

# **Identifikation zellulärer Liganden Cytomegalovirus-kodierter Fcγ-Rezeptoren**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Manuela Fiedler  
aus Berlin

Düsseldorf, Mai 2011

aus dem Institut für Virologie  
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Hartmut Hengel, Institut für Virologie

Koreferent: Prof. Dr. Dieter Willbold, Institut für Physikalische Biologie

Tag der mündlichen Prüfung: 08.06.2011

*Für meine Eltern*

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>6</b>
<b>ABKÜRZUNGEN.....</b>	<b>8</b>
<b>AMINOSÄUREN.....</b>	<b>11</b>
<b>EINHEITEN .....</b>	<b>12</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>13</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>14</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>15</b>
<b>1.1 Viren .....</b>	<b>15</b>
1.1.1 Herpesviren .....	15
<b>1.2 Das Immunsystem als Abwehrsystem viraler Infektionen .....</b>	<b>21</b>
1.2.1 Lymphozyten als zelluläre Bestandteile des Immunsystems.....	21
1.2.2 Antikörper - humorale Immunität .....	26
1.2.3 Fc $\gamma$ -Rezeptoren .....	28
<b>1.3 Das Immunsystem und HCMV .....</b>	<b>32</b>
1.3.1 Immunabwehr gegen HCMV .....	32
1.3.2 Immunevasionsmechanismen von HCMV .....	34
<b>1.4 HCMV-kodierte Fc<math>\gamma</math>-Rezeptoren .....</b>	<b>35</b>
<b>1.5 Immunevasive Funktionen der HCMV-kodierten Fc<math>\gamma</math>-Rezeptoren .....</b>	<b>38</b>
<b>1.6 Weitere herpesvirale Fc<math>\gamma</math>-Rezeptoren .....</b>	<b>38</b>
1.6.1 Der MCMV-kodierte Fc $\gamma$ -Rezeptor m138/fcr-1 .....	39
1.6.2 Der HSV-1-kodierte Fc $\gamma$ -Rezeptorkomplex gE:gl.....	40
<b>2 ERGEBNISSE .....</b>	<b>42</b>
<b>2.1 Analyse HCMV-kodierter Fc<math>\gamma</math>-Rezeptoren gp34 und gp68 in HCMV-infizierten Zellen .....</b>	<b>42</b>
2.1.1 Die HCMV-kodierten Fc $\gamma$ -Rezeptoren gp34 und gp68 werden an der Oberfläche HCMV-infizierter Zellen exprimiert .....	42
2.1.2 Gp34 und gp68 sind in maturer Form stark glykosyliert .....	43
<b>2.2 Konstruktion und Herstellung löslicher viraler Fc<math>\gamma</math>-Rezeptoren zur Suche nach neuen Interaktionspartnern.....</b>	<b>45</b>
2.2.1 Klonierung der löslichen Fc $\gamma$ -Rezeptoren .....	46
2.2.2 Klonierung des löslichen ICOS-Liganden.....	48
2.2.3 Expression und Aufreinigung der löslichen Proteine.....	49
2.2.4 Gp68 ist komplex O-glykosyliert.....	52
2.2.5 Aufgereinigte lösliche Proteine binden humanes Fc $\gamma$ -Fragment und sind stabil .....	54

<b>2.3</b>	<b>Screening nach neuen Interaktionspartnern für gp34 und gp68 .....</b>	<b>57</b>
2.3.1	Nachweis der Bindung des löslichen ICOS-L an seinen ICOS-Rezeptor mittels Durchflusszytometrie	57
2.3.2	Die viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren gp34 und gp68 binden an spezifische Lymphozytensubpopulation .....	58
<b>2.4</b>	<b>Bindung der viralen Fc<math>\gamma</math>-Rezeptoren an B-Zellen .....</b>	<b>64</b>
2.4.1	Die Bindung von gp34 und gp68 an B-Zellen ist unabhängig vom Spender und dessen HCMV-Serostatus .....	64
2.4.2	Gp34 und gp68 binden an die gleiche B-Zellsubpopulation .....	65
2.4.3	Die viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren binden an IgG+CD27+ B-Zellen .....	67
2.4.4	Die viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren binden an die IgG+ B-Zelllinie RPMI 8866.....	69
2.4.5	Gp34 und gp68 präzipitieren den IgG-B-Zellrezeptor.....	71
<b>2.5</b>	<b>Bindung der viralen Fc<math>\gamma</math>-Rezeptoren an NK-Zellen .....</b>	<b>74</b>
2.5.1	gp34 und gp68 binden unabhängig von Spender und dessen HCMV-Serostatus an NK-Zellen .....	74
2.5.2	Die Bindung von gp68 an NK-Zellen ist unabhängig von der N-terminalen O-Glykosylierung von gp68 .....	76
2.5.3	Die Bindung von gp68 an NK-Zellen korreliert mit der CD16-Expression.....	77
2.5.4	CD16 allein ist nicht ausreichend für die Bindung von gp68 an NK-Zellen.....	79
2.5.5	Cytophiles IgG vermittelt die Bindung von gp34 und gp68 an NK-Zellen.....	80
<b>2.6</b>	<b>HCMV-kodierte Fc<math>\gamma</math>-Rezeptoren und CD16- bzw. NK-Zellaktivierung.....</b>	<b>86</b>
2.6.1	Die HCMV-kodierten Fc $\gamma$ -Rezeptoren inhibieren die Antikörper-abhängige Aktivierung zellulärer Fc $\gamma$ -Rezeptoren .....	86
2.6.2	Lösliche HCMV-kodierte Fc $\gamma$ -Rezeptoren inhibieren die Antikörper-abhängige CD16-Aktivierung....	88
2.6.3	Die Fc-bindende Eigenschaft von gp34 ist notwendig für die Inhibition der Antikörper-abhängigen CD16-Aktivierung.....	91
2.6.4	Gp34 benötigt keine Prä-Inkubation mit dem Antigen-Antikörper-Komplex um die CD16-Aktivierung inhibieren zu können .....	92
2.6.5	Die Vernetzung von gp68-Molekülen führt nicht zu einer verstärkten Inhibition der CD16-Aktivierung .....	94
2.6.6	Die löslichen viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren inhibieren ADCC von NK-Zellen .....	95
2.6.7	Die löslichen viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren inhibieren nicht die Antikörper-unabhängige NK-Zellaktivierung durch K562-Zellen.....	98
<b>2.7</b>	<b>HCMV-kodierten Fc<math>\gamma</math>-Rezeptoren und cytophiles IgG von NK-Zellen .....</b>	<b>100</b>
2.7.1	Cytophiles IgG inhibiert Degranulation von NK-Zellen .....	100
2.7.2	Cytophiles IgG inhibiert Zelllyse durch NK-Zellen.....	104
2.7.3	Die Bindung von gp34 und gp68 an IgG-dekorierte NK-Zellen führt nicht zu deren Degranulation .	107
2.7.4	Die Bindung von gp34 und gp68 an cytophiles IgG von NK-Zellen hat keinen Einfluss auf dessen regulative Funktion.....	109
2.7.5	gp34 und gp68 inhibieren „cytophile“ ADCC-Aktivität von NK-Zellen.....	111
<b>3</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>113</b>
<b>3.1</b>	<b>Virale Fc<math>\gamma</math>-Rezeptoren interagieren mit IgG-dekorierten Lymphozytensubpopulation .....</b>	<b>113</b>
3.1.1	Interaktion viraler Fc $\gamma$ -Rezeptoren mit freiem monomeren IgG .....	114
3.1.2	Modell zur Interaktion viraler Fc $\gamma$ -Rezeptoren mit cytophilem IgG auf NK-Zellen.....	114
3.1.3	Modell zur Interaktion viraler Fc $\gamma$ -Rezeptoren mit dem IgG-B-Zellrezeptor .....	117
<b>3.2</b>	<b>Herpesvirale Fc<math>\gamma</math>-Rezeptoren und ihre Fähigkeit ADCC inhibieren zu können .....</b>	<b>119</b>
3.2.1	Mechanismen der HCMV-kodierten Fc $\gamma$ -Rezeptoren gp34 und gp68 zur Inhibition der IgG-abhängigen CD16-Aktivierung .....	120
<b>3.3</b>	<b>HCMV-kodierte Fc<math>\gamma</math>-Rezeptoren und IgG-tragende NK-Zellen.....</b>	<b>123</b>
<b>3.4</b>	<b>HCMV-kodierte Fc<math>\gamma</math>-Rezeptoren gp34 und gp68 und IgG-Gedächtnis-B-Zellen .....</b>	<b>125</b>

