

# **Entwicklung einer DNA-Vakzine gegen das humane Zytomegalievirus**

Von der Fakultät Geo- und Biowissenschaften der Universität Stuttgart genehmigte  
Abhandlung zur Erlangung der Würde eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

vorgelegt von Birgit Schrage

Hauptberichter: Prof. Dr. Peter Scheurich

Mitberichter: Prof. Dr. Frank T. Hufert

Tag der mündlichen Prüfung: 24.07.2002

Institut für Zellbiologie und Immunologie der Universität Stuttgart

Juli 2002

## I Inhaltsverzeichnis

I Inhaltsverzeichnis .....	II
II Abkürzungen .....	V
III Zusammenfassung .....	X
IV Summary .....	XI
1 Einleitung .....	1
1.1 Das humane Zytomegalievirus (HCMV) .....	1
1.1.1 Virale Struktur und Genomaufbau .....	1
1.1.2 Replikation und Transkription .....	3
1.1.3 Die Glykoproteine gB und gH des humanen Zytomegalievirus .....	4
1.1.4 Epidemiologie und klinische Symptomatik .....	8
1.1.5 Immunantwort gegen HCMV .....	9
1.1.6 Therapie und Prophylaxe .....	11
1.2 DNA-Vakzinierung .....	13
1.2.1 DNA-Vakzine-Vektor .....	13
1.2.2 Mechanismus der Antigenpräsentation .....	14
1.2.3 Vorteile, Nachteile und Sicherheitsbedenken von DNA-Impfstoffen .....	16
1.2.4 DNA-Impfstoffe gegen HCMV .....	17
1.3 Zielsetzung und Fragestellung .....	18
2 Materialien und Methoden .....	19
2.1 Chemikalien .....	19
2.2 Geräte .....	19
2.3 Oligonukleotide und Sonde .....	20
2.4 Vektoren .....	20
2.4.1 Klonierungsvektoren pCR <sup>TM</sup> 2.1-TOPO und pCR <sup>TM</sup> II-TOPO .....	20
2.4.2 Expressionsvektor pJW4303 .....	20
2.4.3 Expressionsvektor VR1055 .....	21
2.4.4 Expressionsvektor pRc/CMV2gB .....	22
2.4.5 Expressionsvektor pCMV-S .....	22
2.5 Arbeiten mit Viren .....	23

---

2.5.1 Virusanzucht .....	23
2.5.2 Bestimmung der Virustiter.....	25
2.6 Arbeiten mit DNA.....	27
2.6.1 Präparation von DNA aus Zellkulturüberstand, PBL und Urin .....	27
2.6.2 Präparation von DNA aus Gewebe.....	27
2.6.3 Präparation von Plasmid-DNA.....	28
2.6.4 Bestimmung der DNA-Konzentration.....	30
2.6.5 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen .....	30
2.6.6 Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) .....	30
2.6.7 Auftrennung von DNA-Fragmenten im Agarosegel .....	31
2.6.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	31
2.6.9 Dephosphorylierung linearer Plasmid-DNA.....	32
2.6.10 Ligation und Klonierung.....	33
2.6.11 Transformation und Transfektion.....	34
2.6.12 Sequenzierung .....	36
2.7 PCR-Amplifikation .....	38
2.7.1 PCR-Amplifikation zur gB-Typisierung .....	38
2.7.2 PCR-Amplifikation zur gH-Typisierung .....	40
2.7.3 PCR-Amplifikation zur Klonierung in den Expressionsvektor pJW4303.....	41
2.7.4 PCR-Amplifikation zur Klonierung in den Expressionsvektor VR1055 .....	45
2.7.5 PCR-Amplifikation zum Nachweis von Plasmid-DNA in immunisierten Mäusen und deren Nachkommen.....	46
2.7.6 Aufreinigung von Amplifikaten nach PCR.....	48
2.8 Antigen-Nachweis.....	49
2.8.1 Proteinnachweis mittels indirektem Immunfluoreszenztest (IFT).....	49
2.8.2 HBsAg ELISA.....	50
2.9 Immunisierung von Mäusen .....	50
2.9.1 DNA-Immunisierung intramuskulär (i.m.).....	52
2.9.2 DNA-Immunisierung intrakutan (i.c.) .....	52
2.9.3 DNA-Immunisierung intranasal (i.n.) .....	53
2.9.4 Intramuskuläre DNA-Immunisierung in sich fortpflanzenden Mäusen.....	53
2.9.5 Immunisierung von Mäusen mit einem Lysat HCMV-infizierter HFF-Zellen... 54	
2.10 Nachweis einer antigenspezifischen humoralen Immunantwort .....	55

---

2.10.1 Antikörpernachweis mittels indirektem Immunfluoreszenztest (IFT) .....	55
2.10.2 Neutralisationstest .....	55
2.11 Nachweis einer antigenspezifischen zellulären Immunantwort.....	57
2.11.1 <i>in-vitro</i> -Stimulation antigenspezifischer T-Zellen .....	57
2.11.2 Nachweis einer antigenspezifischen T-Zell Antwort mittels <sup>51</sup> Cr-Freisetzungs- Assay .....	59
3 Ergebnisse.....	61
3.1 Variabilität der Glykoproteine gB und gH .....	61
3.1.1 gB- und gH-Variabilität in klinischen Isolaten .....	61
3.1.2 gB- und gH-Variabilität in Nativmaterialien virämischer Patienten.....	64
3.1.3 gB-Genotyp Verteilung in Organen immunkompetenter Individuen.....	67
3.2 Herstellung der DNA-Vakzine .....	69
3.2.1 Klonierung der DNA-Vakzine-Vektoren.....	70
3.2.2 Überprüfung der DNA-Vakzine-Vektoren .....	70
3.3 Immunreaktion nach DNA-Vakzinierung .....	76
3.3.1 Humorale Immunantwort.....	76
3.3.2 Zelluläre Immunantwort .....	83
3.4 Verteilung von DNA-Vakzine-Vektoren und exprimiertem Antigen in Organen immunisierter Mäuse und in deren Nachkommen.....	86
3.4.1 Sensitivität der PCR Assays.....	86
3.4.2 Verteilung von Plasmid-DNA in immunisierten erwachsenen Mäusen.....	88
3.4.3 Verteilung von Plasmid-DNA in sich fortpflanzenden Mäusen und deren Nachkommen .....	91
3.4.4 Verteilung von HBsAg in Organen pCMV-S immunisierter Mäuse .....	94
4 Diskussion .....	96
4.1 Variabilität der Glykoproteine gB und gH .....	96
4.2 Immunreaktion nach DNA-Vakzinierung .....	99
4.2.1 Humorale Immunantwort.....	100
4.2.2 Zelluläre Immunantwort .....	102
4.3 Verteilung von DNA-Vakzine-Vektoren und exprimiertem Antigen in Organen immunisierter Mäuse und in deren Nachkommen.....	103
5. Literaturverzeichnis .....	107
A. Anhang .....	119

---

## II Abkürzungen

$\Delta R_n$	normalisierte Fluoreszenzintensität
AD1, AD2	antigene Domänen des gB
AD169	HCMV-Laborstamm
AD86	antigene Domäne des gH
AIDS	acquired immuno deficiency syndrom
Ak	Antikörper
ALU	Adju-Phos
Amp	Ampicillin
APC	Antigen-Präsentierende Zelle
AS	Aminosäure
AT	annealing temperature
ATP	Adenosintriphosphat
BGH	bovines Wachstumshormon
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserum Albumin
CD3-TCR	CD3-T-Zell-Rezeptor
Cls	Cleavage-site-Region des gB
CMV	Zytomegalievirus
COOH	C-terminales Proteinende
CpG	Cytosin-Guanosin-Dinukleotid
cpmE	counts per minute mit Effektorzellen
cpmS	counts per minute der Spontanfreisetzung (mit Medium)
cpmT	counts per minute der Totalfreisetzung (mit 2 M HCl)
C-Term	cytoplasmatischer Proteinbereich
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
CV1, CV2, CV3	cluster of variation, variable Bereiche des gH
D1, D2, D3	antigene Domänen des gB
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
Dabcyl	dark Quencher für TaqMan™ Sonde

---

DC	Dendritische Zelle
DC1, DC2, DC3	antigene Domänen des gB
ddNTP	dye-labeled Dideoxynukleotide
DMEM	Zellkulturmedium, Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Dideoxynukleotide
ds	doppelstrang
DTT	Dithiothreitol
E	delayed early Gene oder Proteine
E	Effektor-Zellen des CTL-Assay
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetra-Essigsäure
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Exp.	Experiment
FAM	Reporterfarbstoff für TaqMan™ Sonde
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FKS	Fötale Kälberserum
g	Erdanziehung
gB	Glykoprotein des HCMV
gB1, gB2, gB3, gB4	Genotypen 1 – 4 des gB
gB1ΔTM	Glycoprotein gB, Genotyp 1, ohne Transmembrandomäne und cytoplasmatischen Teil
gBad	AD1-Region des gB
gBc	C-terminale Region des gB
gBcls	Cleavage-site-Region des gB
gBn	N-terminale Region des gB
gC III-Komplex	Proteinkomplex bestehend aus gO, gH und gL
gCI-Komplex	Heterodimer aus gp55 und gp116
GCR33	Glykoprotein des HCMV
gH	Glykoprotein des HCMV
gH1, gH2	Genotypen 1 und 2 des gH
gHcv1	CV1-Region des gH
gHcv2	CV2-Region des gH

---

gHcv3	CV3-Region des gH
gL	Glykoprotein des HCMV
gM	Glykoprotein des HCMV
gO	Glykoprotein des HCMV
GOI	gene of interest
gp 116	Oberflächenbereich des gB
gp48	Glykoprotein des HCMV
gp55	Transmembranbereich des gB
H2-Kd	MHC-Klasse-I-Allel der Balb/c-Maus
H2-Ld	MHC-Klasse-I-Allel der Balb/c-Maus
HBs-Ag	kleines Oberflächenantigen des Hepatitis B Virus
HBV	Hepatitis B Virus
HCMV	Humanes Zytomegalievirus
HFF	Humane Vorhaut-Fibroblasten
HHV5	Humanes Herpesvirus 5
HIV	Humanes Immunodefizienz Virus
HSV	Herpes Simplex Virus
i.c.	intracutan
i.d.	intradermal
i.m.	intramuskulär
i.n.	intranasal
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IE	immediate early Gene oder Proteine
IE1	major immediate early 1 Gen oder Protein
IFN $\gamma$	Interferon $\gamma$
IFT	Immunfluoreszenz Test
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IR	internal repeat
IU/L	international units per litre
Jak	Janus Kinase

---

kb	Kilo-Basenpaare
kDa	kilo Dalton
KM	Knochenmark
Konz.	Konzentration
L	late Gene oder Proteine
LB	Bakterienkulturmedium, Luria Bertani
LK	Lymphknoten
M2	Protein des RSV
M84	Gen oder Protein des MCMV
mAk	monoklonaler Antikörper
MCMV	Murines Zytomegalievirus
MCP	major capsid Protein
MEM	Zellkulturmedium, Minimum Essential Medium
MHC	major histocompatibility complex
MOI	multiplicity of infection
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MWM	molecular weight marker, DNA Marker
N	Neutralisation
ND	nicht bestimmt
NH <sub>2</sub>	aminoterminales Proteinende
NK	Natürliche Killer-Zellen
nPCR	nested Polymerase Kettenreaktion
NTC	no-template-control, Negativkontrolle
N-Term	aminoterminaler Proteinbereich
ORF	offener Leserahmen
ORI	Replikationsursprung
p.c.	post coitus
p82	RSV M2-spezifisches Peptid
PBL	periphere Blutleukozyten
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
POX	Peroxidase
pp150	Phosphoprotein 150 des HCMV



---

pp65	Phosphoprotein 65 des HCMV
pp65/1 – pp65/11	HCMV pp65-spezifische Peptide
pp89	IE1 Protein des HCMV
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
Rox	Referenzfarbstoff für TaqMan™
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Zellkulturmedium
RSV	Respiratorisches Syncytialvirus
RT	Raumtemperatur
SD	Speicheldrüse
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Stat	signal transducers and activators of transcription
SV40	Simian Virus 40
T	Zielzellen des CTL-Assay
TAP1/2	transporter associated with antigen processing
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylen-diamin
tpa	tissue plasminogen activator leader sequence
TR	terminal repeat
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Unit
UL 55	Gen das für HCMV gB kodiert
UL x	Gene oder Proteine des HCMV
U <sub>L</sub>	unique long Region des HCMV Genoms
UL115	Gen das für HCMV gL kodiert
UL75	Gen das für HCMV gH kodiert
ÜN	über Nacht
US x	Gene oder Proteine des HCMV
U <sub>s</sub>	unique short Region des HCMV Genoms
V	Infektiösität Virus mit Immunglobulin
V <sub>0</sub>	Infektiösität Virus ohne Immunglobulin
VV	Vaccinia Virus

### III Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines DNA-Impfstoffes gegen das humane Zytomegalievirus. Eine humorale Immunantwort sollte gegen die viralen Glykoproteine gB und gH gerichtet sein, eine zelluläre Immunantwort sollte gegen das virale Phosphoprotein pp65 induziert werden.

In einem ersten Teil der Arbeit wurde die genetische Variabilität der Glykoproteine gB und gH untersucht. Sowohl in immunsupprimierten als auch in immunkompetenten Patienten konnten nur vier verschiedenen gB-Genotypen (gB1-4) und zwei verschiedene gH-Genotypen (gH1-2) nachgewiesen werden. Die in dieser Arbeit entwickelte DNA-Vakzine sollte all diese Varianten der Glykoproteine gB und gH enthalten, um so einen effektiven Schutz vor einer Erkrankung mit HCMV zu ermöglichen.

Für die DNA-Immunisierung wurden Expressionsvektoren konstruiert, die jeweils einzeln die Glykoproteine gB1, gB1 $\Delta$ TM, gB2, gB3, gB4, gH1, gH2, gL sowie das Phosphoprotein pp65 des HCMV enthielten. Mäuse wurden i.m., i.c., oder i.n. mit diesen Vektoren immunisiert und auf die Induktion einer Immunantwort sowie auf die Verteilung von Plasmid-DNA in verschiedenen Organen hin untersucht.

Eine humorale Immunantwort gegen das Glykoprotein gB konnte in i.m. immunisierten Mäusen induziert werden. Die Antikörpertiter erreichten Werte von bis zu 640. Durch i.n. Immunisierung konnten nur sehr spät und mit einem sehr geringen Titer gB-spezifische Antikörper induziert werden. Antikörper gegen gH oder gegen pp65 konnten nicht nachgewiesen werden. Auch eine zelluläre Immunantwort gegen das Phosphoprotein pp65 konnte durch DNA-Immunisierung nicht induziert werden.

Die Untersuchung von Organen DNA-immunisierter Tiere und deren Nachkommen auf Plasmid-DNA zeigte, daß der Impfvektor sechs Wochen nach Immunisierung noch in allen untersuchten Organen persistiert. Dies war sowohl bei i.m. als auch bei i.c. immunisierten Tieren der Fall. Plasmid-DNA konnte auch in den Nachkommen DNA-immunisierter Mäuse nachgewiesen werden. Exprimiertes Protein (HBsAg) konnte in verschiedenen Organen von Mäusen nachgewiesen werden, die i.m. mit dem Expressionsvektor pCMV-S immunisiert worden waren.

---

## IV Summary

The human cytomegalovirus (HCMV) causes significant and even lifethreatening disease especially in congenitally infected or immunocompromised individuals. A vaccine against HCMV is not available so far although several approaches have been used to develop one.

Aim of this dissertation was the development of a DNA-vaccine against the human cytomegalovirus. It was intended to direct a humoral immune response against the viral glycoproteins gB and gH and a cellular immune response against the viral phosphoprotein pp65. In contrast to previous immunisation approaches the genetic variability of the immunodominant proteins was taken into account.

In the first part of the dissertation the genetic variability of HCMV glycoproteins gB and gH was analysed. In immunocompromised as well as in immunocompetent patients only four different gB genotypes (gB1-4) and two different gH genotypes (gH1-2) were detected. Intra-genic variability between the different gB or gH genotypes was also observed. Immunocompetent individuals were found to be infected with different HCMV strains simultaneously. This indicates that a primary infection with one HCMV strain only insufficiently protects from reinfection with a different virus strain.

For the DNA-immunisation nine expressionvectors were constructed that contained glycoproteins gB1, gB1 $\Delta$ TM, gB2, gB3, gB4, gH1, gH2, gL and the phosphoprotein pp65. Mice were intramuscularly, intranasally or intracutaneously immunised with these plasmids and analysed for either the induction of an immune response or the distribution of plasmid-DNA in different organs

A humoral immune response against the glycoprotein gB could be induced in i.m. immunised mice, with maximum antibodytiters of 640. In mice, i.n. immunised gB-specific antibodies were induced very late after immunisation and with very low titers. None of these HCMV-antibody-positive sera of DNA-vaccinated mice was able to neutralise virus. Antibodies against glycoprotein gH or phosphoprotein pp65 could not be detected. Also a cellular immune response against the phosphoprotein pp65 could not be induced by DNA-immunisation.

To address safety concerns about DNA-vaccines we analysed the distribution of DNA-vaccines in different tissues of immunised mice and the transfer of the immunisation vector to

---

their offspring. Using highly sensitive nested PCRs we could show a wide distribution and a long persistence of plasmid DNA in different tissues of immunised mice. The immunisation vector could be detected in nearly all tissues six weeks postinjection. Moreover expression of the foreign antigen could be found in all analysed tissues 10 weeks after the last immunisation. Plasmid-DNA was also detected in fetuses and in five week old offspring of immunised mice.

## 1 Einleitung

### 1.1 Das humane Zytomegalievirus (HCMV)

Zytomegalieviren (griech: kytos, Zelle; megas, groß) gehören in die Familie der Herpesviren. Die offizielle Nomenklatur bezeichnet das Virus als Humanes Herpesvirus 5 (HHV5). Unter der Infektion mit HCMV kommt es zu einer Vergrößerung der Zellen mit charakteristischen DNA-haltigen intranukleären Einschlusskörperchen und Synzytienbildung ("Eulenaugenzellen"). HCMV wurde erstmals 1956 von Smith aus der Speicheldrüse und den Nieren eines Kindes isoliert (Smith, 1956). Das Virus wurde der  $\beta$ -Subklasse der Herpesviren zugewiesen, die sich durch eine langsame Replikation und ein enges Wirtsspektrum auszeichnen. HCMV kann nur den Menschen infizieren, ein Tiermodell steht daher nicht zur Verfügung.

#### 1.1.1 Virale Struktur und Genomaufbau

Die HCMV-Virionen haben einen Durchmesser von etwa 150 nm und bestehen wie alle Herpesviren aus einem Nukleokapsid, einer Hülle und einem Tegument (Mocarski, 1996). Der schematische Aufbau eines HCMV-Virions ist in Abbildung 1.1 dargestellt.

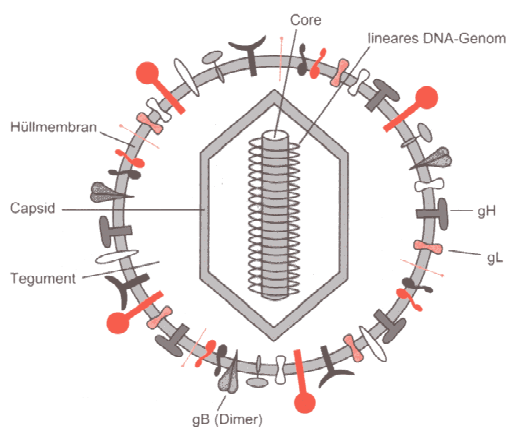


Abb. 1.1: Schematische Darstellung eines HCMV-Virions

Im Innern des Virions befindet sich das Nukleokapsid mit dem linearen, doppelsträngigen DNA-Genom. Zwischen dem Nukleokapsid und der Hüllmembran befindet sich das Tegument. In die Hüllmembran eingelagert sind verschiedene Glykoproteine, wie zum Beispiel gB, gH und gL.

Quelle: Modrow, 1997 (verändert)

Das Nukleokapsid des HCMV besteht aus 162 Kapsomeren, die sich zu einem etwa 100 nm großen Ikosaeder zusammenfügen. Die Kapsomere werden hauptsächlich von dem "major capsid protein" (MCP) gebildet. Ein zweites Protein, das "minor capsid protein", befindet sich an der Innenseite des Kapsides und spielt dort eine Rolle beim Verankern der DNA.

Die Hülle von HCMV ist aus einer Lipid-Doppelmembran aufgebaut, in die verschiedene Glykoproteine eingelagert sind. Diese stellen sich elektronenmikroskopisch als "spikes" dar. Die Umhüllung der Viruspartikel erfolgt zuerst an der inneren Kernmembran und im späteren Verlauf des Infektionszyklus an der Zytoplasmamembran. Durch den Transport über das endoplasmatische Reticulum und den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche findet eine Modifizierung der Oberflächenproteine und eine Reifung der Virionen statt. Die Glykoproteine der Virushülle erfüllen wichtige Funktionen, z. Bsp. bei der Adsorption der Partikel an die Zellrezeptoren, bei der Penetration und Aufnahme sowie bei der Induktion einer neutralisierenden Antikörperantwort. Für das HCMV sind acht Glykoproteine bekannt. Die beiden wichtigsten Glykoproteine, gB und gH, werden weiter unten ausführlich charakterisiert.

Zwischen Nukleokapsid und Hülle befindet sich das Tegument, eine unstrukturierte Matrix aus meist phosphorylierten Proteinen. Die Proteine werden während der Infektion in die Wirtszelle freigesetzt und übernehmen wichtige regulatorische Funktionen im Replikationszyklus des Virus. Zwei der häufigsten Tegumentproteine des HCMV sind die Phosphoproteine pp65 und pp150. Beide sind stark immunogen.

Das Genom des HCMV liegt als lineare Doppelstrang-DNA im Nukleokapsid vor. Die Sequenz des HCMV-Laborstammes AD169 ist bekannt (Chee *et al.*, 1990) (EMBL Nukleotid-Datenbank Accession-No. X17403). Mit 230 000 Basenpaaren (bp), die für etwa 200 Proteine kodieren, ist es das größte Genom unter den Herpesviren.

Das Genom ist in zwei Segmente unterteilt, eine lange Einheit Unique long ( $U_L$ ) und eine kurze Einheit Unique short ( $U_S$ ). Diese nicht-repetitiven Genomsegmente werden von repetitiven Sequenzen, den terminal repeats (TRs) und internal repeats (IRs), flankiert. Mit Hilfe der TRs kann das Genom eine geschlossene Ringform bilden, welche für die Replikation notwendig ist. Während der Replikation können durch intramolekulare Rekombination der TRs und IRs vier isomere Genomformen entstehen, in denen die  $U_L$ - und die  $U_S$ -Regionen unterschiedlich zueinander orientiert sind.

### 1.1.2 Replikation und Transkription

Bei der Infektion einer Zelle mit HCMV adsorbieren die Viruspartikel an bislang unbekannte Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Viruspartikel und Zellmembran verschmelzen miteinander, das Nukleokapsid gelangt zusammen mit dem Tegument in das Zytoplasma. Das Kapsid wird durch Mikrotubuli zum Kern transportiert, anschließend wird das HCMV-Genom in das Nukleoplasma entlassen. Die virale DNA zirkularisiert und liegt anschließend episomal im Kernplasma vor.

Die Expression des Virusgenoms erfolgt in einem kaskadenartig regulierten Zyklus (Becker, 1993; Mocarski, 1996). Bereits 30 min nach der Infektion beginnt die Expression der immediate early Proteine (IE). Diese Proteine dienen als Regulatoren für die Transkription späterer Gene, indem sie die Aktivität viraler und zellulärer Promotoren beeinflussen. Etwa acht bis 36 Stunden nach Infektion erfolgt die Transkription der delayed early Gene (E). Bei diesen Proteinen handelt es sich hauptsächlich um Enzyme, wie zum Beispiel die DNA-Polymerase oder die Helikase, welche für die Replikation des Virusgenoms erforderlich sind. Die Replikation des HCMV-Genoms beginnt etwa 12 bis 24 Stunden nach der Infektion und folgt dem Prinzip des "rolling circle". Ungefähr zeitgleich mit der Replikation der Virus-DNA werden die "late" Proteine (L) exprimiert. Hierbei handelt es sich um Strukturproteine: Glykoproteine, Tegumentproteine und Proteine des Nukleokapsids.

Im Zellkern findet anschließend der Zusammenbau der verschiedenen Strukturproteine des Virus-Genoms zum Viruspartikel statt. Es folgt der Transport durch die innere und äußere Kernmembran, das endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche. Hier werden die auf ihrem Weg modifizierten und gereiften Virionen freigesetzt. Das Virus kann sich jedoch auch durch Zell-Zell-Kontakt oder Zellfusion ausbreiten. Der Infektionszyklus endet mit der Lyse der Zelle.

Wie alle anderen Herpesviren besitzt auch HCMV die Fähigkeit, nach der Erstinfektion latent im Organismus zu verbleiben und zu persistieren. Hierbei liegt die Virus-DNA in den Zellen als extrachromosomales Episom im Kernplasma vor. Sie wird parallel mit dem Zellgenom durch die zelluläre DNA-Polymerase repliziert und an die Tochterzellen weitergegeben. Die Produktion infektiöser Partikel wird unterdrückt. Die Etablierung und die Aufrechterhaltung der Latenz sowie die erneute Reaktivierung zur lytischen Replikation wird über CMV-Latenz-Assoziierte-Transkripte reguliert (Kondo and Mocarski, 1995; Slobedman and Mocarski, 1999). Ort der Latenz beim HCMV sind Monozyten, myelomonozytäre Vorläuferzellen des

---

Knochenmarks und Endothelzellen (Fish *et al.*, 1995; von Laer *et al.*, 1995). Das Virus kann hier lebenslang persistieren und reaktivieren.

### 1.1.3 Die Glykoproteine gB und gH des humanen Zytomegalievirus

In die Hüllmembran des HCMV sowie in die Zytoplasmamembran infizierter Zellen sind verschiedene virale Glykoproteine eingelagert. Sieben dieser Glykoproteine (gp48, GCR33, gB, gH, gM, gL und gO) konnten bislang charakterisiert und einem offenen Leserahmen (ORF) des viralen Genoms zugeordnet werden. Den Hauptanteil an Proteinen in der Virushülle nehmen die Glykoproteine gB (>50%) und gH (>30%) ein.

#### Aufbau der Glykoproteine gB und gH

Das gB wird von dem ORF UL55 kodiert. Es wird ein gB-Vorläuferprotein von 906 Aminosäuren gebildet, das posttranslational glykosyliert und von zellulären Proteasen nach der Position 460 (Cleavage-site) gespalten wird (Spaete *et al.*, 1988; Britt and Vugler, 1989; Spaete *et al.*, 1990; Britt and Vugler, 1992). Durch die proteolytische Spaltung des gB entstehen zwei Untereinheiten, der Transmembranbereich gp55 und der Oberflächenbereich gp116. Beide Untereinheiten bleiben jedoch über Disulfidbrücken miteinander verbunden. Das Heterodimer aus gp55 und gp116 wird auch als gCI-Komplex bezeichnet (Britt, 1984; Britt *et al.*, 1990; Kari *et al.*, 1990).

Das Glykoprotein gH wird von dem ORF UL75 kodiert (Cranage *et al.*, 1988; Pachel *et al.*, 1989). Das Protein hat eine Länge von 743 Aminosäuren und wird ebenso wie das gB posttranslational glykosyliert. Das gH ist über Disulfidbrücken mit dem Glykoprotein gL (UL115) verbunden (Spaete *et al.*, 1993; anderson *et al.*, 1996). Diese Bindung ist notwendig für die Reifung und den intrazellulären Transport von gH zur Plasmamembran. Zusammen mit einem dritten Protein, dem Glykoprotein gO, bilden gH und gL auf der Virushülle den gCIII-Komplex aus (Huber and Compton, 1997, 1998).

Der schematische Aufbau der Glykoproteine gB und gH ist in Abbildung 1.2 dargestellt.



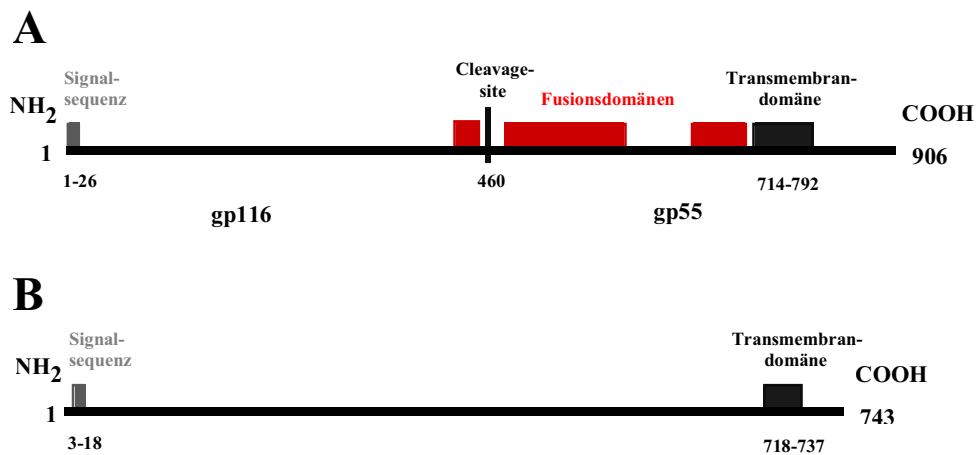


Abb. 1.2: Aufbau der Glykoproteine gB (A) und gH (B)

1= erste Aminosäure des gB bzw. gH vom HCMV-Stamm AD169 (EMBL Nukleotid-Datenbank Accession-No. X17403)

### Funktion der Glykoproteine gB und gH

Die Glykoproteine gB und gH sind multifunktionell. Beide Proteine spielen eine wichtige Rolle sowohl bei der Penetration der Viruspartikel durch Fusion der Virushülle mit der Zellmembran als auch bei der Weitergabe des Virus von Zelle zu Zelle (Pachl *et al.*, 1989; Keay and Baldwin, 1991; Navarro *et al.*, 1993; Reschke *et al.*, 1995). Hierbei kommt es durch die Fusion von infizierten und uninfizierten Zellen zu einer Synzytienbildung (Tugizov *et al.*, 1994; Tugizov *et al.*, 1995). Die für die Fusion verantwortlichen Epitope sind im Fall von gB hauptsächlich um die Cleavage-site und in der Transmembranregion zu finden (Qadri *et al.*, 1992; Navarro *et al.*, 1997). Für das Glykoprotein gH sind bislang keine fusogenen Domänen beschrieben.

### Immundominante Domänen der Glykoproteine gB und gH

Die Glykoproteine gB und gH sind Hauptziele der humoralen Immunantwort. Nahezu 100% aller infizierter HCMV seropositiver Personen besitzen Antikörper, die gegen gB gerichtet sind. Antikörper gegen gH können in >80% nachgewiesen werden (Urban *et al.*, 1996; Schoppel *et al.*, 1997)

Die humorale Immunantwort gegen das Glykoprotein gB ist recht gut untersucht (Marshall *et al.*, 1992; Marshall *et al.*, 1994). Verschiedene lineare und konformationsabhängige Epitope

sind bekannt. Im N-terminalen Bereich des Proteins sind die linearen antigenen Domänen AD2 bzw. DC1 beschrieben (Basgoz *et al.*, 1992; Meyer *et al.*, 1992; Ayata *et al.*, 1994). Die Sequenz in diesem Genbereich ist zwischen den verschiedenen HCMV-Stämmen sehr variabel. Weitere lineare Epitope sind die antigene Domäne AD1 in der mittleren Region des Proteins (Kniess *et al.*, 1991; Navarro *et al.*, 1997) sowie die Domänen DC2 und DC3 im intrazellulären C-terminalen Bereich (Banks *et al.*, 1989; Qadri *et al.*, 1992). Die diskontinuierlichen und somit konformationsabhängigen Epitope D1, D2 und D3 befinden sich in der mittleren Region des Proteins rund um die Cleavage-site (Qadri *et al.*, 1992).

Für das Glykoprotein gH ist eine lineare neutralisierende Antikörper-Bindestelle beschrieben, die N-terminal gelegen ist (AD86). Dieses Epitop ist stammspezifisch, da in diesem Bereich sehr starke Sequenzvariationen zwischen verschiedenen HCMV-Stämmen existieren (Urban *et al.*, 1992a). Drei weitere konformationsabhängige neutralisierende Epitope innerhalb des gH sind vorhanden, eine genaue Lokalisation ist jedoch nicht bekannt (Simpson *et al.*, 1993).

Neben den oben beschriebenen B-Zell-Epitopen gibt es sowohl innerhalb des Glykoproteins gB als auch innerhalb des Glykoproteins gH T-Zell-Epitope, gegen die eine zelluläre Immunantwort gerichtet ist (Borysiewicz *et al.*, 1988; Liu *et al.*, 1993; Beninga *et al.*, 1996; Berencsi *et al.*, 1996).

Die immundominanten Domänen der Glykoproteine gB und gH sind in Abbildung 1.3 dargestellt.

### **Sequenzvariationen und Stammvariabilität**

Das Genom des Glykoproteins gB von HCMV wurde erstmals 1986 von Cranage *et al.* sequenziert (Cranage *et al.*, 1986), 1988 erfolgte die Sequenzierung des Glykoproteins gH von der gleichen Arbeitsgruppe (Cranage *et al.*, 1988). In beiden Fällen wurde die Sequenz des Laborstammes AD169 beschrieben. Die Sequenzanalyse weiterer klinischer HCMV-Isolate zeigte jedoch, daß es sowohl innerhalb des gB als auch innerhalb des gH Variabilitäten zwischen verschiedenen Stämmen gibt.

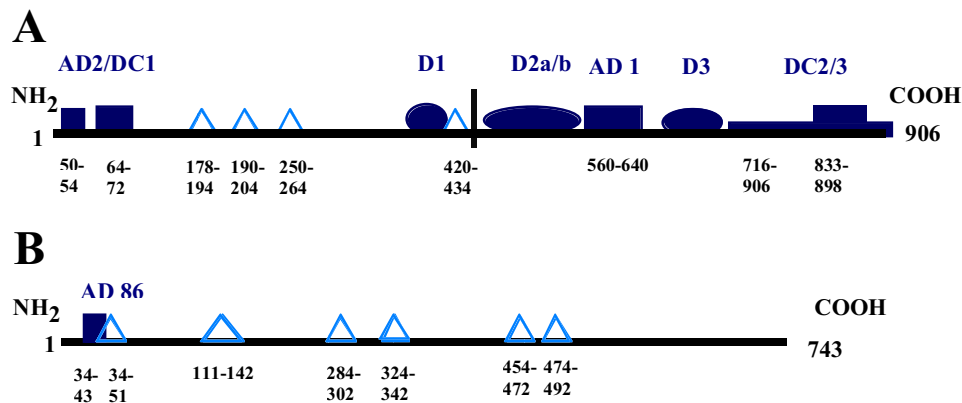


Abb. 1.3: Immundominante Domänen der Glykoproteine gB (A) und gH (B)

1= erste Aminosäure des gB bzw. gH vom HCMV-Stamm AD169 (EMBL Nukleotid-Datenbank Accession-No. X17403)

■ = kontinuierliche B-Zellepitope, ● = diskontinuierliche B-Zellepitope, △ = T-Zellepitope

Für das gB wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen Sequenzanalysen klinischer Isolate durchgeführt und man geht davon aus, daß es weltweit vier verschiedene Genotypen des Glykoproteins gB gibt (Chou, 1992a; Shiu *et al.*, 1994; Zipeto *et al.*, 1998). Diese Genotypen werden als gB1 bis gB4 bezeichnet. Die Nukleotidhomologie innerhalb eines Genotyps liegt bei 99-100%, zwischen verschiedenen Genotypen bei 88-95%. Die größten Sequenzvariabilitäten innerhalb des gB werden in der N-terminalen Region (bp 47-392) und in der Nähe der Cleavage-site (bp 1317-1617) gefunden (Lehner *et al.*, 1991). Eine Unterscheidung der gB-Typen in diesen Bereichen erfolgt mittels eines Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) (Chou, 1990).

Das Glykoprotein gH des HCMV ist im Gegensatz zum gB bislang nicht so ausgiebig untersucht worden. 1992 wurden von Chou aus klinischen Isolaten verschiedene Regionen des gH-Gens sequenziert (Chou, 1992b; Fries *et al.*, 1994). Er konnte zwischen zwei verschiedenen Genotypen, gH1 und gH2, unterscheiden. Die größte Sequenzvariabilität innerhalb des gH findet man in der N-terminalen Region (cluster of variation 1, CV1) mit einer Nukleotidhomologie von nur 86%.

Eine Schematische Darstellung der Sequenzvariationen innerhalb der Glykoproteine gB und gH ist in Abbildung 1.4 dargestellt.

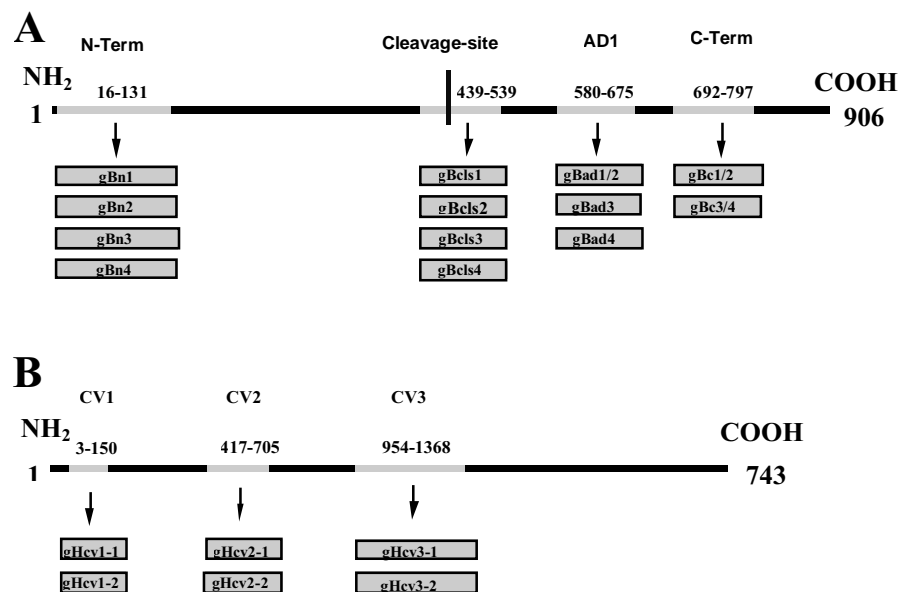


Abb. 1.4: Sequenzvariation der Glykoproteine gB (A) und gH (B)

Bei der Analyse von klinischen Isolaten wurden die folgenden Genotypen gefunden: Im Bereich des N-Terminus und der Cleavage-site von gB konnten jeweils 4 Typen (gBn1-4 und gBcls1-4), im Bereich der AD1-Region konnten 3 Typen (gBad1/2, gBad3 und gBad4) und im Bereich des C-Terminus konnten 2 Typen (gBc1/2 und gBc3/4) unterschieden werden. Im N-terminalen Bereich von gH (cluster of variation 1 oder gHcv1) und den Bereichen gHcv2 bzw. gHcv3 konnten jeweils zwei Typen (gHcv1-1 und gHcv1-2, gHcv2-1 und gHcv2-2, gHcv3-1 und gHcv3-2) unterschieden werden.

1= erste Aminosäure des gB bzw. gH vom HCMV-Stamm AD169 (EMBL Nukleotid-Datenbank Accession-No. X17403)

### 1.1.4 Epidemiologie und klinische Symptomatik

Zytomegalieviren besitzen eine hohe Wirtsspezifität, Reservoir des HCMV ist allein der Mensch.

Eine Übertragung des Virus erfolgt durch direkten Kontakt mit infektiösen Körpersekreten wie Speichel, Urin, Sperma, Zervixsekret und Muttermilch (Reynolds *et al.*, 1973; Lang and Kummer, 1975; Stagno *et al.*, 1980). Desweiteren können Blutprodukte und Transplantate zu einer Übertragung von HCMV führen. Ein weiterer wichtiger Übertragungsweg ist der von der Mutter auf das ungeborene oder das neugeborene Kind (Becker, 1993; Britt, 1996).

Die Durchseuchungsrate der Bevölkerung hängt von sozioökonomischen Faktoren ab und reicht von 60% der über 35-jährigen in den westlich zivilisierten Ländern bis zu 100% in einigen Teilen Afrikas und des Fernen Ostens.

Die Primärinfektion immunkompetenter Personen verläuft meist asymptomatisch, in seltenen Fällen kann es zu mononukleoseähnlichen Erkrankungen kommen.

Congenitale Infektionen mit HCMV sind eine der häufigsten Ursachen für eine Schädigung der Embryonen und betreffen etwa 1 von 1000 Lebendgeburten. Pränatale Infekte führen in etwa zehn Prozent der Fälle zur zytomegalen Einschlußkörperchenkrankheit, die sich in Hepatosplenomegalien, Thrombozytopenien, Hörschäden und Entwicklungsdefekten aufgrund der Infektion des zentralen Nervensystems äußert. Die perinatale Übertragung des Virus auf Neugeborene kann zu ähnlichen, aber meist abgeschwächten Symptomen führen (Becker, 1993; Britt, 1996).

Bei immunsupprimierten Patienten verursacht die HCMV-Infektion je nach Stärke der iatrogenen Immunsuppression schwere Krankheitsverläufe. Sie reichen von einer Fieberreaktion bis zu lebensbedrohlichen Organmanifestationen wie Hepatitis, Chorioretinitis, Enzephalitis oder gastrointestinalen Ulceration. Eine der gefürchtetsten Organmanifestationen ist die interstitielle HCMV-Pneumonie, die mit einer Inzidenz von 10-15% nach Herz-, Lungen- oder Knochenmarktransplantation auftritt und unbehandelt in 80-90% der Fälle zum Tod führt. HCMV-Primärinfektionen oder -Reaktivierungen können bei organtransplantierten Patienten eine Abstoßung des Transplantats begünstigen (Becker, 1993; Britt, 1996).

Bei AIDS-Patienten kann HCMV zu disseminierter Infektion mit multiplem Organbefall wie Lunge, Nebenniere, Gastrointestinaltrakt und dem zentralen Nervensystem führen (Becker, 1993; Britt, 1996). Die häufigste Manifestation ist die Retinitis. Eine HCMV-Infektion beschleunigt den Krankheitsverlauf von AIDS und gilt als prognostisch ungünstig (Leach *et al.*, 1994).

### **1.1.5 Immunantwort gegen HCMV**

Eine Infektion mit HCMV ruft sowohl eine zelluläre als auch eine humorale Immunantwort hervor. Das Zusammenspiel zwischen Virus und Immunsystem des Wirtes ist jedoch überaus komplex, da HCMV selbst mit Zellen des Immunsystems interagiert.

Die zelluläre Immunantwort ist für die Kontrolle der lytischen Infektion und die Beendigung der Symptome verantwortlich. Zytotoxische T-Lymphozyten erkennen vor allem Epitope des Phosphoproteins pp65 sowie des Major-Immediate-Early-Proteins (IE1) (van Zanten *et al.*, 1995; Wills *et al.*, 1996; Khattab *et al.*, 1997).

Antikörper gegen HCMV kontrollieren die virämische Ausbreitung des Virus (Becker, 1993). Die Mehrheit der neutralisierenden Antikörper ist gegen die viralen Glykoproteine gB und gH gerichtet, eine Vielzahl antigener Domänen auf diesen Proteinen ist bekannt (siehe Kap. 1.1.3). Diese Domänen sind zum Teil konserviert in allen HCMV-Stämmen, einige weisen jedoch stammspezifische Sequenzunterschiede auf. Klein et al. konnten zeigen, daß auch die Neutralisationskapazitäten humaner Seren starke stammspezifische Unterschiede aufweisen (Klein *et al.*, 1999).

Weder die humorale noch die zelluläre Immunantwort können eine Reaktivierung oder eine Neuinfektion mit HCMV verhindern.

HCMV selbst hat verschiedene Strategien entwickelt, um der Eliminierung durch das Immunsystem zu entkommen. So bewirkt zum einen die Infektion mit HCMV eine Reduktion der MHC-Klasse-I-Expression, wodurch es zu einer verminderten Präsentation viraler Antigene auf der Zelloberfläche kommt. Verantwortlich hierfür sind die viralen Proteine US6, US3, US2 und US11 (siehe Abb. 1.5) (Hengel *et al.*, 1998). Gleichzeitig mit der MHC-Klasse-I-Runterregulation kommt es zur Expression eines viralen MHC-Klasse-I-Homologs (UL18). Es wurde vermutet, daß auf diese Weise die Lyse infizierter Zellen durch Natürliche-Killer-Zellen (NK-Zellen) verhindert wird, da eine nur geringe MHC-Klasse-I-Expression oft mit der Suszeptibilität der Zelle für eine NK-zellvermittelte Lyse assoziiert wird (Farrell *et al.*, 1997). Neueste Daten zeigen jedoch, daß eine geringe Suszeptibilität HCMV-infizierter Zellen für eine NK-zellvermittelte-Lyse MHC-Klasse-I und UL18 unabhängig ist (Odeberg *et al.*, 2002). Desweiteren verhindert das UL83 kodierte Phosphoprotein pp65 die Bildung von Peptiden des IE1-Proteins (Gilbert *et al.*, 1996). Wahrscheinlich verhindert eine Phosphorylierung des IE-Proteins durch pp65 den Zugang zur Prozessierungs-Maschinerie des MHC-Klasse-I-Pathway (Abb. 1.5). Folge einer weiteren Interaktion von HCMV mit dem Immunsystem des Wirtes ist die Inhibition der IFN $\gamma$ -vermittelten MHC-Klasse-II-Expression auf der Oberfläche einer infizierten Zelle. Eine Infektion mit HCMV führt zu einer Degradierung des Jak1-Proteins und dadurch zu einer Unterbrechung des Jak/Stat-Signaltransduktionsweges (Miller *et al.*, 1998).

