE Ergebnisses mit Hilfe der RT-PCR. Mit mRNA als Template aus mit WT-mCMV infizierten MEF wurde über RT-PCR die 2004 Nukleotide umfassende RACEm164-mRNA amplifiziert (Spur 1). Als Kontrolle wurde versucht, aus der MEF-mRNA mittels der Primer mRNArev und mRNAforout, welcher außerhalb der RACEm164-mRNA liegt, ein Produkt zu generieren (Spur 2). Eine DNA Kontamination der eingesetzten mRNA konnte mittels PCR ohne Reverse Transkriptase ausgeschlossen werden (Spur 3). Spur M: 1kbp Marker. Die Banden unterhalb von 1 kbp sind unspezifische Produkte, da sie unabhängig von den gewählten Primern entstehen.

Über RT-PCR war es möglich, die 2004 Nukleotide umfassende RACEm164-mRNA (Abb. 15) zu amplifizieren. Hingegen konnte keine spezifische Bande mit dem außerhalb des 5'-Bereichs der RACEm164-mRNA liegenden Primer mRNAforout erzeugt werden.

Schlussfolgerung:

Das Ergebnis des RACE-Experiments konnte verifiziert werden; im Gesamt-mRNA Pool von infizierten MEF existiert eine m164-mRNA-Spezies mit einer Länge von 2004 Nukleotiden. Das Vorhandensein einer längeren m164-mRNA wurde ausgeschlossen. Die Frage nach möglichen m164-mRNAs, die kürzer als 2004 Nukleotide sind, konnte mit diesem Experiment nicht beantwortet werden.

3.2 *In vitro* Transkription und Translation der ORF*m164*- und der RACEm164-Sequenz

Es stellte sich nun die Frage, ob der ORF*m164* nach Rawlinson für dasselbe Produkt wie die um 720 Nukleotide größere RACEm164-Sequenz kodiert. Kodieren beide für dasselbe Produkt, würde es sich bei den 5'- und 3'-Überhängen der RACEm164-mRNA um untranslatierte Bereiche (UTR) handeln.

Um dieser Frage nachzugehen, wurden zunächst in einer *in vitro* Transkription (siehe M&M 2.2.1.10) PCR Produkte, die zum einen ausschließlich den vorhergesagten ORF*m164* und alternativ die RACE*m164*-Sequenz enthielten, in RNA umgeschrieben. Um überhaupt eine Translation mit dem verwendeten Weizenkeimlysatz zu ermöglichen, musste den PCR-Fragmenten des ORF*m164* und des RACE*m164* am 5'-Ende eine SP6-Translations-Initiationssequenz (5'- ATT TAG GTG ACA CTA TAG AA-3') angehängt werden (Krieg & Melton, 1984):

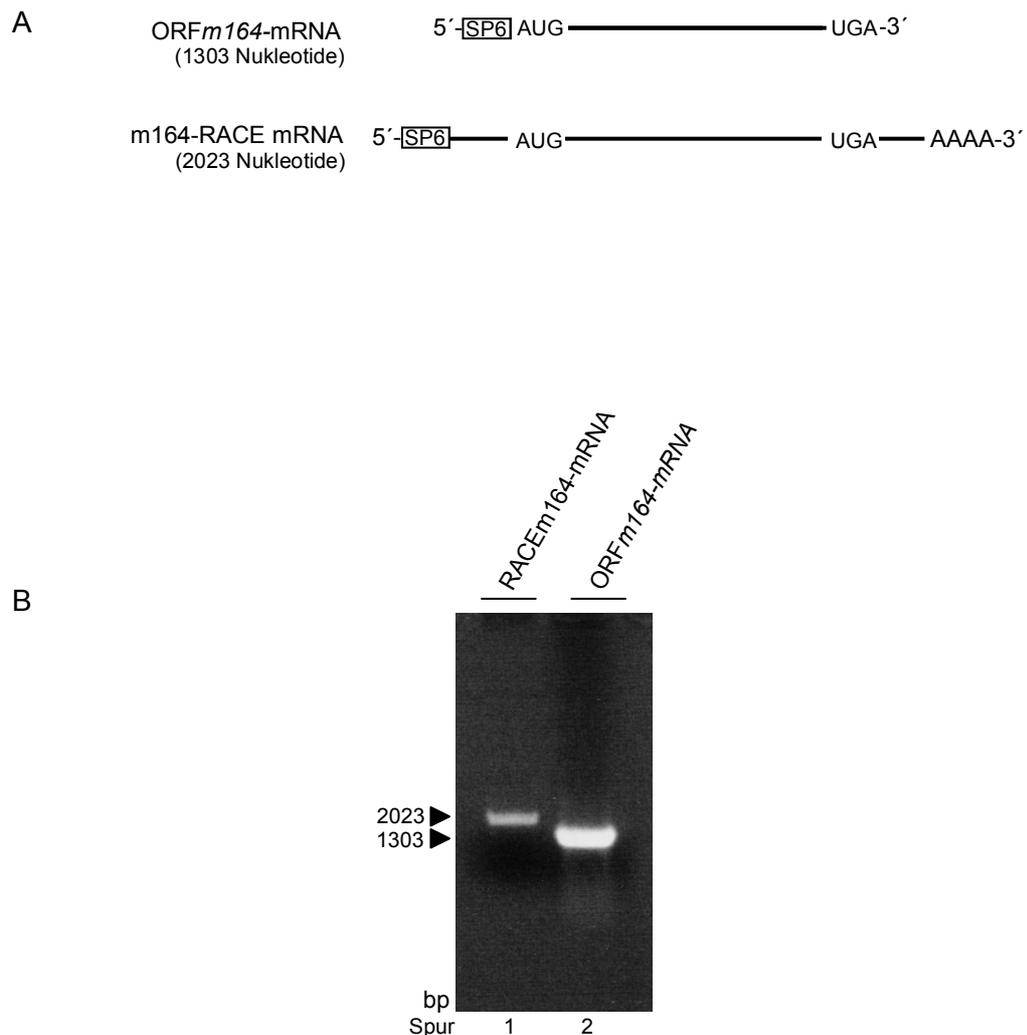


Abb. 16: Formaldehyd-Gel zur Kontrolle der *in vitro* transkribierten RNA. A: Schematische Darstellung der in der *in vitro* Transkription generierten RNA. Beide RNA-Konstrukte tragen eine SP6-Translations-Initiationssequenz. B: Gel-elektrophoretische Auftrennung der RNA. Spur 1: RACE*m164*-mRNA, Spur 2: ORF*m164*-mRNA.

In Abbildung 16 B sind die Produkte der *in vitro* Transkription nach Gel-elektrophoretischer Auftrennung dargestellt. Die beiden mRNA zeigen, wie erwartet, eine deutlich unterscheidbare Größe: Die transkribierte RACE*m164*-mRNA umfasst 2023 Nukleotide, die mRNA des ORF*m164* nach Rawlinson 1303 Nukleotide.

In der anschließenden *in vitro* Translation wurden die mRNA-Produkte der *in vitro* Transkription als Matrize eingesetzt und in Proteine umgeschrieben. Pro *in vitro* Translationsansatz wurden 80 ng RNA als *Template* eingesetzt. Zusätzlich wurde dem Weizenkeimlysat ein ³⁵S-Methionin Mix zugegeben, um entstehende Proteine radioaktiv zu markieren (siehe M&M 2.2.1.11).

Die mRNA des ORF*m164* beginnt mit einem Startcodon (n1) und endet mit einem Stopcodon (n1284). Hier würde man ein Produkt mit einer molekularen Masse von 46,6 kDa erwarten, was der errechneten molekularen Masse des ORF*m164* entspricht:

M¹FLRGCRRGRRRAATVSLAGCGEPELP **M**²⁷CRRRVACSHFDRGS
 RGGTRVGPGRGPRCVPTSSRRPRRRYRRRLPFCIPWTEEDRRS
 RRLFKAG **M**⁹¹LALIYAAASAAGTASASAVGSCVDGVLSDNCMNKI
 YPDQDKAAVICHVKPGSVKKFVGSWSFALPEGRDFQTTTIATFD
 AESFHIHVAGFTGMADALSMTTELWPPSGFSGLVVCDIDHVSQ
 AMCLIPPLLRWVPGEELLTIEPVVPDAAEPFGKDYCRTWGADA
 GPPRYSRIFWAVNNQAIVAAGEETLGTDFLWMSNRLEGFTVN
 ASDLALSFPIRS DLPVCVSCVVGSGGNLLSLPTIECRPVHVAR S
 STGSKSCDCQLERFLAAFVVM L C I T I V T I V V Y I Y L V S D V R P S L F P
 TFEIRYFTGGVPVNGVVSRNHQPWRAATNASSRVGRS ⁴²⁷ **Stop**

Abb. 17: Aminosäuresequenz des m164-Proteins (Rawlinson et al., 1996). Die Sequenz umfasst 427 Aminosäuren, putative Start-Methionine sind fett und unterstrichen dargestellt. Hochgestellt ist die Aminosäureposition.

Bei der RACE*m164*-mRNA sind durch die zusätzlichen Nukleotide im 5'-Bereich weitere Startcodons enthalten (nicht gezeigt), die als Translationinitiation genutzt werden könnten. Dadurch könnten Proteine mit einer größeren molekularen Masse als 46,6 kDa entstehen. Handelt es sich jedoch bei den zusätzlichen Bereichen am 3'- und 5'-Ende der RACE*m164*-mRNA um untranslatierte Bereiche (UTR), sollte das Produkt der *in vitro* Translation ebenfalls eine molekulare Masse von 46,6 kDa haben.

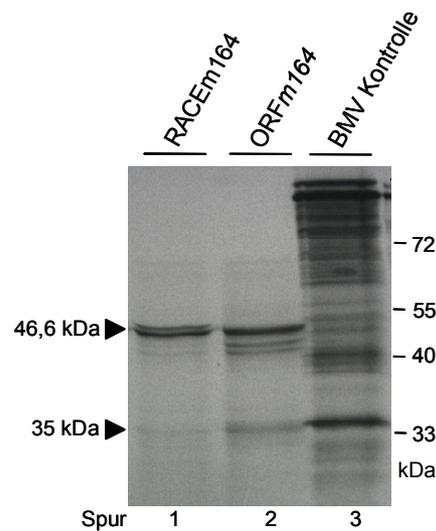


Abb. 18: Der Röntgenfilm zeigt die Produkte der *in vitro* Translation. Die mRNA mit der RACem164-Sequenz (Spur 1) und die ORFm164-mRNA (Spur 2) wurden als Template eingesetzt. Die translatierten Proteine zeigen eine Schwärzung des Röntgenfilms bei 35 kDa und 46,6 kDa. Als Assay-Kontrolle ist das translatierte Produkt der im Kit mitgelieferten BMV-RNA aufgetragen (Spur 3).

Sowohl das Produkt der *in vitro* Translationsreaktion mit RACem164-mRNA als auch mit ORFm164-mRNA als Template, zeigten nach ihrer elektrophoretischen Auftrennung mittels SDS-Gel ein identisches Bandenmuster auf dem Röntgenfilm.

Das erwartete m164-Protein mit der molekularen Masse von 46,6 kDa, translatiert aus der ORFm164-mRNA, konnte experimentell bestätigt werden. Die RACem164-mRNA kodiert ebenfalls für ein Protein mit einer molekularen Masse von 46,6 kDa. Zusätzlich wurde aus beiden mRNA ein 35 kDa großes m164-Protein translatiert. Allerdings zeigte dieses Protein eine schwächere Schwärzung des Röntgenfilms im Vergleich mit dem 46,6 kDa-Protein.

Schlussfolgerung:

Die Produkte der *in vitro* Translation waren unabhängig von der eingesetzten mRNA (RACem164 oder ORFm164) 35 kDa und 46,6 kDa groß. Die Konsequenz, die sich daraus ergab, war, dass es sich bei den 3'- und 5'-Überhängen der RACem164-mRNA um UTR handelt, die keine Sequenz-relevanten Informationen für das m164-Protein enthalten. Das Auftreten eines 35 kDa großen Proteins ist möglicherweise die Folge eines Spleißproduktes, das aus der ORFm164- und RACem164-mRNA hervorgegangen ist.

3.3 Northern Blot Analysen

3.3.1 Kinetik der m164-Genexpression unter Cycloheximid-Einfluss

Die Genexpression von m164 wurde bereits von Holtappels und Kollegen anhand einer auf ORFm164 basierendem RT-PCR untersucht. Die gewonnenen Ergebnisse ließen den

Schluss zu, dass es sich bei *m164* um ein E-Gen handeln könnte (Holtappels et al., 2002b). Um diese postulierte Aussage von Holtappels und Kollegen zu überprüfen, sollte die Expressionskinetik der *m164*-RNA ermittelt werden.

Zur Untersuchung der RNA-Kinetiken wurden Northern Blot Analysen durchgeführt. Mit dieser Methode sollte es auch möglich sein, Spleißvarianten einer RNA zu detektieren. Voraussetzung dafür ist, dass die gewählte Sonde mit einem Exonabschnitt hybridisiert, der in jeder Spleißvariante enthalten ist. Das Experiment sollte auch der Überprüfung der zuvor aufgestellten Hypothese, nach der es sich bei dem 35 kDa-Protein der *in vitro* Translation um das Produkt einer gespleißten *m164*-mRNA handelt (siehe Schlussfolgerung unter 3.2), dienen. Sollte die Hypothese zutreffen, würde man zwei RNA-Populationen mit der *m164*-Sonde nachweisen können: Zum einen die 2004bp große RACem164-mRNA und zum anderen eine kürzere *m164*-mRNA, die für das 35 kDa-Protein kodiert.

Die Detektion der mRNA im Northern Blot (siehe 2.2.2.25 in M&M) erfolgte nicht-radioaktiv. Die DNA-Sonden wurden zu diesem Zweck mit DIG-dUTP markiert. Zunächst wurde der Erfolg des DIG-dUTP Einbaus in die Sonden mit Hilfe eines Agarose-Gels überprüft (siehe Abb. 19 A). Durch den DIG-dUTP Einbau in das PCR-Amplifikat verändert sich das Laufverhalten des PCR-Produkts; es ist im Vergleich zum unmarkierten Amplifikat größer und läuft deshalb während der Gel-elektrophoretischen Auftrennung mit verminderter Geschwindigkeit.

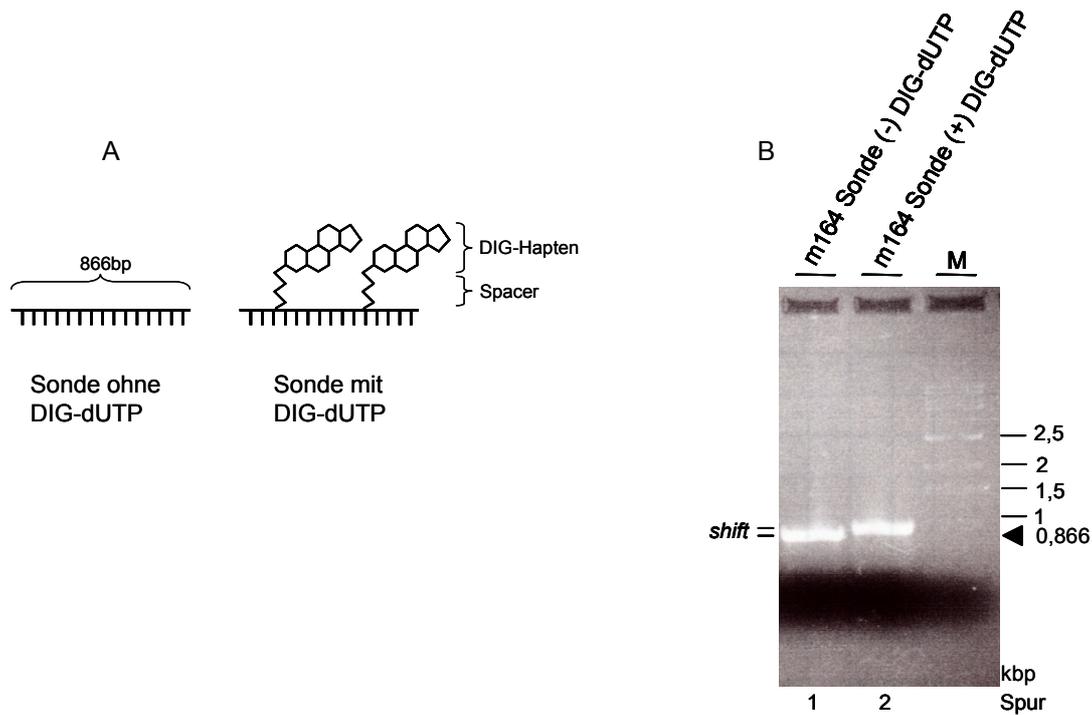


Abb. 19: Kontrollgel zur Überprüfung des Einbaus von DIG-dUTP in das PCR-Produkt. A: Schematische Darstellung der Sonde ohne und mit DIG-dUTP. Das zusätzliche DIG-Hapten vermindert die Laufgeschwindigkeit im Gel gegenüber einer identischen Sonde ohne DIG-dUTP. B: Spur 1 zeigt das PCR-Produkt ohne DIG-dUTP, Spur 2 mit DIG-dUTP. Der erfolgreiche Einbau des DIG-dUTP in die m164-Sonde zeigt sich an der verminderten Laufgeschwindigkeit gegenüber einem normalen PCR-Produkt ohne DIG-dUTP.

Die verwendeten Primer für die Herstellung der m164-Sonde liegen innerhalb des ORF $m164$; sie umfassen den Bereich n370 bis n1236:

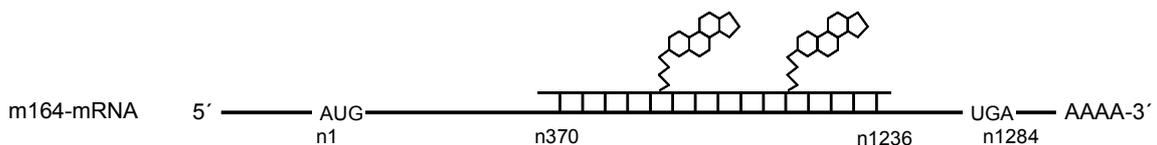


Abb. 20: Position der m164-Sonde auf der RACEm164-mRNA. Schematisch ist die m164-RNA dargestellt, mit der die m164-Sonde hybridisiert. Die Sonde hat eine Größe von 866b.

Um auch die RNA der viralen Gene *ie1* (IE-Phase Produkt), *m04* (E-Phase Produkt) und die RNA des zellulären Enzyms Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) im Northern Blot detektieren zu können, wurde wie unter 2.2.2.25 beschrieben jeweils eine Sonde gegen die genannten Gene generiert.

Zur Beantwortung der Frage, ob es sich bei m164 tatsächlich um ein E-Gen und nicht um ein IE-Gen handelt, musste zwischen der Genexpression der IE-Gene und der der E-Gene unterschieden werden. Mit Cycloheximid (CHX) ist es möglich, die Expression von Genen der IE- und E-Phase zu trennen.

CHX ist ein Translationshemmer bei Eukaryonten, der die Bindung von Aminoacyl-tRNA an Ribosomen inhibiert. Durch die Hemmung der Translation mit CHX zu Beginn der Infektion können keine neuen Proteine und somit keine viralen Transkriptionsfaktoren translatiert werden.

Gene der IE-Phase der mCMV-Infektion werden unabhängig von viralen Transkriptionsfaktoren transkribiert, weshalb die IE-RNAs auch unter Einfluss von CHX detektierbar sind. Gene der E-Phase hingegen sind auf neu synthetisierte virale Transkriptionsfaktoren angewiesen und werden unter CHX Einfluss nicht exprimiert.

Um die E-Genexpression zu unterbinden, wurden mit WT-mCMV infizierte MEF 1 h vor Infektion mit CHX behandelt. Kontrollzellen erhielten kein CHX. Die Gesamt-RNA wurde nach den entsprechenden Zeitpunkten, wie unter 2.2.2.21 beschrieben, isoliert. Der Einsatz von Poly (A⁺)-RNA zeigte dasselbe Ergebnis wie der Einsatz von Gesamt-RNA.

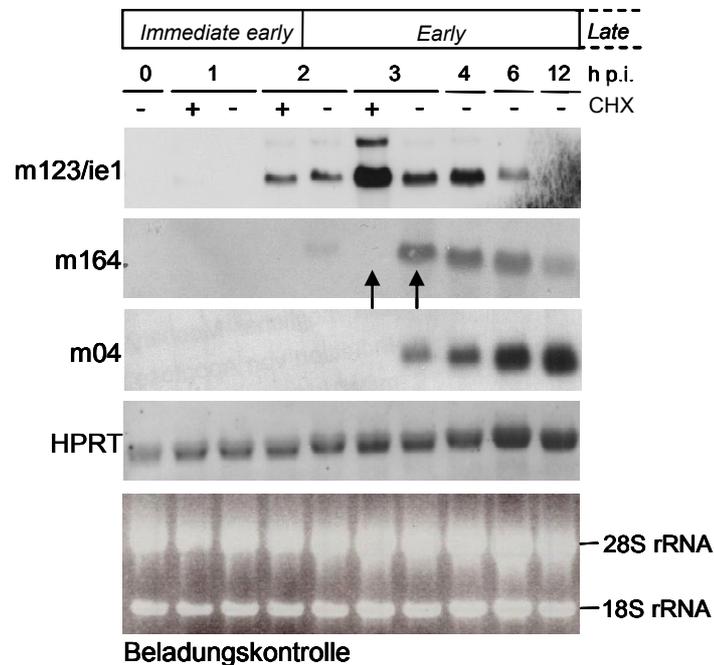


Abb. 21: Northern Blot zur Detektion der *ie1*-, *m164*-, *m04*- und *HPRT*-mRNA. MEF wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach einer Infektion mit WT-mCMV geerntet. Zellen, die 1, 2 und 3 h p.i. geerntet wurden, erhielten 1 h vor Infektion Cycloheximid (+ CHX). Die beiden Pfeile verdeutlichen, dass *m164* CHX-sensitiv ist.

Das *ie1*-Gen wird in der IE-Phase der mCMV-Infektion transkribiert, wobei dies unabhängig von viralen Transkriptionsfaktoren geschieht. Deshalb ist die *ie1*-mRNA 2 h p.i. auch unter Einfluss von CHX detektierbar. Das *m04*-Gen hingegen wird 3 h p.i. in der E-Phase der viralen Infektion transkribiert. Das *m04*-Gen ist auf Transkriptionsfaktoren, die in einer früheren Phase der viralen Infektion exprimiert werden, angewiesen und kann deshalb unter CHX Einfluss nicht transkribiert werden.

Die *m164*-mRNA ist ab 2 h p.i. detektierbar. Unter dem Einfluss von CHX ist jedoch selbst 3 h p.i. keine *m164*-mRNA nachzuweisen (siehe Abb. 21, Pfeil). Demzufolge scheint die

Transkription des *m164*-Gens auf virale Transkriptionsfaktoren angewiesen zu sein. Damit ist es ein echtes Produkt der E-Phase der viralen Genexpression.

Auf dem Northern Blot der Abb. 21 ist bei *m164* nur eine Bande zu sehen. Die *m164*-spezifische Sonde detektiert demnach nur eine *m164*-RNA. Diese hat zu unterschiedlichen Zeitpunkten der viralen Infektion eine konstante Größe.

Die Transkription des zellulären Gens *HPRT* bleibt bei einer viralen Infektion unbeeinflusst, da bestehende zelluläre Transkriptionsfaktoren auch in Gegenwart von CHX die *HPRT* Transkription sicherstellen können.

Schlussfolgerung:

Durch das Arretieren des viralen Replikationszyklus mit CHX konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem *m164*-Gen um ein E-Phase Gen handelt, dessen Transkription 2 h p.i. beginnt. Die Hypothese, nach der es eine Spleißvariante neben der *RACEm164*-mRNA gibt, konnte nicht bestätigt werden.

3.3.2 Kinetik der *m164*-Genexpression unter Phosphonoessigsäure- und ActinomycinD-Einfluss

Mithilfe des Northern Blots (Abb. 21) wurde das *m164*-Gen bereits als E-Phase Gen charakterisiert. Um zu testen, ob *m164* auch in der L-Phase exprimiert wird, wurden weitere Northern Blot Analysen durchgeführt.

Dazu wurde mit WT-mCMV infizierten MEF 12 h p.i. Phosphonoessigsäure (PAA) zugesetzt. PAA hemmt die virale DNA-Polymerase und damit die virale DNA-Replikation. Da echte L-Phase Gene erst nach dem Start der DNA-Replikation exprimiert werden, würde das Northern Blot Signal dieser Gene nach PAA Behandlung abnehmen. Bei nicht PAA behandelten, WT-mCMV infizierten Zellen hingegen wäre eine deutliche Steigerung der Expression echter L-Phase Gene nach Beginn der DNA-Replikation zu erwarten. Wäre *m164* ein typisches E-Phase Gen, so dürfte die *m164*-RNA-Menge unter PAA Einfluss weder abnehmen noch sollte eine Steigerung der *m164*-RNA Expression ohne PAA zu erwarten sein. Da sich die Einteilung der Phasenzugehörigkeit mit dem Beginn der Genexpression definiert, bleibt ein E-Gen ein E-Gen, auch wenn es in der L-Phase transkribiert wird.

In einem anderen Ansatz wurde mit WT-mCMV-infizierten MEF 12 h p.i. ActinomycinD (ActD) zugesetzt. ActD hemmt die RNA-Synthese, indem es zwischen die Basenpaare der DNA interkaliert. Die RNA-Menge eines echten L-Gens würde unter ActD Einfluss im Vergleich zu unbehandelten Zellen abnehmen, da die Transkription der L-Gene frühestens

12 h p.i. startet. Für m164 würde man unter ActD Einfluss eine konstante RNA-Menge im Vergleich zu unbehandelten Zellen erwarten.

Die Detektion der m164-mRNA aus infizierten MEF nach Behandlung mit PAA und ActD ist im folgenden Northern Blot dargestellt.

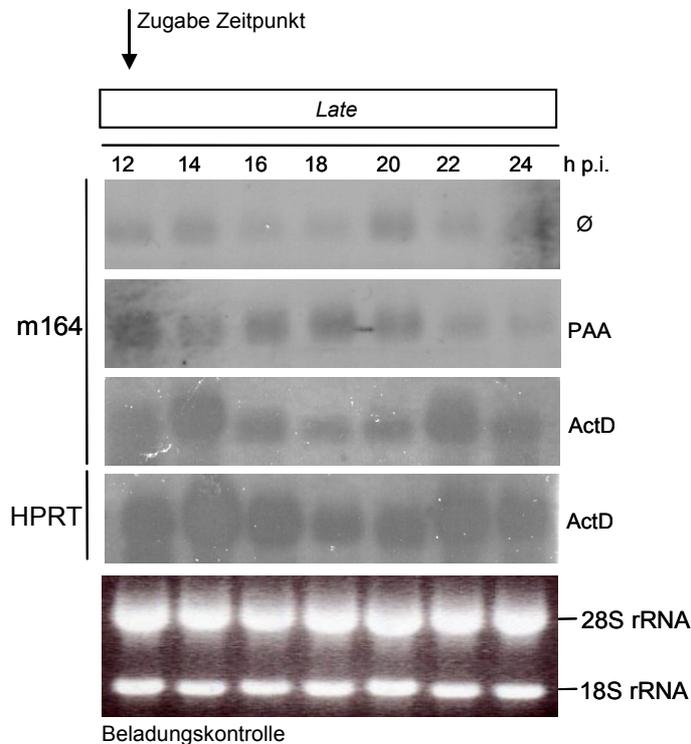


Abb. 22: Northern Blot Analyse zur Überprüfung, ob das *m164*-Gen in der L-Phase der viralen Infektion transkribiert wird. Dazu wurde den mit WT-mCMV infizierten MEF 12 h p.i. Phosphonoessigsäure (PAA) oder ActinomycinD (ActD) zugesetzt. MEF wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach einer Infektion geerntet.

Die m164-RNA konnte wie erwartet sowohl unter PAA Einfluss als auch unter ActD Einfluss von 12 h bis 24 h p.i. in relativ konstanter Menge nachgewiesen werden. Auch ohne PAA und ActD blieb die m164-mRNA Menge unverändert. Die Menge der RNA des zellulären *HPRT*-Gens war unter ActD Einfluss über den untersuchten Zeitraum konstant.

Schlussfolgerung:

Es konnte bestätigt werden, dass es sich bei m164 um ein echtes E-Phase Gen handelt. Weiter konnte gezeigt werden, dass die in der E-Phase gebildete RNA bis 24 h p.i. nachweisbar bleibt.

3.4 Expressionskinetik des m164-Proteins

In der *in vitro* Transkription mit anschließender *in vitro* Translation konnten zwei Expressionsprodukte der m164-RNA detektiert werden. Nun sollte überprüft werden, wann und mit welcher Größe das m164-Protein während der Infektion auftritt. Um diese Fragestellung zu klären, wurde mittels BAC-Technologie (C. Simon, Doktorarbeit, 2006) ein rekombinantes mCMV hergestellt, das ein HA-markiertes m164-Protein exprimiert (m164HA3'). Die BAC-Technologie ermöglicht es, an sehr großen *Inserts*, wie etwa dem mCMV Genom, Mutationen vorzunehmen, um schließlich ein vollständiges, rekombinantes mCMV zu erhalten. In diesem Falle wurde an das 3'-Ende des ORF $m164$ ein HA-Tag inseriert:

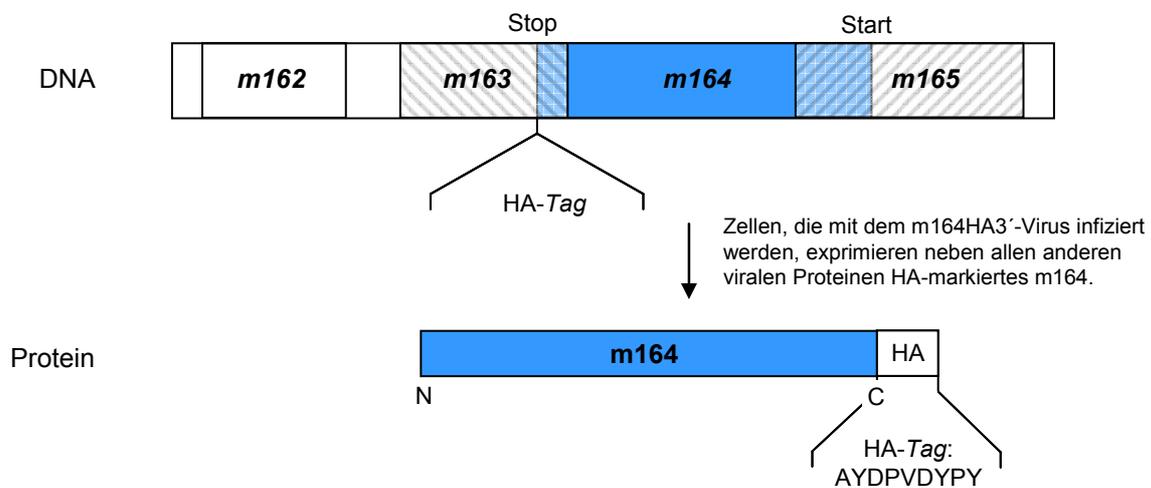


Abb. 23: Ausschnitt aus dem m164HA3'-BAC Genom. Gezeigt sind die ORFs der Gene *m162* bis *m165*. Direkt vor dem Stopcodon von *m164* wurde der HA-Tag eingefügt. Zellen, die mit diesem rekombinanten Virus infiziert werden, exprimieren m164-Protein mit einem C-terminalen HA-Tag.

Zur Ermittlung der m164-Expressionskinetik wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Dazu wurden MEF und NIH 3T3-Zellen mit dem rekombinanten m164HA3'-mCMV infiziert und Gesamtproteinlysate aus den infizierten Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten isoliert. Durch die Verwendung eines α -HA Antikörpers war es möglich, das HA-markierte m164-Protein im Western Blot nachzuweisen.

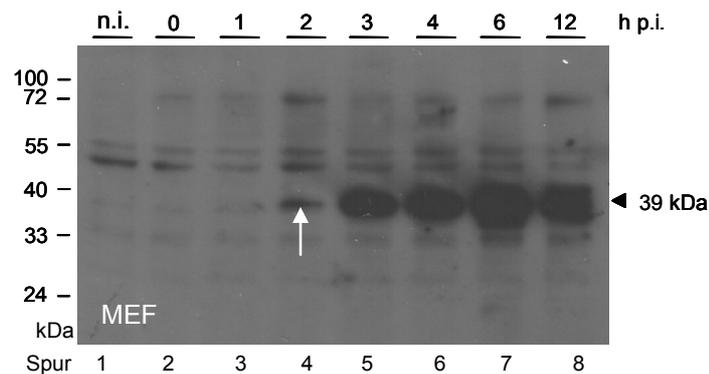


Abb. 24: Western Blot, der die Expression des HA-markierten m164-Proteins im Verlauf der Infektion zeigt. Die Detektion des m164-Proteins erfolgte mittels α -HA Antikörper als Primärantikörper. MEF wurden mit m164HA3'-mCMV infiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Gesamtproteinisolierungen durchgeführt. Pro Spur sind 30 μ g Gesamtprotein aufgetragen.

In den Zellen steigt die Expression eines durch den α -HA Antikörper erkannten 39 kDa großen Proteins mit der Zeit an (Abb. 24). Die Expression des 39 kDa großen Proteins beginnt 2 h p.i. in MEF und steigt bis etwa 6 h p.i. weiter an. Im Gesamtproteinlysate 12 h p.i. (Spur 8) ist etwa gleich viel 39 kDa-Protein enthalten wie in dem 6 h p.i.. Der α -HA Antikörper erkennt im Western Blot bei nicht infizierten MEF (siehe Abb. 24, Spur 1) kein Protein mit einer apparenten molekularen Masse von 39 kDa.

Schlussfolgerung:

In m164HA3'-mCMV infizierten MEF konnte ein spezifisches Signal des HA-markierten m164-Proteins mit dem α -HA Antikörper nachgewiesen werden. Das m164-Protein hat eine apparente molekulare Masse von 39 kDa, seine Expression beginnt 2 h p.i. und steigt im Verlauf der Kinetik an.

3.5 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung zur Verifizierung der m164-Expression

Um den Beginn der Expression des 39 kDa großen m164-Proteins nach Infektion zu bestätigen, wurden indirekte Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt.

Dazu wurden MEF mit dem rekombinanten m164HA3'-mCMV infiziert (0,2 PFU/Zelle, Zentrifugalinfection), zu verschiedenen Zeitpunkten fixiert und schließlich mit dem α -HA Antikörper als Primärantikörper markiert. Das exprimierte m164-Protein sollte einen HA-Tag tragen und deshalb mit dem α -HA Antikörper detektierbar sein. Aufgrund der Western Blot Ergebnisse wäre eine spezifische m164-HA Färbung etwa 2 h p.i. zu erwarten gewesen.

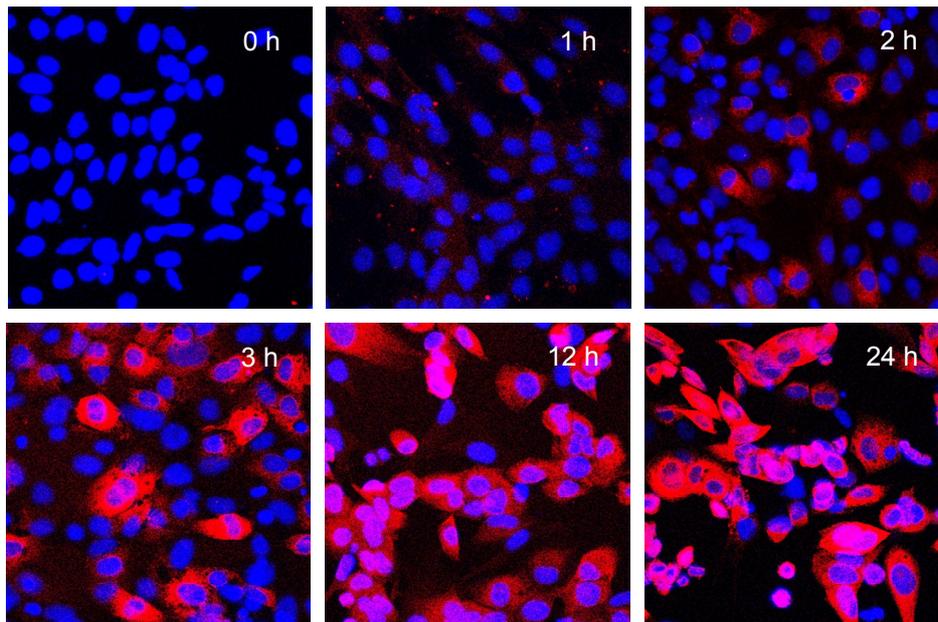


Abb. 25: Nachweis von HA-markiertem Protein mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung. MEF wurden mit m164HA3'-mCMV infiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten fixiert. Die Detektion von HA-markiertem m164 in den fixierten Zellen erfolgte mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung. Dazu wurde der α -HA Antikörper verwendet, der von dem Alexa Fluor 546 konjugierten Sekundärantikörper erkannt wurde. Die rote Alexa Fluor Fluoreszenz wurde mittels konfokalem Laser Scanning Mikroskop detektiert. Dazu wurde das Fluorophor mit einem Argonlaser bei einer Wellenlänge von 546 nm angeregt. Die DNA des Zellkerns ist mit DAPI blau gefärbt.

Wie in Abb. 25 zu sehen ist, erkennt der α -HA Antikörper spezifisch das HA-markierte m164 Protein nach etwa 2 h p. i. in einzelnen Zellen. Im weiteren Infektionsverlauf exprimieren nahezu alle Zellen das HA-markierte m164-Protein. Für den 0 h Wert wurden die Zellen infiziert und im Anschluss daran fixiert. Deshalb beträgt bei dem 0 h Wert die Virion-Protein Menge 0,2 PFU/Zelle. Als Kontrolle wurden nicht infizierte Zellen ebenfalls mit α -HA Antikörper inkubiert. In diesen Zellen konnte kein HA-Signal detektiert werden (nicht gezeigt).

Schlussfolgerung:

MEF, die mit dem rekombinanten m164HA3'-mCMV infiziert wurden, exprimierten HA-markiertes m164. Das m164-Protein kann bereits 2 h p.i. sichtbar gemacht werden; die Stärke des Signals, die der Menge an Protein entspricht, steigt mit der Zeit an. Das detektierte m164-Protein ist allem Anschein nach im Zytoplasma lokalisiert.

3.6 Western Blot Analysen unter Verwendung des α -m164 Antikörpers

3.6.1 Überprüfung des α -m164 Antikörpers

Um Untersuchungen am m164-Wildtypprotein durchführen zu können, musste ein m164-spezifischer Antikörper generiert werden. Mit diesem Antikörper sollte es möglich sein, nicht markiertes m164-Protein mittels Western Blot Analysen und indirekter Immunfluoreszenzfärbungen zu detektieren. Darüber hinaus könnte dieser Antikörper für die Anreicherung von m164 mittels Immunpräzipitation und Affinitätsreinigungen eingesetzt werden. Aufgrund der vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten eines α -m164 Antikörpers sollten zwei Peptidantikörper hergestellt werden. Die Immunisierung von jeweils zwei Kaninchen erfolgte einmal mit dem Peptid MFLRGCRRGRRRAATVSLAGCGELPMC des N-terminalen Endes (Pep-N) und einmal mit dem Peptid CGVVSРНHQPWRAATNASSRVGRSS des C-terminalen Endes (Pep-C) von m164, durchgeführt von Dr. Dennis Strand. Die Isolierung der Antikörper aus dem gewonnenen Serum erfolgte über Affinitätschromatographie (siehe 2.2.1.14 unter M&M).

Die Überprüfung der gewonnenen Peptidantikörper hinsichtlich der Erkennung des gesamten m164-Proteins erfolgte mittels Western Blot Analyse. Dazu wurden MEF mit m164HA3'-mCMV infiziert und 6 h p. i. wurde ein Gesamtproteinlysate hergestellt. Da das Gesamtproteinlysate u.a. m164 enthielt, und somit die antigenen Epitope der Peptidantikörper, sollte sowohl Pep-N als auch Pep-C m164 in der Western Blot Analyse detektieren.