<b>3.5</b>	<b>IgG-unabhängige Funktionen und Liganden herpesviraler Fcγ-Rezeptoren .....</b>	<b>126</b>
<b>3.6</b>	<b>Existieren lösliche Formen der HCMV-kodierte Proteine gp34 und gp68? .....</b>	<b>127</b>
<b>3.7</b>	<b>Rekombinante Proteine .....</b>	<b>131</b>
3.7.1	Rekombinante Proteinen zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen .....	131
3.7.2	Rekombinante virale Proteinen für funktionelle Untersuchungen außerhalb des Viruskontext .....	132
<b>3.8</b>	<b>Fcγ-Rezeptoren gp34 und gp68 als rekombinante therapeutische Proteine? .....</b>	<b>134</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>135</b>
<b>4.1</b>	<b>Material .....</b>	<b>135</b>
4.1.1	Geräte .....	135
4.1.2	Verbrauchsmaterialien .....	136
4.1.3	Chemikalien und Biochemikalien .....	137
4.1.4	Kits .....	139
4.1.5	Enzyme .....	139
4.1.6	Plasmide .....	140
4.1.7	Oligonukleotide .....	140
4.1.8	Antikörper .....	141
4.1.9	Zellkulturmedien und Zusätze .....	143
4.1.10	Zellen .....	143
4.1.11	Viren .....	144
4.1.12	Computer-Programme .....	144
<b>4.2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>145</b>
4.2.1	Zellkultur .....	145
4.2.2	Blutzellaufreinigung .....	146
4.2.3	Virologische Methoden .....	147
4.2.4	Molekularbiologische Methoden .....	149
4.2.5	Proteinbiochemische und immunologische Methoden .....	154
4.2.6	Immunologische Methoden .....	159
4.2.7	BWFcγR-ζ-Assay .....	165
4.2.8	CD107a-Assay (NK-Zell-Degranulationsassay) .....	167
4.2.9	<sup>35</sup> S-Release-Assay .....	167
<b>REFERENZEN .....</b>	<b>169</b>	
<b>ANHANG .....</b>	<b>190</b>	
<b>Präsentationen .....</b>	<b>190</b>	
<b>Publikationen (mit eigener Beteiligung) .....</b>	<b>192</b>	
<b>Danksagung .....</b>	<b>193</b>	
<b>Erklärung .....</b>	<b>194</b>	

## Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Isomere des HCMV Genoms.
- Abb. 1.2: Schematische Darstellung eines humanen IgG1-Antikörpers.
- Abb. 1.3: Schematische Darstellung der humanen Fc $\gamma$ -Rezeptoren.
- Abb. 1.4: Aminosäuresequenz der HCMV-kodierten Fc $\gamma$ -Rezeptoren gp34 und gp68.
- Abb. 2.1: Gp34 und gp68 binden Fc(IgG) an der Oberfläche HCMV-infizierter Zellen.
- Abb. 2.2: Gp34 und gp68 werden stark posttranslational modifiziert.
- Abb. 2.3: Verkürzungsmutanten von gp34, gp68 und ICOS-L.
- Abb. 2.4: Mature Proteine werden in den Überstand transfizierter Zellen sekretiert und ihre Ausbeute läßt sich durch Introninsertion erhöhen.
- Abb. 2.5: Gp68 ist am N-Terminus O-glykosyliert.
- Abb. 2.6: Die löslichen Proteine gp34 und gp68 sind funktional und stabil.
- Abb. 2.7: Löslicher V5His<sub>6</sub>-Epitop-markierter ICOS-L bindet an ICOS exprimierende Zellen.
- Abb. 2.8: *Gating*-Strategie und durchflusszytometrische Analyse peripherer Lymphozyten.
- Abb. 2.9: Gp34 und gp68 binden an spezifische Lymphozytenpopulationen.
- Abb. 2.10: Gp34 und gp68 binden an spezifische Lymphozytenpopulationen (Einzeldarstellung).
- Abb. 2.11: Bindung von gp34 und gp68 an B-Lymphozyten ist Spender-unabhängig.
- Abb. 2.12: Gp34 und gp68 binden an die gleiche B-Zellsubpopulation.
- Abb. 2.13: B-Zellisolierung und Färbung der B-Zellsubpopulation.
- Abb. 2.14: Gp34 und gp68 binden an CD27+ IgG+ B-Zellen.
- Abb. 2.15: Gp34 und gp68 binden an die B-Zelle RPMI 8866.
- Abb. 2.16: Gp34 und gp68 binden nicht an die B-Zellrezeptor-negative B-Zelllinie CB-LCL-5-7-1.
- Abb. 2.17: Gp34 und gp68 präzipitieren den IgG-B-Zellrezeptor.
- Abb. 2.18: Gp34 und gp68 binden an eine definierte NK-Zellsubpopulation.
- Abb. 2.19: Differenzielle Proteinbindung an CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen.
- Abb. 2.20: N-Terminus und O-Glykosylierung von gp68 sind für die Bindung an NK-Zellen nicht essentiell.
- Abb. 2.21: Die gp68-Färbung von NK-Zellen ähnelt der CD16-Färbung von NK-Zellen.
- Abb. 2.22: Die gp68-Bindung korreliert mit der CD16-Expression.