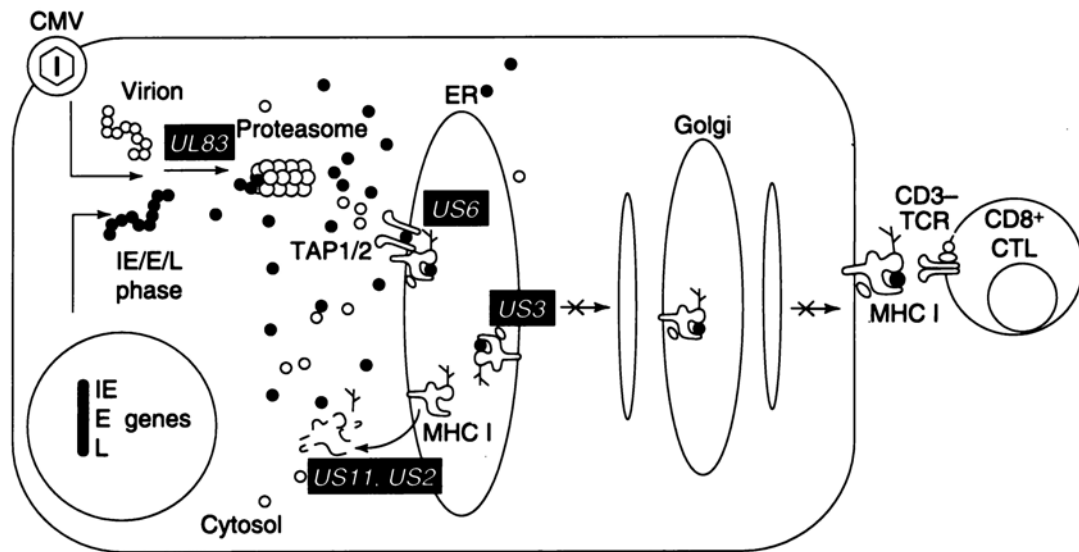


Abb. 1.5: Behinderung des MHC-Klasse-I-Pathway der Antigenprozessierung und Antigenpräsentation durch HCMV

Das UL83-kodierte pp65-Matrix-Protein verhindert die Peptid-Bildung des 72-kDa IE-Proteins. Das US6-kodierte Glykoprotein blockiert den Import von Peptiden in das ER. Die US2- und US11-kodierten Glykoproteine exportieren membraninsertierte MHC-Klasse-I-Schwere Ketten zurück in das Cytosol, wo sie vom Proteasom degradiert werden. Das vom US3 kodierte Glykoprotein blockiert den Export des MHC-Klasse-I-Komplexes aus dem ER.

Quelle: Hengel *et al.*, 1998 (verändert)

### 1.1.6 Therapie und Prophylaxe

Für die Therapie der HCMV-Infektion stehen Ganciclovir und Foscarnet zur Verfügung (Becker, 1993). Bei Ganciclovir handelt es sich um ein Nukleosidanalogen, das von viralen Proteinkinasen phosphoryliert und anschließend, als Triphosphat, von der viralen DNA-Polymerase als Substrat akzeptiert wird. Es folgt der Abbruch des Polymerisationsvorganges. Foscarnet wirkt als Analogon von Pyrophosphaten und hemmt die virale DNA-Polymerase nichtkompetitiv.

Einen Versuch der passiven Immunisierung stellt die Verabreichung von Immunglobulinpräparaten dar. Während die Antikörper in Neugeborenen nach pränataler Infektion einen guten Schutz vermitteln, erzielt man mit der Gabe von Immunglobulin bei

---

Organtransplantierten nur einen geringen Schutz (Snydman, 1990). Der Gebrauch von HCMV-Immunglobulin bei Knochenmarktransplantierten ist umstritten (Meyers, 1991). Ein Impfstoff gegen HCMV steht bislang nicht zur Verfügung, es befinden sich jedoch verschiedene Impfstoffe in der Entwicklung (Plotkin, 1999). Eine dieser Impfstrategien ist die Gabe eines lebenden attenuierten Virus, des HCMV-Stamms Towne. Durch Immunisierung mit dem Towne-Stamm konnte sowohl eine humorale als auch eine zelluläre Immunantwort induziert werden (Starr *et al.*, 1981). Desweiteren wurde der Schweregrad des Krankheitsverlaufs nach HCMV-Primärinfektion gemildert (Plotkin *et al.*, 1994). Ein Schutz vor Erkrankung konnte jedoch nur teilweise erzielt werden (Plotkin *et al.*, 1989). Ein zweiter Ansatz für die Entwicklung einer Vakzine gegen HCMV ist die Immunisierung mit rekombinanten viralen Proteinen. Erfolgversprechendster Kandidat hierfür ist das Glykoprotein gB des HCMV, gegen das mehr als die Hälfte aller neutralisierender Antikörper in Seren natürlich infizierter Individuen gerichtet sind. Nach Immunisierung mit rekombinantem Glykoprotein gB konnten neutralisierende Antikörper im Serum nachgewiesen werden. Der Antikörpertiter fiel jedoch relativ schnell wieder ab, ein Schutz vor HCMV-Erkrankung wurde nicht gezeigt (Frey *et al.*, 1999; Pass *et al.*, 1999). Die Nutzung viraler Vektoren für die Vakzinierung wird auch für HCMV in Betracht gezogen. So gibt es einen Immunisierungsansatz mit einem rekombinanten Canarypox-Virus. Canarypox-gB-Rekombinanten induzierten jedoch nur eine sehr schwache Antikörper-Antwort. Erst nach Boosterung mit dem attenuierten Virus Towne oder mit einem rekombinanten gB-Protein konnten neutralisierende Antikörper nachgewiesen werden (Adler *et al.*, 1999). Immunisierung mit einer Canarypox-pp65-Rekombinante induzierte sowohl eine humorale als auch eine zelluläre Immunantwort (Berencsi *et al.*, 2001). Der Nachweis eines Schutzes vor HCMV-Erkrankung steht noch aus. Eine Alternative zu den oben genannten Impfstrategien ist die Nutzung von "dense bodies" als möglichen Impfstoff (Pepperl *et al.*, 2000). "Dense bodies" sind nichtinfektiöse umhüllte virale Partikel, die keine Virus-DNA enthalten, ihr Hauptbestandteil ist das Phosphoprotein pp65. Ein vielversprechender neuer Ansatz der Impfstoffentwicklung ist die Immunisierung mit nackter DNA.



## 1.2 DNA-Vakzinierung

Im Jahr 1990 berichteten Wissenschaftler von Vical Inc. (San Diego, USA), daß die intramuskuläre Injektion von gereinigter bakterieller Plasmid-DNA, die für ein fremdes Protein kodiert, in Mäusen zur Produktion dieses Proteins in den Muskelzellen führt (Wolff *et al.*, 1990). Diese Beobachtung eröffnete revolutionäre neue Möglichkeiten für Gentherapie und Impfstoffentwicklung. Innerhalb der letzten 12 Jahre konnten zahlreiche Arbeitsgruppen zeigen, daß eine Injektion von nackter DNA zu einer langanhaltenden humoralen und/oder zellulären Immunantwort führen und sogar vor nachfolgender Infektion schützen kann (Tang *et al.*, 1992; Robinson *et al.*, 1993; Ulmer *et al.*, 1993).

Es gibt verschiedene Möglichkeiten der Administration von DNA-Impfstoffen: intramuskulär (i.m.), intradermal (i.d.), intravenös (i.v.), intrakutan (i.c.), intraperitoneal (i.p.), intranasal (i.n.), intratracheal, oral und vaginal. Die intramuskuläre Immunisierung ist der bislang am häufigsten angewandte Immunisierungsweg.

### 1.2.1 DNA-Vakzine-Vektor

Ein DNA-Impfstoff besteht aus einem fremden Antigen, einem „gene of interest“ (GOI), das in einen eukaryotischen Expressionsvektor inseriert ist. Es gibt vier grundlegende Anforderungen an einen DNA-Vakzine-Vektor: (a) einen Replikationsursprung für das Wachstum in Bakterien, (b) ein Antibiotika-Resistenz-Gen (z. Bsp. Ampicillin- oder Kanamycin-Resistenz-Gen) zur Plasmidselektion während der Bakterien-Kultur, (c) einen starken Promoter für eine optimale Expression des Proteins in Säugerzellen (z. Bsp. CMV-Promoter oder SV40-Promoter) und (d) eine Polyadenylierungs-Sequenz (z. Bsp. vom bovinen Wachstumshormon BGH oder SV40) zur Stabilisierung der mRNA-Transkripte (Gurunathan *et al.*, 2000).

Zusätzlich zu den oben genannten wesentlichen Bausteinen des Vakzine-Vektors gibt es spezifische Nukleotidsequenzen, die eine wichtige Rolle bei der Immunogenität der Vakzine spielen. Hierbei handelt es sich um unmethylierte Cytosin-Guanosin-Dinukleotide (CpG-Motive), die in prokaryotischer DNA etwa 20mal häufiger vorkommen als in eukaryotischer. CpG-Motive aktivieren in direkter Weise B-Zellen zur Proliferation oder Antikörpersekretion (Krieg *et al.*, 1995). Außerdem induzieren sie die Zytokinsekretion von professionellen Antigen-Präsentierenden-Zellen (APCs, z. Bsp. Makrophagen und Dendritische Zellen)

(Klinman *et al.*, 1996; Stacey *et al.*, 1996; Jakob *et al.*, 1998) und Natürlichen-Killer-Zellen (NK) (Cowdery *et al.*, 1996). T-Zellen werden ebenfalls, abhängig von ihrem Aktivierungsstatus, direkt oder indirekt von CpG-Motiven stimuliert (Bendigs *et al.*, 1999).

## 1.2.2 Mechanismus der Antigenpräsentation

Es gibt mindestens drei verschiedene Methoden, wie das von dem Impfvektor kodierte Antigen prozessiert und präsentiert werden kann, um eine Immunantwort zu induzieren (Gurunathan *et al.*, 2000): (a) direkte Transfektion professioneller Antigen-Präsentierender-Zellen (APCs), z. Bsp. Dendritische Zellen (DCs) (Corr *et al.*, 1996; Doe *et al.*, 1996), (b) Priming somatischer Zellen, z. Bsp. Myozyten, Keratinozyten oder andere MHC-Klasse-II-negative-Zellen (Wolff *et al.*, 1990; Ulmer *et al.*, 1993) oder (c) Cross-Priming, wobei die Plasmid-DNA somatische Zellen und/oder professionelle APCs transfiziert und das sekretierte Protein anschließend von anderen professionellen APCs aufgenommen und T-Zellen präsentiert wird (Albert *et al.*, 1998). Diese drei verschiedenen Mechanismen sind in Abbildung 1.6 dargestellt.

### A. Direkte Transfektion von APCs

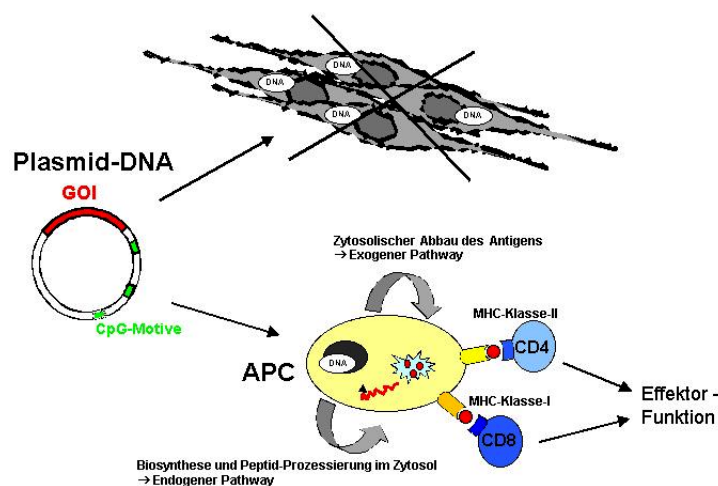
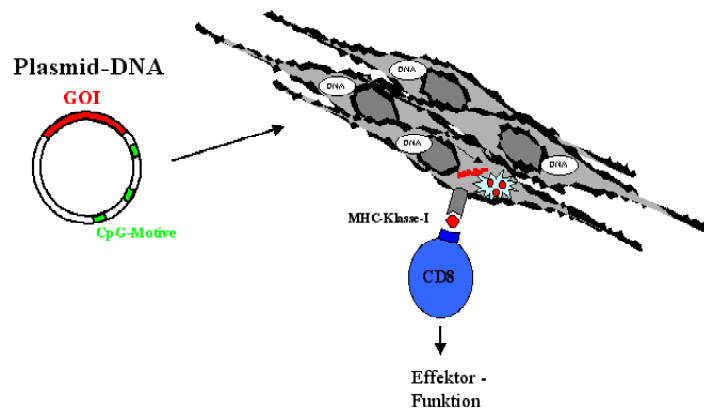


Abb. 1.6: Mechanismus der Antigen-Präsentation nach DNA-Immunisierung

## B. Direkte Transfektion von somatischen Zellen



## C. Cross-Priming

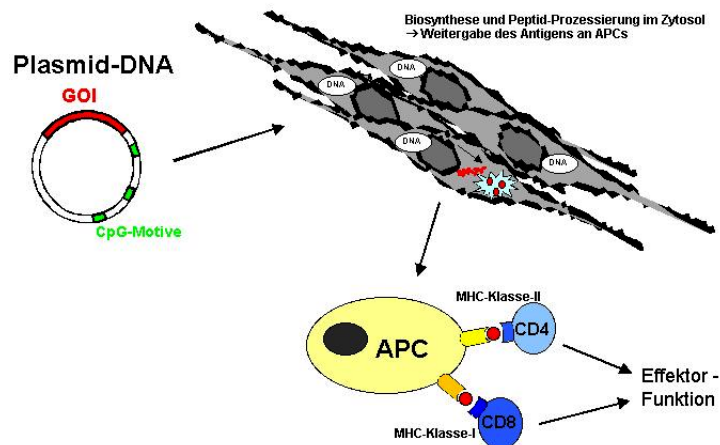


Abb. 1.6 (Fortsetzung): Mechanismus der Antigen-Präsentation nach DNA-Immunisierung

- (a) Die Injektion von Plasmid-DNA führt zur Transfektion von APCs des Knochenmarks (z.Bsp. DCs), die das Antigen T- und B-Zellen präsentieren.
- (b) Nach intramuskulärer (i.m.) oder intracutaner (i.c.) Immunisierung werden somatische Zellen (z. Bsp. Myozyten, Keratinozyten oder andere MHC-Klasse-II-negative-Zellen) direkt transfiziert. Die somatischen Zellen produzieren das Antigen und präsentieren es selbst den T-Zellen.
- (c) Das Antigen wird von transfizierten somatischen Zellen produziert und sekretiert. Professionelle APCs nehmen das Antigen auf und präsentieren es T-Zellen (Cross-Priming).

Quelle: Gurunathan *et al.*, 2000 (verändert)

### 1.2.3 Vorteile, Nachteile und Sicherheitsbedenken von DNA-Impfstoffen

Gegenüber herkömmlichen Impfstoffen bietet die DNA-Vakzinierung einige Vorteile. Analog zu den Lebendimpfstoffen induzieren DNA-Vakzinen sowohl eine B-Zell-Antwort als auch eine MHC-Klasse-I-vermittelte T-Zell-Antwort, ohne jedoch die mit Lebendimpfstoffen assoziierten Risiken einer möglichen Infektiösität zu besitzen. Durch die Wahl der Applikation der Plasmid-DNA (z. Bsp. intranasal, intratracheal oder oral) ist es möglich eine mukosale Immunität zu induzieren (Lewis and Babiuk, 1999). Dies ist vor allem bei viralen Infektionen wie HIV, HSV oder CMV von entscheidender Bedeutung, da bei diesen Viren eine Infektion über die Schleimhäute erfolgt. Zusätzlich zu den medizinischen Vorteilen bietet die DNA-Vakzinierung auch finanzielle Vorteile, da Plasmid-DNA relativ kostengünstig herzustellen und leicht zu lagern ist. Eine Kühlkette zum Erhalt der Stabilität ist nicht notwendig.

Neben all diesen Vorteilen gibt es jedoch auch Nachteile und Sicherheitsbedenken gegen die Anwendung von DNA-Impfstoffen. So gibt es bislang viele erfolgreiche DNA-Immunisierungen im Maussystem, jedoch keine im Menschen (Sharma and Khuller, 2001). Nur wenn die DNA-Immunisierung mit einer Protein-Immunisierung (Prime-Boost-Strategie) kombiniert wird, kann im Primaten eine ausreichende Immunantwort induziert werden (Ramshaw and Ramsay, 2000). Da es zur Zeit noch keine Langzeit-Erfahrungen über die Wirkungsweise von DNA-Impfstoffen im Menschen gibt, ist die Untersuchung von Sicherheitsrisiken von großer Bedeutung. So besteht die Möglichkeit, daß der Impfvektor in das Wirtsgenom integriert und dadurch das Tumorrisiko erhöht wird. Dies kann z. Bsp. durch die Aktivierung von Onkogenen oder die Inaktivierung von Tumor-Suppressor-Genen erfolgen. Bis heute gibt es keinen Hinweis auf eine Integration der Plasmid-DNA in das Wirtsgenom, die Möglichkeit konnte bislang jedoch auch nicht ausgeschlossen werden (Nichols *et al.*, 1995; Martin *et al.*, 1999; Ledwith *et al.*, 2000; Manam *et al.*, 2000). Plasmid-DNA kann an der Injektionsstelle viele Monate lang persistieren (Wolff *et al.*, 1992). Desweiteren kann Plasmid-DNA in Geweben fern von der Injektionsstelle (z. Bsp. auch in Gonaden) nachgewiesen werden (Thierry *et al.*, 1995). Eine Übertragung des Impfvektors auf die Nachkommen ist daher vorstellbar. Ein weiteres Sicherheitsrisiko ist die Induktion einer Immunantwort gegen transfizierte Zellen, ein möglicher Auslöser für die Entwicklung von Autoimmun-Erkrankungen. Bakterielle CpG-Motive können die Produktion von Anti-dsDNA-Autoantikörpern induzieren (Gilkeson *et al.*, 1995). Bislang durchgeführte Studien

zeigen jedoch, daß die durch die DNA-Vakzinierung induzierten Autoantikörper einen zu geringen Titer haben um ein Krankheitsbild hervorzurufen (Klinman *et al.*, 1997; Mor *et al.*, 1997). Sicherheitsbedenken bestehen auch bei der Immunisierung von Neugeborenen und Kindern, da bei ihnen das Immunsystem noch nicht vollständig ausgereift ist und statt Immunität gegen das Antigen eine Toleranz induziert werden kann. Dies konnte bei einer DNA-Immunisierung von neugeborenen Mäusen mit einer Malaria-Vakzine beobachtet werden. Eine Induktion von Toleranz anstatt Immunität scheint sowohl vom Alter des Geimpften als auch vom Antigen selbst abzuhängen (Klinman *et al.*, 1997; Ichino *et al.*, 1999).

#### 1.2.4 DNA-Impfstoffe gegen HCMV

Die Entwicklung eines Impfstoffes gegen HCMV ist eine große Herausforderung. Zur Zeit untersuchen mehrere Arbeitsgruppen die Möglichkeiten eines DNA-Impfstoffes gegen HCMV. Pande *et al.* immunisierten Mäuse mit verschiedenen HCMV pp65-exprimierenden Vektoren und konnten pp65-spezifische Antikörper im Serum nachweisen. Eine CTL-Antwort in den immunisierten Mäusen wurde nicht untersucht (Pande *et al.*, 1995). In einer Studie von Endresz *et al.* wurden Mäuse mit HCMV pp65- und HCMV gB-exprimierenden Plasmiden immunisiert. Das Glykoprotein gB stellt das Hauptziel der humoralen Immunantwort dar. Spezifische Antikörper gegen gB konnten im Serum immunisierter Tiere nachgewiesen werden. HCMV pp65 ist das Hauptziel der zellulären Immunantwort. Immunisierte Mäuse besaßen spezifische Antikörper gegen pp65 und zum Teil auch eine pp65-spezifische CTL-Antwort (Endresz *et al.*, 1999; Endresz *et al.*, 2001). In einer koreanischen Studie wurden Mäuse mit einem HCMV gB-exprimierenden Vektor immunisiert. Neutralisierende Antikörper gegen gB konnten hierbei nachgewiesen werden (Hwang *et al.*, 1999).

Aufgrund des engen Wirtsspektrums von HCMV ist es nicht möglich, HCMV-DNA immunisierte Mäuse zu infizieren und somit den durch die Immunisierung induzierten Schutz zu überprüfen. Die Arbeitsgruppe von Deborah Spector etablierte daher ein MCMV/Mausmodell. Mäuse wurden mit einem pp89-exprimierenden Plasmid immunisiert, auf humorale und zelluläre Immunantwort hin untersucht und anschließend mit MCMV infiziert. Das MCMV Phosphoprotein pp89 ist ein Homolog des HCMV IE1-Proteins und

stellt im Maussystem das Hauptziel der zellulären Immunantwort dar. In den immunisierten Mäusen konnte nur eine geringe Antikörper-Antwort gegen pp89 induziert werden, eine pp89-spezifische CTL-Antwort wurde jedoch nachgewiesen. Schutz vor einer nachfolgenden Infektion mit MCMV konnte in den immunisierten Tieren teilweise induziert werden, das Ausmaß des Schutzes variierte jedoch erheblich von Studie zu Studie (Gonzalez Armas *et al.*, 1996). In einer neueren Studie der Arbeitsgruppe Spector wurden Mäuse mit verschiedenen weiteren MCMV-Antigen-exprimierenden Vektoren immunisiert. M84, ein Homolog des HCMV pp65 Proteins, vermittelte einen spezifischen Schutz vor anschließender Infektion. Dieser Schutz war jedoch nur nachweisbar, wenn M84 in Kombination mit pp89 immunisiert wurde (Morello *et al.*, 2000; Ye *et al.*, 2002).

### 1.3 Zielsetzung und Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung einer DNA-Vakzine gegen das humane Zytomegalievirus. Im Gegensatz zu den bisherigen Impfstoff-Strategien (Kap. 1.1.6 und 1.2.4) sollte die genetische Variabilität der immundominanten Proteine stärker berücksichtigt werden. Im einzelnen sollten folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

- Ist die genetische Variabilität der HCMV Glykoproteine gB und gH in Patientenisolaten und Nativmaterialien limitiert? Wenn Ja, wieviele Varianten existieren?
- Ist es möglich, durch DNA-Immunisierung mit Vektoren, die verschiedene immundominante Proteine des HCMV exprimieren, eine humorale und zelluläre Immunantwort in der Maus zu induzieren?
- Wie verteilen sich die Plasmid-DNA und das exprimierte Protein in verschiedenen Organen sowie in den Nachkommen DNA-immunisierter Tiere?

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien, Biochemika und Medienzusätze wurden, wenn nicht gesondert angegeben, über Bayer (Leverkusen), Biorad (München), Fluka (Deisenhofen), Gibco BRL (Eggenstein), New England Biolabs (Schwalbach), Riedel-de-Haen (Seelze), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Deisenhofen) bezogen.

### 2.2 Geräte

ABI Prism 7700 Sequence Detector	PE-Applied Biosystems, Weiterstadt
Bakterieninkubator	Infors, Stuttgart
CO <sub>2</sub> -Brutschrank	Heraeus, Fellbach
Computer, Power Mac G3	Apple-Macintosh, München
DNA-Sequencer 373A	PE-Applied Biosystems, Weiterstadt
DNAS <sub>T</sub> ar-Softwarepackage	DNAS <sub>T</sub> AR, Inc, Madison, USA
Elektrophoresekammern und Spannungsquellen	Biorad, München
ELISA-Prozessor BEP III	Dabe Behring, Schwalbach
FastPrep FP120	Q-BIOgene, Heidelberg
Genequant RNA/DNA Calculator	Pharmacia, Freiburg
Heidolph-Vortexer	Roth, Karlsruhe
Heizblock	Multimed, Kirchheim-Teck
Heto-Vakuum-Konzentrator	Roth, Karlsruhe
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Mikroskope	Leica, Wetzlar
Thermocycler, DNA-Thermal-Cycler	PE-Applied Biosystems, Weiterstadt
Thermocycler, Gene Amp PCR Systems 9600	PE-Applied Biosystems, Weiterstadt
Ultra Turrax T25	IKA, Staufen

---

Ultraschallgerät Branson Sonifier 150	G. Heinemann, Schwäbisch-Gmünd
Zentrifuge, Sigma 4K15C	Qiagen, Hilden
Zentrifuge, Megafuge 1.0R	Heraeus, Fellbach
Zytozentrifuge, Cytospin 3	Shandon, Runcorn, UK
Plattenzentrifuge Rotanta/TRC	Hettich, Tuttlingen

### 2.3 Oligonukleotide und Sonde

Alle verwendeten Oligonukleotide und die TaqMan™-Sonde wurden von der Firma TIB Molbiol (Berlin) nach der Betazyanoethylphosphonat-Methode hergestellt. Die Sequenzen wurden mit Hilfe des Computerprogramms *Amplify* (DNASar) ausgewählt.

### 2.4 Vektoren

#### 2.4.1 Klonierungsvektoren pCR™2.1-TOPO und pCR™II-TOPO

Mit den Vektoren pCR™2.1-TOPO und pCR™II-TOPO ist es möglich, PCR-Fragmente direkt zu klonieren. Bei der PCR wird, unabhängig vom Template, von der Taq-Polymerase ein Adenosin an die 3'-Enden des PCR-Produkts ansynthetisiert. Die linearisierten Vektoren pCR™2.1-TOPO und pCR™II-TOPO besitzen jeweils einzelne 3'-Thymidin-Überhänge, die eine direkte Klonierung ermöglichen. Die Vektoren pCR™2.1-TOPO und pCR™II-TOPO (siehe Abb. 2.1) sind Bestandteil des TOPO TA Cloning Kits von Invitrogen (Leek, Niederlande)

#### 2.4.2 Expressionsvektor pJW4303

Als DNA-Vakzine-Vektor wurde der eukaryotische Expressionsvektor pJW4303 benutzt, der uns von Harriet Robinson (Worcester, USA) zur Verfügung gestellt wurde. Die "genes of interest" (GOI) wurden in die BamH I- bzw. Hind III-Schnittstelle inseriert.



pJW4303 enthält einen Replikationsursprung (ORI) vom Simian Virus 40 (SV40), der es dem Plasmid ermöglicht unabhängig vom Chromosom der Wirtszelle zu replizieren. Die Genexpression wird durch den CMV-IE Promoter/Enhancer reguliert. Es handelt sich hierbei um den Promoter des HCMV IE Gens plus des IE Introns A, einer der stärksten bekannten Promotoren im Eukaryoten-System. Der Vektor enthält zusätzlich eine "tissue plasminogen activator leader sequence" (tpa), die die Sekretion des exprimierten Proteins verbessern soll, sowie die Polyadenylierungs-Sequenz des bovinen Wachstumshormons (BGH), das eine Stabilisierung der mRNA Transkripte bewirkt. pJW4303 enthält das  $\beta$ -Laktamase-Gen und ermöglicht somit eine Selektion transformierter Zellen mit Hilfe von Ampicillin. Eine Vektorkarte des eukaryotischen Expressionsvektors pJW4303 ist in Abbildung 2.2 dargestellt.

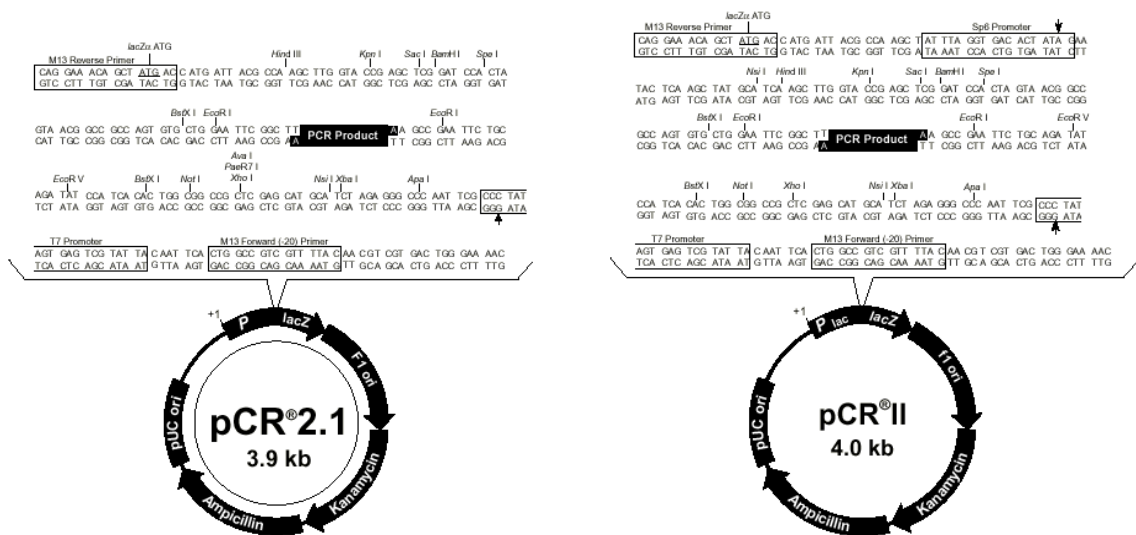


Abb. 2.1: Multiple cloning sites und Vektorkarten der beiden Klonierungsvektoren pCR<sup>™</sup>2.1-TOPO und pCR<sup>™</sup>II-TOPO von Invitrogen (Leek, Niederlande)

### 2.4.3 Expressionsvektor VR1055

Der eukaryotische Expressionsvektor VR1055 wurde uns von der Firma Vical Inc. (San Diego, USA) zur Verfügung gestellt.

Die Genexpression wird durch den CMV-IE Promoter/Enhancer reguliert, das "gene of interest" (gB1 $\Delta$ TM) wurde in die BamH I- und Bcl I-Schnittstellen inseriert. Der Vektor enthält das Kanamycin-Resistenz-Gen und ermöglicht somit eine Selektion transformierter

Zellen. Eine Vektorkarte des eukaryotischen Expressionsvektors VR1055 ist in Abbildung 2.2 dargestellt.

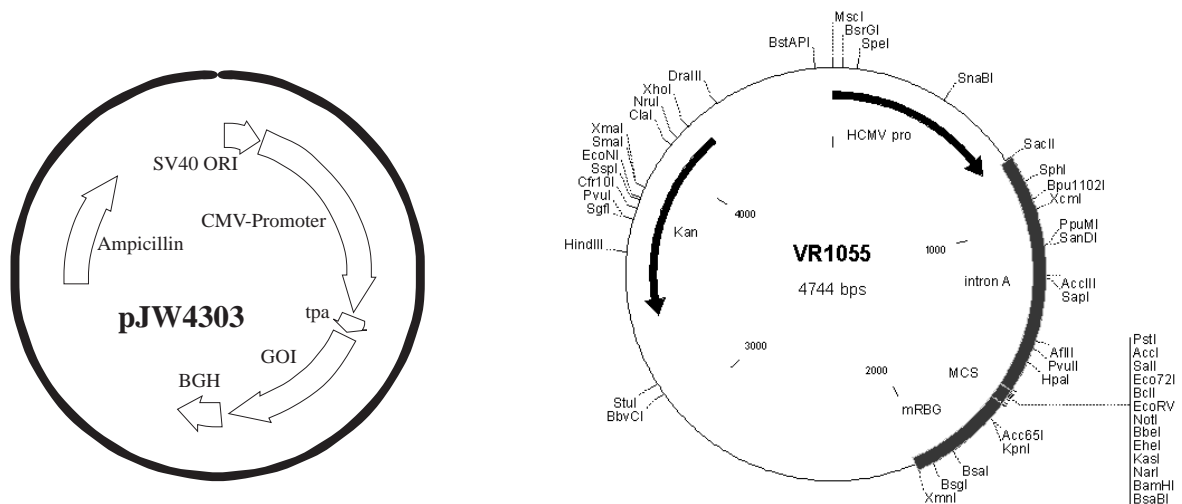


Abb. 2.2: Vektorkarten der eukaryotischen Expressionsvektoren pJW4303 und VR1055

#### 2.4.4 Expressionsvektor pRc/CMV2gB

Der eukaryotische Expressionsvektor pRc/CMV2gB wurde uns von Nigel Temperton (London, GB) zur Verfügung gestellt.

Grundlage dieses Vektors ist das Plasmid pRc/CMV2 von Invitrogen (Leek, Niederlande). In diesen Vektor ist die Voll-Längen-Sequenz des HCMV-gB-Gens von Laborstamm AD169 inkloniert. Der Vektor diente als Positivkontrolle für die DNA-Immunisierungen.

#### 2.4.5 Expressionsvektor pCMV-S

Der eukaryotische Expressionsvektor pCMV-S (pRc/CMV-HBs(S)) wurde uns von Aldevron, LLC. (Fargo, USA) zur Verfügung gestellt.

Grundlage dieses Vektors ist das Plasmid pRc/CMV2 von Invitrogen (Leek, Niederlande). In diesen Vektor ist das Hepatitis B Oberflächenantigen (HBsAg) inkloniert.

## 2.5 Arbeiten mit Viren

### 2.5.1 Virusanzucht

#### Humanes Zytomegalievirus

Bei den verwendeten HCMV-Stämmen handelte es sich hauptsächlich um klinische Isolate. Diese Viren wurden aus dem Blut von immunsupprimierten Patienten (Transplantations-Patienten, konnatal infizierte Kinder, autoimmunerkrankte Patienten) isoliert. Nach der Isolierung wurden alle klinischen Isolate mindestens zwei mal auf humanen Vorhaut-Fibroblasten (HFF) plaquegereinigt. Weitere verwendete HCMV-Stämme waren die Laborstämme AD169, Towne und Toledo.

Anzucht und Kultivierung von HCMV erfolgte auf humanen Vorhaut-Fibroblasten (HFF) in Zellkulturmedium DMEM mit 10% Fötalem Kälberserum (FKS), 2mM Glutamin, Penicillin (100 IE/ml)/Streptomycin (0,1 mg/ml) bei 37°C und unter 5% CO<sub>2</sub>. Die Zellen wurden mit einer MOI (multiplicity of infection) von eins infiziert. Nach drei bis fünf Tagen zeigten der Großteil der Zellen einen zytopathischen Effekt, der Hauptanteil an Viren befand sich im Kulturüberstand. Der Überstand wurde abgenommen, Zellen und Zelltrümmer wurden pelletiert. Von dem so gewonnene Virusüberstand wurde der Virustiter bestimmt. Der Überstand wurde im folgenden für weitere Infektionen oder Virus-DNA-Extraktionen verwendet.

Material:           DMEM (CC-Pro, Neustadt)  
                      FKS (CC-Pro, Neustadt)  
                      Glutamin (Gibco BRL, Eggenstein)  
                      Penicillin 10000 IE/ml(Gibco BRL, Eggenstein)  
                      Streptomycin 10 mg/ml (Gibco BRL, Eggenstein)

#### Vaccinia Virus

Die HCMV-spezifischen rekombinanten Vaccinia Viren VVgB, VVgH und VVpp65 wurden uns von William Britt (Birmingham, USA) zur Verfügung gestellt (Britt *et al.*, 1988; Urban *et al.*, 1992b; Boppana and Britt, 1996). Das RSV-spezifische rekombinante Vaccinia Virus VVM2 wurde uns von Stephan Ehl (Kinderklinik, Universität Freiburg) zur Verfügung

gestellt (Ostler *et al.*, 2001). Als Wildtyp Vaccinia Virus diente der Stamm VV Western Reserve (WR).

Die Anzucht von Vaccinia Viren erfolgte auf TC7-CV1-Zellen (Zelllinie, African Green Monkey Fibroblast) in Zellkulturmedium MEM mit 10% FKS, 2mM Glutamin, Penicillin (100 IE/ml)/Streptomycin (0,1 mg/ml) bei 37°C und unter 5% CO<sub>2</sub>. Die Zellen wurden mit einer MOI von 0,01 infiziert. Nach 48 h zeigten sämtliche Zellen einen zytopathischen Effekt, Viren befanden sich sowohl im Kulturüberstand als auch in den Zellen. Der Überstand wurde abgenommen und der Virustiter bestimmt. Die infizierten Zellen wurden abgeschabt, in 1 ml Medium resuspendiert und durch wiederholtes Frieren/Tauen sowie Ultraschall aufgeschlossen. Auch von diesem Zellysate wurde der Virustiter bestimmt.

Material: MEM (CC-Pro, Neustadt)  
FKS (CC-Pro, Neustadt)  
Glutamin (Gibco BRL, Eggenstein)  
Penicillin 10000 IE/ml (Gibco BRL, Eggenstein)  
Streptomycin 10 mg/ml (Gibco BRL, Eggenstein)

### **Baculovirus gB**

Das rekombinante HCMV gB exprimierende Baculovirus wurden uns von William Britt (Birmingham, USA) zur Verfügung gestellt (Wells *et al.*, 1990).

Die Anzucht des Baculovirus gB erfolgte auf High5 Zellen (Zelllinie, Insektenzellen) in serumfreien SF-900 II Medium bei Raumtemperatur. Die Zellen wurden mit einer MOI von 0,5 infiziert. Nach fünf Tagen zeigten der Großteil der Zellen einen zytopathischen Effekt, Viren befanden sich sowohl im Kulturüberstand als auch in den Zellen. Der Überstand wurde abgenommen und der Virustiter bestimmt. Die infizierten Zellen wurden abgeschabt und in PBS resuspendiert.  $1 \times 10^5$  infizierte Zellen wurden mit einer Zytocentrifuge auf Objektträger aufgespinnt und für den IFT (siehe Kap. 2.10.1) verwendet.

Material: SF-900 II, serumfrei (Gibco BRL, Eggenstein)  
PBS: 8 g NaCl, 2898 mg Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 200 mg KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 200 mg KCl, ad 1 l H<sub>2</sub>O, pH 7,4

### 2.5.2 Bestimmung der Virustiter

#### Humanes Zytomegalievirus

Zur Virustiterbestimmung von HCMV wurde eine sogenannte Kurzzeitkultur durchgeführt. Hierbei wurden HFF-Zellen in einer 24-Well-Platte ausgesät und mit Virusüberstand in verschiedenen Verdünnungen infiziert. Nach 24 h Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden die Zellen mit PBS gewaschen und fixiert. Hierzu wurden die Zellen in Aceton/Methanol (Verhältnis 1:1) inkubiert (10 min, auf Eis) und anschließend mit PBS gewaschen. Zum Nachweis von HCMV IE Protein wurde der HCMV-IE-spezifische monoklonale Antikörper E13 der Firma Argene-Biosoft (1:200 Verdünnung) verwendet. Jeweils 200 µl dieses Erstantikörpers wurden pro Well auf die Zellen gegeben und 45 min bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mehrmals mit PBS gewaschen und wiederum 45 min bei 37°C mit einem zweiten Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) markierten Antikörper Rabbit-Anti-Mouse (1:40 Verdünnung in PBS/0,01% Evansblau) inkubiert. Die Zellen wurden nochmals mit PBS gewaschen. Unter dem Fluoreszenzmikroskop ließen sich nun HCMV infizierte Zellen anhand ihres leuchtenden Kernes auszählen.

Material: Aceton/Methanol (Verhältnis 1:1)  
Anti-HCMV I.E.A E13 (Argene-Biosoft)  
Rabbit-Anti-Mouse-FITC (Argene-Biosoft)  
PBS: 8 g NaCl, 2898 mg Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 200 mg KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 200 mg KCl, ad 1 l H<sub>2</sub>O, pH 7,4  
Evansblau (Sigma, Steinheim)

#### Vaccinia Virus

Zur Virustiterbestimmung von Vaccinia Virus wurde ein Plaque-Assay durchgeführt. Grundlage für die Titerbestimmung mit Hilfe des Plaqueassays ist die Annahme, daß ein infektiöses Virus eine Zelle infiziert, sich vermehrt und von ihr ausgehend weitere Zellen infiziert, die daraufhin absterben. Es entsteht ein Plaque in einem geschlossenen Zellrasen, der sich unter dem Mikroskop erkennen und auszählen läßt.

TC7-CV1-Zellen (Zelllinie, African Green Monkey Kidney Fibroblast) wurden in einer 6-Well-Platte (5 x 10<sup>5</sup> Zellen/Well) ausgesät und mit Virusüberstand bzw. Zell-Lysat in verschiedenen Verdünnungen infiziert. Nach 24 h Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurde

das Medium abgenommen und pro Well 0,5 ml 0.1% Kristallviolett auf die Zellen gegeben. Nach 5 min Inkubation wurde der Farbstoff entfernt und die Zellen getrocknet. Die Plaques konnten nun ausgezählt werden.

Material: Kristallviolett: 0.1% Kristallviolett (Sigma, Deisenhofen) in 20% Ethanol

### **Baculovirus gB**

Zur Virustiterbestimmung von Baculovirus gB wurden High5-Zellen in 6-Well-Platten ausgesät, mit Virusüberstand in verschiedenen Verdünnungen infiziert und bei Raumtemperatur inkubiert. Sechs Tage nach der Infektion wurden die Zellen geerntet und mit einer Zytocentrifuge auf Objektträger aufgespinn. Die Objektträger wurden an der Luft getrocknet und angefärbt. Zum Nachweis von HCMV gB wurde hierfür der monoklonale Antikörper gBI verwendet. 50 µl dieses Erstantikörpers wurden auf die Zellen aufgetropft und die Objektträger 30 min bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Objektträger wurden anschließend für 10 min in PBS gewaschen. Dann wurden 40 µl eines Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) markierten Anti-Maus-IgG+IgM Zweitantikörpers in einer Verdünnung von 1:100 in PBS/0,01% Evansblau aufgetropft. Eine zweite Inkubation bei 37°C für 30 min erfolgte. Hiernach wurden die Objektträger in PBS gewaschen, mit Elvanol übertropft und eingedeckelt. Die Objektträger wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet, Baculovirus gB infizierte Zellen ließen sich auszählen.

Material: mAK gBI (von M. Mach, Institut für Klinische und Molekulare Virologie, Erlangen zur Verfügung gestellt)  
Fab2 Anti-Maus-IgG+IgM-FITC (Argene-Biosoft)  
PBS: 8 g NaCl, 2898 mg Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 200 mg KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 200 mg KCl, ad 1 l H<sub>2</sub>O, pH 7,4  
Evansblau (Sigma, Steinheim)  
Elvanol

## 2.6 Arbeiten mit DNA

### 2.6.1 Präparation von DNA aus Zellkulturüberstand, PBL und Urin

DNA wurde aus dem Überstand HCMV infizierter HFF-Zellen sowie aus PBL und Urin aufgereinigt. Hierbei wurde das QIAamp Blood Kit (Qiagen, Hilden) verwendet, die Methode beruht auf der Bindung von DNA an eine Silica-Matrix. Es wurden 200 µl des Kulturüberstandes,  $1 \times 10^7$  PBL oder 200 µl Urin mit 200 µl Puffer AL und 25 µl Qiagen Protease versetzt und 10 min bei 70°C inkubiert. Nach Zugabe von 210 µl 96% Ethanol wurde die Probe auf eine mit Silica gefüllte Säule gegeben und durchzentrifugiert. Die nun an der Silica gebundene DNA wurde zweimal mit Puffer AW gewaschen und in einem letzten Schritt mit 200 µl Puffer AE eluiert.

Material:            Qiagen Puffer AL, AW und AE  
                          Qiagen Protease  
                          Ethanol 96%

### 2.6.2 Präparation von DNA aus Gewebe

Zur Präparation von DNA aus Gewebeproben wurde das QIAamp Tissue Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Die Methode beruht wie bei dem QIAamp Blood Kit auf der Bindung von DNA an eine Silica-Matrix, ein Unterschied zwischen beiden Protokollen besteht lediglich in der Aufarbeitung der Proben. Es wurden ca. 25 mg Gewebeprobe mechanisch zerkleinert, mit 200 µl Puffer ATL und 25 µl Proteinase K versetzt und über Nacht bei 55°C inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Puffer AL wurde die Probe nochmals 10 min bei 70°C inkubiert, anschließend wurden 210 µl 96% Ethanol zugegeben. Die Probe wurde auf eine mit Silica gefüllte Säule aufgetragen und durchzentrifugiert. Die nun an der Silica gebundene DNA wurde zweimal mit Puffer AW gewaschen und in einem letzten Schritt mit 200 µl Puffer AE eluiert.