Neben den Gesamtproteinlysaten aus MEF wurde auch Gesamtproteinlysate aus transfizierten COS-7-Zellen eingesetzt. Die COS-7-Zellen waren mit dem Expressionsplasmid m164HA-C transformiert worden, welches den gesamten ORF *m164* mit zusätzlichem C-terminalen HA-Tag kodiert:



Abb. 26: Fusionsprotein m164HA-C. Schematische Darstellung des m164HA-C Proteins, das aus dem gleichnamigen Expressionsplasmid nach Transfektion von COS-7-Zellen exprimiert wird. Der ORF *m164* wurde in das Expressionsplasmid pcDNA3.1/myc-His (siehe M&M 2.2.2.2) kloniert. Zusätzlich wurde dem ORF *m164* C-terminal ein HA-Tag angehängt, dessen Sequenz mit einem Stopcodon endet. Die Expression des Vektor-kodierten myc- und His-Tags wurde somit verhindert.

Da das Expressionsplasmid m164HA-C (Abb. 26), wie das m164HA3'-mCMV auch, einen HA-Tag trägt, sollten die detektierten m164-Proteine, unabhängig davon, ob α -m164 oder α -HA Antikörper in der Western Blot Analyse verwendet werden, auf der gleichen Höhe im Western Blot nachweisbar sein.

Anmerkung:

Gesamtproteinlysate aus mit m164HA-C transfizierten COS-7-Zellen wird in Western Blot Analysen als Größenkontrolle eingesetzt, da es HA-markiertes m164 enthält, was bei einer apparenten molekularen Masse von 39 kDa detektiert wird.

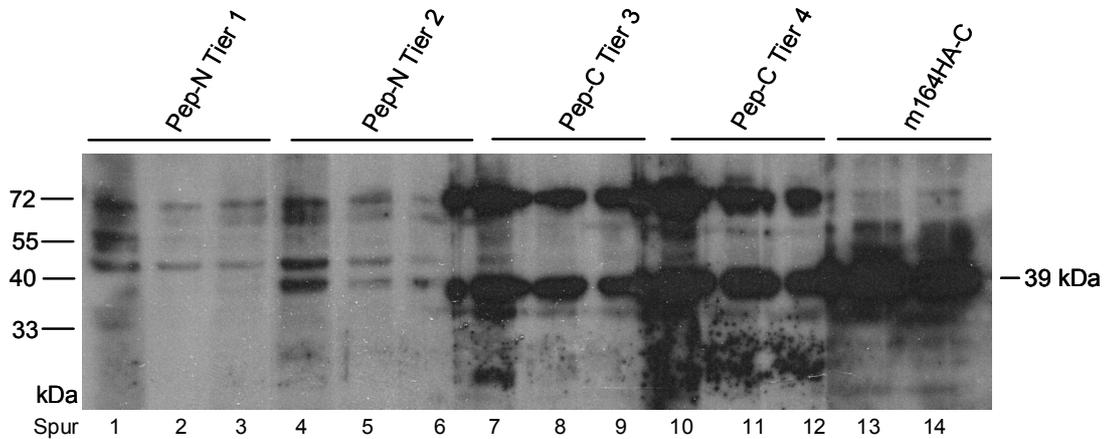


Abb. 27: Western Blot Analyse zur Überprüfung der Peptidantikörper. Bis Spur 12 sind 30 µg Gesamtproteinlysate aus mit m164HA3'-mCMV infizierten MEF aufgetragen. Die Gesamtproteinlysate wurden 6 h p.i. isoliert. Die Proteine der Gesamtproteinlysate wurden in einem SDS-Polyacrylamidgel (12,5%) aufgetrennt und auf PVDF-Membran geblottet. Das HA-markierte m164-Protein wurde mit Pep-N Antikörper (Spur 1-3 aus Tier 1, Spur 4-6 aus Tier 2), Pep-C Antikörper (Spur 7-9 aus Tier 3, Spur 10-12 aus Tier 4) und dem α-HA Antikörper (Spur 13, 14) nach ECL Entwicklung nachgewiesen. In Spur 13 und 14 sind je 30 µg Gesamtproteinlysate aus transfizierten COS-7-Zellen, die das m164HA-C Protein exprimieren, aufgetragen.

Wie in Spur 13 und 14 des Western Blots in Abb. 27 zu sehen ist, detektierte der α-HA Antikörper HA-markiertes m164-Protein wie erwartet bei einer molekularen Masse von 39 kDa (siehe 3.4, Abb. 24). Der Pep-C Antikörper (Spur 7-12) detektiert erwartungsgemäß ein Protein, das ebenfalls bei einer apparenten molekularen Masse von 39 kDa ein spezifisches Signal erzeugt. Dieses Protein erscheint exakt auf der gleichen Höhe wie das m164-Protein aus den transfizierten COS-7-Zellen. Neben der 39 kDa Bande erkennt der Pep-C Antikörper ein unbekanntes Protein mit einer molekularen Masse von etwa 72 kDa. Das m164-Protein mit der molekularen Masse von 39 kDa wurde durch den Pep-N Antikörper nicht erkannt. Die in Spur 1-6 sichtbaren Banden konnten keinem Protein zugeordnet werden.

Schlussfolgerung:

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass nur der Pep-C Antikörper das 39 kDa große m164-Protein erkennt und bindet, hingegen bindet der Pep-N Antikörper sein Epitop nicht. Im Folgenden findet daher nur der Pep-C Antikörper Verwendung.

Anmerkung:

Der Pep-C Antikörper wird im Folgenden als α-m164 Antikörper bezeichnet.

3.6.2 Überprüfung der Expressionskinetik von m164 mit Hilfe des α -m164 Antikörpers

Zur Überprüfung der in Abschnitt 3.4 gemachten Aussage, wonach die Expression des m164-Proteins im Laufe der Infektion von MEF mit m164HA3'-mCMV ansteigt, wurden Western Blot Analysen mit dem neuen α -m164 Antikörper durchgeführt. Da der α -m164 Antikörper dasselbe Protein erkennt wie der α -HA Antikörper wäre dieselbe Kinetik, d. h. ein Anstieg der Proteinmenge über die Zeit nach Infektion von MEF zu erwarten gewesen. Für das Experiment wurden MEF mit m164HA3'-mCMV infiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion eine Gesamtproteinisolierung durchgeführt. Zur Überprüfung, ob auch andere Zelltypen für die Expression von m164 geeignet sind, wurden parallel NIH 3T3-Zellen infiziert.

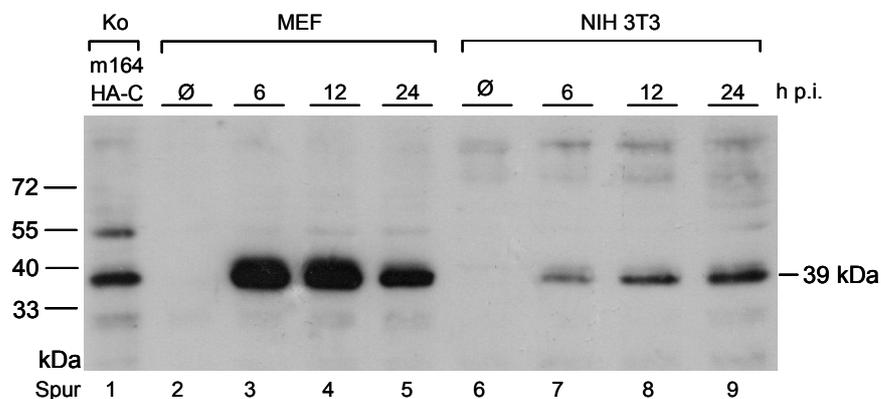


Abb. 28: Expressionskinetik von m164. Der Western Blot wurde mit Gesamtproteinlysate aus m164HA3'-mCMV infizierten MEF (Spur 2-5) und NIH 3T3-Zellen (Spur 6-9) durchgeführt. Das Gesamtproteinlysate wurde zu verschiedenen Zeitpunkten isoliert (6, 12, 24 h p.i.). Als Größenkontrolle ist in Spur 1 30 μ g Gesamtprotein aus m164HA-C exprimierenden COS-7-Zellen aufgetragen. Die Proteine der Gesamtproteinlysate wurden in einem SDS-Polyacrylamidgel (12,5%) aufgetrennt, auf PVDF-Membran geblottet und das HA-markierte m164-Protein wurde mit dem α -HA Antikörper nach ECL Entwicklung nachgewiesen.

Der Western Blot in Abb. 28 zeigt eine Zunahme der Bandenintensität bis 6 h p.i. mit Gesamtproteinlysate aus infizierten MEF (Spur 3). Die Menge an m164 Protein ist 6 h p.i. und 12 h p.i. in etwa gleich (Spur 3 und 4). Hingegen nimmt die Menge an exprimiertem m164-Protein in NIH 3T3-Zellen bis 24 h p.i. zu (Spur 7 – 9).

Ab 12 h p.i. scheint in infizierten MEF der m164-Anteil abzunehmen. Wie erwartet zeigen die Kinetiken aus den Western Blots der Abb. 24 und 28 (Spur 2-5) ähnliche Ergebnisse. In beiden Western Blots wird m164-Protein bei 39 kDa detektiert, obwohl zwei verschiedene (α -HA und α -m164 Antikörper) Antikörper zur Detektion eingesetzt wurden. Das aus transfizierten COS-7-Zellen isolierte Gesamtprotein ist in Abb. 28 in Spur 1 aufgetragen (Größenkontrolle).

Schlussfolgerung:

Auch unter Verwendung des α -m164 Antikörpers kann eine Zunahme der m164-Proteinmenge in infizierten MEF bis 6 h p.i. detektiert werden. Sowohl der α -m164 als auch der α -HA Antikörper erkennen m164-Protein aus m164HA3'-mCMV infizierten MEF mit einer apparenten molekularen Masse von 39 kDa. Aufgrund der schwächeren Expression von m164-Protein in infizierten NIH 3T3-Zellen werden in den folgenden Experimenten nur MEF verwendet.

3.6.3 Überprüfung des m164HA3'-Virions hinsichtlich m164

In der mCMV-Proteom Analyse (siehe Einleitung unter Abschnitt 1.6) konnten neben zahlreichen zellulären Proteinen auch 58 virale Proteine nachgewiesen werden, allerdings kein m164-Protein (Kattenhorn et al., 2004). Die dabei angewandte Methode des tryptischen Verdau der Virionen in Lösung (*tryptical digestion in-solution*) und anschließender Analyse durch LS-MS/MS ist wesentlich sensitiver als die bisherige konventionelle Methode der MS-Analyse nach einem im Gel-Verdau der zuvor über SDS-Gel separierten Proteine (*in-gel digestion*). Aktuell wird noch diskutiert, ob alle detektierten Proteine auch tatsächlich zum Virion gehören oder durch die Virion-Reinigung in die Proben gelangt sind.

Um die von Kattenhorn et al. (2004) gemachte Aussage zu überprüfen, nach der kein m164-Protein im Virion enthalten ist, wurde gereinigtes m164HA3'-mCMV in abnehmender Konzentration in einem Western Blot mit dem α -m164 Antikörper auf die Anwesenheit von m164-Protein getestet. Aufgrund der geringeren Sensitivität der Western Blot Analyse im Vergleich zur LC-MS Analyse ist es unwahrscheinlich, m164 im Virion zu finden.

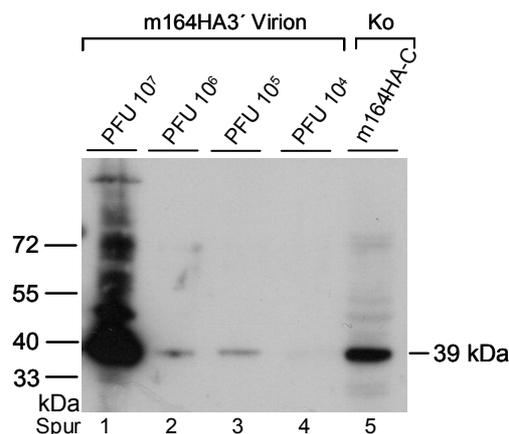


Abb. 29: Im gereinigten m164HA3'-mCMV ist m164 detektierbar. Der Western Blot wurde mit gereinigtem Virus durchgeführt. Als Größenkontrolle ist in Spur 5 30 μ g Gesamtprotein aus m164HA3-C exprimierenden COS-7-Zellen aufgetragen. Die Proteine des gereinigten m164HA3'-mCMV wurden in Konzentrationen von 10⁷, 10⁶, 10⁵ und 10⁴ PFU-Äquivalenten in einem SDS-Polyacrylamidgel (12,5%) aufgetrennt und auf PVDF-Membran geblottet. Das HA-markierte m164-Protein wurde mit dem α -HA Antikörper nach ECL Entwicklung nachgewiesen.

Entgegen der von Kattenhorn et al. (2004) gemachten Aussage, im Virion sei kein m164-Protein vorhanden, ist im Western Blot der Abb. 29 in den Spuren 1 - 3 eine deutliche Bande bei 39 kDa sichtbar. Die m164-Größenkontrolle in Spur 5 zeigt das m164-Protein, welches auf der gleichen Höhe läuft wie die mit dem α -m164 Antikörper detektierten Banden der Virionlysate. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass eine enorm große Menge an Viruspartikeln in den Western Blot Analysen eingesetzt wurde (Spur 1: 10^7 PFU). Auch führt die Methode der Virusreinigung nicht zu 100% reinen Virionen, die isolierte Virion-Lösung enthält immer noch Teile infizierter Zellen. Neben Virionen wurde demnach auch eine große Zahl von Zelltrümmern in den Western Blot Analysen eingesetzt.

Schlussfolgerung:

Im gereinigten m164HA3'-mCMV konnte m164-Protein nachgewiesen werden. Dass m164-Protein tatsächlich im Virion enthalten ist, ist aber sehr unwahrscheinlich. Dann hätten Kattenhorn et al. (2004) mit der sensitiveren Proteom-Analyse Methode auch m164-Protein nachweisen müssen. Es ist von der Methode der Virusreinigung abhängig, wie rein die Virionen schließlich vorliegen. Das gereinigte m164HA3'-mCMV enthält Bestandteile infizierter Zellen, die noch m164-Protein enthalten.

3.7 Pulse-Chase zur Ermittlung der m164 Stabilität in der Zelle

Dass die m164-Proteinmenge im Laufe einer Infektion ansteigt (bis 6 h p.i.), haben die Western Blot Analysen in Abb. 24 und Abb. 28 mit infizierten MEF unter Verwendung des α -HA wie auch des α -m164 Antikörpers gezeigt. Diese Zunahme der m164-Proteinmenge im Laufe der Infektion kann durch eine Hochregulation der m164-Expression oder durch eine lange Halbwertszeit des m164-Proteins erfolgen. Mithilfe eines *Pulse-Chase* Experiments sollte die m164-Protein Stabilität in der Zelle überprüft werden. Zu diesem Zweck wurden MEF mit m164HA3'-mCMV infiziert und in Minimalmedium (ohne Met/Cys/Ser) inkubiert. Zum Zeitpunkt 2½ h p.i. wurde 250 μ Ci 35 S markierter Met/Cys/Ser-Mix zugesetzt. Dies diente dem Einbau radioaktiv markierter Aminosäuren in neu synthetisiertes Protein. Der radioaktiv markierte Aminosäure-Mix wurde 3 h später (5½ h p.i.) durch Normalmedium ersetzt. Die Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet und daraus Gesamtproteinlysate hergestellt. Die Normierung der gewonnenen Proteinlysate erfolgte mit Hilfe eines Scintillationszählers, um in allen Proteinlysaten die gleiche Menge an radioaktiv markiertem Protein zu haben. Schließlich wurde eine Immunpräzipitation unter Verwendung des α -HA Antikörpers durchgeführt. Die Proteine wurden über Gelelektrophorese separiert, getrocknet und auf einen für Radioaktivität sensitiven Röntgenfilm aufgelegt. Zur Kontrolle wurden MEF mit WT-mCMV infiziert.

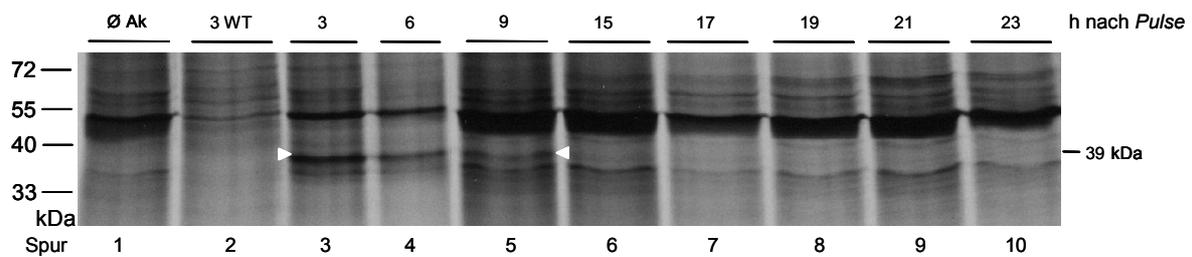


Abb. 30: Analyse der m164-Stabilität in infizierten Zellen. Der Röntgenfilm zeigt die Gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine nach dem *Pulse-Chase*. Der *Pulse* (Einbau von radioaktiv markierten Aminosäuren) dauerte 3 h und wurde 2½ h p.i. begonnen. Der *Chase* wurde 5½ h p.i. begonnen und dauerte zwischen 0 h und 20 h. Markiert wurde mit 250 µCi ³⁵S - Met/Cys/Ser-Mix. Pro Spur ist immer eine identische Menge ³⁵S - markiertes Protein aufgetragen.

Der Röntgenfilm aus Abb. 30 zeigt, dass m164 bis 9 h nach seiner Synthese nachweisbar ist (Spuren 3-5). Alle Zeitpunkte danach lassen nur noch sehr schwache m164-Protein Banden erkennen, die den Abbau des m164-Proteins widerspiegeln (ab Spur 5). Aus MEF, die mit WT-mCMV infiziert wurden, konnte mittels α-HA Antikörper kein m164-Protein angereichert werden (Spur 2). Wird eine IP mit Gesamtproteinlysat aus mit m164HA3'mCMV infizierten MEF ohne den α-HA Antikörper durchgeführt, kann ebenfalls kein m164-Protein nachgewiesen werden (Spur 1).

Schlussfolgerung:

Das m164-Protein scheint relativ instabil zu sein, da die Degradation von m164 bereits zwischen den Zeitpunkten 3 h und 6 h nach seiner Synthese deutlich sichtbar ist. Die Zunahme des m164-Proteins bis 3 h nach dem *Pulse* beruht vorwiegend auf Neusynthese und übersteigt die Zerfallsrate. Im weiteren Verlauf, zwischen 3 h und 9 h nach *Pulse*, nimmt die m164-Bandenintensität wieder ab, hier ist die Zerfallsrate größer als die Syntheserate.

3.8 Das m164-Protein wird in infizierten Zellen als 38 kDa-Protein exprimiert

Bei den bisherigen Western Blot Analysen wurde nur HA-markiertes m164-Protein untersucht, welches eine molekulare Masse von 39 kDa hatte. Der eingefügte HA-Tag besteht aus 9 Aminosäuren und hat damit eine Masse von etwa 1 kDa. Demnach war für das WT-m164-Protein ohne HA-Tag eine molekulare Masse von 38 kDa zu erwarten. Um zu untersuchen, ob dies tatsächlich zutrifft, wurde Gesamtproteinlysat aus MEF, die mit WT-mCMV infiziert wurden, isoliert und im Western Blot analysiert.

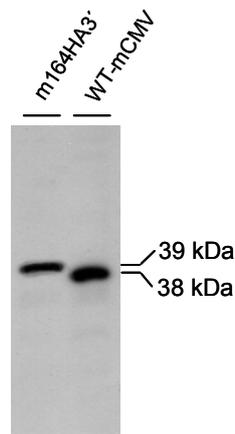


Abb. 31: Analyse von m164-Protein in Gesamtproteinlysaten m164HA3'- und WT-mCMV infizierter MEF. Die Gesamtproteinlysate wurde 6 h p.i. isoliert. Die Proteine der Gesamtproteinlysate, 30µg je Spur, wurden in einem SDS-Polyacrylamidgel (12,5%) aufgetrennt und auf PVDF-Membran geblottet. Das HA-markierte (m164HA3'-mCMV) bzw. unmarkiertes (WT-mCMV) m164-Protein wurde mit dem α-m164 Antikörper nach ECL Entwicklung nachgewiesen.

Wie in Abb. 31 zu sehen ist, kann das HA-markierte m164-Protein bei 39 kDa detektiert werden. Wie erwartet hat das m164-Protein aus WT-mCMV infizierten MEF eine um 1 kDa reduzierte molekulare Masse und wird von dem α-m164 Antikörper bei 38 kDa erkannt.

Schlussfolgerung:

Werden MEF mit WT-mCMV infiziert, kann das m164-Protein im Western Blot mit einer apparenten molekularen Masse von 38 kDa detektiert werden. Diese Erkenntnis wirft eine weitere Frage auf: Warum hat das m164-Protein eine molekulare Masse von 38 kDa und nicht wie aufgrund der vorhergesagten Aminosäurezusammensetzung berechnet von 46,6 kDa?

Nach der Schlussfolgerung aus den Northern Blot und RT-PCR Ergebnissen existiert keine verkürzte m164-mRNA Spleißvariante, die das Auftreten des 38 kDa großen m164-Proteins erklären könnte. Auf Proteinebene könnte das reduzierte Molekulargewicht mehrere Ursachen haben:

1. Die Translationsinitiation des ORF*m164* könnte an einem alternativen Startcodon beginnen.
2. Es könnte auf eine proteolytische Spaltung im Bereich des N-Terminus zurückzuführen sein.
3. Es könnte posttranslational ein Intein-*Splicing* stattfinden (Kane et al., 1990).

3.9 Expression des m164-Proteins in Sf-9 Insektenzellen

Für weitere Untersuchungen musste ein Expressionssystem gefunden werden, das es gestattet, das m164-Protein in großer Menge herstellen und anschließend möglichst rein isolieren zu können. Gereinigtes m164-Protein könnte für weiterführende Analysen, wie

MALDI-TOF-MS Analysen oder Edman-Sequenzierung eingesetzt werden. So würde beim Vergleich der Sequenzen des 38 kDa-Proteins und des vorhergesagten 46,6 kDa umfassenden Produkts erkennbar werden, ob in der kurzen Proteinsequenz ein Abschnitt fehlt und um welchen es sich dabei handelt.

Baculovirus infizierte *Sf-9* Insektzellen erwiesen sich als geeignetes Expressionssystem. Damit wurde m164 als Fusionsprotein mit einem GST- und einem Poly His-Tag am N-terminalen Ende exprimiert:



Abb. 32: Fusionsprotein GST/His-m164. Dieses Fusionsprotein ist das Expressionsprodukt des Expressionsvektors pAcGHLT-m164. Der ORF $m164$ wurde in den Vektor pAcGHLT (siehe M&M 2.2.2.2) kloniert. Das fertige Konstrukt wurde als pAcGHLT-m164 bezeichnet. Dieser Vektor trägt einen Polyhedrin Promotor vor dem GST, um das Fusionsprotein effizient in Insektzellen zu exprimieren.

Das in Abb. 32 dargestellte Fusionsprotein hat eine theoretische molekulare Masse von 73 kDa, die sich aus 47 kDa für m164, 25 kDa für GST und etwa 1 kDa für den Poly His-Tag und einen *Spacer* zusammensetzt.

Die Affinitätsreinigung des GST-Fusionsproteins über Glutathion-S-Sepharose wie auch die Verwendung des μ Macs *anti GST bead Isolation Kit* ergab nicht die Menge an gereinigtem Protein, die für MALDI-TOF-MS Analysen erforderlich gewesen wäre. Mit Hilfe des μ Macs *anti His bead Isolation Kit* war es jedoch möglich, genug m164-Protein über den His-Tag zu isolieren, um eine spezifische Bande bei 73 kDa in einem mit Coomassie Brilliant Blue R250 (CBB) gefärbten Gel zu generieren (Abb. 33 A).

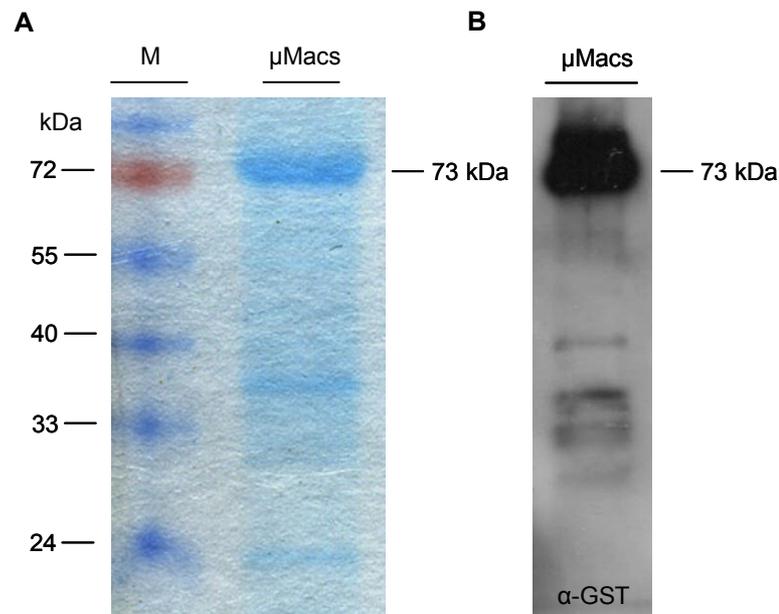


Abb. 33: Detektion des Fusionsproteins GST/His-m164 aus Sf-9 Insektenzellen. A: 10 μ l Eluat des μ Macs *anti His bead Isolation Kit* wurden in einem 12,5%igem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die separierten Proteine mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. B: Der Western Blot wurde mit 2 μ l Eluat des μ Macs *anti His bead Isolation Kit* durchgeführt. Die Proteine des Eluats wurden in einem SDS-Polyacrylamidgel (12,5%) aufgetrennt, auf PVDF-Membran geblottet und das GST-markierte m164-Protein wurde mit dem α -GST Antikörper nach ECL Entwicklung nachgewiesen.

In Abb. 33 A ist das mit CBB gefärbte m164-Fusionsprotein bei einer molekularen Masse von 73 kDa zu erkennen. Dass es sich dabei um das m164-Fusionsprotein handelt, wurde mittels Western Blot bestätigt (siehe Abb. 33 B).

Schlussfolgerung:

Das Fusionsprotein GST/His-m164 konnte erfolgreich in Sf-9 Insektenzellen exprimiert werden. Die isolierte Proteinmenge war ausreichend um in MALDI-TOF-MS Analysen eingesetzt zu werden.

Anmerkung:

Neben dem Expressionsvektor pAcGHLT wurde m164 in den Expressionsvektor pAcgp67 kloniert. Dieser Expressionsvektor trägt N-terminal der *Multiple Cloning Site (MCS)* einen Poly His-Tag.

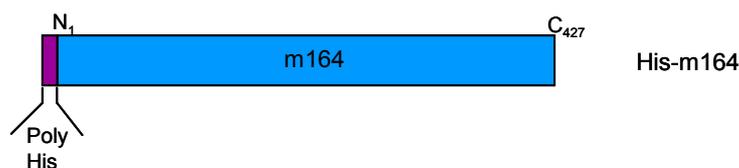


Abb. 34: Fusionsprotein His-m164. Dieses Fusionsprotein ist das Expressionsprodukt des Expressionsvektors pAcgp67-m164. Der ORF $m164$ wurde in den Vektor pAcgp67 (siehe M&M 2.2.2.2) kloniert, das fertige Konstrukt wurde als pAcgp67-m164 bezeichnet. Dieser Vektor trägt einen Polyhedrin Promotor vor dem His-Tag um das klonierte Protein effizient in Insektenzellen zu exprimieren.

Die Isolierung des His-m164-Proteins mit Hilfe des *µMacs anti His bead Isolation Kit* führte zu einer geringeren Ausbeute an Fusionsprotein verglichen mit der Isolierung des GST/His-m164-Fusionsproteins. In Western Blot Analysen war es zwar möglich das gereinigte His-m164-Protein nachzuweisen, jedoch konnte in einem CBB gefärbten SDS-Gel der eluierten His-m164-Proteine keine Bande bei der erwarteten molekularen Masse von 48 kDa detektiert werden. Für MALDI-TOF-MS Analysen konnte dieses Fusionsprotein deshalb nicht eingesetzt werden.

3.10 MALDI-TOF-MS Analysen des in Insektenzellen exprimierten m164

Das in den Insektenzellen exprimierte 73 kDa große GST/His-Fusionsprotein wurde für MALDI-TOF-MS Analysen eingesetzt. Es galt zunächst zu prüfen, ob die gefundene Proteinmenge ausreicht und ob dieses Protein auch rein genug ist, um MALDI-TOF-MS Analysen damit durchzuführen. Ziel war es, eine möglichst hohe Sequenzabdeckung des 73 kDa-Proteins zu erhalten.

Die CBB gefärbte 73 kDa Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und das Protein in der Gelbande mit der Peptidase Chymotrypsin im Gel verdaut. Dann wurden die entstandenen Peptide extrahiert und schließlich über MALDI-TOF-MS analysiert.

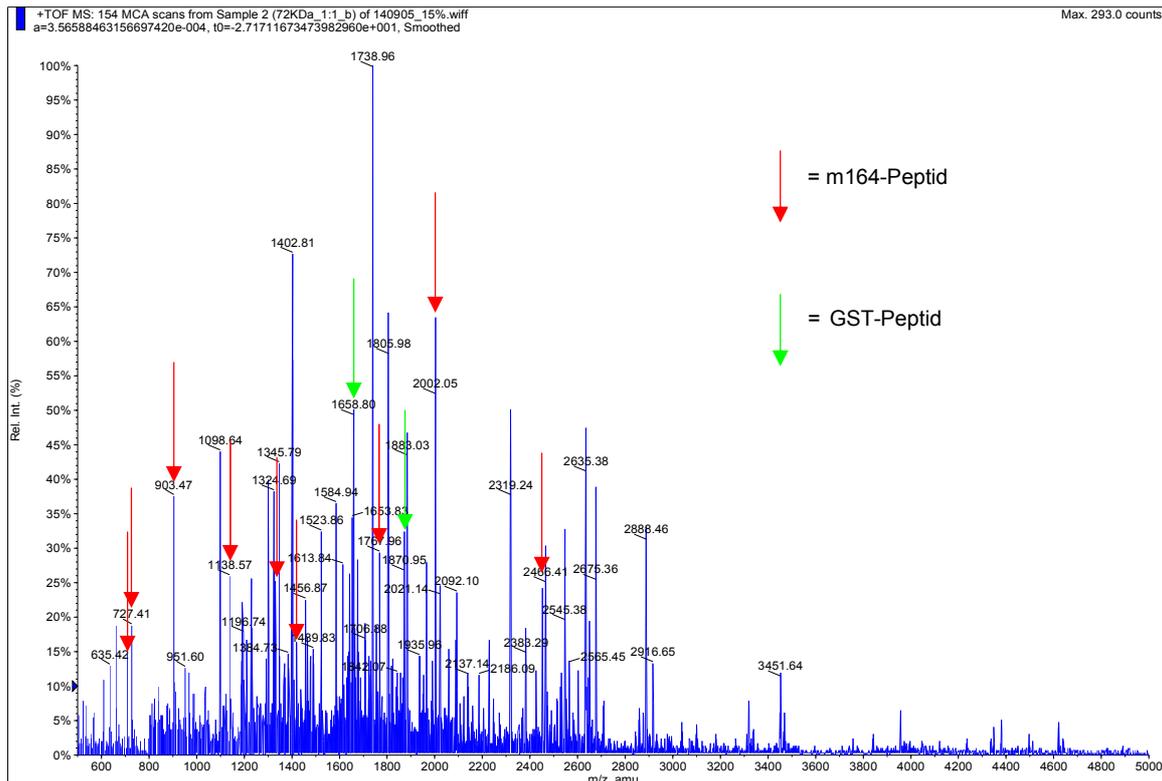


Abb. 35: MALDI-TOF-MS Spektrum. Die 73 kDa-Bande im SDS-Gel wurde mit Chymotrypsin verdaut und anschließend mit Hilfe von MALDI-TOF-MS analysiert. Die Peptide des m164-Proteins sind mit roten Pfeilen markiert, die von GST mit grünen Pfeilen.

Die MALDI-TOF-MS Messungen bestätigten, dass es sich bei der 73 kDa-Bande des SDS-Gels u. a. um das m164-Protein handelt. Allerdings konnten nur wenige der gefundenen Peptide dem m164-Protein zugeordnet werden; die Sequenzabdeckung lag im Durchschnitt bei nur 10%. Außerdem wurden zahlreiche Kontaminationen in der untersuchten Bande gefunden, z.B. hsp72, ein Hitzeschockprotein aus *Sf-9* Zellen. Dieses konnte mit einer Sequenzabdeckung zwischen 50% - 60% erfasst werden.

Schlussfolgerung:

In der untersuchten 73 kDa Bande konnten zwar m164 und auch GST nachgewiesen werden. Die unerwartet geringe Sequenzabdeckung von nur etwa 10% und der hohe Anteil an Fremdprotein in den untersuchten Proben zeigten jedoch, dass die gewählte Reinigungsmethode unzureichend war. Da bisher alle gewählten Isolierungsmethoden nicht den gewünschten Erfolg bezüglich der Reinheit und der Ausbeute brachten, wurden keine weiteren MALDI-TOF-MS Analysen durchgeführt.

3.11 Vorhersage über mögliche m164 Proteinfunktionen

Über die Struktur und Funktion des m164-Proteins war zu Beginn dieser Arbeit nichts bekannt. Anhand der bekannten Aminosäuresequenz nach Rawlinson et al. (1996) konnten mit Hilfe verschiedener Computeralgorithmen Vorhersagen über mögliche Proteinfunktionen getroffen werden. Die m164-Protein Sequenz wurde in verschiedenen Datenbanken unter expasy.org überprüft:

<http://cubic.bioc.columbia.edu/predictprotein/> oder <http://www.expasy.org/tools/blast/>.

Eine Zusammenfassung der wichtigsten und am häufigsten angezeigten putativen Strukturelemente des m164-Proteins ist in folgender Abbildung dargestellt (siehe auch Abschnitt 1.9):

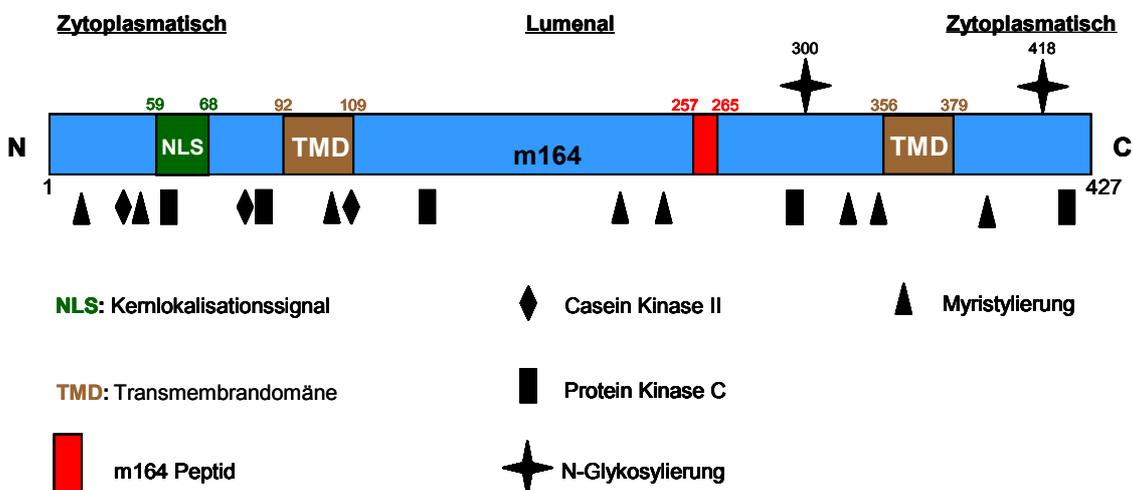


Abb 36: Vorhergesagte Struktur des m164-Proteins. Über die *in silico* Analyse in expasy.org wurden ein Kernlokalisierungssignal, zwei Membrandomänen, zwei N-Glykosylierungsstellen, mehrere putative Phosphorylierungsstellen, sowie acht Myristylierungsstellen im m164-Protein identifiziert. Die Ziffern geben die Aminosäureposition im Protein an.

Die in Abb. 36 dargestellten potentiellen Struktureigenschaften des m164-Proteins wurden im Folgenden überprüft.

3.12 Überprüfung der putativen Phosphorylierungsstellen von m164 durch Casein Kinase II und Protein Kinase C

Laut *in silico* Analyse stellt das m164-Protein sowohl ein Substrat der Protein Kinase C (PKC) als auch der Casein Kinase II (CKII) dar. Um dies zu überprüfen, wurde rekombinantes m164-Protein aus Sf-9 Insektenzellen verwendet. Das m164-Protein wurde mit Hilfe des Expressionsvektors pAcGHLT-B (mit GST- und His-Tag, siehe Abb. 32) und mit

dem Expressionsvektor pAcgp67 (nur His-Tag, siehe Abb. 34) in Sf-9 Insektenzellen exprimiert. Wie bereits in Abschnitt 3.9 gezeigt wurde, konnte mit dem Plasmid pAcGHLT in Insektenzellen eine m164-spezifische Bande bei 73 kDa exprimiert werden (siehe Abb. 33). Hingegen würde man mit dem Expressionsplasmid pAcgp67 eine m164-spezifische Bande bei 48 kDa erwarten. Die Reinigung der m164-Proteine erfolgte mittels des *μMacs anti His bead Kit*. Das Protein wurde über einen α-His Antikörper an der *μMacs* Säule immobilisiert und mit der entsprechenden Kinase sowie γ -³²P-ATP inkubiert. Zur Aktivierung der PKC wurden Phorbolster und Phosphatidylserin zugegeben.

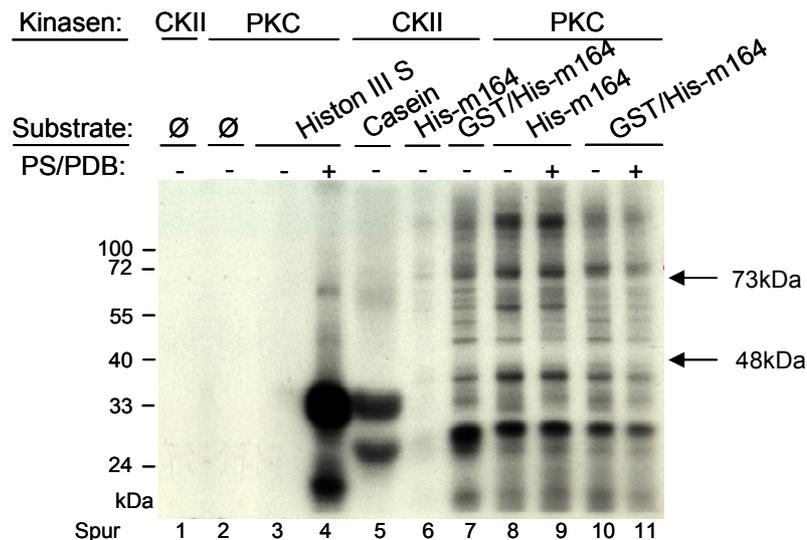


Abb. 37: Röntgenfilm des m164-Phosphorylierungsassays. Eingesetzt wurde rekombinantes Protein aus Sf-9 Insektenzellen, das aus unterschiedlichen Expressionsplasmiden (pAcGHLT oder pAcgp67) exprimiert wurde. Als Positivkontrolle der Protein Kinase C (PKC) wurde das Substrat Histon III S verwendet, als Positivkontrolle der Casein Kinase II (CKII) das Substrat Casein (Spur 4 und 5). Zur Aktivierung der PKC wurde Phorbolster (PDB) und Phosphatidylserin (PS) zugesetzt (Spur 4).