- Abb. 2.23: Virale Fc $\gamma$ -Rezeptoren gp34 und gp68 binden nicht an ektop-exprimiertes CD16.
- Abb. 2.24: Frisch isolierte CD16<sup>+</sup> NK-Zellen tragen cytophiles IgG an ihrer Oberfläche.
- Abb. 2.25: Verlust von cytophilem IgG führt zum Verlust der gp68-Bindung an NK-Zellen.
- Abb. 2.26: Die IgG-Inkubation kultivierter PBMCs führt zur Bindung von gp34 und gp68 an NK-Zellen.
- Abb. 2.27: Gp68 und gp34 binden an CD16-exprimierende Zellen, wenn diese Fc $\gamma$ -Fragment an der Oberfläche tragen.
- Abb. 2.28: Unterschiedliche Versuchsaufbauten zur Messung der Fc $\gamma$ -Rezeptor-Aktivierung mittels Reporterzellen.
- Abb. 2.29: Lösliches gp34 und gp68 inhibieren die IgG1-abhängige CD16-Aktivierung.
- Abb. 2.30: Lösliches gp34 und gp68 inhibieren die IgG-abhängige CD16-Aktivierung.
- Abb. 2.31: W65 bzw. die Fc-Bindung von gp34 ist essentiell für die Inhibition der CD16-Aktivierung.
- Abb. 2.32: Lösliches gp34 kann präformierte Immunkomplexe antagonisieren.
- Abb. 2.33: Künstliche Multimerisierung von gp34 und gp68 verändert die Inhibitionseigenschaften nicht.
- Abb. 2.34: Lösliches gp34 und gp68 inhibieren die ADCC-Reaktion primärer NK-Zellen.
- Abb. 2.35: Lösliches gp34 und gp68 inhibieren die Antikörper-abhängige, aber nicht die Antikörper-unabhängige NK-Zellaktivierung.
- Abb. 2.36: Kultivierte (IgG-freie) NK-Zellen sind aktiver als frisch isolierte (IgG-dekorierte) NK-Zellen.
- Abb. 2.37: IgG-Präinkubation inhibiert NK-Zellaktivierung.
- Abb. 2.38: Frisch-isolierte NK-Zellen werden weniger aktiviert als kultivierte NK-Zellen.
- Abb. 2.39: Bindung der löslichen Fc $\gamma$ -Rezeptoren an NK-Zellen führt nicht zu Degranulation.
- Abb. 2.40: Keine Veränderung der IgG-unabhängigen NK-Zellaktivierung nach Inkubation mit gp34 und gp68.
- Abb. 2.41: Lösliches gp34 und gp68 inhibieren die durch cytophiles IgG vermittelte CD16-Aktivierung.
- Abb. 3.1: Modell der gp34- bzw. gp68 Bindung an cytophiles IgG von CD16<sup>+</sup> NK-Zellen.
- Abb. 3.2: Modell der gp34- bzw. gp68-Bindung an den IgG-B-Zellrezeptor.
- Abb. 3.3: Die Genregion UL119-118 kodiert für ein potentielles pUL119, das den löslichen N-Terminus von gp68 darstellt.

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADCC	Antikörper-abhängige Zytolyse
AK	Antikörper
Amp.	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATCC	<i>american type culture collection</i> , amerikanische Stammsammlung
BSA	bovines Serumalbumin
BZR	B-Zellrezeptor
bzw.	beziehungsweise
C1q	Komplementkomponente 1q
ca.	zirka
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CIP	<i>calf intestine alkaline phosphatase</i> , alkalische Phosphatase
CpG	hypomethyliertes DNA-Motiv: Cytosin-Phosphat-Guanosin
C-terminal	carboxyterminal
DC	dendritische Zelle
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	2-Desoxyribonukleinsäure
ds	Doppelstrang/doppelsträngig
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	<i>ethylenedinitrilo tetraacetic acid</i>
EGFP	( <i>enhanced green fluorescent protein</i> )
Endo H	Endoglykosidase H
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Fab	Antigen-bindendes Fragment
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
Fc	kristallisierbares Fragment
FcR	Fc-Rezeptor
FcRn	neonataler Fc-Rezeptor
FCS	fötale Kälberserum
gp	Glykoprotein

## Abkürzungen

---

gB	HCMV Glykoprotein B
gE	HSV Glykoprotein E
gH	HCMV Glykoprotein H
gI	HSV Glykoprotein I
gL	HCMV Glykoprotein L
gM	HCMV Glykoprotein M
gN	HCMV Glykoprotein N
gO	HCMV Glykoprotein O
gp34	HCMV Glykoprotein 34
gp68	HCMV Glykoprotein 68
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
H60	<i>minor histocompatibility antigen 60</i>
HA	Hämagglutinin
HC	<i>heavy chain</i> , Schwere Kette von Antikörpern
HCMV	Humanes Cytomegalovirus
HHV	Humanes Herpesvirus
HIV-1	Humanes Immundefizienz Virus Typ 1
hpi	<i>hours post infection</i> , Stunden nach Infektion
HSV	Herpes simplex Virus
HUVEC	humane Nabelschnurendothelzellen
ICOS	induzierbarer Co-Stimulator
IE	<i>immediate early</i> (sehr frühe Phase der Genexpression)
IFN	Interferon
IgA	Immunglobulin A
IgD	Immunglobulin D
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IgSF	Immunglobulin-Superfamilie
IP	Immunpräzipitation
IRL	<i>internal repeat long</i>
IRS	<i>internal repeat short</i>
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
ITIM	<i>immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif</i>

## Abkürzungen

---

IVIG	intravenöses Immunglobulin
Kana	Kanamycin
KSHV	Karposi Sarkoma Herpes Virus
MCMV	Maus-Cytomegalovirus
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> , Haupthistokompatibilitätsfaktor
mIg	membranständiges Immunglobulin
mock	“so tun, als ob”: uninferiert, aber gleich behandelt
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MRC-5	humane, embryonale Lungenfibroblasten
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
MULT-1	<i>murine UL16-binding protein like transcript 1</i>
NK	Natürliche Killerzellen
NKG2D	<i>natural-killer group 2, member D</i>
NKT	Natürliche Killer-T-Zellen
N-terminal	aminoterminal
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i> ; offener Leserahmen
PAA	Polyacrylamid
PAS	Protein-A Sepharose
PBMCs	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
pfu	<i>plaque forming units</i>
PGS	Protein-G Sepharose
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
p. i.	<i>post infection</i> ; nach Infektion
PNGaseF	Peptid-N-Glykosidase F
pp65	Phosphoprotein 65 (65 kDa)
RAE-1	<i>Retinoic acid early inducible 1</i>
RPMI	Zellkulturmedium ( <i>Roswell Park Memorial Institute</i> )
RT	Raumtemperatur
rVACV	rekombinantes Vakziniavirus
[ <sup>35</sup> S]	Radioaktives Schwefel mit der Kernzahl 35
SDS	Natriumdodecylsulfat

SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
TBE	Tris Borat EDTA
TBST	<i>tris buffered saline with tween</i>
TEMED	N,N,N',N''-Tetramethyldiamin
TRIM21	tripartite motif-containing 21
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRL	terminal repeat long
TRS	terminal repeat short
u. a.	unter anderem
UL	<i>unique long</i>
US	<i>unique short</i>
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolettes Licht
V5	auf SV5 V-Protein beruhendes Epitop
V5His <sub>6</sub>	Fusionsepitop aus V5 und HIS <sub>6</sub>
VACV	Vakzinia-Virus
vFcR	viraler Fc-Rezeptor
v/v	Volumen pro Volumen
VZV	Varicella zoster Virus
WHO	World Health Organization, Weltgesundheitsorganisation
Wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
z. B.	zum Beispiel