Material:            Qiagen Puffer ATL, AL, AW und AE  
                          Proteinase K 20 mg/ml (Boehringer, Ingelheim)  
                          Ethanol 96%

### 2.6.3 Präparation von Plasmid-DNA

#### Minipräparation

Die Plasmid Minipräparation dient der schnellen Gewinnung ausreichender Mengen von Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien.

Aus einer 2 ml ÜN-Kultur transformierter Bakterien in LB-Amp-Medium oder LB-Kana-Medium, die bei 37°C und 200 rpm im Inkubationsschüttler inkubiert wurde, zentrifugierte man die Zellen ab (20800 x g, 5 min). Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet wurde in 200 µl LB-Medium resuspendiert. Anschließend wurden 300 µl TENS-Lösung und 150 µl Natrium-Acetat (pH 5,3) hinzugegeben und gut gevortext. Das durch das Natrium-Acetat gefällte Protein, die chromosomale DNA und die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (20800 x g, 10 min). Der Überstand mit der darin enthaltenen Plasmid-DNA wurde in eine neue Eppendorf-Tube überführt. Die Plasmid-DNA wurde nun mit Ethanol gefällt. Hierzu wurden zwei Volumen eiskaltes 96% Ethanol hinzugefügt, gut durchmischt und in der Kühlzentrifuge bei 4°C für 30 min bei 20800 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das DNA-Pellet wurde zur Entfernung von Salzen mit 70% eiskaltem Ethanol gewaschen und erneut bei 20800 x g zentrifugiert (10 min). Der Überstand wurde wiederum verworfen und das DNA-Pellet an der Luft getrocknet. Anschließend wurde die Plasmid-DNA in 50 µl RNaseA-Wasser (RNaseA-Konz. 10 µg/ml) gelöst.

Material:           LB-Amp-Medium: 1% Trypton, 0,5% Hefe-Extrakt, 1% NaCl, 100 µg/ml Ampicillin  
                      LB-Kana-Medium: 1% Trypton, 0,5% Hefe-Extrakt, 1% NaCl, 50 µg/ml Kanamycin  
                      TENS-Lsg: 10 mM Tris-Cl (pH 7,5), 1 mM EDTA, 0,1 N NaOH, 0,5% SDS  
                      Natrium-Acetat, pH 5,3  
                      Ethanol 70% und 96% (-20°C)  
                      RNaseA (Promega, Mannheim)

#### Präparation mit Qiagen-Säulen

Zur Gewinnung größerer Mengen sehr reiner Plasmid-DNA wurde der EndoFree Plasmid Giga Kit der Firma Qiagen verwendet. Die Methode basiert auf der alkalischen Lyse der Bakterien gefolgt von der Bindung von Plasmid-DNA an ein Anionen-Austausch-Resin.

Von einer LB-Amp-Agarplatte oder einer LB-Kana-Agarplatte wurde eine Einzelkolonie in 3 ml LB-Flüssigmedium (LB-Amp oder LB-Kana) überimpft und ca. acht Stunden bei 37°C



im Schüttler inkubiert. Anschließend wurden mit dieser Starterkultur 2,5 l LB-Amp-Medium oder LB-Kana-Medium angeimpft und erneut über Nacht (12-16 Stunden) im Schüttler inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Bakterien geerntet (6240 x g, 15 min, 4°C) und das Pellet in 125 ml Puffer P1 resuspendiert. Die Lyse der Bakterien erfolgte durch Zugabe von 125 ml Puffer P2 und einer fünfminütigen Inkubation bei Raumtemperatur. Während dieser Zeit werden zum einen die Bakterienzellen aufgeschlossen, zum anderen sowohl Protein als auch DNA denaturiert. Die Neutralisation des Lysats erfolgte durch Zugabe von 125 ml kaltem Puffer P3, dessen hohe Salzkonzentration das im Lysepuffer enthaltene SDS ausfallen läßt. Dabei werden Zelltrümmer, Proteine und genomische DNA in Salz-Detergens-Komplexen eingeschlossen, während die Plasmid-DNA korrekt renaturiert und so im Überstand verbleibt. Das Lysat wurde mit einer QIAfilter Giga Cartridge unter Vakuum filtriert, anschließend wurden 50 ml Puffer FWB auf die Cartridge gegeben und ebenfalls durchfiltriert. Das Filtrat mit der darin enthaltenen Plasmid DNA wurde mit 30 ml Puffer ER versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Puffer ER entfernt die im Lysat enthaltenen bakteriellen Endotoxine. Während der Inkubationszeit wurde eine QIAGEN-tip Säule mit 75 ml Puffer QBT equilibriert, anschließend wurde das Lysat auf die Säule gegeben. Die Salz- und pH Bedingungen des Lysats erlauben hierbei eine effiziente Bindung der Plasmid-DNA an das Säulenmaterial, während RNA, Proteine und Kontaminanten nicht zurückgehalten und durch zweimaliges Waschen mit jeweils 300 ml Puffer QC weggespült werden. Die Plasmid DNA wurde mit 75 ml Puffer QN eluiert, mit 52,5 ml (0,7 Volumen) Isopropanol präzipitiert und 30 min bei 15000 x g (4°C) pelletiert. Das Pellet wurde mit 10 ml endotoxin-freiem 70% Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und an der Luft getrocknet. Anschließend wurde die DNA in 1 ml Puffer TE gelöst.

Material: LB-Amp-Agar: 1% Trypton, 0,5% Hefe-Extrakt, 1% NaCl, 1,5% Agar,  
100 µg/ml Ampicillin  
LB-Amp-Medium: 1% Trypton, 0,5% Hefe-Extrakt, 1% NaCl, 100 µg/ml Ampicillin  
LB-Kana-Agar: 1% Trypton, 0,5% Hefe-Extrakt, 1% NaCl, 1,5% Agar,  
50 µg/ml Kanamycin  
LB-Kana-Medium: 1% Trypton, 0,5% Hefe-Extrakt, 1% NaCl, 50 µg/ml Kanamycin  
Qiagen Puffer P1, P2, P3, FWB, QBT, QC, QF, QN und TE  
Isopropanol  
70% Ethanol, endotoxinfrei

#### 2.6.4 Bestimmung der DNA-Konzentration

Der Bestimmung von DNA-Konzentrationen liegt die Lichtabsorption von DNA-Molekülen im UV-Bereich zugrunde. Konzentrationsmessungen wurden im Photometer bei  $\lambda=260$  nm mit Wasser als Leerwert vorgenommen. Eine Extinktion von 1,0 entspricht dabei etwa 50 mg/ml DNA. Ein Anhaltspunkt für die Reinheit der DNA ergibt sich aus dem Quotienten  $E_{260}/E_{280}$ , der im Idealfall 1,8 betragen sollte. Höhere Werte deuten auf Verunreinigung mit RNA, niedrigere Werte auf Proteinverunreinigung hin.

#### 2.6.5 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Für den Restriktionsverdau von Gewebe-DNA, Plasmid-DNA oder PCR-Amplifikaten wurden 0,5-10  $\mu$ g DNA in einem 20  $\mu$ l oder 70  $\mu$ l Ansatz mit 3-100 Units des entsprechenden Restriktionsenzym vermischt. Als Reaktionspuffer wurde jeweils der vom Hersteller mitgelieferte optimale Puffer benutzt. Der Ansatz wurde für mindestens eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym für 20 min bei 70°C inaktiviert.

Material: Restriktionsenzyme und -puffer:  
BamH I, Bfr I, Hinf I (Boehringer, Mannheim)  
Bcl I, BstU I, Hind III, Hha I, Sac II (New England BioLabs, Schwalbach)  
Bgl II (Stratagene, Heidelberg)  
Rsa I (Fermantas, St. Leon-Rot)

#### 2.6.6 Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP)

Zur näheren Charakterisierung von Vektoren oder PCR-Amplifikaten wurde die DNA einer RFLP unterworfen. Hierzu wurde ein Restriktionsverdau wie oben beschrieben durchgeführt, anschließend erfolgte die Auftrennung der DNA-Fragmente in einem 0.7-3% Agarosegel (siehe Kap. 2.6.7). Die Restriktionsendonukleasen wurden so gewählt, daß sich anhand der Länge der entstehenden DNA-Fragmente eine Aussage über Orientierung eines Inserts im Vektor oder über den Genotyp einer bestimmten DNA-Sequenz machen ließ.

### 2.6.7 Auftrennung von DNA-Fragmenten im Agarosegel

Zur Bestimmung und Charakterisierung der zu untersuchenden DNA wurde diese nach einer PCR-Amplifikation oder einem Restriktionsverdau entsprechend der Fragmentgröße durch Gelelektrophorese in Agarosegelen aufgetrennt. Hierzu wurden, je nach gewünschter Trennleistung des Gels, zwischen 0,7 g und 3 g Agarose in 100 ml 0,5x TBE-Puffer in der Mikrowelle kurz aufgeköcht. Die Lösung wurde auf etwa 50°C abgekühlt und Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,5 µg/ml zugefügt. Anschließend wurde die Lösung in einen Gelträger mit Kamm gegossen. Nachdem das Gel polymerisiert war, wurden jeweils 10 µl der Proben mit 2 µl 6x Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen einpipettiert. Als Marker wurde ein 100 bp oder 1 kb Standardmarker mitgeführt. Die Gelelektrophorese erfolgte in einer horizontalen Elektrophoresekammer bei 5-10 V/cm unter 0,5x TBE-Puffer. Durch Interkalation von Ethidiumbromid in die DNA wird die DNA bei UV-Bestrahlung als fluoreszierende Bande sichtbar. Bei einer ausreichenden Auftrennung der DNA-Banden wurde die Gelelektrophorese abgebrochen. Das Gel wurde mit UV-Licht durchleuchtet und fotografiert.

Material:            Agarose (FMC, Maine, USA)  
                         Ethidiumbromid (Roth, Karlsruhe)  
                         0,5x TBE-Puffer: 45 mM TrisBase, 45 mM Borsäure, 1 mM EDTA  
                         6x Ladepuffer: 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylene-Cyanol, 15% Ficoll 400  
                         DNA-Längenstandard 25 bp (Invitrogen, Leek, Niederlande)  
                         DNA-Längenstandard 100bp (Pharmacia, Freiburg)  
                         DNA-Längenstandard 1kb (Pharmacia, Freiburg)

### 2.6.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die verwendete Methode zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen beruht auf der Bindung von DNA an Silica. Es wurde eine Gelelektrophorese mit einem 1-2% TAE-Agarose-Gel durchgeführt. Ein Unterschied zur oben beschriebenen Methode der Gelelektrophorese bestand lediglich in der Verwendung von 1x TAE-Puffer anstelle des 0,5x TBE-Puffers. Die zu präparierende DNA-Bande wurde unter UV-Licht mit einem Minimum an Gelrückständen aus dem TAE-Agarosegel herausgeschnitten und in ein Eppendorftube

überführt. Das Tube wurde mit 6 M Natriumjodid (NaJ) gefüllt und das Gel bei 55°C vollständig geschmolzen. Anschließend wurden 50 µl Silica-Suspension (100 mg/ml in 3 M NaJ) zugegeben. Das DNA-Silica-Gemisch wurde gut gevortext und der Ansatz für 5 min im Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Silica bei 10600 x g für 1 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zweimal mit 0,5 ml Waschlösung gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift erfolgte das vollständige Abpipettieren der Waschlösung und die Elution der DNA mit 200 µl H<sub>2</sub>O oder TE-Puffer. Um die Silica vollständig zu entfernen, wurde die Probe zweimal für 1 min bei 10600 x g zentrifugiert. Der Überstand, der das gereinigte DNA-Fragment enthielt, wurde in ein neues Tube überführt.

Material: TAE (50x): 0,04 M TrisBase, 0,04 M konz. Essigsäure, 0,001 M EDTA  
Natriumjodid (Fluka, Steinheim)  
Silica (Sigma, Steinheim)  
Waschlösung: 10 mM Tris-Cl (pH 7,5), 2,5 mM EDTA, 50 mM NaCl, 50% Ethanol  
TE-Puffer: 10 mM Tris-Cl (pH 8,0), 1 mM EDTA

### 2.6.9 Dephosphorylierung linearer Plasmid-DNA

Unter Dephosphorylierung von DNA versteht man das Abspalten von 5'-Phosphatgruppen an DNA-Enden. Das dazu eingesetzte Enzym ist die alkalische Phosphatase, sie entfernt endständige 5'-Phosphatgruppen in linearen, doppelsträngigen DNA-Molekülen. Ziel einer solchen Behandlung ist es zu verhindern, daß linearisierte Vektor-Moleküle mit sich selbst ligieren (zirkularisieren) wenn sie in eine Ligations-Reaktion eingesetzt werden.

In einem Reaktionsvolumen von 100 µl wurden 40 ng linearisierter Vektor, 5 µl Shrimp Alkalische Phosphatase (1 U/µl), 10 µl 10x Dephosphorylierungspuffer sowie H<sub>2</sub>O für 45 min bei 37°C inkubiert. Das Enzym wurde anschließend 10 min bei 66°C inaktiviert und die lineare Plasmid-DNA über ein TAE-Gel aufgereinigt (siehe Kap. 2.6.8).

Material: Shrimp Alkalische Phosphatase (USB, England)  
Dephosphorylierungspuffer (10x): 200 mM Tris-Cl (pH 8,0), 100 mM MgCl<sub>2</sub>  
(USB, England)

### 2.6.10 Ligation und Klonierung

#### Ligation mit T4-Ligase

Zur Ligation eines DNA-Fragments in einen linearisierten und dephosphorylierten Vektor wurden Vektor und Insert in einem Verhältnis von 1:5 (Vektor:Insert) eingesetzt. Für einen 10 µl Ansatz wurden dem Vektor/Insert-Gemisch 1 µl T4 DNA-Ligase (20 U/µl) sowie 1 µl Ligationspuffer (10x) zugesetzt, die Differenz zum 10 µl Gesamtvolumen wurde mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 14°C inkubiert.

Material: T4 DNA-Ligase (Invitrogen, Leek, Niederlande)  
 Ligationspuffer (10x): 500 mM Tris-Cl (pH 7,8), 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM DTT,  
 10 mM ATP, 500 µg/ml BSA (Invitrogen, Leek, Niederlande)

#### TOPO TA-Cloning™

Das TOPO TA-Cloning™ Kit von Invitrogen erlaubt es, PCR-Produkte direkt in den TOPO TA-Cloning™ Vektor einzuklonieren. Bei der PCR wird, unabhängig vom Template, von der Taq-Polymerase ein Adenosin an die 3' Enden des PCR-Produkts ansynthetisiert. Diese 3' A-Überhänge werden ausgenutzt, um das Fragment an der Insertionsstelle des Vektors einzuklonieren, welche 3' T-Überhänge aufweist. Der mit dem TOPO TA-Cloning™ Kit gelieferte Vektor (pCR™2.1-TOPO oder pCR™II-TOPO) liegt als linearisiertes Molekül mit zur Insertion bereiten 3' T-Überhängen vor. Der Vektor besitzt zusätzlich eine Topoisomerase-Aktivität, sodaß eine Ligation von PCR-Produkt und Vektor sehr schnell und sehr effizient erfolgt.

Bei der Ligation wird ein Verhältnis von 1:2 (Vektor:Insert) eingesetzt. Die Menge an benötigtem PCR-Produkt errechnet sich wie folgt:

$$x \text{ ng PCR – Produkt} = \frac{(y \text{ bp PCR – Produkt})(40 \text{ ng pCR II – Vektor})}{3932 \text{ bp pCR II – Vektor}}$$

Das Ergebnis (x) entspricht einem 1:1 Verhältnis von Vektor und Insert, daher werden für ein 1:2 Verhältnis 2x ng PCR-Produkt benötigt. Für die Ligation wurden 0,5 - 2 µl (2x ng) möglichst "frisches" PCR-Produkt mit 1 µl Vektor und H<sub>2</sub>O gemischt, sodaß sich ein

Gesamtvolumen von 5  $\mu$ l ergab. Die Ligation erfolgte innerhalb von 5 min bei Raumtemperatur.

Material: TOPO TA-Cloning™ Kit (Invitrogen, Leek, Niederlande)

### 2.6.11 Transformation und Transfektion

#### Transformation in kompetente E. coli

Plasmid-DNA wurde mittels Hitzeschock-Transformation in kompetente E. coli transformiert. Verwendet wurden hierbei die kompetenten Bakterien INV $\alpha$ F', TOP10 oder XL1Blue. Nachfolgend sind die einzelnen E. coli-Stämme mit ihrem Genotyp aufgeführt:

INV $\alpha$ F'	F' endA1 recA1 hsdR17 (rk-, mk+) supE44 thi-1 gyrA96 relA1 f80 lacZDM15D(lacZYA-argF) U169 (Invitrogen, Leek, Niederlande)
TOP10	F- mcrA D(mrr-hsdRMS-mcrBC) f80lacZDM15 DlacX74 deoR recA1 araD139 D(ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG U169 (Invitrogen, Leek, Niederlande)
XL1Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F $\phi$ proAB lacIqZDM15 Tn10 (Tetr)] (Stratagene, Heidelberg)

Es wurden pro Ligation je ein 50  $\mu$ l Aliquot kompetente Zellen auf Eis aufgetaut. In jedes Zelltube wurden 2  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol und 5  $\mu$ l des Ligationsansatzes zugegeben, vorsichtig gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Es folgten eine Hitzeschockbehandlung für 30 s bei 42°C im Wasserbad und eine anschließende Inkubation auf Eis für 2 min. Pro Tube wurden 450  $\mu$ l warmes SOC-Medium zugegeben und die Zellen bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Nach einer Stunde wurden 50  $\mu$ l bzw. 100  $\mu$ l der transformierten Zellen auf LB-Amp-Agarplatten oder LB-Kana-Agarplatten ausgestrichen und ÜN im 37°C Brutschrank inkubiert.

Bei Transformation eines pCR™2.1- oder eines pCR™II-Vektors wurden die LB-Amp-Agarplatten vor dem Auftragen der transformierten Zellen mit 80  $\mu$ l X-Gal (20 mg/ml) bestrichen. Dieses Vorgehen ermöglicht es einem nach Inkubation und Wachstum der transformierten Zellen eine Blau-Weiß-Selektionierung der Kolonien vornehmen zu können. Durch Insertion des PCR-Fragmentes in den Vektor wird der LacZ $\alpha$ -Leserahmen

unterbrochen, die  $\beta$ -Galaktosidase wird nicht exprimiert. X-Gal kann somit nicht durch  $\beta$ -Galaktosidase umgesetzt werden zu einem blauen Farbstoff. Positive Klone können so anhand ihres farblosen Phänotyps identifiziert werden.

Material	One Shot™ kompetente Bakterien INV $\alpha$ F' und TOP10 (Invitrogen, Leek, Niederlande)
	kompetente Bakterien XL1Blue (Stratagene, Heidelberg)
	$\beta$ -Mercaptoethanol 0,5 M (Sigma, Steinheim)
	SOC-Medium: 2% Trypton, 0,5% Hefe-Extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM MgSO <sub>4</sub> , 20 mM Glucose
	LB-Amp-Agar: 1% Trypton, 0,5% Hefe-Extrakt, 1% NaCl, 1,5% Agar, 100 $\mu$ g/ml Ampicillin
	LB-Kana-Agar: 1% Trypton, 0,5% Hefe-Extrakt, 1% NaCl, 1,5% Agar, 50 $\mu$ g/ml Kanamycin
	X-Gal (Stratagene, Heidelberg)

### Transfektion in 293-Zellen und D2-Zellen

Die Transfektion von eukaryotischen 293-Zellen (Zelllinie, humane embryonale Nierenzellen) und D2-Zellen (Zelllinie, Maus Balb/c Fibroblasten) wurde mit dem Calcium-Phosphat Transfektions Kit der Firma 5Prim $\rightarrow$ 3Prime Inc (Boulder, USA) durchgeführt.

Ca 20 Stunden vor Transfektion wurden  $5 \times 10^5$  Zellen in einer 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche ausgesät, zwei Stunden vor Transfektion wurde das gesamte Medium (DMEM mit 10% FKS, 2mM Glutamin, Penicillin (100 IE/ml)/Streptomycin (0,1 mg/ml)) durch 5 ml frisches Medium ersetzt. Dem Kulturmedium wurden 0,5 ml eines Calciumphosphat-DNA-Gemisches bestehend aus 250  $\mu$ l 2x DNA Precipitation Buffer, 31  $\mu$ l 2 M CaCl<sub>2</sub>, 50  $\mu$ g Plasmid-DNA und einer entsprechenden Menge H<sub>2</sub>O zugegeben. Nach vier Stunden Inkubation im Brutschrank (37°C) wurde das Kulturmedium aspiriert, die Zellen mit 5 ml serumfreiem Medium gewaschen und mit 15% Glycerolshocking Buffer für 90 s überschichtet. Die Zellen wurden erneut mit 5 ml serumfreiem Medium gewaschen und nach Zugabe von frischem Medium zwei Tage im Brutschrank (37°C) inkubiert.

Material:	DMEM (CC-Pro, Neustadt)
	FKS (CC-Pro, Neustadt)
	2mM Glutamin (Gibco BRL, Eggenstein)
	Penicillin 10000 IE/ml (Gibco BRL, Eggenstein)

Streptomycin 10 mg/ml (Gibco BRL, Eggenstein)  
 2x DNA Precipitation Buffer: 50 mM Hepes (pH 7,05), 1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 M CaCl<sub>2</sub>  
 10 mM KCl, 280 mM NaCl, 12 mM Glukose  
 15% Glycerolshocking Buffer: 3Teile Glycerin, 7 Teile steriles H<sub>2</sub>O,  
 10 Teile 2x DNA Precipitation Buffer

### 2.6.12 Sequenzierung

Die Analyse von DNA-Sequenzen erfolgte mit dem Kettenabbruchverfahren nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Bei diesem Verfahren führen die zugesetzten ddNTP während der DNA-Synthese zum Kettenabbruch, da diesen das zur Kettenverlängerung nötige 3'OH fehlt. Die ddNTPs sind dem Reaktionsgemisch in einer Konzentration beigefügt, die mit statistischer Häufigkeit zum Abbruch an allen Positionen führt, sodaß jede mögliche Kettenlänge (in einem Bereich von 10->700 Basen) vertreten ist. Dieses Gemisch unterschiedlich langer DNA-Stränge wird auf einem Polyacrylamid/Harnstoff-Gel zur Sequenzanalyse aufgetrennt. Die ddNTPs sind an unterschiedliche Farbstoffe (substituierte Rhodamine) gekoppelt, die nach Anregung durch einen Argon-Laserstrahl Licht in definierter Wellenlänge emittieren. Dieses Licht wird vom Sequencer detektiert und in elektrische Signale umgewandelt. Eine Auswertung der Daten erfolgte mit dem DNAS<sub>tar</sub>-Software-Package.

### DNA-Sequenzierung mit dem DyeDeoxy-Terminator Cycle Sequencing Kit

Zur Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde das DyeDeoxy-Terminator Cycle Sequencing Kit der Firma Perkin Elmer verwendet. Plasmid-DNA wurde durch Plasmid-Präparation mit Qiagen-Säulchen (s.Kap. 2.6.3) erhalten. In ein Reaktionsvolumen von 20 µl wurden 500 ng Plasmid-DNA, 8 µl Terminator Ready Reaction Mix, 10 pmol Primer und eine entsprechende Menge H<sub>2</sub>O eingesetzt. Im Gene Amp 9600 Thermocycler wurde die folgende Sequenzier-Reaktion durchgeführt:

1. 10 s	96°C	Denaturierung
2. 5 s	55°C	Annealing
3. 4 min	60°C	Synthese



Die Schritte 1. bis 3. wurden 25x wiederholt. Die Sequenzierprimer sind in Tabelle 2.1 aufgelistet.

Tabelle 2.1: Sequenzierprimer

Primer	Primersequenz	sequenzierter Vektor
Sp6	5' ATTTAGGTGACACTATA 3'	pCR II
T7	5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'	pCR II, pCR 2.1
M13	5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'	pCR II, pCR 2.1
pJW seq5'1	5' TGCTGTGTGGAGCAGTCTTCG 3'	pJW4303
pJW seq5'2	5' GTGTGGAGCAGTCTTCGTTTCG 3'	pJW4303
pJW seq5'4	5' CATAATAGCTGACAGACTAACAGACT 3'	pJW4303
pJW seq3'1	5' CACAGTCGAGGCTGATCATA 3'	pJW4303
pJW seq3'3	5' GTCGAGGCTGATCATACGTAGA 3'	pJW4303

Material: DyeDeoxy-Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin Elmer, Weiterstadt)

### **Aufreinigung der fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente nach Sequenzier-Reaktion**

Um überschüssige ddNTPs, dNTPs und Primer zu entfernen wurde der Reaktionsansatz über ein MicroSpin S-200 Säulchen gereinigt. Zur Vorbereitung des Säulchens mußte dieses erst 90 s bei 1500 x g zentrifugiert werden. Das so vorbereitete Säulchen wurde in ein frisches Eppendorftube gesetzt und die Sequenzier-Probe wurde aufgetragen. Nach erneuter Zentrifugation für 90 s bei 1500 x g befand sich nun die durchzentrifugierte und gereinigte Probe im Tube. Die DNA wurde in einem Vakuum-Konzentrator eingedampft und anschließend in 4 µl eines Formamid/EDTA-Gemisches (Formamid/50 mM EDTA (pH 8,0), 5:1) aufgenommen. Vor dem Auftragen der Probe auf das Polyacrylamid/Harnstoff-Gel wurde die DNA für zwei Minuten bei 90°C denaturiert und anschließend auf Eis gestellt.

Material: MicroSpin S-200 Säulchen (Pharmacia, Freiburg)  
Formamid (Kodak, Rochester, USA)

### **Polyacrylamid/Harnstoff-Gelelektrophorese**

Zur Herstellung des Polyacrylamid/Harnstoff-Gels wurden 30 g Harnstoff mit 9 ml 40% Acrylamid-Lösung, 6 ml 10x TBE und 23,5 ml H<sub>2</sub>O vermischt. Durch Erwärmen auf 50°C und gelegentliches Rühren wurde der Harnstoff gelöst, die Lösung wurde anschließend filtriert und abgekühlt. Durch Zugabe von 180 µl Ammoniumpersulfat 10% (Radikalquelle) und 24 µl TEMED (Katalysator) kurz vor dem Gießen des Gels wurde die Polymerisationsreaktion gestartet. Das Gel wurde nun zwischen zwei mit einem Detergenz (Alconox) gewaschenen und mit Isopropanol (90%) nachbehandelten Glasplatten gegossen und zwei Stunden in horizontaler Lage auspolymerisiert. Die elektrophoretische Auftrennung der Proben erfolgte bei 30 Watt, einer Spannung von 2500 Volt und einer Laufzeit von 14 Stunden im ABI 373A DNA Sequencer.

Material:           Harnstoff (Gibco BRL, Eggenstein)  
                      Acrylamid-Lösung (40% (19:1) Acrylamid/Bisacrylamid) (Biorad, München)  
                      10x TBE: 0,9 M TrisBase, 0,9 M Borsäure, 20 mM EDTA  
                      Ammoniumpersulfat (Biorad, München)  
                      TEMED (N,N,N,N-Tetramethylethylen-diamin) (Biorad, München)  
                      Alconox (Sigma, Deisenhofen)  
                      Isopropanol 90% (Fluka, Deisenhofen)

## **2.7 PCR-Amplifikation**

### **2.7.1 PCR-Amplifikation zur gB-Typisierung**

Zur Typisierung der gB-Sequenzen von klinischen Isolaten, Laborstämmen und Nativmaterialien wurden verschiedene nested PCRs (nPCRs) durchgeführt. In einer ersten Runde (5'gBoutN/3'gBout neu) wurde das gesamte gB-Gen amplifiziert. Zwei verschiedene Zweite-Runde-PCRs wurden anschließend durchgeführt, um das gB-Gen in den Bereichen N-Term (NgB5'in48/NgB3'in366) und Cleavage-site (gB1319/gB1604) zu amplifizieren und durch RFLP zu typisieren. Alle Erste- und Zweite-Runde-Amplifikationen wurden in einem 50 µl Reaktionsvolumen durchgeführt, mit 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris (pH 8,3), 50 mM KCl, 200 µM dNTP, 1,25 U Taq Gold Polymerase sowie 20 pmol eines jeden Primers. Als Template wurden 1-5 µl aufgearbeitete DNA (siehe Kap. 2.6.1) oder 2 µl Erste-Runde-

Amplifikat eingesetzt. Die PCRs wurden in einem DNA-Thermal-Cycler der Firma Perkin Elmer durchgeführt, die Amplifikation erfolgte mit einem klassischen 3-Schritt-Programm:

1. 10 min	95°C	Denaturierung
2. 1 min	95°C	Denaturierung
3. 1 min	x°C	Annealing
4. 1 min	72°C	Elongation
5. 10 min	72°C	Auslaufzeit

Die Schritte 2. bis 4. wurden 35x wiederholt. Die Annealing-Temperatur "x" richtete sich nach den für die jeweiligen Primer optimalen Bedingungen und kann aus Tabelle 2.2 ersehen werden.

Material: 25 mM Magnesiumchlorid MgCl<sub>2</sub> (Perkin Elmer, Weiterstadt)  
 PCR-Puffer (10x): 0,1 M Tris (pH 8,3), 0,5 M KCl (Perkin Elmer, Weiterstadt)  
 dNTP (Pharmacia, Freiburg)  
 AmpliTaq Gold Polymerase (Perkin Elmer, Weiterstadt)

Tabelle 2.2: Primer zur Amplifikation von gB-Fragmenten

Primer	Primersequenz	Position <sup>1</sup>	AT [°C]
5'gBoutN	5' TTCTGGGAAGCCTCGGAACG 3'	-114 - -97	60
3'gBout neu	5' ATCACGCAGCACCTTGACGC 3'	2855 - 2876	60
NgB5'in48	5' TCTGTCTGGGTGCTGYGGTTTCC 3'	49 - 71	65
NgB3'in366	5' GTCTTCATTGATRGGCTTCATCG 3'	337 - 359	65
gB1319	5' TGGAAYTSGAACGTTTGGC 3'	1318 - 1335	55
gB1604	5' GAAACGCGCGCAATCGG 3'	1602 - 1619	55

1: 1= erste Base des gB Startcodons vom HCMV-Stamm AD169 (EMBL Nukleotid-Datenbank Accession-No. X17403)

### 2.7.2 PCR-Amplifikation zur gH-Typisierung

Zur Typisierung der gH-Sequenzen von klinischen Isolaten, Laborstämmen und Nativmaterialien wurden verschiedene nPCRs durchgeführt. In einer ersten Runde (gH-out-5'/gH-all-3') wurde das gesamte gH-Gen amplifiziert, verschiedene Zweite-Runden wurden anschließend durchgeführt. Zur gH-Typisierung durch RFLP wurden aus dem Erste-Runde-Amplifikat Fragmente um die Bereiche gH CV1 (gH-201/gH-172), gH CV2 (gHNr6-5'/gHNr7-3') und gH CV3 (gHNr9-5'/gHNr10-3') in einer Zweiten-Runde-PCR amplifiziert. Alle Erste- und Zweite-Runde-Amplifikationen wurden in einem 50 µl Reaktionsvolumen durchgeführt, mit 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris (pH 8,3), 50 mM KCl, 200 µM dNTP, 1,25 U Taq Gold Polymerase sowie 20 pmol eines jeden Primers. Als Template wurden 1-5 µl aufgearbeitete DNA (siehe Kap. 2.6.1) oder 2 µl Erste-Runde-Amplifikat eingesetzt. Die PCRs wurden in einem DNA-Thermal-Cycler der Firma Perkin Elmer durchgeführt, die Amplifikation erfolgte mit einem klassischen 3-Schritt-Programm (siehe Kap. 2.7.1).

Die Annealing-Temperaturen richteten sich nach den für die jeweiligen Primer optimalen Bedingungen und können aus Tabelle 2.3 ersehen werden.

Material: 25 mM Magnesiumchlorid MgCl<sub>2</sub> (Perkin Elmer, Weiterstadt)  
 PCR-Puffer (10x): 0,1 M Tris (pH 8,3), 0,5 M KCl (Perkin Elmer, Weiterstadt)  
 dNTP (Pharmacia, Freiburg)  
 AmpliTaq Gold Polymerase (Perkin Elmer, Weiterstadt)

Tabelle 2.3: Primer zur Amplifikation von gH-Fragmenten

Primer	Primersequenz	Position <sup>1</sup>	AT [°C]
gH-out-5'	5' CGAATCAGCGTCGTCACCCAC 3'	-227 - -208	66
gH-all-3'	5' ACCATCACACCGTGTGGCGT 3'	2353 - 2372	66
gH-Nr6-5'	5' CCGATCTTTTTTCGCAGCAGC 3'	407 - 427	58
gH-Nr7-3'	5' AGCAGCATGGGTGTGTCGTCG 3'	725 - 745	58
gH-Nr9-5'	5' CGGTAGAAATGGCCTTCGCC 3'	1012 - 1031	61
gH-Nr10-3'	5' GGCTGAAAGAAAAGAGGCC 3'	1367 - 1385	61
gH-201	5' CCACCTGGATCACGCCGCTG 3'	-42 - -22	58
gH-172	5' TGGTGTTCACGCAGGAA 3'	152 - 171	58

1: 1= erste Base des gH Startcodons vom HCMV-Stamm AD169 (EMBL Nukleotid-Datenbank Accession-No. X17403)

### 2.7.3 PCR-Amplifikation zur Klonierung in den Expressionsvektor pJW4303

Um die verschiedenen HCMV-Gene in den Expressionsvektor pJW4303 zu klonieren, wurden die jeweiligen Gene als Voll-Längen-Gene amplifiziert. Zur Amplifikation der Gene wurde jeweils eine nested PCR durchgeführt, wobei die Zweite-Runde-Primer so gewählt wurden, daß sie an Start- und Stopcodon der jeweiligen Gen-Sequenz annealten. Zusätzlich wurden in die Zweite-Runde-Primer Restriktionschnittstellen eingeführt, um eine spätere Klonierung in den Vektor zu ermöglichen. Die optimalen PCR-Mixe und Amplifikationsbedingungen mußten für jedes Gen neu ermittelt werden, die PCRs wurden in einem DNA-Thermal-Cycler der Firma Perkin Elmer durchgeführt. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 2.4 aufgelistet:

Tabelle 2.4: Primer zur Amplifikation der HCMV Voll-Längen-Gene pp65, gH, gL und gB

Primer	Primersequenz	Position <sup>1</sup>	AT [°C]
pp65 5'out	5' GCTCAGTCGCCTACACCC 3'	-63 - -45	70/65/60
pp65 3'out	5' TTTATAGAGTCGTCCTAAGC 3'	1672 - 1692	70/65/60
pp65 5'Bam	5' GGATCCAATGATATCCGTAAGGG 3'	-1 - 17	55
pp65 3'Bam	5' GGATCCGCTCAACCTCGGTGCT 3'	1643 - 1658	55
gH-out-5'	5' CGAATCAGCGTCGTCACAC 3'	-227 - -208	66
gH-all-3'	5' ACCATCACACCGTGTGGCGT 3'	2353 - 2372	66
gH 5'Hind	5' AAGCTTATGCGGCCMGGCTCCCC 3'	-1 - 17	72
gH 3'Hind	5' AAGCTTCAGTCAGCATGTCTTGAGCAT 3'	2214 - 2231	72
gL 5'out	5' AACTGGCTCCTTACCGTCACAC 3'	-43 - -22	65
gL 3'out	5' CGCGAGCCTGCTCGTCGGGG 3'	866 - 886	65
gL 5'Bam	5' GGATCCGATGTGCCGCCGCCGGA 3'	-1 - 17	74
gL 3'Bam	5' GGATCCTGTTAGCGAGCATCCACTGC 3'	818 - 839	74
5'gB out neu	5' GGCTGCCAAGTCCGTATC 3'	-114 - -97	58
3'gB out neu	5' GGGTTGAAAACATAGCGGA 3'	2855 - 2874	58
gB 5'Bam	5' GGATCCCATGGAATCCAGGATCTG 3'	-1 - 17	63
gB 3'Bam	5' GGATCCGTTACAGACGTTCTCTTC 3'	2706 - 2722	63

1: 1= erste Base des pp65, gH, gL oder gB Startcodons vom HCMV-Stamm AD169 (EMBL Nukleotid-Datenbank Accession-No. X17403)

### Amplifikation der HCMV pp65-Sequenz

Die Erste-Runde-Amplifikation der pp65-Sequenz (pp65 5'out/pp65 3'out) wurde in einem 50 µl Reaktionsvolumen durchgeführt, mit 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris (pH 8,3), 50 mM KCl, 200 µM dNTP, 1,25 U Taq Gold Polymerase sowie 20 pmol eines jeden Primers. Als Template wurden 1-5 µl aufgearbeiteter Kulturüberstand von HCMV-Isolat Nr 3 (siehe Kap. 2.6.1 und 3.1.1) eingesetzt, die Amplifikation erfolgte mit einem gestaffelten 3-Schritt-Programm:

1. 10 min	95°C	Denaturierung
2. 1 min	95°C	Denaturierung
3. 1 min	70°C	Annealing
4. 1 min	72°C	Elongation
5. 1 min	95°C	Denaturierung
6. 1 min	65°C	Annealing
7. 1 min	72°C	Elongation
8. 1 min	95°C	Denaturierung
9. 1 min	60°C	Annealing
10. 1 min	72°C	Elongation
11. 10 min	72°C	Auslaufzeit

Die Schritte 2. bis 4. wurden 10x wiederholt, die Schritte 5. bis 7. 20x und die Schritte 8. bis 10. wurden wiederum 10x wiederholt.

Für die zweite Runde der pp65-PCR (pp65 5'Bam/pp65 3'Bam) wurde ein ähnliches Puffersystem gewählt wie auch in der ersten Runde, allerdings enthielt der Zweite-Runde-Mix zusätzlich 15% Glycerin. Als Template wurden 2 µl Erste-Runde-Amplifikat in ein 50 µl Reaktionsvolumen eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte mit einem klassischen 3-Schritt-Programm (siehe Kap. 2.7.1) bei einer Annealing-Temperatur von 55°C.

Material: 25 mM Magnesiumchlorid  $MgCl_2$  (Perkin Elmer, Weiterstadt)  
 PCR-Puffer (10x): 0,1 M Tris (pH 8,3), 0,5 M KCl, (Perkin Elmer, Weiterstadt)  
 dNTP (Pharmacia, Freiburg)  
 Glycerin (Sigma, Steinheim)  
 AmpliTaq Gold Polymerase (Perkin Elmer, Weiterstadt)

### Amplifikation der HCMV gH-Sequenzen

Die Erste-Runde-Amplifikation der gH-Sequenzen (gH 5' out/gH 3' out) wurde in einem 50  $\mu$ l Reaktionsvolumen durchgeführt, mit 2,5 mM  $MgCl_2$ , 10 mM Tris (pH 8,3), 50 mM KCl, 200  $\mu$ M dNTP, 1,25 U Taq Gold Polymerase sowie 20 pmol eines jeden Primers. Als Template wurden 1-5  $\mu$ l aufgearbeiteter Kulturüberstand von Isolat Nr. 1 (gH1) oder Isolat Nr. 2 (gH2) (siehe Kap. 2.6.1 und 3.1.1) eingesetzt, die Amplifikation erfolgte mit einem klassischen 3-Schritt-Programm (siehe Kap. 2.7.1) bei einer Annealing-Temperatur von 70°C. Das erhaltene Amplifikat wurde in den pCR<sup>TM</sup>2.1-Vektor kloniert (s. Kap. 2.6.10).

Für die zweite Runde der gH-PCR (gH 5' Hind/gH 3' Hind) wurde ein ähnliches Puffersystem gewählt wie auch in der ersten Runde, allerdings enthielt der Zweite-Runde-Mix die doppelte Menge an dNTPs (400  $\mu$ M). Als Template wurden 2  $\mu$ l Plasmid DNA in ein 50  $\mu$ l Reaktionsvolumen eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte mit einem 2-Schritt-Programm, die Schritte 2. bis 3. wurden 35x wiederholt:

1. 10 min	95°C	Denaturierung
2. 1 min	95°C	Denaturierung
3. 2 min	72°C	Annealing und Elongation
4. 1 min	72°C	Auslaufzeit

Material: 25 mM Magnesiumchlorid  $MgCl_2$  (Perkin Elmer, Weiterstadt)  
 PCR-Puffer (10x): 0,1 M Tris (pH 8,3), 0,5 M KCl (Perkin Elmer, Weiterstadt)  
 dNTP (Pharmacia, Freiburg)  
 AmpliTaq Gold Polymerase (Perkin Elmer, Weiterstadt)

### Amplifikation der HCMV gL-Sequenz

Die Erste-Runde-Amplifikation der gL-Sequenz (gL 5' out/gL 3' out) wurde in einem 50 µl Reaktionsvolumen durchgeführt, mit 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris (pH 8,8), 10 mM KCl, 0,002% Tween 20, 200 µM dNTP, 1,25 U UITma DNA Polymerase sowie 20 pmol eines jeden Primers. Als Template wurden 1-5 µl aufgearbeiteter Kulturüberstand von Isolat Nr. 1 (siehe Kap. 2.6.1 und 3.1.1) eingesetzt, die Amplifikation erfolgte mittels eines 3-Schritt-Programms mit Hot Start. Dabei wurde der PCR-Mix ohne MgCl<sub>2</sub> und UITma DNA Polymerase 5 min bei 80°C vorgeheizt, erst dann wurden MgCl<sub>2</sub> und Polymerase zugegeben und die PCR gestartet. Für die PCR wurde eine Annealing-Temperatur von 65°C gewählt.

1. 5 min	80°C	Vorheizen
	Zugabe von MgCl <sub>2</sub> und UITma DNA Polymerase	
2. 10 min	95°C	Denaturierung
3. 1 min	95°C	Denaturierung
4. 1 min	65°C	Annealing
5. 1 min	72°C	Elongation
6. 1 min	72°C	Auslaufzeit

Die Amplifikation der zweiten Runde (gL 5' Bam/gL 3' Bam) wurde unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wie in der ersten Runde. Als Template wurden 2 µl Erste-Runde-Amplifikat eingesetzt, die Amplifikation erfolgte bei einer Annealing-Temperatur von 74°C.

Material: 25 mM Magnesiumchlorid MgCl<sub>2</sub> (Perkin Elmer, Weiterstadt)  
 PCR-Puffer (10x): 0,1 M Tris (pH 8,8), 0,1 M KCl, 0,02% Tween 20  
 (Perkin Elmer, Weiterstadt)  
 dNTP (Pharmacia, Freiburg)  
 UITma DNA Polymerase (Perkin Elmer, Weiterstadt)

### Amplifikation der HCMV gB-Sequenzen

Die Erste-Runde-Amplifikation der gB-Sequenzen (gB 5' out neu/gB 3' out neu) wurde in einem 50 µl Reaktionsvolumen durchgeführt, mit 7,5 µl MgCl<sub>2</sub>, 7,5 µl 10 x PCR-Puffer,



400  $\mu\text{M}$  dNTP, 1,5 U AmpliTaq DNAPolymerase sowie 20 pmol eines jeden Primers. Als Template diente aufgearbeiteter Kulturüberstand von Isolat Nr. 1 (gB1), Isolat Nr. 9 (gB2), Isolat Nr. 16 (gB3) oder Isolat Nr. 22 (gB4) (siehe Kap 2.6.1 und 3.1.1). Vor Einsatz in die PCR wurde die aus dem Überstand isolierte Virus-DNA einem Restriktionsverdau mit BamH I unterzogen (siehe Kap. 2.6.5); 17  $\mu\text{l}$  dieser DNA wurden in die PCR eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte mit einem klassischen 3-Schritt-Programm (siehe Kap. 2.7.1) bei einer Annealing-Temperatur von 58°C.

Für die zweite Runde der gB-PCR (gB 5' Bam/gB 3' Bam) wurden 2  $\mu\text{l}$  Erste-Runde-Amplifikat in ein 50  $\mu\text{l}$  Reaktionsvolumen eingesetzt, mit 5  $\mu\text{l}$   $\text{MgCl}_2$ , 5  $\mu\text{l}$  10x PCR-Puffer, 10  $\mu\text{l}$  Q-Solution, 300  $\mu\text{M}$  dNTP, 1,5 U AmpliTaq DNA Polymerase sowie 20 pmol eines jeden Primers. Die Amplifikationsbedingungen waren die gleichen wie in der ersten Runde, die Annealing-Temperatur betrug 63°C.