Wie in Abb. 37, Spur 5 zu sehen ist, wurde das Substrat der CKII, also Casein, phosphoryliert; die Casein-Doppelbande bei etwa 33 und 27 kDa führte zu einer Schwärzung des Röntgenfilms. Auch Histon III S (Spur 4), das Substrat der PKC, wurde phosphoryliert, jedoch nur in Anwesenheit der Aktivatoren PS und PDB. Ohne Aktivatoren findet keine Phosphorylierung von Histon III S statt (Spur 3). Da der Röntgenfilm eine deutliche Schwärzung auf Höhe der molekularen Masse der als Positivkontrolle eingesetzten Substrate Casein und Histon III S zeigt, konnte die Aktivität der verwendeten Kinasen bestätigt werden. Rekombinantes m164-Protein aus den Expressionsplasmiden pAcGHLT und pAcgp67 wurde weder durch CKII noch durch PKC phosphoryliert. Die gefundenen Signale der Proteine (Spur 6-11) sind zu schwach, um als echtes Substratsignal zu gelten (im Vergleich zu Spur 4 und 5). Auch wird das bereits bei den MALDI-TOF-MS Analysen beschriebene Problem der unsaubereren Isolierung der Fusionsproteine über den *μMacs anti His bead Kit* deutlich. Neben den m164-Fusionsproteinen haben noch zahlreiche weitere

Proteine unspezifisch an die α -His Antikörper gebunden und werden als Banden auf dem Röntgenfilm sichtbar.

Schlussfolgerung:

Das m164-Protein stellt weder für CKII noch für PKC ein Substrat dar.

3.13 Glykosylierung des m164-Proteins

Proteine, die für die Sekretion, den Einbau in Membranen oder den Transport in membranumschlossene Organellen bestimmt sind, enthalten Kohlenhydrate. Diese Glykosylierung spielt eine essentielle Rolle bei der „Sortierung“ dieser Proteine in den Golgi Zisternen, so etwa bei ihrer Verteilung auf die richtigen Zielorte innerhalb der Zelle. Laut *in silico* Analyse besitzt das m164-Protein zwei putative N-Glykosylierungsstellen an Aminosäureposition N300 und N418 (Asparaginrest = Asn oder N). N-glykosyliert bedeutet, dass die Oligosaccharide durch eine β -N-glykosidische Bindung an einen Asn-Rest mit der Polypeptidkette verbunden sind. N-gekoppelte Glykoproteine haben einen gemeinsamen Pentasaccharid-Kern:

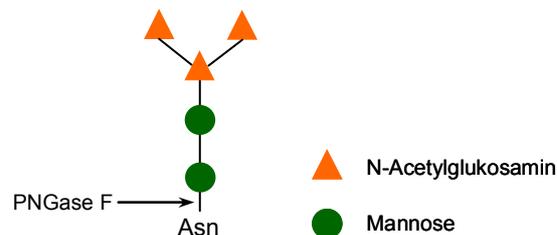


Abb. 38: Schematische Darstellung des Pentasaccharid-Kerns. Dieser Oligosaccharid-Kern besteht aus 2 Mannose-, und 3 N-Acetylglukosamin-Einheiten und ist das bereits prozessierte Grundgerüst aller N-gekoppelten Oligosaccharide. Im weiteren Reifungsverlauf, je nach zellulärem Bestimmungsort in den cis-, den medialen oder den trans-Zisternen des Golgi, können zahlreiche Kohlenhydrateinheiten wie N-Acetylglukosamin-, Galaktose-, Fukose- und Sialinsäure-Reste angefügt werden. Durch das Anheften verschiedener Zucker kommt es zu der enormen Vielfalt der N-gekoppelten Oligosaccharide. Das Enzym Peptid:N-Glykosidase F (PNGase F) spaltet N-glykosidisch gebundene Zuckerreste zwischen dem Stickstoffatom der Seitenkette des Asparaginrestes und dem N-Acetylglukosamin des Zuckerbaumes von Glykoproteinen (siehe Pfeil).

Zuerst musste überprüft werden, ob das m164-Protein überhaupt glykosyliert wird. Dazu wurde m164-Protein mit der Peptid:N-Glykosidase F (PNGase F) behandelt. Jede einfache N-Glykosylierung kann die molekulare Masse eines Proteins um etwa 2 kDa erhöhen, jede weitere Glykosylierung um den gleichen Wert. Die Behandlung von Glykoproteinen mit PNGase F führt zu einer vollständigen Deglykosylierung. Aus der Differenz der molekularen Masse vor und nach der Behandlung mit PNGase F können Rückschlüsse auf die Anzahl der N-Glykosylierungsstellen gezogen werden. Da für m164 höchstens zwei Glykosylierungsstellen vorhergesagt wurden, kann sich die molekulare Masse um höchstens 4-6 kDa reduzieren.

3.13.1 PNGase F Behandlung des m164-Proteins

Die PNGase F Behandlung wurde mit m164-Protein aus dem Gesamtproteinlysat transfizierter COS-7-Zellen durchgeführt. Als Expressionsvektoren wurden m164HA-C (siehe Abb. 26) und m164V5-C eingesetzt.



Abb. 39: Fusionsprotein m164V5-C. Schematische Darstellung des m164V5-C Proteins, das aus dem gleichnamigen Expressionsplasmid nach Transfektion von COS-7-Zellen exprimiert wird. Der ORF *m164* wurde in das Expressionsplasmid pcDNA6/V5-His (siehe M&M 2.2.2.2) kloniert. Der V5-Tag befindet sich am C-terminalen Ende von m164.

Die zu erwartende molekulare Masse der markierten-Proteine war 39 kDa (siehe Abschnitt 3.8, Abb. 31), sowohl für m164HA-C als auch für m164V5-C. Nach PNGase F Behandlung der markierten m164-Proteine waren vier Möglichkeiten hinsichtlich der Änderung der apparenten molekularen Masse von m164 denkbar:

1. Das PNGase F behandelte m164 ändert seine Masse nicht: Es ist nicht glykosyliert.
2. Die molekulare Masse vermindert sich um 2-3 kDa: m164 wäre einfach glykosyliert.
3. Die molekulare Masse ist um 4-6 kDa reduziert: m164 wäre wie vorhergesagt zweifach glykosyliert.
4. Die Reduktion der molekularen Masse von m164 entspricht mehr als 6 kDa: Über die beiden vorhergesagten Glykosylierungsstellen hinaus gibt es weitere.

Im Anschluss an eine Gesamtproteinisolierung aus transfizierten COS-7-Zellen wurde die PNGase F Behandlung durchgeführt (siehe 2.2.1.20 in M&M). Die Detektion der PNGase F behandelten Proteine erfolgte in Western Blot Analysen mit Hilfe eines α -HA Antikörpers bzw. α -V5 Antikörpers

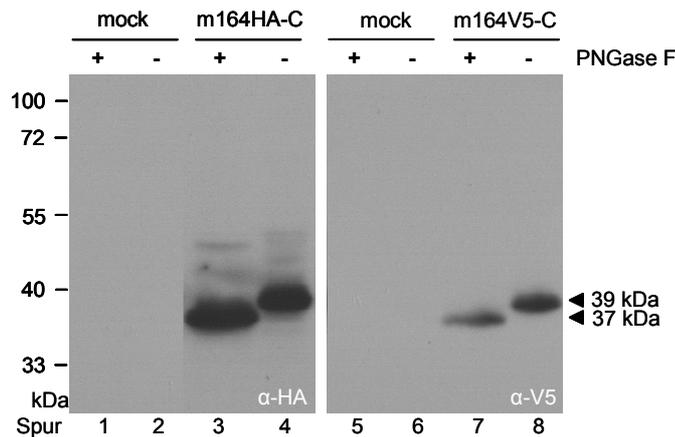


Abb. 40: Western Blot der PNGase F verdauten m164-Proteine. Der Western Blot wurde mit Gesamtproteinlysats aus m164HA-C (Spur 3 und 4) und m164V5-C (Spur 7 und 8) exprimierenden COS-7-Zellen durchgeführt. Die Gesamtproteinextraktion erfolgte 48 h nach der Transfektion. In Spuren, die mit „+“ markiert sind, wurde das Gesamtproteinlysats vor der Gel-elektrophoretischen Auftrennung mit PNGase F behandelt, in Spuren, die mit „-“ markiert sind, fand keine PNGase F Behandlung des Gesamtproteinlysats statt. Die Proteine, mit und ohne vorherige PNGase F Behandlung, wurden in einem SDS-Polyacrylamidgel (12,5%, 30µg je Spur) aufgetrennt und auf PVDF-Membran geblottet. Das HA-markierte bzw. V5-markierte m164-Protein wurde mit dem α-HA bzw. α-V5 Antikörper nach ECL Entwicklung nachgewiesen.

Im Western Blot der Abb. 40 ist ein *Shift* der apparenten molekularen Masse der markierten m164-Proteine m164HA-C (Spur 3 und 4) und m164V5-C (Spur 7 und 8) von 39 kDa nach 37 kDa nach PNGase F Verdau detektierbar. Dies konnte in zwei unabhängigen Versuchen mit jeweils unterschiedlich markierten Proteinen (HA bzw. V5) bestätigt werden. Die Abnahme der apparenten molekularen Masse nach PNGase F Behandlung der m164-Proteine um etwa 2 kDa lässt darauf schließen, dass das m164-Protein nicht wie vorhergesagt zweifach, sondern nur einfach N-glykosyliert ist (Möglichkeit Nr. 2 unter 3.13).

Schlussfolgerung:

Eine PNGase F Behandlung von m164 reduziert die apparente molekulare Masse um etwa 2 kDa. Demzufolge ist m164 einfach N-glykosyliert.

3.13.2 Ortsspezifische Mutagenese der Asparaginreste 300 und 418 des m164-Proteins

Es stellte sich die Frage, welche der beiden vorhergesagten N-Glykosylierungsstellen, an Aminosäureposition N300 oder N418, tatsächlich genutzt wird. Der Asn-Rest ist Teil einer Erkennungssequenz Asn-Xaa-Thr/Ser, wobei Xaa jeder Aminosäurerest außer Prolin oder Asparagin sein kann. Diese Erkennungssequenz ist unerlässlich für die Glykosylierung eines Proteins. Durch den Austausch des Asn-Rest gegen einen Glutaminrest (Gln oder Q), wird die Erkennungssequenz zerstört und eine Glykosylierung des Proteins verhindert.

Um den tatsächlich glykosylierten Asn-Rest in m164 zu finden, wurden die Asparaginreste N300 und N418 jeweils unabhängig voneinander über eine gerichtete Mutagenese (Kombinations-PCR siehe 2.2.2.14 in M&M) gegen Glutaminreste ausgetauscht. Nach dem Ersatz des relevanten Asn-Rest gegen Gln sollte eine m164-Bande bei 37 kDa detektiert werden können.

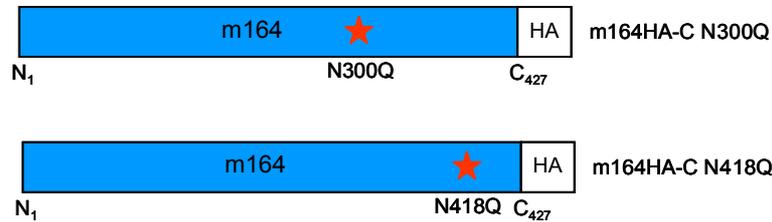


Abb. 41: HA-markierte m164-Proteine mit Punktmutation. Die Punktmutation wurde in den ORF*m164* gesetzt und der veränderte ORF*m164* in den Vektor pcDNA3.1 myc-His kloniert. Der HA-Tag befindet sich am C-terminalen Ende von m164 und trägt ein Stopcodon, so dass der vektorkodierte myc/His-Tag nicht exprimiert wird. Der rote Stern zeigt die Position des Aminosäureaustauschs. Der Asparaginrest (N) an Aminosäureposition 300 (m164HA-C N300Q) und 418 (m164HA-C N418Q) wurde durch ortsspezifische Mutagenese durch Glutamin (Q) ersetzt.

Nach der getrennten Expression der Plasmide m164HA-C N300Q sowie m164HA-C N418Q in COS-7-Zellen wurden im Anschluss an eine Gesamtproteinisolierung die markierten Proteine mittels Western Blot analysiert.

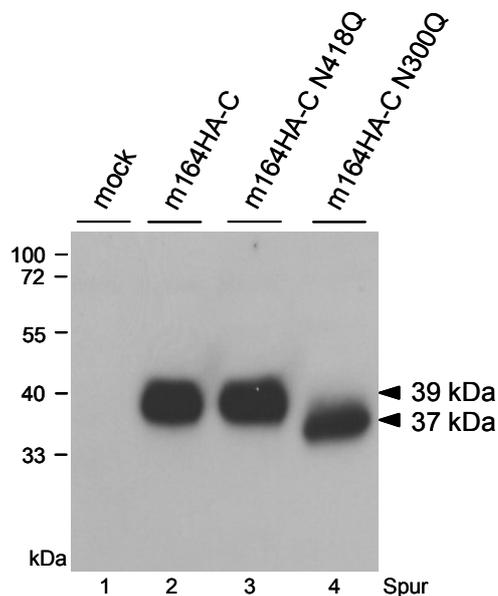


Abb. 42: Western Blot der m164-Proteine mit Punktmutation. Die putativen N-Glykosylierungsstellen N300 und N418 von m164 wurden durch Glutaminreste ersetzt. Die Detektion der Proteine erfolgte mit dem α -HA Antikörper. Jede Spur enthält 30 μ g Gesamtproteinlysate aus COS-7-Zellen, die mit verschiedenen Plasmiden transfiziert wurden: Spur 1: leerer Vektor; Spur 2: Positivkontrolle, Plasmid m164HA-C (siehe Abb. 26); Spur 3: Plasmid m164HA-C N418Q; Spur 4: Plasmid m164HA-C N300Q. Die Isolierung der Gesamtproteinlysate wurde 48 h nach Transfektion durchgeführt.

Das m164-Protein ohne Punktmutation (m164HA-C) konnte wie erwartet bei 39 kDa detektiert werden (Abb. 42, Spur 2). Der Austausch des Asparaginrestes durch einen

Glutaminrest an Position 418 hat keinen Einfluss auf das Laufverhalten im Polyacrylamidgel. Hier erscheint das m164-Protein ebenfalls bei einer apparenten molekularen Masse von 39 kDa (Spur 3). Der Austausch N→Q an Aminosäureposition 300 allerdings hat einen Einfluss auf die molekulare Masse des m164-Proteins. Hier erscheint das m164-Protein mit einer um 2 kDa reduzierten molekularen Masse von 37 kDa (Spur 4). Die Glykosylierung wurde in diesem Fall durch den Aminosäureaustausch verhindert.

Schlussfolgerung:

Das m164-Protein hat eine einfache N-Glykosylierungsstelle an Aminosäureposition N300.

3.14 Überprüfung der putativen Transmembrandomänen von m164

Die Existenz von Transmembrandomänen lässt sich vorhersagen, indem man die Änderung der freien Enthalpie bei Überführung α -helikaler Polypeptide aus dem unpolaren Inneren einer Membran in eine wässrige Umgebung berechnet. Ist bei diesem Prozess die Änderung der freien Enthalpie für ein Aminosäuresegment positiv, d.h. dieser Prozess läuft endergonisch und liegt über einem bestimmten Ausschlusswert, könnte es sich hierbei um eine Transmembrandomäne handeln. Unter www.expasy.org gibt es zahlreiche Algorithmen, welche diese Berechnung durchführen. Für m164 konnten so zwei putative Transmembrandomänen, eine im vorderen Bereich um Aminosäureposition 92 bis 109 und eine Zweite etwa bei Aminosäureposition 356 bis 379, ermittelt werden:

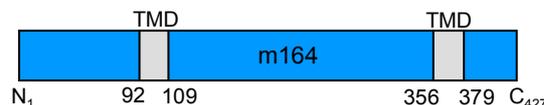


Abb. 43: Die putativen Transmembrandomänen (TMD) von m164. Je eine TMD befindet sich laut der *in silico* Analyse an Aminosäurepositionen 92-109 und 356-379.

Die Kenntnis des Vorhandenseins möglicher Transmembrandomänen ist für die Topologie-Klassifizierung des m164-Proteins essentiell. Nur so können Aussagen über die Orientierung der C- bzw. N-terminalen Bereiche von m164 gemacht werden.

Um die Funktionalität der putativen Transmembrandomänen zu überprüfen, wurden Expressionsplasmide erstellt, die verschiedene Fragmente des m164-Proteins beinhalten. Dazu wurden die m164-Fragmente folgendermaßen festgelegt: Ein N-terminales A-Fragment, ein zentrales B-Fragment und ein C-terminales C-Fragment, definiert durch die Positionen der beiden vorhergesagten Transmembrandomänen. Sie wurden entweder ohne oder mit Transmembrandomäne kloniert und sind C-terminal mit GFP fusioniert. Eine Ausnahme stellt das Fragment C_{TMD} dar, hier wurde GFP N-terminal angefügt:

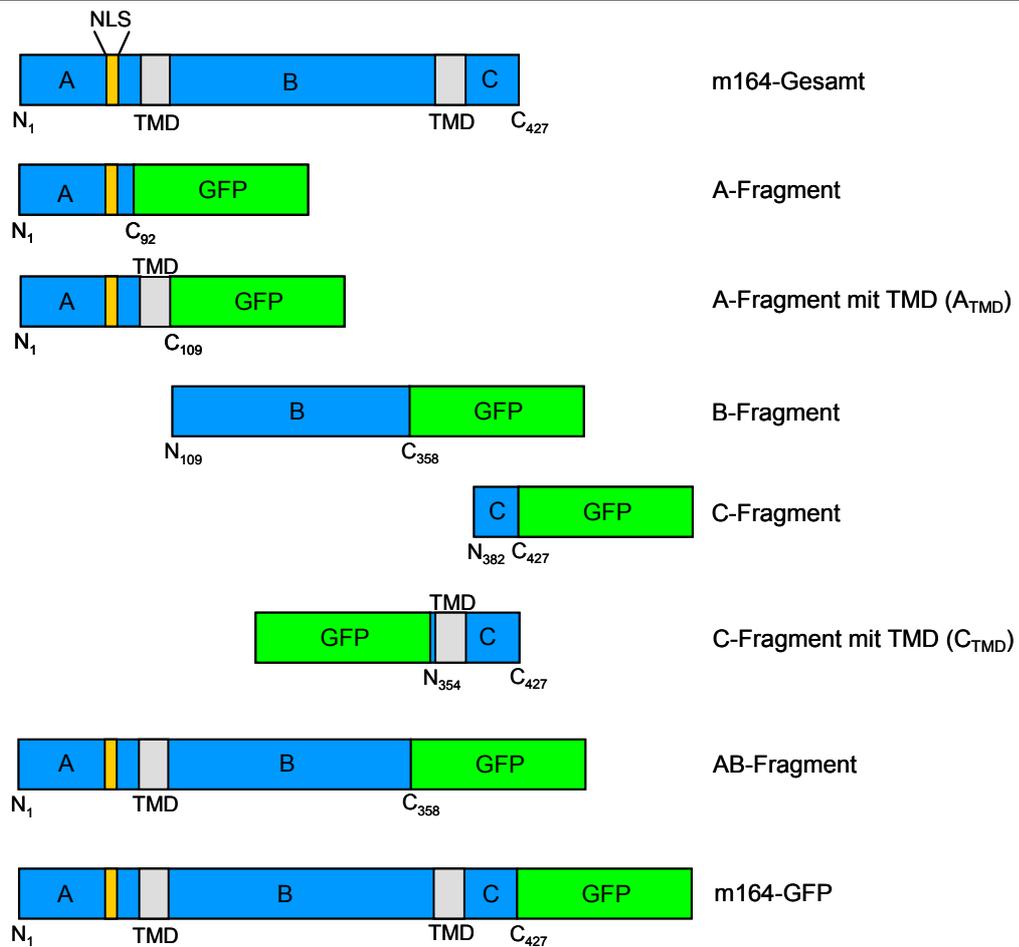


Abb. 44: Übersicht der GFP-m164 Fusionsproteine. Oben ist das WT-m164-Protein mit den zwei putativen Transmembrandomänen (TMD) dargestellt. TMD enthalten nur die Konstrukte A_{TMD}, AB-Fragment, C_{TMD} und m164-GFP. Ein Kernlokalisationssignal (NLS) fehlt den Fragmenten B, C und C_{TMD}. Die verschiedenen m164-Fragmente wurden in den Expressionsvektor GFP-N1 kloniert. (Ausnahme: C_{TMD}, hier wurde der Expressionsvektor GFP-C1 verwendet)

COS-7-Zellen wurden mit den gleichnamigen Expressionsplasmiden der Fusionsproteine aus Abb. 44 transfiziert. Mit den resultierenden Zellextrakten wurde eine Fraktionierung in Zytoplasma- und Membranfraktion durchgeführt (siehe 2.2.1.13 in M&M). Die gewonnenen Lysate wurden über Western Blot mit einem α -GFP Antikörper analysiert.

Da GFP ein zytoplasmatisches Protein ist, sollte es ausschließlich in der Zytoplasmafraktion nachweisbar sein. Die Fragmente A, B und C besitzen laut *in silico* Analyse keine Transmembrandomäne, deshalb waren diese Fragmente in der Zytoplasmafraktion zu erwarten. Fragmente, die eine Transmembrandomäne besitzen (wie A_{TMD}, C_{TMD}, AB und m164-GFP), sollten membranassoziiert und demnach nur in der Membranfraktion detektierbar sein.

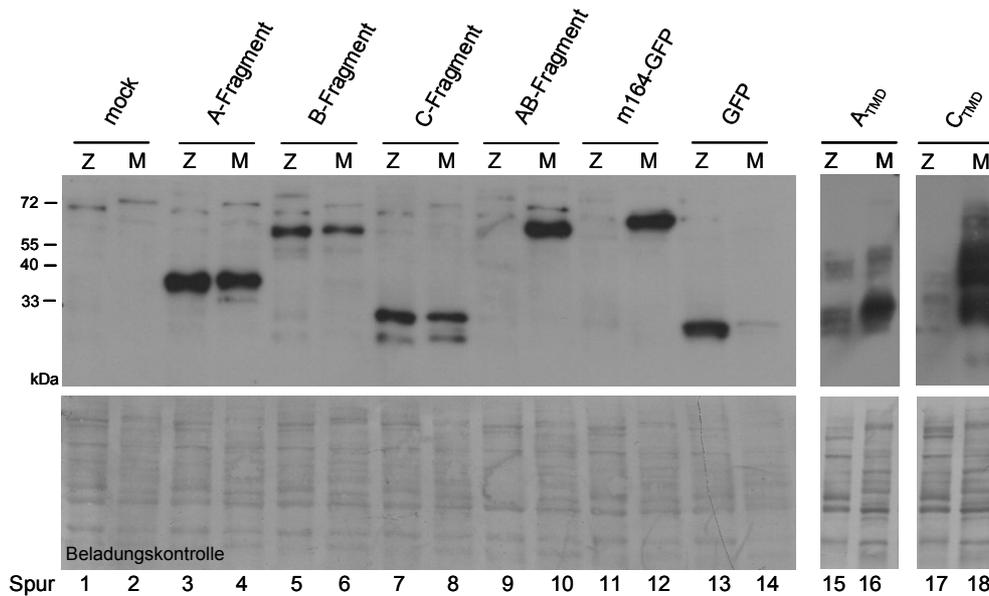


Abb. 45: Western Blot der GFP-Fusionsproteine nach Fraktionierung der Zellextrakte. COS-7-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden transfiziert, die für die in Abb. 44 dargestellten Proteine kodieren. 48 h nach Transfektion wurde eine Gesamtproteinisolierung durchgeführt, anschließend wurden die Gesamtproteinlysate in Zytoplasma- (Z) und Membranfraktion (M) getrennt. Der Western Blot wurde mit Zytoplasma- und Membranfraktionslysate durchgeführt. Die Proteine der Lysate, 18 µg je Spur, wurden in einem SDS-Polyacrylamidgel (12,5%) aufgetrennt, und auf PVDF-Membran gebロットet. Dann wurden die mit GFP fusionierten m164-Fragmente mit dem α-GFP Antikörper nach ECL Entwicklung nachgewiesen.

Das GFP-Protein aus COS-7-Zellextrakten konnte nach der Zellextrakt-Fraktionierung ausschließlich in der Zytoplasmafraktion (Spur 13 des Western Blots aus Abb. 45) mit einem α-GFP Antikörper detektiert werden. In der Membranfraktion konnte wie erwartet kein GFP-Protein detektiert werden, da GFP als zytoplasmatisches Protein keine Transmembrandomänen besitzt. Auch die Fragmente A, B und C zeigen in der Zytoplasmafraktion eine intensivere Bandenfärbung verglichen mit der Bande der Membranfraktion (Spur 3-8). Dies ist ein typisches Verteilungsmuster myristylierter Proteine. Lösliche Proteine erhalten durch eine Myristylierung eine Membranassoziation, da der Fettsäurerest der Myristinsäure in die Lipidmembran integriert werden kann (Farazi et al., 2001). Dadurch kommt es zu einer Anreicherung eigentlich löslicher Proteine in der Membranfraktion. Da für das m164-Protein eine Reihe von Myristylierungsstellen vorhergesagt wurden, spricht dieses Ergebnis dafür, dass in den Fragmenten A, B und C tatsächlich keine Transmembrandomänen vorhanden sind, sondern der Nachweis dieser Protein-Fragmente in der Membranfraktion lediglich auf das Vorhandensein von Myristylierungsstellen zurückzuführen ist.

Werden dem A-Fragment weitere 19 Aminosäuren, die der putativen Transmembrandomäne an Aminosäure-Position 92-109 entsprechen, angehängt (A_{TMD}), ist es deutlich verstärkt mit der Membranfraktion assoziiert (Spur 16). Durch eine Verlängerung des C-Fragments um 28 Aminosäuren, welche die putative Membrandomäne 356-379 umfassen, befindet sich das

m164-Proteinfragment eindeutig und nahezu ausschließlich in der Membranfraktion (Spur 18).

Wie in Spur 10 und 12 zu sehen ist, waren die Proteine AB-Fragment und m164-GFP ausschließlich in der Membranfraktion nachweisbar. Dies war zu erwarten, da beide Proteine mindestens eine Transmembrandomäne besitzen sollen.

Schlussfolgerung:

Durch die Aufteilung von m164 in unterschiedlich große Fragmente konnten die beiden putativen Transmembrandomänen (Aminosäuren 92-109 und 356-379) bestätigt werden. Das m164-Protein ist ein Protein mit zwei Transmembrandomänen und wird folglich als Typ-III Membranglykoprotein definiert:

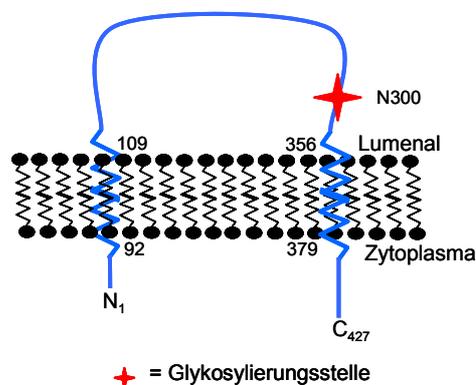


Abb. 46: Modell des m164-Proteins. Das Protein liegt als Typ-III Membranglykoprotein hufeisenförmig in der Membran. Die Lage der beiden Transmembrandomänen ist durch die Position der Aminosäuren definiert. Die Glykosylierungsstelle an Aminosäure-Position 300 ist durch einen roten Stern gekennzeichnet und befindet sich luminal.

3.15 Überprüfung der Funktionalität der Kernlokalisationssequenz von m164

Laut *in silico* Analyse soll das m164-Protein eine Kernlokalisationssequenz (NLS) an Aminosäureposition 59-68 tragen.



Abb. 47: Lage der putativen Kernlokalisationssequenz (NLS) im m164-Protein. Die Kernlokalisationssequenz (NLS) soll laut *in silico* Analyse an Aminosäureposition 59-68 des m164-Proteins liegen.

3.15.1 Lokalisation der GFP/m164-Fusionsproteine in transfizierten Zellen

Zur Untersuchung der Funktionalität der NLS wurden die in Abb. 44 dargestellten Protein-Fragmente eingesetzt. COS-7-Zellen wurden mit diesen pGFP-Konstrukten transfiziert, die Zellen fixiert und die Lokalisation der GFP-Mutanten in der Zelle mit Hilfe eines konfokalen Laser Scanning Mikroskops (Zeiss LSM 510) analysiert.

Lösliche Proteine mit funktioneller NLS werden über Importine durch die Kernpore in den Zellkern transportiert und verbleiben dort. Besitzen Proteine eine Transmembrandomäne und ein NLS, sollten sie aufgrund ihrer Membranassoziation nicht oder nur in geringer Menge in das Nukleoplasma transportiert werden. Demnach wäre eine eindeutige Kernlokalisation nur bei dem A-Fragment zu erwarten gewesen, da dieses Fusionsprotein ein NLS aber keine Transmembrandomänen besitzt. Alle anderen m164-Fragmente besitzen entweder kein NLS (B- und C-Fragment, sowie GFP) oder zusätzlich zur NLS eine Transmembrandomäne (A_{TMD}, AB-Fragment). Bei den Fragmenten ohne NLS wäre eine Verteilung der Proteine über die gesamte Zelle, also im Zytoplasma wie im Zellkern, zu erwarten gewesen. Hingegen hätte man bei den Fragmenten mit NLS und einer Transmembrandomäne nur eine schwache Lokalisation im Zellkern neben einer Assoziation an Membranstrukturen im Zytoplasma wie im ER erwartet.

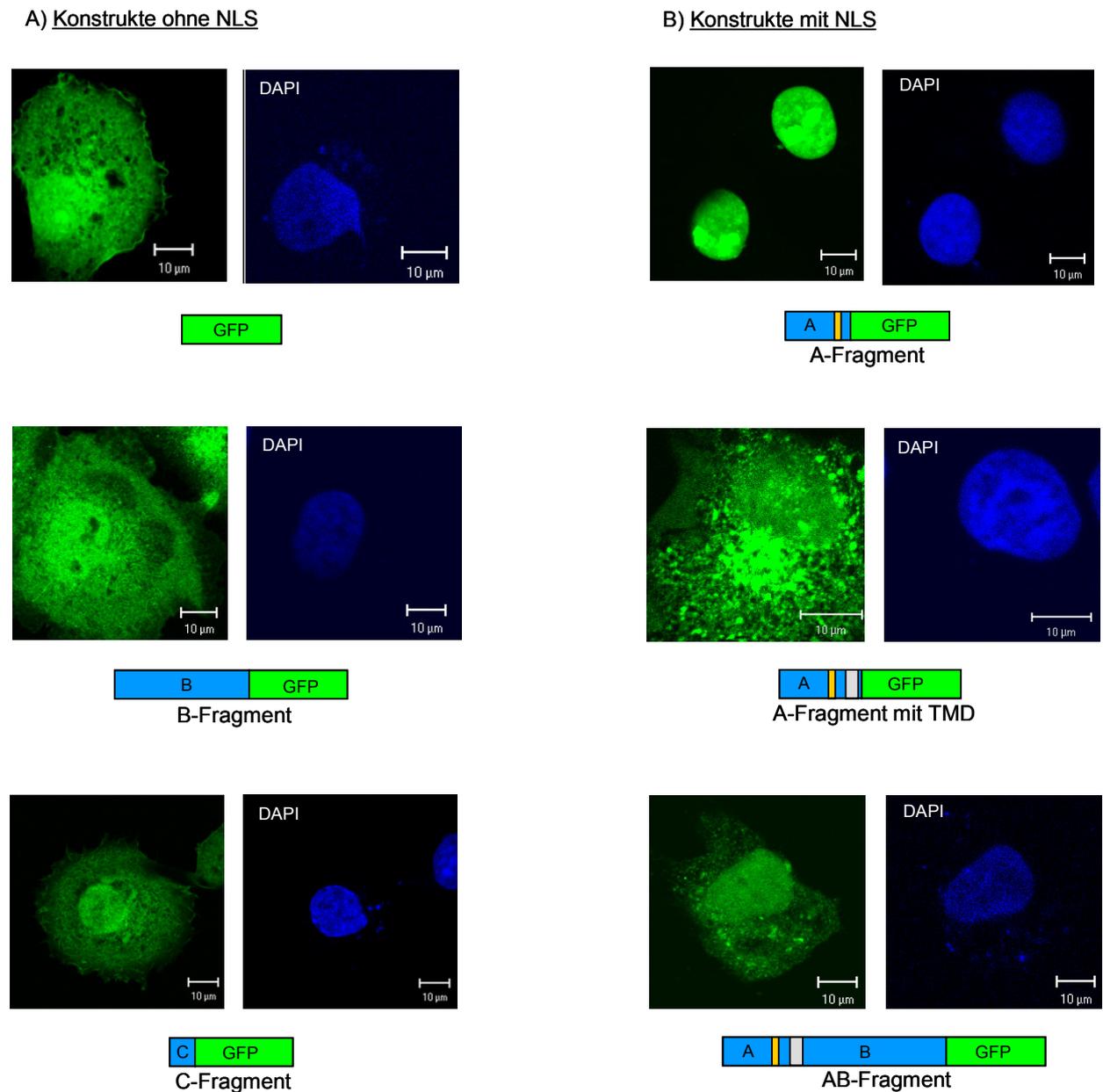


Abb. 48: Lokalisation der GFP/m164-Fusionsproteine in transfizierten Zellen. COS-7-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden transfiziert, welche für die dargestellten Fusionsproteine (unter den Fotos) kodieren. Die Zellen wurden 48 h nach Transfektion fixiert. A: Die Bilder zeigen die Lokalisationen der Konstrukte ohne NLS: GFP, B-Fragment und C-Fragment. B: Auf den Bildern sind die Lokalisationen von A-Fragment, A-Fragment mit Transmembrandomäne (TMD) und AB-Fragment mit NLS gezeigt. Zu sehen ist jeweils die GFP-Fluoreszenz (grün), aufgenommen mit einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop. Die Anregung des GFP erfolgte mittels des Argon Lasers bei 488 nm. Die DNA des Zellkerns ist mit DAPI blau gefärbt.

Die Fusionsproteine ohne NLS (Abb. 48 A), also B-Fragment und C-Fragment, zeigten wie erwartet eine homogene Verteilung in Zytoplasma und Zellkern und entsprachen mit dieser Gesamtzellverteilung der GFP-Kontrolle.

Wie in Abb. 48, B zu sehen ist, war das A-Fragment ausschließlich im Zellkern lokalisiert.

Die GFP/m164-Fusionsproteine, die zwar ein NLS aber auch eine Transmembrandomäne besitzen (Abb. 48, B: A_{TMD}, AB), sind nicht im Zellkern lokalisiert, sondern wie vorhergesagt im Zytoplasma. Die Art der Lokalisation außerhalb des Zellkerns ist jedoch nicht mit der löslichen Fragmente zu vergleichen, sondern deutet auf eine Membranassoziation hin. Hier verhindert die Transmembrandomäne den Transport der Proteine über Importine in den Zellkern. Dieser Befund bestätigt noch einmal die nach den Zellfraktionierungs-Experimenten gemachte Aussage, dass es sich bei dem Aminosäurebereich 92-109 um eine Transmembrandomäne handelt.

Schlussfolgerung:

Das A-Fragment mit dem NLS ist ausschließlich im Zellkern lokalisiert. Besitzen die Protein-Fragmente wie A_{TMD} und AB neben dem NLS noch eine Transmembrandomäne, sind diese Proteine im Zytoplasma lokalisiert.

3.15.2 Lokalisation von m164 in transfizierten und infizierten Zellen

Wie beschrieben scheint das NLS von m164 funktionell zu sein. Ob dies jedoch auch für das NLS im Kontext des m164-Gesamtproteins zutrifft, sollte mit Hilfe der folgenden Experimente geklärt werden:

COS-7-Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden m164-GFP oder m164HA-C transfiziert. Parallel dazu wurden MEF mit WT-mCMV infiziert. Die Detektion des HA-markierten m164-Proteins, wie auch die des WT-m164 Proteins in infizierten MEF, erfolgte mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenzfärbung (siehe M&M unter 2.2.3.10). Das GFP-Fusionsprotein wie auch die mit Antikörper markierten m164-Proteine wurden mit Hilfe des Laser Scanning Mikroskops visualisiert.

Aufgrund des eindeutigen Nachweises der beiden Transmembrandomänen im m164-Gesamtprotein (siehe Abschnitt 3.14) war nicht davon auszugehen, dass das NLS tatsächlich genutzt wird. Deshalb war eine Lokalisation des m164-Gesamtproteins im Zellkern nicht zu erwarten.

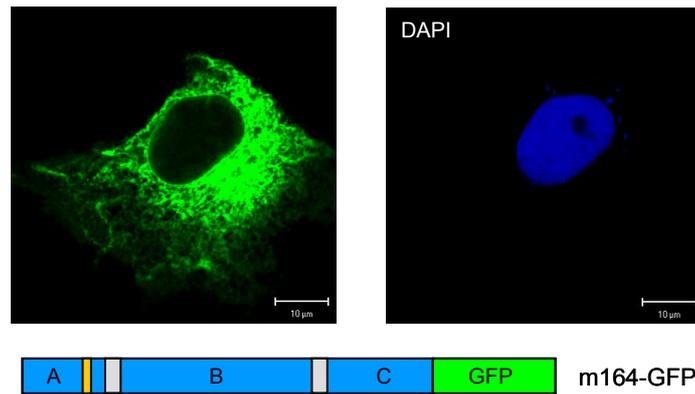


Abb. 49: Lokalisation des GFP/m164-Fusionsproteins in transfizierten COS-7-Zellen. COS-7-Zellen wurden mit dem Expressionsvektor transfiziert, der für das m164-GFP Fusionsprotein kodiert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen fixiert und das Bild mittels des konfokalen Laser Scanning Mikroskops aufgenommen. Das GFP wurde mittels Argonlaser bei 488nm angeregt. Zu sehen ist die GFP-Fluoreszenz in einem zytoplasmatischen Netzwerk und im Kernrandbereich sowie die Färbung der DNA im Zellkern mit DAPI.

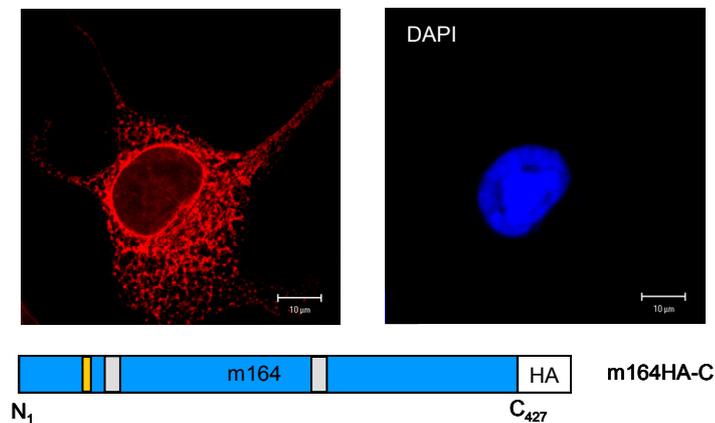


Abb. 50: Lokalisation des m164HA-C Proteins in transfizierten COS-7-Zellen. Die Zellen wurden mit dem Expressionsplasmid m164HA-C transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen fixiert. Die Detektion von m164 in den fixierten Zellen erfolgte mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung. Dazu wurde der α -HA Antikörper verwendet, der von dem Alexa Fluor 546 konjugierten Sekundärantikörper erkannt wurde. Die rote Alexa Fluor Fluoreszenz wurde mit Hilfe des konfokalen Laser Scanning Mikroskops detektiert. Dazu wurde das Fluorophor mit einem Argonlaser bei einer Wellenlänge von 546 nm angeregt. Zu sehen ist die Alexa Fluor Fluoreszenz in einem zytoplasmatischen Netzwerk und im Kernrandbereich. Die DNA des Zellkerns ist mit DAPI blau gefärbt.

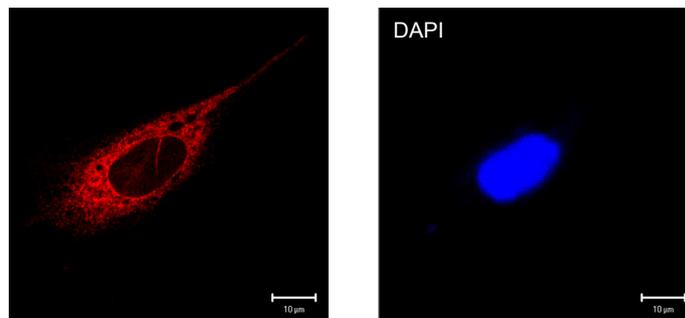


Abb. 51: Lokalisation des m164-Proteins in infizierten MEF. Die MEF wurden mit WT-mCMV infiziert und 6 h p.i. fixiert. Die Detektion von m164 in den fixierten Zellen erfolgte mittels indirekter

Immunfluoreszenzfärbung. Dazu wurde der α -m164 Antikörper verwendet, der von dem Alexa Fluor 546 konjugierten Sekundärantikörper erkannt wurde. Die rote Alexa Fluor Fluoreszenz wurde mittels des konfokalen Laser Scanning Mikroskops detektiert. Dazu wurde das Fluorophor mit einem Argonlaser bei einer Wellenlänge von 546 nm angeregt. Zu sehen ist die Alexa Fluor Fluoreszenz in einem zytoplasmatischen Netzwerk und im Kernrandbereich. Die DNA des Zellkerns ist mit DAPI blau gefärbt.