## Aminosäuren

A (Ala)	Alanin
C (Cys)	Cystein
D (Asp)	Asparaginsäure
E (Glu)	Glutaminsäure
F (Phe)	Phenylalanin
G (Gly)	Glycin
H (His)	Histidin
I (Ile)	Isoleucin

K (Lys)	Lysin
L (Leu)	Leucin
M (Met)	Methionin
N (Asp)	Asparagin
P (Pro)	Prolin
Q (Glu)	Glutamin
R (Arg)	Arginin
S (Ser)	Serin
T (Thr)	Threonin
V (Val)	Valin
W (Trp)	Tryptophan
Y (Tyr)	Tyrosin

## Einheiten

A	Ampere
°C	Grad Celsius
d	<i>day(s)</i> , Tage
g	Gramm
h	<i>hour</i> , Stunde
J	Joule
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
m	Milli (1/10 <sup>3</sup> )
μ	Mikro (1/10 <sup>6</sup> )
M	Molarität, Teilchenmenge pro Volumen
nm	Nanometer
min	Minute
n x g	n-fache Erdbeschleunigung
sek	Sekunde
U	Unit
V	Volt

### Zusammenfassung

Zelluläre Fc $\gamma$ -Rezeptoren sind Oberflächenmoleküle, die auf spezifische Weise den Fc-Teil von IgG-Antikörpermolekülen binden. Sie sind wichtige Bestandteile des Immunsystems und vermitteln über die IgG-Bindung entscheidende Signale zur Auslösung bzw. Modulation von Effektorfunktionen. Interessanterweise kodieren Mitglieder der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Herpesviren virale Fc $\gamma$ -Rezeptoren, für die IgG-abhängige wie auch IgG-unabhängigen Funktionen beschrieben wurden. Das Humane Cytomegalovirus (HCMV) kodiert für die viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren gp34 und gp68, die im Virion und auf der Oberfläche infizierter Zellen exprimiert werden. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte eine gp34- bzw. gp68-abhängige Inhibition der IgG-vermittelten Aktivierung zellulärer Fc $\gamma$ -Rezeptoren nachgewiesen werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit Hilfe rekombinanter gp34- und gp68-Proteine nach zellulären Liganden der HCMV-kodierten Fc $\gamma$ -Rezeptoren zu suchen, um so Hinweise auf weitere, möglicherweise auch IgG-unabhängige, Funktionen von gp34 und gp68 zu erhalten. Dazu wurden lösliche Epitop-markierte gp34- und gp68-Proteine in HEK293-Zellen hergestellt und mittels Ni-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die Bindung der rekombinanten Proteine an verschiedene Zelltypen wurde durchflusszytometrisch nachgewiesen. Dabei konnte die spezifische Bindung von gp34 und gp68 an distinkte Subpopulationen von B-, NK-, und NKT-Lymphozyten gezeigt werden. Die interagierende B-Zellsubpopulation wurde als IgG<sup>+</sup>-Gedächtnis-B-Zelle und der IgG-B-Zellrezeptor als Ligand von gp34 und gp68 identifiziert. Die interagierende NK-Zellsubpopulation wurde als CD16<sup>+</sup> NK-Zellpopulation identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass für diese Bindung das über den Fc $\gamma$ -Rezeptor IIIa (CD16)-gebundene monomere IgG („cytophiles IgG“) notwendig ist, welches auf frisch aus dem Blut isolierten NK-Zellen zu finden ist. Die gp34- bzw. gp68-NK-Zellbindung geht durch den Verlust des cytophilen IgGs (z. B. nach Säurebehandlung der Zellen) verloren. Die Wirkung der gp34- bzw. gp68-NK-Zellbindung auf die NK-Zellaktivität wurde ebenfalls untersucht. Hierbei konnte zum ersten Mal die Inhibition der IgG-abhängigen CD16- bzw. NK-Zellaktivierung durch rekombinante Proteine der Fc $\gamma$ -Rezeptoren gp34 und gp68 nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass die HCMV-kodierten Fc $\gamma$ -Rezeptoren die CD16-Aktiveringung, ausgelöst durch opsonisiertes (Antigen-gebundenes) IgG sowie durch CD16-gebundenes (cytophiles) IgG, inhibieren können. Die HCMV-kodierten Fc $\gamma$ -Rezeptoren gp34 und gp68 besitzen somit die Fähigkeit, über IgG direkt oder indirekt an Immunzellen zu binden und so deren Aktivität zu regulieren.

### Summary

Host Fc $\gamma$  receptors (Fc $\gamma$ R) are cell surface resident immune receptors recognizing the constant Fc part of IgG. IgG-mediated Fc $\gamma$ R crosslinking by antigen results in the activation of immune cells (e.g. natural killer (NK) cells or monocytes) playing a crucial role in immune responses against pathogens. Interestingly, members of the  $\alpha$ - and  $\beta$ -*herpesviridae* express virally encoded Fc $\gamma$  receptors (vFc $\gamma$ Rs) which exert IgG-dependent but also IgG-independent immune evasive functions. The Human Cytomegalovirus (HCMV) encodes the vFc $\gamma$ Rs gp34 and gp68, which are expressed on the surface of the virion and the infected host cell. Previous studies showed the inhibition of the IgG-mediated activation of host Fc $\gamma$  Receptors by gp34 and gp68.

The aim of this thesis was to identify cellular ligands of the viral proteins gp34 and gp68, and thereby uncovering novel functions of the molecules. Epitope-tagged soluble gp34 and gp68 molecules were produced in HEK293 cells and incubated with different human cell types. FACS analysis revealed specific binding patterns of gp34 and gp68 to defined B, NK and NKT cell subsets but not to T lymphocytes. The interacting B cells were identified as CD19<sup>+</sup> B cells, coexpressing surface IgG and the memory marker CD27. The IgG B cell receptor was identified as ligand of gp34 and gp68. Both vFc $\gamma$ Rs also bound to CD16<sup>+</sup> NK cells but did not stain CD16<sup>-</sup> NK cells. Both vFc $\gamma$ Rs lost their capability to decorate NK cells upon *in vitro* culture due to a loss of cytophilic IgG which was prebound to CD16 of *ex vivo* isolated primary NK cells. Consequently, addition of purified monomeric IgG to NK cell cultures readily restored binding of vFc $\gamma$ Rs. Moreover, activation of primary NK cells as well as of CD16-expressing BW5147 reporter cell transfectants by antigen-opsonized IgG or CD16-bound cytophilic IgG was strongly inhibited by soluble vFc $\gamma$ Rs.

Thus, by binding IgG HCMV encoded Fc $\gamma$  Receptors bind directly or indirectly to different immune cells and regulate their activity.

# 1 Einleitung

## 1.1 Viren

Obwohl Viren erst Ende des 19. und Anfang des 20. Jahrhunderts als Krankheitserreger entdeckt wurden, ist es die am häufigsten vorkommende biologische Daseinsform auf dem Planeten (Breitbart und Rohwer, 2005). Der Begriff „Virus“ (lat.: Schleim, Saft, Gift) wurde dabei eigentlich schon im ersten Jahrhundert vor Christus von Cornelius Aulus Celsus benutzt, um damit die Übertragung von Krankheiten durch „Gifte“ zu bezeichnen. Die wissenschaftlichen Untersuchungen von Adolf Mayer, Dmitri Iossifowitsch Iwanowski und Martinus Willem Beijerinck zur Übertragung der Tabakmosaikviruskrankheit Ende des 19. Jahrhunderts legten aber den eigentlichen Grundstein zur Entdeckung der Viren als eigene Daseinsform und Krankheitserreger.