Material: 25 mM Magnesiumchlorid  $\text{MgCl}_2$  (Qiagen, Hilden)  
10x PCR-Puffer (Qiagen, Hilden)  
Q-Solution (Qiagen, Hilden)  
dNTP (Pharmacia, Freiburg)  
AmpliTaq DNAPolymerase (Perkin Elmer, Weiterstadt)

#### 2.7.4 PCR-Amplifikation zur Klonierung in den Expressionsvektor VR1055

Zur Klonierung des Gens gB1 $\Delta\text{TM}$  in den Expressionsvektor VR1055 wurde das HCMV gB1-Gen ohne Transmembrandomäne amplifiziert. Zur Amplifikation des Gens wurde eine einfache single round PCR durchgeführt, als Template diente der Expressionsvektor pJW4303gB1. Die Primer wurden so gewählt, daß der 5'Primer an das Startcodon des gB-Gens annealte und der 3'Primer an die gB Sequenz bp 2016 – 2032 (1= erste Base des gB Startcodons vom HCMV-Stamm AD169). In beide Primer wurden Restriktionsschnittstellen eingeführt, in den 3'Primer wurde zusätzlich ein Stopcodon eingebaut.

Es wurden folgende Primer benutzt: gB5'BclI 5' TGATCATGGAATCCAGGATCTG 3', gB $\Delta\text{TM}$ 3' 5' GGATCCTCAAACGTTGCTGGAACGC 3'.

Die PCR wurde in einem 50  $\mu\text{l}$  Reaktionsvolumen durchgeführt, mit 2,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM Tris (pH 8,3), 50 mM KCl, 200  $\mu\text{M}$  dNTP, 1,25 U Taq Gold Polymerase sowie 25 pmol eines jeden Primers. Als Template wurden 2  $\mu\text{l}$  Plasmid DNA in die Reaktion eingesetzt. Die PCR

wurde in einem Gene Amp 9600 Thermocycler der Firma Perkin Elmer durchgeführt, die Amplifikation erfolgte mit einem klassischen 3-Schritt-Programm (siehe Kap. 2.7.1) bei einer Annealing-Temperatur von 65°C.

Material: 25 mM Magnesiumchlorid  $MgCl_2$  (Perkin Elmer, Weiterstadt)  
PCR-Puffer (10x): 0,1 M Tris (pH 8,3), 0,5 M KCl (Perkin Elmer, Weiterstadt)  
dNTP (Pharmacia, Freiburg)  
AmpliTaq Gold Polymerase (Perkin Elmer, Weiterstadt)

### **2.7.5 PCR-Amplifikation zum Nachweis von Plasmid-DNA in immunisierten Mäusen und deren Nachkommen**

#### **Qualitative PCR**

Zum Nachweis von Plasmid-DNA in den Organen immunisierter Mäuse oder in deren Nachkommen wurden verschiedene nPCRs durchgeführt. Es wurden jeweils Bereiche aus den HCMV-Genen pp65 (1. Runde Primer 5'pp65 210/3'pp65 740, 2. Runde Primer 5'pp65 310/3'pp65 675), gH (1. Runde Primer gH-Nr5-5'/gH-Nr8-3', 2. Runde Primer gH-Nr6-5'/gH-Nr7-3') oder gB (1. Runde Primer gB 1319/ gB Ci 3', 2. Runde Primer AD1-5'/AD1-3') amplifiziert. Bei einigen mit einem Plasmidcocktail immunisierten Mäusen wurde ein Bereich aus dem CMV IE-Promoter des Expressionsvektors pJW4303 (1. Runde Primer pJW 5'out neu/ pJW 3'out neu, 2. Runde Primer pJW 5'out/ pJW 3'in neu) amplifiziert.

Alle Erste- und Zweite-Runde-Amplifikationen wurden in einem 50 µl Reaktionsvolumen durchgeführt, mit 2,5 mM  $MgCl_2$ , 10 mM Tris (pH 8,3), 50 mM KCl, 200 µM dNTP, 1,25 U Taq Gold Polymerase (bei der gB-PCR 1,25 U AmpliTaq Polymerase) sowie 25 pmol eines jeden Primers. Als Template wurde 1 µg DNA eingesetzt, bei geringen DNA-Konzentrationen max. 20 µl. Die DNA war mit dem Qiagen Tissue Kit aus Mäuseorganen aufgearbeitet worden (siehe Kap. 2.6.2) und wurde vor Einsatz in die PCR mit dem Restriktionsenzym BamH I verdaut (siehe Kap. 2.6.5). Für die zweite Runde wurden 2 µl des Erste-Runde-Amplifikats überpipettiert. Die PCRs wurden in einem Gene Amp 9600 Thermocycler der Firma Perkin Elmer durchgeführt, die Amplifikation erfolgte mit einem klassischen 3-Schritt-Programm (siehe Kap. 2.7.1). Die Annealing-Temperaturen richteten sich nach den für die jeweiligen Primer optimalen Bedingungen und können aus Tabelle 2.5 ersehen werden:

Tabelle 2.5: Primer zum Nachweis von Plasmid-DNA in den Organen immunisierter Mäuse und deren Nachkommen

Primer	Primersequenz	Position <sup>1</sup>	AT [°C]
5'pp65 210	5' GTACTTTACGGGCAGCGA 3'	210 - 226	60
3'pp65 740	5' TCATCGTCAGGTCCTCTTC 3'	720 - 738	60
5'pp65 310	5' TACGCGCTGCCGCTCAA 3'	310 - 325	60
3'pp65 675	5' ACGTCCTCGCAGAAGGACT 3'	655 - 673	60
gH-Nr5-5'	5' CGGTCGTCAGGGAAAACGC 3'	208 - 227	65
gH-Nr8-3'	5' GCGGCGTCRAGAAAGTCCG 3'	886 - 904	65
gH-Nr6-5'	5' CCGATCTTTTTTCGCAGCAGC 3'	407 - 427	65
gH-Nr7-3'	5' AGCAGCATGGGTGTGTCGTCG 3'	725 - 745	65
gB 1319	5' TGGAAYTSGAACGTTTGGC 3'	1319 - 1337	59
gB Ci 3'	5' TAAGCCTGCTCGTTGGTGTA 3'	2515 - 2534	59
AD1-5'	5' GGACGCTGCTACTCACGACC 3'	1708 - 1727	68
AD1-3'	5' GGGTCGACTACCTTGTCCTCC 3'	2085 - 2105	68
pJW 5'out neu	5' TTCCATTGACGTCAATGGGTGGA 3'		70
pJW 3'out neu	5' AGTCCCGTTGATTTTGGTGCCA 3'		70
pJW 5'out	5' GGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCC 3'		70
pJW 3'in neu	5' CCATTGACGTCAATGGGGTGGAGAC 3'		70

1: 1= erste Base des pp65, gH oder gB Startcodons vom HCMV-Stamm AD169 (EMBL Nukleotid-Datenbank Accession-No. X17403)

Material: 25 mM Magnesiumchlorid MgCl<sub>2</sub> (Perkin Elmer, Weiterstadt)  
 PCR-Puffer (10x): 0,1 M Tris (pH 8,3), 0,5 M KCl (Perkin Elmer, Weiterstadt)  
 dNTP (Pharmacia, Freiburg)  
 AmpliTaq Gold Polymerase (Perkin Elmer, Weiterstadt)  
 AmpliTaq DNAPolymerase (Perkin Elmer, Weiterstadt)

### Quantitative PCR

Der quantitative Nachweis von Plasmid-DNA in den Organen DNA immunisierter Mäuse wurde mit einer Real-Time PCR basierend auf der TaqMan™-Chemie durchgeführt. Das Amplicon lag innerhalb des CMV-IE-Promoter/Enhancer Elements des Vektors. Es wurden folgende Primer und Sonde benutzt: Primer TMpJWfw 5'ACTTGGAATCCCCGTGAGTC3', Primer TMpJWrev 5'CATGGTGATGCGGTTTTGG3', Sonde TMpJWprobe 5' 6FAM AACCGCTATCCACGCCCATTTGGT Dabcyl.

Die TaqMan™-PCR wurde in einem 50 µl Reaktionsvolumen durchgeführt, mit 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris, 0.01 mM EDTA, 50 mM KCl, 0.05% Gelatine, 0.01% Tween 20, 200 µM dNTP, 2 µM Rox, 1,25 U Taq Gold Polymerase, 15 pmol eines jeden Primers sowie 5 pmol Sonde. Als Template wurde 1 µg DNA eingesetzt, bei geringen DNA-Konzentrationen max. 20 µl. Die DNA war mit dem Qiagen Tissue Kit aus Mäuseorganen aufgearbeitet worden (siehe Kap. 2.6.2) und wurde vor Einsatz in die PCR mit dem Restriktionsenzym BamH I verdaut (siehe Kap. 2.6.5). Die PCR wurde in einem ABI Prism 7700 Sequence Detector der Firma Perkin Elmer durchgeführt. Die Amplifikation erfolgte mit einem 3-Schritt-Programm, die Schritte 1. bis 3. wurden 40x wiederholt.

1. 1 min	95°C	Denaturierung
2. 1 min	66°C	Annealing
3. 1 min	72°C	Elongation

Material: 25 mM Magnesiumchlorid MgCl<sub>2</sub> (Perkin Elmer, Weiterstadt)  
 PCR-Puffer (10x): 0,1 M Tris (pH 8,3), 0.1 mM EDTA, 0,5 M KCl, 0.5% Gelatine,  
 0.1% Tween 20 (Perkin Elmer, Weiterstadt)  
 dNTP (Pharmacia, Freiburg)  
 AmpliTaq Gold Polymerase (Perkin Elmer, Weiterstadt)  
 Rox (Molecular Probes, Leiden, Niederlande)

### 2.7.6 Aufreinigung von Amplifikaten nach PCR

Eine Aufreinigung von PCR-Amplifikaten erfolgte mit dem QIAquick PCR Purification Kit der Firma Qiagen. Die Methode basiert auf der Bindung von DNA an eine Silica-Gel-Membran.

Der PCR-Reaktionsansatz wurde mit dem fünffachen Volumen an Puffer PB vermischt und auf die QIAquick-Säule gegeben. Die Probe wurde durchzentrifugiert (20800 x g, 1 min) und die nun an der Silica gebundene DNA wurde zweimal mit Puffer PE gewaschen. Die DNA wurde anschließend in 50 µl Puffer EB eluiert.

Material: Qiagen Puffer PB, PE und EB

## 2.8 Antigen-Nachweis

### 2.8.1 Proteinnachweis mittels indirektem Immunfluoreszenztest (IFT)

Zum Nachweis von HCMV-Protein in transfizierten 293-Zellen oder D2-Zellen (siehe Kap. 2.6.11) wurde ein indirekter Immunfluoreszenztest (IFT) durchgeführt. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen abtrypsiniert, zweimal mit PBS gewaschen und anschließend fixiert. Hierzu wurden die Zellen in Aceton/Methanol (Verhältnis 1:1) aufgenommen, 10 min auf Eis inkubiert und nochmals zweimal mit PBS gewaschen. Die Konzentration wurde auf  $2 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt, je 100  $\mu$ l ( $2 \times 10^5$  Zellen) wurden auf einen Objektträger mit einer Zytocentrifuge (3 min, 900 rpm) aufzentrifugiert. Die Objektträger wurden an der Luft getrocknet und angefärbt. Zum Nachweis von pp65 wurde der HCMV-pp65-spezifische monoklonale Antikörper der Firma Argene-Biosoft (1:10 Verdünnung) verwendet, der Nachweis von gH erfolgte mit Hilfe eines HCMV-positiven Humanserums (1:40 Verdünnung) und der Nachweis von gB wurde mit dem HCMV-gB-spezifischen monoklonalen Antikörper 58-15-18 (1:2 Verdünnung) erbracht. Jeweils 50  $\mu$ l Erstantikörper wurden auf die Zellen aufgetropft und die Objektträger 30 min bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Objektträger wurden anschließend für 10 min in PBS gewaschen. Dann wurden 40  $\mu$ l eines Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) markierten Anti-Maus-IgG+IgM Zweitantikörpers in einer Verdünnung von 1:100 in PBS/ 0,01% Evansblau aufgetropft, zum Nachweis von gH wurde Anti-Human-IgG-FITC verwendet. Eine zweite Inkubation bei 37°C für 30 min erfolgte. Hiernach wurden die Objektträger in PBS gewaschen, die angefärbten Zellen mit Elvanol übertropft und eingedeckelt. Die Objektträger wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

Material: Aceton/Methanol (Verhältnis 1:1)  
Anti-HCMV pp65 mAk (Argene-Biosoft)  
HCMV positives Humanserum  
mAK 58-15-18 (von M. Mach, Institut für Klinische und Molekulare Virologie, Erlangen zur Verfügung gestellt)  
Fab2 Anti-Maus-IgG+IgM-FITC (Argene-Biosoft)  
Anti-Human-IgG-FITC (Sigma, Steinheim)  
PBS: 8 g NaCl, 2898 mg Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 200 mg KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 200 mg KCl, ad 1 l H<sub>2</sub>O, pH 7,4  
Evansblau (Sigma, Steinheim)  
Elvanol

### 2.8.2 HBsAg ELISA

Zum Nachweis des Oberflächenantigens von Hepatitis B (HBsAg) in Organen DNA-immunisierter Mäuse wurde der HBsAg-spezifische ELISA MONOLISA® Ag HBs PLUS der Firma Bio-Rad verwendet. Hierbei handelt es sich um einen Einschritt-Enzymimmunoassay vom Typ „Sandwich“. Die Gewebeproben wurden in 1 ml Protein-Lysis-Puffer + Protease-Inhibitor aufgenommen und in der FastPrep-Maschine (30s, Stufe 5) mechanisch zerkleinert. Gewebetrümmer wurden abzentrifugiert (20800 x g, 10 min) und der Überstand wurde unverdünnt oder 1:2 verdünnt in den ELISA eingesetzt. Dazu wurden jeweils 100 µl Proben oder Kontrollen auf die Vertiefungen der ELISA-Platte verteilt. Als Negativkontrolle diente der Protein-Lysis-Puffer + Protease-Inhibitor, als Positivkontrolle wurde ein HBsAg-Standard vom Paul-Ehrlich-Institut (Langen) in den Verdünnungen 0,1 U/ml – 1 U/ml eingesetzt. In alle Vertiefungen wurde 50 µl Konjugatlösung (R6+R7) hinzugefügt und die Platte wurde zwei Stunden im Trockeninkubator bei 37°C inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit Waschlösung R2 wurde in jede Vertiefung 100 µl enzymatische Entwicklungslösung (R8+R9) gegeben und die Platte wurde 30 min bei RT inkubiert. Es erfolgte das Abstoppen der Entwicklungsreaktion durch Zugabe von 100 µl Stopplösung und die Auswertung im Photometer bei 450/620 nm. Der gesamte Test wurde auf einem ELISA-Prozessor BEP III (Dabe Behring, Schwalbach) durchgeführt.

Material: Protein-Lysis-Puffer: 25 mM Tris (pH7,4), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM KCl, 0,01% NP40  
10 ml Protein-Lysis-Puffer + 1 Tablette Complete, Mini, EDTA-free  
Protease-Inhibitor (Roche, Mannheim)  
MONOLISA® Ag HBs PLUS (Bio-Rad, München)

## 2.9 Immunisierung von Mäusen

Immunisierungen wurden vorwiegend in der Balb/c Maus (Haplotyp H-2<sup>d</sup>) durchgeführt. Kontrollimmunisierungen wurden jedoch auch in Mäusen des Stammes Black6 (Haplotyp H-2<sup>b</sup>) sowie C3H (Haplotyp H-2<sup>k</sup>) durchgeführt. Die Tiere wurden von der Firma Charles River (Sulzfeld) bezogen. Allen Arbeiten mit Mäusen lagen die Genehmigungen der Tierversuchsvorhaben AZ 37/9185.81/1/104.1 und AZ 35/9185.81/1/442.1 zu Grunde.

DNA-Immunsierungen wurden in 4-6 Wochen alten Mäusen durchgeführt, mit Ausnahme eines Experimentes wurden ausschließlich weibliche Mäuse verwendet. Pro Versuchsansatz wurden mindestens drei Tiere immunisiert. Pro Immunisierungszeitpunkt erhielten die Tiere 100 µg DNA in einem Volumen von 100 µl. Wenn mit einem Plasmidcocktail bestehend aus verschiedenen Plasmiden immunisiert wurde, wurden pro Plasmid jeweils 100 µg DNA in einem Gesamtvolumen von 100 µl verabreicht.

Es wurden verschiedene DNA-Immunsierungsstrategien angewandt und miteinander verglichen; so zum Beispiel DNA-Immunsierung i.m. mit und ohne Adjuvans, DNA-Immunsierung i.m. in verschiedenen Mausstämmen, DNA-Immunsierung i.c., DNA-Immunsierung i.n. oder auch DNA-Immunsierung in sich fortpflanzenden Tieren. In Kapitel 2.9.1 bis 2.9.4 werden diese einzelnen DNA-Immunsierungsprotokolle genau beschrieben. Eine vollständige Übersicht über alle DNA-Immunsierungen ist in den Tabellen A.1 und A.2 (siehe Anhang) zusammengefaßt.

Nach den DNA-Immunsierungen wurde den Mäusen in regelmäßigen Abständen Blut aus der Schwanzvene oder aus dem retroorbitalen Plexus abgenommen. Das Serum wurde mit IFT (Kap. 2.10.1) auf HCMV-spezifische Antikörper untersucht. Frühestens sechs Wochen nach der letzten DNA-Immunsierung wurden die Mäuse getötet und die Organe (Blut, Leber, Lunge, Niere, Milz, Thymus, Speicheldrüse, Gehirn, Darm, Ovarien, Knochenmark, Lymphgewebe links, Quadriceps links, Lymphgewebe rechts und Quadriceps rechts) entnommen. Die DNA wurde aus den Organen aufgereinigt und in eine HCMV- oder Expressionsvektor-spezifische PCR eingesetzt (Kap. 2.7.5), um Plasmid DNA nachzuweisen. Bei Mäusen, die mit dem Vektor pJW4303pp65 immunisiert waren, wurden aus der Milz die Lymphozyten herausgereinigt und mit einem <sup>51</sup>Cr-Freisetzungs-Assay (siehe Kap. 2.11) auf eine HCMVpp65-spezifische CTL-Antwort hin untersucht.

Um ein HCMV-positives polyklonales Mausserum als Positivkontrolle zu bekommen wurden Mäuse mehrmals subkutan mit einem Zell-Lysat HCMV infizierter HFF-Zellen immunisiert. In Kapitel 2.9.5 wird auf dieses Immunisierungsprotokoll genauer eingegangen.

### 2.9.1 DNA-Immunsierung intramuskulär (i.m.)

Mäuse wurden dreimal mit verschiedenen Vektoren oder Vektorgemischen (siehe Anhang, Tabelle A1, Experiment-Nr. 1-21) intramuskulär immunisiert. Dabei wurden jeweils 100 µl Plasmid-DNA in PBS (100 µg bei Immunisierungen mit nur einem Vektor, jeweils 100 µg pro Vektor bei Immunisierungen mit einem Vektorgemisch) in den rechten oberen Quadriceps injiziert.

Um die Immunantwort in den i.m. immunisierten Tieren zu verstärken wurden bei einigen Immunisierungsansätzen Adjuvantien eingesetzt. Bei dem Adjuvans Bupivacaine handelt es sich um ein Lokalanesthetikum, das gleichzeitig myotoxisch wirkt. Durch die im Muskelgewebe ausgelöste Entzündungsreaktion werden Makrophagen und andere antigenpräsentierende Zellen an den Ort der Immunisierung gelockt. Tiere wurden dreimal innerhalb von drei Wochen (Tag 0, Tag 7 und Tag 21) intramuskulär immunisiert (s.o.), jeweils fünf Tage vor den Immunisierungen wurde 100 µl 0,25 % Bupivacain in den rechten oberen Quadriceps (Immunisierungsstelle) injiziert.

Bei dem Adjuvans Adju-Phos (ALU) handelt es sich um ein Aluminium-Phosphat-Gel. Dieses Adjuvans besitzt die Eigenschaft Antigene auf seiner Oberfläche zu adsorbieren. Tiere wurden dreimal innerhalb von elf Wochen (Woche 0, Woche 5 und Woche 11) mit einem Gemisch aus DNA und Adju-Phos (1 µg/µl Plasmid DNA, 0,045% Adju-Phos in PBS) i.m. immunisiert. Pro Immunisierung wurden 100 µl des DNA/Adju-Phos Gemisches verabreicht.

Material:           Bupivacaine (Sigma, Deisenhofen)  
                      Adju-Phos (HCl Biosector, Frederikssund, Dänemark)  
                      PBS: 8 g NaCl, 2898 mg Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 200 mg KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 200 mg KCl, ad 1 l H<sub>2</sub>O, pH 7,4

### 2.9.2 DNA-Immunsierung intrakutan (i.c.)

Mäuse wurden dreimal innerhalb von drei Wochen (Tag 0, Tag 7 und Tag 21) intrakutan (i.c.) mit dem Vektorgemisch pJW4303pp65 + pJW4303gB1 + pJW4303gB2 + pJW4303gB3 + pJW4303gB4 immunisiert (siehe Anhang, Tabelle A1, Experiment-Nr. 22). Es wurden 100 µg jedes Vektors in einem Gesamtvolumen von 100 µl PBS intrakutan appliziert. Der Impfstoff wurde an drei verschiedenen Stellen auf dem Rücken der Tiere injiziert.



Material: PBS: 8 g NaCl, 2898 mg Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 200 mg KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 200 mg KCl, ad 1 l H<sub>2</sub>O, pH 7,4

### 2.9.3 DNA-Immunisierung intranasal (i.n.)

Mäuse wurden dreimal innerhalb von drei Wochen (Tag 0, Tag 7 und Tag 21) mit den Vektoren VR1055Ø und VR1055gB1ΔTM intranasal (i.n.) immunisiert (siehe Anhang, Tabelle A1, Experiment-Nr. 23 und 24). Die Plasmid DNA wurde zusammen mit dem Tranfektionsreagenz Vaxfectin als DNA/Lipid-Komplex (1 µg/µl Plasmid DNA, 0.75 mM Vaxfectin in H<sub>2</sub>O) in einem Gesamtvolumen von 100 µl appliziert. Dazu wurde die DNA Lösung tropfenweise auf die Nase aufgetragen und von der Maus durch Inhalation aufgenommen.

Material: Vaxfectin (Vical Inc., San Diego, USA)

### 2.9.4 Intramuskuläre DNA-Immunisierung in sich fortpflanzenden Mäusen

Um die Übertragung von Plasmid-DNA auf Nachkommen DNA-immunisierter Tiere zu untersuchen, wurden sich fortpflanzende Tiere immunisiert. Die Immunisierungen wurden ausschließlich in Balb/c Mäusen durchgeführt, pro Immunisierung wurde den Tieren das Vektorgemisch pJW4303gH1 + pJW4303gL (jeweils 100 µg in 100µl PBS) intramuskulär in den rechten oberen Quadriceps injiziert. Dabei wurden drei verschiedene Versuchsansätze gewählt, die in Tabelle A2 (siehe Anhang) zusammengefaßt sind.

Material: PBS: 8 g NaCl, 2898 mg Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 200 mg KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 200 mg KCl, ad 1 l H<sub>2</sub>O, pH 7,4

### DNA-Immunisierung trächtiger Weibchen

Insgesamt sechs weibliche Balb/c Mäuse wurden angepaart. Trächtige Tiere wurden zweimal (Tag 7 und Tag 21 nach Anpaarung) intramuskulär immunisiert (siehe Anhang, Tabelle A2, Experiment-Nr. 25).

Bei drei Mäusen wurden kurz vor der Geburt die Feten entnommen, bei den restlichen drei Mäusen wurden die Nachkommen einen Tag nach der Geburt bzw. fünf Wochen nach der

Geburt untersucht. DNA wurde aus den Mäusen bzw. aus einzelnen Mäuseorganen aufgearbeitet und mittels HCMV gH-spezifischer PCR auf Plasmid-DNA untersucht.

### **DNA-Immunisierung von Weibchen vor Schwangerschaft**

Sechs weibliche Balb/c Mäuse wurden dreimal innerhalb von drei Wochen (Tag 0, Tag 7 und Tag 21) intramuskulär immunisiert. Sechs Wochen nach der letzten Immunisierung wurden die Weibchen angepaart (siehe Anhang, Tabelle A2, Experiment-Nr. 26).

Bei drei Mäusen wurden kurz vor der Geburt die Feten entnommen, bei den restlichen drei Mäusen wurden die Nachkommen einen Tag nach der Geburt bzw. fünf Wochen nach der Geburt untersucht. DNA wurde aus den Mäusen bzw. aus einzelnen Mäuseorganen aufgearbeitet und mittels HCMV gH-spezifischer PCR auf Plasmid-DNA untersucht.

### **DNA-Immunisierung von Männchen vor Anpaarung**

Drei männliche Balb/c Mäuse wurden dreimal innerhalb von drei Wochen (Tag 0, Tag 7 und Tag 21) intramuskulär immunisiert. Sechs Wochen nach der letzten Immunisierung wurden pro Männchen jeweils zwei Weibchen angepaart (siehe Anhang, Tabelle A2, Experiment-Nr. 27).

Die Nachkommen wurden einen Tag nach der Geburt bzw. fünf Wochen nach der Geburt untersucht. DNA wurde aus den Mäusen bzw. aus einzelnen Mäuseorganen aufgearbeitet und mittels HCMV gH-spezifischer PCR auf Plasmid-DNA untersucht.

## **2.9.5 Immunisierung von Mäusen mit einem Lysat HCMV-infizierter HFF-Zellen**

Um ein HCMV-positives polyklonales Mausserum als Positivkontrolle für einen Antikörpernachweis zu bekommen wurden fünf Balb/c Mäuse mehrmals subkutan mit einem Zell-Lysat HCMV-infizierter Zellen immunisiert. Humane Vorhaut-Fibroblasten (HFF-Zellen) wurden mit HCMV-Laborstamm AD169 (MOI=1) infiziert. Drei Wochen nach der Infektion wurden die Zellen geerntet, in PBS aufgenommen und mit Ultraschall lysiert. Für die Immunisierung wurden dreimal innerhalb von drei Wochen (Tag 0, Tag 7 und Tag 21) 40 µg Zell-Lysat zusammen mit 50 µg Lipopeptid-Adjuvans Pam<sub>3</sub>Cys vermischt und

subkutan in den Nacken der Tiere appliziert. Zwei Wochen nach der letzten Immunisierung wurde den Mäusen Blut aus der Schwanzvene abgenommen.

Material: PBS: 8 g NaCl, 2898 mg Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 200 mg KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 200 mg KCl, ad 1 l H<sub>2</sub>O, pH 7,4  
Pam<sub>3</sub>Cys (EMC, Tübingen)

## 2.10 Nachweis einer antigenspezifischen humoralen Immunantwort

### 2.10.1 Antikörpernachweis mittels indirektem Immunfluoreszenztest (IFT)

Zum Nachweis HCMV-spezifischer Antikörper in Seren immunisierter Mäuse wurde ein indirekter Immunfluoreszenztest (IFT) durchgeführt. Dazu wurden pJW4303pp65 transfizierte 293-Zellen, HCMV infizierte HFF-Zellen oder Baculovirus gB infizierte High5 Zellen mit verschiedenen Verdünnungen (1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640) des Maus-Serums angefärbt. Jeweils 50 µl Serumverdünnung wurden auf die Zellen aufgetropft. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C in einer feuchten Kammer wurden die Zellen in PBS gewaschen. Dann wurden 40 µl eines Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) markierten Anti-Maus-IgG+IgM Zweitantikörpers oder eines FITC-markierten Anti-Maus-IgA Zweitantikörpers in einer Verdünnung von 1:100 in PBS/0,01% Evansblau aufgetropft. Eine zweite Inkubation für 30 min erfolgte bei RT, anschließend konnte der IFT unter einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden.

Material: Fab2 Anti-Maus-IgG+IgM-FITC (Argene-Biosoft)  
Ratte-Anti-Maus-IgA-FITC (Pharmingen, Heidelberg)  
Evansblau (Sigma, Steinheim)  
PBS: 8 g NaCl, 2898 mg Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 200 mg KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 200 mg KCl, ad 1 l H<sub>2</sub>O, pH 7,4

### 2.10.2 Neutralisationstest

Um die Neutralisationskapazität HCMV gB positiver Mausseren zu bestimmen, wurden die Seren in einen Neutralisationstest eingesetzt. Da ein unbekannter Complement-unabhängiger Faktor in den Mausseren per se in der Lage war, HCMV zu neutralisieren, mußten die

Immunglobuline aus den Seren herausgereinigt werden. Hierzu wurden zuerst die Seren 30 min bei 20800 x g zentrifugiert, um jeglichen Zellschrott zu entfernen. Anschließend wurden 20 µl (55%) des Serumüberstandes mit 16,4 µl (45%) gesättigtem Ammoniumsulfat vermischt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Immunglobuline wurden für 30 min bei 20800 x g gefällt und anschließend in 20 µl PBS aufgenommen. Diese Immunglobuline wurden in Zellkulturmedium DMEM mit 10% Fötalem Kälberserum (FKS), 2mM Glutamin, Penicillin (100 IE/ml)/Streptomycin (0,1 mg/ml) verdünnt (50 µl, Verdünnung 1:20 – 1:1280) und mit  $4 \times 10^2$  HCMV-Viren vermischt. Bei dem verwendeten HCMV-Virus handelte es sich um das Virusisolat Nr. 7 (ON10), ein gB1 prototypisches Virus. Das Virus-Immunglobulin-Gemisch wurde vier Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend auf HFF-Zellen gegeben, die am Tag zuvor in einer 96-Well-Platte ( $2 \times 10^4$  Zellen/Well) ausgesät worden waren. Das Virus-Immunglobulin-Gemisch wurde 50 min bei 370 x g auf die Zellen aufzentrifugiert, anschließend wurde das Medium gewechselt und die Platten wurden für 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Aceton/Methanol fixiert und mit einem HCMV-IE-spezifischen Antikörper angefärbt (siehe Kap. 2.5.2). Virus-infizierte Zellen wurden ausgezählt und die Neutralisation (N) berechnet. Pro Serum und Immunglobulin-Verdünnung wurden jeweils zwei Wells ausgezählt. Für die Berechnung der Virusneutralisation wurde jeweils der Mittelwert verwendet. Als Referenz dienten Zellen, die mit Virus infiziert wurden, das nicht mit Immunglobulinen vermischt war ( $V_0$ ). Die Virusneutralisation errechnete sich wie folgt:

$$N [\%] = 100 - \frac{\text{Virus mit Immunglobulin [V]} * 100\%}{\text{Virus ohne Immunglobulin [V}_0\text{]}}$$

**Material:**

- Ammoniumsulfat gesättigt: 76g in 100 ml H<sub>2</sub>O (Sigma, Steinheim)
- PBS: 8 g NaCl, 2898 mg Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 200 mg KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 200 mg KCl, ad 1 l H<sub>2</sub>O, pH 7,4
- DMEM (CC-Pro, Neustadt)
- FKS (CC-Pro, Neustadt)
- Glutamin (Gibco BRL, Eggenstein)
- Penicillin 10000 IE/ml (Gibco BRL, Eggenstein)
- Streptomycin 10 mg/ml (Gibco BRL, Eggenstein)
- Aceton/Methanol (Verhältnis 1:1)
- Anti-HCMV I.E.A E13 (Argene-Biosoft)
- Rabbit-Anti-Mouse-FITC (Argene-Biosoft)
- Evansblau (Sigma, Steinheim)

## 2.11 Nachweis einer antigenspezifischen zellulären Immunantwort

Mäuse, die mit dem Expressionsvektor pJW4303pp65 immunisiert worden waren, wurden auf die Induktion einer antigenspezifischen zellulären Immunantwort hin untersucht. Dazu wurden die Milzzellen der immunisierten Tiere mit Antigen stimuliert, anschließend erfolgte der Nachweis von zytotoxischen T-Lymphozyten mittels  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungs-Assay.

### 2.11.1 *in-vitro*-Stimulation antigenspezifischer T-Zellen

#### Präparation der Effektorzellen

pJW4303pp65-immunisierten Mäusen wurde sechs Wochen nach der letzten Immunisierung die Milz entnommen und die Zellen daraus präpariert (Effektorzellen). Die Trennung vom Bindegewebe der Milz erfolgte mittels Filtern der Zellsuspension durch ein steriles Nylonnetz (Maschenweite 70  $\mu\text{m}$ ). Um die Erythrozyten zu lysieren, wurden die Zellen in einem 50 ml Tube für 5 min bei 1870 x g pelletiert und anschließend in 3 ml destilliertem Wasser resuspendiert. Nach 30 s Lyse erfolgte das Auffüllen der Zellsuspension mit 45 ml PBS. Die Zellen wurden wiederum pelletiert und in Zellkulturmedium RPMI mit 10% FKS, 2mM Glutamin, Penicillin (100 IE/ml)/Streptomycin (0,1 mg/ml) und 20 U/ml rekombinantem murinen IL-2 resuspendiert.

#### Präparation der Stimulatorzellen

Als Stimulatorzellen dienten Milzzellen naiver Mäuse. Die Zellen wurden auf gleiche Weise wie die Effektorzellen präpariert und aufgereinigt. Um die naiven Milzzellen mit Antigen zu beladen wurden sie mit Vaccinia Virus infiziert oder mit verschiedenen Peptiden inkubiert. Die Infektion der naiven Milzzellen mit den rekombinanten Vaccinia Viren VVpp65 und VVM2 erfolgte mit einer MOI von eins. Nach zweistündiger Inkubation bei 37°C auf dem Schüttler und anschließendem zweimaligen Waschen mit PBS wurden die Zellen in Zellkulturmedium RPMI mit 10% FKS, 2mM Glutamin, Penicillin (100 IE/ml)/Streptomycin (0,1 mg/ml) und 20 U/ml rekombinantem murinen IL-2 resuspendiert. Für die Beladung mit Peptid wurden die Zellen einer halben Milz in 1 ml Peptidlösung ( $10^{-5}\text{M}$  in RPMI, 10% FKS, 2mM Glutamin, Penicillin (100 IE/ml)/Streptomycin (0,1 mg/ml)) resuspendiert und eine

Stunde bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und anschließend in Zellkulturmedium RPMI mit 10% FKS, 2mM Glutamin, Penicillin (100 IE/ml)/ Streptomycin (0,1 mg/ml) und 20 U/ml rekombinantem murinen IL-2 resuspendiert. Die pp65-spezifischen Peptide wurden mit Hilfe der Datenbank SYFPEITHI (Rammensee *et al.*, 1999) ausgewählt. SYFPEITHI erlaubt die Vorhersage von T-Zell-Epitopen für MHC-Klasse-I-Allele, indem es eine Wertung vornimmt, die die Aminosäuren an den Ankerpositionen und andere häufige Aminosäuren berücksichtigt. Je höher die Punktzahl bei der Bewertung, desto wahrscheinlicher ist eine korrekte Vorhersage. Es wurden insgesamt elf verschiedene pp65-spezifische Peptide ausgewählt und als Antigene in den CTL-Assay eingesetzt. Die Peptide sind in Tabelle 2.9 aufgelistet.

Das RSV M2-spezifische Peptid p82 (SYIGSINNI, H-2Kd) wurde uns freundlicherweise von Stephan Ehl (Kinderklinik, Universität Freiburg) zur Verfügung gestellt.

### ***in-vitro*-Stimulation**

Die *in-vitro*-Stimulation fand in 24-Well Platten statt.  $5 \times 10^6$  Effektorzellen (1 ml) wurden mit  $2 \times 10^6$  Stimulatorzellen (1 ml) pro Well vermischt und fünf Tage bei 37°C und unter 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Das Verhältnis von Effektorzellen zu Stimulatorzellen (E:S) betrug somit 4:1.

Tabelle 2.9 : mögliche HCMV pp65-spezifische T-Zell-Epitope

Peptidname	Peptidsequenz	MHC-Klasse-I-Allel	Bewertung
pp65/1	DPVAALFFF	H2-Ld	24
pp65/2	VYALPLKML	H2-Kd	22
pp65/3	KYQEFFWDA	H2-Kd	19
pp65/4	VFSRGDTPV	H2-Kd	18
pp65/5	WPPWQAGIL	H2-Ld	21
pp65/6	TSHEHFGLL	H2-Ld	20
pp65/7	FSRGDTPVL	H2-Ld	19
pp65/8	KPGKISHIM	H2-Ld	18
pp65/9	LSISGNLLM	H2-Ld	18
pp65/10	CPSQEPMSI	H2-Ld	17
pp65/11	LGPISGHVL	H2-Ld	15

Material: Nylonnetz, Maschenweite 70  $\mu\text{m}$  (Becton Dickinson, Heidelberg)  
PBS: 8 g NaCl, 2898 mg  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 200 mg  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 200 mg KCl, ad 1 l  $\text{H}_2\text{O}$ , pH 7,4  
RPMI (CC-Pro, Neustadt)  
FKS (CC-Pro, Neustadt)  
Glutamin (Gibco BRL, Eggenstein)  
Penicillin 10000 IE/ml (Gibco BRL, Eggenstein)  
Streptomycin 10 mg/ml (Gibco BRL, Eggenstein)  
pp65-spezifische Peptide (Dept. of Immunohaematology and Blood Transfusion,  
Leiden University Medical Center, Leiden, Niederlande)  
rekombinantes murines IL-2 (Sigma, Deisenhofen)

### 2.11.2 Nachweis einer antigenspezifischen T-Zell Antwort mittels $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungs-Assay

Mit dem  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungs-Assay wurde die Aktivität HCMV-spezifischer zytotoxischer T-Zellen in DNA-immunisierten Mäusen bestimmt.

#### Präparation der Zielzellen

Als Zielzellen dienten P815-Zellen (Zelllinie, Maus Haplotyp H-2<sup>d</sup> Mastocytoma), die mit  $^{51}\text{Cr}$  markiert worden waren. Dazu wurden  $2 \times 10^6$  P815-Zellen in 200  $\mu\text{l}$  Zellkulturmedium RPMI mit 10% FKS, 2mM Glutamin, Penicillin (100 IE/ml)/Streptomycin (0,1 mg/ml) und 200  $\mu\text{Ci}$   $^{51}\text{Cr}$  bei 37°C und unter 5%  $\text{CO}_2$  auf einem Schüttler inkubiert. Nach zwei Stunden wurden die Zellen dreimal mit RPMI gewaschen. Um die Zielzellen mit dem spezifischen Antigen zu bestücken, wurden sie entweder zeitgleich mit der  $^{51}\text{Cr}$ -Markierung mit Peptid ( $10^{-5}\text{M}$  in RPMI, 10% FKS, 2mM Glutamin, Penicillin (100 IE/ml)/Streptomycin (0,1 mg/ml)) beladen, oder sie wurden nach der  $^{51}\text{Cr}$ -Markierung für vier Stunden mit einem Vaccinia Virus (MOI=10) infiziert und nochmals zweimal gewaschen. Die Zellzahl der Zielzellen wurde auf  $5 \times 10^4/\text{ml}$  eingestellt.

Für die Beladung mit Antigen wurden die HCMV-spezifischen Peptide pp65/1 – pp65/11 sowie das RSV M2-spezifische Peptid p82 verwendet (siehe Kap. 2.11.1). Infektionen wurden mit dem rekombinanten Vaccinia Virus pp65 sowie mit dem Wildtyp Vaccinia Virus WR (Negativkontrolle) durchgeführt.

### Präparation der Effektorzellen

Fünf Tage nach der *in-vitro*-Stimulation (siehe Kap. 2.11.1) wurden die Effektorzellen geerntet und gezählt. Die Zellzahl wurde auf  $5 \times 10^6/\text{ml}$  in RPMI, 10% FKS, 2mM Glutamin, Penicillin (100 IE/ml)/Streptomycin (0,1 mg/ml) eingestellt. Es folgte die Ausverdünnung der Zellen über sechs Stufen (100/1; 33/1; 11/1; 3,7/1; 1,2/1; 0,4/1) in einer 96-Well-Rundbodenplatte. Das Volumen wurde auf 100 $\mu\text{l}$  pro Well eingestellt. Die Verdünnungen wurden jeweils im Duplikat angesetzt.

### <sup>51</sup>Cr-Freisetzungs-Assay

Die Effektorzellen wurden jeweils gegen HCMV pp65-spezifische Zielzellen (pp65-Peptid-beladen oder VVpp65 infiziert) oder gegen unspezifische Zielzellen (p82-Peptid-beladen oder VV WR infiziert) getestet. Zu den vorgelegten Effektorzellen wurden 100  $\mu\text{l}$  Zielzellen pro Well mit einer Konzentration von  $5 \times 10^4/\text{ml}$  hinzugegeben. Die Platte wurde für 2 Minuten bei 370 x g zentrifugiert, um die Zellen in engen Kontakt zu bringen. Zur Bestimmung der spontanen und der maximalen Freisetzung von <sup>51</sup>Cr aus den Zielzellen wurden Triplikate der Zielzellen mit 100  $\mu\text{l}$  Medium bzw. 100  $\mu\text{l}$  2 M HCl anstelle von Effektorzellen inkubiert. Die Inkubationszeit betrug fünf Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Es wurden anschließend 70  $\mu\text{l}$  des Überstandes abpipettiert und die dorthin freigesetzte Radioaktivität in einem  $\gamma$ -Strahler-Zähler gemessen. Die spezifische <sup>51</sup>Cr-Freisetzung (spezifische Lyse [%]) wurde nach Ermittlung der Mittelwerte der angesetzten Duplikate mit der folgenden Formel berechnet:

$$\text{spezifische Lyse [\%]} = \frac{(\text{cpmE} - \text{cpmS}) \times 100}{(\text{cpmT} - \text{cpmS})}$$

cpmE = counts per minute mit Effektorzellen

cpmS = counts per minute der Spontanfreisetzung (mit Medium)

cpmT = counts per minute der Totalfreisetzung (mit 2 M HCl)



## 3 Ergebnisse

### 3.1 Variabilität der Glykoproteine gB und gH

Die Glykoproteine gB und gH des HCMV sind Hauptziele der humoralen Immunantwort im infizierten Menschen und daher für die Konstruktion der DNA-Vakzine-Vektoren von zentraler Bedeutung. Um die klinische Relevanz der vier verschiedenen gB-Genotypen bzw. der zwei verschiedenen gH-Genotypen (siehe Kap. 1.1.3) zu ermitteln, wurden klinische Isolate und Nativmaterialien auf ihren gB- bzw. gH-Genotyp hin untersucht. Dabei handelte es sich um Proben virämischer Patienten. Zusätzlich wurden verschiedene Organe HCMV-seropositiver immunkompetenter Individuen untersucht. Durch die Genotypisierung sollte die Frage beantwortet werden, ob die genetische Variabilität der HCMV-Glykoproteine in Patientenisolaten und in Nativmaterialien limitiert ist, und wenn ja, wieviele Varianten existieren.

#### 3.1.1 gB- und gH-Variabilität in klinischen Isolaten

Es wurden die gB- und gH-Genotypen von insgesamt 23 klinischen Isolaten untersucht. Die HCMV-Stämme wurden aus Blut-, Urin- und Broncheallavage-Proben isoliert, die bei der routinemäßigen Überwachung immunsupprimierter Patienten mit aktiver HCMV Infektion (Knochenmark-, Nieren-, Herz- und Lebertransplantierte, konnatal infizierte Kinder, autoimmunerkrankte Patienten) abgenommen wurden.

DNA wurde aus den Überständen HCMV infizierter HFF-Zellen mit Hilfe des QIAamp Blood Kits aufgearbeitet und mittels PCR wurden verschiedene variable Bereiche des HCMV gB Gens (N-term und Cleavage-site) sowie des HCMV gH Gens (CV1, CV2 und CV3) amplifiziert. Eine Typisierung der gB-Gene an der Cleavage-site sowie der gH Gene in der CV1 Regionen erfolgte durch den Restriktionsverdau der gewonnenen Amplifikate. Anhand des entstandenen Bandenmusters ließ sich die Zugehörigkeit zu dem jeweiligen gB- oder gH-Genotypen ermitteln (siehe Abb. 3.3). Die DNA-Sequenzen der gB Gene am N-term sowie der gH Gene in den Bereichen CV2 und CV3 wurden sequenziert.