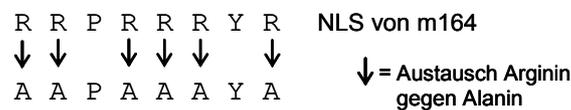
Sowohl nach der Transfektion von COS-7-Zellen mit den Expressionsplasmiden m164-GFP und m164HA-C als auch nach der Infektion von MEF mit WT-mCMV zeigt das m164-Protein eine identische Lokalisation in der Zelle. Unabhängig von den verschiedenen Nachweismethoden des m164-Proteins und vom exprimierenden Zelltyp erhält man die typische m164 Lokalisation: Das Protein befindet sich im Kernrandbereich und in einem zytoplasmatischen Netzwerk. Erwartungsgemäß ist das m164-Protein nicht im Zellkern nachweisbar. Die für die m164-Fragmente gemachte Schlussfolgerung (3.15.1) lässt sich also auch auf das Gesamtprotein m164 übertragen: Das Vorhandensein von Transmembrandomänen verhindert die Nutzung des NLS.

Schlussfolgerung:

Das m164-Protein ist netzartig im Zytoplasma und ringförmig am Kernrand verteilt, was im Folgenden als typische m164-Lokalisation bezeichnet wird. Im Zellkern befindet sich kein m164-spezifisches Signal. Dies zeigt, dass das NLS keinen Einfluss auf die Lokalisation des Gesamtproteins hat.

3.15.3 Zerstörung des NLS von m164 durch Mutagenese

Wie im letzten Abschnitt beschrieben, hat das NLS des m164-Proteins weder in transfizierten noch in infizierten Zellen einen Einfluss auf dessen subzelluläre Lokalisation. Somit sollte es möglich sein, das NLS des m164-Proteins durch Mutation seiner Aminosäuren zu zerstören, ohne dass sich die Lokalisation des Proteins verändert. Zur Zerstörung des NLS wurden folgende Arginine durch Alanine ausgetauscht (Ilmarinen et al., 2006):



Zunächst wurde das NLS des A-Fragmentes mutiert, um zu überprüfen, ob dieser Aminosäureaustausch auch tatsächlich zur Zerstörung des NLS führt. Da das A-Fragment ausschließlich im Zellkern lokalisiert ist (Abb 48, B), eignet es sich besonders gut, einen Funktionsverlust des NLS durch Mutation aufzuzeigen.



Abb. 52: Fusionsprotein A_{NLSmut} . Das NLS des A-Fragments wurde durch Austausch von sechs Argininen gegen Alanine zerstört. Als Klonierungsgrundlage wurde das A-Fragment (siehe Abschnitt 3.14, Abb. 44) verwendet. Das A-Fragment mit zerstörtem NLS wurde an seinem C-terminalen Ende mit GFP fusioniert.

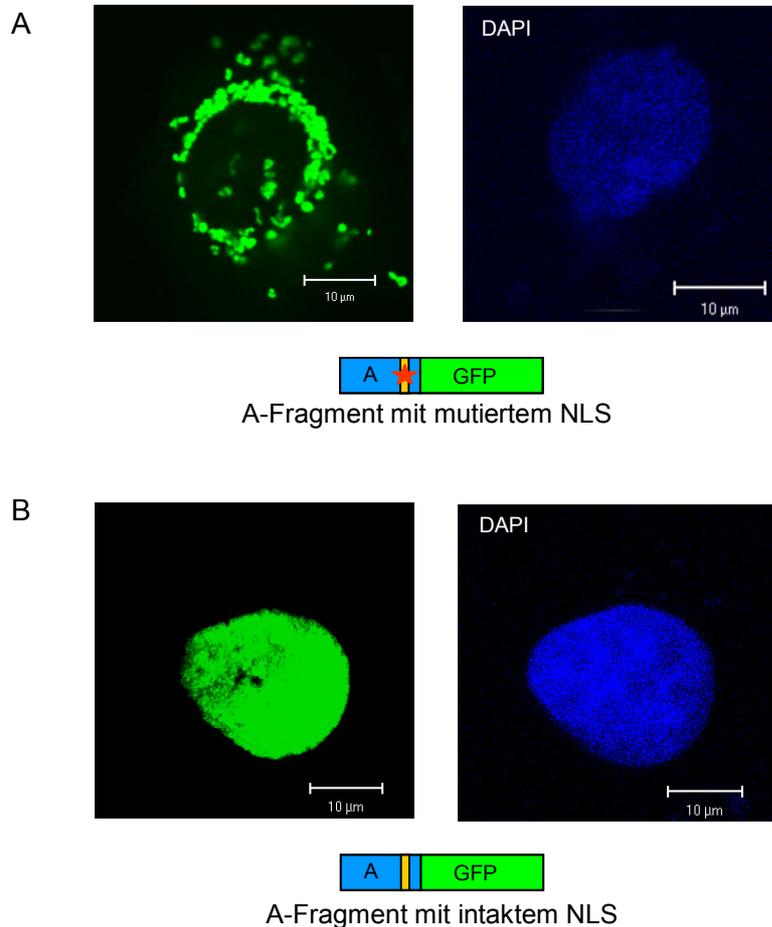


Abb. 53: Lokalisation des Fusionsproteins A_{NLSmut} in transfizierten COS-7-Zellen im Vergleich zur Lokalisation des Fusionsproteins A-Fragment mit intaktem NLS. Die COS-7-Zellen wurden mit dem Expressionsplasmid A_{NLSmut} -GFP (A) bzw. A-GFP (B) transfiziert. Die Zellen wurden 48 h nach Transfektion fixiert. Zu sehen ist die GFP-Fluoreszenz (grün), aufgenommen mit einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop. Die Anregung des GFP erfolgte mittels Argon Lasers bei 488 nm. Die DNA des Zellkerns ist mit DAPI blau gefärbt.

Das A-Fragment mit NLS-Mutation wird nicht mehr in den Zellkern transportiert, es ist außerhalb des Zellkerns lokalisiert (Abb. 53 A). In Abb. 53 B ist noch einmal deutlich zu sehen, dass das A-Fragment mit NLS ausschließlich im Zellkern lokalisiert ist. Dies bedeutet, dass die Zerstörung des NLS durch den Austausch von sechs Aminosäuren tatsächlich zu einem Funktionsverlust des NLS führte.

Nach diesem Kontrollexperiment wurde das NLS des m164-Gesamtproteins zerstört.

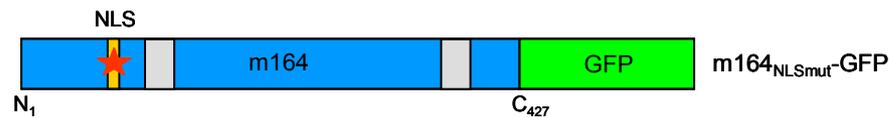


Abb. 54: Fusionsprotein m164_{NLSmut}-GFP mit zerstörter NLS. Als Klonierungsgrundlage wurde m164-GFP verwendet. Das m164 mit zerstörter NLS ist C-terminal mit GFP fusioniert. Das Expressionsplasmid m164_{NLSmut}-GFP kodiert für das gleichnamige Protein.

COS-7-Zellen wurden mit dem Plasmid m164_{NLSmut}-GFP transfiziert und fixiert. Dann wurde mit Hilfe des konfokalen Laser Scanning Mikroskops die Lokalisation von GFP detektiert.

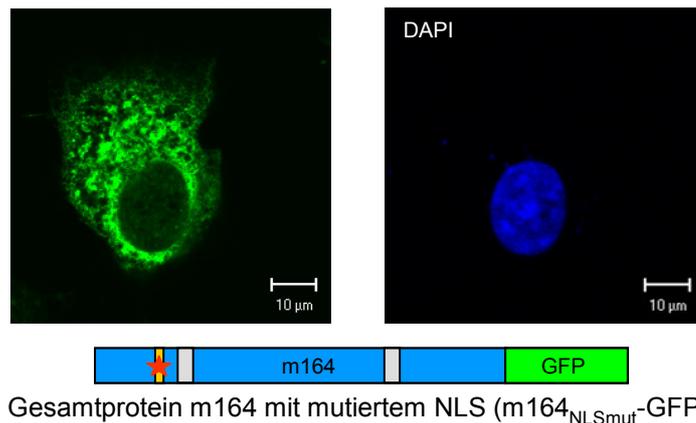


Abb. 55: Lokalisation des m164-Fusionsproteins mit zerstörter NLS. Laser Scanning Mikroskop-Aufnahme von COS-7-Zellen, die mit dem Plasmid m164_{NLSmut}-GFP transfiziert wurden. Die Zellen wurden 48 h nach Transfektion fixiert. Zu sehen ist die GFP-Fluoreszenz (grün), aufgenommen mit einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop. Die Anregung des GFP erfolgte mittels des Argon Lasers bei 488 nm. Die DNA des Zellkerns ist mit DAPI blau gefärbt.

Verglichen mit Abb. 49, welche die Lokalisation des GFP/m164-Fusionsproteins mit intaktem NLS zeigt, ist kein Unterschied zur Lokalisation von m164 mit mutiertem NLS erkennbar (Abb. 55). Wie erwartet hat die Zerstörung der NLS-Sequenz des m164-Proteins keinen Einfluss auf die Lokalisation des Proteins.

Schlussfolgerung:

Durch den Austausch der sechs Arginine gegen Alanine konnte das NLS von m164 erfolgreich zerstört werden. Im Gegensatz zum A-Fragment, das aufgrund des NLS in den Zellkern transportiert wird, hat das NLS des m164-Gesamtproteins keinen Einfluss auf die Lokalisation.

3.16 Bedeutung des C-Fragments mit Transmembrandomäne für die m164 Lokalisation in der Zelle

Aus den bisher gezeigten Ergebnissen geht noch nicht hervor, welcher Sequenzbereich von m164 für die spezifische Lokalisation in transfizierten Zellen verantwortlich ist. Das NLS und die erste Transmembrandomäne scheinen keinen Einfluss auf die typische m164 Lokalisation (Kernrandbereich und zytoplasmatisches Netzwerk) auszuüben. Da auch das

AB-Fragment nicht die typische Lokalisation aufweist, scheint das dafür verantwortliche Element im C-Teil von m164 zu liegen. Bereits gezeigt wurde, dass das 45 Aminosäuren umfassende lösliche C-Fragment, fusioniert mit GFP, homogen im Zytoplasma und Zellkern lokalisiert ist (Abb. 48 A). Eine Verlängerung dieses C-Fragments um die nächsten 28 Aminosäuren (diese enthalten die zweite Transmembrandomäne, AS 356-379, zuzüglich 5 weiterer Aminosäuren) am N-terminalen Ende könnte aufgrund der Transmembrandomäne eine veränderte Lokalisation zur Folge haben.

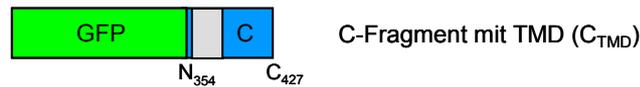
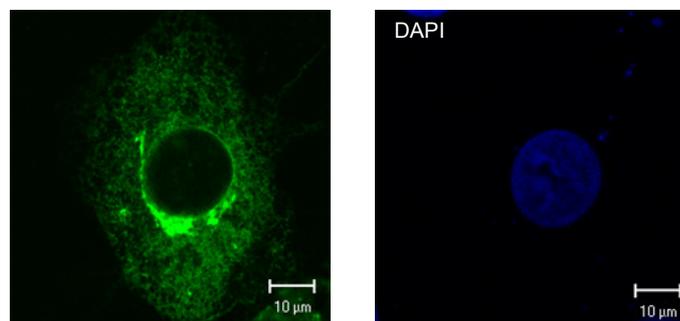


Abb. 56: Fusionsprotein des verlängerten C-Fragments. 28 Aminosäuren wurden an das N-terminale Ende des ursprünglichen C-Fragments angehängt. Diese Aminosäuren beinhalten die zweite Transmembrandomäne von m164 im Aminosäurebereich 356-379. Das gesamte Fragment wurde in den Vektor pEGFP-C1 kloniert, hier befindet sich das GFP am N-terminalen Ende des C-Fragments.



C-Fragment mit Transmembrandomäne

Abb. 57: Lokalisation des verlängerten C-Fragments (C_{TMD}) in transfizierten COS-7-Zellen. Die Zellen wurden 48 h nach Transfektion fixiert. Zu sehen ist die GFP-Fluoreszenz (grün), aufgenommen mit einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop. Die Anregung des GFP erfolgte mittels des Argon Lasers bei 488 nm. Die DNA des Zellkerns ist mit DAPI blau gefärbt.

Tatsächlich zeigte sich nach der Transfektion von COS-7-Zellen mit dem Plasmid C_{TMD} im Gegensatz zur Transfektion mit dem Fusionsprotein C/GFP die typische m164 Lokalisation: Kernrandfärbung und die netzartige Verteilung im Zytoplasma (Abb. 57).

Schlussfolgerung:

Das Fusionsprotein GFP/ C_{TMD} weist die charakteristische m164-Verteilung mit Kernrandfärbung und der netzartigen Verteilung im Zytoplasma auf, wie sie auch für das gesamte m164-Protein zu finden ist (Abb. 49). Daher scheint die zweite Transmembrandomäne, nahe des C-Terminus, für die spezifische Lokalisation von m164 in der Zelle verantwortlich zu sein.

3.17 Ursache der 38 kDa-Form von m164

Bereits unter Abschnitt 3.10 wurde versucht der Frage nachzugehen, warum das m164-Protein mit einer molekularen Masse von 38 kDa exprimiert wird. Obwohl die summierte Masse aller Aminosäuren der vom vorhergesagten ORF nach Rawlinson et al. (1996) abgeleiteten Proteinsequenz inklusive der einfachen Glykosylierung einer molekularen Masse von 48,6 kDa entsprechen müsste. Da die MALDI-TOF-MS Analysen aufgrund unzureichender Ausbeute an exprimiertem 38 kDa-Protein aus Sf-9 Zellen keine Ergebnisse brachten, wurde versucht, das Problem auf anderem Weg zu lösen: In der 5'-Region der m164-RNA gibt es neben dem von Rawlinson et al. (1996) vorhergesagten AUG zur Translationsinitiation zwei weitere Startcodons, im Protein an den Aminosäurepositionen 27 und 91, die auch als Translationsstart genutzt werden könnten. Um zu untersuchen, ob eine der beiden Alternativen tatsächlich als Initiationspunkt bei der Synthese des m164-Proteins dient, wurden zwei verkürzte Sequenz-Varianten beginnend am Methioninrest 27 bzw. Methioninrest 91 kloniert.

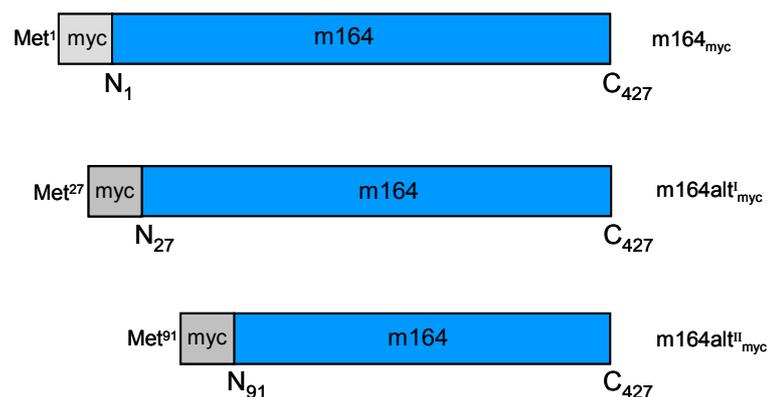


Abb. 58: Myc-markierte m164-Proteinvarianten unterschiedlicher Länge. Met¹, Met²⁷ und Met⁹¹ bezeichnen die Aminosäure-Position der Methioninreste. Die Methioninreste befinden sich in der vom vorhergesagten ORF nach Rawlinson et al. (1996) abgeleiteten Proteinsequenz. Die jeweiligen m164-Konstrukte wurden in den *Tag*-freien pcDNA3.1(+) Vektor kloniert. Der *myc-Tag* wurde über PCR jeweils N-terminal an das m164-Konstrukt angefügt. Die hier dargestellten Proteine sind auf gleichnamigen Expressionsplasmiden kodiert.

Die Konstrukte wurden in den Vektor pcDNA3.1 (+) kloniert. Dieser Vektor kodiert für keinen *Tag*. Den Konstrukten m164_{myc}, m164alt^I und m164alt^{II} wurde über PCR die für einen *myc-Tag* kodierende Sequenz direkt hinter dem jeweiligen Start-ATG angehängt.

Bei Nutzung des ersten Startcodons (m164_{myc}) umfasst der klonierte Bereich von m164 1281bp, was 427 Aminosäuren mit einer berechneten molekularen Masse von 46,6 kDa entspricht. Wird das AUG als Startcodon genutzt, das dem zweiten Methionin des ORF_{m164} Genproduktes entspricht (m164alt^I_{myc}), ergibt sich für das korrespondierende Produkt von 400 Aminosäuren eine errechnete molekulare Masse von 43,7 kDa. Bei Nutzung des AUG als Startcodon, das dem dritten Methionin des ORF_{m164} Genproduktes entspricht

(m164alt^{II}_{myc}), wird die molekulare Masse des exprimierten Proteins auf 36,1 kDa (337 AS) reduziert.

COS-7-Zellen wurden mit den jeweiligen Expressionsplasmiden transfiziert. Anschließend wurde eine Gesamtproteinisolierung durchgeführt. Die Gesamtproteinlysate wurden unter Verwendung der α -myc und α -m164 Antikörper im Western Blot analysiert.

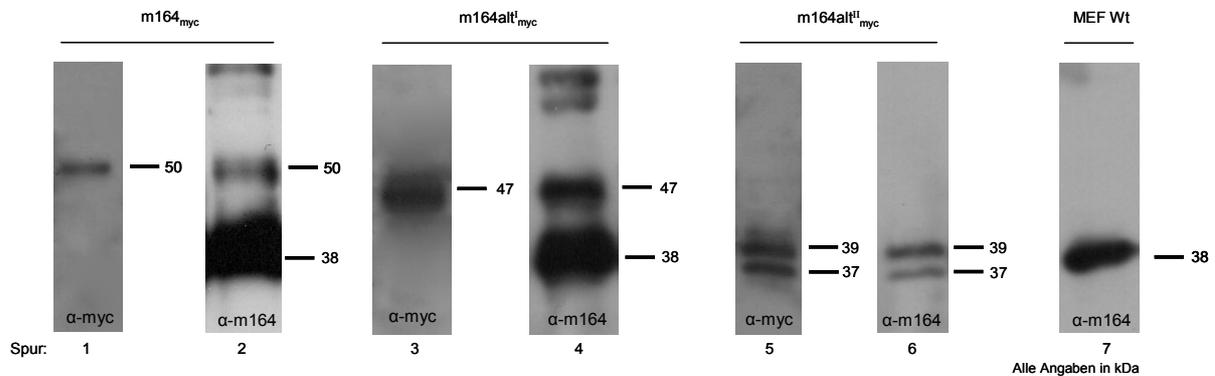


Abb. 59: Western Blot der m164-Proteine mit alternativen Start-Methioninen. Der Western Blot wurde mit Gesamtproteinlysat aus COS-7-Zellen, transfiziert mit den Expressionsplasmiden m164_{myc}, m164alt^I_{myc} und m164alt^{II}_{myc} durchgeführt. Die Proteine der jeweiligen Gesamtproteinlysate, 30 μ g je Spur, wurden in SDS Polyacrylamidgelen aufgetrennt (12,5%), auf eine Membran geblottet und die myc-tragenden sowie *Tag*-freien m164-Proteine schließlich mit α -myc (Spur 1, 3, 5) bzw. α -m164 Antikörper (Spur 2, 4, 6) nach ECL-Entwicklung nachgewiesen. Gesamtproteinlysat aus mit WT-mCMV infizierten MEF diente als Größenkontrolle des m164-Proteins und wurde mit dem α -m164 Antikörper detektiert (Spur 7).

Erläuterung des Western Blots aus Abb. 59:

Das m164_{myc}-Protein:

Der α -myc Antikörper detektiert das myc-markierte m164-Protein bei einer apparenten molekularen Masse von 50 kDa (Spur 1), die sich aus der errechneten molekularen Masse der 427 Aminosäuren (46,6 kDa) ergibt, zuzüglich der Masse von 1 kDa für den myc-*Tag* sowie weiteren 2 kDa für die Glykosylierung (siehe 3.13.1, Abb. 42). Auf einer Höhe von 38 kDa konnte der α -myc Antikörper kein Protein detektieren.

In Spur 2 konnte mit dem α -m164 Antikörper neben der 50 kDa-Bande eine weitere Bande bei 38 kDa detektiert werden, die auf der gleichen Höhe zu finden war, wie das m164-Protein aus dem Gesamtproteinlysat der mit WT-mCMV infizierten MEF.

In dem Gesamtproteinlysat der mit m164_{myc} transfizierten COS-7-Zellen existieren also zwei m164-Proteinvarianten: Eine Variante mit einer molekularen Masse von 38 kDa und eine Variante von 50 kDa.

Das m164alt^I_{myc}-Protein:

COS-7-Zellen, transfiziert mit dem Plasmid m164alt^I_{myc}, exprimieren m164 sowohl mit einer molekularen Masse von 38 kDa als auch von 47 kDa. Der α -myc und auch der α -m164 Antikörper erkennen beide das 47 kDa-Protein (Spur 3 und 4). Bei der 47 kDa-Bande handelt

es sich um das m164-Protein, dessen molekulare Masse sich aus den 400 Aminosäuren (43,7 kDa) zuzüglich der molekularen Masse von 1 kDa für den myc-Tag und 2 kDa für die Glykosylierung zusammensetzt. Mittels α -m164 Antikörper ist zusätzlich das 38 kDa m164-Protein detektierbar (Spur 4), das augenscheinlich ohne myc-Tag exprimiert wird.

Das m164alt^{II}_{myc}-Protein:

Wird das AUG als Startcodon genutzt, das dem dritten Methionin des ORF*m164* Genproduktes entspricht (m164alt^{II}_{myc}), erhält man in einem Western Blot sowohl unter Verwendung des α -myc als auch des α -m164 Antikörpers jeweils eine Bande bei 39 kDa. Dies entspricht der glykosylierten Form inklusive myc-Tag des 337 Aminosäuren großen m164-Proteins (36,1 kDa, plus 1 kDa für den myc-Tag plus 2 kDa für die Glykosylierung). In der Bande bei 37 kDa könnte die unglykosylierte Form des 39 kDa-Proteins enthalten sein (Spur 5 und 6).

Zum Vergleich der molekularen Massen der myc-markierten Proteine mit alternativen Startcodons und dem WT-m164-Protein wurde in Spur 7 Gesamtproteinlysate aus mit WT-mCMV infizierten MEF aufgetragen und das m164-Protein mit dem α -m164 Antikörper detektiert. Wie erwartet konnte das WT-m164 Protein mit einer apparenten molekularen Masse von 38 kDa nachgewiesen werden.

Schlussfolgerung:

Wird das dritte AUG (was dem Methioninrest an Aminosäureposition 91 entspricht) des transkribierten ORF*m164* als Startcodon verwendet (m164alt^{II}_{myc}), hat das translatierte Produkt eine molekulare Masse von 39 kDa. Diese molekulare Masse, abzüglich der 1 kDa für den myc-Tag, entspricht der molekularen Masse des WT-m164 Proteins von 38 kDa. Daraus folgt, dass der tatsächliche Startpunkt der Translation 273 Nukleotide weiter Richtung 3'-Ende der RNA liegt. Entgegen der Vorhersage von Rawlinson et al. (1996) umfasst der ORF*m164* nur die Nukleotide n222.366 bis n223.376 im WT-mCMV und wird in der korrigierten Form neu definiert. Da das NLS außerhalb des neu definierten ORF*m164* liegt, können als Konsequenz m164-Proteine keine NLS besitzen. Das m164 Genprodukt ist demnach 337 Aminosäuren groß und hat eine apparente molekulare Masse von 38 kDa im SDS-Gel.

3.18 Kolokalisationsexperimente

Die sich aus den Transfektions- und Infektionsexperimenten ergebenden Befunde zur Lokalisation des m164-Proteins aus Abb. 49, 50 und 51 weisen auf eine Assoziation von m164 mit zellulären Kompartimenten mit netzartiger Struktur hin. Nun sollten diese

Zellkompartimente identifiziert werden. Dazu wurden MEF mit m164HA3'-mCMV infiziert und das m164-Protein mit dem α -m164 Antikörper detektiert. Außerdem wurden in diesen Zellen spezifische Proteine unterschiedlicher Zellkompartimente (Markerproteine) mit Antikörpern detektiert. Die mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenzdoppelfärbung markierten Proteine wurden mit Hilfe des Laser Scanning Mikroskops sichtbar gemacht. Durch das Übereinanderlegen der Fluoreszenzsignale der Sekundärantikörper (*merge*), die zum einen an den α -m164 Antikörper und zum anderen an den spezifischen Markerprotein-Antikörper gebunden haben, konnte eine mögliche Kolokalisation von m164 mit einem jeweiligen zellulären Markerprotein überprüft werden. Im Falle einer Kolokalisation kommt es zu einer Superposition der jeweils gewählten Fluoreszenzsignalfarben (hier grün und rot) zu einer Farbe (gelb), vorausgesetzt die Farbpixel der Fluoreszenzsignale liegen exakt übereinander.

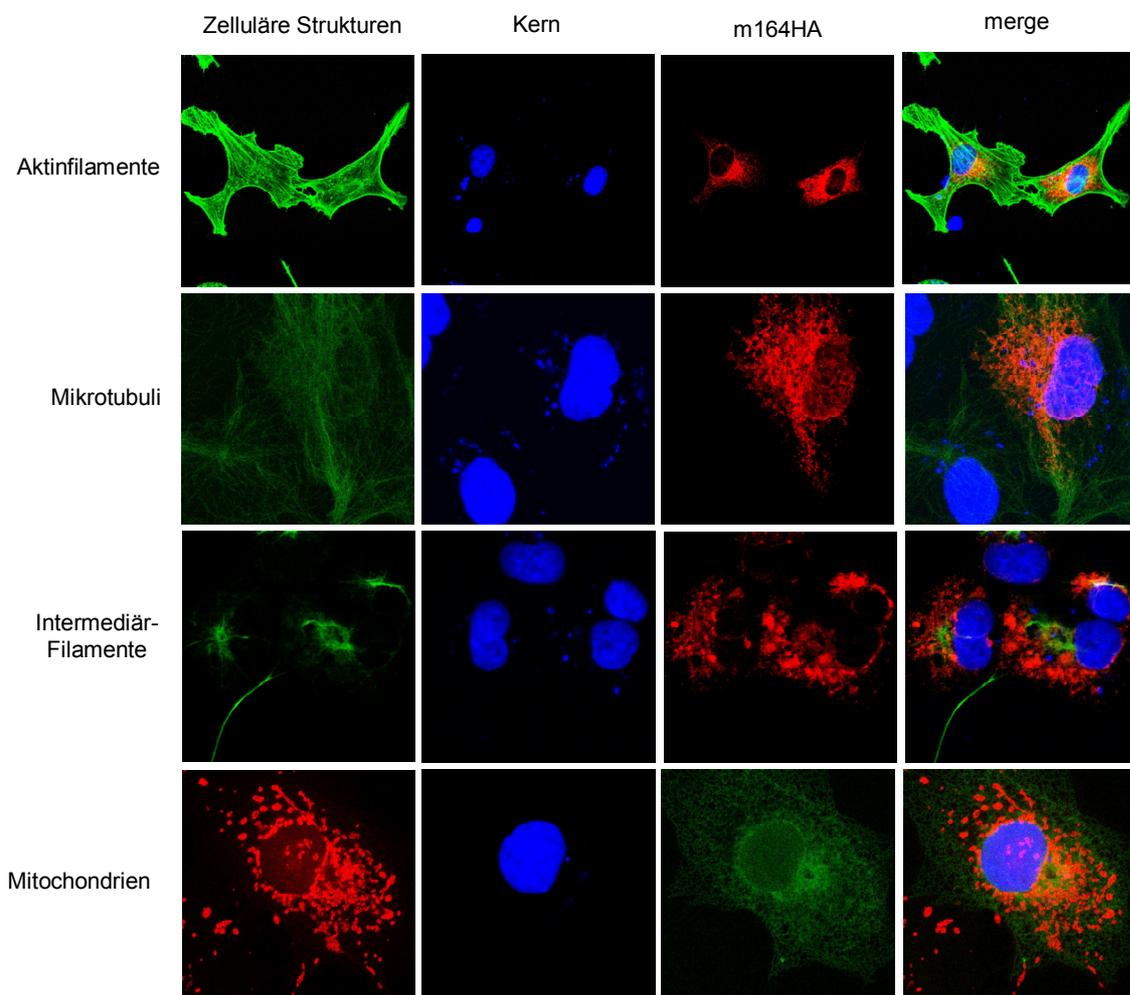


Abb. 60: Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von m164-HA3'-mCMV infizierten MEF. MEF wurden 6 h p.i. fixiert und mit jeweils unterschiedlichen Antikörpern, gerichtet gegen typische Proteine zellulärer Strukturen (Markerproteine), inkubiert: Die verwendeten Primärantikörper waren: FITC-Phalloidin (Aktinfilamente), α -Tubulin Antikörper (Mikrotubuli), α -Vimentin Antikörper (Intermediärfilamente) und der Lebendfarbstoff MitoTracker (Mitochondrien). Entweder wurden mit Alexa Fluor 546 (rote Fluoreszenz) oder mit Alexa Fluor 488 (grüne Fluoreszenz) konjugierte Sekundärantikörper eingesetzt. Die rote bzw. grüne Alexa Fluor Fluoreszenz wurde mittels konfokalem Laser Scanning Mikroskop (bestückt mit einem Argonlaser, um das konjugierte Fluorophor mit 546nm bzw. 488nm anzuregen) detektiert. Die Färbung der DNA im Zellkern erfolgte mit DAPI. In

der Spalte *merge* wurden die Fluoreszenzsignale der Sekundärantikörper, gebunden an die jeweiligen Primärantikörper, übereinander gelegt.

Zwischen den in Abb. 60 dargestellten zellulären Kompartimenten und m164 konnte keine Kolokalisation nachgewiesen werden. Bei keinem der detektierten Markerproteine konnte eine netzartige Verteilung im Zytoplasma oder eine mit m164 identische Lokalisation identifiziert werden.

In weiteren indirekten Immunfluoreszenzfärbungen konnten jedoch spezifische Kolokalisationen von Emerin (α -Emerin Antikörper), LaminB2 (α -LaminB2 Antikörper), Calnexin (α -Calnexin Antikörper) und der Protein Disulfid Isomerase (PDI) (α - PDI Antikörper) mit m164 mit Hilfe des Programms ImageJ detektiert werden.

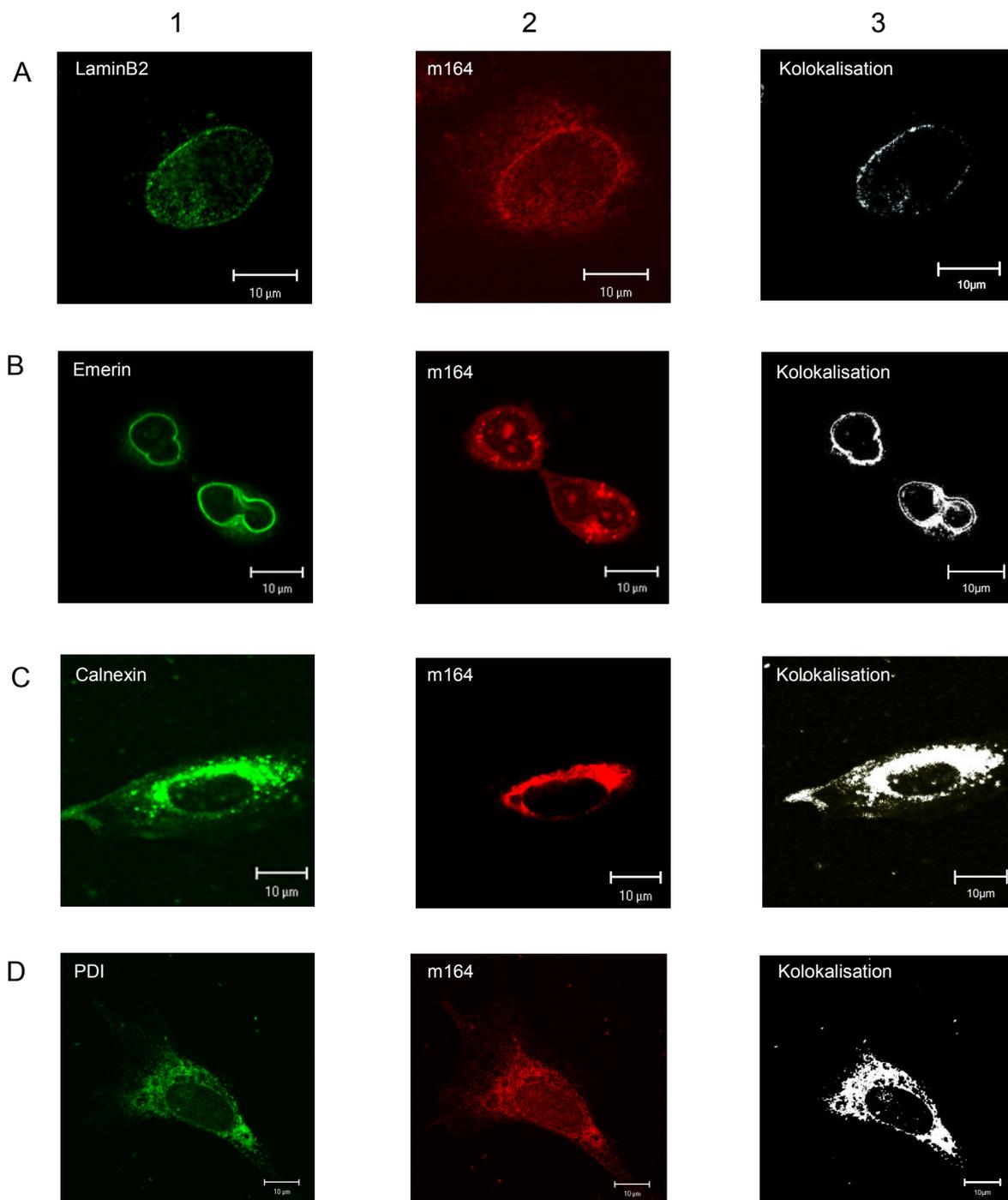


Abb. 61: Kolokalisation von m164 mit LaminB2 (A), Emerin (B), Calnexin (C) und Protein Disulfid Isomerase (PDI) (D). MEF wurden mit WT-mCMV infiziert und 6 h p.i. fixiert. Für die indirekte Immunfluoreszenzfärbung wurden die Antikörper α -LaminB2 (A), α -Emerin (B), α -Calnexin (C) und α -PDI (D) verwendet (Spalte 1 von oben nach unten). Das m164-Protein wurde mit Hilfe des α -m164 Antikörpers detektiert (Spalte 2). In Spalte 3 wurden Fluoreszenzsignale übereinander gelegt. Unter Verwendung des Auswertprogrammes ImageJ wurden die Bereiche berechnet, in denen sowohl m164 als auch das jeweilige Markerprotein lokalisiert sind (weiße Bereiche).

Während LaminB2 (Abb. 61, Reihe A) nur im Kernrandbereich exprimiert wird und somit auch nur dort mit m164 kolokalisieren kann, findet die Kolokalisation von m164 mit Emerin, Calnexin und PDI neben dem Kernrandbereich auch zum Teil im Zytoplasma statt. Es ist bekannt, dass Emerin ein Protein der inneren Kernmembran ist (Georgatos, 2001) und

LaminB2 ein Bestandteil der Kernlamina, welche sich als eine Art Matrix zwischen innerer Kernmembran und Chromatin befindet (Wolfner & Wilson, 2001, Goldman et al., 2002).

Schlussfolgerung:

Das m164-Protein kolokalisiert in indirekten Immunfluoreszenzfärbungen mit einem Bestandteil der Kernlamina, LaminB2, mit einem Protein der inneren Kernmembran, Emerin, sowie mit den ER-Markerproteinen Calnexin und PDI.

3.19 Überprüfung einer möglichen Protein-Protein Interaktion zwischen m164 und LaminB2 sowie Emerin mittels Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer

Aufgrund des Befundes der Kolokalisation von m164 mit Komponenten der Kernhülle, (Emerin und LaminB2) war es notwendig zu prüfen, ob hierbei eine direkte Interaktion der jeweiligen Proteine vorliegt. Da man mit indirekten Immunfluoreszenz Analysen nicht in der Lage ist, die einzelnen Strukturen ausreichend hoch aufzulösen, um echte Protein-Protein Wechselwirkungen nachweisen zu können, sind andere Methoden erforderlich. Zusätzlich könnten Informationen über direkte Interaktionen mit Proteinpartnern Hinweise auf die Funktion des m164-Proteins im Kontext einer WT-mCMV-Infektion liefern. Zu diesem Zweck wurden Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET) Experimente mit diesen Proteinen durchgeführt.

Als Donor-Akzeptor FRET Paar wurde die blaue (*cyan*, CFP) und die gelbe (*yellow*, YFP) Variante des GFP genutzt und diese wurden mit den zu untersuchenden Proteinen fusioniert. Damit FRET stattfinden kann, müssen die FRET Paare in enger räumlicher Nähe liegen (unter 10 nm), Emissions- und das Exzitationsspektrum von Donor und Akzeptor überlappen und beide die richtige Orientierung zueinander haben. Wird dann das Donor-Fluorophor mit der entsprechenden Wellenlänge angeregt, kann ein strahlungsloser Energietransfer vom Donor auf den Akzeptor stattfinden. Dies führt zu einer Fluoreszenz-Emission des Akzeptors, während die Donor-Emission gequencht wird (Abb. 62 A).

Zur Detektion von FRET wurde die Akzeptor-Fotobleich Methode eingesetzt (zur Übersicht siehe Wouters et al. 2001; Karpova et al., 2003; Verveer et al. 2005). Dabei wird das Akzeptor-Fluorophor YFP irreversibel ausgebleicht (Abb. 62 B), wodurch es seine Fähigkeit der strahlungslosen Energieaufnahme komplett verliert. Das Bleichen des Akzeptors führt dann zu einer Verstärkung der Fluoreszenzintensität des Donors, da diese nicht mehr gequencht wird.

Eine andere Methode FRET zu detektieren ist die Messung der Zunahme der YFP-Fluoreszenz (*sensitized emission*). Das YFP-Signal sollte dabei ohne Anregung fehlen und

erst beim Austreten von FRET detektierbar werden. Da YFP und CFP in der Zelle immer als Fusionsproteine koexprimiert werden, ist es nicht möglich, die YFP-Fluoreszenz vor und nach Zugabe des CFP zu bestimmen. In der Praxis hat sich deswegen die Akzeptor-Fotobleich Methode als die sensitivere und zuverlässigere Methode erwiesen.