Viren sind in Form des Virions Nukleinsäure-Protein-Komplexe ohne eigenen Stoffwechsel. Ihre genetische Information kann in Form von Ribonukleinsäure (RNA) oder Desoxyribonukleinsäure (DNA) vorliegen, welche von einer Proteinhülle, dem Viruskapsid, schützend umgeben wird. Das Nukleokapsid (Nukleinsäure plus Kapsid) ist bei einigen Viren zusätzlich von einer Lipidmembran umhüllt, die sich von der Zellmembran der Wirtszelle ableitet und in die verschiedene virale Glykoproteine eingelagert sind. Viren tragen zwar ihre eigene Erbinformation, aber nicht das entsprechende Werkzeug (Ribosomen) bei sich, um diese Information autark in Proteine zu translatieren und somit auch eigenständig replizieren zu können. Viren sind daher strikt abhängig vom Translationsapparat ihrer entsprechenden Wirtszelle und somit obligat intrazelluläre Parasiten.

Viren können alle drei Domänen des Lebens infizieren: Eukaryoten, Archeen und Bakterien. Viren von Bakterien werden dabei als Bakteriophagen bezeichnet. Mittlerweile wird sogar davon ausgegangen, dass Viren auch andere Viren infizieren können (La Scola et al., 2008). In Anlehnung an Bakteriophagen, wurde hier der Begriff Virophagen vorgeschlagen.

### 1.1.1 Herpesviren

Herpesviren sind in der Natur ubiquitär verbreitet und ko-evolvieren schon seit über 200 Millionen Jahren mit ihren Wirten. Mittlerweile sind über 100 verschiedene Herpesvirenspezies bekannt. Seit 2008 werden alle Herpesviren taxonomisch der Ordnung *Herpesvirales* zugeordnet, die in drei Familien unterteilt wird: *Alloherpesviridae*,

*Herpesviridae*, *Malacoherpesviridae* (Davison et al., 2009). Die neue Familie *Alloherpesviridae* umfasst die Herpesviren der Fische und Frösche, während die Familie der *Herpesviridae* alle Herpesviren von Säugetieren, Vögeln und Reptilien beinhaltet. Es existieren auch Herpesviren die *Invertebrata* infizieren. Die Zahl bereits bekannter und beschriebenen Viren ist allerdings im Vergleich zu den Herpesviren der *Vertebrata* sehr gering. Die Familie der *Malacoherpesviridae* umfasst die bisher bekannten Herpesviren der Weichtiere (Savin et al., 2010). Obwohl es keine hochkonservierten Gene bzw. Proteine in allen Herpesvirusspezies gibt, so ist doch die Morphologie des Viruspartikels bei allen Herpesviren gleich und unterscheidet sich von anderen Viren. Herpesviren besitzen ein doppelsträngiges lineares DNA-Genom von ca. 125-290 kbp Länge, welches assoziiert mit dem Virus-Core, einer fibrilären Proteinmatrix, in einem ikosaedrischen Kapsid vorliegt, das eine ungefähre Größe von 100 nm hat. Dieses Kapsid ist wiederum von einer Proteinmatrix, dem sogenannten Tegument, umgeben. Eine Lipid-Doppelmembran, die eine Vielzahl viruskodierter Glykoproteine enthält, umhüllt Tegument und Kapsid. Die Herpesviren gehören somit zu den behüllten Viren. Ein weiteres gemeinsames Merkmal der Herpesviren ist die Ausbildung einer lebenslangen Persistenz, bei der das Virusgenom nach der Erstinfektion latent im Wirtzellorganismus verbleibt. Im Zustand der Latenz werden keine infektiösen Viruspartikel produziert, das Virus kann aber unter bestimmten Umständen, wie z. B. Stress, Immunschwäche bzw. -defekt, reaktivieren, was zu einer wiederkehrenden Replikation führt. Die Familie der *Herpesviridae*, zu denen auch die humanpathogenen Herpesviren gehören, wird in die drei Subfamilien: *Alpha-*, *Beta-*, *Gammaherpesvirinae* eingeteilt. Diese Subfamilien unterscheiden sich bezüglich Pathogenität, Zelltropismus und ihren Replikationseigenschaften. Es existieren 8 bzw. 9 verschiedene humanpathogene Herpesviren (HHV): HHV 1 bis HHV 8, wobei für das HHV 6 zwei Varianten (A/B) existieren (Aubin et al., 1991; Schirmer et al., 1991). Alphaherpesviren zeichnen sich durch ein breites Wirtsspektrum (*in vitro*), einen relativ kurzen Replikationszyklus (besonders *in vitro*), und durch eine lebenslange latente Infektion von Neuronen aus. Ein typischer Vertreter der Alphaherpesviren ist das Herpes simplex Virus Typ 1 (HSV-1 bzw. HHV 1), das besonders durch seine häufigste Manifestationsform den *Herpes labialis* (Lippenherpes) bekannt ist. Betaherpesviren haben ein enges Wirtsspektrum und einen langen Replikationszyklus. Mit dem Cytomegalovirus wird der prototypische Vertreter der Betaherpesviren im nächsten Abschnitt genauer vorgestellt. Gammaherpesviren zeichnen sich ebenfalls durch ein enges Wirtsspektrum aus und infizieren *in vivo* insbesondere T oder B-Zellen. Die beiden humanpathogenen Gammaherpesviren: Epstein-Barr-Virus (EBV, HHV 4)

und Kaposi-Sarkom-Herpesvirus (KSHV, HHV 8) werden zu den onkogenen Viren gezählt und für die Entstehung verschiedener Krebserkrankungen verantwortlich gemacht (Martin und Gutkind, 2008).