Bei allen Isolaten konnte der gB- und gH-Genotyp eindeutig bestimmt werden. Die Ergebnisse der Genotypisierung sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

Tabelle 3.1: Verteilung von gB- und gH-Genotypen in klinischen Isolaten

Nr.	Isolat Nr.	gB-Genotyp		gH Genotyp		
		N-term	Cls	CV1	CV2	CV3
1.	14983	1	1	1	1	1
2.	212828	1	1	2	2	2
3.	P143	1	1	2	2→1	1
4.	210619	1	1	2	2	2
5.	212216	1	1	2	2	2
6.	214820	1	1	2	2	2
7.	ON10	1	1	1	2	2
8.	273535	1	1	1	1	1
9.	TB34-02	2	2	1	1	1
10.	209685	3	2	2	2	2
11.	244186	3	2	1	1	1
12.	215769	3	2	2	2	2
13.	TB49	3	2	2	2	2
14.	5210	3	2	2	2	2
15.	258410	3	2	1	1	1
16.	264601	3	3	2	2	2
17.	258706	4	3	2	2→1	1
18.	252492	4	3	1	1	1
19.	AA07	4	3	1	1	1
20.	283588	4	4	1	1	1
21.	236154	4	4	1	1	1
22.	262430	4	4	1	1	1
23.	ZG251	1→4/2	4	2	2	2

→ Genotyp-Wechsel innerhalb der sequenzierten Region, grau hinterlegte Zellen markieren intragenische Variabilität

Mit Hilfe der gB-Genotypisierung wurde in 56% der Isolate in beiden untersuchten Regionen ein konstanter gB-Typ (Prototyp) ermittelt. Acht von 23 Isolaten (35%) waren prototypisch gB1, eines von 23 Isolaten (4%) war prototypisch gB2, eines von 23 Isolaten (4%) war prototypisch gB3 und drei von 23 Isolaten (13%) waren prototypisch gB4. Bei 10 von 23 Isolaten (43%) konnte eine intragenische Variabilität festgestellt werden. Bei einem dieser 10 Isolate (Nr. 23) fand der gB-Genotyp-Wechsel innerhalb der sequenzierten Region statt. Die

gB-Sequenz dieses Isolates war prototypisch gB1 und wechselte ab AS 50 erst zu einem gB4- und anschließend zu einem gB2-Genotyp. Die Nukleotidhomologie der klinischen Isolate in der N-terminalen Region des gB lag bei 79–100%. Die HCMV-Stamm-Variabilität der klinischen Isolate in diesem Genbereich ist als phylogenetischer Baum in Abbildung 3.1 dargestellt.

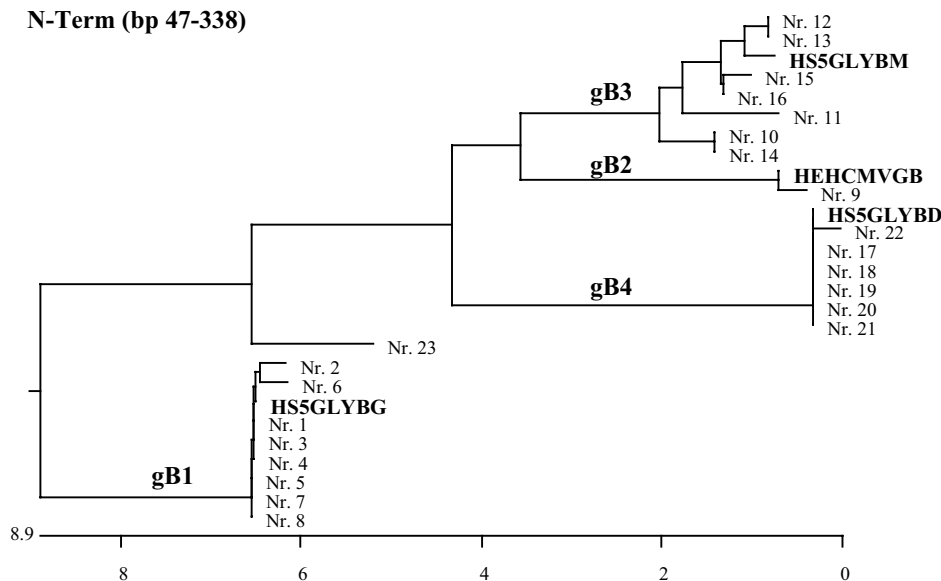


Abb. 3.1: Phylogenetischer Baum der N-terminalen Region des HCMV-gB

Virus-Stämme in den unterschiedlichen Gruppen hatten mindestens elf konservierte Aminosäure-Unterschiede in der jeweiligen sequenzierten Region. Die HCMV-Isolate HS5GLYBG (EMBL Accession-No. M60929), HEHCMVGB (EMBL Accession-No. X04606), HS5GLYBM (EMBL Accession-No. M85228) und HS5GLYBD (EMBL Accession-No. M60926) wurden als Prototypen mit dargestellt.

Auf der Abszisse ist die prozentuale Divergenz der Sequenzen aufgetragen. Sequenzdaten wurden in der EMBL Nukleotid-Datenbank unter Accession-Nos. AJ236805 – AJ236832 hinterlegt.

Durch die gH-Genotypisierung konnte in 87% der Isolate ein konstanter gH-Typ (Prototyp) in allen drei Genregionen ermittelt werden. Die beiden gH-Typen kamen gleichhäufig vor, jeweils 10 von 23 Isolaten (43%) waren prototypisch gH1 und gH2. Eine intragenische Variabilität konnte bei drei von 23 Isolaten (13%) festgestellt werden. Bei zwei von diesen drei Isolaten (Nr. 3 und Nr. 17) fand der gH-Genotyp-Wechsel innerhalb der sequenzierten Region statt und konnte auf den gH-Genbereich zwischen AS 28 und 32 lokalisiert werden.

Die Nukleotidhomologie der klinischen Isolate in den Genregionen CV2 und CV3 lag bei 95-96%. Die HCMV-Stamm-Variabilitäten des gH in diesen Regionen sind als phylogenetische Bäume in Abbildung 3.2 dargestellt.

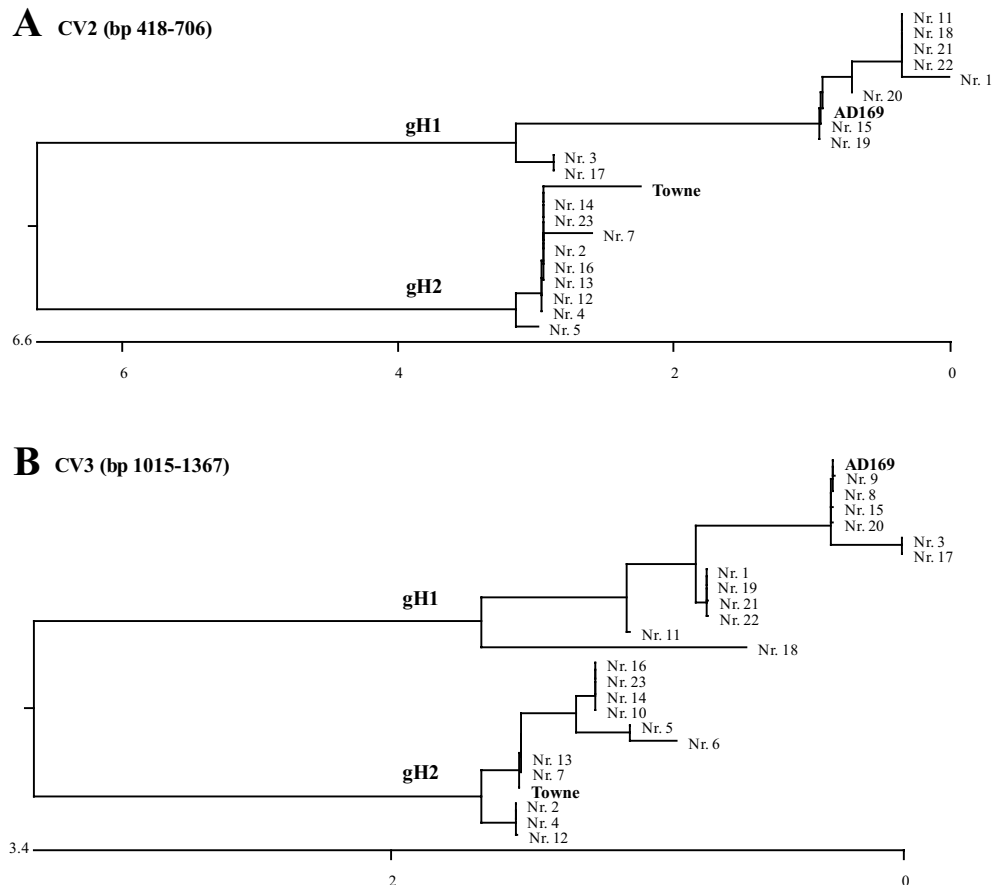


Abb. 3.2: Phylogenetische Bäume der (A) CV2- und (B) CV3-Region des HCMV-gH

Virus-Stämme in den unterschiedlichen Gruppen hatten mindestens fünf konservierte Aminosäure-Unterschiede in der jeweiligen sequenzierten Region. Die HCMV-Laborstämme AD169 (EMBL Accession-No. X17403) und Towne (EMBL Accession-No. M22343) wurden als Prototypen mit dargestellt.

Auf der Abszisse ist die prozentuale Divergenz der Sequenzen aufgetragen. Sequenzdaten wurden in der EMBL Nukleotid-Datenbank unter Accession-Nos. AJ239005 – AJ239020 hinterlegt.

### 3.1.2 gB- und gH-Variabilität in Nativmaterialien virämischer Patienten

Zusätzlich zu den gB- und gH-Typisierungen von klinischen Isolaten, wurde eine Typisierung direkt aus Nativmaterialien virämischer Patienten vorgenommen. Dadurch sollte sichergestellt

werden, daß es sich bei den oben gezeigten Ergebnissen nicht um Artefakte handelte, die durch die Kultivierung der HCMV-Stämme generiert wurden.

Es wurden die gB- und gH-Genotypen von insgesamt 13 Patienten untersucht. Bei diesen Patienten handelte es sich um kongenital oder perinatal infizierte Neugeborene sowie um immunsupprimierte Transplantierte. Die Typisierung erfolgte direkt aus dem Urin oder aus PBL der Patienten.

DNA wurde aus den jeweiligen Materialien mit Hilfe des QIAamp Blood Kits aufgearbeitet und mittels einer PCR wurden verschiedene variable Bereiche des HCMV gB Gens sowie des HCMV gH Gens amplifiziert. Bei dem gB handelte es sich hier um den N-terminalen Bereich des Gens sowie um die Cleavage-site-Region. Aus dem gH-Gen wurden die Bereiche CV1, CV2 und CV3 amplifiziert. Eine Typisierung der gB und gH Gene in diesen Regionen erfolgte durch den Restriktionsverdau der gewonnenen Amplifikate. Anhand des entstandenen Bandenmusters ließ sich die Zugehörigkeit zu dem jeweiligen gB- und gH-Genotypen ermitteln (siehe Abb. 3.3).

Bei allen 13 untersuchten Materialien konnte der gB- und gH-Genotyp eindeutig bestimmt werden. Die Ergebnisse der Genotypbestimmung sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

Tabelle 3.2: Verteilung von gB- und gH-Genotypen in Nativmaterialien virämischer Patienten

Nr.	Material	gB-Genotyp		gH-Genotyp		
		N-term	Cls	CV1	CV2	CV3
1	Urin	1	1	2	2	2
2	PBL	1	1	2	2	2
3	PBL	1	1	2	2	2
4	PBL	1	1	2	2	2
5	Urin	1	1	2	2	2
6	PBL	1	2	2	2	2
7	Urin	3	3	2	2	2
8	Urin	3	3	1	1	1
9	Urin	3	3	2	2	2
10	Urin	3	3	2	2	1
11	Urin	4	4	2	2	2
12	Urin	4	4	2	2	2
13	PBL	4	1	2	2	2

grau hinterlegte Zellen markieren intragenische Variabilität

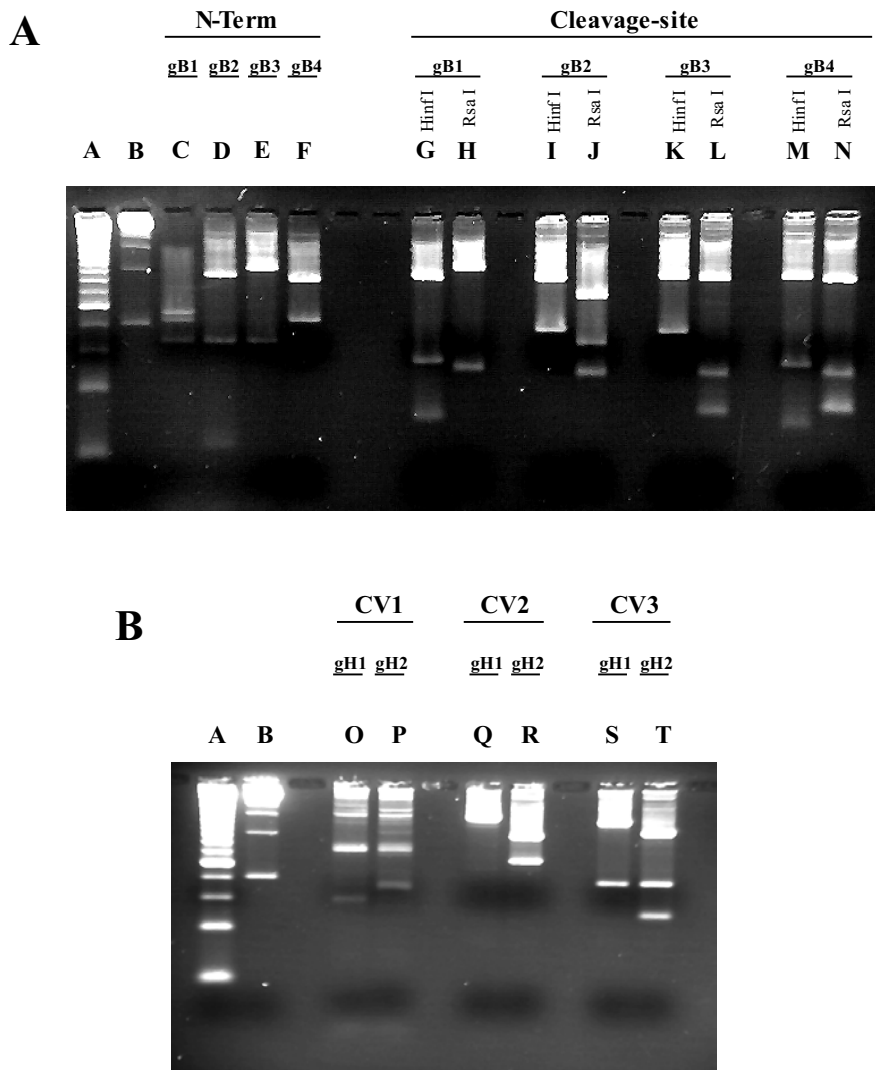


Abb. 3.3: RFLP-Muster für (A) gB N-term und CIs sowie (B) gH CV1, CV2 und CV3

A: DNA-Längenstandard 25 bp, B: DNA-Längenstandard 100 bp;

C-F: N-Term gB BstU I- und Hinf I-verdaut:

C: gB1 (83bp+108bp+118bp), D: gB2 (27bp+83bp+199bp), E: gB3 (83bp+226bp), F: gB4 (112bp+191bp)

G-N: Cleavage-site gB Hinf I-verdaut (G, I, K, M) oder Rsa I-verdaut (H, J, L, N):

G: gB1 (36bp+67bp+202bp), H: gB1 (66bp+239bp), I: gB2 (100bp+202bp), J: gB2 (63bp+239bp),

K: gB3 (97bp+202bp), L: gB3 (41bp+63bp+195bp), M: gB4 (36bp+67bp+202bp), N: gB4 (41bp+63bp+195bp)

O-P: CV1 gH Hha I-verdaut:

O: gH1 (8bp+20bp+32bp+73bp+81bp), P: gH2 (8bp+32bp+81bp+90bp);

Q-R: CV2 gH Hinf I-verdaut:

Q: gH1 (339bp unverdaut), R: gH2 (131bp+208bp);

S-T: CV3 gH Hinf I-verdaut:

S: gH1 (96bp+278bp), T: gH2 (57 bp+96bp+221bp),

die Zahlen in Klammern geben die durch den Verdau entstehenden Fragmentgrößen an.

In zwei (Nr. 6 und 13) von 13 Proben (15%) wurden aus dem gleichen Material zwei unterschiedliche gB-Genotypen an den Regionen N-term und Cleavage-site ermittelt, in einer (Nr. 10) von 13 Proben (8%) konnten zwei unterschiedliche gH-Genotypen an den Regionen CV1, CV2 und CV3 bestimmt werden. In allen anderen Fällen wurde ein konstanter Genotyp (Prototyp) ermittelt. Bei dem Glykoprotein B war der gB-Prototyp 1 vorherrschend (38%), beim Glykoprotein H der gH-Prototyp 2 (85%). Es konnten jedoch auch in geringerer Häufigkeit die gB-Prototypen 3 (31%) und 4 (15%) sowie der gH-Prototyp 1 (8%) nachgewiesen werden. Ein gB-Prototyp 2 wurde nicht typisiert.

Die Ergebnisse zeigen, daß die HCMV-Stamm-Variabilität *in vivo* in etwa mit der Variabilität in klinischen Isolaten übereinstimmt. Alle vier gB-Typen und beide gH-Typen konnten in Nativmaterialien virämischer Patienten nachgewiesen werden. Die Häufigkeit intragenischer Variabilität war in den Nativmaterialien etwas geringer als in den klinischen Isolaten.

### 3.1.3 gB-Genotyp Verteilung in Organen immunkompetenter Individuen

In Kapitel 3.1.1 und 3.1.2 wurden die gB- und die gH-Variabilität von klinischen Isolaten und in verschiedenen Nativmaterialien immunsupprimierter und/oder virämischer Patienten untersucht. Dabei konnte bei einem Teil der Proben eine intragenische Variabilität innerhalb der gB- und gH-Sequenzen festgestellt werden. Eine Erklärung hierfür könnte der Immunstatus der Patienten sein. Aufgrund ihrer Immunsuppression ist möglicherweise das Risiko, mit anderen HCMV-Virus-Varianten überinfiziert zu werden größer, als bei immunkompetenten Individuen. Im folgenden sollte deshalb die gB-Variabilität in immunkompetenten Individuen analysiert werden.

Blut, Lunge, Gehirn, Knochenmark, Leber, Lymphknoten und Darm von 25 Autopsie-Fällen aus der Rechtsmedizin wurden untersucht. Bei fünf der 25 Fälle wurden zusätzlich Niere und Speicheldrüse untersucht. Als Todesursachen wurden festgestellt: Tablettenintoxikation, Erhängen, Schußverletzung und Herzversagen.

Aus den Blut- und Gewebeproben wurde die DNA aufgereinigt und mit Hilfe einer nested PCR auf HCMV-DNA hin untersucht. Hierzu wurden zwei variable Bereiche des HCMV gB Gens (N-term und Cleavage-site) amplifiziert. Von allen PCR positiven Proben wurde der gB-Genotyp durch Restriktionsverdau bestimmt. Die Ergebnisse dieser Typisierung sind in Tabelle 3.3 dargestellt.

Tabelle 3.3: Verteilung von HCMV gB-Genotypen in verschiedenen Organen immunkompetenter Individuen

	<b>Blut</b>	<b>Lunge</b>	<b>Gehirn</b>	<b>KM</b>	<b>Leber</b>	<b>LK</b>	<b>Niere</b>	<b>SD</b>
F1	-*	N1/Cls1	-	-	-	-	n.d. <sup>†</sup>	n.d.
F2	-	-	N4/Cls4	-	-	-	n.d.	n.d.
F3	-	-	-	N1/Cls1	-	N1/Cls1	n.d.	n.d.
F4	-	N2/Cls2	-	-	-	-	n.d.	n.d.
F5	-	-	-	N1/Cls1	-	-	n.d.	n.d.
<b>F6</b>	N1/Cls2	-	N1/Cls2	-	-	-	n.d.	n.d.
F7	-	-	-	-	N1/Cls1	-	n.d.	n.d.
F8	-	N1/Cls1	-	-	-	-	n.d.	n.d.
F9	N3/Cls3	N3/Cls3	-	N3/Cls3	-	-	n.d.	n.d.
<b>F10</b>	-	-	N2/Cls3	-	-	-	n.d.	n.d.
<b>F11</b>	N4/Cls2	-	-	-	N4/Cls4	-	n.d.	n.d.
F12	-	-	-	N3/Cls3	-	-	n.d.	n.d.
F13	-	N1/Cls1	-	-	-	-	n.d.	n.d.
<b>F14</b>	-	-	-	N3/Cls1	-	-	n.d.	n.d.
<b>F15</b>	N2/Cls2	N3/Cls3	N3/Cls2	-	-	-	n.d.	n.d.
F16	N3/Cls3	N3/Cls3	-	-	-	-	n.d.	n.d.
F17	-	-	-	-	N1/Cls1	-	n.d.	n.d.
F18	-	-	-	-	-	N2/Cls2	n.d.	n.d.
F19	-	-	N3/Cls3	-	-	-	n.d.	n.d.
F20	N1/Cls1	N1/Cls1	-	-	-	-	n.d.	n.d.
<b>F21</b>	-	N1/gBc1	N1/Cls1	N1/Cls1	-	- / Cls1	-	N2/Cls1
F22	N1/Cls1	N1/Cls1	N1/Cls1	-	-	N1/Cls1	-	-
<b>F23</b>	-	-	-	N1/Cls1	-	-	-	N3/Cls2
<b>F24</b>	N2/Cls3	N1/Cls1	-	N1/Cls1	N1/Cls1	-	N1/Cls1	N3/Cls2
F25	-	N2/Cls2	-	-	- / Cls2	-	-	-

KM =Knochenmark, LK = Lymphknoten, SD = Speicheldrüse, \* PCR-negativ, <sup>†</sup> nicht untersucht

N1/Cls2 = N-term Typ1/Cleavage-site Typ2

In Biopsiematerial vom Darm konnte keine HCMV DNA nachgewiesen werden

Die Analyse der verschiedenen Gewebe zeigt, daß immunkompetente Individuen gleichzeitig mit verschiedenen HCMV-gB-Stämmen infiziert sein können. In acht von 25 Fällen (32%) wurden mehr als ein HCMV-gB-Stamm in den verschiedenen Organen gefunden (F6, F10, F11, F14, F15, F21, F23 und F24). In einem Fall (F15) wurden zwei prototypische Stämme (N2/Cls2 und N3/Cls3) in Blut und Lunge sowie ein nicht-prototypischer Stamm (N3/Cls2) im Gehirn gefunden. Insgesamt konnten alle vier gB-Genotypen nachgewiesen werden.



Die Untersuchung von gB- und gH-Variabilitäten in immunsupprimierten und immunkompetenten HCMV-positiven Individuen zeigt deutlich, daß insgesamt vier verschiedene gB-Typen und zwei verschiedene gH-Typen in der Bevölkerung kursieren und replizieren. Die Ergebnisse zeigen auch, daß immunkompetente Individuen gleichzeitig mit mehreren verschiedenen HCMV-Virusstämmen infiziert sein können und daß intragenische Variabilität nicht nur in immunsupprimierten Patienten vorkommt. Ein Impfstoff, der alle vier gB-Typen und beide gH-Typen enthält, sollte demnach ausreichen, um alle Virusvarianten zu erkennen und einen Schutz vor HCMV-Erkrankung zu ermöglichen.

### **3.2 Herstellung der DNA-Vakzine**

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines DNA-Impfstoffes gegen das humane Zytomegalievirus. Grundlage der DNA-Vakzine-Vektoren bildeten die eukaryotischen Expressionsvektoren pJW4303 und VR1055. In Vektor pJW4303 wurden jeweils einzeln die Voll-Längen-Gene für die vier Genotypen des Glykoproteins gB, die zwei Genotypen des Glykoproteins gH, das Glykoprotein gL sowie das Phosphoprotein pp65 des HCMV kloniert. Die Glykoproteine gB und gH sind das Hauptziel der humoralen Immunantwort gegen HCMV im Menschen. Die Expressionsvektoren pJW4303gB1, pJW4303gB2, pJW4303gB3, pJW4303gB4, pJW4303gH1 und pJW4303gH2 sollen im immunisierten Tier Antikörper gegen die jeweiligen viralen Proteine induzieren. Das Glykoprotein gL ist notwendig für den intrazellulären Transport von gH zur Plasmamembran. Der Expressionsvektor pJW4303gL soll deshalb bei der Immunisierung in Kombination mit den beiden Vektoren pJW4303gH1 und pJW4303gH2 appliziert werden. Das Phosphoprotein pp65 ist das Hauptziel der zellulären Immunantwort gegen HCMV im Menschen. Der Expressionsvektor pJW4303pp65 soll in den immunisierten Tieren zytotoxische T-Lymphozyten gegen das virale Protein induzieren. In Vektor VR1055 wurde der N-terminale Teil des Glykoproteins gB Genotyp 1 (Aminosäure 1 - 677) einkloniert. Diesem gB (gB1 $\Delta$ TM) fehlt die Transmembran-Domäne sowie der C-terminale Teil des Gens. Das exprimierte Glykoprotein ist somit nicht länger membrangebunden sondern löslich.

Der Expressionsvektor pRc/CMV2gB wurde uns von Nigel Temperton (London, GB) zur Verfügung gestellt. In diesen Vektor ist die Voll-Längen-Sequenz des HCMV-gB-Gens von

Laborstamm AD169 einkloniert. Der Vektor diente als Positivkontrolle für die DNA-Immunisierungen.

### 3.2.1 Klonierung der DNA-Vakzine-Vektoren

Per PCR wurden die Gene gB1, gB2, gB3, gB4, gH1, gH2, gL und pp65 aus verschiedenen klinischen HCMV Isolaten amplifiziert (siehe Kap. 2.7.3 und 2.7.4). Die Gene wurden entweder als Voll-Längen-Gene amplifiziert, die ihr eigenes Start- und Stop-Codon enthielten oder als Genfragment, wobei durch den reversen PCR-Primer ein künstliches Stop Codon eingeführt wurde. Für die Klonierung der Gene in die Expressionsvektoren wurden durch die PCR-Primer Restriktionsschnittstellen eingebaut: BamH I-Schnittstellen für die Gene gB, gL und pp65, Hind III-Schnittstellen für die gH-Gene sowie Bcl I- und BamH I-Schnittstellen für das Gen gB1 $\Delta$ TM.

Die PCR-Amplifikate wurden direkt in die TA-Vektor pCR<sup>TM</sup>2.1-TOPO oder pCR<sup>TM</sup>II-TOPO kloniert und anschließend in kompetente Bakterien transformiert. Nach Bestätigung der Klonierung durch RFLP und PCR folgte die Umklonierung der HCMV-Gensequenzen in die Expressionsvektoren pJW4303 und VR1055. Hierzu wurden die klonierten Fragmente per Restriktion mit BamH I (gB, gL und pp65), Hind III (gH) sowie BamH I+Bcl I (gB1 $\Delta$ TM) aus den TA-Vektoren ausgeschnitten und in die entsprechend linearisierten (pJW4303: BamH I oder Hind III, VR1055: Bcl I und BamH I) und dephosphorylierten Vektoren ligiert.

### 3.2.2 Überprüfung der DNA-Vakzine-Vektoren

Für eine erfolgreiche DNA-Immunisierung *in vivo* ist die korrekte Klonierung der DNA-Vakzine-Vektoren essentiell. Die Vektoren wurden deshalb mehrfach und mit unterschiedlichen Methoden analysiert und überprüft.

#### Restriktions-Fragment-Längen-Poymorphismus (RFLP)

Durch die RFLP-Analyse der Expressionsvektoren wurde überprüft, ob die Klone das jeweilige HCMV-Gen insertiert hatten. Zudem konnte die Orientierung der insertierten Gene

untersucht werden. Eine korrekte Orientierung in "sense" ist für die Ablesung der Gene essentiell.

Zur Überprüfung der jeweiligen Expressionsvektoren wurden verschiedene Restriktionsenzyme verwendet: Bgl II (pJW4303gB1, pJW4303gB2, pJW4303gB3, pJW4303gB4, VR1055gB1ΔTM), BamH I (pJW4303gH1, pJW4303gH2), Sac II (pJW4303gL) und Bfr I (pJW4303pp65) (siehe Abb. 3.4). Alle Vektoren zeigten ein Restriktionsmuster, daß auf eine korrekte Insertierung der Gene in "sense" hindeutete.

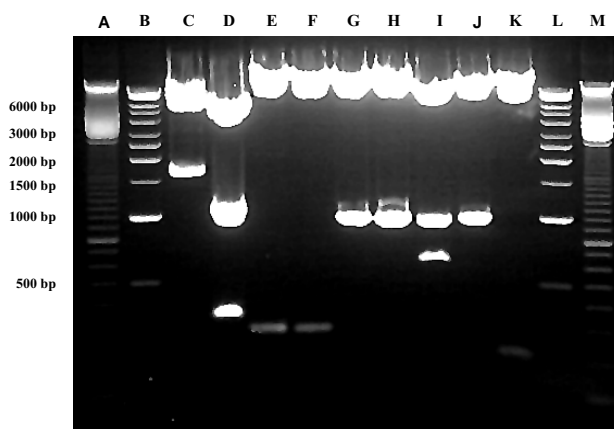


Abb. 3.4: RFLP-Analyse der Expressionsvektoren

A und M: DNA-Längenstandard 100 bp, B und L: DNA-Längenstandard 1 kb,

C: pJW4303pp65 Bfr I-verdaut (1643 bp + 5157 bp),

D: pJW4303gL Sac II-verdaut (346 bp + 1117 bp + 4518 bp),

E und F: pJW4303gH1 und pJW4303gH2 Bam H I-verdaut (291 bp + 7085 bp),

G, H und J: pJW4303gB1, pJW4303gB2 und pJW4303gB4 Bgl II-verdaut (984 bp + 6881 bp),

I: pJW4303gB3 Bgl II-verdaut (639 bp + 984 bp + 6239 bp),

K: VR1055gB1ΔTM Bgl II-verdaut (37 bp + 191 bp + 6557 bp)

die Zahlen in Klammern geben die durch den Verdau entstehenden Fragmentgrößen an; die kleineren Fragmente bezeichnen jeweils Insertbanden oder Insertbanden mit Vektoranteil, bei den großen Fragmenten handelt es sich um Vektorbanden mit Insertanteil

### Sequenzanalyse

Alle Expressionsvektoren wurden einer Sequenzanalyse unterzogen, um die korrekte Klonierung zu überprüfen. Hierbei wurden die Vektoren zunächst ansequenziert, d.h. vom Vektor ausgehend wurde jeweils Anfang und Ende des insertierten Gens überprüft.

Die Sequenzanalyse der Vektoren zeigte, daß alle Vektoren in der richtigen Orientierung kloniert waren und daß sowohl Start- als auch Stop-Codon des insertierten HCMV-Gens vorhanden waren. Die erhaltenen Sequenzen für die HCMV-Gene stimmten weitgehend mit veröffentlichten HCMV-Sequenzen in der EMBL-Datenbank überein.

Im späteren Verlauf der Untersuchungen wurden alle Expressionsvektoren vollständig durchsequenziert. Bei den Vektoren pJW4303gH1, pJW4303gH2, pJW4303pp65 sowie VR1055gB1 $\Delta$ TM stimmten die ermittelten Sequenzen weitgehend, bis auf einige wenige Aminosäureaustausche, mit den veröffentlichten HCMV-Sequenzen der EMBL-Datenbank überein. Bei einigen Vektoren zeigte es sich jedoch, daß die insertierten Gene im Vergleich zu veröffentlichten Sequenzen des HCMV Deletionen einzelner Nukleotide aufwiesen. Grund hierfür waren wahrscheinlich Fehler der Taq-Polymerase während der PCR-Amplifikation der Gene. Durch diese Deletionen wurde eine Verschiebung des Leserahmens und/oder ein Translationsstop erzeugt. Betroffen waren die Vektoren pJW4303gL, pJW4303gB1, pJW4303gB2, pJW4303gB3 und pJW4303gB4.

### **Proteinexpression *in vitro***

Ein letzter Schritt zur Vektoren-Analyse war die funktionelle Überprüfung der Expressionsvektoren. Der Nachweis von Proteinexpression *in vitro* wurde mittels indirektem Immunfluoreszenztest (IFT) geführt.

Hierzu wurden 293-Zellen (humane embryonale Nierenzellen) oder D2-Zellen (murine Fibroblasten) mit den jeweiligen Expressionsvektoren oder Vektorgemischen transfiziert. Acht verschiedene Transfektionsansätze wurden gewählt: Einzeltransfektionen mit den Vektoren pJW4303gB1, pJW4303gB2, pJW4303gB3, pJW4303gB4, pJW4303pp65, VR1055gB1 $\Delta$ TM und den leeren Vektoren pJW4303 $\emptyset$  und VR1055 $\emptyset$  sowie Doppeltransfektionen mit den Vektorgemischen pJW4303gH1+pJW4303gL und pJW4303gH2+pJW4303gL. Proteinexpression in den transfizierten Zellen wurde mit monoklonalen Antikörpern oder mit HCMV-Antikörper-positivem Humanserum nachgewiesen.

Proteinexpression in transfizierten Zellen konnte trotz Leserahmenwechsel und Translationsstop für alle Expressionsvektoren nachgewiesen werden. Die Glykoproteine gH1 und gH2 konnten auf der Oberfläche transfizierter Zellen angefärbt werden, die Transfektionshäufigkeit war mit <10% eher gering. Die Glykoproteine gB1-4 konnten

ebenfalls mit sehr geringer Transfektionsrate auf der Oberfläche transfizierter Zellen angefärbt werden. Das Glykoprotein gB1 $\Delta$ TM konnte auf der Oberfläche sowie im Zytoplasma der transfizierten Zellen nachgewiesen werden, die Transfektionshäufigkeit lag bei etwa 25%. Das Phosphoprotein pp65 konnte im Gegensatz zu den Glykoproteinen in den Zellkernen transfizierter Zellen nachgewiesen werden, die Transfektionshäufigkeit lag auch hier bei etwa 25%.

In Abbildung 3.5 sind Immunfluoreszenzbilder von Zellen nach Transfektion mit den Expressionsvektoren pJW4303pp65, pJW4303gH1+pJW4303gL, pJW4303gB1, VR1055gB1 $\Delta$ TM sowie pRc/CMV2gB dargestellt.

### **Verwendung der DNA Vakzine Vektoren**

Es wurden insgesamt neun verschiedene Expressionvektoren für die DNA-Immunisierung konstruiert. Die Überprüfung dieser Vektoren (s.o.) zeigte, daß bei einigen Plasmiden (pJW4303 gB1 – 4 und pJW4303 gL) Fehler in der DNA-Sequenz zu einem Wechsel des Leserahmens und einem anschließenden Translationsstop führten. Dadurch konnte jeweils nur der N-terminale Teil dieser viralen Antigene exprimiert werden. Diese Vektoren, sowie die Plasmide pJW4303 gH1 – 2 und pJW4303 pp65, wurden im weiteren für Verteilungs-Studien verwendet. In diesen Studien wurde die Verteilung von Plasmid-DNA nach i.m. oder i.c. DNA-Immunisierung in verschiedenen Organen oder in den Nachkommen der immunisierten Mäuse untersucht.

Die Expressionsvektoren pJW4303 gH1 – 2, pJW4303 pp65 und VR1055 gB1 $\Delta$ TM besaßen eine korrekte Sequenz der viralen Antigene. Mäuse, die mit diesen Vektoren i.m. oder i.n. DNA-immunisiert wurden, wurden auf eine humorale (pJW4303 gH1 – 2, pJW4303 pp65 und VR1055 gB1 $\Delta$ TM) oder zelluläre (pJW4303 pp65) Immunantwort hin untersucht.

In Tabelle 3.4 sind zur Übersicht alle konstruierten Expressionsvektoren, deren Überprüfung sowie deren Anwendung für DNA-Immunisierungsexperimente aufgelistet.

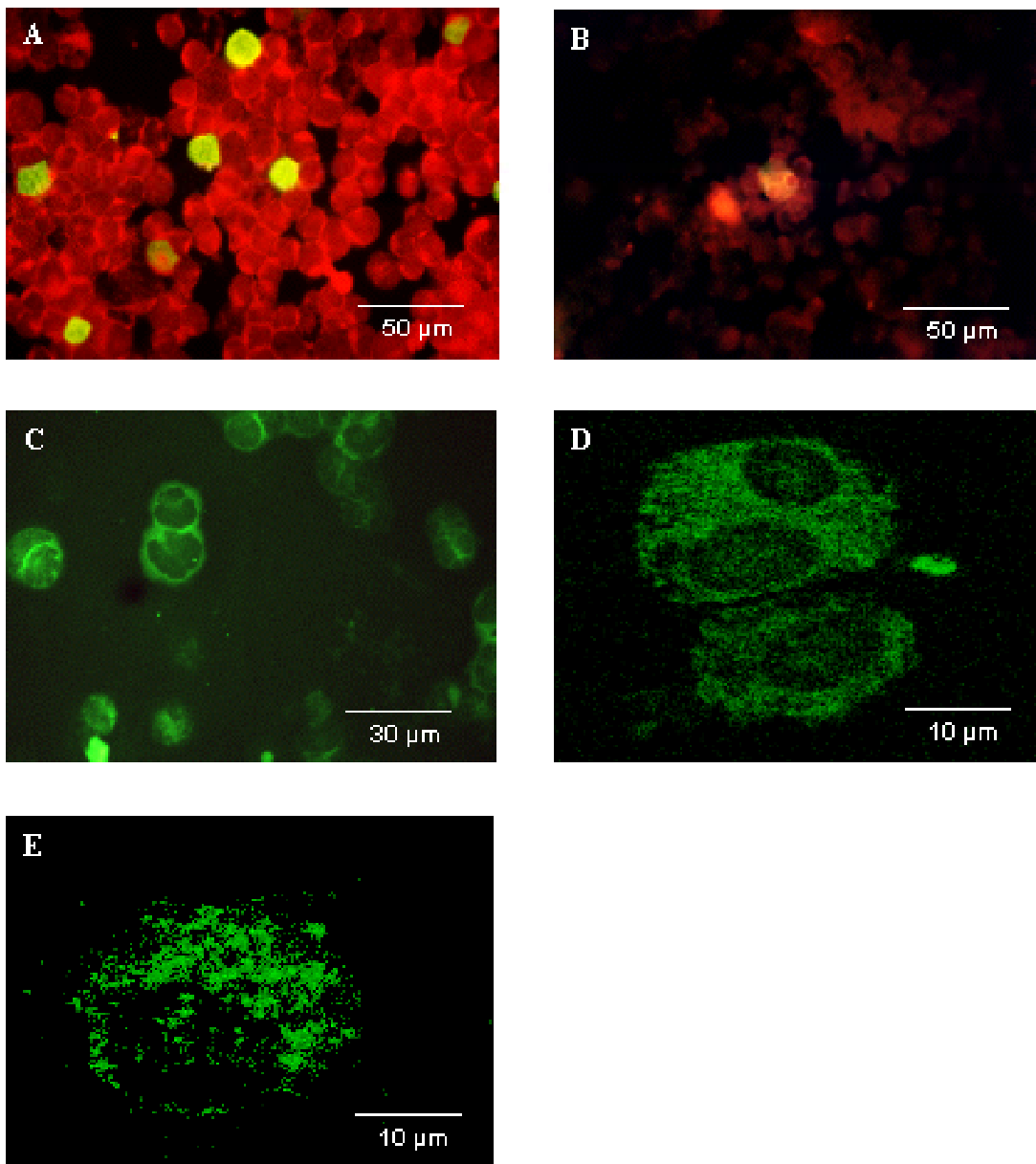


Abb. 3.5: IFT von 293-Zellen (A,B und C) und D2-Zellen (D und E) nach Transfektion mit den Expressionsvektoren: (A) pJW4303pp65, (B) pJW4303gH1+pJW4303gL, (C) pJW4303gB1, (D) VR1055gB1 $\Delta$ TM und (E) pRc/CMV2gB

Antigen-exprimierende Zellen erscheinen aufgrund des FITC-markierten Zweitantikörpers unter dem Fluoreszenzmikroskop gelblich-grün. Unspezifische Zellen erscheinen rot, wenn der Zweitantikörper in PBS/Evansblau verdünnt wurde (A und B) und farblos, wenn er in reinem PBS verdünnt wurde (C – E).

Tabelle 3.4: Übersicht über die DNA-Immunisierungs-Vektoren

Vektor	RFLP	Sequenzierung	IFT	DNA-Immunisierungsexperimente
pJW4303 gB1	✓	Leserahmenwechsel und Translationsstop nach AS 865	10%	- Plasmidverteilungs-Untersuchung im DNA-immunisierten Tier
pJW4303 gB2	✓	Leserahmenwechsel und Translationsstop nach AS 612	10%	- Plasmidverteilungs-Untersuchung im DNA-immunisierten Tier
pJW4303 gB3	✓	Leserahmenwechsel und Translationsstop nach AS 412	10%	- Plasmidverteilungs-Untersuchung im DNA-immunisierten Tier
pJW4303 gB4	✓	Leserahmenwechsel und Translationsstop nach AS 262	10%	- Plasmidverteilungs-Untersuchung im DNA-immunisierten Tier
pJW4303 gH1	✓	✓	10%	- Plasmidverteilungs-Untersuchung im DNA-immunisierten Tier - Nachweis einer humoralen Immunantwort im DNA-immunisierten Tier
pJW4303 gH2	✓	✓	10%	- Plasmidverteilungs-Untersuchung im DNA-immunisierten Tier - Nachweis einer humoralen Immunantwort im DNA-immunisierten Tier
pJW4303 gL	✓	Leserahmenwechsel und Translationsstop nach AS 51	ND	- Plasmidverteilungs-Untersuchung im DNA-immunisierten Tier
pJW4303 pp65	✓	✓	25%	- Plasmidverteilungs-Untersuchung im DNA-immunisierten Tier - Nachweis einer humoralen Immunantwort im DNA-immunisierten Tier
VR1055 gB1ΔTM	✓	✓	25%	- Nachweis einer humoralen Immunantwort im DNA-immunisierten Tier

AS: Aminosäure, ND: nicht bestimmt, ✓: positive Überprüfung der Vektoren

### 3.3 Immunreaktion nach DNA-Vakzinierung

DNA-Vakzinierungen mit den verschiedenen Expressionsvektoren wurden in Mäusen vorgenommen. Es sollte untersucht werden, ob durch DNA-Immunisierung mit HCMV gB-, gH- und pp65-exprimierenden Vektoren eine HCMV-spezifische Immunantwort in Mäusen induziert werden kann. Eine humorale Immunantwort sollte sich vorwiegend gegen die Glykoproteine gB und gH richten, eine zelluläre Immunantwort sollte vorwiegend gegen das Phosphoprotein pp65 gerichtet sein. Für die Immunisierungen wurden die Expressionsvektoren pJW4303gH1, pJW4303gH2, pJW4303pp65, VR1055gB1ΔTM sowie pRc/CMV2gB verwendet, da bei diesen Vektoren die Sequenzen der insertierten Gene mit den veröffentlichten HCMV-Sequenzen übereinstimmten. Der Nachweis einer erfolgreichen Immunisierung durch nachfolgende Infektion, und somit der Schutz vor dem Virus ist aufgrund der hohen Wirtsspezifität des HCMV in der Maus nicht möglich.

#### 3.3.1 Humorale Immunantwort

Zum Nachweis einer HCMV-spezifischen humoralen Immunantwort wurden Seren DNA-immunisierter Mäuse auf HCMV-spezifische Antikörper hin untersucht. Dazu wurden die Seren in einen Immunfluoreszenztest (IFT) eingesetzt. Um individuelle Schwankungen bei der Immunisierung der Mäuse auszugleichen, waren jeweils mehrere Mäuse (drei bis zehn) mit dem gleichen Vektor bzw. Vektorgemisch immunisiert worden. Seren gleich immunisierter Tiere wurden gepoolt.

Bei dem IFT wurden die Serumpools in verschiedenen Verdünnungen (1:20 – 1: 1280) eingesetzt. Die Seren von Mäusen, die mit VR1055gB1ΔTM oder pRc/CMV2gB immunisiert worden waren, wurden auf Baculovirus-gB-infizierten High5-Zellen getestet. Seren von Mäusen, die mit einem der beiden gH-exprimierenden Vektoren immunisiert worden waren, wurden auf HCMV-infizierten HFF-Zellen untersucht. Seren von Mäusen, die mit dem Vektoren pJW4303 pp65 immunisiert worden waren, wurden auf 293-Zellen untersucht, die mit dem Vektoren pJW4303 pp65 transfiziert worden waren.

In allen IFTs wurden IgG- und IgM-Antikörper nachgewiesen. Die Seren von Mäusen, die intranasal DNA-immunisiert wurden, wurden zusätzlich auf IgA-Antikörper hin untersucht.



### **Humorale Immunantwort gegen HCMV gB**

Antikörper gegen HCMV gB konnten in Mäusen nachgewiesen werden, die mit den gB-exprimierenden Vektoren VR1055gB1 $\Delta$ TM oder pRc/CMV2gB immunisiert worden waren. In Abb. 3.6 sind die Seren verschiedener DNA-immunisierter Mäuse zusammen mit Positiv- und Negativkontrollen im IFT zu sehen. Als Positivkontrolle wurde ein gB-spezifischer monoklonaler Antikörper (mAk gBI) sowie Serum von Mäusen verwendet, die mit einem Zell-Lysat HCMV-infizierter HFF-Zellen immunisiert worden waren (polyklonales HCMV positives Mausserum, siehe Kap. 2.9.5). Als Negativkontrolle wurden alle Seren bzw. Antikörper auf nicht-infizierten High5-Zellen untersucht.