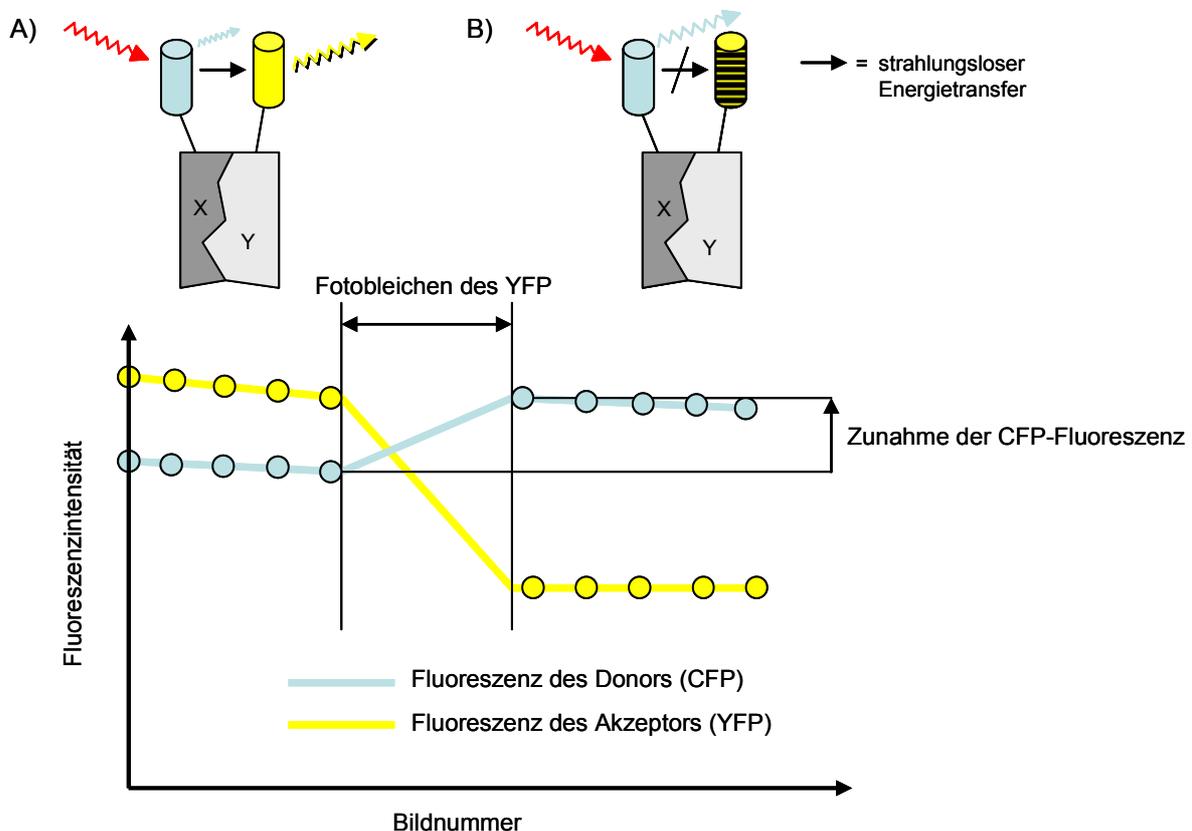


Abb. 62: Schematische Darstellung des Prinzips der Akzeptor-Fotobleich Methode. Vor dem Bleichschritt ist ein Energietransfer von Donor-Fluorophor auf Akzeptor-Fluorophor möglich, falls die FRET Paare in räumlicher Nähe und Orientierung zueinander stehen. Durch den Energietransfer wird das Akzeptor-Fluorophor energetisch angeregt und emittiert Fluoreszenz (A). Nach dem Bleichen ist kein Energietransfer auf den Akzeptor mehr möglich. Die Energie, die vor dem Bleichen auf den Akzeptor übertragen wurde, wird nun vom Donor-Fluorophor selbst emittiert, da dieses nicht mehr durch den Akzeptor gequencht wird (B). Dargestellt sind Fusionsproteine X und Y, fusioniert mit CFP bzw. YFP.

3.19.1 Expression der für die Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer Experimente vorgesehenen Fusionsproteine in COS-7-Zellen

Um die Fusionsproteine klonieren zu können, musste zuerst die DNA für murines LaminB2 und Emerin als PCR-*Template* zur Verfügung stehen.

Murines LaminB2 wurde vom RZPD (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung) als cDNA bezogen (IRAVp968C1187D6), über PCR amplifiziert und in die Vektoren pECFP-C1, pECFP-N1, pEYFP-N1 und pEYFP-C1 kloniert:

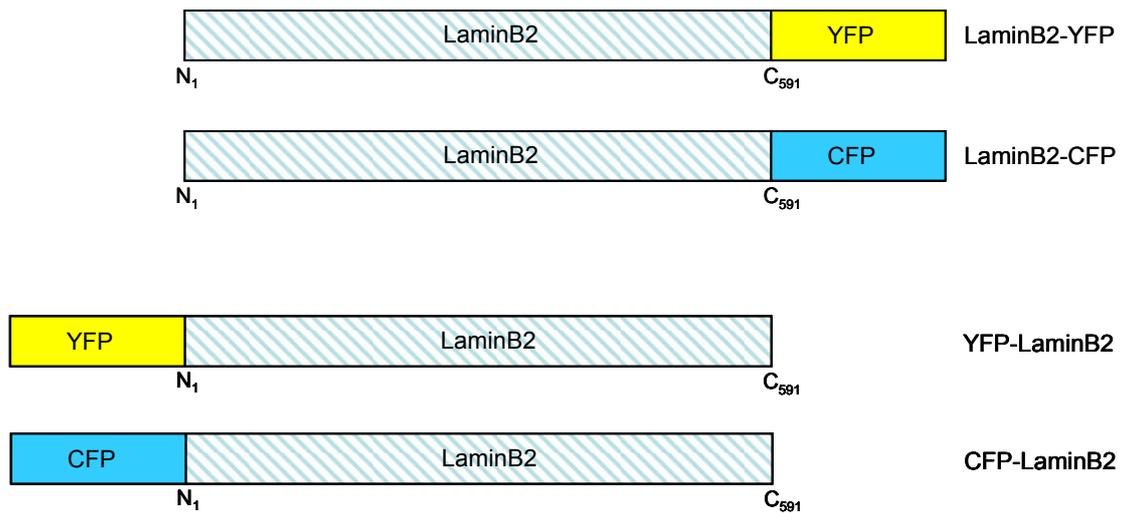


Abb. 63: Fusionsproteine aus LaminB2 und YFP oder CFP. Murines LaminB2 wurde entweder C- oder N-terminal mit YFP oder CFP fusioniert. COS-7-Zellen wurden mit den gleichnamigen Expressionsplasmiden, welche für die hier dargestellten Fusionsproteine kodieren, transient transfiziert.

Murines Emerin wurde über RT-PCR aus MEF-RNA amplifiziert und in die Vektoren pECFP-N1 und pEYFP-N1 kloniert.

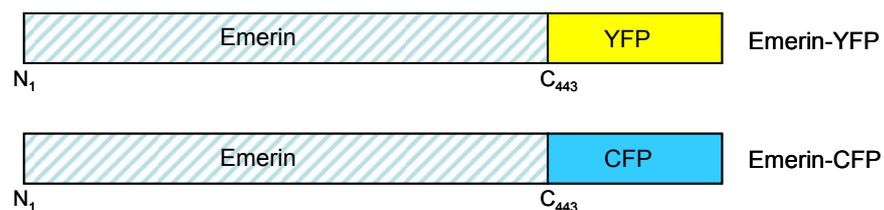


Abb. 64: Fusionsproteine aus Emerin und YFP oder CFP. Murines Emerin wurde C-terminal mit YFP und CFP fusioniert. COS-7-Zellen wurden mit den gleichnamigen Expressionsplasmiden, welche für die hier dargestellten Fusionsproteine kodieren, transient transfiziert.

Der nach Rawlinson vorhergesagte ORF*m164* wurde in die gleichen Vektoren wie LaminB2 kloniert.

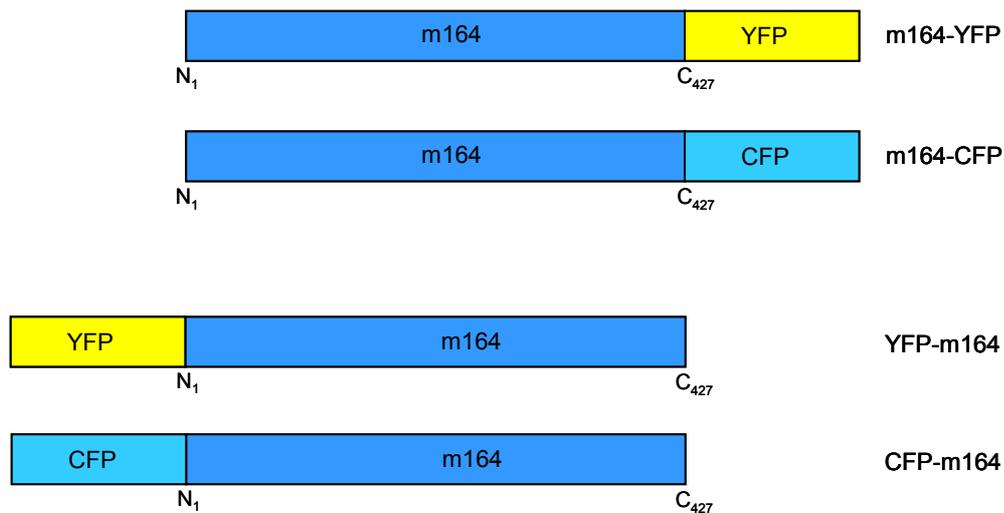


Abb. 65: Fusionsproteine aus m164 und YFP oder CFP. m164 wurde entweder C- oder N-terminal mit YFP oder CFP fusioniert. COS-7-Zellen wurden mit den gleichnamigen Expressionsplasmiden, welche für die hier dargestellten Fusionsproteine kodieren, transient transfiziert.

COS-7-Zellen wurden jeweils mit Expressionsplasmiden, die für die dargestellten Fusionsproteine (Abb. 63, 64, 65) kodieren, transient transfiziert, um die Transfektionseffizienz sowie das Expressionsniveau der Fusionsproteine zu ermitteln. Um FRET Experimente durchführen zu können, müssen die rekombinanten Fusionsproteine aus LaminB2, Emerin, m164 und CFP sowie YFP die gleiche Lokalisation in transfizierten COS-7-Zellen haben, wie es in Abb. 61 für die nativen Proteine LaminB2, Emerin und m164 in infizierten MEF mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenzfärbung gezeigt wurde. LaminB2 sollte demnach nur im Kernrandbereich vorkommen, m164 und Emerin sollten neben dem Kernrandbereich zusätzlich netzartig im Zytoplasma lokalisiert sein.

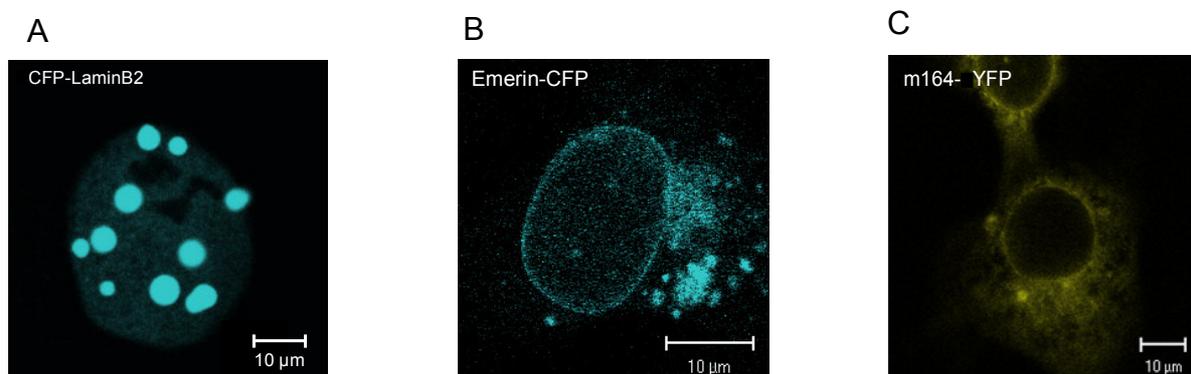


Abb. 66: Die Expression der Fusionsproteine. Konfokale Laser Scanning Aufnahmen. COS-7-Zellen wurden mit folgenden Expressionsplasmiden transfiziert: A: CFP-LaminB2. B: Emerin-CFP. C: m164-YFP. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen fixiert. Mit Hilfe des konfokalen Laser Scanning Mikroskops konnte die zelluläre Lokalisation der Fusionsproteine analysiert werden. Die CFP-Fusionsproteine sind hier hellblau dargestellt, die YFP-Fusionsproteine gelb. Es ist jeweils eine repräsentative Zelle abgebildet. In A ist deutlich zu erkennen, dass das Fusionsprotein CFP-LaminB2

ausschließlich kugelartig im Zellkern lokalisiert ist. Die Fusionsproteine Emerin-CFP und m164-YFP sind im Kernrandbereich und im Zytoplasma lokalisiert (B und C).

In CFP-LaminB2 exprimierenden COS-7-Zellen konnte die CFP-Fluoreszenz ausschließlich im Zellkern detektiert werden. Eine für LaminB2 typische Kernrandfärbung ist nicht erkennbar. Auch die N- und C-terminalen Fusionsproteine aus CFP sowie YFP mit LaminB2 zeigten das gleiche Ergebnis; die Lokalisation der LaminB2-Proteine war lediglich in Form runder Strukturen im Zellkern (Abb. 66 A) erkennbar. Da es sich hierbei um ein Transfektionsartefakt aufgrund der Überexpression in COS-7-Zellen handelt, konnten keine FRET Experimente mit den Lamin-Fusionsproteinen durchgeführt werden.

Das Fusionsprotein Emerin-CFP zeigte dagegen nach Transfektion eine dem nativen Protein entsprechende Verteilung im Zytoplasma (Abb. 66 B) und die typische Kernrandlokalisation. Auch das Fusionsprotein Emerin-YFP zeigte diese Lokalisation in transfizierten COS-7-Zellen (nicht gezeigt).

Die Lokalisation des Fusionsproteins m164-YFP in transfizierten COS-7-Zellen entsprach der charakteristischen Verteilung des m164-Proteins im Kernrandbereich und als netzartige Struktur im Zytoplasma, wie es bereits für transfizierte (Abb. 49) und infizierte Zellen (Abb. 51) gezeigt wurde. Das Fusionsprotein m164-CFP zeigte eine identische Expression und Verteilung wie sie in Abb. 66 C gezeigt ist. Die Transfektion von COS-7-Zellen mit den Expressionsplasmiden für CFP-m164 und YFP-m164 führte allerdings zu einer untypischen subzellulären Verteilung der Fusionsproteine. Es konnten ausschließlich runde Strukturen im Zellkern detektiert werden. Deshalb wurden diese beiden Konstrukte nicht für FRET Experimente verwendet. In allen folgenden Versuchen wurde ausschließlich mit den Konstrukten m164-CFP und m164-YFP gearbeitet.

Schlussfolgerung:

Für FRET Messungen geeignete Fusionsproteine sind Emerin-YFP/CFP und m164-YFP/CFP. Die anderen Fusionsproteine zeigten eine aufgrund der Überexpression ungewöhnliche Lokalisation in runden Strukturen innerhalb des Zellkerns der transfizierten COS-7-Zellen.

3.19.2 Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer Analyse des Kontrollproteins YFP-CFP

Als FRET Positivkontrolle wurde ein Fusionsprotein aus CFP und YFP verwendet, bei dem die beiden Fluorophore durch einen Peptidlinker (n=15) voneinander getrennt sind. Durch diesen Abstandshalter wird gewährleistet, dass die Proteine in korrekter räumlicher Nähe

zueinander stehen, damit ein Energietransfer von CFP auf YFP stattfinden kann. Dieses Konstrukt wurde freundlicherweise von D. Strand zur Verfügung gestellt.



Abb. 67: FRET Positivkontrolle. Fusionsprotein aus YFP und CFP. Die Fluorophore sind über einen Peptidlinker von 15 Aminosäure-Resten miteinander verbunden. COS-7-Zellen wurden mit einem Expressionsplasmid transfiziert (YFP-CFP), welches für dieses Fusionsprotein kodiert.

Um FRET Messungen durchführen zu können, wurden COS-7-Zellen mit zwei Plasmiden, mit Emerin und m164, fusioniert mit CFP bzw. YFP, kotransfiziert.

FRET wurde über die Akzeptor-Fotobleich Methode bestimmt, wobei die relative Fluoreszenzintensität des Donor Fluorophors (CFP) vor und nach dem Fotobleichen des Akzeptor Fluorophors (YFP) detektiert wurde. Gemessen wurde in den Zellbereichen, die eine Kolokalisation von CFP und YFP aufwiesen. Je nach Fragestellung wurden Mehrfachmessungen an mehreren Zellen durchgeführt. Exemplarisch ist im Folgenden eine Messung gezeigt. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels Zeiss LSM 510 Meta Software. Als Positivkontrolle wurden COS-7-Zellen mit dem Kontrollplasmid YFP-CFP transfiziert:

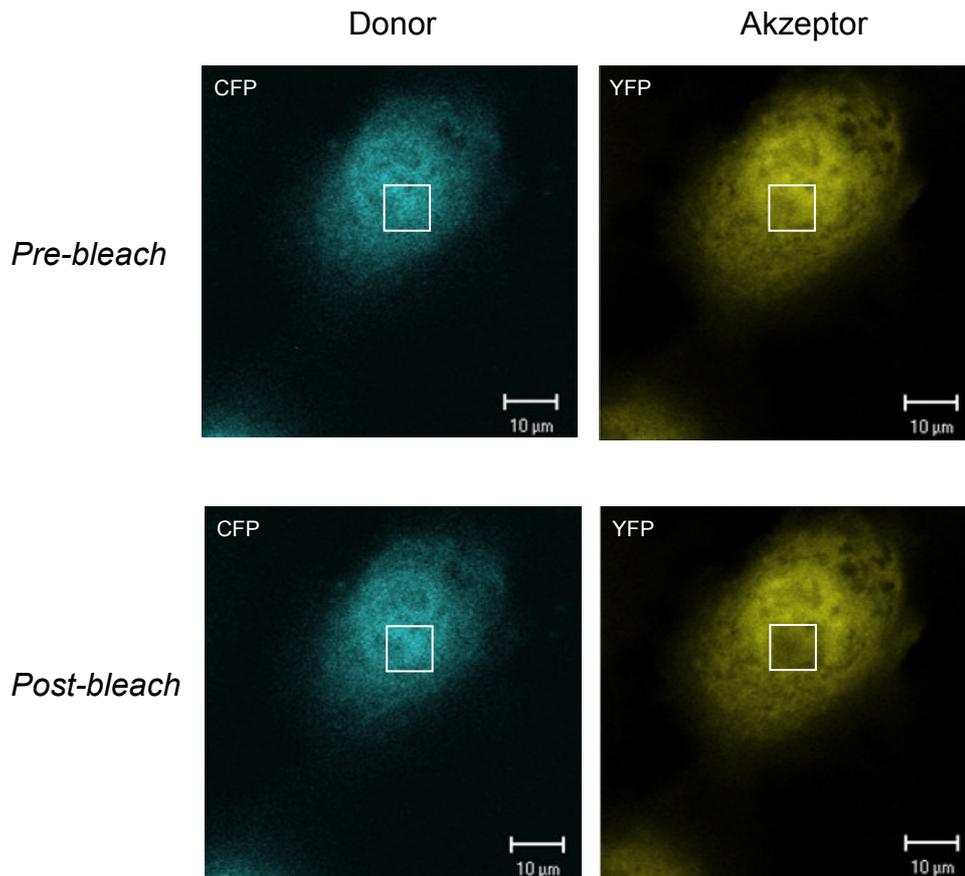


Abb. 68: FRET Interaktion zwischen CFP und YFP. Gezeigt sind COS-7-Zellen, die das Fusionsprotein YFP-CFP exprimieren, aufgenommen mit einem konfokalen Zeiss LSM 510 Meta. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen fixiert. Die FRET Interaktion wurde über das Fotobleichen des YFP innerhalb der weißen Box ($90\mu\text{m}^2$) detektiert. Das YFP wurde mittels eines Argon Lasers bei einer Wellenlänge von 514nm gebleicht. Zu sehen sind Aufnahmen der CFP-YFP Fluoreszenz vor (obere Reihe, *pre-bleach*) und nach dem Akzeptor-Fotobleich Prozess (untere Reihe, *post-bleach*).

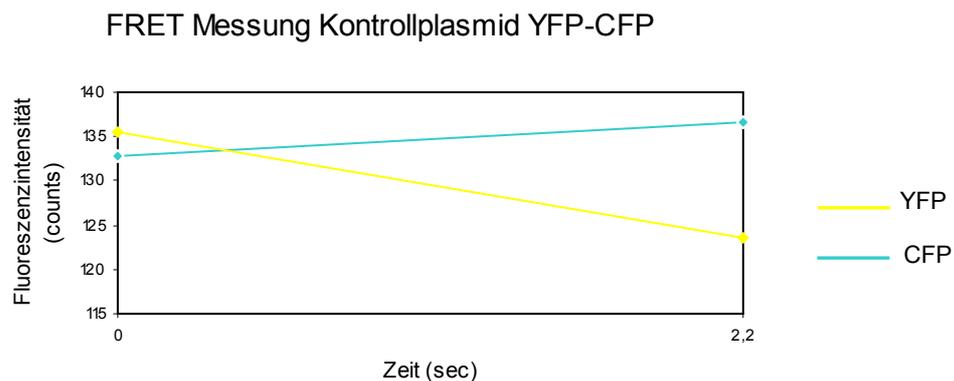


Abb. 69: Spektrale Änderung nach dem Akzeptor-Fotobleichen. Das Diagramm zeigt die Abnahme der Fluoreszenzintensität des Akzeptors YFP und die Zunahme der Fluoreszenzintensität des Donors CFP nach dem Fotobleich-Prozess. Die y-Achse zeigt die Fluoreszenzintensität des YFP und CFP, auf der x-Achse ist die Zeit in sec vor (0 sec) und nach (lediglich der Zeitpunkt 2,2 sec) dem Bleichvorgang dargestellt.

Abb. 68 zeigt die Laser Scanning Mikroskop-Aufnahmen von fixierten COS-7-Zellen, die das Fusionsprotein YFP-CFP exprimieren. Das Bild wurde vor (obere Reihe, *pre-bleach*) und kurz nach dem Fotobleichen des YFP (untere Reihe, *post-bleach*) aufgenommen. War das

YFP gebleicht, stieg die Fluoreszenz des CFP in diesem Bereich (untere Reihe, weiße Box, *post-bleach*; Abb. 68) an, was auf eine direkte FRET Interaktion zwischen CFP und YFP hinweist. Die Abb. 69 zeigt die Zunahme der Fluoreszenzintensität des CFP während gleichzeitig die Fluoreszenzintensität des YFP abfällt. Nach dem Bleichen des YFP kann kein strahlungsloser Energietransfer von CFP auf YFP stattfinden, als Folge steigt die Fluoreszenzintensität des Donors an. Die hier dargestellten Messergebnisse bestehen aus nur zwei Zeitwerten. Durch das mehrmalige Wiederholen dieser Messung an verschiedenen Zellen, konnte ein Energietransfer zwischen CFP und YFP bestätigt werden.

Schlussfolgerung:

In COS-7-Zellen, die das Fusionsprotein CFP-YFP exprimierten, konnte ein Energietransfer zwischen CFP und YFP nachgewiesen werden. Mit diesem Protein sind FRET Effizienzen von 20-40% zu erreichen.

3.19.3 Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer Analyse zwischen Emerin-CFP und m164-YFP

Eine potentielle FRET Interaktion zwischen Emerin-CFP und m164-YFP sollte mit Hilfe der Akzeptor-Fotobleich Methode analysiert werden. Dazu wurden COS-7-Zellen verwendet, die transient kotransfiziert wurden, um sowohl m164-YFP als auch Emerin-CFP zu exprimieren.

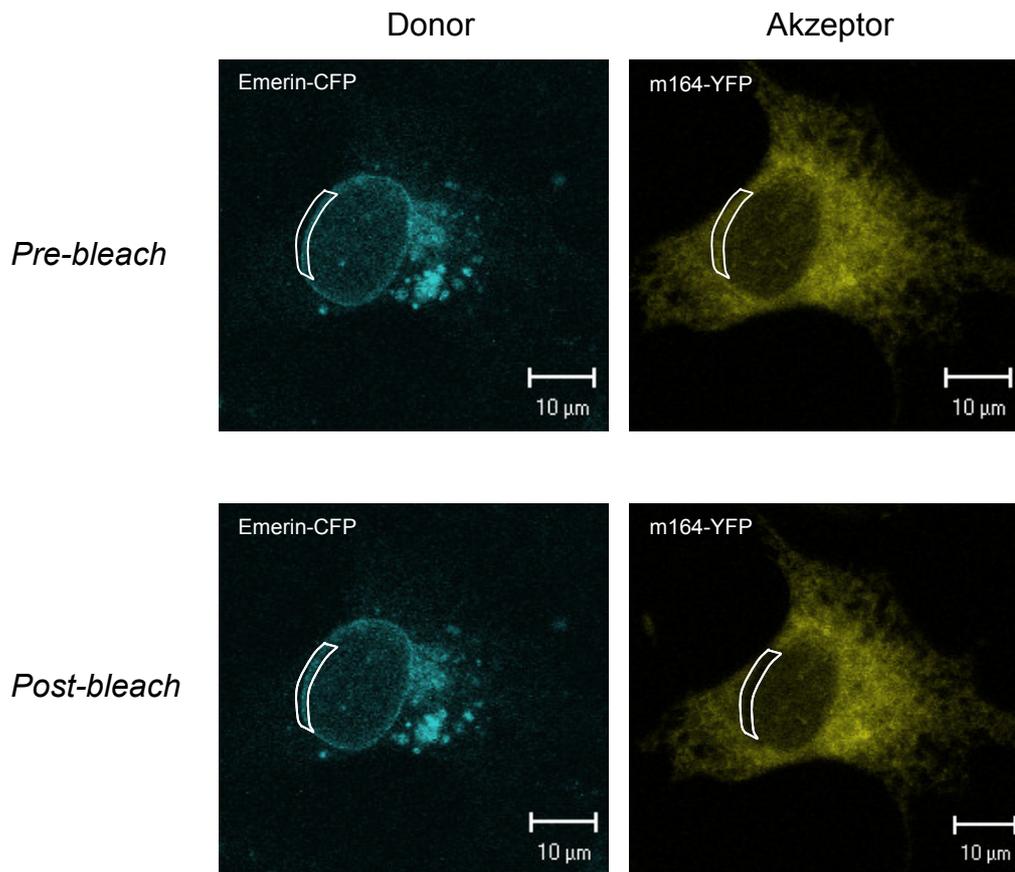


Abb. 70: Potentielle FRET Interaktion zwischen Emerin-CFP und m164-YFP. COS-7-Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden Emerin-CFP und m164-YFP kotransfiziert, welche für die gleichnamigen Fusionsproteine kodieren. Die gezeigten Abbildungen wurden mit einem konfokalen Zeiss LSM 510 Meta aufgenommen. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen fixiert. Die FRET Interaktion wurde über das Fotobleichen des YFP innerhalb der weißen Box am Kernrand ($100\mu\text{m}^2$) detektiert. Das YFP wurde mittels eines Argon Lasers bei einer Wellenlänge von 514nm gebleicht. Zu sehen sind Aufnahmen der CFP-YFP Fluoreszenz vor (obere Reihe, *pre-bleach*) und nach dem Akzeptor-Fotobleich Prozess (untere Reihe, *post-bleach*).

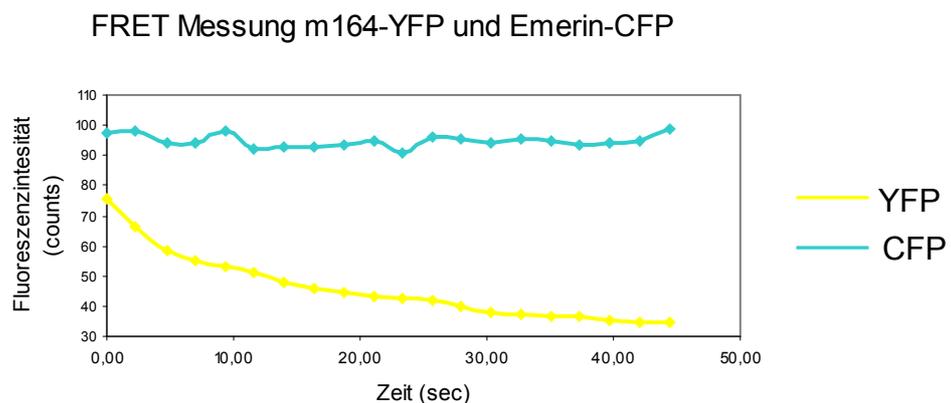


Abb. 71: Spektrale Änderung nach dem Akzeptor-Fotobleichen. Das Diagramm zeigt die Abnahme der Fluoreszenzintensität des Akzeptors m164-YFP im Anschluss an das Fotobleichen. Die Donor Fluoreszenzintensität des Emerin-CFP bleibt auch nach dem Fotobleich-Prozess unverändert. Die y-Achse zeigt die Fluoreszenzintensitäten von YFP und CFP, auf der x-Achse ist die Zeit in sec vor (0 sec) und nach (alle folgenden Zeitpunkte > 0) dem Bleichvorgang dargestellt.

Wie schon unter 3.18, Abb. 61 beschrieben, kolokalisieren die Proteine Emerin und m164 auch in kotransfizierten COS-7-Zellen im Kernrandbereich (Abb. 70). Deshalb wurde im Kernrandbereich in einem $100 \mu\text{m}^2$ großen Bereich der Akzeptor YFP mit dem Argonlaser bei einer Wellenlänge von 514nm gebleicht. In Abb. 70 sind die Laser Scanning Mikroskop-Aufnahmen vor (Abb. 70, obere Reihe, *pre-bleach*) und kurz nach dem Fotobleichen des YFP (Abb. 70, untere Reihe, *post-bleach*) dargestellt.

Die Fluoreszenzintensität des gebleichten Akzeptors YFP reduziert sich mit der Zeit. Das war nicht anders zu erwarten, da die Fähigkeit des YFP zur Emission von Fluoreszenz durch den Fotobleich Prozess irreversibel geschädigt wurde. Demgegenüber blieb die Fluoreszenzintensität des CFP nach dem Fotobleichen des YFP konstant. Somit zeigte sich, dass die Fluoreszenz des angeregten CFP vor dem Fotobleichen nicht durch das YFP gequencht wurde (zur Übersicht siehe Abb. 62). Dies kann nur damit erklärt werden, dass das Donor/Akzeptor Paar CFP/YFP in keiner räumlichen Nähe zueinander steht.

Schlussfolgerung:

FRET konnte zwar etabliert werden, jedoch war es mit Hilfe der FRET Analysen nicht möglich, eine spezifische Protein-Protein Interaktion zwischen m164 und Emerin zu zeigen.

3.20 *Fluorescence recovery after photobleaching* Analysen: Ist m164 ein Protein der inneren oder äußeren Kernmembran?

Wie aus dem Abschnitt 3.18 hervorgeht, ist m164 unter anderem im Kernrandbereich lokalisiert. Es konnte zwar für dieses zelluläre Kompartiment eine Kolokalisation mit Emerin und LaminB2 nachgewiesen werden, nicht jedoch eine direkte Protein-Protein-Interaktion. Da es die Auflösung der Immunfluoreszenz-Analyse nicht erlaubt, zwischen der äußeren und der inneren Kernmembran bzw. der Kernlamina zu diskriminieren, ist es notwendig, eine andere Methode heranzuziehen, um die Lokalisation von m164 exakt definieren zu können.

Wäre mittels FRET Analysen eine Interaktion zwischen m164 und Emerin oder auch LaminB2 nachweisbar gewesen, hätte dies auf eine Lokalisation von m164 in der inneren Kernmembran schließen lassen, da Emerin ein Bestandteil der inneren Kernmembran ist und LaminB2 typischerweise mit Proteinen der inneren Kernmembran interagiert (Bione et al., 1994; Wolfner & Wilson, 2001). Trotz negativem FRET Ergebnis ist nicht auszuschließen, dass m164 mit Emerin spezifisch interagieren könnte. Es ist durchaus vorstellbar, dass durch die Fusion von Emerin mit CFP und von m164 mit YFP die notwendige räumliche Orientierung zwischen m164 und Emerin verhindert wurde und deshalb in der FRET Analyse kein Energietransfer nachweisbar war.

In *Fluorescence recovery after photobleaching* (FRAP) Experimenten macht man sich die unterschiedliche Beweglichkeit und Austausch-rate der Proteine zunutze (zur Übersicht

siehe Houtsmuller & Vermeulen, 2001), um Rückschlüsse auf ihre genaue Positionierung in der Zelle ziehen zu können. Dazu werden die zu untersuchenden Proteine mit einem Fluorophor (meist GFP) fusioniert. Dann wird in transfizierten Zellen, die das GFP-Fusionsprotein exprimieren, in einem definierten Bereich der Zelle das Fluorophor fotogeleicht. Die Fluoreszenzintensität in der gebleichten Region wird dabei als eine Funktion der Zeit nach dem Fotobleichen detektiert. Handelt es sich bei dem zu untersuchenden Fusionsprotein um ein mobiles Protein, so erholt sich die Fluoreszenz in der gebleichten Region durch die Diffusion von ungebleichten, fluoreszierenden Proteinen aus ungebleichten Regionen in die gebleichte Region relativ schnell (*Fluorescence Recovery*).

Mit Proteinen der inneren Kernmembran z.B. mit Emerin, LAP2 β und MAN1 (Foisner & Gerace, 1993; Bione et al., 1994; Lin et al., 2000; Wolfner & Wilson, 2001) wurden bereits FRAP Analysen im Kernrandbereich von transfizierten Zellen durchgeführt. Dabei wurden Halbwertszeiten der *Fluorescence Recovery* für GFP-Emerin von 60 sec, für GFP-LAP2 β von 60 sec und für GFP-MAN1 von 100 sec berechnet. Für das lösliche GFP wurde eine Halbwertszeit von 0,03 sec ermittelt (Shimi et al., 2003).

Allerdings ist als FRAP Phänomen bekannt, dass es zu keiner vollständigen Erholung der Fluoreszenz in der zuvor gebleichten Region kommt (zur Übersicht siehe Lippincott-Schwartz et al., 2001; Giese et al., 2003). Ein Anteil von etwa 10-20% der gebleichten Fluorophore kann nicht durch ungebleichte Fluorophore aus ungebleichten Regionen ausgetauscht werden. Es wird angenommen, dass diese immobile Fraktion aufgrund von *Cross-linking* Ereignissen nicht in der Lage ist, lateral zu diffundieren. Gebleichte Komponenten der mobilen Fraktion hingegen sind in der Lage, lateral in der Membran zu diffundieren, und werden durch ungebleichte Fluorophore ausgetauscht. Der Anteil der mobilen Fraktion liegt zwischen 80-90% aller bleichbaren Fluorophore.

Östlund et al. (1999) konnten zeigen, dass in transfizierten Zellen die mobile Emerin-GFP Fraktion innerhalb der gebleichten Region im ER-Bereich in etwa 60 sec ausgetauscht wird, die mobile Emerin-GFP Fraktion der inneren Kernmembran für diesen Austauschvorgang hingegen benötigt ganze 260 sec. Östlund hat nicht die Halbwertszeiten der *Fluorescence Recovery* berechnet, sondern lediglich die Zeitspanne des Austauschvorgangs der mobilen Fraktion bestimmt, d.h. die Zeit, die für die Wiederherstellung der Ausgangsfluoreszenz der mobilen Fraktion benötigt wird.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Proteine der inneren Kernmembran in FRAP Experimenten eine deutlich verzögerte laterale Diffusionsmobilität in die gebleichte Region zeigen, im Vergleich zu Proteinen, die mit der äußeren Kernmembran assoziiert sind.

Dies hängt u.a. damit zusammen, dass die Proteine der inneren Kernmembran an das relativ starre Lamingerüst bzw. an Chromatin oder an beide binden und dadurch retendiert werden. Hingegen können die Proteine der äußeren Kernmembran, die ein Kontinuum mit dem ER-Membransystem bildet, frei lateral diffundieren (Soullam & Worman 1995; Ellenberg et al.,

1997). So ist es möglich, aus der Zeitspanne des Fluoreszenzrückstroms in die zuvor gebleichte Region Rückschlüsse auf die Lokalisation des Fluorophor-tragenden Proteins zu ziehen.

Ziel war es, eine exakte Aussage darüber zu treffen, ob m164 in der inneren oder äußeren Kernmembran lokalisiert ist. Dazu wurden COS-7-Zellen mit dem in Abb. 44 dargestellten m164-GFP Expressionsplasmid transfiziert und 48 h nach Transfektion FRAP Messungen an lebenden Zellen durchgeführt. Dazu wurde in zwei unabhängigen Experimenten jeweils eine kleine Region im ER-Bereich fotogeblickt. Dabei wurde darauf geachtet, den Fotobleichvorgang möglichst schonend durchzuführen, um etwa 20-30% der Ausgangs-Fluoreszenzintensität zu erhalten. So sollte das vorher bereits erwähnte Crosslinken der Fusionsproteine durch die zugeführte Lichtenergie minimiert werden. Das Fotobleichen erfolgte mittels Argonlaser bei einer Wellenlänge von 488nm. Gemessen wurde der Rückstrom der Fluoreszenz in die zuvor gebleichte Region.

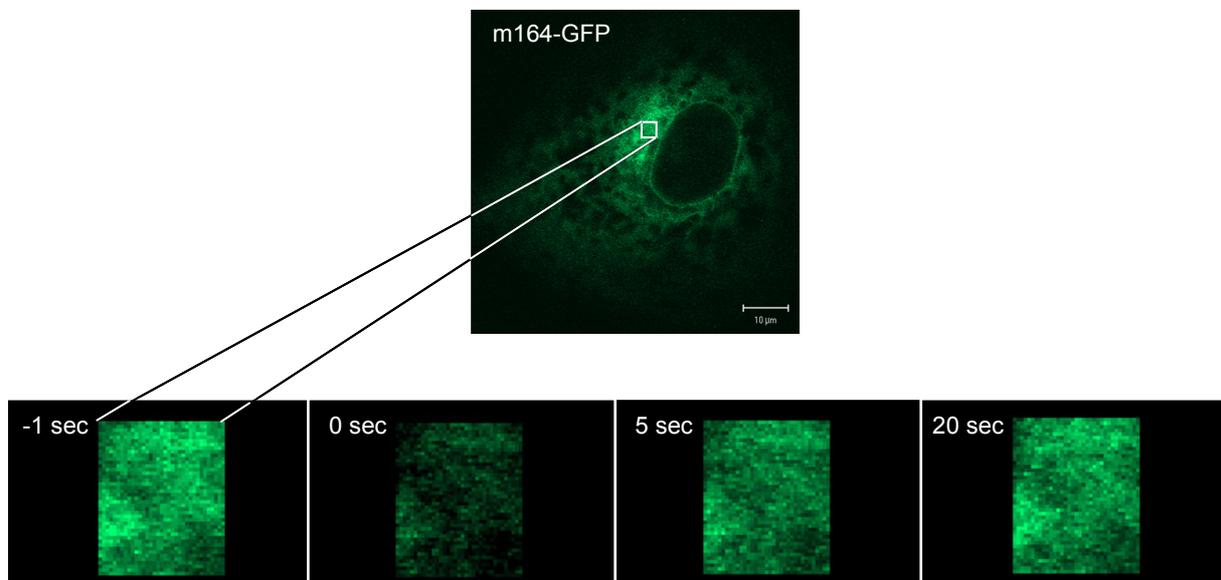


Abb. 72: FRAP Analyse von m164-GFP im Bereich des ER. COS-7-Zellen wurden mit einem Expressionsplasmid transfiziert, das für m164-GFP kodiert. 48 h nach Transfektion wurden lebende Zellen mittels des konfokalen Laser Scanning Mikroskops untersucht (Bild oben). Die weiße Box zeigt die *region of interest* (ROI) im ER-Bereich, die fotogeblickt wurde (zum Zeitpunkt 0 sec, untere Reihe). Unten: Das Bild links (-1sec) zeigt vergrößert die ROI mit der GFP-Fluoreszenz direkt vor dem Bleichen. Bei 0 sec erfolgte das Bleichen der Fluorophore. Die beiden folgenden Bilder zeigen den Fluoreszenzrückstrom ungebleichter Fluorophore aus nicht gebleichten Regionen als Funktion der Zeit.