### 1.1.1.1 Das Humane Cytomegalovirus

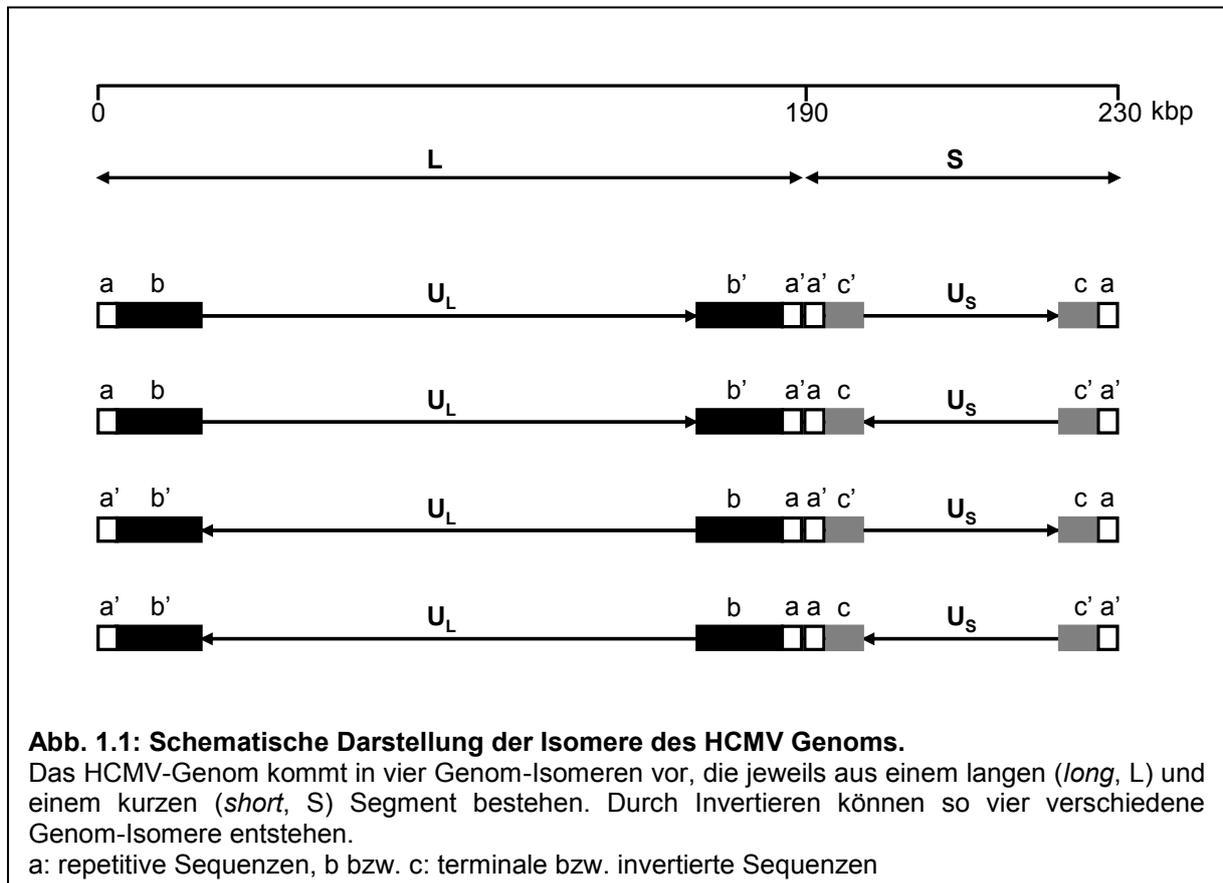
Das Cytomegalovirus ist aufgrund seiner strikten Wirtsspezifität und seines langsamen Replikationszyklus ein prototypischer Vertreter der Betaherpesviren. Der Name des Virus beschreibt das typische Aussehen der virusinfizierten Zelle, die durch den virus-induzierten zytopathischen Effekt vergrößert (Cytomegalie) und mit Einschlusskörperchen vorliegt. Schon Anfang des 20. Jahrhunderts beschrieben verschiedene Wissenschaftler solche Zellen in isoliertem humanen Gewebe (Ho, 2008). Das Virus konnte aber erst 1956 von verschiedenen Arbeitsgruppen isoliert und in humaner Zellkultur passagiert werden (Smith, 1956; Rowe et al., 1956; Craig et al., 1957). Anfangs wurde es als *Salivary gland Virus* (SVG) oder als *Cytomegalic inclusion disease virus* (CID) bezeichnet. Im Jahr 1960 benannte Thomas H. Weller das Virus dann endgültig Cytomegalovirus (Weller et al., 1960).

Cytomegaloviren sind in der Natur weit verbreitet. Viele verschiedene Tierspezies wie auch der Mensch sind mit dem jeweiligen Cytomegalovirus infiziert. Cytomegalovirusgenome liegen kolinear zwischen den Spezies vor. Wie alle anderen Herpesviren auch, bildet das Cytomegalovirus nach Erstinfektion eine lebenslange Persistenz aus. Ein Ort, an dem das Virus latent verbleibt, sind die CD34<sup>+</sup> Blutvorläuferzellen. Das HCMV-Genom kann direkt in *ex vivo* isolierten CD34<sup>+</sup> Zellen nachgewiesen werden (Mendelson et al., 1996). Lytische Genexpression ist erst nach Differenzierung der Vorläuferzellen nachweisbar (Maciejewski et al., 1992; Kondo et al., 1994; Minton et al., 1994).

### 1.1.1.2 Das HCMV-Genom

Die Cytomegaloviren haben die größten Genome unter den Herpesviren. Mit ca. 230 kbp kodiert HCMV ungefähr 200 offene Leserahmen (ORF, *open reading frame*). Das Genom liegt wie bei allen Herpesviren als lineare doppelsträngige DNA vor. Sobald das Virus jedoch eine Zelle infiziert und die DNA in den Zellkern entlassen wird, zirkularisiert diese und wird dort unter Bildung von Konkatemeren nach dem *Rolling-circle*-Prinzip repliziert (McVoy und Adler, 1994). Diese Zirkularisierung ist möglich, da die HCMV-DNA an ihren Enden repetitive Sequenzen enthält. Grundsätzlich ähnelt das HCMV-Genom stark dem HSV-Genom. Beide Genome werden der Genomklasse E der Herpesviren zugeordnet (Pellet und

Roizman, 2007). Es setzt sich aus zwei Segmenten zusammen: dem L (*long*)- und dem S (*short*)-Segment. Diese Segmente bestehen jeweils aus einer einzigartigen (*unique*) Sequenz ( $U_L$ -*unique sequence long*,  $U_S$ -*unique sequence short*), die von invertierten Sequenzen umgeben sind, die wiederum repetitive Sequenzen enthalten (s. Abb. 1.1). Diese kurzen repetitiven Sequenzen "a" sind variabel in Länge und Kopienzahl (Tamashiro et al., 1984; Spaete und Mocarski, 1985; Tamashiro und Spector, 1986) und ermöglichen u. a. die Zirkularisierung der DNA und eine Isomerisierung des Genoms (Kilpatrick und Huang, 1977). Die Deletion der internen repetitiven Sequenzen verhindert zwar die Genom-Isomerisierung von HCMV, beeinflusst aber kaum die Replikationsfähigkeit des Virus *in vitro* (Sauer et al., 2010).



Das HCMV-Genom wurde erstmals 1990 vollständig sequenziert und annotiert (Chee et al., 1990). Die Benennung der HCMV-kodierten Gene basiert auf dieser Annotation und beschreibt ihre Lage im Genom, z. B. *UL1* bis *UL150*. Das von Chee und Kollegen sequenzierte HCMV-Genom stammt aus dem (auf humanen Fibroblasten vielfach passagierten) HCMV-Stamm AD169. Mittlerweile wurden auch andere HCMV-Stämme, die entweder hoch-, niedrig-passagiert oder direkt aus klinischem Material isoliert wurden,

sequenziert und analysiert (Dolan et al., 2004; Murphy und Shenk, 2008). Diese Analysen zeigen, dass die extensiv-passagierten Laborstämme AD169 und Towne verglichen mit den niedrig-passagierten Stämmen (z. B. Toledo) große Deletionen, zusätzlich aber auch Genduplikationen, tragen (Cha et al., 1996). Aber auch niedrig-passagierte Stämme zeigen schon nach wenigen Zellkulturpassagen in einigen Genen Mutationen, die Auswirkungen auf den Zelltropismus von HCMV haben (Akter et al., 2003; Dolan et al., 2004; Wang und Shenk, 2005).