Um die Titer der gB-spezifischen Antikörper in den einzelnen Mausseren zu bestimmen, wurden die in der Immunfluoreszenz positiven Seren ausverdünnt. Die höchste Verdünnung, die in der Immunfluoreszenz positiv war, ergab den HCMV gB-spezifischen Antikörpertiter. Die Antikörpertiter (IgG+IgM) in den Seren von Mäusen, die in den verschiedenen Immunisierungs-Experimenten DNA-immunisiert wurden (siehe Anhang Tab. A.1), sind im folgenden (Abb. 3.7 – 3.10) graphisch dargestellt. Als Positivkontrolle ist jeweils das Serum von Mäusen angegeben, die mit einem Zell-Lysat HCMV-infizierter HFF-Zellen immunisiert worden waren.

In Seren von Balb/c Mäusen, die i.m. mit dem Vektor VR1055gB1 $\Delta$ TM immunisiert wurden (siehe Anhang Tab. A.1, Experiment-Nr. 11), konnten HCMV-gB-spezifische Antikörper nachgewiesen werden. In Mäusen, die mit dem leeren Vektor VR1055 $\emptyset$  i.m. immunisiert wurden (siehe Anhang Tab. A.1, Experiment-Nr. 10) konnten hingegen keine gB-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.7). Die Seren von Mäusen, die mit VR1055gB1 $\Delta$ TM immunisiert wurden, waren vor Woche fünf negativ, ab Woche fünf war ein Ak-Titer von 320 nachweisbar. Der Titer stieg in Woche neun auf 640 an und blieb bis Woche 15 konstant. Nach Woche 15 wurde kein Serum mehr abgenommen.

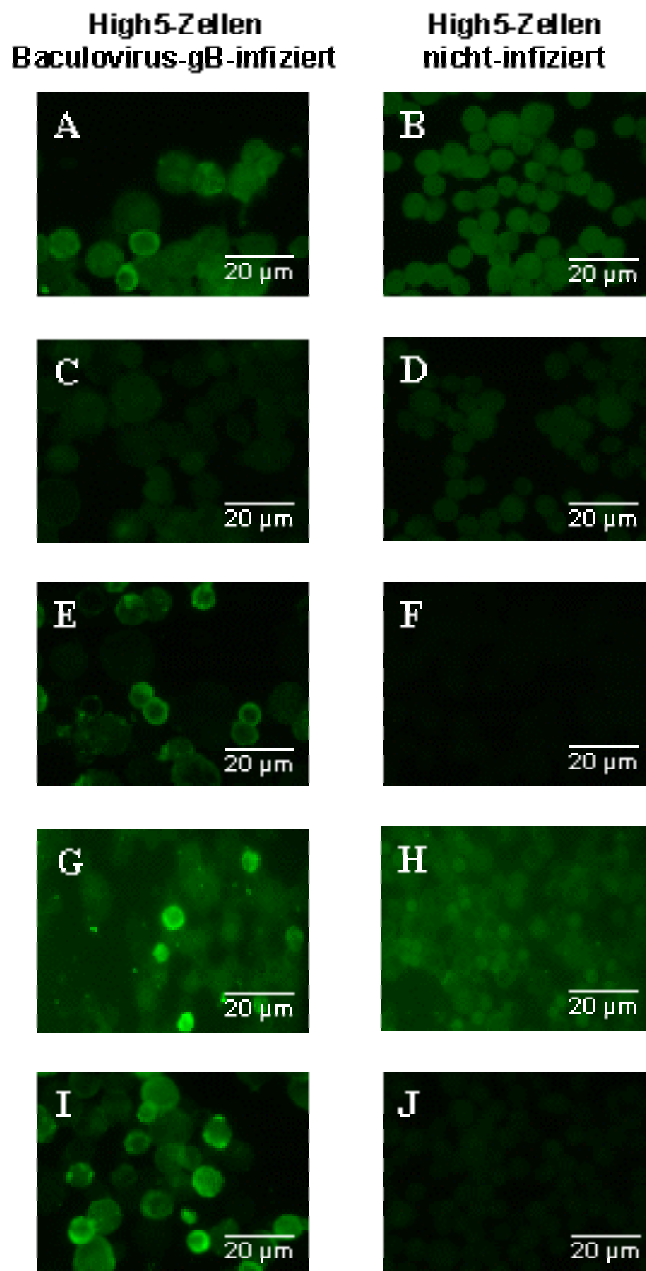


Abb. 3.6: IFT auf Baculovirus-gB-infizierten und nicht-infizierten High5-Zellen mit Seren DNA-immunisierter Mäuse:

**A+B:** Serum VR1055gB1ΔTM, i.m., Woche fünf (Exp.-Nr. 11, siehe Anhang Tabelle A.1),

**C+D:** Serum VR1055∅, i.m., Woche fünf (Exp.-Nr. 11, siehe Anhang Tabelle A.1),

**E+F:** Serum pRc/CMV2gB+ALU, i.m., Woche 12 (Exp.t-Nr. 18, siehe Anhang Tabelle A.1),

**G+H:** polyklonales HCMV positives Mausserum,

**I+J:** mAk gBI,

Antigen-exprimierende Zellen erscheinen aufgrund des FITC-markierten Zweitantikörpers unter dem Fluoreszenzmikroskop leuchtend gelblich-grün. Unspezifische Zellen erscheinen farblos bzw. matt grün.

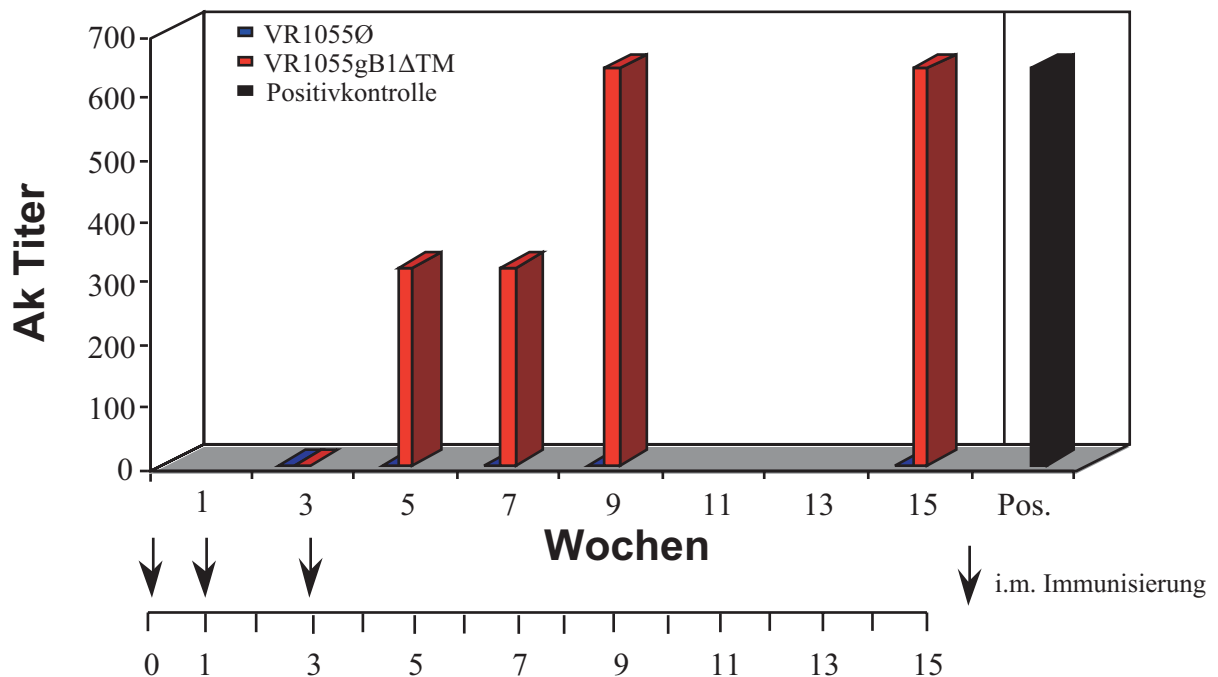


Abb. 3.7: Ak Titer in Seren DNA-immunisierter Mäuse (Experiment-Nr. 10 und 11)

Mäuse wurden dreimal i.m. immunisiert (Tag 0, 7 und 21) mit den Vektoren VR1055Ø und VR1055gB1ΔTM, Serum wurde abgenommen Woche 3, 5, 7, 9 und Woche 15

In Experiment-Nr. 13, 16 und 18 (siehe Anhang Tab. A.1) konnten HCMV-gB-spezifische Antikörper in Seren von Balb/c Mäusen nachgewiesen werden, die mit den Vektoren VR1055gB1ΔTM+AdjuPhos<sup>®</sup>, pRc/CMV2gB und pRC/CMV2gB+AdjuPhos<sup>®</sup> i.m. immunisiert wurden. In Balb/c Mäusen, die mit den leeren Vektoren pRc/CMV2Ø und pRC/CMV2Ø+AdjuPhos<sup>®</sup> i.m. immunisiert wurden (siehe Anhang Tab. A.1, Experiment-Nr. 12 und 17) konnten hingegen keine HCMV gB-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. Die Antikörpertiter dieser Mäuse sind in Abb. 3.8 dargestellt. Vor Woche sechs waren alle Seren negativ, ab Woche sechs konnten gB-spezifische Ak in den Seren nachgewiesen werden (Titer VR1055gB1ΔTM+AdjuPhos<sup>®</sup>: 80, pRc/CMV2gB: 20, pRC/CMV2Ø+AdjuPhos<sup>®</sup>: 320). Der Titer stieg bei allen drei Immunisierungsgruppen in Woche zwölf auf 640 an und blieb bei Mäusen, die mit den Vektoren pRc/CMV2gB und pRC/CMV2gB+AdjuPhos<sup>®</sup> immunisiert wurden bis Woche 22 konstant. Bei Mäusen, die mit dem Vektor VR1055gB1ΔTM+AdjuPhos<sup>®</sup> immunisiert wurden fiel der Ak-Titer in Woche 22 wieder auf 320 ab.

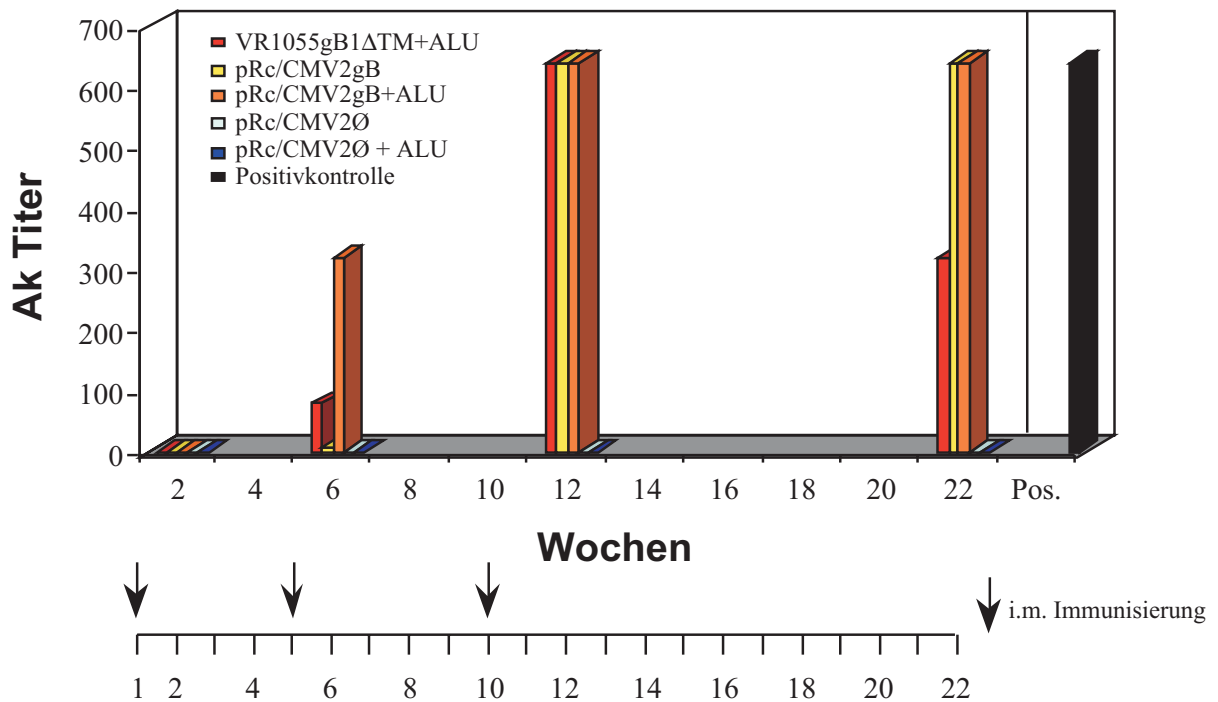


Abb. 3.8: Ak Titer in Seren DNA-immunisierter Mäuse (Experiment-Nr. 12-13 und 16-18)

Mäuse wurden dreimal i.m. immunisiert (Woche 0, 5 und 10) mit den Vektoren VR1055gB1ΔTM+ALU, pRc/CMV2Ø, pRc/CMV2Ø +ALU, pRc/CMV2ØgB, und pRc/CMV2gB+ALU, Serum wurde abgenommen Woche 6, 12 und 22

In Abb. 3.9 sind zum Vergleich die Ak-Titer von Balb/c Mäusen dargestellt, die entweder i.m. (siehe Anhang Tab. A.1, Experiment-Nr. 10 und 11) oder i.n. (siehe Anhang Tab. A.1, Experiment-Nr. 22 und 23) mit den Vektoren VR1055gB1ΔTM und VR1055Ø immunisiert wurden. Die Seren von allen Mäusen, die mit einem leeren Vektor immunisiert wurden waren negativ. Bei Seren von Mäusen, die i.m. mit VR1055gB1ΔTM immunisiert wurden, war ab Woche fünf ein gB spezifischer Ak-Titer von 320 nachweisbar. Dieser Titer erhöhte sich in Woche neun auf 640. In Seren von Mäusen, die i.n. mit VR1055gB1ΔTM immunisiert wurden waren bis Woche neun keine gB-spezifischen Antikörper (IgG+IgM) nachweisbar, in Woche neun war ein Titer von 20 zu sehen. HCMV gB-spezifische IgA-Antikörper waren in keinem dieser Mäuseseren nachweisbar.

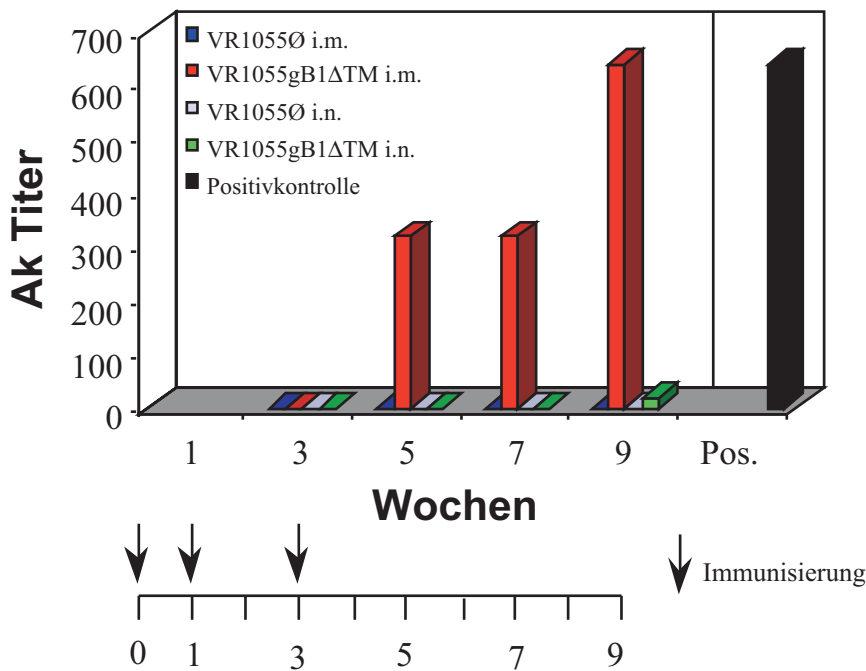


Abb. 3.9: Ak Titer in Seren DNA-immunisierter Mäuse (Experiment-Nr. 10, 11, 22 und 23)

Mäuse wurden dreimal i.m. oder i.n. immunisiert (Tag 0, 7 und 21) mit den Vektoren VR1055Ø und VR1055gB1ΔTM, Serum wurde abgenommen Woche 3, 5, 7 und 9

In Experiment-Nr. 18-20 (siehe Anhang Tab. A.1) wurden drei verschiedene Mausstämmen i.m. mit dem Vektor pRc/CMV2gB immunisiert. Hierbei handelte es sich um die Stämme Balb/c (Haplotyp H-2<sup>d</sup>), C3H (Haplotyp H-2<sup>k</sup>) und Black6 (Haplotyp H-2<sup>b</sup>). Die Ak-Titer in den drei Mausstämmen sind in Abb. 3.10 dargestellt. Alle drei Mausstämmen bildeten Antikörper gegen gB, die Titer waren jedoch unterschiedlich. In Balb/c Mäusen waren ab Woche drei gB-spezifische Antikörper mit einem Titer von 40 nachweisbar, ab Woche fünf stieg der Titer auf 320 an und blieb auch bis Woche zwölf konstant bei 320. In C3H Mäusen waren von Woche drei bis sechs gB-spezifische Antikörper mit einem Titer von 160 nachweisbar, Seren von Woche elf hatten einen Titer von 640. Black6 Mäuse zeigten im Vergleich die schwächste humorale Immunantwort. gB-spezifische Ak waren erst ab Woche sechs nachweisbar, der Ak Titer war in Woche sechs und auch in Woche elf nur 160.

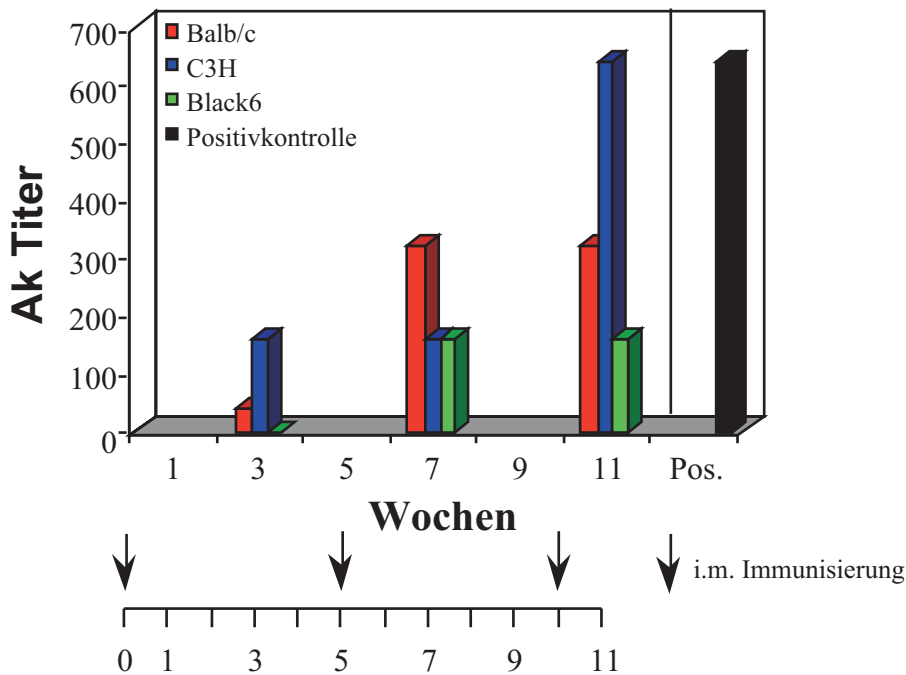


Abb. 3.10: Ak Titer in Seren DNA-immunisierter Mäuse (Experiment 18-20)

Mäuse wurden dreimal i.m. immunisiert (Woche 0, 5 und 10) mit dem Vektor pRc/CMVgB, Serum wurde abgenommen Woche 3, 7 und 11

HCMV gB positive Seren wurden in einem Neutralisationstest auf ihre Neutralisationskapazität hin untersucht. Dazu wurden die Seren mit HCMV Virus (gB Prototyp 1) vermischt und vier Stunden inkubiert. Anschließend wurde das Serum-Virus-Gemisch auf HFF-Zellen gegeben und die Infektionsrate bestimmt. Als Referenz diente Virus, das mit Medium anstelle Serum vorinkubiert wurde. Die Ergebnisse des Neutralisationstestes sind in Abbildung 3.11 dargestellt. Während ein HCMV positives Humanserum in den niedrigen Verdünnungen eine sehr hohe Neutralisationskapazität besitzt, neutralisieren die Seren der DNA-immunisierten Mäuse das Virus nicht.

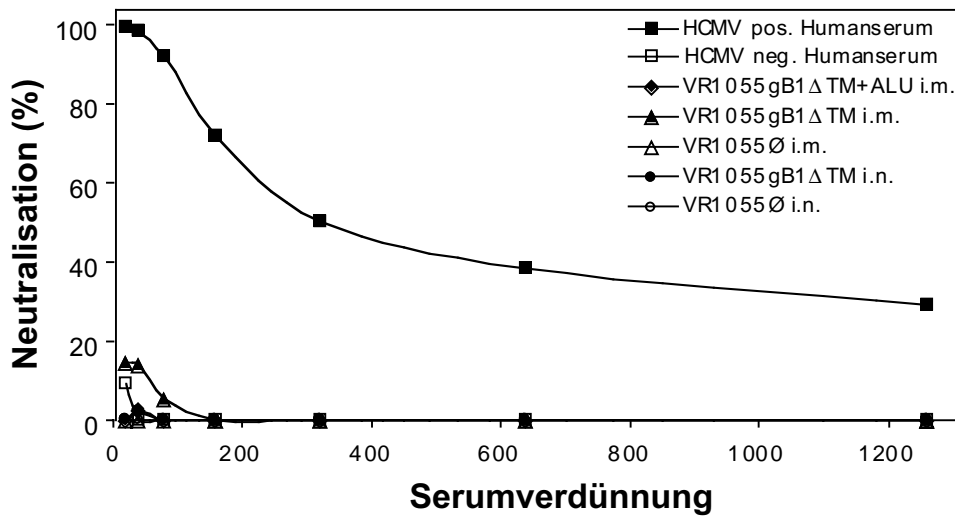


Abb. 3.11: Neutralisationkapazität von Seren DNA-immunisierter Mäuse

Der Prozentsatz an Neutralisation ist als Funktion der Serumverdünnung dargestellt.

### Humorale Immunantwort gegen HCMV gH

Seren von Mäusen, die mit einem der beiden gH-exprimierenden Vektoren immunisiert worden waren (siehe Anhang Tab. A.1, Experiment-Nr. 6, 7 und 15), wurden in der Immunfluoreszenz auf HCMV-infizierten HFF-Zellen untersucht. Zu keinem Zeitpunkt nach der Immunisierung konnten in diesen Seren HCMV gH-spezifische Antikörper nachgewiesen werden.

### Humorale Immunantwort gegen HCMV pp65

Seren von Mäusen, die mit dem Vektor pJW4304 pp65 immunisiert worden waren (siehe Anhang Tab. A.1, Experiment-Nr. 8, 9, 15 und 22), wurden in der Immunfluoreszenz auf 293-Zellen untersucht, die mit dem Vektoren pJW4304 pp65 transfiziert worden waren. Auch in diesen Seren konnten zu keinem Zeitpunkt nach der Immunisierung HCMV pp65-spezifische Antikörper nachgewiesen werden.

### 3.3.2 Zelluläre Immunantwort

Mäuse, die mit dem Expressionsvektor pJW4303pp65 immunisiert worden waren, wurden auf die Induktion einer zellulären Immunantwort hin untersucht. Dazu wurden den immunisierten Tieren die Milzen entnommen und die Zellen daraus präpariert. Die Milzzellen

(Effektorzellen) wurden *in vitro* mit einem spezifischen Antigen stimuliert und anschließend in einen CTL-Assay, einen  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungs-Assay, eingesetzt. Hierbei wurde die antigenspezifische zytotoxische Aktivität der T-Zellen gemessen. In dem Assay wurden antigenpräsentierende Zielzellen mit radioaktivem  $^{51}\text{Cr}$  beladen und mit den *in vitro* stimulierten zytotoxischen T-Lymphozyten der immunisierten Mäuse gemischt. Die Menge an  $^{51}\text{Cr}$  im Kulturüberstand korrelierte mit der antigenspezifischen Lyse der Zielzellen und wurde gemessen. Antigene für die *in vitro* Stimulation und die Beladung der Zielzellen waren zum einen Vaccinia Virus pp65 (VVpp65) infizierte Zellen und zum anderen Zellen, die mit verschiedenen HCMV pp65-spezifischen Peptiden beladen waren. Diese pp65-spezifischen Peptide wurden mit Hilfe der Datenbank SYFPEITHI (Rammensee *et al.*, 1999) ausgewählt, die eine Vorhersage von T-Zell-Epitopen für MHC-Klasse-I-Allele erlaubt. pp65-spezifische zytotoxische T-Lymphozyten konnten in keiner der DNA-immunisierten Mäuse nachgewiesen werden. Das war unabhängig davon, ob eines der verschiedenen pp65-spezifischen T-Zell-Epitope (siehe Abb. 3.12 A) oder VVpp65 (siehe Abb. 3.12 B) für die *in vitro* Stimulation und die Beladung der Zielzellen eingesetzt wurde.

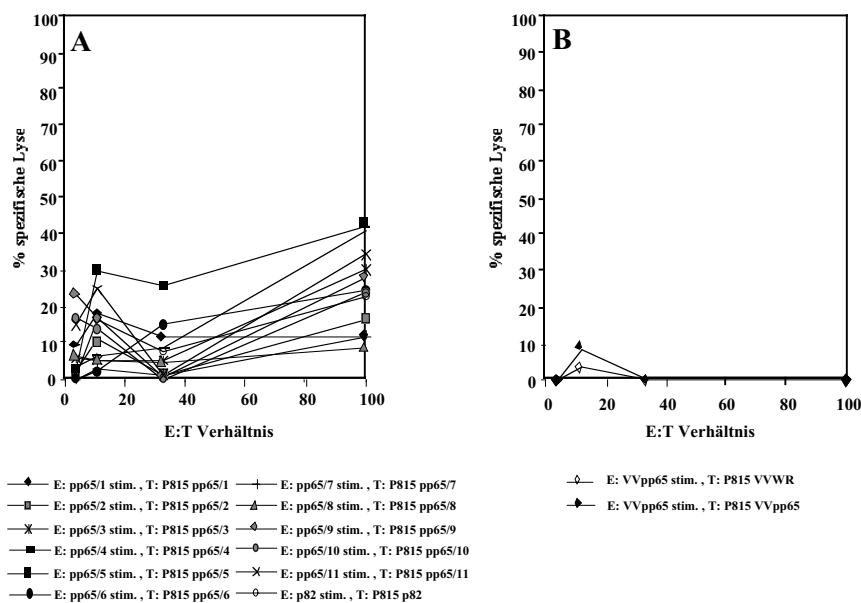


Abb. 3.12:  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungs-Assay zum Nachweis einer HCMV pp65-spezifischen zytotoxischen Aktivität der T-Zellen in pJW4303pp65 immunisierten Mäusen

(A) Effektorzellen (E) stimuliert mit pp65-spezifischen Peptiden, Targetzellen (T) unbeladen (-○-) oder beladen mit pp65-spezifischen Peptiden (-◆-■-✕-■-■-●-|-▲-◆-●-✕-)

(B) Effektorzellen (E) stimuliert mit VVpp65-infizierten Milzzellen, Targetzellen (T) infiziert mit VV WR (-◇-) oder infiziert mit VVpp65 (-◆-)



Als Kontrolle wurde ein CTL-Assay im RSV-System durchgeführt. Als Effektorzellen (E) dienten Milzzellen von Mäusen, die mit Vaccinia Virus RSV M2 (VV RSV M2) intravenös infiziert worden waren. Zehn Tage nach der Infektion wurden diese Zellen präpariert und *in vitro* stimuliert mit (A) naiven Milzzellen beladen mit p82, einem RSV M2-spezifischen Peptid, oder (B) naiven Milzzellen infiziert mit VV RSV M2. Als Zielzellen (T) in dem  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungs-Assay dienten naive P815-Zellen und P815-Zellen, die mit p82 beladen waren. Die Ergebnisse des CTL-Assays sind in Abbildung 3.13 dargestellt und zeigen, daß die Methodik funktioniert. Über 80% der p82 beladenen P815-Zielzellen wurden bei einem E:T-Verhältnis von 100/1 lysiert, wohingegen nur 10% bzw. 30% der naiven P815-Zellen bei dem gleichen E:T-Verhältnis lysiert wurden. Die Lyse der Zielzellen war somit antigenspezifisch. Die unspezifische Lyse war geringer als 20%.

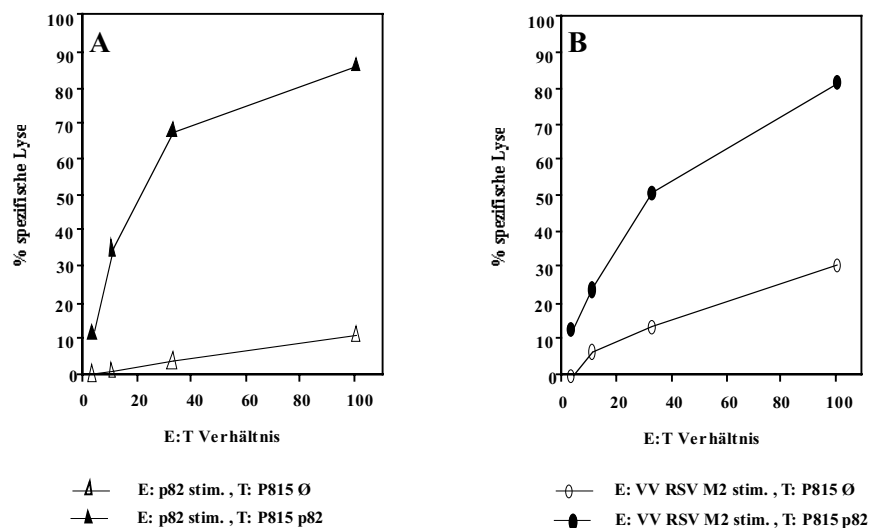


Abb. 3.13:  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungs-Assay zum Nachweis einer RSV-spezifischen zytotoxischen Aktivität der T-Zellen in VV RSV M2 infizierten Mäusen

(A) Effektorzellen (E) stimuliert mit RSV M2-spezifischem Peptid p82, Targetzellen (T) unbeladen (-△-) oder beladen mit RSV M2-spezifischem Peptid p82 (-▲-)

(B) Effektorzellen (E) stimuliert mit VV RSV M2 infizierten Milzzellen, Targetzellen (T) unbeladen (-○-) oder beladen mit RSV M2-spezifischem Peptid p82 (-●-)

### **3.4 Verteilung von DNA-Vakzine-Vektoren und exprimiertem Antigen in Organen immunisierter Mäuse und in deren Nachkommen**

Aufgrund von Sicherheitsbedenken ist es bei DNA-Immunisierungen von großem Interesse, die Verteilung und Persistenz der Plasmid DNA sowie des exprimierten Antigens in den DNA-immunisierten Tieren zu verfolgen.

Auch bei unserem Ansatz der DNA-Immunisierung von Mäusen wurde die Verteilung der Vakzine-Vektoren analysiert. Untersucht wurden zum einen verschiedene Organe DNA-immunisierter erwachsener Tiere, zum anderen wurde untersucht, ob Plasmid-DNA von immunisierten Tieren auf deren Nachkommen übertragen werden kann. Nachgewiesen wurde die Plasmid-DNA im Gewebe mit Hilfe von qualitativen oder quantitativen PCRs.

Zusätzlich zur Verteilung der Plasmid-DNA wurden verschiedene Organe DNA-immunisierter Mäuse auch auf eine Expression des rekombinanten Antigens hin untersucht. Dazu wurden die Tieren i.m. mit dem Vektor pCMV-S immunisiert. Dieser Vektor exprimiert das Oberflächenantigen des Hepatitis B Virus (HBsAg). Der Nachweis von Protein erfolgte mit Hilfe eines HBsAg ELISAs.

#### **3.4.1 Sensitivität der PCR Assays**

Um die Verteilung von Plasmid-DNA nach DNA Immunisierung mit verschiedenen Vektoren in der Maus untersuchen zu können, wurden PCRs spezifisch für die unterschiedlichen Vakzine-Vektoren etabliert. Die PCRs waren entweder spezifisch für die HCMV Gene gH, gB oder pp65, Inserts der Vakzine-Vektoren, oder für den pJW4303 Vektor selbst. Bei der pJW4303-spezifischen PCR wurde ein Fragment innerhalb des CMV-IE Promoter/Enhancer Elements amplifiziert.

Für den qualitativen Plasmidnachweis wurden vier verschiedene nPCRs etabliert, die entweder gH, gB, pp65 oder den pJW4303 Vektor amplifizierten. Um die Sensitivität dieser nPCRs zu ermitteln wurden definierte Kopienzahlen des BamHI verdauten Plasmids zusammen mit 1 µg BamH I verdauter genomischer Maus DNA amplifiziert. Für alle nPCRs lag die Sensitivität zwischen 1 und 10 Kopien pro Test. Exemplarisch ist in Abbildung 3.14.A die Sensitivität der pJW4303 nPCR dargestellt. Die Sensitivität dieser nPCR sowie aller anderen nPCRs war unter 10 Kopien. Alle nPCRs waren hochspezifisch.

Für den quantitativen Plasmidnachweis wurde eine Real Time PCR basierend auf der TaqMan™-Chemie etabliert. Diese PCR war spezifisch für den pJW4303 Vektor, das Amplicon lag innerhalb des CMV-IE Promoter/Enhancer Elements. Um die Sensitivität dieser TaqMan™ PCR zu ermitteln wurden definierte Kopienzahlen des BamH I verdauten Plasmid Standards zusammen mit 1 µg BamH I verdauter genomischer Maus DNA amplifiziert. Alle Standard-Proben wurden in einem Dreifachansatz analysiert. Das Amplifikations-Diagramm dieser Standards ist in Abbildung 3.14.B dargestellt. Basierend auf dem durchschnittlichen Threshold Cycle für jede Verdünnung wurde eine lineare Regression durchgeführt, mit dem Threshold Cycle als Funktion der Kopienzahl/Reaktionsvolumen. Anhand dieser Regressionsanalyse wurde für jede Gewebeprobe die Anzahl an Template-Molekülen pro Reaktionsvolumen errechnet, wobei wiederum der Mittelwert eines Dreifachansatzes zur Kalkulation genutzt wurde. Sehr geringe Kopienzahlen (10 Kopien oder weniger pro Reaktion) wurden als negativ definiert, da das spezifische Signal nicht klar von unspezifischen Signalen in der Negativkontrolle (NTC) unterschieden werden konnte. Die Signale in den Negativkontrollen lassen sich durch unspezifische Bindung von Primern und Sonde an die genomische Maus DNA oder durch beginnende Sondenzersetzung bei hoher Zyklenzahl erklären.

Vergleicht man beide PCR-Methoden, so ist die qualitative nPCR um eine Log-Stufe sensitiver als die quantitative TaqMan™ PCR

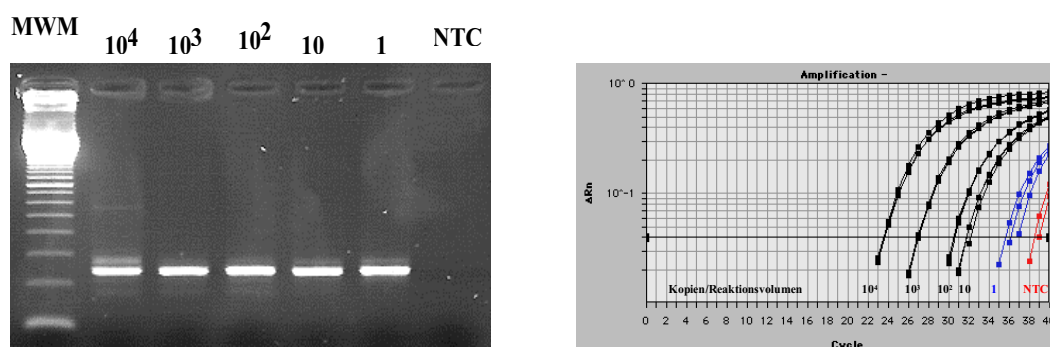


Abb. 3.14: PCR-Sensitivitäts-Assays spezifisch für den CMV-IE Promoter/enhancer (pJW4303 Vektor) mit seriellen Plasmidverdünnungen (Kopien/Reaktionsvolumen) **A** nPCR und **B** TaqMan™ PCR

MWM: DNA-Längenstandard, NTC: Negativkontrolle (No-Template-Control), ΔRn: normalisierte Fluoreszenzintensität

### 3.4.2 Verteilung von Plasmid-DNA in immunisierten erwachsenen Mäusen

Sechs Wochen nach i.m. oder i.c. DNA Immunisierung von erwachsenen Mäusen wurde die Gesamt-DNA aus verschiedenen Geweben präpariert und auf den Immunisierungs-Vektor hin untersucht (siehe Anhang Tab. A.1, Experiment-Nr. 2-9 und 22). Der Nachweis von Plasmid-DNA im Gewebe wurde entweder qualitativ mit Hilfe von nPCRs oder quantitativ mit Hilfe einer Real Time PCR durchgeführt. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden extreme Vorsichtsmaßnahmen während der Gewebepreparation und während der PCRs getroffen. Um Kreuzkontaminationen während der Gewebepreparation zu vermeiden wurden die Instrumente zwischen den einzelnen Organen abgeflammt und für jede Maus wurde ein neues Präparationsbesteck verwendet. Um Random-Kontaminationen während der PCRs auszuschließen wurden Gewebepreparation, Ansetzen der PCRs und das Pipettieren der zweiten Runde PCR in verschiedenen Räumen durchgeführt. Mehr als 30 Negativkontrollen (No-Template-Controls, NTCs) wurden in den PCRs mitgeführt und 100% dieser Kontrollen waren negativ.

Für den qualitativen Nachweis von Plasmid-DNA in DNA-immunisierten Mäusen wurden die Tiere entweder mit einzelnen Plasmiden (pJW4303gB1, pJW4303gB2, pJW4303gB3, pJW4303gB4, pJW4303pp65) oder mit Plasmidgemischen (pJW4303gH1 + pJW4303gL und pJW4303gH2 + pJW4303gL) i.m. immunisiert. Die nPCRs, mit denen die Plasmid DNA in den Mäuseorganen nachgewiesen wurde, waren spezifisch für den jeweiligen Vakzine-Vektor. Es wurden jeweils Fragmente der einzelnen Inserts amplifiziert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.5 zusammengefaßt.

Sechs Wochen nach der letzten i.m. Immunisierung konnte Plasmid DNA im Gehirn, im Thymus, in den Ovarien, in der Milz und in allen anderen untersuchten Geweben, sogar im Blut, nachgewiesen werden. Nicht alle immunisierten Mäuse waren in allen analysierten Geweben positiv. Wurden die Gewebeproben im Dreifachansatz untersucht, waren die nPCR-Ergebnisse eines Gewebes nicht immer in allen drei nPCR Reaktionen einheitlich. Dies zeigt deutlich, daß obwohl hochsensitive nPCRs benutzt wurden, die weniger als 10 Kopien/1 µg genomische DNA nachweisen können, die Menge an Plasmid DNA in einigen Gewebeproben unter der Nachweisgrenze zu sein scheint.

Tabelle 3.5: Nachweis von Plasmid-DNA in Geweben immunisierter Mäuse durch nPCR

<b>Experiment-Nr.</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>
	<b>gB1</b>	<b>gB2</b>	<b>gB3</b>	<b>gB4</b>	<b>gH1+gL</b>	<b>gH2+gL</b>	<b>pp65</b>
Gehirn	0	1	0	1	2 <sup>a</sup>	3	1
Niere	0	1	0	1	3	3	2
Ovarien	1	1	1	1	3	3	3
Thymus	0	1	0	2	2	3	2
Knochen	1	2	0	1	3	3	1
Darm	1	1	0	3	1	3	2
Speicheldrüse	0	0	0	2	3	3	3
Lunge	0	1	0	1	3	3	2
Milz	1	0	0	2	3	3	3
Leber	1	2	0	1	2	3	1
Quadriceps links	1	0	0	1	3	3	0
Quadriceps rechts *	0	2	1	1	3	3	1
Lymphknoten links abführender	0	0	0	1	0	2	0
Lymphknoten rechts	0	0	0	1	1	3	0
Blut	0	0	0	1	1	3	ND

a=Anzahl positiver Gewebe/3 immunisierter Mäuse, \* Immunisierungsstelle, ND nicht bestimmt

Um die Plasmid DNA in den verschiedenen Organen immunisierter Mäuse quantifizieren zu können, wurden die Proben zusätzlich zur qualitativen nPCR mit einer quantitativen Real Time PCR basierend auf der TaqMan™-Chemie untersucht. Für diese Untersuchung wurden Mäuse dreimal entweder i.m. oder i.c. mit einem Cocktail bestehend aus allen pJW4303 Expressionsvektoren immunisiert (siehe Anhang Tab. A.1, Experiment-Nr. 9 und 22). Sechs Wochen nach der letzten Immunisierung wurden die Mäuse getötet und die Organe in der PCR untersucht. In beiden PCR Methoden, nPCR und TaqMan™ PCR, wurde ein Fragment des CMV-IE Promoter/Enhancer Elements des pJW4303 Vektors amplifiziert. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Tabelle 3.6 zusammengefaßt.

Tabelle 3.6: Nachweis von Plasmid-DNA in Geweben i.m. und i.c. immunisierter Mäuse durch nPCR und TaqMan™ PCR

	<b>i.m. Immunisierung</b>					
	<b>n PCR</b>	<b>TaqMan</b>	<b>n PCR</b>	<b>TaqMan</b>	<b>n PCR</b>	<b>TaqMan</b>
Gehirn	-	-	+	-	-	-
Niere	+	-	+	-	+	-
Ovarien	-	-	-	-	-	-
Thymus	-	-	+	-	-	-
Knochen	+	2320	+	2857	+	2413
Darm	-	-	-	-	-	-
Speicheldrüse	-	-	+	-	+	-
Lunge	+	-	+	-	+	-
Milz	+	-	-	-	-	-
Leber	-	-	+	-	+	-
Quadriceps links	-	-	+	-	-	-
Lymphknoten links	-	-	+	-	-	-
Quadriceps rechts *	+	ND	+	-	+	119311
abführender Lymphknoten	+	7945	+	34	+	64
Blut	+	-	-	-	-	-
	<b>i.c. Immunisierung</b>					
	<b>n PCR</b>	<b>TaqMan</b>	<b>n PCR</b>	<b>TaqMan</b>	<b>n PCR</b>	<b>TaqMan</b>
Gehirn	-	-	-	-	+	-
Niere	-	-	-	-	-	-
Ovarien	+	-	+	-	+	-
Thymus	-	-	+	-	-	-
Knochen	-	-	+	-	+	-
Darm	-	-	+	-	+	-
Speicheldrüse	-	-	+	-	+	-
Lunge	+	-	-	-	+	-
Milz	+	-	+	-	+	-
Leber	+	-	-	-	+	-
Quadriceps rechts	+	18442	+	-	+	-
Blut	-	-	+	-	+	-
Haut*	+	9238212	+	-	+	1693928
abführender Lymphknoten	+	-	+	147	+	11

\* Immunisierungsstelle, ND nicht bestimmt

Mit Hilfe der nPCR konnte Plasmid DNA in nahezu allen Geweben in mindestens einem von drei immunisierten Tieren nachgewiesen werden. Ausnahme waren die Ovarien bei i.m. und die Nieren bei i.c. immunisierten Tieren. Bei der Untersuchung der gleichen Gewebeproben in der quantitativen Real Time PCR waren nur wenige Proben positiv: Knochen, Quadriceps rechts (Immunisierungsstelle) und abführender Lymphknoten bei i.m. immunisierten Mäusen sowie Quadriceps rechts, Haut (Immunisierungsstelle) und abführender Lymphknoten bei i.c. immunisierten Mäusen. Die Kopienzahlen variierten zwischen  $1,1 \times 10^1$  (abführender Lymphknoten) und  $9,2 \times 10^6$  (Haut, Immunisierungsstelle) Kopien/ $\mu\text{g}$ -Gewebe DNA. Die Diskrepanz der Ergebnisse zwischen gleichen Gewebeproben DNA immunisierter Mäuse in der nPCR oder in der Real Time PCR, ist auf die unterschiedliche Sensitivität beider Methoden zurückzuführen. Die nPCR ist mit 1 Kopie pro  $\mu\text{g}$  Gewebe-DNA um eine Log-Stufe sensitiver als die Real Time PCR mit 10 Kopien pro  $\mu\text{g}$  Gewebe-DNA (siehe Abb. 3.14).