FRAP ER-Bereich

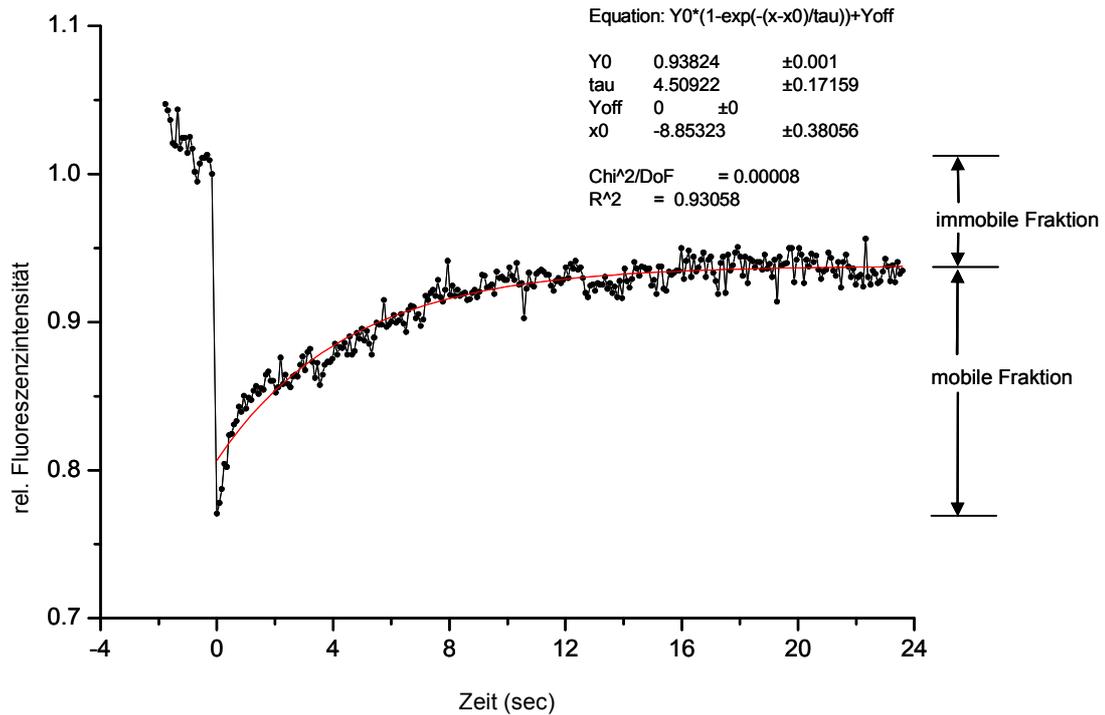


Abb. 73: Quantitative Mobilitätsmessung von m164-GFP im ER-Bereich. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität des GFP gegen die Zeit in Sekunden (sec). Die Fluoreszenzintensität ist als relative Intensität, basierend auf dem ursprünglichen Wert vor dem Bleichen, gezeigt. Der Teil der Kurve, der zu der immobilen bzw. mobilen Fraktion gehört, ist rechts dargestellt. Die gefittete Kurve der experimentellen Daten ist rot eingezeichnet, beschrieben durch die Formel oben rechts.

Nach dem Fotobleichen des GFP in einer definierten Region im ER-Bereich transfizierter COS-7-Zellen (Abb. 72) erfolgt eine Rückdiffusion der Fluorophor-fusionierten Proteine direkt nach dem Bleichvorgang. Bereits 10 sec nach dem Bleichen erreichte die Fluoreszenzintensität eine Sättigung, die etwa 7% unter der Ausgangsfluoreszenz lag (hervorgerufen durch die immobile Fraktion, die nicht ersetzt werden kann). Die *Recovery* der mobilen Fraktion lag entsprechend bei etwa 93%. Aus der Zunahme der Fluoreszenz in der gebleichten Region konnte die Halbwertszeit der *Fluorescence Recovery* durch das Anpassen einer Kurve an die Datenpunkte (*fitten*) berechnet werden: Die Halbwertszeit der *Recovery* betrug 3,1 sec.

In einem zweiten, unabhängigen Experiment wurde eine definierte Fläche des Kernrandes von m164-GFP exprimierenden, lebenden COS-7-Zellen fotogeblichen. Auch hier wurde der Rückstrom der Fluoreszenz in die zuvor gebleichte Region als Funktion der Zeit detektiert.

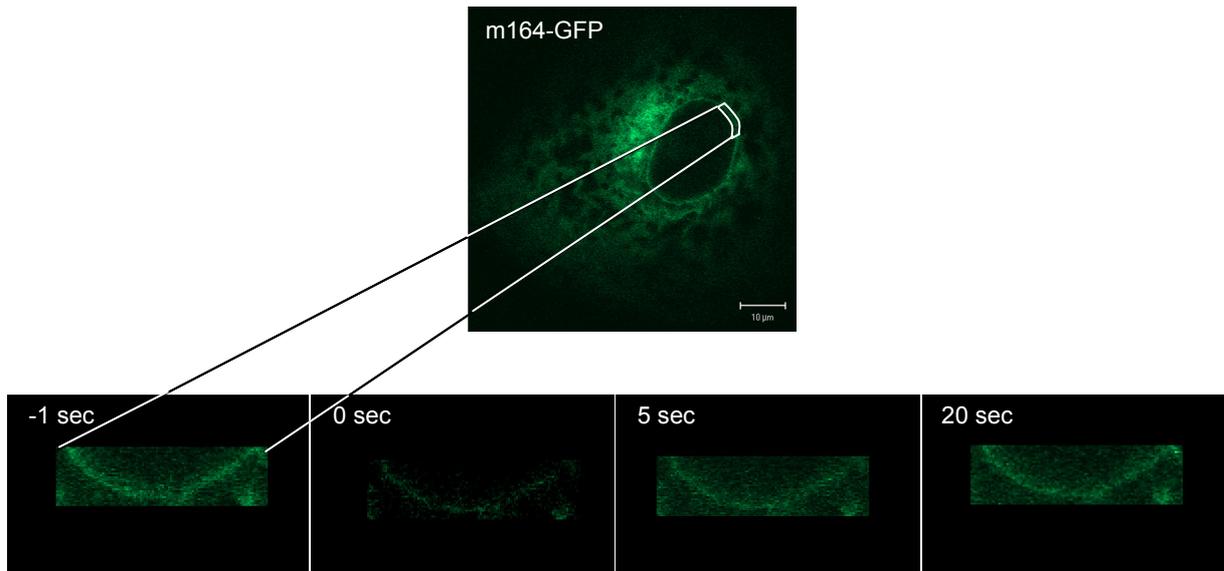


Abb. 74: FRAP Analyse von m164-GFP im Kernrandbereich. COS-7-Zellen wurden mit einem Expressionsplasmid transfiziert, das für m164-GFP kodiert. 48 h nach Transfektion wurden lebende Zellen mittels des konfokalen Laser Scanning Mikroskops untersucht (Bild oben). Die weiße Box zeigt die *region of interest* (ROI) im ER-Bereich, die fotogeleicht wurde (zum Zeitpunkt 0 sec, untere Reihe). Unten: Das Bild links (-1sec) zeigt vergrößert die ROI mit der GFP-Fluoreszenz direkt vor dem Bleichen. Bei 0 sec erfolgte das Bleichen der Fluorophore, die beiden folgenden Bilder zeigen den Fluoreszenzrückstrom ungebleichter Fluorophore aus nicht gebleichten Regionen als Funktion der Zeit.

FRAP Kernrand-Bereich

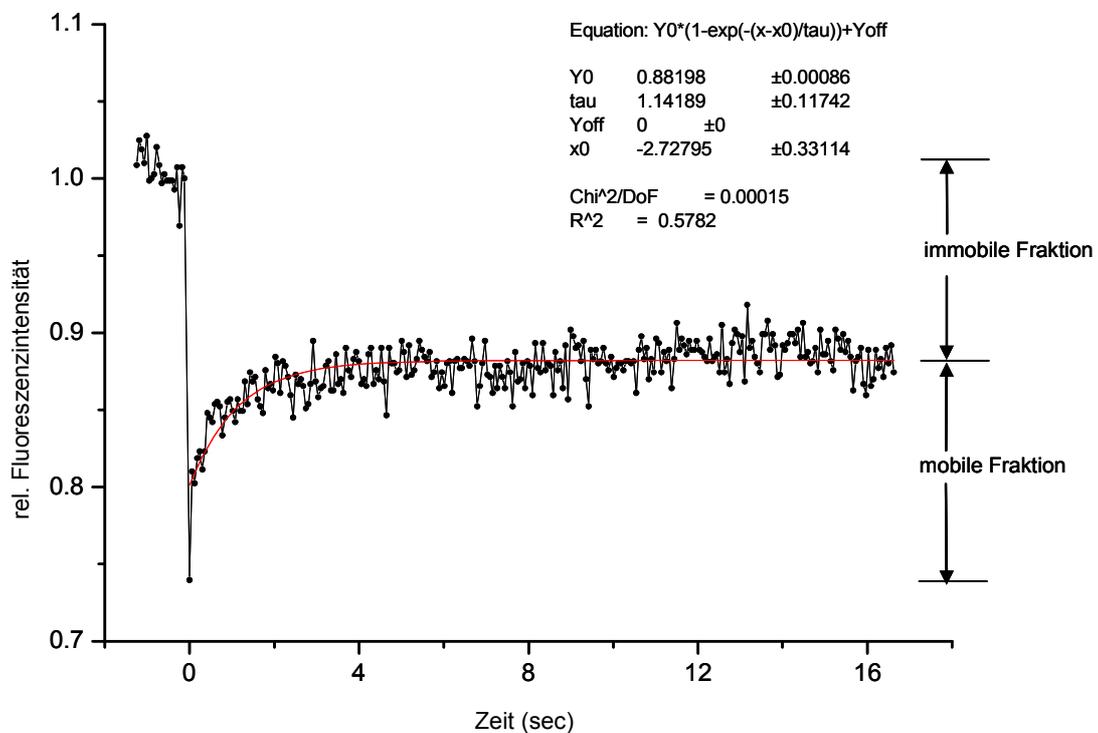


Abb. 75: Quantitative Mobilitätsmessung von m164-GFP im Kernrandbereich. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität des GFP gegen die Zeit in Sekunden (sec). Die Fluoreszenzintensität ist als

relative Intensität, basierend auf dem ursprünglichen Wert vor dem Bleichen, gezeigt. Der Teil der Kurve der zu der immobilen bzw. mobilen Fraktion gehört, ist rechts dargestellt. Die gefittete Kurve der experimentellen Daten ist rot eingezeichnet, beschrieben durch die Formel oben rechts.

Auch nach dem Fotobleichen des m164-GFP in einer bestimmten Region im Kernrandbereich transfizierter COS-7-Zellen (Abb. 74) erfolgte, wie im ER-Bereich, ein Rückfluss der Fluorophore direkt nach dem Bleichvorgang. Die mobile Fraktion erholte sich wieder zu 88%, vergleichbar mit dem Wert des ER-Bereichs. Die Halbwertszeit der *Recovery* betrug 0,8 sec, die Fluoreszenzintensität erholte sich bereits nach 5 sec und erreichte eine Sättigung, die 12% unter der Ausgangsfluoreszenz lag.

Die Erholung des Fluoreszenzsignals nach dem Bleichen einer bestimmten Region erfolgte im ER-Bereich wie auch im Kernrandbereich in einer annähernd identischen Zeitspanne von etwa 10 sec im Gegensatz zu den 260 sec, die beim Fluoreszenzsignal von Emerin-GFP benötigt werden, um die mobile Fraktion auszutauschen (Östlund et al., 1999). Auch liegt die durchschnittliche Halbwertszeit der *Fluorescence Recovery* ($t_{1/2}$) für Proteine der inneren Kernmembran mit 60-100 sec (Shimi et al., 2003) ein Vielfaches über den ermittelten $t_{1/2}$ -Werten von m164-GFP im ER-Bereich (3,2 sec) und im Kernrandbereich (0,8 sec). Die FRAP Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass m164 als Membranglykoprotein (siehe Abschnitt 3.13) in die äußere Kernmembran integriert ist.

Die unterschiedlichen Halbwertszeiten der *Fluorescence Recovery* ($t_{1/2}$) von 3,2 sec und 0,8 sec sind zum einen sicherlich auf die Varianz der Messmethode zurückzuführen. Zum anderen könnte die Ursache für einen kleineren $t_{1/2}$ -Wert von m164-GFP im Kernrandbereich an einer größeren Anzahl von m164-Proteinen in der äußeren Kernmembran im Vergleich zum ER-Bereich liegen, so dass eine laterale Diffusion in der äußeren Kernmembran aufgrund der höheren Teilchenzahl schneller ablaufen kann.

Schlussfolgerung:

Eine Lokalisation von m164 in der inneren Kernmembran konnte mit Hilfe der durchgeführten FRAP Experimente ausgeschlossen werden. Eine Protein-Protein Interaktion zwischen m164 mit Emerin oder LaminB2 ist demnach alleine aufgrund der unterschiedlichen Lokalisation nicht möglich.

4.1 Die m164-mRNA

Entgegen der *in silico* Analyse, derzufolge der von Rawlinson et al. (1996) vorhergesagte ORF*m164* für ein 46,6 kDa-Protein kodiert, konnte in Western Blot Analysen mit Gesamtproteinlysaten sowohl aus transfizierten wie aus infizierten Zellen ein m164-Protein mit einer molekularen Masse von 38 kDa identifiziert werden. Die Ursache für diese reduzierte Größe könnte darin liegen, dass

- 1) die m164-prä-mRNA gespleißt wird, oder
- 2) die Translationsinitiation an einem anderen Startcodon erfolgt als von Rawlinson et al. (1996) vorhergesagt.

4.1.1 Die m164-mRNA wird nicht gespleißt

Die in den *in vitro* Translationsexperimenten exprimierten m164-Proteine hatten eine molekulare Masse von 35 kDa und 46,6 kDa. Da für das ORF*m164*-Genprodukt eine Masse von 46,6 kDa vorhergesagt worden war, wäre es denkbar gewesen, dass das 35 kDa-Protein das Expressionsprodukt einer durch alternatives Spleißen entstandenen m164-mRNA darstellt.

Spleißen bezeichnet die Prozessierung einer prä-mRNA zur mRNA durch Verknüpfung der Exons. Das Spleißen wird von Ribonukleoproteinen vermittelt, den sogenannten snRNPs (*small nuclear ribonucleoproteins*). Diese enthalten RNA-Komponenten aus 100-200 Nukleotiden (*small nuclear RNA*, snRNA). Durch die Vereinigung der snRNPs auf der prä-mRNA entstehen die Spleißosomen, die dafür sorgen, dass die reaktiven Gruppen der RNA für den Spleißvorgang korrekt angeordnet sind. Für die stabile Bindung einiger snRNPs an Intron-Sequenzen der prä-mRNA ist ATP notwendig.

Neben der Spleißreaktion im Spleißosomenkomplex können RNA-Moleküle auch autokatalytisch, ohne Beteiligung von Proteinen und ohne Zufuhr von zellulärer Energie, gespleißt werden (*self splicing*, Cech & Brehm, 1981). Dazu muss die zu spleißende RNA in der passenden Sekundärstruktur vorliegen. Dies bedeutet im Detail, dass ein Guanosin der RNA über Wasserstoff-Brücken in einer Sekundärstruktur-Tasche der RNA gehalten werden muss, damit die für die Selbstspleiß-Reaktion notwendigen Transester-Reaktionen ablaufen können (Knippers et al., 1997).

Grundsätzlich unterscheidet man zwei verschiedene Spleißarten, die sowohl im Spleißosomenkomplex als auch autokatalytisch ablaufen können: Die meisten prä-mRNAs werden nach einem festen Schema gespleißt (konstitutives Spleißen). Es gibt jedoch auch mRNAs, die alternativ gespleißt werden können. Dabei werden aus einer prä-mRNA verschiedene, reife mRNAs, die sich in der Anzahl einzelner Exons unterscheiden.

Alternatives und konstitutives Spleißen wurde auch für virale RNAs beschrieben. So entstehen aus der *ie1/3*-Transkriptionseinheit (ORFs *m123* und *M122*) von mCMV durch alternatives Spleißen zwei mRNAs, die für das IE1-Protein bzw. das IE3-Protein kodieren. Durch konstitutives Spleißen hingegen entsteht aus dem *ie2*-Gen (ORF*m128*) eine mRNA, die für das IE2-Protein kodiert (Dorsch-Häsler et al., 1985; Keil et al., 1987; Messerle et al., 1991, 1992).

In der vorliegenden Arbeit wurde die *in vitro* Translation mit Weizenkeimlysat durchgeführt. Das verwendete Weizenkeimlysat-Kit enthält laut Hersteller ausschließlich Ribosomen und die für eine effiziente Translation notwendigen Translationsfaktoren. Die für die Reifung der prä-mRNA notwendigen Spleißosomen fehlen in diesem System. Demnach könnte die mRNA des 35 kDa-Proteins nur durch einen autokatalytischen Spleißvorgang aus der prä-mRNA entstanden sein. Um dies zu überprüfen wurden RT-PCR und Northern Blotting Analysen durchgeführt, die zeigten, dass nur eine m164-mRNA Population existierte. Somit konnte ein Spleißen der m164-mRNA ausgeschlossen werden.

4.1.2 Die m164-mRNA besitzt an ihrem 3'- und 5'-Ende untranslatierte Regionen

Die Kartierung der m164-mRNA erfolgte über 5'/3' RACE. Mit Hilfe des 5'/3' RACE-Experiments konnte sowohl der 5'- als auch der 3'-Bereich der m164-mRNA entschlüsselt werden. Über die von Rawlinson et al. (1996) beschriebenen Grenzen des ORF*m164* hinaus konnten am 5'-Ende 187 Basen und am 3'-Ende 533 Basen detektiert werden (siehe Ergebnisse, Abschnitt 3.1.1 und 3.1.2). Durch *in vitro* Translationsexperimente konnte gezeigt werden, dass es sich bei den zusätzlich zum ORF*m164* gefundenen Bereichen am 5'- und 3'-Ende um untranslatierte Bereiche (UTR) handelt (siehe Ergebnisse, Abschnitt 3.2). Aufgrund der Initiation der Translation am dritten AUG vergrößert sich die 5'-UTR um 273 Nukleotide auf 460 Basen.

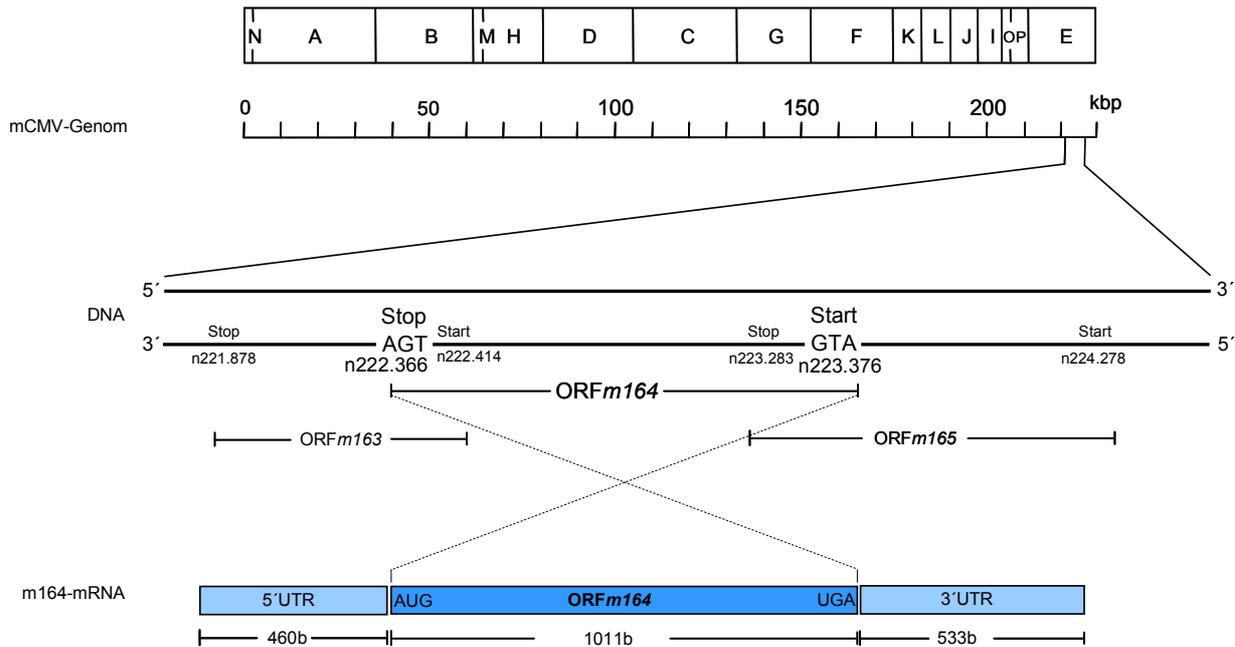


Abb. 77: Lokalisation des neu definierten ORFm164 innerhalb des WT-mCMV-Genoms. Physikalische *Hind*III-Karte des WT-mCMV-Genoms mit Teil-Vergrößerung des E-Fragments. Der ORFm164 liegt im E-Fragment und umfasst 1011 Nukleotide. Die 5'UTR umfasst 460 Basen, die 3'UTR 533 Basen.

3'-UTR: In der Nukleotidsequenz des 3'-Endes liegt 36 bp stromaufwärts des Poly A-Endes ein Polyadenylierungssignal (AATAAA). Dieses dient als Erkennungsstelle für eine Endonuklease, die am 3'-Ende des ursprünglichen Transkriptionsproduktes einen Teil abtrennt und somit Raum zur Anheftung des Poly A-Schwanzes schafft (Simonsen et al., 1983). In der 3'-UTR (Bereich zwischen Stopcodon und Start des Poly A-Schwanzes) befindet sich in der Regel ein *zip code*, d.h. ein Lokalisationssignal, das die mRNA zum Ort ihrer Translation führt. Die Translationsinitiations-Sequenz wird während des mRNA-Transportes durch Proteine blockiert, um eine vorzeitige Translation zu verhindern (Jansen, 2001). Auch wird die Lebensdauer der mRNA im Zytosol über bestimmte Sequenzen in der 3'-UTR bestimmt. Ob es sich bei der mRNA von m164 um eine stabile oder eine labile RNA handelt (manche mRNA sind über Tage stabil, andere werden bereits innerhalb von Minuten abgebaut; Knippers, 1997; Hentze & Kulozik, 1999), wurde nicht näher untersucht. Mit Hilfe von Pulse-Chase Experimenten konnte gezeigt werden, dass das Produkt der m164-mRNA relativ instabil ist. Die Tatsache, dass die Expression des m164-Proteins bereits zwischen 3 h und 6 h nach seiner Synthese deutlich abnimmt, lässt auf eine durchschnittliche Lebensdauer der m164-mRNA schließen. Diese Annahme wird auch dadurch unterstützt, dass die 3'-UTR keine Destabilisierungs-Sequenz (ATTTA) besitzt (Wickens & Stephenson, 1984; Shaw & Kamen, 1986; Knippers, 1997), die zu einer besonders kurzen Lebensdauer der mRNA führen würde.

5'-UTR: In etwa 90% der eukaryontischen Zellen beginnt die Initiation der Translation im 5'-UTR der mRNA, nämlich am 5'-*Cap*. Für den Start der Translation sind neben bestimmten Sekundärstrukturelementen im 5'-Bereich auch zahlreiche eukaryontische Initiationsfaktoren notwendig. Zu Beginn der Translation formt sich ein 40S Prä-Initiationskomplex am 5'-*Cap*. Dieser Komplex scannt die mRNA bis zum Initiationscodon, wo die Elongationsphase der Translation beginnt (Pickering & Willis, 2005). Etwa 10% der zellulären mRNA kann die Translation über einen 5'-*Cap* unabhängigen Prozess initiieren. Dabei wird der ribosomale Initiationskomplex an eine spezielle Sekundärstruktur in der 5'-UTR (*internal ribosome entry site* (IRES)) rekrutiert. In einer IRES Datenbank (<http://ifr31w3.toulouse.inserm.fr/IRESdatabase/>) sind alle bisher detektierten zellulären, wie auch viralen IRES Sequenzen dargestellt (Bonnal et al., 2003). Die meisten IRES stammen aus RNA-Viren. In der 5'-UTR von m164 konnte keine IRES-Sequenz identifiziert werden. Im Gegensatz zu 3'-UTR sind die 5'-UTR in der Regel wesentlich kürzer. Dies trifft für die UTR von m164 nur bedingt zu, da die 5'-UTR nur unwesentlich kürzer ist als die 3'-UTR. Die Tatsache, dass die 5'-UTR von m164 keine IRES-Sequenz besitzt, deutet auf eine Initiation der Translation durch einen 5'-*Cap* abhängigen Prozess hin.

4.2 Das m164-Protein

4.2.1 Translationsinitiation des ORFm164-Genproduktes

Das Auftreten der 35 kDa-Variante von m164 könnte auch damit erklärt werden, dass die Translation an einem anderen Startcodon als dem von Rawlinson et al. (1996) vorhergesagten AUG initiiert wird.

Eukaryontische Ribosomen erkennen die Translationsinitiationsstelle, indem sie sich auf der mRNA entlang bewegen und die passende Sequenz suchen (*scanning mechanism*). Dabei heften sich die Met-tRNA und die verschiedene Translationsfaktoren tragende ribosomale 40S Untereinheit an das 5'-*Cap* der mRNA und gleiten bis zum Startcodon. Dort fügt sich die ribosomale 60S Untereinheit an die 40S Untereinheit und das entstandene 80S Ribosom beginnt mit der Proteinsynthese. Die Translationsinitiation findet am AUG-Startcodon der mRNA statt. Da zahlreiche AUGs in einer mRNA enthalten sein können, haben die das AUG umgebenden Sequenzen einen wesentlichen Einfluss darauf, welches Codon letztlich als Startcodon genutzt wird. Liegt das erste AUG der mRNA in einer für die Ribosomen ungünstigen Sequenz, kann die ribosomale 40S Untereinheit über dieses AUG hinweg gleiten und die Translation erst an dem nächsten AUG starten (Kozak, 1986; Hayes et al., 1989; Kozak, 1989a; Lin et al., 1993; Ossipow et al., 1993). So ist es auch möglich, dass aus einer mRNA zwei Proteine entstehen können, wenn die Initiation der Translation am

kDa großen Genproduktes in infizierten Zellen war zunächst unerwartet. Man muss jedoch berücksichtigen, dass es sich bei m164 um ein virales Protein handelt. Der Translationsstart am dritten AUG kann hier nicht ausschließlich über die Kozak-Sequenz erklärt werden. So ist durchaus denkbar, dass mCMV eigene, vielleicht Kozak-ähnliche Sequenzen zur Translationsinitiation besitzt. Der ausschließliche Translationsstart am dritten m164-AUG in infizierten Zellen könnte durch flankierende Nukleotide ermöglicht werden, die Einfluss auf die Translationsinitiation nehmen.

In Transfektionsexperimenten hingegen konnte neben dem 38 kDa-m164-Protein tatsächlich ein zweites m164-Genprodukt nachgewiesen werden. Bei der Transfektion von COS-7-Zellen mit Expressionsplasmiden, die für drei verschiedene m164-Proteinvarianten (jeweils mit dem ersten, zweiten oder dritten AUG als Startcodon, siehe Abb. 78 oder Abschnitt 3.17, Abb. 58) kodieren, war es möglich diese Proteinvarianten auch zu exprimieren: Fügt man über PCR eine künstliche Kozak-Konsensussequenz GCC GCC ATG vor das Startcodon des m164-Gens ein, kann die Initiation der Translation an dieser Position erzwungen werden. Tatsächlich wurden die AUG-Codons an Position +1 bis +3 und +81 bis +83 auch genutzt; so konnte jeweils ein m164-Protein mit einer Masse von 50 kDa und 47 kDa exprimiert werden (Abschnitt 3.17, Abb. 59, Spur 1 & 3). Allerdings gab es neben diesen erzwungenen Translationen auch in allen drei Fällen immer eine Translationsinitiation am dritten AUG-Codon wodurch immer ein 38 kDa großes m164-Produkt entstand. Deshalb konnten im Gesamtproteinlysate aus transfizierten Zellen mit Hilfe des α -m164 Antikörpers in Western Blot Analysen zwei m164-Proteine nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 3.17, Abb. 59, Spur 2 & 4).

Die intensive Film-Färbung der 38 kDa-Bande zeigt aber, dass hauptsächlich m164 mit einer molekularen Masse von 38 kDa exprimiert wurde. Das lässt darauf schließen, dass das dritte Startcodon effektiver genutzt werden konnte als die künstliche, über PCR eingefügte Kozak-Konsensussequenz.

Das relativ schwache Signal der 38 kDa-Bande des Konstruktes m164alt^{II}_{myc} (siehe Ergebnisse, Abschnitt 3.17, Abb. 59, Spur 5 & 6) war dadurch zu erklären, dass die ursprüngliche (virale) Konsensussequenz um das dritte AUG durch das Anheften des myc-*Tags* und der künstlichen Kozak-Konsensussequenz zerstört wurde. Auch ist zu beachten, dass das Startcodon dieses Expressionsplasmids relativ nahe am 5'-Cap der mRNA liegt, was einen negativen Einfluss auf die Translationsinitiation haben kann (Kozak, 1991).

Zwei weitere wichtige Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass das physiologisch korrekte Startcodon von m164 an der Nukleotidposition +273 bis +275 liegt:

- Zur Charakterisierung des m164-Proteins wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit zwei Antikörper hergestellt. Ein Antikörper ist gegen das C-terminale Ende (AS 401-427) von m164 gerichtet (α -m164), ein weiterer Antikörper gegen das N-terminale (AS 1-25) Ende (Pep-N). Während der α -m164 Antikörper das 38 kDa große m164-Protein detektierte, erkannte der Pep-N Antikörper das Protein nicht (siehe Ergebnisse, Abschnitt 3.6.1. Abb. 27). Dies ist durch die Nutzung des dritten AUG als Startcodon zu erklären: Da die Initiation der Translation erst am dritten AUG beginnt, fehlt im m164-Protein der gesamte, stromaufwärts des dritten AUG liegende N-terminale Teil des putativen ORF*m164*-Proteins und somit auch das Epitop des Pep-N Antikörpers.
- Neben dem rekombinanten m164HA3'-mCMV (siehe Ergebnisse, Abschnitt 3.4) wurde am Institut ein rekombinantes m164HA5'-mCMV erstellt (C. Simon, Doktorarbeit, 2006). Da dieses Virus eine für einen HA-Tag kodierende Sequenz stromaufwärts (HA5') des ersten ATG im ORF*m164* trägt, sollte es die Detektion von m164 mittels α -HA Antikörper im Western Blot ermöglichen. Erstaunlicherweise war es mit dem α -HA Antikörper nicht möglich, das HA-markierte m164-Protein im Gesamtproteinlysate mit m164HA5'-mCMV infizierten Zellen nachzuweisen. Dagegen konnte mit dem α -m164 Antikörper, dessen Epitop im C-terminalen Teil von m164 liegt, das 38 kDa m164-Protein detektiert werden. Diese Ergebnisse deuten ebenfalls darauf hin, dass der Bereich stromaufwärts des dritten AUG nicht translatiert wird und somit der HA-Tag am 5' Ende des ersten AUG nicht exprimiert ist.

4.2.2 Der neu definierte ORF*m164*

Der ORF*m164* mit einer Größe von 1284 Basen wurde von Rawlinson et al. (1996) definiert. Erst 2006 wurde von Tang et al. (2006) mit Hilfe eines mCMV-DNA-Microarrays überprüft, ob die vorhergesagten ORFs auch tatsächlich transkribiert werden. So konnten acht ORFs identifiziert werden, die zwar laut Rawlinson existieren sollten, aber laut Tang nicht exprimiert werden. Mit der vorliegenden Arbeit konnte das Ergebnis von Rawlinson dahingehend bestätigt werden, dass es einen ORF*m164* gibt. Die Daten führen aber zu einer Korrektur der bislang angenommenen Größe des ORF*m164*. Da ein weiter stromabwärts liegendes Startcodon als das von Rawlinson vorgeschlagene zur Translationsinitiation genutzt wird, besitzt der ORF*m164* eine Größe von nur 1008 Basen (ohne Stopcodon). Dieser neu definierte ORF kodiert für ein Protein mit einer errechneten molekularen Masse von 36,1 kDa. Zuzüglich der einfachen N-Glykosylierung kann dieses Protein mit einer apparenten

molekularen Masse von 38 kDa im SDS-Gel nachgewiesen werden. Tang et al. konnten zwar zeigen, dass der ORF*m164* transkribiert wird, machten jedoch keine Aussage über die Größe des m164-Gesamtproduktes.

Wie hier gezeigt hat der ORF*m164* einen Umfang von 1008 Basen, seine mRNA umfasst 2004 Basen (460 Basen der 5'-UTR plus 1011 Basen (mit Stopcodon) des ORF*m164* plus 533 Basen der 3'-UTR)) und das Genprodukt des ORF*m164* ist nach Gel-elektrophoretischer Auftrennung bei einer apparenten molekularen Masse von 38 kDa nachweisbar. Eine *in silico* Analyse auf Basis der korrespondierenden Proteinsequenz des neu definierten ORF*m164* ergibt ein putatives Typ-I Membranglykoprotein.

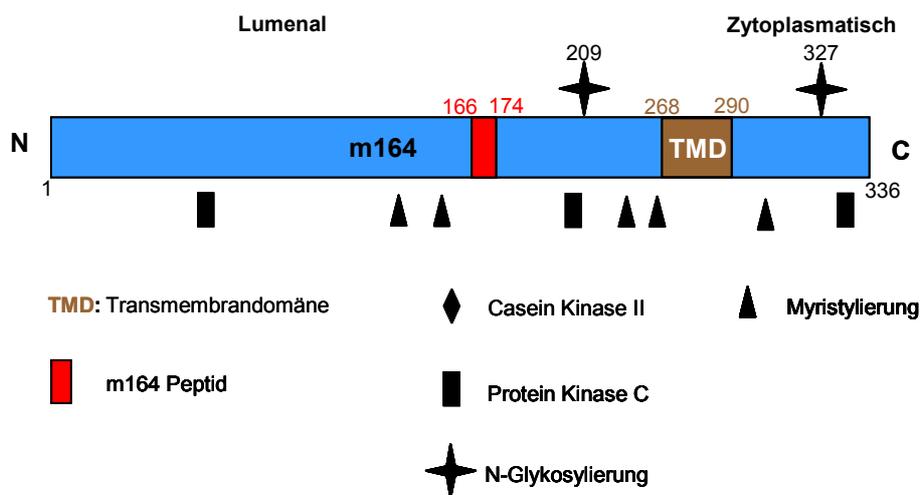


Abb. 80: Vorhergesagte Struktur des m164-Proteins. Die *in silico* Analyse wurde auf Basis der korrespondierenden Proteinsequenz des neu definierten ORF*m164* durchgeführt (in: *expasy.org*). Fünf Vorhersage-Algorithmen für Membrandomänen identifizierten mit einer hohen Wahrscheinlichkeit die Transmembrandomäne an Aminosäureposition 268 bis 290. Daneben wurden zwei weitere hydrophobe Bereiche, direkt im N-terminalen Bereich und um Aminosäureposition 230 detektiert. Außerdem konnten über andere Vorhersageprogramme N-Glykosylierungsstellen, mehrere putative Phosphorylierungsstellen, sowie Myristylierungsstellen im m164-Protein identifiziert werden.

Die vorhergesagten N-Glykosylierungsstellen, Phosphorylierungsstellen, sowie Myristylierungsstellen im m164-Protein befinden sich an der gleichen Position, an der sie schon im ORF*m164*-Genprodukt nach Rawlinson definiert worden waren. Die erste Membrandomäne des Rawlinson ORF-Genprodukt an Aminosäure (AS)-Position 92 bis 109 (siehe Einleitung, Abb. 5) wurde von einigen Vorhersageprogrammen nicht als Membrandomäne (im neu definierten ORF*m164*-Genprodukt etwa an Position 4 bis 21) identifiziert. Dennoch handelt es sich um einen hydrophoben AS-Bereich. Eine weitere hydrophobe Proteinregion beginnt an AS-Position 225 und umfasst etwa 20 AS. Durch den erbrachten Nachweis der Glykosylierung des Asparaginrestes an Position 209 (siehe Ergebnisse Abschnitt 3.13.1) folgt, dass diese beiden Proteinabschnitte im ER-Lumen lokalisiert sein müssen. Aus energetischen Gründen muss das Protein in einer Sekundärstruktur vorliegen, die diese hydrophoben AS-Bereiche im Inneren verbirgt.

Im Ergebnisteil der vorliegenden Arbeit wurde unter 3.14 der Schluss gezogen, dass m164 nach Rawlinson zwei Transmembrandomänen besitzt, eine an AS-Position 92-109 und eine weitere an AS-Position 356-379:

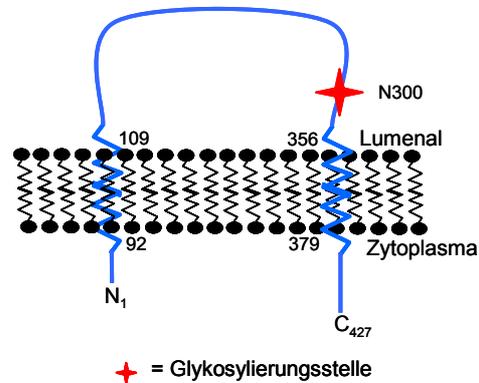


Abb. 81: Modell der Topologie von m164 ohne Kenntnis des physiologisch korrekten Startcodons. Dieses Modell basiert auf der vorhergesagten Struktur des m164-Proteins auf Basis des Rawlinson ORF (siehe Einleitung, Abb. 5). Das Protein besitzt zwei Transmembrandomänen, wie im Ergebnisteil unter 3.14 gezeigt werden konnte.

Die beiden in Abb. 81 dargestellten Transmembrandomänen (AS-Position 92-109 und 356-379) entsprechen im neu definierten ORF*m164*-Genprodukt den hydrophoben Bereichen der AS-Position 4 bis 21 und 268-290. Die gezeigten Experimente im Ergebnisteil unter 3.14 basieren jedoch noch auf dem von Rawlinson definierten ORF*m164*. So enthält ein Teil der GFP*m164*-Fusionsproteine (Abb. 44) das A-Fragment, welches aber in dem neu definierten ORF*m164*-Genprodukt nicht existiert. Alle Ergebnisse, die mit diesem A-Fragment erhalten wurden, leisten somit keinen Beitrag zur Aufklärung der korrekten m164-Topologie. Um zu überprüfen, ob die erste Transmembrandomäne (im neuen ORF*m164*-Genprodukt an AS-Position 4-21) tatsächlich existiert, müssen ergänzende Experimente mit weiteren Konstrukten des neuen ORF*m164*-Genproduktes durchgeführt werden.

Würde dem B-Fragment (C-terminal fusioniert mit GFP) der erste hydrophobe Bereich (AS-Position 4-21) angehängt, wäre entsprechend der *in silico* Analyse (siehe Abb. 80) zu erwarten, dass das resultierende Fusionsprotein in transfizierten Zellen nicht membranassoziiert auftritt. Wenn die zweite Transmembrandomäne (AS-Position 268-290) tatsächlich funktionell ist, müsste ihr Fehlen innerhalb des BC-Fragments ebenfalls zur Expression eines löslichen Proteins führen.

Beide Fusionsproteine wurden bereits hergestellt und die Ergebnisse der Expressionsanalysen entsprachen den Erwartungen. Das bedeutet, dass m164 tatsächlich nur eine Transmembrandomäne besitzt wie es in Abb. 80 dargestellt ist. Ein Modell des m164-Proteins in der äußeren Kernmembran oder im ER würde wie folgt aussehen:

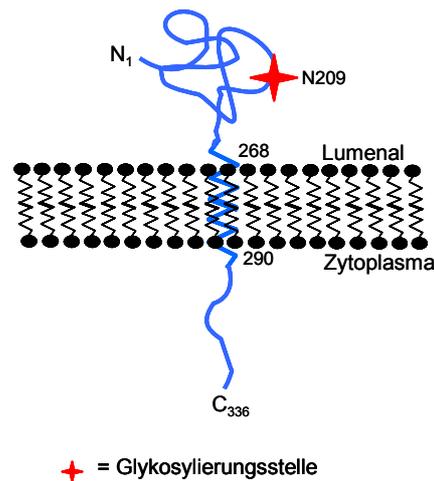


Abb. 82: Topologie-Modell des m164-Proteins. Das m164-Protein ist mit einer Transmembrandomäne an AS-Position 268-290 in der Membran verankert. Der lumenale Teil hat eine entsprechende Sekundärstruktur, damit die hydrophoben Bereiche um AS-Position 4-21 und 225-240 nicht in das hydrophile ER-Lumen ragen. Die N-Glykosylierungsstelle ist als roter Stern dargestellt. Das m164-Protein ist ein Typ-I Membranprotein.