### 1.1.1.3 Das HCMV-Virion

Die Virionstruktur von HCMV folgt dem generellen Aufbau aller Herpesviren und setzt sich aus mindestens 59 HCMV-kodierten Proteinen zusammen (Varnum et al., 2004). Die virale DNA liegt eingeschlossen in einem ikosaedrischen Kapsid (ca. 100 nm) vor. Der Zusammenbau (*assembly*) des Kapsids erfolgt im Nukleus. Die benötigten HCMV-kodierten Proteine werden dazu in den Nukleus der infizierten Zelle geschleust. Nach der Kapsidformation wird die virale DNA durch einen Terminase/Portal-Komplex in das Kapsid eingeschleust. Dabei formt das HCMV-kodierte Portalprotein (PORT, *UL104*) durch Oligomerisierung Kanäle, durch die DNA geschleust werden kann. Die Terminase, die sich aus den Untereinheiten pUL56 und pUL89 zusammensetzt, bindet an das Kapsid und an die virale konkatemere dsDNA und spaltet diese (Scheffczik et al., 2002), so dass immer nur ein virales Genom pro Kapsid verpackt wird.

Das Kapsid ist umgeben von einer Proteinmatrix, dem Tegument, das viele verschiedene Virus- aber auch Wirts-kodierte Proteine (Baldick, Jr. und Shenk, 1996; Varnum et al., 2004) und sogar RNA-Transkripte enthält (Greijer et al., 2000; Terhune et al., 2004). Kapsid und Tegument sind umschlossen von einer Virushülle (*Envelope*), die sich von der Zellmembran (Lipiddoppelmembran) der Wirtszelle ableitet und in die virale Glykoproteine eingelagert sind. Viele dieser Glykoproteine, wie z. B. gB (*UL55*), gM (*UL100*), gN (*UL73*), gO (*UL74*), gL (*UL115*) oder gH (*UL75*) sind für den Eintritt des Virions in die Wirtszelle von eminenter Bedeutung.

### 1.1.1.4 Epidemiologie und Klinische Bedeutung von HCMV

HCMV ist ubiquitär verbreitet. Die Seroprävalenz liegt dabei zwischen 40-100 % der Erwachsenenpopulation, dabei spielen der sozioökonomische Status, unabhängig davon aber auch das Geschlecht und Alter eine Rolle (Tookey et al., 1992; Lubeck et al., 2010). Das

Virus wird horizontal durch direkten Kontakt mit Körperflüssigkeiten, wie Urin, Speichel, Blut oder Zervixsekret und Samenflüssigkeit übertragen. Zur Primärinfektion kommt es hauptsächlich im Kindesalter (besonders in Kindertagesstätten) aber auch später zwischen Sexualpartnern. Das Virus kann aber auch vertikal von der Mutter transplazentar (*intra partum*) auf den Fötus oder mit der Muttermilch auf das Neugeborene übertragen werden. Die transplazentare Übertragung durch die Mutter tritt häufig bei HCMV-Erstinfektionen, aber auch bei Reaktivierung sowie Superinfektion mit anderen HCMV-Virusstämmen auf (Boppana et al., 2001). HCMV ist weltweit die häufigste kongenitale Infektion, zu der es zu 32 % bei HCMV-Erstinfektionen in der Schwangerschaft und nur zu 1,4 % bei Re- sowie Superinfektionen der Mutter kommt (Kenneson und Cannon, 2007).

In immunkompetenten Personen verläuft die HCMV-Infektion in den meisten Fällen asymptomatisch. Bei immungeschwächten Personen (Transplantatempfänger, HIV-Patienten) und immunologisch unreifen Individuen (Embryos, Feten, Neugeborene) kann es allerdings zu schweren Krankheitsverläufen durch eine HCMV-Infektion kommen. Die transplazentare Übertragung des Virus auf den Embryo oder den Fötus kann zu schwerwiegenden Krankheitsverläufen mit bleibenden Schäden des Zentralnervensystems und des Gehörs, aber auch zum Tod des Fötus (bis zu 30 % aller kongenitalen Infektionen) führen (Alford et al., 1990; Boppana et al., 1992; Ludwig und Hengel, 2009). Bei einer Virusübertragung durch Re- sowie Superinfektion der Mutter geht man vom Schutz des Fötus durch das maternale HCMV-spezifische IgG (Antikörper) aus. In diesem Fall treten die Erkrankungen mit weniger schwerwiegenden Verläufen auf (Ross et al., 2006; Ludwig und Hengel, 2009), obwohl auch hier schon letale Verläufe beschrieben wurden (Wintergerst et al., 2006).

Als ein opportunistischer Erreger tritt HCMV besonders auch bei HIV-Patienten und Transplantatempfängern auf und kann zu schweren Krankheitsverläufen wie z.B. Pneumonitis, Hepatitis, Enzephalitis, Retinitis führen und sogar einen fatalen Ausgang nehmen. Die HCMV-Infektion stellt, trotz sensitiver Diagnostikverfahren und verschiedener Strategien zur Vorbeugung und Bekämpfung der HCMV-Infektion, eine der häufigsten Komplikationen nach allogener Knochenmarkstransplantation dar (Zaia, 2002; Ljungman et al., 2008). Zur Bekämpfung der HCMV-Infektion werden heutzutage verschiedenen Virostatika eingesetzt: Ganciclovir, Valganciclovir, Foscarnet, Cidofovir. Acyclovir und Valacyclovir werden dabei nur noch selten zur Prophylaxe benutzt, da der starke Einsatz der Virostatika besonders bei Transplantationsempfängern zur Entstehung von Virusresistenzen führt (Lurain und Chou, 2010). Der Einsatz von Antikörperpräparaten (CMV-IVIG [*intravenous immunoglobulin*]) wie z. B. Cytogam® (CSL Behring) oder Cytotect® (Biotest AG) zur Vorbeugung von

HCMV-Infektionen bzw. HCMV-Erkrankung bei Transplantatempfängern ist umstritten, da die bisherigen klinische Studien nur leichte oder keine vorbeugenden Effekte zeigen konnten (Raanani et al., 2009). Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von CMV-IVIG bei CMV-infizierten Frauen während der Schwangerschaft deutlich die Wahrscheinlichkeit einer Infektion des Fetus und CMV-bedingten Erkrankung verringern kann (Adler und Nigro, 2009).

Um HCMV-Infektionen wirklich effizient vorbeugen zu können, wäre eine HCMV-Impfung notwendig, die bisher aber nicht existiert. Für die Entwicklung einer HCMV-Vakzinierungsstrategie werden verschiedene Ansätze verfolgt wie die Gabe attenuierter Lebendviren oder verschiedener HCMV-Proteine (gB, pp65, IE1), die entweder in aufgereinigter Form oder als Vektorexpressionssysteme vorliegen (Schleiss, 2008). Ein erster Teilerfolg bei der Suche nach einer effizienten HCMV-Impfung konnte in einer neueren Studie erzielt werden, bei der mit einer 50 %igen Effizienz die CMV-Infektion von seronegativen Frauen durch die Impfung verhindert werden konnte (Dekker und Arvin, 2009).