### **3.4.3 Verteilung von Plasmid-DNA in sich fortpflanzenden Mäusen und deren Nachkommen**

Nachdem Plasmid-DNA in so vielen Geweben DNA-immunisierter Mäuse gefunden wurde, wurde die Plasmid-Verteilung in sich fortpflanzenden Mäusen und deren Nachkommen untersucht. Es wurden drei verschiedene DNA-Immunisierungsexperimente durchgeführt (siehe Anhang, Tabelle A.2). In Experiment 25 wurden weibliche Mäuse während der Schwangerschaft-DNA immunisiert, in Experiment 26 wurden weibliche Mäuse sechs Wochen vor einer Schwangerschaft DNA-immunisiert und in Experiment 27 wurden männliche Mäuse sechs Wochen vor einer Anpaarung mit weiblichen Mäusen DNA-immunisiert. Die Verteilung der Plasmid-DNA wurde sowohl in den Eltern als auch in den Nachkommen untersucht. Es wurden wiederum extreme Vorkehrungen getroffen, um Kontaminationen während der Gewebepreparation und den PCRs zu vermeiden. Auch hier wurden mehr als 39 Negativkontrollen (NTCs) in den PCRs mitgeführt, von denen 100% in den PCRs negativ waren. Die Ergebnisse der Experimente 25 – 27 sind in Tabelle 3.7 dargestellt.

In Experiment 25 wurden weibliche Mäuse während der Schwangerschaft DNA-immunisiert. Die Immunisierung erfolgte i.m. an Tag 2 und Tag 9 postcoitus mit einem Plasmid-Cocktail

bestehend aus pJW4303gH1 und pJW4303gL. Der Nachweis von Plasmid DNA in Feten, Neugeborenen und Müttern erfolgte mit einer nPCR spezifisch für das gH Insert des Vakzine-Vektors. Plasmid-DNA wurde fünf Wochen nach der Geburt in den meisten der untersuchten mütterlichen Geweben (Blut, Lunge, Milz, Niere, Quadriceps) nachgewiesen. An Tag 15 postcoitus wurden Feten entnommen und auf Plasmid-DNA hin untersucht. Drei von 16 untersuchten Feten waren positiv für das HCMV gH Gen. Nachkommen wurden an Tag 1 nach der Geburt oder einzelne Gewebe 5 Wochen nach der Geburt untersucht. Alle sechs Neugeborene am Tag 1 nach der Geburt sowie die meisten Gewebe der Neugeborenen fünf Wochen nach der Geburt waren nPCR positiv.

Tabelle 3.7: Nachweis von Plasmid-DNA in Geweben immunisierter Mäuse und deren Nachkommen durch nPCR

Experiment-Nr.	25	26	27
	DNA-Immunsisierung trächtiger Mäuse	DNA-Immunsisierung weiblicher Mäuse vor Schwangerschaft	DNA-Immunsisierung männlicher Mäuse vor Anpaarung
Mutter, Blut	1/3 <sup>a</sup>	0/2	0/6
Mutter, Leber	0/3	0/3	0/6
Mutter, Lunge	2/3	0/3	0/6
Mutter, Milz	2/3	ND	0/6
Mutter, Niere	2/3	0/3	0/6
Mutter, Quadriceps rechts*	1/3*	2/3*	ND
Mutter, Lymphknoten rechts	0/3	0/3	ND
Vater, Leber	ND	ND	0/1
Vater, Lunge	ND	ND	0/1
Vater, Milz	ND	ND	0/1
Vater, Niere	ND	ND	0/1
Vater, Quadriceps rechts*	ND	ND	1/1*
Vater, Hoden	ND	ND	0/1
Feten, Tag 15 p.c.	3/16	12/24	ND
Neugeborene, Tag 1 nach Geburt	6/6	4/11	9/20



Tabelle 3.7 (Fortsetzung): Nachweis von Plasmid-DNA in Geweben immunisierter Mäuse und deren Nachkommen durch nPCR

Experiment-Nr.	25	26	27
	DNA-Immunisierung trächtiger Mäuse	DNA-Immunisierung weiblicher Mäuse vor Schwangerschaft	DNA-Immunisierung männlicher Mäuse vor Anpaarung
Nachkommen, Leber, 5 Wochen nach Geburt	4/9	1/9	0/17
Nachkommen, Lunge, 5 Wochen nach Geburt	7/9	5/9	0/17
Nachkommen, Milz, 5 Wochen nach Geburt	9/9	4/9	0/17
Nachkommen, Niere, 5 Wochen nach Geburt	6/9	5/9	0/17

a) Anzahl PCR positiver Proben/untersuchter Proben, \* Immunisierungsstelle, p.c. post coitus, ND nicht bestimmt

In Experiment 26 wurden weibliche Mäuse vor der Schwangerschaft DNA-immunisiert. Mäuse wurden dreimal innerhalb von drei Wochen i.m. mit einem Plasmid-Cocktail bestehend aus pJW4303gH1 und pJW4303gL immunisiert. Sechs Wochen nach der letzten Immunisierung wurden die Tiere mit männlichen Mäusen angepaart. Anschließend wurde nach Plasmid-DNA in den immunisierten Müttern und deren Nachkommen gesucht. Nachweisverfahren war eine nPCR spezifisch für das gH Insert des Vakzine-Vektors. In den Müttern war fünf Wochen nach der Geburt (14 Wochen nach der letzten Immunisierung) die Immunisierungsstelle immer noch nPCR positiv, alle anderen Gewebe hingegen negativ. Feten wurden 15 Tage postcoitus entfernt und auf Plasmid-DNA hin untersucht, 12 von 24 Feten waren positiv in der nPCR. Die Neugeborenen an Tag 1 nach der Geburt wurden ebenfalls untersucht. Auch hier waren von 11 Mäusen vier in der nPCR positiv. Fünf Wochen nach der Geburt wurden Leber, Lunge, Milz und Niere der Nachkommen in der PCR untersucht und Plasmid DNA konnte in allen Gewebearten, wenn auch nicht in allen Mäusen nachgewiesen werden. In zwei von neun untersuchten Mäusen konnte überhaupt keine Plasmid DNA nachgewiesen werden.

In Experiment 27 wurden männliche Mäuse vor Anpaarung mit Weibchen DNA-immunisiert. Männchen wurden dreimal innerhalb von drei Wochen i.m. mit einem Plasmid-Cocktail bestehend aus pJW4303gH1 und pJW4303gL immunisiert. Sechs Wochen nach der letzten Immunisierung wurden die immunisierten Tiere mit weiblichen Mäusen angepaart. Anschließend wurde nach Plasmid DNA in den immunisierten Vätern, den nicht

immunisierten Müttern und deren Nachkommen gesucht. Nachweisverfahren war eine nPCR spezifisch für das gH Insert des Vakzine-Vektors. Fünf Wochen nach der Geburt waren alle untersuchten Gewebe der Mütter (Leber, Lunge, Milz und Niere) nPCR negativ. Zwei der immunisierten Männchen verstarben unabhängig von der Immunisierung sodaß nur die Gewebe eines Vaters fünf Wochen nach der Geburt (14 Wochen nach der letzten Immunisierung) untersucht werden konnten. Die Immunisierungsstelle war positiv in der nPCR, alle anderen Gewebe (Leber, Lunge, Milz, Niere und Hoden) waren negativ. Die Verteilung von Plasmid DNA in den Nachkommen wurde an Tag 1 sowie fünf Wochen nach der Geburt analysiert. An Tag 1 nach der Geburt waren neun von 20 Neugeborene nPCR positiv. Fünf Wochen nach der Geburt konnte jedoch in keinem der 17 Nachkommen Plasmid-DNA nachgewiesen werden. Die Anwesenheit von Plasmid-DNA in Feten wurde nicht untersucht.

#### **3.4.4 Verteilung von HBsAg in Organen pCMV-S immunisierter Mäuse**

Mit den oben beschriebenen Experimenten konnte gezeigt werden, daß sich die Plasmid-DNA nach einer DNA-Immunisierung auf nahezu alle Organe verteilt. Im folgenden sollte nun geklärt werden, ob diese Plasmid-DNA in den verschiedenen Organen auch in der Lage ist, das rekombinante Gen zu exprimieren.

Fünf Balb/c Mäuse wurden i.m. mit dem Expressionsvektor pCMV-S immunisiert (siehe Anhang Tab. A1, Experiment-Nr. 24). Dieser Vektor exprimiert das Oberflächenantigen des Hepatitis B Virus (HBsAg). Die DNA-Immunisierung mit einem HBsAg-exprimierenden Vektor bietet gegenüber Immunisierungen mit den HCMV gB- oder gH-exprimierenden Vektoren den Vorteil, daß das exprimierte Protein (HBsAg) relativ leicht zu quantifizieren ist. In einem Zwei-Wochen-Abstand wurden nach der Immunisierung die Mäuse einzeln getötet und verschiedene Organe entnommen. Die Organe wurden homogenisiert und HBsAg wurde mit einem ELISA in dem Protein-Lysat nachgewiesen. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 3.15 dargestellt.

HBsAg konnte in allen untersuchten Organen (Leber, Lunge, Niere, Milz, Muskel rechts (Immunisierungsstelle), Lymphgewebe rechts (abführender Lymphknoten), Muskel links, und Lymphgewebe links) nachgewiesen werden. Die Antigen-Mengen schwankten dabei von 0 bis 19,9 mU HBsAg pro mg untersuchtem Gewebe je nach Organ und Maus. In den Mäusen

(c) und (d) waren die HBsAg-Mengen in allen untersuchten Geweben untern 2,2 mU/mg, in Maus (e) war die HBsAg-Mengen in allen untersuchten Geweben größer als 8,3 mU/mg. Die höchsten Protein-Mengen waren im Muskelgewebe zu finden. Auffällig hierbei ist, daß nicht nur der rechte Quadriceps (Immunisierungsstelle), sondern auch der linke Quadriceps extrem hohe HBsAg-Mengen besaß.

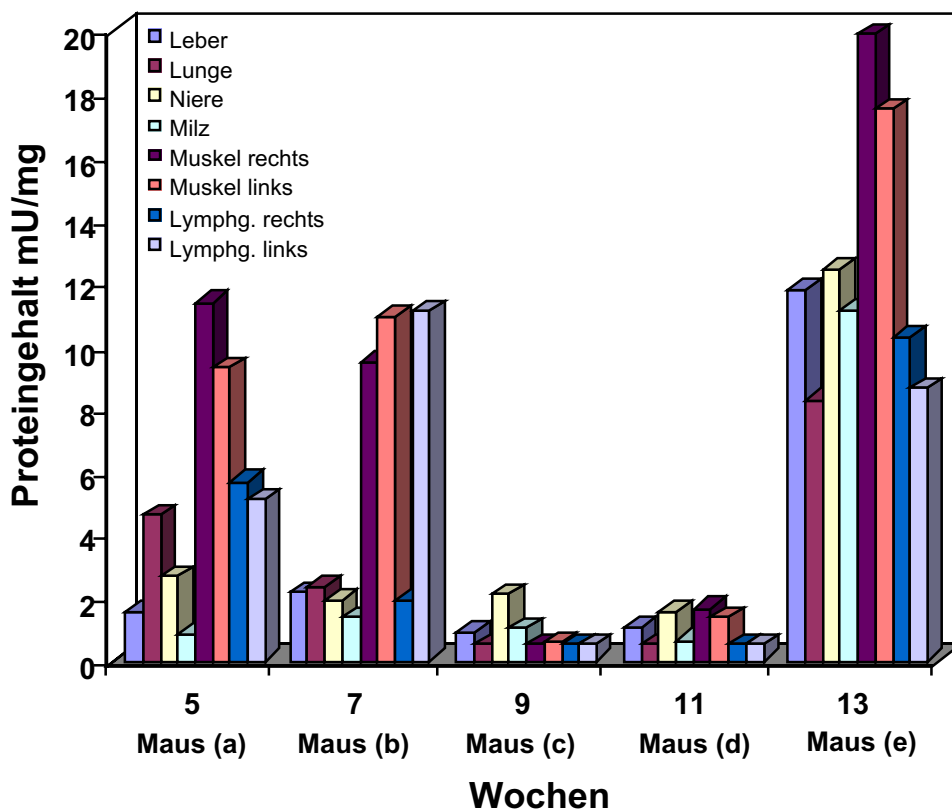


Abb. 3.15: HBsAg-Gehalt in verschiedenen Organen pCMV-S immunisierter Mäuse

Da zu jedem Zeitpunkten nach Immunisierung nur eine Maus untersucht wurde, ist eine Aussage über den zeitlichen Verlauf der Proteinexpression nach DNA-Immunisierung nicht möglich. Die Unterschiede in der Proteinexpression sind wohl eher auf individuelle Schwankungen zurückzuführen. Für eine statistisch solide Aussage über den zeitlichen Verlauf der Proteinexpression nach DNA-Immunisierung müsste eine größere Zahl an Mäusen pro Zeitpunkt untersucht werden.

## 4 Diskussion

Das humane Zytomegalievirus kann vor allem bei kongenitalen Infektionen oder bei Infektionen immunsupprimierter Personen schwere Krankheitsverläufe verursachen. Ein Impfstoff gegen HCMV steht nicht zur Verfügung, auch wenn sich verschiedene Impfstoffe in der Entwicklung befinden. Bislang ließ sich jedoch nur mit einem Vakzine-Ansatz, der Immunisierung mit dem attenuierten HCMV-Stamm Towne, ein partieller Schutz vor Erkrankung erzielen (Plotkin *et al.*, 1989; Plotkin, 1999).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines DNA-Impfstoffes gegen das humane Zytomegalievirus. Im Gegensatz zu den bisherigen Impfstoff-Strategien sollte die genetische Variabilität der immundominanten Proteine stärker berücksichtigt werden. In einem ersten Teil der Arbeit wurde deshalb die genetische Variabilität der Glykoproteine gB und gH in Patientenisolaten und Nativmaterialien genauer untersucht. Die Glykoproteine gB und gH stellen das Hauptziel der humoralen Immunantwort gegen HCMV im Menschen dar. In dem zweiten Teil der Arbeit wurden Plasmide konstruiert, die verschiedene immundominante Proteine des HCMV exprimieren. Mäuse wurden mit diesen Vektoren DNA-immunisiert und auf eine humorale oder zelluläre Immunantwort gegen HCMV untersucht. Da DNA-Immunisierungen eine noch relativ neue Vakzinierungsmethode darstellt, gibt es bislang noch keine Langzeit-Erfahrungen über deren Wirkungsweise. Eine lange Persistenz der Plasmid-DNA, eine mögliche Integration in das Wirtsgenom und eine persistente Expression des fremden Antigens können jedoch Sicherheitsrisiken darstellen. In einem dritten Teil der Arbeit wurde daher die Verteilung der DNA-Vakzine-Vektoren und des exprimierten Antigens in verschiedenen Organen und in den Nachkommen DNA-immunisierter Tiere analysiert.

### 4.1 Variabilität der Glykoproteine gB und gH

Die Glykoproteine gB und gH sind das Hauptziel der humoralen Immunantwort im HCMV infizierten Menschen. Für das gB wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen Sequenzanalysen klinischer Isolate durchgeführt und man geht davon aus, daß es weltweit

vier verschiedene Genotypen des Glykoproteins gB (gB1 bis gB4) gibt (Lehner *et al.*, 1991; Chou, 1992a; Shiu *et al.*, 1994; Zipeto *et al.*, 1998). In einigen Studien wurde der gB Genotyp von Patientenisolaten mit dem Verlauf der HCMV-Infektion korreliert. Die Arbeitsgruppe von Torok-Storb bestimmte den gB Genotyp von Isolaten knochenmarktransplantierte Patienten mittels PCR und RFLP in dem Bereich der Cleavage-site, die Infektion mit den gBcls-Typen 2-4 korrelierte mit einer erhöhten Rate tödlicher Verläufe der HCMV-Infektion (Fries *et al.*, 1994). Diese vielversprechenden Befunde gaben Anlaß zu zahlreichen Studien an unterschiedlichen Patientengruppen, um den Einfluß von gBcls-Genotypen auf den Verlauf der HCMV-Infektion zu verifizieren. Die Ergebnisse dieser Studien sind jedoch diskrepant und die Befunde der Arbeitsgruppe Torok-Storb konnten nicht bestätigt werden (Bongarts *et al.*, 1996; Shepp *et al.*, 1996; Vogelberg *et al.*, 1996; Rasmussen *et al.*, 1997; Zipeto *et al.*, 1998). Das Glykoprotein gH des HCMV ist im Gegensatz zum gB bislang nicht so ausgiebig untersucht worden. Sequenzanalysen klinischer Isolate deuten jedoch darauf hin, daß es nur zwei verschiedene Genotypen des Glykoproteins gH (gH1 und gH2) gibt (Chou, 1992b; Fries *et al.*, 1994). Eine Korrelation von gH Genotypen mit dem klinischen Verlauf der HCMV-Infektion wurde nicht gefunden (Fries *et al.*, 1994). HCMV-Stämme, die an allen untersuchten Regionen des gB- oder gH-Gens den gleichen Genotyp besitzen, werden als gB- oder gH-Prototypen bezeichnet.

Um die Variabilität der Glykoproteine gB und gH und die klinische Relevanz der verschiedenen Genotypen zu ermitteln, wurden Patientenisolat und Nativmaterialien (Urin, Blut) virämischer Patienten auf ihren gB- bzw. gH-Genotyp hin untersucht. Dazu wurden mittels PCR zwei variable Bereiche innerhalb des gB Gens (N-Term und Cleavage-site) und zusätzlich drei variable Bereiche innerhalb des gH Gens (CV1, CV2 und CV3) amplifiziert, die Amplifikate wurden anschließend durch RFLP typisiert. In den untersuchten Materialien konnten vier gB-Genotypen und zwei gH-Genotypen nachgewiesen werden. Die Ergebnisse korrelieren somit mit den Ergebnissen anderer Studien (Lehner *et al.*, 1991; Chou, 1992a; Shiu *et al.*, 1994; Zipeto *et al.*, 1998). Neben den vier gB- und den zwei gH-Prototypen, die jeweils einen konstanten Genotyp an allen untersuchten Genregionen besaßen, gab es jedoch auch eine relativ große Anzahl an HCMV-Stämmen, die eine intragenische Variabilität innerhalb dieser Glykoprotein-Gene aufwiesen (8-43%). Bereits in der Literatur gab es erste Hinweise dafür, daß die gB-Genotypen nicht konstant sind, sondern daß bei einer kleinen Zahl der klinischen Isolate intragenische Variabilität vorkommt. So beschrieb Chou einen klinischen HCMV-Stamm, der zunächst die typische Sequenz eines der vier gB-Genotypen

zeigte und dann zur typischen Sequenz eines anderen gB-Genotyps wechselte (Chou, 1992a). Daß in früheren Studien eine solch hohe intragenische Variabilität von gB und gH nicht festgestellt wurde, kann mit der meist geringen Anzahl der untersuchten Proben erklärt werden. In der Studie von Chou wurden lediglich 11 Proben untersucht, in der Studie von Lehner *et al.* nur fünf Proben und in der Studie von Shiu *et al.* 15 Proben (Lehner *et al.*, 1991; Chou, 1992a; Shiu *et al.*, 1994). In einer Studie von Shepp *et al.* an über 100 HIV-infizierten Patienten wurde ein fünfter, bislang nicht beschriebener gB-Genotyp entdeckt, mit dem 5% der HIV-Patienten infiziert waren (Shepp *et al.*, 1998). Dieser Befund spricht dafür, daß die intragenische gB- und gH-Variabilität in bisherigen Studien mit kleinen Patientenkollektiven möglicherweise übersehen wurde. Das häufige Vorkommen intragenischer Variabilität stellt den Sinn der Korrelation von bestimmten gB Genotypen mit dem Verlauf der klinischen Infektion von HCMV in Frage, da in all diesen Studien nur ein variabler Bereich des gB Gens analysiert wurde.

Die intragenische Variabilität der HCMV-Glykoproteine war nicht nur in immunsupprimierten Patienten zu beobachten, sondern auch in immunkompetenten Individuen. Dies konnte durch eine Untersuchung von Organen und Blutproben gesunder HCMV-Seropositiver nachgewiesen werden (Meyer-König *et al.*, 1998). Auch hier konnte eine gleichzeitige Infektion mit unterschiedlichen, teils prototypischen, teils nicht prototypischen HCMV-gB-Genotypen nachgewiesen werden. Zwei und mehr HCMV gB-Stämme wurden in verschiedenen Organen bei 32% der untersuchten Individuen gefunden. Die Bestimmung von gB-Varianten aus Materialien eines Organkompartiments läßt somit keine Rückschlüsse über die Verteilung in anderen Organen zu. Die verschiedenen Virus-Stämme in ein und demselben Wirt können gleichzeitig als Folge einer einzelnen Infektion erlangt worden sein. Möglich ist jedoch auch, daß die Patienten nacheinander im Laufe ihres Lebens mit verschiedenen HCMV-Stämmen infiziert wurden. Dies deutet darauf hin, daß eine HCMV-Primärinfektion nicht vor einer Überinfektion mit einem zweiten oder dritten HCMV-Stamm, der einen anderen gB-Genotyp besitzt, schützen kann. Diese These wurde inzwischen von der Arbeitsgruppe von K. Hamprecht bestätigt (Prix *et al.*, 1998). Sie konnten nachweisen, daß nacheinander zwei verschiedene Virusvarianten von der Mutter durch die Muttermilch auf das neugeborene Kind übertragen wurden. In einer Studie mit Frauen, die bereits eine Immunität gegen HCMV hatten, konnte eine intrauterine Übertragung von HCMV auf die Kinder vor allen in den Müttern beobachtet werden, die während der Schwangerschaft mit einem anderen Virusstamm infiziert wurden (Boppana *et al.*, 2001).

Entscheidend hierfür war die fehlende Immunität gegen ein Antikörper-Epitop auf dem gH-Gen, das stammspezifische Unterschiede zwischen den beiden Genotypen gH1 und gH2 aufweist.

In den Abbildungen 1.3 und 1.4 sind die immundominanten Domänen sowie die Sequenzvariationen der Glykoproteine gB und gH dargestellt. Viele kontinuierliche und diskontinuierliche B-Zellepitope liegen in hochvariablen Bereichen von gB und gH. Antikörper, die an diese Epitope binden, sind von daher stammspezifisch nur gegen jeweils einen gB- oder gH-Genotypen gerichtet. Allgemein läßt sich sagen, daß die Induktion stammspezifischer Antikörper gegen gB oder gH, die jeweils nur einen Genotyp erkennen und neutralisieren, für den ungenügenden Schutz vor Infektionen mit heterologen HCMV-Stämmen verantwortlich sind (Klein *et al.*, 1999).

## 4.2 Immunreaktion nach DNA-Vakzinierung

Die Entwicklung einer DNA-Vakzine gegen HCMV wird zur Zeit von mehreren Arbeitsgruppen versucht. Aufgrund des engen Wirtsspektrums von HCMV ist es nicht möglich, HCMV DNA-immunisierte Mäuse zu infizieren und somit den durch die Immunisierung induzierten Schutz zu überprüfen. Ein Erfolg der DNA-Vakzinierung ist somit nur anhand der Induktion von humoraler und/oder zellulärer Immunantwort im immunisierten Tier abzulesen. HCMV-spezifische Antikörper gegen gB und pp65 konnten in mehreren Studien im Serum DNA-immunisierter Mäuse nachgewiesen werden (Pande *et al.*, 1995; Endresz *et al.*, 1999; Hwang *et al.*, 1999; Endresz *et al.*, 2001). Eine zelluläre Immunantwort gegen HCMV pp65 konnte von Endresz *et al.* in DNA-immunisierten Mäusen induziert werden (Endresz *et al.*, 1999; Endresz *et al.*, 2001). Diese pp65-spezifische CTL-Antwort war jedoch nur in maximal 54% aller DNA-immunisierter Mäuse nachweisbar.

Die in dieser Arbeit entwickelte DNA-Vakzine gegen HCMV sollte die genetische Variabilität der immundominanten Proteine berücksichtigen. Der Impfstoff sollte deshalb aus verschiedenen Vektoren bestehen, die alle vier gB-Prototypen, beide gH-Prototypen und das Glykoprotein gL für eine Induktion der humoralen Immunantwort, sowie das Phosphoprotein pp65 für eine Induktion der zellulären Immunantwort enthalten. Für eine Konstruktion dieser verschiedenen Vakzinevektoren diente der eukaryotische Expressionsvektor pJW4303 als Grundlage. Zusätzlich wurde ein Vektor konstruiert, der ein lösliches Glykoprotein gB1 ohne

Transmembrandomäne und zytoplasmatischen Teil exprimiert (VR1055gB1 $\Delta$ TM). Mäuse wurden mit einzelnen Vektoren oder mit einem Cocktail aus verschiedenen Vektoren immunisiert. Die Gabe von verschiedenen Plasmiden gleichzeitig in einem Cocktail wird häufig verwendet und bietet keine Nachteile gegenüber der Immunisierung mit einzelnen Vektoren (Lu *et al.*, 1996b). Als Positivkontrolle für die Immunisierung diente der Expressionsvektor pRc/CMV2gB von Nigel Temperton. Bei den rekombinanten Fragmenten der vier gB-Vektoren pJW4303gB1-4 sowie des Vektors pJW4303gL kam es durch Deletionen zu einem Frameshift und zu einem Translationsstop. Mäuse, die mit diesen Expressionsvektoren immunisiert worden waren, wurden nur auf eine Verteilung von Plasmid-DNA in den verschiedenen Organen hin untersucht. Mäuse, die mit den Vektoren VR1055gB1 $\Delta$ TM, pRc/CMV2gB, pJW4303gH1, pJW4303gH2 und pJW4303pp65 immunisiert worden waren wurden auf eine Induktion der Immunantwort hin untersucht.

#### 4.2.1 Humorale Immunantwort

Eine humorale Immunantwort konnte in Mäusen induziert werden, die i.m. mit den gB-exprimierenden Vektoren VR1055gB1 $\Delta$ TM und pRc/CMV2gB immunisiert wurden. HCMV gB-spezifische Antikörper konnten frühestens drei und bis mindestens 23 Wochen nach Immunisierung nachgewiesen werden. Antikörpertiter erreichten Werte von bis zu 640 im IFT. Ein wesentlicher Unterschied in der Immunantwort nach Immunisierung mit dem membrangebundenen gB-exprimierendem Vektor pRc/CMV2gB und dem löslichen gB-exprimierendem Vektor VR1055gB1 $\Delta$ TM konnte nicht festgestellt werden. Durch die Zugabe des Adjuvans AdjuPhos<sup>®</sup> konnten in der frühen Phase nach Immunisierung (Woche sechs) höhere Antikörpertiter induziert werden als durch Immunisierungen ohne Adjuvans. Auf den Antikörpertiter im späteren Verlauf hatte AdjuPhos<sup>®</sup> jedoch keinen Einfluß. Daß Adjuvantien auch einen gegenteiligen Effekt haben können, zeigt die Studie von Endresz *et al.* (Endresz *et al.*, 2001). Die Vorbehandlung der DNA-immunisierten Mäuse mit dem Adjuvans Bupivacaine führte zu einem verringerten Antikörpertiter im Gegensatz zu Immunisierungen ohne Adjuvans.

Neben der intramuskulären DNA-Immunisierung wurden Mäuse auch intranasal DNA-immunisiert, um eine mukosale Immunität (IgA-Antikörper) zu induzieren. Dies ist gerade für einen HCMV-Impfstoff von großer Bedeutung, da bei HCMV die Infektion über die



Schleimhäute erfolgt. Bei einem Vergleich von i.m. und i.n. Immunisierung konnten in den i.m. immunisierten Mäusen ab Woche fünf Antikörper mit einem Titer von 320 nachgewiesen werden, wohingegen in i.n. immunisierten Tieren erst ab Woche neun Antikörper mit einem geringen Titer von 20 detektiert wurden. Diese Antikörper in i.n. immunisierten Tieren gehörten zur Immunglobulinklasse IgG+IgM, HCMV gB-spezifische IgA-Antikörper konnten hingegen nicht nachgewiesen werden. Eine mukosale DNA-Immunisierung gegen HCMV ist in der Literatur bislang nicht beschrieben. In einer Studie zur DNA-Immunisierung von Kühen gegen das Bovine Herpesvirus-1 konnten jedoch mit einer intravaginalen Applikation der DNA-Vakzine IgG- und IgA-Antikörper im Serum und im Nasensekret nachgewiesen werden (Loehr *et al.*, 2001).

Eine Antikörperantwort nach DNA-Immunisierung kann abhängig von dem Maus-Stamm, den man immunisiert, sehr stark variieren (Tang *et al.*, 1992). Um zu überprüfen, ob die Immunantwort gegen HCMV gB nach DNA-Vakzinierung Maus-Stamm-abhängig ist, wurden Mäuse mit drei verschiedenen Haplotypen (Balb/c, C3H und Black6) i.m. mit dem Vektor pRc/CMV2gB immunisiert. HCMV gB-spezifische-Antikörper konnten in allen Maus-Stämmen induziert werden. Die geringsten Antikörpertiter wurden in Black6-Mäusen gefunden, die höchsten Titer wurden in C3H-Mäusen nachgewiesen.

Seren DNA-immunisierter Mäuse, die im IFT positiv waren für HCMV gB, wurden in einem Neutralisationstest auf ihre Neutralisationskapazität hin untersucht. Keines dieser Seren war neutralisierend. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die nach DNA-Immunisierung mit verschiedenen gB-exprimierenden Vektoren neutralisierende Antikörper nachweisen konnten (Endresz *et al.*, 1999; Hwang *et al.*, 1999; Endresz *et al.*, 2001). Ein Grund hierfür könnten die unterschiedlichen Nachweisverfahren mit eventuell unterschiedlichen Empfindlichkeiten sein. Während Endresz *et al.* und Hwang *et al.* einen Plaque-Reduktions-Assay zum Nachweis von Virusneutralisation anwandten, wurde in dieser Arbeit ein Mikroneutralisationstest benutzt, der auf der Anfärbung von IE-Protein in infizierten Zellen beruht. Möglich ist auch, daß sich neutralisierende Antikörper erst später nach der Immunisierung bilden. So werden bei HCMV-Primärinfektionen im Menschen erst 50 – 200 Tage nach der Infektion Antikörper gegen die Glykoproteine gB und gH gebildet (Klein *et al.*, 1999).

Antikörper gegen die Glykoproteine gH1 und gH2 sowie gegen das Phosphoprotein pp65 konnten in den DNA-immunisierten Mäusen nicht induziert werden. Grund hierfür ist möglicherweise der Expressionsvektor pJW4303 selbst. Obwohl eine Proteinexpression *in*

*in vitro* in transfizierten Zellen nachgewiesen werden konnte und obwohl der Vektor pJW4303 für andere DNA-Immunisierungen in Mäusen und Makakken bereits erfolgreich eingesetzt wurde (Justewicz *et al.*, 1995; Justewicz and Webster, 1996; Lu *et al.*, 1996a; Yasutomi *et al.*, 1996; Robinson *et al.*, 1997), konnte in keiner Maus, die mit einem HCMV-exprimierenden pJW4303 Plasmid immunisiert wurde eine Antikörperantwort induziert werden. Möglich ist, daß im Gegensatz zu einer Expression *in vitro*, die Proteinexpression *in vivo* vermindert ist. pJW4303 ist ein Vektor, der seit mehr als sechs Jahren von verschiedenen Arbeitsgruppen für Immunisierungsstudien verwendet wird, eine verifizierte Sequenz des Plasmides ist jedoch nirgendwo veröffentlicht. Es ist gut möglich, daß die sich im Umlauf befindenden Plasmide Sequenzenunterschiede besitzen. So hatte der pJW4303 Vektor, den wir von Harriet Robinson bekommen haben zwei Deletionen von jeweils 15 bzw. 9 Aminosäuren etwa 400 Basenpaare downstream der Insertionsstelle gegenüber der von ihr beschriebenen Sequenz.

Pande *et al.* konnten durch DNA-Immunisierung Antikörper gegen pp65 in Mäusen induzieren (Pande *et al.*, 1995). In dieser Studie wurde jedoch auch gezeigt, daß die Höhe der Antikörper-Titer abhängig war von dem benutzten Vektorkonstrukt.

#### 4.2.2 Zelluläre Immunantwort

Eine zelluläre Immunantwort gegen das Phosphoprotein pp65 des HCMV konnte durch Immunisierung mit dem Expressionsvektor pJW4303pp65 nicht induziert werden. In einem CTL-Assay waren zytotoxische T-Zellen von Mäusen, die mit pJW4303pp65 immunisiert wurden, nicht in der Lage pp65-spezifische Zielzellen zu lysieren. Bei diesen Zielzellen handelte es sich um Maus Mastozytomazellen (P815-Zellen), die entweder mit Vaccinia Virus pp65 infiziert oder mit einem von 11 verschiedenen pp65-spezifischen Peptiden beladen worden waren. Diese pp65-spezifischen Peptide wurden mit Hilfe der Datenbank SYFPEITHI (Rammensee *et al.*, 1999) ausgewählt. Mit dem von SYFPEITHI verwendeten T-Zell-Epitope-Vorhersage-Algorithmus sollte die Wahrscheinlichkeit, unter diesen 11 Peptiden das natürlich präsentierte Epitop zu finden, größer als 80% sein. Um zu zeigen, daß eine antigenspezifische Lyse von Zielzellen möglich ist, wurde ein CTL-Assay in einem anderen viralen System durchgeführt. Zytotoxische T-Lymphozyten von Mäusen, die i.v. mit Vaccinia Virus RSV M2 infiziert worden waren, lysierten mehr als 80% der RSV-spezifischen Zielzellen.

Dadurch konnte gezeigt werden, daß der CTL-Assay in einem homologen System funktioniert.

Bislang konnte einzig die Arbeitsgruppe von Eva Gönczöl eine HCMV pp65-spezifische zelluläre Immunantwort in der Maus nachweisen (Endresz *et al.*, 1999; Endresz *et al.*, 2001). Eine pp65-spezifische CTL-Antwort konnte in dieser Studie jedoch nur in max. 54% der immunisierten Mäuse induziert werden. Grund für eine fehlende zelluläre Immunantwort in den in dieser Arbeit mit dem Vektor pJW4303pp65 immunisierten Tieren könnte wiederum das Vektorsystem pJW4303 sein (s.o.). Möglich ist jedoch auch, daß HCMV pp65 ein schlechtes Ziel zytotoxischer T-Lymphozyten in der Maus ist. Das pp65 Protein ist zwar das Hauptziel der zellulären Immunantwort im Menschen, dies muß jedoch nicht auch für die Maus zutreffen.

### **4.3 Verteilung von DNA-Vakzine-Vektoren und exprimiertem Antigen in Organen immunisierter Mäuse und in deren Nachkommen**

Die DNA Immunisierung mit Plasmiden, die für virale, bakterielle, parasitische oder Tumor-Antigene kodieren, ist ein vielversprechender neuer Ansatz um eine protektive Immunantwort zu induzieren. Es gibt jedoch auch einige Sicherheitsbedenken gegenüber dieser neuen Vakzinierungsmethode. So besteht die Möglichkeit, daß die Plasmid-DNA in das Wirtsgenom integriert und durch eine Aktivierung von Onkogenen oder eine Inaktivierung von Tumor-Suppressor-Genen das Tumorrisiko im Wirt erhöht (Nichols *et al.*, 1995; Martin *et al.*, 1999; Ledwith *et al.*, 2000; Manam *et al.*, 2000). Es wird auch befürchtet, daß eine persistente Expression eines fremden Genes während der Ausreifung des Immunsystems vor und nach der Geburt zu einer Toleranz gegen das fremde Antigen führen könnte (Klinman *et al.*, 1997; Gorecki and Simons, 1999). Deshalb fordert eine WHO Richtlinie zur Sicherstellung der Qualität von DNA Impfstoffen, daß die Verteilung, Persistenz und die mögliche Integration der Plasmid DNA in vorklinischen Sicherheitsstudien untersucht wird (Robertson and Griffiths, 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Verteilung und die Persistenz von intramuskulär und intrakutan applizierter Plasmid DNA in verschiedenen Geweben DNA immunisierter Mäuse sowie die Übertragung des Impfvektors auf deren Nachkommen untersucht. In immunisierten erwachsenen Mäusen konnte Plasmid DNA in nahezu allen untersuchten Organen sechs

Wochen nach der letzten i.m. oder i.c. Immunisierung nachgewiesen werden. Die Ergebnisse machen deutlich, dass es unbedingt notwendig ist, die sensitivste Methode zum Nachweis der Plasmid-DNA zu verwenden, da in den meisten Geweben die Kopienzahl unter 10 Plasmidkopien pro  $\mu\text{g}$  Gewebe-DNA lag. In der vorliegenden Arbeit wurde die DNA vor der Amplifikation mit BamH I verdaut, um die Sensitivität zu erhöhen. Aufgrund der geringen Sensitivität der TaqMan-PCR (eine Log-Stufe weniger sensitiv als die nPCR) war es fast unmöglich, die geringe Plasmid-DNA-Last in den Geweben zu quantifizieren. Bei den Gewebeproben war eine TaqMan-PCR-Quantifizierung der Plasmid-DNA nur für die Immunisierungsstelle, den Knochen, den Quadriceps und den abführenden Lymphknoten möglich.

Bei diesen geringen Mengen an Plasmid-DNA in den verschiedenen Geweben ist es schwierig, eine Integration des Immunisierungsvektors in das Genom des Wirtes zu untersuchen. Mit Kopienzahlen unter 10 Kopien pro  $\mu\text{g}$  genomischer DNA ist die Wahrscheinlichkeit, ein Integrationsereignis nachzuweisen, extrem gering.

Die Immunisierungsstudie in sich fortpflanzenden Mäusen und deren Nachkommen zeigt, dass Plasmid-DNA von immunisierten Müttern und Vätern auf die Nachkommen übertragen werden kann. Die Immunisierung von weiblichen Mäusen, während oder vor einer Schwangerschaft, führte zu einer Übertragung der DNA-Vakzine-Vektoren auf ihre Feten und Nachkommen. Die übertragene Plasmid-DNA war fünf Wochen nach der Geburt in allen analysierten Geweben der Nachkommen nachweisbar. Ob die Übertragung der Plasmid-DNA transplazental oder über die Keimbahn erfolgte, ist nicht geklärt. Selbst die DNA-Immunisierung männlicher Mäuse vor einer Anpaarung mit weiblichen Mäusen führte zu einer Übertragung des Immunisierungsvektors auf die Nachkommen. Plasmid-DNA konnte in Neugeborenen an Tag eins nach der Geburt nachgewiesen werden, jedoch nicht mehr fünf Wochen später. In diesem Fall kann eine Übertragung der Plasmid-DNA auf die Nachkommen nur über das Sperma erfolgt sein. Der Mechanismus der Übertragung von Plasmid-DNA auf die Nachkommen ist bislang noch völlig unklar. Ungeklärt ist auch, ob die Plasmid-DNA in den immunisierten Tieren und deren Nachkommen episomal vorliegt oder ob sie in das Wirtsgenom integriert wurde. Um dies zu prüfen, müssten die Nachkommen DNA-immunisierter Mäuse gezüchtet über mehrere Generationen auf Plasmid-DNA hin untersucht werden. Episomal vorliegende Plasmid-DNA sollte sich hierbei herausverdünnen, integrierte DNA müsste auch nach mehreren Generationen noch nachweisbar sein.

Wir stellten uns weiter die Frage, ob Plasmid-DNA, die nach DNA-Immunisierung in den verschiedensten Organen zu finden ist, das fremde Antigen in diesen Organen exprimieren kann. Für diese Untersuchungen wurden Mäuse i.m. mit dem Vektor pCMV-S immunisiert, der das Oberflächenantigen des Hepatitis B Virus (HBsAg) exprimiert. Dieser Vektor wird für Untersuchungen von DNA-Immunisierungen häufig als Modellsystem genutzt, da Antigen in ausreichender Menge exprimiert wird und weil es gut etablierte Tests für einen Nachweis von Antikörpern und Antigen gibt. Davis et al. konnten HBsAg bereits 10 Tage nach i.m. DNA-Immunisierung im Muskelgewebe nachweisen (Davis *et al.*, 1993). Die Antigen-Menge fiel jedoch ab Tag 30 deutlich ab und es wurden außer dem Muskelgewebe auch keine anderen Organe auf HBsAg untersucht. In unserer Arbeit konnte HBs-Antigen in allen untersuchten Organen bis 10 Wochen nach der letzten Immunisierung nachgewiesen werden, auch wenn die konkreten Antigen-Mengen von Maus zu Maus stark schwankten. Dieses Ergebnis zeigt deutlich, daß die DNA-Vakzine-Vektoren nicht nur im gesamten Körper persistieren können, sondern daß auch eine Expression des jeweiligen Antigens im gesamten Körper stattfindet. Für zukünftige Studien wäre es interessant zu untersuchen, ob HBsAg auch in den Nachkommen pCMV-S immunisierter Mäuse nachzuweisen ist und ob es dadurch in den Nachkommen zu Toleranz gegenüber dem fremden Antigen kommen kann.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, daß Plasmid DNA nach i.m. oder i.c. DNA Immunisierung weit länger und in viel mehr Geweben persistiert als bislang beschrieben (Wolff *et al.*, 1992; Winegar *et al.*, 1996; Parker *et al.*, 1999; Mena *et al.*, 2001). Zusätzlich konnte eine Übertragung der Plasmid DNA auf die Nachkommen immunisierter Tiere beobachtet werden. Tsukamoto et al. konnten Plasmid DNA und Protein bis zu einem Monat nach der Geburt in Feten und Neugeborenen nachweisen, wenn die DNA trächtigen Mäusen intravenös injiziert wurde (Tsukamoto *et al.*, 1995). In der vorliegenden Arbeit konnte die Übertragung von Plasmid DNA auf die Nachkommen i.m. immunisierter trächtiger Mäuse bestätigt werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, daß eine Übertragung von Plasmid DNA auf Nachkommen auch dann stattfindet, wenn die Mütter oder Väter Wochen vor der Anpaarung immunisiert wurden. Es stellt sich die Frage, ob der Nachweis von Plasmid DNA in den Geweben und in den Nachkommen DNA immunisierter Mäuse ein physiologisches oder ein pathologisches Phänomen darstellt. Schubbert et al. fütterten Mäuse mit der DNA des Bakteriophagen M13 und fanden mittels FISH-Technologie verdaute M13 DNA integriert in verschiedenen Zellen und Geweben der gefütterten Mäuse (Schubbert *et al.*, 1997; Schubbert *et al.*, 1998). Hohlweg und Dörfler amplifizierten pflanzliche DNA aus dem Verdauungstrakt, der Milz und der

---

Leber von Mäusen, die mit den Blättern von Sojabohnen gefüttert wurden (Hohlweg and Doerfler, 2001). Sie fanden weder einen Hinweis für eine Expression noch für eine Keimbahnübertragung der oral verabreichten Gene. Jedoch konnte nach Fütterung trächtiger Mäuse mit der DNA des Bakteriophagen M13 die fremde DNA mittels FISH-Technologie in Feten und Neugeborenen nachgewiesen werden (Schubbert *et al.*, 1998). Die medizinische und evolutionsbiologische Bedeutung dieser Beobachtung ist bislang unklar. Im Bereich der Reproduktions-Medizin ist es inzwischen allerdings eine gut dokumentierte Tatsache, daß episodale DNA über Spermatozoen auf die Nachkommen übertragen werden kann (Bachiller *et al.*, 1991; Camaioni *et al.*, 1992; Spadafora, 1998). Die Aufnahme von episomaler DNA in Spermatozoen wird über DNA-bindende Proteine auf der Oberfläche der Spermazellen reguliert, eine Internalisation in den Kern ist CD4-Rezeptor vermittelt (Spadafora, 1998). Spermavermittelter Gentransfer führt zu einer transgenen F1 Nachfolgeneration in Mäusen und vielen anderen Spezies (Lavitrano *et al.*, 1989; Maione *et al.*, 1998; Spadafora, 1998). Die Bedeutung eines Gentransfers durch Nahrung oder Spermatozoen in der Natur ist völlig unbekannt. Man kann jedoch darüber spekulieren, ob diese Mechanismen dazu beitragen die Evolution anzutreiben. Es ist nun von großer Bedeutung die Konsequenzen eines Gentransfers durch DNA-Immunisierung zu untersuchen. Es muß geprüft werden, ob es sich hierbei um ein physiologisches Phänomen handelt oder ob die Plasmid DNA in den Feten Krebs, Autoimmunerkrankungen oder Toleranz gegen das Antigen erzeugen kann.