4.2.3 Laut des neu definierten ORF*m164* existiert kein Kernlokalisierungssignal im m164-Protein

Ausgehend von der ORF*m164* Sequenz nach Rawlinson liegt laut *in silico* Analyse von Aminosäureposition 59 bis 68 ein Kernlokalisierungssignal (NLS) im m164-Protein vor. NLS sind Sequenzen, die positiv geladene Aminosäuren wie Lysin oder Arginin enthalten. Das Vorhandensein eines NLS kann ein zytoplasmatisches Protein in den Zellkern dirigieren. Die Position der NLS innerhalb des Proteins ist dabei unwichtig (Kalderon et al., 1984; Kaffman & O'Shea, 1999). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Fragmente von m164, welche das NLS trugen, aber keine Transmembrandomäne besaßen, ausschließlich eine Zellkernfärbung zeigten. Obwohl es sich daher um eine funktionelle NLS handelt, war hingegen das m164-Gesamtprotein nicht im Zellkern lokalisiert. Da es sich, wie gezeigt wurde, bei m164 um ein integrales Membranprotein handelt, kann ein Kernimport über die Kernporen mittels der Bindung des NLS an Importin nicht stattfinden (Catimel et al, 2001; Fahrenkrog & Aeby, 2003). Zudem liegt das NLS stromaufwärts des dritten AUG-Codons und sollte daher nicht translatiert werden.

4.2.4 Die m164-Glykosylierung ist für die Lokalisation von m164 nicht essentiell

Beinahe alle Proteine, die am rauen ER translatiert werden, erhalten eine Glykosylierung. Die Kohlenhydratgruppen dieser Proteine spielen neben der Verteilung auf die richtigen

Zielorte innerhalb der Zelle (Voet & Voet, 1994) auch eine Schlüsselrolle bei der Funktion zahlreicher Glykoproteine. So dienen die Kohlenhydratgruppen vieler Glykoproteine als Bindungsstellen, um Interaktionen mit anderen Makromolekülen einzugehen (Karp, 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurde in Abschnitt 3.13.1 gezeigt, dass m164 einfach N-glykosyliert ist und die Kohlenhydratgruppe eine Masse von 2 kDa besitzt. Wie in Abb. 57 zu sehen ist, weist das in COS-7-Zellen exprimierte Fusionsprotein C-Fragment mit Transmembrandomäne die gleiche charakteristische Lokalisation mit Kernrandfärbung und der netzartigen Verteilung im Zytoplasma auf wie das m164-Gesamtprotein. Die Tatsache, dass dem C-Fragment mit Transmembrandomäne die Glykosylierungsstelle fehlt und es deshalb nicht glykosyliert werden kann, lässt den Schluss zu, dass die N-Glykosylierung für die Lokalisation von m164 nicht essentiell ist. Die Kohlenhydratgruppe könnte allerdings bei der Funktion des m164-Proteins eine Rolle spielen, etwa als Bindungsstelle für bisher unbekannte Interaktionspartner.

4.2.5 Eine mögliche Funktion von m164 im *De-envelopment*-Prozess von mCMV

Das *De-envelopment* ist Bestandteil des komplexen Prozesses der Virion-Morphogenese. Es bezeichnet den Austritt des primären Virions aus dem Perinuklearraum ins Zytoplasma. Dabei fusioniert die Membran des primären Virions mit der äußeren Kernmembran; als Folge wird ein unbehülltes Kapsid ins Zytoplasma entlassen. Es gibt viele Arbeiten zur hCMV, VZV-, HSV-1- und PRV-Morphogenese. Aufgrund der Verwandtschaft innerhalb der Familie der Herpesviren sind die Vorgänge der Morphogenese auf mCMV weitgehend übertragbar (Weiland et al., 1986).

Wird im Infektionsverlauf die L-Phase der viralen Genexpression erreicht, erfolgt die Translation der für die Kapside notwendigen Strukturproteine. Im Zellkern assemblieren diese viralen Proteine zu den sogenannten Prokapsiden. Bei hCMV erfolgt die Aufnahme der Virus-DNA durch die Wechselwirkung von viralen Proteinen in den Seitenflächen der Kapside mit dem DNA-Konkatemer, was dazu führt, dass ein Genomäquivalent in das Prokapsid eingeschleust wird (Gibson, 2006). Für den Transport durch den Kernporenkomplex sind die Kapside allerdings zu groß. Der Weg ins Zytoplasma führt deshalb über die Kernmembran. Dazu werden die Kapside vom Ort ihrer Synthese aktinabhängig an die innere Kernmembran geleitet (Forest et al., 2005; Feierbach et al., 2006). Dort rekrutieren virale Proteine die zelluläre Protein Kinase C (PKC), welche die Kernlamina phosphoryliert und dadurch auflöst (Muranyi et al., 2002; Reynolds et al., 2004; Gonnella et al., 2005). Das Kapsid kann so in direkten Kontakt mit der inneren Kernmembran treten. Welche viralen Kapsidproteine diesen Kontakt vermitteln ist allerdings unbekannt.

Durch die Knospung des Kapsids an der inneren Kernmembran in den Perinuklearraum erhält das Kapsid eine Lipidhülle bestehend aus der inneren Kernmembran (*primary envelopment*) und liegt so behüllt als ein primäres Virion im Perinuklearraum vor. Virionen im Perinuklearraum scheinen eine andere Morphologie und Proteinzusammensetzung zu haben als reife Virus-Partikel (Granzow et al., 2001; Fuchs et al., 2002; Miranda-Saksena et al., 2002). Für hCMV ist bekannt, dass die Kinase pUS3 ein Bestandteil des primären Virions im Perinuklearraum ist. So wird diskutiert, ob der sogenannte *De-envelopment*-Prozess durch die Phosphorylierung anderer Proteine mittels pUS3 im Perinuklearraum eingeleitet wird (Klupp et al., 2001; Reynolds et al., 2002; Granzow et al., 2004; Schumacher et al., 2005). Dabei, so wird postuliert, nimmt das primäre Virion über noch nicht identifizierte Proteine (Fusogene) Kontakt mit der äußeren Kernmembran auf. Beim Durchtritt des Virions durch die äußere Kernmembran verschmilzt die Übergangslipidhülle mit dieser. So wird das Kapsid unbehüllt ins Zytoplasma entlassen.

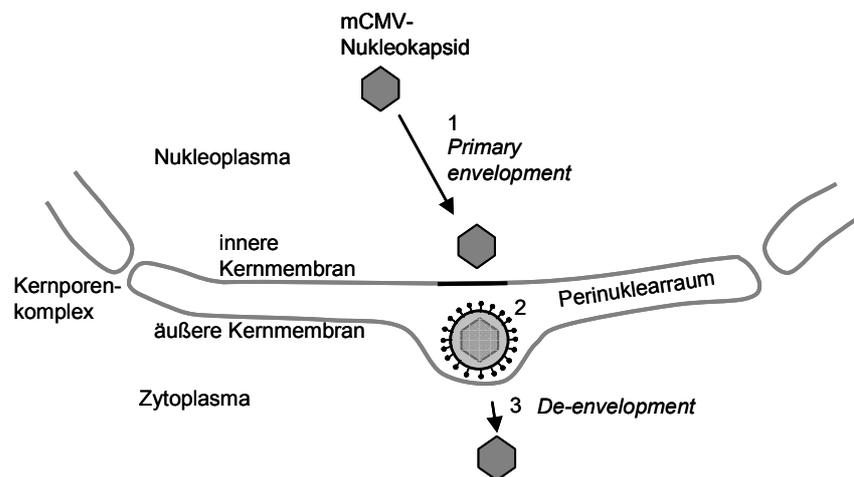


Abb. 83: Darstellung des *De-envelopment*-Prozesses. Schematische Darstellung des *primary envelopment* des Nukleokapsids an der inneren Kernmembran (1). Dabei erhält das Kapsid eine Hülle, bestehend aus der inneren Kernmembran; ein primäres Virion entsteht (2). Schließlich fusioniert die Hülle des primären Virions mit der äußeren Kernmembran und ein unbehülltes Kapsid wird ins Zytoplasma entlassen (3, *De-envelopment*). Im Anschluss erfolgt ein *secondary envelopment* des Kapsids an Trans-Golgi Vesikeln (nicht dargestellt). Der gesamte Prozess, der das *primary* und *secondary envelopment* umfasst, wird als *double envelopment theory* bezeichnet.

Virale Membranglykoproteine in Herpesvirus-infizierten Zellen werden vom Ort ihrer Synthese am rauhen ER nicht nur entlang des sekretorischen Weges transportiert, sondern auch in die innere Kernmembran inseriert. Im Falle von hCMV wurde eine Lokalisation der bei allen Herpesviren konservierten Glykoproteine B und H (gB, gH) in der inneren Kernmembran gezeigt (Eickman et al., 2006) so dass sie eine Rolle im *secondary envelopment* spielen könnten (Strive et al., 2005). Für PRV hingegen konnte mit Hilfe einer PRV-Mutante, deren gB deletiert worden war, gezeigt werden, dass gB weder für den Prozess des *primary* noch des *secondary envelopments* eine Rolle spielt (Granzow et al.,

2001; Klupp et al., 2001). Es ist fraglich, ob gB bei PRV überhaupt in der inneren Kernmembran lokalisiert ist, da es offensichtlich beim Prozess der Virion Morphogenese keine Rolle spielt.

Da das m164-Protein in der äußeren Kernmembran lokalisiert ist, kann es nicht am Prozess des *primary envelopment* beteiligt sein. Allerdings wäre allein durch die Größe der Virionen ein rein physikalischer Kontakt zwischen m164 und den kurz vor dem *De-envelopment* stehenden Virionen vorstellbar. Daher wäre es denkbar, dass m164 am Prozess des *De-envelopments* beteiligt ist. So könnte es zu einer Kontaktaufnahme zwischen Membranproteinen des primären Virions und m164 in der äußeren Kernmembran kommen, vorstellbar als Rezeptor (= primäre Hülle)-Ligand (=m164) Paar. Bei diesem Vorgang könnte die Glykosylierung von m164 eine entscheidende Rolle spielen, da sie die Interaktion zwischen Rezeptor und Ligand vermitteln könnte.

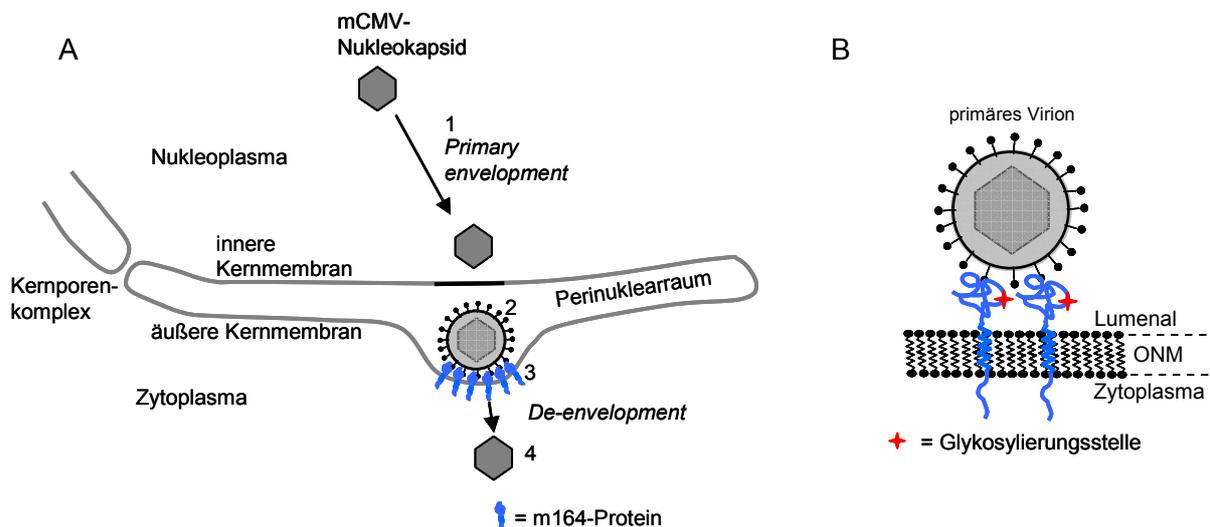


Abb. 84: Hypothetische Beteiligung von m164 am *De-envelopment*-Prozess. Schematische Darstellung des *primary envelopment* des Nukleokapsids an der inneren Kernmembran (1). Dabei erhält das Kapsid eine Hülle aus der inneren Kernmembran, ein primäres Virion entsteht (2). Das m164-Protein könnte eine Interaktion zwischen äußerer Kernmembran (ONM) und der primären Hülle des Virions vermitteln (3, siehe B). Die Glykosylierungsstelle von m164 könnte für die Kontaktaufnahme relevant sein. Schließlich fusioniert die Hülle des primären Virions mit der äußeren Kernmembran und ein unhülltes Kapsid wird ins Zytoplasma entlassen (4, *De-envelopment*).

4.2.6 Eine mögliche Funktion von m164 als Antifusionsprotein

Es existieren verschiedene Modelle zur Virion Morphogenese. Die *double envelopment theory* (auch *Stackpole pathway*) beschreibt dabei ein Modell. Ein weiteres Modell ist die sogenannte *single envelopment*-Hypothese (Wild et al., 2002; 2005; Leuzinger et al., 2005). Für dieses Modell sind sogenannte Antifusionsproteine von entscheidender Bedeutung. Diese Proteine verhindern eine Fusion von Virionen mit der Membran der ER- und Golgi-Zisternen.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Lokalisation von m164 in der äußeren Kernmembran und in der ER-Membran gezeigt werden, so dass eine mögliche Funktion als Antifusionsprotein denkbar wäre.

Das *single envelopment*-Modell stützt sich primär auf Elektronen-mikroskopische (EM)-Untersuchungen an HSV-1 und Rinder Herpes Virus 1 (BHV-1) infizierten Zellen. Auch hier kann aufgrund der Verwandtschaft innerhalb der Familie der Herpesviren davon ausgegangen werden, dass die Vorgänge der HSV-1- bzw. BHV-1-Morphogenese weitgehend auch auf mCMV übertragbar sind (Weiland et al., 1986).

Im Gegensatz zur *double envelopment theory* beschreibt das *single envelopment*-Modell den Austritt unbehüllter Kapside durch vergrößerte Kernporen aus dem Zellkern in das Zytoplasma der infizierten Zelle. Dass es aber auch zu einem *primary envelopment* der Nukleokapside an der inneren Kernmembran kommen kann, schließt dieses Modell nicht aus. Vielmehr scheinen beide Morphogenesewege parallel zu existieren. Der Austritt von Nukleokapsiden über die Kernporen ins Zytoplasma wurde bereits von Weiland et al. (1986) postuliert. In dieser Arbeit konnte in EM-Untersuchungen gezeigt werden, dass unbehüllte Kapside in unmittelbarer Nähe zu den Kernporen im Zytoplasma vorliegen. Parallel dazu konnte in infizierten MEF Elektronen-mikroskopisch ein *budden* der Nukleokapside an der inneren Kernmembran nachgewiesen werden. Bemerkenswert hierbei ist, dass diese Arbeit zur Virion-Morphogenese mit mCMV-infizierten Zellen durchgeführt wurde und sie somit die Theorie der grundsätzlichen Übertragbarkeit von Erkenntnissen über die Virion-Morphogenese anderer Herpesviren auf mCMV unterstützt.

Während der Infektion weiten sich bei der *single envelopment*-Hypothese die Kernporen von 160 nm auf etwa 1 μm (dies wurde bereits 1976 von Haines & Baerwald an HSV-1 infizierten Zellen gezeigt). Die Kapside gelangen zu den Kernporen über intranukleären Transport.

Die unbehüllten Kapside im Zytoplasma erhalten im weiteren ihre endgültige Hülle durch *budding* an der äußeren Kernmembran oder der ER-Membran aus dem Zytoplasma in den Perinuklearraum bzw. das ER-Lumen. Der Prozess des *single envelopment* steht im Gegensatz zur *double envelopment theory*: Bei der *single envelopment*-Hypothese behalten die Virionen ihre Hülle, die sie durch das *budden* an der äußeren Kernmembran oder der ER-Membran erworben haben.

Befindet sich das Virion im Perinuklearraum, wandert es laut *single envelopment*-Modell durch intralumenalen Transport durch die ER-Zisternen in die Golgi-Zisternen. Erstaunlicherweise kommt es bei diesem Prozess zu keiner Fusion der Virushülle mit dem Membransystem des ER oder des Golgi, wie dies normalerweise bei engem Kontakt von Membranen der Fall ist. Daher wird postuliert, dass Proteine in der Virushülle existieren, die eine Fusion der Virushüllmembran mit anderen Membransystemen verhindern, sogenannte Antifusionsproteine (Wild et al., 2002). Diese Proteine werden beim *Budding*-Prozess des

Kapsids erworben, da sie in den Membranen lokalisiert sind. Ohne diese Proteine würde eine spontane Fusion des Virions mit den räumlich sehr nahen Membransystemen stattfinden und es würde wieder unbehüllt ins Zytoplasma entlassen. Ein Antifusionsprotein-Kandidat in HSV-1 ist das Glykoprotein K (gK) (Hutchinson et al., 1995; Jayachandra et al., 1997). Das gK umfasst bei HSV-1 338 AS und besitzt 4 Transmembrandomänen (Debroy et al., 1985; Pertel & Spear, 1997). Es ist zweimal glykosyliert (Hutchinson et al., 1992; Ramaswamy & Holland, 1992), in der inneren und äußeren Kernmembran sowie im ER lokalisiert und wie m164 nicht in reifen Virionen zu finden (Foster et al., 2004). Bei der Infektion von Vero-Zellen mit einer HSV-1-Mutante, bei der gK deletiert wurde, bildeten sich zwar Virionen, diese wurden aber nicht aus dem Zytoplasma in den extrazellulären Raum transportiert. Die Virionen akkumulierten in TGN-ähnlichen Vesikeln (Jayachandra et al., 1997). Es wird vermutet, dass gK zusammen mit UL20 (Foster et al., 2004), UL31 und UL34 (Reynolds et al., 2002) die unerwünschte Fusion der Virushülle mit ER-Membranen während des intralumenalen Transports verhindert (zur Übersicht siehe Rajcani & Vojvodova, 1998).

Im weiteren Verlauf der *single envelopment theory* werden Transportvakuolen unterschiedlicher Größe, gefüllt mit einem oder mehreren Virionen, in den Golgi-Zisternen abgeschnürt. Diese Transportvakuolen bringen die Virionen zur Zelloberfläche, verschmelzen mit der Plasmamembran und entlassen behüllte Herpesviren.

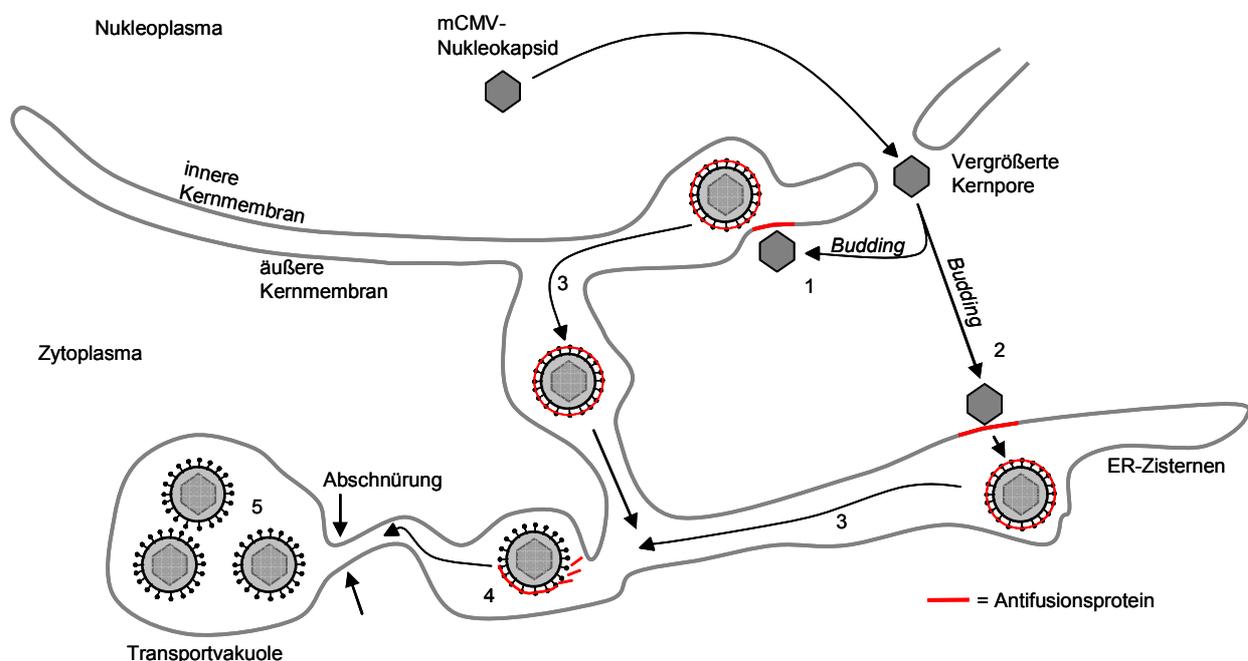


Abb. 85: Schematische Darstellung des mCMV envelopments laut *single envelopment theory*. Gezeigt sind das *envelopment* der unbehüllten Kapside aus dem Zytoplasma in den Perinuklearraum oder das ER-Lumen und der intralumenale Transport der Virionen. Die Kapside verlassen den Zellkern über vergrößerte Kernporen. Im Zytoplasma wird an der äußeren Kernmembran (1) und an der ER-Membran (2) ein *Budding*-Prozess induziert. Die jeweiligen Membranen bilden die Virionhülle, wobei ein Antifusions-Protein in dieser Hülle sitzt (rot) und eine Fusion des Virions mit den Membransystemen während des intralumenalen Transports (3) verhindert. Kurz bevor das behüllte

Kapsid in die Transportvakuole (5) verpackt wird, wird das Antifusionsprotein von der Virionhülle entfernt (4).

Das glykosylierte Membranprotein m164 ist in der äußeren Kernmembran und in der ER-Membran lokalisiert. Sollten Kapside an der äußeren Kernmembran oder an ER-Zisternen *budden*, treten sie zwangsläufig mit m164 in Kontakt und es wird Bestandteil der Virushülle. So ist denkbar, dass m164 eine Funktion als Antifusionsprotein hat. Auch die Tatsache, dass m164 kein Bestandteil des mCMV-Virions ist (Kattenhorn et al., 2004), würde zu den Eigenschaften eines Antifusionsproteins passen, da Antifusionsproteine auf dem Weg in die Transportvakuolen entfernt werden (siehe Abb. 85 (4)) (Leuzinger et al., 2005). Auch die Topologie eines Typ-I Membranglykoproteins könnte für ein Antifusionsprotein von Vorteil sein: Das kurze C-terminale Ende ragt ins Tegument, während der Hauptteil von etwa 268 Aminosäuren samt Glykosylierungsstelle, wie in Abb. 86 B dargestellt, als „Antifusionsteil“ agieren könnte.

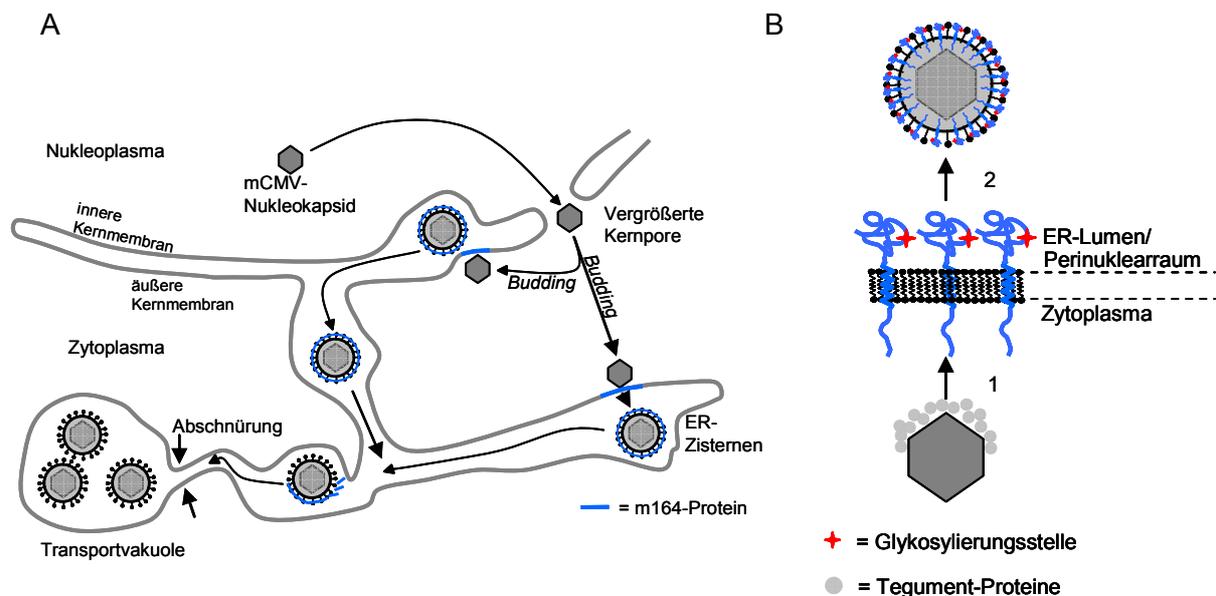


Abb. 86: Modell von m164 als Antifusionsprotein. In Abb. (A) ist das *Envelopment* der Kapside aus dem Zytoplasma in den Perinuklearraum oder das ER-Lumen gezeigt. Das m164-Protein ist als Antifusionsprotein blau dargestellt. Die hier gezeigte Darstellung des *primary envelopment* ist analog zu dem in Abb. 84 gezeigten Prozess. Abb. (B) zeigt detailliert die Vorgänge des CMV-*envelopments* an der äußeren Kernmembran oder der ER-Membran. An das noch unbehüllte Kapsid lagern sich bereits vor dem Membrandurchtritt Tegument-Proteine an (1). Über das C-terminale Ende von m164 nimmt das Kapsid Kontakt mit der Membran auf und gelangt durch *budding* in den Perinuklearraum oder das ER-Lumen. Schließlich liegt im Perinuklearraum oder dem ER-Lumen ein behülltes Virion vor, in dessen Hülle sich das m164-Protein befindet (2). Das relativ kurze C-terminale Ende ragt ins Tegument des Virions. Die lange Domäne mit der Glykosylierungsstelle ragt in den Perinuklearraum oder das ER-Lumen. Diese Domäne könnte im Virion während des intralumenalen Transports dafür verantwortlich sein, eine Fusion der Virionhülle mit ER-, Golgi-Membranen oder der äußeren Kernmembran zu verhindern.

Die Virionhülle wäre dann mit m164 gespickt (Abb. 86 B, 2). Während der intralumenalen Wanderung der Virionen zu den Transportvesikeln zeigen also die N-Termini der m164-

Proteine auf dem Virion bzw. in der ER-Membran zueinander. Ein direkter Kontakt zwischen der Virionmembran und dem lumenalen Membransystem könnte dadurch vermieden werden. Wie in Abb. 86 A (siehe auch Abb. 85 (4)) gezeigt ist, wird das m164-Protein (Antifusionsprotein) auf dem Weg in die Transportvakuole aus der Virionhülle entfernt. Dies könnte durch eine proteolytische Spaltung der ins Lumen gerichteten Proteindomäne von m164 durch eine Protease im ER geschehen.

Zahlreiche Membranproteine an der Zelloberfläche - beispielsweise Zytokin- und Wachstumsfaktor-Rezeptoren, Adhäsionsmoleküle (Seth et al., 1991) oder CD27 und CD40 auf B- und T-Zellen (Loenen et al., 1992) - können nicht nur membrangebunden sein, sondern ihre extrazelluläre Domäne kann auch löslich vorliegen (zur Übersicht siehe Rose-John & Heinrich, 1994). Zytokinrezeptoren sind Typ-I Membranproteine, deren extrazelluläre Domäne unter anderem durch proteolytische Spaltung (*shedding*) von der Membrandomäne getrennt werden kann, wobei die Fähigkeit zur Ligandenbindung erhalten bleibt. So wird etwa der Interleukin-6 Rezeptor (IL-6R) auf der Zelloberfläche bestimmter Zelltypen von einer ebenfalls membrangebundenen ADAM (A Disintegrin And Metalloprotease) kurz hinter seiner Membrandomäne auf der extrazellulären Seite proteolytisch gespalten (Müllberg et al., 1993). Der lösliche, N-terminale Teil des Rezeptors kann weiterhin IL-6 binden und ist somit in der Lage, in einer Zelle, die den IL-6R nicht exprimiert, zusammen mit der Dimerisierung des Interaktionspartners gp130 ein biologisches Signal auszulösen (Taga et al., 1989; Heinrich & Rose-John, 1993).

Das Adhäsionsmolekül NCAM-L1 Protein (*neural cell adhesion molecule L1*), ein Typ-I Membranglykoprotein, kann ebenfalls proteolytisch gespalten werden. Das an der Entwicklung des Nervensystems beteiligte Protein wird nahe seiner Membrandomäne durch eine Metalloprotease in einen löslichen N-terminalen Teil und einen Membran-assoziierten Stumpf gespalten (Beer et al., 1999).

Bei m164 bliebe bei intralumenaler proteolytischer Spaltung die Membrandomäne einschließlich der kurzen C-terminalen Domäne in der Virionmembran zurück. Da dies lediglich ein sehr kurzes Stück von m164 darstellt ist es denkbar, dass m164 Peptidfragmente von Kattenhorn in den Virionen zwar detektiert, aber aufgrund der erwartungsgemäß geringen Sequenzabdeckung nicht weiter verfolgt wurden.

4.3 Ausblick

Um zu überprüfen, ob m164 tatsächlich als Antifusionsprotein dient, müssten Virionen während des intralumenalen Transports zunächst einmal auf die Anwesenheit von m164 in der Virionhülle hin untersucht werden.

Dies könnte mit Hilfe von spezifischen m164-Antikörpern mit der Elektronenmikroskopischen Immunogold-Methode erfolgen. Vorstellbar wäre auch eine Trennung von ausgereiften Virionen und Virionen des Perinuklearraums/ER-Lumens durchzuführen. So sollten ausschließlich die Virionen des Perinuklearraums/ER-Lumens in Western Blot Analysen oder MALDI-TOF-MS Analysen die Anwesenheit von m164 zeigen. Es ist aber anzumerken, dass eine präparative Trennung der beiden Virion-Formen bislang technisch noch keiner Arbeitsgruppe gelungen ist.

Eine andere Möglichkeit wäre der Nachweis des postulierten m164-Stumpfes in den Virionen mit Hilfe von Western Blot Analysen. Da gemäß der Theorie der ins Lumen ragende N-terminale Teil des möglichen Antifusionsproteins m164 auf dem Weg in die Transportvakuolen proteolytisch entfernt werden sollte, müssten die Virionen in der Hülle zumindest den verbliebenen C-terminalen Teil mit Membrananker tragen. Wird mit Virionen aus dem WT-mCMV-Virusstock ein Western Blot durchgeführt, müsste mit dem α -m164 Antikörper (der gegen das C-terminale Ende von m164 gerichtet ist) das verbliebene, mindestens 68 Aminosäuren (ca. 7,5 kDa) große m164 Fragment nachweisbar sein.

In der Einleitung wurde bereits erwähnt, dass die Deletionsmutante mCMV Δ m164 keinen Phänotyp besitzt (Abschnitt 1.9). Die Mutante zeigte *in vivo* dieselbe Replikationskinetik wie WT-mCMV. Dies würde bedeuten, dass andere virale Proteine die Aufgabe von m164, sei es als Antifusionsprotein oder im Prozess des *De-envelopments*, übernehmen können. Es wäre deshalb sinnvoll, rekombinante Viren zu generieren, in welchen nur bestimmte Teile von m164 deletiert oder mutiert sind. Derartige Mutanten exprimieren defektes m164. Als Folge könnte das Virus einen gegenüber dem WT-mCMV veränderten Phänotyp aufweisen. Ein sicherlich interessantes Ziel stellt hier die Mutation der N-Glykosylierungsstelle dar (z.B. durch Austausch des Asparagins gegen ein Glutamin). Möglicherweise ist dies die entscheidende Stelle im Protein und eine Mutation dieser würde zu einer dominant negativen Mutante führen. So wäre vorstellbar, dass die Funktion als Antifusionsprotein durch die fehlende Glykosylierung aufgehoben oder zumindest empfindlich gestört wird.

Um detaillierte Informationen bezüglich einer Funktion von m164 im Kontext einer mCMV-Infektion zu erhalten, sollen in weiterführenden Arbeiten Interaktionen zwischen m164 und zellulären- sowie viralen Proteinen identifiziert werden. Zu diesem Zweck wird der lumenale Teil des m164-Proteins in einem *Yeast Two Hybrid (YTH) Assay* gegen eine cDNA Bibliothek gescreent. Die cDNA Bibliothek der viralen Proteine existiert bereits, diese muss jedoch noch in entsprechende *YTH*-Vektoren umkloniert werden. Positive Klone sollen schließlich über Pull-Down Assays oder FRET überprüft werden. Falls die Funktion der mit diesem Ansatz

detektierten Interaktionspartner bekannt wäre, könnten Rückschlüsse auf eine mögliche Funktion von m164 im Laufe einer mCMV-Infektion gezogen werden.

Die Suche nach viralen Interaktionspartnern ließe sich einschränken, wenn man annimmt, dass Hüllproteine des primären Virions mit m164 in der äußeren Kernmembran während des *De-envelopment* Prozesses interagieren. Da die Hüllproteine des primären Virions zuvor in der inneren Kernmembran saßen, kommen demnach virale Proteine in Betracht, die an oder in der inneren Kernmembran assoziiert sind. Dies sind unter anderem die in allen Herpesviren konservierten Proteine pUL34 und pUL31 (Fuchs et al., 2002). Diese Proteine bilden einen Komplex und sind für den Austritt der Nukleokapside über die innere Kernmembran von entscheidender Bedeutung. Sie rekrutieren die zelluläre Protein Kinase C, die das Laminnetzwerk phosphoryliert und dadurch auflöst (Reynolds et al., 2004). Diese Proteine sind nicht in reifen Virionen zu finden, da das primäre Virion sie möglicherweise während des *De-envelopment* Prozesses verliert (zur Übersicht siehe Mettenleiter et al., 2006). Lohnenswert wäre hier direkt die Interaktion zwischen M50/53, dem murinen Pendant zu pUL31/pUL34 und m164 zu überprüfen, beispielsweise mit Hilfe von FRET oder Pull-Down Assays.

5 Literatur

- Alwine, J. C., D. J. Kemp, B. A. Parker, J. Reiser, J. Renart, G. R. Stark, and G. M. Wahl.** 1979. Detection of specific RNAs or specific fragments of DNA by fractionation in gels and transfer to diazobenzyloxymethyl paper. *Methods Enzymol.* **68**:220-242.
- Andoniou, C. E., D. M. Andrews, and M. A. Degli-Esposti.** 2006. Natural killer cells in viral infection: more than just killers. *Immunol. Rev.* **214**:239-50.
- Arase, H., E. S. Mocarski, A. E. Campbell, A. B. Hill, and L. L. Lanier.** 2002. Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors. *Science* **296**:1323-1326.
- Beer, S., M. Oleszewski, P. Gutwein, C. Geiger, and P. Altevogt.** 1999. Metalloproteinase-mediated release of the ectodomain of L1 adhesion molecule. *J. Cell Sci.* **112**:2667-2675.
- Bione, S., E. Maestrini, S. Rivella, M. Mancini, S. Regis, G. Romeo, and D. Toniolo.** 1994. Identification of a novel X-linked gene responsible for Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat. Genet.* **8**:323-327.
- Bolger, G., N. Lapeyre, M. Rheaume, P. Kibler, C. Bousquet, M. Garneau, and M. Cordingley.** 1999. Acute murine cytomegalovirus infection: a model for determining antiviral activity against CMV induced hepatitis. *Antiviral. Res.* **44**:155-165.
- Bonnal, S., C. Boutonnet, L. Prado-Lourenco, and S. Vagner.** 2003. IRESdb: the internal ribosome entry site database. *Nucleic Acids Res.* **31**:427-428.
- Boppana, S. B., K. B. Fowler, Y. Vaid, G. Hedlund, S. Stagno, W. J. Britt, and R. F. Pass.** 1997. Neuroradiographic findings in the newborn period and long-term outcome in children with symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Pediatrics* **99**:409-414.
- Boppana, S. B., L. B. Rivera, K. B. Fowler, M. Mach, and W. J. Britt.** 2001. Intrauterine transmission of cytomegalovirus to infants of women with preconceptional immunity. *N. Engl. J. Med.* **344**:1366-1371.
- Boyle, K. A., and T. Compton.** 1998. Receptor-binding properties of a soluble form of human cytomegalovirus glycoprotein B. *J. Virol.* **72**:1826-1833.
- Brody, A. R., and J. E. Craighead.** 1974. Pathogenesis of pulmonary cytomegalovirus infection in immunosuppressed mice. *J. Infect. Dis.* **129**:677-689.
- Cai, W. H., B. Gu, and S. Person.** 1988. Role of glycoprotein B of herpes simplex virus type 1 in viral entry and cell fusion. *J. Virol.* **62**:2596-2604.
- Campadelli-Fiume, G., F. Farabegoli, S. Di Gaeta, and B. Roizman.** 1991. Origin of unenveloped capsids in the cytoplasm of cells infected with herpes simplex virus 1. *J. Virol.* **65**:1589-1595.
- Catimel, B., T. The, M. R. Fontes, I. G. Jennings, D. A. Jans, G. J. Howlett, E. C. Nice, and B. Kobe.** 2001. Biophysical characterization of interactions involving importin- α during nuclear import. *J. Biol. Chem.* **276**:34189-34198.
- Cech, T. R., and S. L. Brehm.** 1981. Replication of the extrachromosomal ribosomal RNA genes of *Tetrahymena thermophila*. *Nucleic Acids Res.* **9**:3531-3543.

- Cha, T. A., E. Tom, G. W. Kemble, G. M. Duke, E. S. Mocarski, and R. R. Spaete.** 1996. Human cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains. *J. Virol.* **70**:78-83.
- Chee, M. S., A. T. Bankier, S. Beck, R. Bohni, C. M. Brown, R. Cerny, T. Horsnell, C. A. Hutchison 3rd, T. Kouzarides, J. A. Martignetti, E. Preddie, S. C. Satchwell, P. Tomlinson, K. M. Westom, and B. G. Barrell.** 1990. Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **154**:125-169.
- Compton, T.** 1993. An immortalized human fibroblast cell line is permissive for human cytomegalovirus infection. *J. Virol.* **67**:3644-3648.
- Darlington, R. W., and L. H. Moss 3rd.** 1968. Herpesvirus envelopment. *J. Virol.* **2**:48-55.
- Davison, A. J., D. J. Dargan, and N. D. Stow.** 2002. Fundamental and accessory systems in herpesviruses. *Antiviral Res.* **56**:1-11.
- Debroy, C., N. Pederson, S. Person.** 1985. Nucleotide sequence of a herpes simplex virus type 1 gene that causes cell fusion. *Virology* **145**:36-48.
- Del Val, M., H. Hengel, H. Häcker, T. Hartlaub, T. Ruppert, P. Lucin, and U. H. Koszinowski.** 1992. Cytomegalovirus prevents antigen presentation by blocking the transport of peptide-loaded major histocompatibility complex class I molecules into the medial-Golgi compartment. *J. Exp. Med.* **176**:729-738.
- Djandji, D.** 2004. Die pathophysiologische Rolle der Infektion von sinusoidalen Endothelzellen der Leber mit murinem Zytomegalievirus. Doktorarbeit.
- Dolan, A., C. Cunningham, R. D. Hector, A. F. Hassan-Walker, L. Lee, C. Addison, D. J. Dargan, D. J. McGeoch, D. Gatherer, V. C. Emery, P. D. Griffiths, C. Sinzger, B. P. McSharry, G. W. Wilkinson, and A. J. Davison.** 2004. Genetic content of wild-type human cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.* **85**:1301-1312.
- Dorsch-Häsler, K., G. M. Keil, F. Weber, M. Jasin, W. Schaffner, and U. H. Koszinowski.** 1985. A long and complex enhancer activates transcription of the gene coding for the highly abundant immediate early mRNA in murine cytomegalovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **82**:8325-8329.
- Drew, W. L.** 1992. Cytomegalovirus infection in patients with AIDS. *Clin. Infec. Dis.* **14**:608-615.
- Dunn, W., C. Chou, H. Li, R. Hai, D. Patterson, V. Stolc, H. Zhu, and F. Liu.** 2003. Functional profiling of a human cytomegalovirus genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **100**:14223-14228.
- Edidin, M., Y. Zagjansky, and T. J. Lardner.** 1976. Measurement of membrane protein lateral diffusion in single cells. *Science* **191**:466-468.
- Eickmann, M., D. Gickelhorn, and K. Radsack.** 2006. Glycoprotein trafficking in Virion morphogenesis, p. 245-264. *In* M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: Molecular Biology and Immunology*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.