---

## 5. Literaturverzeichnis

- ADLER, S.P., PLOTKIN, S.A., GONCZOL, E., CADOZ, M., MERIC, C., WANG, J.B., DELLAMONICA, P., BEST, A.M., ZAHRADNIK, J., PINCUS, S., BERENCSI, K., COX, W.I., and GYULAI, Z. (1999). A canarypox vector expressing cytomegalovirus (CMV) glycoprotein B primes for antibody responses to a live attenuated CMV vaccine (Towne). *J Infect Dis* 180, 843-846.
- ALBERT, M.L., PEARCE, S.F., FRANCISCO, L.M., SAUTER, B., ROY, P., SILVERSTEIN, R.L., and BHARDWAJ, N. (1998). Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 188, 1359-1368.
- ANDERSON, R.A., LIU, D.X., and GOMPELS, U.A. (1996). Definition of a human herpesvirus-6 betaherpesvirus-specific domain in glycoprotein gH that governs interaction with glycoprotein gL: substitution of human cytomegalovirus glycoproteins permits group-specific complex formation. *Virology* 217, 517-526.
- AYATA, M., SUGANO, T., MURAYAMA, T., SAKAMURO, D., TAKEGAMI, T., and MATSUMOTO, Y.F. (1994). Different antibody response to a neutralizing epitope of human cytomegalovirus glycoprotein B among seropositive individuals. *J.Med.Virol.* 43, 386-392.
- BACHILLER, D., SCHELLANDER, K., PELI, J., and RUTHER, U. (1991). Liposome-mediated DNA uptake by sperm cells. *Mol Reprod Dev* 30, 194-200.
- BANKS, T., HUO, B., KOUSOULAS, K., SPAETE, R., PACHL, C., and PEREIRA, L. (1989). A major neutralizing domain maps within the carboxyl-terminal half of the cleaved cytomegalovirus B glycoprotein. *J.Gen.Virol.* 70, 979-985.
- BASGOZ, N., QADRI, I., NAVARRO, D., SEARS, A., LENNETTE, E., and YOUNGBLOM, J.P. (1992). The amino terminus of human cytomegalovirus glycoprotein B contains epitopes that vary among strains. *J.Gen.Virol.* 73, 983-988.
- BECKER, Y., DARAI, G., HUANG, E. S. (1993). *Molecular aspects of human cytomegalovirus disease*. (Springer Verlag).
- BENDIGS, S., SALZER, U., LIPFORD, G.B., WAGNER, H., and HEEG, K. (1999). CpG-oligodeoxynucleotides co-stimulate primary T cells in the absence of antigen-presenting cells. *Eur J Immunol* 29, 1209-1218.
- BENINGA, J., KALBACHER, H., and MACH, M. (1996). Analysis of T helper cell response to glycoprotein H (gpUL75) of human cytomegalovirus: evidence for strain-specific T cell determinants. *J.Infect.Dis.* 173, 1051-1061.

- BERENCSI, K., GONCZOL, E., ENDRESZ, V., KOUGH, J., TAKEDA, S., GYULAY, Z.P., and RANDO, R.F. (1996). The N-terminal 303 amino acids of the human cytomegalovirus envelope glycoprotein B (UL55) and the exon 4 region of the major immediate early protein 1 (UL123) induce a cytotoxic T-cell response. *Vaccine* 14, 369-374.
- BERENCSI, K., GYULAI, Z., GONCZOL, E., PINCUS, S., COX, W.I., MICHELSON, S., KARI, L., MERIC, C., CADDOZ, M., ZAHRADNIK, J., STARR, S., and PLOTKIN, S. (2001). A canarypox vector-expressing cytomegalovirus (CMV) phosphoprotein 65 induces long-lasting cytotoxic T cell responses in human CMV- seronegative subjects. *J Infect Dis* 183, 1171-1179.
- BONGARTS, A., VON LAER, D., VOGELBERG, C., EBERT, K., VAN LUNZEN, J., GARWEG, J., VEITH, P., HUFERT, F.T., HALLER, O., and MEYER-KÖNIG, U. (1996). Glycoprotein B genotype of human cytomegalovirus: distribution in HIV infected patients. *Scand.J.Infect.Dis.* 28, 447-449.
- BOPPANA, S.B., and BRITT, W.J. (1996). Recognition of human cytomegalovirus gene products by HCMV-specific cytotoxic T cells. *Virology* 222, 293-296.
- BOPPANA, S.B., RIVERA, L.B., FOWLER, K.B., MACH, M., and BRITT, W.J. (2001). Intrauterine transmission of cytomegalovirus to infants of women with preconceptional immunity. *N Engl J Med* 344, 1366-1371.
- BORYSIEWICZ, L.K., HICKLING, J.K., GRAHAM, S., SINCLAIR, J., CRANAGE, M.P., SMITHGL., and SISSONS, J.G. (1988). Human cytomegalovirus-specific cytotoxic T cells. Relative frequency of stage-specific CTL recognizing the 72-kD immediate early protein and glycoprotein B expressed by recombinant vaccinia viruses. *J.Exp.Med.* 168, 919-931.
- BRITT, W.J. (1984). Neutralizing antibodies detect a disulfide-linked glycoprotein complex within the envelope of human cytomegalovirus. *Virology* 135, 369-378.
- BRITT, W.J., ALFORD C.A. (1996). Cytomegalovirus. In *Fields Virology*. F.B. N., ed. (Raven Publishers, Philadelphia).
- BRITT, W.J., VUGLER, L., BUTFILOSKI, E.J., and STEPHENS, E.B. (1990). Cell surface expression of human cytomegalovirus (HCMV) gp55-116 (gB): use of HCMV-recombinant vaccinia virus-infected cells in analysis of the human neutralizing antibody response. *J.Virol.* 64, 1079-1085.
- BRITT, W.J., VUGLER, L., and STEPHENS, E.B. (1988). Induction of complement-dependent and -independent neutralizing antibodies by recombinant-derived human cytomegalovirus gp55-116 (gB). *J Virol* 62, 3309-3318.
- BRITT, W.J., and VUGLER, L.G. (1989). Processing of the gp55-116 envelope glycoprotein complex (gB) of human cytomegalovirus. *J.Virol.* 63, 403-410.
- BRITT, W.J., and VUGLER, L.G. (1992). Oligomerization of the human cytomegalovirus major envelope glycoprotein complex gB (gp55-116). *J.Virol.* 66, 6747-6754.



- CAMAIONI, A., RUSSO, M.A., ODORISIO, T., GANDOLFI, F., FAZIO, V.M., and SIRACUSA, G. (1992). Uptake of exogenous DNA by mammalian spermatozoa: specific localization of DNA on sperm heads. *J Reprod Fertil* 96, 203-212.
- CHEE, M.S., BANKIER, A.T., BECK, S., BOHNI, R., BROWN, C.M., CERNY, R., HORSNELL, T., KOUZARIDES, T., MARTIGNETTI, J.A., and ET AL. (1990). Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. [Review]. *Current Topics in Microbiology & Immunology* 154, 125-169.
- CHOU, S. (1992a). Comparative analysis of sequence variation in gp116 and gp55 components of glycoprotein B of human cytomegalovirus. *Virology* 188, 388-390.
- CHOU, S. (1992b). Molecular epidemiology of envelope glycoprotein H of human cytomegalovirus. *J.Infect.Dis.* 166, 604-607.
- CHOU, S.W. (1990). Differentiation of cytomegalovirus strains by restriction analysis of DNA sequences amplified from clinical specimens. *J.Infect.Dis.* 162, 738-742.
- CORR, M., LEE, D.J., CARSON, D.A., and TIGHE, H. (1996). Gene vaccination with naked plasmid DNA: mechanism of CTL priming. *J.Exp.Med.* 184, 1555-1560.
- COWDERY, J.S., CHACE, J.H., YI, A.K., and KRIEG, A.M. (1996). Bacterial DNA induces NK cells to produce IFN-gamma in vivo and increases the toxicity of lipopolysaccharides. *J Immunol* 156, 4570-4575.
- CRANAGE, M.P., KOUZARIDES, T., BANKIER, A.T., SATCHWELL, S., WESTON, K.T., BARRELL, B., HART, H., BELL, S.E., MINSON, A.C., and ET AL. (1986). Identification of the human cytomegalovirus glycoprotein B gene and induction of neutralizing antibodies via its expression in recombinant vaccinia virus. *EMBO J.* 5, 3057-3063.
- CRANAGE, M.P., SMITH, G.L., BELL, S.E., HART, H., BROWN, C., BANKIER, A.T.T., BARRELL, B.G., and MINSON, T.C. (1988). Identification and expression of a human cytomegalovirus glycoprotein with homology to the Epstein-Barr virus BXLF2 product, varicella-zoster virus gpIII, and herpes simplex virus type 1 glycoprotein H. *J.Virol.* 62, 1416-1422.
- DAVIS, H.L., MICHEL, M.L., and WHALEN, R.G. (1993). DNA-based immunization induces continuous secretion of hepatitis B surface antigen and high levels of circulating antibody. *Hum Mol Genet* 2, 1847-1851.
- DOE, B., SELBY, M., BARNETT, S., BAENZIGER, J., and WALKER, C.M. (1996). Induction of cytotoxic T lymphocytes by intramuscular immunization with plasmid DNA is facilitated by bone marrow-derived cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 93, 8578-8583.
- ENDRESZ, V., BURIAN, K., BERENCSEI, K., GYULAI, Z., KARI, L., HORTON, H., VIROK, D., MERIC, C., PLOTKIN, S.A., and GONCZOL, E. (2001). Optimization of DNA immunization against human cytomegalovirus. *Vaccine* 19, 3972-3980.

- ENDRESZ, V., KARI, L., BERENCSEI, K., KARI, C., GYULAI, Z., JENEY, C., PINCUS, S., RODECK, U., MERIC, C., PLOTKIN, S.A., and GONCZOL, E. (1999). Induction of human cytomegalovirus (HCMV)-glycoprotein B (gB)-specific neutralizing antibody and phosphoprotein 65 (pp65)-specific cytotoxic T lymphocyte responses by naked DNA immunization. *Vaccine* 17, 50-58.
- FARRELL, H.E., VALLY, H., LYNCH, D.M., FLEMING, P., SHELLAM, G.R., and SCALZO, A.A.D.P. (1997). Inhibition of natural killer cells by a cytomegalovirus MHC class I homologue in vivo [see comments]. *Nature* 386, 510-514.
- FISH, K.N., STENGLEIN, S.G., IBANEZ, C., and NELSON, J.A. (1995). Cytomegalovirus persistence in macrophages and endothelial cells. *Scand J Infect Dis Suppl* 99, 34-40.
- FREY, S.E., HARRISON, C., PASS, R.F., YANG, E., BOKEN, D., SEKULOVICH, R.E., PERCELL, S., IZU, A.E., HIRABAYASHI, S., BURKE, R.L., and DULIEGE, A.M. (1999). Effects of antigen dose and immunization regimens on antibody responses to a cytomegalovirus glycoprotein B subunit vaccine. *J Infect Dis* 180, 1700-1703.
- FRIES, B.C., CHOU, S., BOECKH, M., and TOROK STORB, B. (1994). Frequency distribution of cytomegalovirus envelope glycoprotein genotypes in bone marrow transplant recipients. *J.Infect.Dis.* 169, 769-774.
- GILBERT, M.J., RIDDELL, S.R., PLACHTER, B., and GREENBERG, P.D. (1996). Cytomegalovirus selectively blocks antigen processing and presentation of its immediate-early gene product. *Nature* 383, 720-722.
- GILKESON, G.S., PIPPEN, A.M., and PISETSKY, D.S. (1995). Induction of cross-reactive anti-dsDNA antibodies in preautoimmune NZB/NZW mice by immunization with bacterial DNA. *J Clin Invest* 95, 1398-1402.
- GONZALEZ ARMAS, J.C., MORELLO, C.S., CRANMER, L.D., and SPECTOR, D.H. (1996). DNA immunization confers protection against murine cytomegalovirus infection. *J.Virol.* 70, 7921-7928.
- GORECKI, D.C., and SIMONS, J.P. (1999). The dangers of DNA vaccination. *Nat Med* 5, 126.
- GURUNATHAN, S., KLINMAN, D.M., and SEDER, R.A. (2000). DNA vaccines: immunology, application, and optimization\*. *Annu Rev Immunol* 18, 927-974.
- HENGEL, H., BRUNE, W., and KOSZINOWSKI, U.H. (1998). Immune evasion by cytomegalovirus--survival strategies of a highly adapted opportunist. [Review] [60 refs]. *Trends in Microbiology* 6, 190-197.
- HOHLWEG, U., and DOERFLER, W. (2001). On the fate of plant or other foreign genes upon the uptake in food or after intramuscular injection in mice. *Mol Genet Genomics* 265, 225-233.
- HUBER, M.T., and COMPTON, T. (1997). Characterization of a novel third member of the human cytomegalovirus glycoprotein H-glycoprotein L complex. *J.Virol.* 71, 5391-5398.
- HUBER, M.T., and COMPTON, T. (1998). The human cytomegalovirus UL74 gene encodes the third component of the glycoprotein H-glycoprotein L-containing envelope complex. *J.Virol.* 72, 8191-8197.

- HWANG, E.S., KWON, K.B., PARK, J.W., KIM, D.J., PARK, C.G., and CHA, C.Y. (1999). Induction of neutralizing antibody against human cytomegalovirus (HCMV) with DNA-mediated immunization of HCMV glycoprotein B in mice. *Microbiol Immunol* 43, 307-310.
- ICHINO, M., MOR, G., CONOVER, J., WEISS, W.R., TAKENO, M., ISHII, K.J., and KLINMAN, D.M. (1999). Factors associated with the development of neonatal tolerance after the administration of a plasmid DNA vaccine. *J Immunol* 162, 3814-3818.
- JAKOB, T., WALKER, P.S., KRIEG, A.M., UDEY, M.C., and VOGEL, J.C. (1998). Activation of cutaneous dendritic cells by CpG-containing oligodeoxynucleotides: a role for dendritic cells in the augmentation of Th1 responses by immunostimulatory DNA. *J Immunol* 161, 3042-3049.
- JUSTEWICZ, D.M., MORIN, M.J., ROBINSON, H.L., and WEBSTER, R.G. (1995). Antibody-forming cell response to virus challenge in mice immunized with DNA encoding the influenza virus hemagglutinin. *J.Virol.* 69, 7712-7717.
- JUSTEWICZ, D.M., and WEBSTER, R.G. (1996). Long-term maintenance of B cell immunity to influenza virus hemagglutinin in mice following DNA-based immunization. *Virology* 224, 10-17.
- KARI, B., LIU, Y.N., GOERTZ, R., LUSSENHOP, N., STINSKI, M.F., and GEHRZ, R. (1990). Structure and composition of a family of human cytomegalovirus glycoprotein complexes designated gC-I (gB). *J.Gen.Virol.* 71, 2673-2680.
- KEAY, S., and BALDWIN, B. (1991). Anti-idiotypic antibodies that mimic gp86 of human cytomegalovirus inhibit viral fusion but not attachment. *J.Virol.* 65, 5124-5128.
- KHATTAB, B.A., LINDENMAIER, W., FRANK, R., and LINK, H. (1997). Three T-cell epitopes within the C-terminal 265 amino acids of the matrix protein pp65 of human cytomegalovirus recognized by human lymphocytes. *J.Med.Virol.* 52, 68-76.
- KLEIN, M., SCHOPPEL, K., AMVROSSIADIS, N., and MACH, M. (1999). Strain-specific neutralization of human cytomegalovirus isolates by human sera. *J Virol* 73, 878-886.
- KLINMAN, D.M., TAKENO, M., ICHINO, M., GU, M., YAMSHCHIKOV, G., MOR, G., and CONOVER, J. (1997). DNA vaccines: safety and efficacy issues. *Springer Semin Immunopathol* 19, 245-256.
- KLINMAN, D.M., YI, A.K., BEAUCAGE, S.L., CONOVER, J., and KRIEG, A.M. (1996). CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 2879-2883.
- KNISS, N., MACH, M., FAY, J., and BRITT, W.J. (1991). Distribution of linear antigenic sites on glycoprotein gp55 of human cytomegalovirus. *J.Virol.* 65, 138-146.
- KONDO, K., and MOCARSKI, E.S. (1995). Cytomegalovirus latency and latency-specific transcription in hematopoietic progenitors. [Review] [24 refs]. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases - Supplementum* 99, 63-67.

- KRIEG, A.M., YI, A.K., MATSON, S., WALDSCHMIDT, T.J., BISHOP, G.A., TEASDALE, R., KORETZKY, G.A., and KLINMAN, D.M. (1995). CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374, 546-549.
- LANG, D.J., and KUMMER, J.F. (1975). Cytomegalovirus in semen: observations in selected populations. *J.Infect.Dis.* 132, 472-473.
- LAVITRANO, M., CAMAIONI, A., FAZIO, V.M., DOLCI, S., FARACE, M.G., and SPADAFORA, C. (1989). Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice. *Cell* 57, 717-723.
- LEACH, C.T., DETELS, R., HENNESSEY, K., LIU, Z., VISSCHER, B.R., DUDLEY, J.P., and CHERRY, J.D. (1994). A longitudinal study of cytomegalovirus infection in human immunodeficiency virus type 1-seropositive homosexual men: molecular epidemiology and association with disease progression. *J Infect Dis* 170, 293-298.
- LEDWITH, B.J., MANAM, S., TROILO, P.J., BARNUM, A.B., PAULEY, C.J., GRIFFITHS, T.G., 2ND, HARPER, L.B., BEARE, C.M., BAGDON, W.J., and NICHOLS, W.W. (2000). Plasmid DNA vaccines: investigation of integration into host cellular DNA following intramuscular injection in mice. *Intervirology* 43, 258-272.
- LEHNER, R., STAMMINGER, T., and MACH, M. (1991). Comparative sequence analysis of human cytomegalovirus strains. *J.Clin.Microbiol.* 29, 2494-2502.
- LEWIS, P.J., and BABIUK, L.A. (1999). DNA vaccines: a review. *Adv Virus Res* 54, 129-188.
- LIU, Z., WILLIAMS, K.P., CHANG, Y.H., and SMITH, J.A. (1993). Immunodominance: a single amino acid substitution within an antigenic site alters intramolecular selection of T cell determinants. *J.Immunol.* 151, 1852-1858.
- LOEHR, B.I., RANKIN, R., PONTAROLLO, R., KING, T., WILLSON, P., BABIUK, L.A., and VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S. (2001). Suppository-mediated DNA immunization induces mucosal immunity against bovine herpesvirus-1 in cattle. *Virology* 289, 327-333.
- LU, S., ARTHOS, J., MONTEFIORI, D.C., YASUTOMI, Y., MANSON, K., MUSTAFA, F., JOHNSON, E., SANTORO, J.C., WISSINK, J., MULLINS, J.I., HAYNES, J.R., LETVIN, N.L., WYAND, M., and ROBINSON, H.L. (1996a). Simian immunodeficiency virus DNA vaccine trial in macaques. *J Virol* 70, 3978-3991.
- LU, S., ARTHOS, J., MONTEFIORI, D.C., YASUTOMI, Y., MANSON, K., MUSTAFA, F.J., SANTORO, J.C., WISSINK, J., MULLINS, J.I., HAYNES, J.R., LETVIN, N.L.W., and ROBINSON, H.L. (1996b). Simian immunodeficiency virus DNA vaccine trial in macaques. *J.Virol.* 70, 3978-3991.
- MAIONE, B., LAVITRANO, M., SPADAFORA, C., and KIESSLING, A.A. (1998). Sperm-mediated gene transfer in mice. *Mol Reprod Dev* 50, 406-409.

- MANAM, S., LEDWITH, B.J., BARNUM, A.B., TROILO, P.J., PAULEY, C.J., HARPER, L.B., GRIFFITHS, T.G., 2ND, NIU, Z., DENISOVA, L., FOLLMER, T.T., PACCHIONE, S.J., WANG, Z., BEARE, C.M., BAGDON, W.J., and NICHOLS, W.W. (2000). Plasmid DNA vaccines: tissue distribution and effects of DNA sequence, adjuvants and delivery method on integration into host DNA. *Intervirology* 43, 273-281.
- MARSHALL, G.S., RABALAIS, G.P., STOUT, G.G., and WALDEYER, S.L. (1992). Antibodies to recombinant-derived glycoprotein B after natural human cytomegalovirus infection correlate with neutralizing activity. *J.Infect.Dis.* 165, 381-384.
- MARSHALL, G.S., STOUT, G.G., KNIGHTS, M.E., RABALAIS, G.P., ASHLEY, R., MILLER, H., and ROSSIER, E. (1994). Ontogeny of glycoprotein gB-specific antibody and neutralizing activity during natural cytomegalovirus infection. *J Med Virol* 43, 77-83.
- MARTIN, T., PARKER, S.E., HEDSTROM, R., LE, T., HOFFMAN, S.L., NORMAN, J., HOBART, P., and LEW, D. (1999). Plasmid DNA malaria vaccine: the potential for genomic integration after intramuscular injection. *Hum Gene Ther* 10, 759-768.
- MENA, A., ANDREW, M.E., and COUPAR, B.E. (2001). Rapid dissemination of intramuscularly inoculated DNA vaccines. *Immunol Cell Biol* 79, 87-89.
- MEYER, H., SUNDQVIST, V.A., PEREIRA, L., and MACH, M. (1992). Glycoprotein gp116 of human cytomegalovirus contains epitopes for strain-common and strain-specific antibodies. *J.Gen.Virol.* 73, 2375-2383.
- MEYER-KÖNIG, U., EBERT, K., SCHRAGE, B., POLLAK, S., and HUFERT, F.T. (1998). Simultaneous infection of healthy people with multiple human cytomegalovirus strains. *Lancet* 352, 1280-1281.
- MEYERS, J.D. (1991). Critical evaluation of agents used in the treatment and prevention of cytomegalovirus infection in immunocompromised patients. *Transplant Proc* 23, 139-142, discussion 142-133.
- MILLER, D.M., RAHILL, B.M., BOSS, J.M., LAIRMORE, M.D., DURBIN, J.E., WALDMAN, J.W., and SEDMAK, D.D. (1998). Human cytomegalovirus inhibits major histocompatibility complex class II expression by disruption of the Jak/Stat pathway. *J Exp Med* 187, 675-683.
- MOCARSKI, E.S. (1996). *Cytomegaloviruses and their replication*. (Raven Publishers, Philadelphia).
- MODROW, S., FALKE, D. (1997). *Molekulare Virologie*. (Spektrum).
- MOR, G., SINGLA, M., STEINBERG, A.D., HOFFMAN, S.L., OKUDA, K., and KLINMAN, D.M. (1997). Do DNA vaccines induce autoimmune disease? *Hum Gene Ther* 8, 293-300.
- MORELLO, C.S., CRANMER, L.D., and SPECTOR, D.H. (2000). Suppression of murine cytomegalovirus (MCMV) replication with a DNA vaccine encoding MCMV M84 (a homolog of human cytomegalovirus pp65). *J Virol* 74, 3696-3708.
- NAVARRO, D., LENNETTE, E., TUGIZOV, S., and PEREIRA, L. (1997). Humoral immune response to functional regions of human cytomegalovirus glycoprotein B. *J.Med.Virol.* 52, 451-459.

- NAVARRO, D., PAZ, P., TUGIZOV, S., TOPP, K., LA VAIL, J., and PEREIRA, L. (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.
- NICHOLS, W.W., LEDWITH, B.J., MANAM, S.V., and TROILO, P.J. (1995). Potential DNA vaccine integration into host cell genome. *Ann N Y Acad Sci* 772, 30-39.
- ODEBERG, J., CERBONI, C., BROWNE, H., KARRE, K., MOLLER, E., CARBONE, E., and SODERBERG-NAUCLER, C. (2002). Human cytomegalovirus (HCMV)-infected endothelial cells and macrophages are less susceptible to natural killer lysis independent of the downregulation of classical HLA class I molecules or expression of the HCMV class I homologue, UL18. *Scand J Immunol* 55, 149-161.
- OSTLER, T., HUSSELL, T., SURH, C.D., OPENSHAW, P., and EHL, S. (2001). Long-term persistence and reactivation of T cell memory in the lung of mice infected with respiratory syncytial virus. *Eur J Immunol* 31, 2574-2582.
- PACHL, C., PROBERT, W.S., HERMSEN, K.M., MASIARZ, F.R., RASMUSSEN, L., and MERIGAN, T.C.S. (1989). The human cytomegalovirus strain Towne glycoprotein H gene encodes glycoprotein p86. *Virology* 169, 418-426.
- PANDE, H., CAMPO, K., TANAMACHI, B., FORMAN, S.J., and ZAIA, J.A. (1995). Direct DNA immunization of mice with plasmid DNA encoding the tegument protein pp65 (ppUL83) of human cytomegalovirus induces high levels of circulating antibody to the encoded protein. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases - Supplementum* 99, 117-120.
- PARKER, S.E., BORELLINI, F., WENK, M.L., HOBART, P., HOFFMAN, S.L., HEDSTROM, R., LE, T., and NORMAN, J.A. (1999). Plasmid DNA malaria vaccine: tissue distribution and safety studies in mice and rabbits. *Hum Gene Ther* 10, 741-758.
- PASS, R.F., DULIEGE, A.M., BOPPANA, S., SEKULOVICH, R., PERCELL, S., BRITT, W., and BURKE, R.L. (1999). A subunit cytomegalovirus vaccine based on recombinant envelope glycoprotein B and a new adjuvant. *J Infect Dis* 180, 970-975.
- PEPPERL, S., MUNSTER, J., MACH, M., HARRIS, J.R., and PLACHTER, B. (2000). Dense bodies of human cytomegalovirus induce both humoral and cellular immune responses in the absence of viral gene expression. *J Virol* 74, 6132-6146.
- PLOTKIN, S.A. (1999). Vaccination against cytomegalovirus, the changeling demon. *Pediatr Infect Dis J* 18, 313-325; quiz 326.
- PLOTKIN, S.A., HIGGINS, R., KURTZ, J.B., MORRIS, P.J., CAMPBELL, D.A., JR., SHOPE, T.C., SPECTOR, S.A., and DANKNER, W.M. (1994). Multicenter trial of Towne strain attenuated virus vaccine in seronegative renal transplant recipients. *Transplantation* 58, 1176-1178.
- PLOTKIN, S.A., STARR, S.E., FRIEDMAN, H.M., GONCZOL, E., and WEIBEL, R.E. (1989). Protective effects of Towne cytomegalovirus vaccine against low-passage cytomegalovirus administered as a challenge. *J.Infect.Dis.* 159, 860-865.

- PRIX, L., KUNER, R., SPEER, C.P., JAHN, G., and HAMPRECHT, K. (1998). Evaluation of restriction fragment length polymorphism analysis of the UL10-UL13 genomic region for rapid identification of human cytomegalovirus strains. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 17, 525-528.
- QADRI, I., NAVARRO, D., PAZ, P., and PEREIRA, L. (1992). Assembly of conformation-dependent neutralizing domains on glycoprotein B of human cytomegalovirus. *J.Gen.Virol.* 73, 2913-2921.
- RAMMENSEE, H., BACHMANN, J., EMMERICH, N.P., BACHOR, O.A., and STEVANOVIC, S. (1999). SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 50, 213-219.
- RAMSHAW, I.A., and RAMSAY, A.J. (2000). The prime-boost strategy: exciting prospects for improved vaccination. *Immunol Today* 21, 163-165.
- RASMUSSEN, L., HONG, C., ZIPETO, D., MORRIS, S., SHERMAN, D., CHOU, S., and MINER, R. (1997). Cytomegalovirus gB Genotype Distribution Differs in Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients and Immunocompromised Allograft Recipients. *J.Infect.Dis.* Vol. 175, 179-184.
- RESCHKE, M., REIS, B., NODING, K., ROHSIEPE, D., RICHTER, A., MOCKENHAUPT, T.G., and RADSAK, K. (1995). Constitutive expression of human cytomegalovirus glycoprotein B (gpUL55) with mutagenized carboxy-terminal hydrophobic domains. *J.Gen.Virol.* 76, 113-122.
- REYNOLDS, D.W., STAGNO, S., HOSTY, T.S., TILLER, M., and ALFORD, C.A., JR. (1973). Maternal cytomegalovirus excretion and perinatal infection. *N.Engl.J.Med.* 289, 1-5.
- ROBERTSON, J., and GRIFFITHS, E. (1998). WHO guidelines for assuring the quality of DNA vaccines. *Biologicals* 26, 205-212.
- ROBINSON, H.L., BOYLE, C.A., FELTQUATE, D.M., MORIN, M.J., SANTORO, J.C., and WEBSTER, R.G. (1997). DNA immunization for influenza virus: studies using hemagglutinin- and nucleoprotein-expressing DNAs. *J Infect Dis* 176 Suppl 1, S50-55.
- ROBINSON, H.L., HUNT, L.A., and WEBSTER, R.G. (1993). Protection against a lethal influenza virus challenge by immunization with a haemagglutinin-expressing plasmid DNA. *Vaccine* 11, 957-960.
- SANGER, F., NICKLEN, S., and COULSON, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 74, 5463-5467.
- SCHOPPEL, K., KROPFF, B., SCHMIDT, C., VORNHAGEN, R., and MACH, M. (1997). The humoral immune response against human cytomegalovirus is characterized by a delayed synthesis of glycoprotein-specific antibodies. *J.Infect.Dis.* 175, 533-544.
- SCHUBBERT, R., HOHLWEG, U., RENZ, D., and DOERFLER, W. (1998). On the fate of orally ingested foreign DNA in mice: chromosomal association and placental transmission to the fetus. *Mol Gen Genet* 259, 569-576.
- SCHUBBERT, R., RENZ, D., SCHMITZ, B., and DOERFLER, W. (1997). Foreign (M13) DNA ingested by mice reaches peripheral leukocytes, spleen, and liver via the intestinal wall mucosa and can be covalently linked to mouse DNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 94, 961-966.

- SHARMA, A., and KHULLER, G. (2001). DNA vaccines: Future strategies and relevance to intracellular pathogens. *Immunol Cell Biol* 79, 537-546.
- SHEPP, D.H., MATCH, M.E., ASHRAF, A.B., LIPSON, S.M., MILLAN, C., and PERGOLIZZI, R. (1996). Cytomegalovirus glycoprotein B groups associated with retinitis in AIDS. *J.Infect.Dis.* 174, 184-187.
- SHEPP, D.H., MATCH, M.E., LIPSON, S.M., and PERGOLIZZI, R.G. (1998). A fifth human cytomegalovirus glycoprotein B genotype. *Res.Virol.* 149, 109-114.
- SHIU, S.Y., CHAN, K.M., LO, S.K., IP, K.W., YUEN, K.Y., and HEALTH, R.B. (1994). Sequence variation of the amino-terminal antigenic domains of glycoprotein B of human cytomegalovirus strains isolated from Chinese patients. *Arch.Virol.* 137, 133-138.
- SIMPSON, J.A., CHOW, J.C., BAKER, J., AVDALOVIC, N., YUAN, S., AU, D., CO, M.S.V., BRITT, W.J., and COELINGH, K.L. (1993). Neutralizing monoclonal antibodies that distinguish three antigenic sites on human cytomegalovirus glycoprotein H have conformationally distinct binding sites. *J.Virol.* 67, 489-496.
- SLOBEDMAN, B., and MOCARSKI, E.S. (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 (SVG) disease. *Proc Soc Exp Biol Med* 92, 424-430.
- SNYDMAN, D.R. (1990). Cytomegalovirus immunoglobulins in the prevention and treatment of cytomegalovirus disease. *Rev Infect Dis* 12 Suppl 7, S839-848.
- SPADAFORA, C. (1998). Sperm cells and foreign DNA: a controversial relation. *Bioessays* 20, 955-964.
- SPAETE, R.R., PEROT, K., SCOTT, P.I., NELSON, J.A., STINSKI, M.F., and PACHL, C. (1993). Coexpression of truncated human cytomegalovirus gH with the UL115 gene product or the truncated human fibroblast growth factor receptor results in transport of gH to the cell surface. *Virology* 193, 853-861.
- SPAETE, R.R., SAXENA, A., SCOTT, P.I., SONG, G.J., PROBERT, W.S., BRITT, W.J., GIBSONW., RASMUSSEN, L., and PACHL, C. (1990). Sequence requirements for proteolytic processing of glycoprotein B of human cytomegalovirus strain Towne. *J.Virol.* 64, 2922-2931.
- SPAETE, R.R., THAYER, R.M., PROBERT, W.S., MASIARZ, F.R., CHAMBERLAIN, S.H.R., MERIGAN, T.C., and PACHL, C. (1988). Human cytomegalovirus strain Towne glycoprotein B is processed by proteolytic cleavage. *Virology* 167, 207-225.
- STACEY, K.J., SWEET, M.J., and HUME, D.A. (1996). Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA. *J Immunol* 157, 2116-2122.
- STAGNO, S., REYNOLDS, D.W., PASS, R.F., and ALFORD, C.A. (1980). Breast milk and the risk of cytomegalovirus infection. *N.Engl.J.Med.* 302, 1073-1076.



- STARR, S.E., GLAZER, J.P., FRIEDMAN, H.M., FARQUHAR, J.D., and PLOTKIN, S.A. (1981). Specific cellular and humoral immunity after immunization with live Towne strain cytomegalovirus vaccine. *J.Infect.Dis.* 143, 585-589.
- TANG, D.C., DEVIT, M., and JOHNSTON, S.A. (1992). Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 356, 152-154.
- THIERRY, A.R., LUNARDI-ISKANDAR, Y., BRYANT, J.L., RABINOVICH, P., GALLO, R.C., and MAHAN, L.C. (1995). Systemic gene therapy: biodistribution and long-term expression of a transgene in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9742-9746.
- TSUKAMOTO, M., OCHIYA, T., YOSHIDA, S., SUGIMURA, T., and TERADA, M. (1995). Gene transfer and expression in progeny after intravenous DNA injection into pregnant mice. *Nat Genet* 9, 243-248.
- TUGIZOV, S., NAVARRO, D., PAZ, P., WANG, Y., QADRI, I., and PEREIRA, L. (1994). Function of human cytomegalovirus glycoprotein B: syncytium formation in cells constitutively expressing gB is blocked by virus-neutralizing antibodies. *Virology* 201, 263-276.
- TUGIZOV, S., WANG, Y., QADRI, I., NAVARRO, D., MAIDJI, E., and PEREIRA, L. (1995). Mutated forms of human cytomegalovirus glycoprotein B are impaired in inducing syncytium formation. *Virology* 209, 580-591.
- ULMER, J.B., DONNELLY, J.J., PARKER, S.E., RHODES, G.H., FELGNER, P.L., DWARKI, V.J., GROMKOWSKI, S.H., DECK, R.R., DEWITT, C.M., FRIEDMAN, A., and ET AL. (1993). Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein [see comments]. *Science* 259, 1745-1749.
- URBAN, M., BRITT, W., and MACH, M. (1992). The dominant linear neutralizing antibody-binding site of glycoprotein gp86 of human cytomegalovirus is strain specific. *J Virol* 66, 1303-1311.
- URBAN, M., KLEIN, M., BRITT, W.J., HASSFURTHER, E., and MACH, M. (1996). Glycoprotein H of human cytomegalovirus is a major antigen for the neutralizing humoral immune response. *J.Gen.Virol.* 77, 1537-1547.
- VAN ZANTEN, J., HARMSSEN, M.C., VAN DER MEER, P., VAN DER BIJ, W., VAN SON, W.J., PROP, J., DE LEIJ, L., and THE, T.H. (1995). Proliferative T cell responses to four human cytomegalovirus-specific proteins in healthy subjects and solid organ transplant recipients. *J.Infect.Dis.* 172, 879-882.
- VOGELBERG, C., MEYER-KÖNIG, U., HUFERT, F.T., KIRSTE, G., and VON LAER, D. (1996). Human cytomegalovirus glycoprotein B genotypes in renal transplant recipients. *J.Med.Virol.* 50, 31-34.
- VON LAER, D., MEYER-KOENIG, U., SERR, A., FINKE, J., KANZ, L., FAUSER, A.A., NEUMANN-HAEFELIN, D., BRUGGER, W., and HUFERT, F.T. (1995). Detection of cytomegalovirus DNA in CD34+ cells from blood and bone marrow. *Blood* 86, 4086-4090.
- WELLS, D.E., VUGLER, L.G., and BRITT, W.J. (1990). Structural and immunological characterization of human cytomegalovirus gp55-116 (gB) expressed in insect cells. *J Gen Virol* 71, 873-880.

- WILLS, M.R., CARMICHAEL, A.J., MYNARD, K., JIN, X., WEEKES, M.P., and PLACHTER, B.S. (1996). The human cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to cytomegalovirus is dominated by structural protein pp65: frequency, specificity, and T-cell receptor usage of pp65-specific CTL. *J.Virol.* 70, 7569-7579.
- WINEGAR, R.A., MONFORTE, J.A., SUING, K.D., O'LOUGHLIN, K.G., RUDD, C.J., and MACGREGOR, J.T. (1996). Determination of tissue distribution of an intramuscular plasmid vaccine using PCR and in situ DNA hybridization. *Hum Gene Ther* 7, 2185-2194.
- WOLFF, J.A., LUDTKE, J.J., ACSADI, G., WILLIAMS, P., and JANI, A. (1992). Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. *Hum Mol Genet* 1, 363-369.
- WOLFF, J.A., MALONE, R.W., WILLIAMS, P., CHONG, W., ACSADI, G., JANI, A., and FELGNER, P.L. (1990). Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 247, 1465-1468.
- YASUTOMI, Y., ROBINSON, H.L., LU, S., MUSTAFA, F., LEKUTIS, C., ARTHOS, J.M., VOSS, G., MANSON, K., WYAND, M., and LETVIN, N.L. (1996). Simian immunodeficiency virus-specific cytotoxic T-lymphocyte induction through DNA vaccination of rhesus monkeys. *J.Virol.* 70, 678-681.
- YE, M., MORELLO, C.S., and SPECTOR, D.H. (2002). Strong CD8 T-cell responses following coimmunization with plasmids expressing the dominant pp89 and subdominant M84 antigens of murine cytomegalovirus correlate with long-term protection against subsequent viral challenge. *J Virol* 76, 2100-2112.
- ZIPETO, D., HONG, C., GERNA, G., ZAVATTONI, M., KATZENSTEIN, D., and MERIGAN, T.C.R. (1998). Geographic and demographic differences in the frequency of human cytomegalovirus gB genotypes 1-4 in immunocompromised patients. *AIDS Research & Human Retroviruses* 14, 533-536.

## A. Anhang

### Immunisierungsprotokolle

Tabelle A1: Immunisierungsexperimente in erwachsenen Mäusen

Nr.	Maus	Anzahl	Applikation	Vektor(en)	Immunisierungszeiten	Adjuvans
1	Balb/c	3	i.m.	pJWØ	Tag 0, Tag 7, Tag 21	-
2	Balb/c	3	i.m.	pJWgB1	Tag 0, Tag 7, Tag 21	-
3	Balb/c	3	i.m.	pJWgB2	Tag 0, Tag 7, Tag 21	-
4	Balb/c	3	i.m.	pJWgB3	Tag 0, Tag 7, Tag 21	-
5	Balb/c	3	i.m.	pJWgB4	Tag 0, Tag 7, Tag 21	-
6	Balb/c	3	i.m.	pJWgH1+pJWgL	Tag 0, Tag 7, Tag 21	-
7	Balb/c	3	i.m.	pJWgH2+pJWgL	Tag 0, Tag 7, Tag 21	-
8	Balb/c	3	i.m.	pJWpp65	Tag 0, Tag 7, Tag 21	-
9	Balb/c	3	i.m.	pJWgB1+pJWgB2+pJWgB3+pJWgB4+pJWpp65	Tag 0, Tag 7, Tag 21	-
10	Balb/c	5	i.m.	VR1055Ø	Tag 0, Tag 7, Tag 21	-
11	Balb/c	5	i.m.	VR1055gB1ΔTM	Tag 0, Tag 7, Tag 21	-
12	Balb/c	5	i.m.	pRc/CMV2Ø	Woche 0, Woche 5, Woche 11	-
13	Balb/c	5	i.m.	pRc/CMV2gB	Woche 0, Woche 5, Woche 11	-
14	Balb/c	10	i.m.	pJWØ	Woche 0, Woche 4, Woche 8	0.25% Bupivacaine
15	Balb/c	10	i.m.	pJWgH1+pJWgH2+pJWgL+pJWpp65	Woche 0, Woche 4, Woche 8	0.25% Bupivacaine
16	Balb/c	5	i.m.	VR1055gB1ΔTM	Woche 0, Woche 5, Woche 11	0.045% AdjuPhos <sup>®</sup>
17	Balb/c	5	i.m.	pRc/CMV2Ø	Woche 0, Woche 5, Woche 11	0.045% AdjuPhos <sup>®</sup>
18	Balb/c	10	i.m.	pRc/CMV2gB	Woche 0, Woche 5, Woche 11	0.045% AdjuPhos <sup>®</sup>

<b>19</b>	Black 6	5	i.m.	pRc/CMV2gB	Woche 0, Woche 5, Woche 11	0.045% AdjuPhos <sup>®</sup>
<b>20</b>	C3H	5	i.m.	pRc/CMV2gB	Woche 0, Woche 5, Woche 11	0.045% AdjuPhos <sup>®</sup>
<b>21</b>	Balb/c	5	i.m.	pCMV-S	Tag 0, Tag 7, Tag 21	-
<b>22</b>	Balb/c	3	i.c.	pJWgB1+pJWgB2+ pJWgB3+pJWgB4+ pJWpp65	Tag 0, Tag 7, Tag 21	-
<b>23</b>	Balb/c	5	i.n.	VR1055Ø	Tag 0, Tag 7, Tag 21	0.75 mM Vaxfectin
<b>24</b>	Balb/c	5	i.n.	VR1055gB1ΔTM	Tag 0, Tag 7, Tag 21	0.75 mM Vaxfectin

Tabelle A.2: Immunisierungsexperimente in sich fortpflanzenden Mäusen

<b>Nr.</b>	<b>25.</b>	<b>26.</b>	<b>27.</b>
<b>DNA-Immunisierung</b>	<b>DNA-Immunisierung</b> von weiblichen trächtigen Mäusen mit pJWgH1+ pJWgL (Tag 2 und Tag 9 p.c.)	<b>DNA-Immunisierung</b> von weiblichen Mäusen mit pJWgH1+pJWgL (Tag 0, Tag 7 und Tag 21)	<b>DNA-Immunisierung</b> von männlichen Mäusen mit pJWgH1+pJWgL (Tag 0, Tag 7 und Tag 21)
<b>Anpaarung</b>	-	<b>Anpaarung</b> (Tag 63)	<b>Anpaarung</b> (Tag 63)
<b>DNA Extraktion</b>	<b>DNA-Extraktion</b> aus <b>a)</b> ganzen Feten (Tag 15 p.c.) <b>b)</b> ganzen Neugeborenen (Tag 1 nach Geburt) <b>c)</b> Neugeborenen Organen (Leber, Lunge, Niere, Milz) (5 Wochen nach Geburt) <b>d)</b> mütterlichen Organen (Blut, Leber, Lunge, Niere, Milz, Quadriceps*, Lymphknoten) (5 Wochen nach Geburt)	<b>DNA-Extraktion</b> aus <b>a)</b> ganzen Feten (Tag 15 p.c.) <b>b)</b> ganzen Neugeborenen (Tag 1 nach Geburt) <b>c)</b> Neugeborenen Organen (Leber, Lunge, Niere, Milz) (5 Wochen nach Geburt) <b>d)</b> mütterlichen Organen (Blut, Leber, Lunge, Niere, Milz, Quadriceps*, Lymphknoten) (5 Wochen nach Geburt)	<b>DNA-Extraktion</b> aus <b>b)</b> ganzen Neugeborenen (Tag 1 nach Geburt) <b>c)</b> Neugeborenen Organen (Leber, Lunge, Niere, Milz) (5 Wochen nach Geburt) <b>d)</b> mütterlichen Organen (Blut, Leber, Lunge, Niere, Milz) (5 Wochen nach Geburt) <b>e)</b> väterlichen Organen (Leber, Lunge, Niere, Milz, Quadriceps*, Hoden) (5 Wochen nach Geburt)
<b>DNA Analyse</b>	<b>nPCR</b> (gH Gen)	<b>nPCR</b> (gH Gen)	<b>nPCR</b> (gH Gen)

**Teile dieser Arbeit sowie verwandte Themen wurden wie folgt veröffentlicht:**

Meyer-König U, Ebert K, **Schrage B**, Pollak S, Hufert FT

Simultaneous infection of healthy people with multiple human cytomegalovirus strains  
Lancet. 352(9136):1280-1, 1998 Oct 17

Meyer-König U, **Schrage B**, Huzly D, Bongarts A, Hufert FT

High variability of cytomegalovirus glycoprotein B gene and frequent multiple infections  
in HIV-infected patients with low CD4 T-cell count  
AIDS 12:2227-2241, 1998

---

Die Arbeit wurde in der Abteilung für Virologie des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg im Breisgau durchgeführt.

Hiermit versichere ich, daß die vorliegende Arbeit von mir selbständig und unter ausschließlicher Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt wurde.

Freiburg, den 17.6.2002

Birgit Schrage

## **Vielen Dank!**

An Frank Hufert und Ursula Meyer-König für die wissenschaftliche Betreuung, die vielen Anregungen und Diskussionen und die Unterstützung während meiner Arbeit.

An Peter Scheurich für die Vertretung der Arbeit am Institut für Zellbiologie und Immunologie in Stuttgart.

An alle MitarbeiterInnen der Arbeitsgruppe für die anregenden Diskussionen, die nette Atmosphäre und die Freundschaften über den Laboralltag hinaus.

An meine Familie, an Markus, Jasmin und Christoph, die Freude und Frust mit mir geteilt haben.