- Ellenberg, J., E. D. Siggia, J. E. Moreira, C. L. Smith, J. F. Presley, H. J. Worman, and J. Lippincott-Schwartz.** 1997. Nuclear membrane dynamics and reassembly in living cells: targeting of an inner nuclear membrane protein in interphase and mitosis. *J. Cell Biol.* **138**:1193-1206.
- Emery, V. C., and P. D. Griffiths.** 1990. Current status review: molecular biology of cytomegalovirus. *Int. J. Exp. Path.* **71**:905-918.
- Fahrenkrog, B., and U. Aebi.** 2003. The nuclear pore complex: nucleocytoplasmic transport and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**:757-766.
- Farazi, T. A., G. Waksman, and J. I. Gordon.** 2001. The biology and enzymology of protein N-myristoylation. *J. Biol. Chem.* **276**:39501-39504.
- Feierbach, B., S. Piccinotti, M. Bisher, W. Denk, and L. W. Enquist.** 2006. Alpha-herpesvirus infection induces the formation of nuclear actin filaments. *PLoS Pathog.* **27**:763-776.
- Förster, T.** 1948. Intermolecular energy migration and fluorescence. *Ann. Phys.* **2**:55-75.
- Foisner, R., and L. Gerace.** 1993. Integral membrane proteins of the nuclear envelope interact with lamins and chromosomes, and binding is modulated by mitotic phosphorylation. *Cell* **73**:1267-1279.
- Forest, T., S. Barnard, and J. D. Baines.** 2005. Active intranuclear movement of herpesvirus capsids. *Nat. Cell Biol.* **7**:429-431.
- Foster, T. P., J. M. Melancon, T. L. Olivier, and K. G. Kousoulas.** 2004. Herpes Simplex virus type 1 glycoprotein K and the UL20 protein are interdependent for intracellular trafficking and trans-Golgi network localization. *J. Virol.* **78**:13262-13277.
- Frohman, M. A., M. K. Dush, and G. R. Martin.** 1988. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **23**:8998-9002.
- Fuchs, W., B. G. Klupp, H. Granzow, N. Osterrieder, and T. C. Mettenleiter.** 2002. The interacting UL31 and UL34 gene products of pseudorabies virus are involved in egress from the host-cell nucleus and represent component of primary enveloped but not of mature virions. *J. Virol.* **76**:364-378.
- Georgatos, S. D.** 2001. The inner nuclear membrane: simple, or very complex? *EMBO J.* **20**:2989-2994.
- Gershon, A. A., D. L. Sherman, Z. Zhu, C. A. Gabel, R. T. Ambron, and M. D. Gershon.** 1994. Intracellular transport of newly synthesized varicella zoster virus: final envelopment in the *trans*-Golgi network. *J. Virol.* **68**:6372-6390.
- Gibson, W.** 1996. Structure and assembly of the virion. *Intervirology* **39**:389-400.
- Gibson, W.** 2006. Assembly and Maturation of the Capsid, p. 231-243. *In* M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: Molecular Biology and Immunology*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.

- Giese, B., A. Chi-King, A. Herrmann, S. Diefenbach, C. Haan, A. Küster, S. B. Wortmann, C. Roderburg, P. H. Heinrich, I. Behrmann, and G. Müller-Newen.** 2003. Long term association of the cytokine receptor gp130 and the janus kinase Jak1 revealed by FRAP analysis. *J. Biol. Chem.* **40**:39205-39213.
- Gluzman, Y.** 1981. SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* **23**:175-182.
- Goldman, R. D., Y. Gruenbaum, R. D. Moir, D. K. Shumaker, and T. P. Spann.** 2002. Nuclear lamins: building blocks of nuclear architecture. *Genes Dev.* **16**:533-547.
- Goncziol, E., E. Danczig, I. Boldogh, T. Toth, and L. Vaczi.** 1985. In vivo model for the acute, latent and reactivated phases of cytomegalovirus infection. *Acta Microbiol. Hung.* **32**:39-47.
- Gonnella, R., A. Farina, R. Santarelli, S. Raffa, R. Feederle, R. Bei, M. Granato, A. Modesti, L. Frati, and H. J. Delecluse.** 2005. Characterization and intracellular localization of the Epstein-Barr virus protein BFLF2: Interactions with BFRF1 and 3 with the nuclear lamina. *J. Virol.* **79**:3713-3727.
- Granzow, H., B. G. Klupp, W. Fuchs, J. Veits, N. Osterrieder, and T. C. Mettenleiter.** 2001. Egress of alphaherpesviruses: comparative ultrastructural study. *J. Virol.* **75**:3675-3684.
- Granzow, H., B. G. Klupp, and T. C. Mettenleiter.** 2004. The pseudorabies virus US3 protein is a component of primary and of mature virions. *J. Virol.* **78**:1314-1323.
- Granzow, H., F. Weiland, A. Jöns, B. G. Klupp, A. Karger, and T. C. Mettenleiter.** 1997. Ultrastructural analysis of the replication cycle of pseudorabies virus in cell culture: a reassessment. *J. Virol.* **71**:2072-2082.
- Grzimek, N. K. A., D. Dreis, D. Schmalz, and M. J. Reddehase.** 2001. Random, asynchronous, and asymmetric transcriptional activity of enhancer-flanking major immediate-early genes *ie1/3* and *ie2* during murine cytomegalovirus latency in the lungs. *J. Virol.* **75**:2692-2705.
- Haines, H., and R. J. Baerwald.** 1976. Nuclear membrane changes in herpes simplex virus-infected BHK-21 cells as seen by freeze-fracture. *J. Virol.* **17**:1038-1042.
- Hancock, K., and V. C. Tsang.** 1983. India ink staining of proteins on nitrocellulose paper. *Anal. Biochem.* **133**:157-162.
- Harlow, E., and D. Lane.** 1988. *Antibodies – a laboratory manual.* Cold Spring Harbour Laboratory, New York, USA.
- Hayes, P. H., G. K. Scott, N. F. L. Ng, C. L. Hew, and P. L. Davies.** 1989. Cysteine-rich type II antigen protein precursor is initiated from the third AUG Codon of its mRNA. *J. Biol. Chem.* **264**:18761-18767.
- Heinrich, P. C., and S. Rose-John.** 1993. Humoral factors, p. 47-63. *In* The Natural Immune System. Oxford University Press, Oxford.
- Hentze, M. W., and A. E. Kulozik.** 1999. A perfect message: RNA surveillance and nonsense-mediated decay. *Cell* **3**:307-310.

- Ho, S. N., H. D. Hunt, R. M. Horton, J. K. Pullen, and L. R. Pease.** 1989. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**:51-59.
- Höltke, H. J., and C. Kessler.** 1990. Non-radioactive labeling of RNA transcripts in vitro with the hapten digoxigenin (DIG); hybridization and ELISA-based detection. *Nucleic Acids Res.* **19**:5843-5851.
- Holtappels, R., D. Gillert-Marien, D. Thomas, J. Podlech, P. Deegen, S. Herter, S. A. Oehrlein-Karpi, D. Strand, M. Wagner, and M. J. Reddehase.** 2006. Cytomegalovirus encodes a positive regulator of antigen presentation. *J. Virol.* **80**:7613-7624.
- Holtappels, R., N. K. A. Grzimek, C. O. Simon, D. Thomas, D. Dreis, and M. J. Reddehase.** 2002b. Processing and presentation of murine cytomegalovirus pORFm164 peptide in fibroblasts in the face of all viral immunosubversive early gene functions. *J. Virol.* **76**:6044-6053.
- Holtappels, R., M.-F. Pahl-Seibert, D. Thomas, and M. J. Reddehase.** 2000. Enrichment of immediate-early 1 (m123/pp89) peptide-specific CD8 T cells in a pulmonary CD62L(lo) memory-effector cell pool during latent murine cytomegalovirus infection of the lungs. *J. Virol.* **74**:11495-11503.
- Holtappels, R., D. Thomas, J. Podlech, and M. J. Reddehase.** 2002a. Two antigenic peptides from genes m123 and m164 of murine cytomegalovirus quantitatively dominate CD8 T-cell memory in the *H-2^d* haplotype. *J. Virol.* **76**:151-164.
- Houtsmuller, A. B., and W. Vermeulen.** 2001. Macromolecular dynamics in living cell nuclei revealed by fluorescence redistribution after photobleaching. *Histochem. Cell Biol.* **2001** **115**:13-21.
- Hutchinson, L. M., S. Primorac, D. Snoddy, H. Ghosh, and D. C. Johnson.** 1992. Identification and characterization of a novel herpes simplex virus glycoprotein gK involved in cell fusion. *J. Virol.* **66**:5603-5609.
- Hutchinson, L., C. Roop-Beauchamp, and D. C. Johnson.** 1995. Herpes simplex virus glycoprotein K is known to influence fusion of infected cells, yet is not on the cell surface. *J. Virol.* **69**:4556-4563.
- Ilmarinen, T., K. Melen, H. Kangas, I. Julkunen, I. Ulfmanen, and P. Eskelin.** 2005. The monopartite nuclear localization signal of autoimmune regulator mediates its nuclear import and interaction with multiple importin α molecules. *FEBS J.* **273**:315-324.
- IUPAC-IUB, Commission on Biochemical Nomenclature (CBN).** 1970. Abbreviations and symbols for nucleic acids, polynucleotides and their constituents. *Eur. J. Biochem.* **15**:203-208.
- IUPAC-IUB, Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN).** 1984. Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides. *Eur. J. Biochem.* **138**:9-37.
- Jackson, R. J.** 2005. Alternative mechanisms of initiating translation of mammalian mRNAs. *Biochem. Soc. Trans.* **33**:1231-1241.
- Jansen, R. P.** 2001. mRNA localization: message on the move. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**:247-256.

- Jayachandra, S., A. Baghian, and K. G. Kousoulas.** 1997. Herpes simplex virus type 1 glycoprotein K is not essential for infectious virus production in actively replicating cells but is required for efficient envelopment and translocation of infectious virions from the cytoplasm to the extracellular space. *J. Virol.* **71**:5012–5024.
- Kaffman, A., and E. K. O’Shea.** 1999. Regulation of nuclear localization: a key to a door. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **15**:291-339.
- Kalderon, D., B. L. Roberts, W. D. Richardson, and A. E. Smith.** 1984. A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* **39**:499-509.
- Kane, P. M., C. T. Yamashiro, D. F. Wolczyk, M. Goebel, N. Neff, and T. H. Stevens.** 1990. Protein splicing converts the yeast TFP1 gene product to the 69-kD subunit of the vacuolar H(+)-adenosine triphosphatase. *Science* **250**:651-657.
- Karas, M., F. Hillenkamp.** 1988. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.* **60**:2299-22301.
- Karp, G.** 2002. Cytoplasmic membrane systems: structure, function and membrane trafficking, p. 279-333. *In Cell and Molecular Biology.* John Willey & Sons, Inc, New York.
- Karpova, T. S., C. T. Baumann, L. He, X. Wu, A. Grammer, P. Lipsky, G. L. Hager, and J. G. McNally.** 2003. Fluorescence resonance energy transfer from cyan to yellow fluorescent protein detected by acceptor photobleaching using confocal microscopy and a single laser. *J. Microsc.* **209**:56-70.
- Kattenhorn, L. M., M. Mills, M. Wagner, A. Lomsadze, V. Makeev, M. Borodovsky, H. L. Ploegh, and B. M. Kessler.** 2004. Identification of proteins associated with murine cytomegalovirus virions. *J. Virol.* **78**:11187-11197.
- Keil, G. M., A. Ebeling-Keil, and U. H. Koszinowski.** 1987. Sequence and structural organization of murine cytomegalovirus immediate-early gene 1. *J. Virol.* **61**:1901-1908.
- Kleijnen, M. F., J. B. Huppa, P. Lucin, S. Mukherjee, H. Farrell, A. E. Campbell, U. H. Koszinowski, A. B. Hill, and H. L. Ploegh.** 1997. A mouse cytomegalovirus glycoprotein, gp34, forms a complex with folded class I MHC molecules in the ER which is not retained but is transported to the cell surface. *EMBO J.* **16**:685-694.
- Klupp, B. G., H. Granzow, and T. C. Mettenleiter.** 2001. Effect of the pseudorabies virus US3 protein on nuclear membrane localization of the UL34 protein and virus egress from the nucleus. *J. Gen. Virol.* **82**:2363-2371.
- Knippers, R.** 1997. Transkription, Translation und der genetische Code, p. 45-80. *In Molekulare Genetik.* Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Koszinowski, U. H., M. J. Reddehase, and S. Jonjic.** 1993. The role of T-lymphocyte subsets in the control of cytomegalovirus infection, p. 429-445. *In Thomas D. B. (ed.), Viruses and the cellular immune response.* Marcel Dekker, Inc. New York, N. Y.
- Kozak, M.** 1986. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* **44**:283-292.
- Kozak, M.** 1987. At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J. Mol. Biol.* **196**:947-950.

- Kozak, M.** 1989a. The scanning model for translation: an update. *J. Cell Biol.* **108**:229-241.
- Kozak, M.** 1989b. Context effects and inefficient initiation at non-AUG codons in eucaryotic cell-free translation systems. *Mol. Cell Biol.* **9**:5073-5080.
- Kozak, M.** 1991. Effects of long 5' leader sequences on initiation by eukaryotic ribosomes in vitro. *Gene Expr.* **1**:117-125.
- Kozak, M.** 1996. Interpreting cDNA sequences: some insights from studies on translation. *Mamm. Genome* **8**:563-574.
- Krieg, P., and D. Melton.** 1984. Functional messenger RNAs are produced by SP6 in vitro transcription of cloned cDNAs. *Nucl. Acids Res.* **12**:7057-7070.
- Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- Lanier, L. L., and J. H. Phillips.** 1992. Natural killer cells. *Curr. Opin. Immunol.* **4**:38-42.
- Lathbury, L. J., J. E. Allan, G. R. Shellam, and A. A. Scalzo.** 1996. Effect of host genotype in determining the relative roles of natural killer cells and T cells in mediating protection against murine cytomegalovirus infection. *J. Gen. Virol.* **77**:2605-2613.
- Leuzinger, H., U. Ziegler, E. M. Schraner, C. Fraefel, D. L. Glauser, I. Heid, M. Ackermann, M. Mueller, and P. Wild.** 2005. Herpes simplex virus 1 envelopment follows two diverse pathways. *J. Virol.* **79**:13047-13059.
- Lilley, B. N., and H. L. Ploegh.** 2005. Viral modulation of antigen presentation: manipulation of cellular targets in the ER and beyond. *Immunol. Rev.* **207**:126-144.
- Lin, F., D. L. Blake, I. Callebaut, I. S. Skerjanc, L. Holmer, M. W. McBurney, M. Paulin-Levasseur, and H. J. Worman.** 2000. MAN1, an inner nuclear membrane protein that shares the LEM domain with lamina-associated polypeptide 2 and emerin. *J. Biol. Chem.* **275**:4840-4847.
- Lin F. T., O. A. MacDougald, A. M. Diehl, and M. D. Lane.** 1993. A 30-kDa alternative translation product of the CCAAT/enhancer binding protein alpha message: transcriptional activator lacking antimitotic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **90**:9606-9610.
- Lion, T., and O. A. Haas.** 1990. Nonradioactive labeling of probe with digoxigenin by polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* **188**:335-337.
- Lippincott-Schwartz, J., E. Snapp, and A. Kenworthy.** 2001. Studying protein dynamics in living cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**:444-456.
- Loenen, W. A., E. De Vries, L. A. Gravestien, R. Q. Hintzen, R. A. Van Lier, and J. Borst.** 1992. The CD27 membrane receptor, a lymphocyte-specific member of the nerve growth factor receptor family, gives rise to a soluble form by protein processing that does not involve receptor endocytosis. *Eur. J. Immunol.* **22**:447-455.
- Lottspeich, F., and H. Zorbach.** 1998. Massenspektrometrie, p. 323-368. *In* Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg.

- Luxton, G. W., J. Lee, S. Haverlock-Moyns, J. M. Schober, and G. A. Smith.** 2006. The pseudorabies virus VP1/2 tegument protein is required for intracellular capsid transport. *J. Virol.* **80**:201-209.
- Marks, J. R., and D. H. Spector.** 1988. Replication of the murine cytomegalovirus genome: structure and role of the termini in the generation and cleavage of concatemers. *Virology* **162**:98-107.
- Mayo, D. R., J. A. Armstrong, and M. Ho.** 1977. Reactivation of murine cytomegalovirus by cyclophosphamide. *Nature* **267**:721-723.
- Messerle, M., B. Bühler, G. M. Keil, and U. H. Koszinowski.** 1992. Structural organization, expression and functional characterization of the murine cytomegalovirus immediate-early gene 3. *J. Virol.* **66**:27-36.
- Messerle, M., G. M. Keil, and U. H. Koszinowski.** 1991. Structure and expression of murine cytomegalovirus immediate-early gene 2. *J. Virol.* **65**:1638-1643.
- Mettenleiter, T. C.** 2006. Intriguing interplay between viral proteins during herpesvirus assembly or: the herpesvirus assembly puzzle. *Vet. Microbiol.* **113**:163-169.
- Mettenleiter, T. C., B. C. Klupp, and H. Granzow.** 2006. Herpesvirus assembly: a tale of two membranes. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**:423-429.
- Minsky, M.,** 1988. Memoir on Inventing the Confocal Scanning Microscope. *Scanning* **10**:128-138.
- Miranda-Saksena, M., R. A. Boadle, P. Armati, and A. L. Cunningham.** 2002. In rat dorsal root ganglion neurons, herpes simplex virus type 1 tegument forms in the cytoplasm of the cell body. *J. Virol.* **76**:9934-9951.
- Misra, V., M. T. Muller, J. K. Chantler, and J. B. Hudson.** 1978. Regulation of murine cytomegalovirus gene expression. I. Transcription during productive infection. *J. Virol.* **27**:263-268.
- Mocarski, E. S.** 2004. Immune escape and exploitation strategies of cytomegaloviruses: impact on and imitation of the major histocompatibility system. *Cell. Microbiol.* **6**:707-717.
- Mocarski, E. S., and C. T. Courcelle.** 2001. Cytomegaloviruses and their replication, p 2629-2674. *In* D. M. Knipe and P. M. Howley (eds.), *Fields virology*, 4th ed., vol. 2. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.
- Moon, H. M., V. J. Sapienza, R. I. Carp, and K. S. Kim.** 1976. DNA synthesis in mouse embryo fibroblast cells infected with murine cytomegalovirus. *Virology* **75**:376-383.
- Müllberg, J., H. Schooltink, T. Stoyan, M. Gunther, L. Graeve, G. Buse, A. Mackiewicz, P. C. Heinrich, and S. Rose-John.** 1993. The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding. *Eur. J. Immunol.* **23**:473-480.
- Müller, J. N.** 2005. Einsatz der BAC-Mutagenese zur Generierung einer ORF m164 Deletionsmutante des murinen Cytomegalvirus. Diplomarbeit.
- Muranyi, W., J. Haas, M. Wagner, G. Krohne, and U. H. Koszinowski.** 2002. Cytomegalovirus recruitment of cellular kinases to dissolve the nuclear lamina. *Science* **297**:854-857.

- Murphy, E., D. Yu, J. Grimwood, J. Schmutz, M. Dickson, M. Jarvis, G. Hahn, J. Nelson, R. Myers, and T. Shenk.** 2003. Coding potential of laboratory and clinical strains of human cytomegalovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **100**:14976-14981.
- Navarro, D., P. Paz, S. Tugizov, K. Topp, J. La Vail, and L. Pereira.** 1993. Glycoprotein B of human cytomegalovirus promotes virion penetration into cells, transmission of infection from cell to cell, and fusion of infected cells. *Virology* **197**:143-158.
- Östlund, C., J. Ellenberg, E. Hallberg, J. Lippincott-Schwartz, and H. J. Worman.** 1999. Intracellular trafficking of emerin, the Emery-Dreifuss muscular dystrophy protein. *J. Cell Sci.* **112**:1709-1719.
- Ogawa-Goto, K., K. Tanaka, W. Gibson, E. Moriishi, Y. Miura, T. Kurata, S. Irie, and T. Sata.** 2003. Microtubule network facilitates nuclear targeting of human cytomegalovirus capsid. *J. Virol.* **77**:8541-8547.
- Ojala, P. M., B. Sodeik, M. W. Ebersold, U. Kutay, and A. Helenius.** 2000. Herpes simplex virus type 1 entry into host cells: reconstitution of capsid binding and uncoating at the nuclear pore complex in vitro. *Mol. Cell Biol.* **20**:4922-4931.
- Okazaki, S., T. Ito, M. Ui, T. Watanabe, K. Yoshimatsu, and H. Iba.** 1998. Two proteins translated by alternative usage of initiation codons in mRNA encoding a JunD transcriptional regulator. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **250**:347-353.
- Ossipow, V., P. Descombes, and U. Schibler.** 1993. CCAAT/enhancerbinding protein mRNA is translated into multiple proteins with different transcription activation potentials. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **90**:8219-8223.
- Pass, R. F.** 2001. Cytomegalovirus, p. 2675-2705. *In* D. M. Knipe and P. M. Howley (eds.), *Fields virology*, 4th ed., vol. 2. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.
- Peckham, C. S., K. S. Chin, J. C. Coleman, K. Henderson, R. Hurley, and P. M. Preece.** 1983. Cytomegalovirus infection in pregnancy: preliminary findings from a prospective study. *Lancet* **1**:1352-1355.
- Pertel, P. E, and P. G. Spear.** 1996. Partial resistance to gD-mediated interference conferred by mutations affecting herpes simplex virus type 1 gC and gK. *J. Virol.* **71**:8024-8028.
- Pickering, B. M., and A. E. Willis.** 2005. The implications of 5' untranslated regions on translation and disease. *Semin. Cell. Dev. Biol.* **16**:39-47.
- Pluskal, M. G.** 1986. ImmobilonTM PVDF transfer membrane: A new membrane substrate for blotting of proteins. *Biotechniques* **4**:272.
- Podlech, J., R. Holtappels, N. K. A. Grzimek, and M. J. Reddehase.** 2002. Animal models: murine cytomegalovirus, p. 493-527. *In* S. H. E. Kaufmann & D. Kabelitz (eds.), *Immunology of Infection*. Academic Press, London, United Kingdom.
- Podlech, J, R. Holtappels, N. Wirtz, H. P. Steffens, and M. J. Reddehase.** 1998. Reconstitution of CD8 T cells is essential for the prevention of multiple-organ cytomegalovirus histopathology after bone marrow transplantation. *J. Gen. Virol.* **79**:2099-2104.
- Quinnan, G. V., J. E. Manischewitz, and F. A. Ennis.** 1978. Cytotoxic T lymphocyte response to murine cytomegalovirus infection. *Nature* **273**:541-543.

- Radsak, K., H. Kern, B. Reis, M. Reschke, T. Mockenhaupt, and M. Eickmann.** 1995. Human cytomegalovirus-aspects of viral morphogenesis and of processing and transport of viral glycoproteins, p. 295-312. *In* G. Barbanti-Brodano (ed.), DNA tumor viruses: oncogenic mechanisms. Plenum Press, New York, N.Y.
- Rajcani, J., and A. Vojvodova.** 1998. The role of herpes simplex virus glycoproteins in the virus replication cycle. *Acta. Virol.* **42**:103-118.
- Ramaswamy, R, and T. C. Holland.** 1992. In vitro characterization of the HSV-1 UL53 gene product. *Virology.* **186**:579-587.
- Rawlinson, W. D., H. E. Farrell, and B. G. Barrell.** 1996. Analysis of the complete DNA sequence of murine cytomegalovirus. *J. Virol.* **70**:8833-8849.
- Reddehase, M. J.** 2002. Antigens and immunoevasins: opponents in cytomegalovirus immune surveillance. *Nat. Rev. Immunol.* **2**:831-844.
- Reddehase, M. J., S. Jonjic, F. Weiland, W. Mutter, and U. H. Koszinowski.** 1988. Adoptive immunotherapy of murine cytomegalovirus adrenalitis in the immunocompromised host: CD4-helper-independent antiviral function of CD8-positive memory T lymphocytes derived from latently infected donors. *J. Virol.* **62**:1061-1065.
- Reddehase, M. J., J. B. Rothbard, and U. H. Koszinowski.** 1989. A pentapeptide as minimal antigenic determinant for MHC class I-restricted T lymphocytes. *Nature* **337**:651-653.
- Reddehase, M. J., F. Weiland, K. Munch, S. Jonjic, A. Luske, and U. H. Koszinowski.** 1985. Interstitial murine cytomegalovirus pneumonia after irradiation: characterization of cells that limit viral replication during established infection of the lungs. *J. Virol.* **55**:264-273.
- Reinke, P., S. Prosch, F. Kern, and H. D. Volk.** 1999. Mechanisms of human cytomegalovirus (HCMV) (re)activation and its impact on organ transplant patients. *Transpl. Infect. Dis.* **1**:157-164.
- Reits, E., A. J., and J. J. Neefjes.** 2001. From fixed to FRAP: measuring protein mobility and activity in living cells. *Nature Cell Biol.* **3**:145-147.
- Reusch, U., W. Muranyi, P. Lucin, H. G. Burgert, H. Hengel, and U. H. Koszinowski.** 1999. A cytomegalovirus glycoprotein re-routes MHC class I complexes to lysosomes for degradation. *EMBO J.* **18**:1081-1091.
- Reynolds, A. E., L. Liang, and J. D. Baines.** 2004. Conformational changes in the nuclear lamina induced by herpes simplex virus type 1 require genes UL31 and UL34. *J. Virol.* **78**:5564-5575.
- Reynolds, A. E., E. G. Wills, R. J. Roller, B. J. Ryckman, and J. D. Baines.** 2002. Ultrastructural localization of the herpes simplex virus type 1 UL31, UL34 and US3 proteins suggests specific roles in primary envelopment and egress of nucleocapsids. *J. Virol.* **76**:8939-8952.
- Roizman, B., and E. P. Pellet.** 2001. The family herpesviridae: a brief introduction, p. 2381-2397. *In* D. M. Knipe and P. M. Howley (eds.), *Fields virology*, 4th ed., vol. 2. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.

- Roizman, B., and A. E. Sears.** 1987. An inquiry into the mechanisms of herpes simplex virus latency. *Ann. Rev. Microbiol.* **41**:543-571.
- Rose-John, S, and P. C. Heinrich.** 1994. Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. *Biochem. J.* **300**:281-290.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich.** 1988. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**:487-491.
- Schröder, C., and G. Keil.** 1999. Bovine herpesvirus 1 requires glycoprotein H for infectivity and direct spreading and glycoproteins gHW450 and gB for glycoprotein D-independent cell-to-cell spread. *J. Gen. Virol.* **80**:57-61.
- Schumacher, D., B. K. Tischer, S. Trapp, and N. Osterrieder.** 2005. The protein encoded by the Us3 orthologue of Marek's disease virus is required for efficient de-envelopment of perinuclear virions and involved in actin stress fiber breakdown. *J. Virol.* **79**:3987-3997.
- Seth, R., F. D. Raymond, and M. W. Makgoba.** 1991. Circulating ICAM-1 isoforms: diagnostic prospects for inflammatory and immune disorders. *Lancet* **338**:83-84.
- Shaw, G., and R. Kamen.** 1986. A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell* **46**:659-667.
- Shimi, T., T. Koujin, M. Segura-Totten, K. L. Wilson, T. Haraguchi, and Y. Hiraoka.** 2003. Dynamic interaction between BAF and emerin revealed by FRAP, FLIP, and FRET analysis in living HeLa cells. *J. Struct. Biol.* **147**:31-41.
- Simon, C. O.** 2006. Generierung und Charakterisierung von rekombinanten Cytomegaloviren mit Punktmutationen in antigenen Peptiden. Doktorarbeit.
- Simon, C. O., R. Holtappels, H.-M. Tervo, V. Böhm, T. Däubner, S. A. Oehrlein-Karpi, B. Kühnapfel, A. Renzaho, D. Strand, J. Podlech, M. J. Reddehase, and N. K. A. Grzimek.** 2006a. CD8 T cells control cytomegalovirus latency by epitope-specific sensing of transcriptional reactivation. *J. Virol.* **80**:10436-10456.
- Simon, C. O., C. K. Seckert, N. K. A. Grzimek, and M. J. Reddehase.** 2006b. Murine model of cytomegalovirus latency and reactivation: the silencing/desilencing and immune sensing hypothesis, p. 483-500. *In* M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: Molecular Biology and Immunology*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.
- Simonsen, C. C., and A. D. Levinson.** 1983. Analysis of processing and polyadenylation signals of the hepatitis B virus surface antigen gene by using simian virus 40-hepatitis B virus chimeric plasmids. *Mol. Cell Biol.* **12**:2250-2258.
- Slobedman, B. and E. S. Mocarski.** 1999. Quantitative analysis of latent human cytomegalovirus. *J. Virol.* **73**:4806-4812.
- Smith, M. G.** 1956. Propagation in tissue cultures of a cytopathogenic virus from human salivary gland virus (SGV) disease. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **92**:224-230.
- Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. X. Fujimoto, N. M. Goetze, B. J. Olsen, and D. C. Klenk.** 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**:76-85.

- Smith, R. D., and R. W. Wehner.** 1980. Acute cytomegalovirus glomerulonephritis: an experimental model. *Lab. Invest.* **43**:278-286.
- Sodeik, B., M. W. Ebersold, and A. Helenius.** 1997. Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J. Cell. Biol.* **136**:1007-1021.
- Soullam, B., and H. J. Worman.** 1995. Signal and structural features involved in integral membrane protein targeting to the inner nuclear membrane. *J. Cell Biol.* **130**:15-27.
- Stackpole, C. W.** 1969. Herpes-type virus of the frog renal adenocarcinoma. I. Virus development in tumor transplants maintained at low temperature. *J. Virol.* **4**:75-93.
- Streblow, D. N., S. M. Varnum, R. D. Smith, and J. A. Nelsom.** 2006. A proteomics analysis of human cytomegalovirus particles, p. 91-110. *In* M. J. Reddehase (ed.), *Cytomegaloviruses: Molecular Biology and Immunology*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.
- Strive, T., D. Gickhorn, M. Wohlfahrt, L. Kolesnikova, M. Eickmann, E. Borst, M. Messerle, and K. Radsak.** 2005. Site directed mutagenesis of the carboxyl terminus of human cytomegalovirus glycoprotein B leads to attenuation of viral growth in cell culture. *Arch. Virol.* **3**:585-593.
- Stryer, L., R. P. Haugland.** 1967. Energy transfer: a spectroscopic ruler. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2**:719-726.
- Taga, T., M. Hibi, Y. Hirata, K. Yamasaki, K. Yasukawa, T. Matsuda, T. Hirano, and T. Kishimoto.** 1989. Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell* **58**:573-581.
- Tang, Q., E. A. Murphy, and G. Maul.** 2006. Experimental confirmation of global murine cytomegalovirus open reading frames by transcriptional detection and partial characterization of newly described gene products. *J. Virol.* **80**:6873-6882.
- Thäle, R., U. Szepan, U. Hengel, G. Geginat, P. Lucin, and U. H. Koszinowski.** 1995. Identification of the mouse cytomegalovirus genomic region affecting major histocompatibility complex class I molecule transport. *J. Virol.* **69**:6098-6105.
- Thomas, P. S.** 1980. Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **9**:5201-5205.
- Tognon, M., D. Furlong, A. J. Conley, and B. Roizman.** 1981. Molecular genetics of herpes simplex virus. V. Characterization of a mutant defective in ability to form plaques at low temperatures and in a viral fraction which prevents accumulation of coreless capsids at nuclear pores late in infection. *J. Virol.* **40**:870-880.
- Trincado, D. E., and W. D. Rawlinson.** 2001. Congenital and perinatal infections with cytomegalovirus. *J. Paediatr. Child Health.* **37**:187-192.
- Turcotte, S., J. Letellier, and R. Lippe.** 2005. Herpes simplex virus type 1 capsids transit by the trans-Golgi network, where viral glycoproteins accumulate independently of capsid egress. *J. Virol.* **79**:8847-8860.

- Varnum, S. M., D. N. Streblow, M. E. Monroe, P. Smith, K. J. Auberry, L. Pasa-Tolic, D. Wang, D. G. Camp, K. Rodland 2nd, S. Wiley, W. Britt, T. Shenk, R. D. Smith, and J. A. Nelson.** 2004. Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome. *J. Virol.* **78**:10960-10966.
- Vaughn, J. L., R. N. Goodwin, G. L. Thompkins, and P. Cawley.** 1977. The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda*. *In Vitro* **13**:213-217.
- Verveer, P. J., O. Rocks, A. G. Harpur, and I. H. Bastiaens.** 2005. Imaging protein interactions by FRET microscopy, p. 609-637. *In* E. A. Golemis and P. D. Adams (eds.), *Protein-Protein Interactions*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York, USA.
- Vink, C., E. Beuken, and C. A. Bruggeman.** 2000. Complete DNA sequence of the rat cytomegalovirus genome. *J. Virol.* **74**:7656-7665.
- Voet, D., and J. G. Voet.** 1994. Andere Wege des Kohlenhydrat-Stoffwechsels, p. 561-586. *In* *Biochemie*. VCH, Weinheim.
- Wagner, M., A. Gutermann, J. Podlech, M. J. Reddehase, and U. H. Koszinowski.** 2002. Major histocompatibility complex class I allele-specific cooperative and competitive interactions between immune evasion proteins of cytomegalovirus. *J. Exp. Med.* **196**:805-816.
- Wang, X., S. M. Huong, M. L. Chiu, N. Raab-Traub, and E. S. Huang.** 2003. Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus. *Nature* **424**:456-61.
- Weiland, F., G. M. Keil, M. J. Reddehase, and U. H. Koszinowski.** 1986. Studies on the morphogenesis of murine cytomegalovirus. *Intervirology* **26**:192-201.
- Weller, T. H., J. B. Hanshaw, and D. E. Scott.** 1960. Serology differentiation of viruses responsible for cytomegalic inclusion disease. *Virology* **12**:130-132.
- Welsh, R. M.** 1986. Regulation of virus infections by natural killer cells. A review. *Nat. Immun. Cell Growth Regul.* **5**:169-199.
- Wickens, M., and P. Stephenson.** 1984. Role of the conserved AAUAAA sequence: four AAUAAA point mutants prevent messenger RNA 3' end formation. *Science* **226**:1045-1051.
- Wild, P., M. Engels, C. Senn, K. Tobler, U. Ziegler, E. M. Schraner, E. Loepfe, M. Ackermann, M. Mueller, and P. Walther.** 2005. Impairment of nuclear pores in bovine herpesvirus 1-infected MDBK cells. *J. Virol.* **79**:1071-1083.
- Wild, P., E. M. Schraner, D. Cantieni, E. Loepfe, P. Walther, M. Müller, and M. Engels.** 2002. The significance of the Golgi complex in envelopment of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) as revealed by cryobased electron microscopy. *Micron.* **33**:327-337.
- Wintergerst, U., C. Hübener, A. Strauss, G. Jäger, K. Bise, J. Herms, and A. Schulze.** 2006. Schwere kongenitale CMV-Infektion trotz maternem CMV-Durchseuchungstiter. *Monatsschr. Kinderheilkd.* **154**:558-564.
- Wolfner, M. F., and K. L. Wilson.** 2001. The nuclear envelope: emerging roles in development and disease. *Cell. Mol. Life Sci.* **58**:1737-1740.

- Wolfstein, A., C. H. Nagel, K. Radtke, K. Dohner, V. Allan, and B. Sodeik.** 2006. The inner tegument promotes herpes simplex virus capsid motility along microtubules in vitro. *Traffic* **7**:227-237.
- Wouters, F. S., P. J. Verveer, and P. I. Bastiaens.** 2001. Imaging biochemistry inside cells. *Trends Cell. Biol.* **11**:203-211.
- Wu, P., and L. Brand.** 1994. Resonance energy transfer: methods and applications. *Anal. Biochem.* **1**:1-13.
- Zhu, Z., M. D. Gershon, Y. Hao, R. T. Ambron, C. A. Gabel, and A. A. Gershon.** 1995. Envelopment of varicella-zoster virus: targeting of viral glycoproteins to the *trans*-Golgi network. *J. Virol.* **69**:7951-7959.
- Ziegler, H., W. Muranyi, H.-G. Burgert, E. Kremmer, and U. H. Koszinowski.** 2000. The luminal part of the murine cytomegalovirus glycoprotein gp40 catalyzes the retention of MHC class I molecules. *EMBO J.* **19**:870-881.
- Ziegler, H., R. Thäle, P. Lucin, W. Muranyi, T. Flohr, H. Hengel, H. Farrell, W. Rawlinson, and U. H. Koszinowski.** 1997. A mouse cytomegalovirus glycoprotein retains MHC class I complexes in the ERGIC/cis-Golgi compartments. *Immunity* **6**:57-66.

6 Veröffentlichungen

Simon, C. O., R. Holtappels, H.-M. Tervo, V. Böhm, T. Däubner, S. A. Oehrlein-Karpi, B. Kühnapfel, A. Renzaho, D. Strand, J. Podlech, M. J. Reddehase, and N. K. A. Grzimek. 2006. CD8 T cells control cytomegalovirus latency by epitope-specific sensing of transcriptional reactivation. *J. Virol.* 80:10436-10456.

Däubner, T., D. Strand, A. Seitz, C. O. Simon, A. Renzaho, C. Krause, D. Schaible, K. Downard, S. Tenzer, N. K. A. Grzimek-Koschewa, M. J. Reddehase, and S. A. Oehrlein-Karpi. 2007. Identification of the ORF*m164* gene product of murine cytomegalovirus as a 38 kDa type-I glycoprotein localizing to the outer nuclear membrane. *J. Virol.* (in preparation).

Poster:

Oehrlein-Karpi, S. A., T. Däubner, C. O. Simon, A. Renzaho, N. K. A. Grzimek-Koschewa, and M. J. Reddehase. 2004. The m164 protein of murine cytomegalovirus. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Tübingen.

Oehrlein-Karpi, S. A., T. Däubner, J. N. Müller, A. Renzaho, J. Podlech, D. Strand, and M. J. Reddehase. 2005. The m164 protein of murine cytomegalovirus. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie, Heidelberg.

Lemmermann, N., T. Däubner, D. Thomas, A. Renzaho, N. K. A. Grzimek-Koschewa, R. Holtappels-Geginat, M. J. Reddehase, and S. A. Oehrlein-Karpi. 2006. Construction of an orthotopic CD8 T cell epitope swap mutant of murine cytomegalovirus. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, München.

T. Däubner, N. K. A. Grzimek-Koschewa, C. O. Simon, A. Renzaho, J. N. Müller, D. Strand, M. J. Reddehase, and S. A. Oehrlein-Karpi. 2006. The m164 protein of murine cytomegalovirus. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie, Braunschweig.

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation „Molekulare Charakterisierung und Aufklärung der intrazellulären Lokalisation des ORF*m164* Genprodukts des Murinen Cytomegalovirus“ selbstständig verfasst und keine als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Mainz, den 08. März 2007

Torsten Däubner