## 1.2 Das Immunsystem als Abwehrsystem viraler Infektionen

Eine wesentliche Aufgabe des Immunsystems ist die Abwehr von Krankheitserregern wie z. B. Viren. Damit das Immunsystem ihm bekannte wie auch ihm unbekannt Viren bzw. virusinfizierte Zellen eliminieren kann, besitzt es angeborene und erworbene (adaptive) Abwehrmechanismen. Die angeborenen Mechanismen dienen der sofortigen und ersten Immunabwehr aller Krankheitserreger. Dabei erkennen sogenannte *Pattern-Recognition-Receptors* (wie z. B. *Toll-like receptors*) allgemeine Eigenschaften bzw. molekulare Muster (sogenannte *Pathogen-associated molecular patterns*) von Erregern wie z. B. LPS (Lipopolysaccharide) oder CpG-DNA. Die erworbenen Abwehrmechanismen, die Erregerspezifisch sind, bilden sich nach dem ersten Kontakt mit dem Erreger, sind aber dann im Immunsystem „gespeichert“ und schützen so vor erneuten Infektionen. Die verschiedenen Immunmechanismen setzen sich aus zellulären und humoralen Bestandteilen zusammen.

### 1.2.1 Lymphozyten als zelluläre Bestandteile des Immunsystems

Die Zellen des Immunsystems stammen von hämatopoetischen Stammzellen (HSC, *haematopoietic stem cell*) aus dem Knochenmark ab. Aus diesen pluripotenten Zellen entwickeln sich Vorläuferzellen (Progenitorzellen) mit eingeschränktem

Entwicklungspotential: die myeloiden und die lymphoiden Vorläuferzellen (Akashi et al., 2000; Reya et al., 2001). Aus den myeloiden Vorläuferzellen entwickeln sich die Granulozyten, die Monozyten (Vorläuferzellen von Makrophagen), dendritische Zellen und Mastzellen. Neben den Leukozyten (weiße Blutkörperchen) entwickeln sich aber auch die Megakaryozyten, aus denen die Thrombozyten entstehen, und Zellen des erythropoetischen Systems aus den myeloiden Vorläuferzellen. B-, T- und NK-Zellen entstehen aus den lymphoiden Vorläuferzellen.

Lymphozyten sind ein wesentlicher Bestandteil der Immunantwort, wobei B- und T-Zellen hauptsächlich bei der adaptiven, NK-Zellen hingegen bei der angeborenen Immunantwort eine wichtige Rolle spielen. Ein wesentlicher Unterschied zwischen NK- und B- bzw. T-Zellen ist, dass B- und T-Zellen Antigenrezeptoren tragen, die nur für ein bestimmtes Antigen, bzw. für ein Peptid eines Antigens, spezifisch sind. Diese spezifischen Antigenrezeptoren werden über die sogenannte somatische V(D)J-Rekombination (Genumlagerung) zufällig mit anschließender positiver und negativer Selektion erzeugt. Durch die Bindung des Antigens an den spezifischen Antigenrezeptor wird die B- oder T-Zelle spezifisch aktiviert. Die Aktivierung führt zur spezifischen Proliferation (klonale Expansion) bevor die Lymphozyten zu Effektorzellen differenzieren. NK-Zellen tragen hingegen keine antigenspezifischen Rezeptoren. Allerdings ermöglichen ihre Rezeptoren, die nicht durch V(D)J-Rekombination entstehen, ebenfalls eine Unterscheidung zwischen körpereigenen und -fremden Strukturen. Mithilfe ihres „angeborenen“ Rezeptorrepertoires sind NK-Zellen fähig, früh in einer Infektionsphase Pathogene bzw. Pathogen-infizierte Zellen zu erkennen und zu eliminieren. Eine vorangehende Differenzierung zur Effektorzelle wie bei B- bzw. T-Zellen ist dafür nicht nötig. Ein weiterer Unterschied ist, dass B- bzw. T-Zellen nach ihrer Aktivierung nicht nur zu Effektorzellen sondern auch zu sogenannten Gedächtniszellen differenzieren. Diese verbleiben als langlebige Effektorzellen im Körper und sorgen bei einer erneuten Infektion für eine schnelle Immunabwehr. Diese Zellen der adaptiven Immunabwehr stellen somit das sogenannte „immunologische Gedächtnis“ dar.

### 1.2.1.1 T-Zellen

Während der Reifung der T-Zellen im Thymus entwickeln sich unterschiedlichen T-Zellsubpopulationen, die sich bezüglich ihres T-Zellrezeptors ( $\alpha\beta$ - oder  $\gamma\delta$ -T-Zellrezeptor), ihres Korezeptors (CD4 oder CD8), ihrer Antigenpezifität und ihres Effektorpotentials unterscheiden (Janeway jr. et al., 2002). Die Aktivierung von T-Zellen mit einem

$\alpha\beta$ -T-Zellrezeptor ist abhängig von der Antigenpräsentation über MHC-Moleküle, die  $\gamma\delta$ -T-Zellaktivierung ist MHC-unabhängig.

Bei der Geburt tragen mehr als 90 % der T-Zellen einen  $\alpha\beta$ -T-Zellrezeptor. Die  $\alpha\beta$ -T-Zellen, die den CD8-Korezeptor exprimieren, erkennen nur Peptide, die über MHC-I-Moleküle präsentiert werden. Diese T-Zellen werden auch als zytotoxischen T-Zellen (früher auch als Killerzellen) bezeichnet, da ihre Aktivierung zur Zytolyse der infizierten oder entarteten Zelle führt (Janeway jr. et al., 2002). Die  $\alpha\beta$ -T-Zellen, die Peptide erkennen, die über MHC-II präsentiert werden, exprimieren den CD4-Korezeptor und werden als T-Helferzellen bezeichnet (Janeway jr. et al., 2002). Ihre Aktivierung führt zur Sekretion verschiedener Zytokine, die die adaptive Immunantwort regulieren, indem sie die Differenzierung von B-Zellen und zytotoxischen CD8<sup>+</sup>T-Zellen unterstützen und lenken. Die  $\alpha\beta$ -T-Zellen, die zusätzlich zum T-Zellrezeptor typische NK-Zellrezeptoren exprimieren, werden als NKT-Zellen bezeichnet. Dieser Begriff fasst dabei verschiedene Subpopulationen zusammen, die sich in der Expression ihrer Oberflächenrezeptoren, Funktion und Verteilung unterscheiden (Godfrey et al., 2004).

Die  $\gamma\delta$ -T-Zellen exprimieren den konservierten aber ebenfalls diversen  $\gamma\delta$ -T-Zellrezeptor und sind meistens CD4/CD8 doppelnegativ. Sie stellen nur eine kleine Subpopulation der T-Zellen im Blut dar. Sie sind kaum im Lymphgewebe und Thymus, im Gegensatz dazu aber verstärkt in der Haut und im Darmepithel zu finden (Hayday, 2000). Die  $\gamma\delta$ -T-Zellen werden MHC-unabhängig aktiviert, erkennen nicht-peptidische Antigene und besitzen ein breites Erkennungsspektrum von Fremd- aber auch Selbstantigenen. Ihr Funktionsspektrum ist divers. So können sie zytotoxisch aber auch nicht-zytotoxisch also regulatorisch wirken. Die  $\gamma\delta$ -T-Zellen spielen eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunität, da sie sofort und MHC-unabhängig auf Antigene reagieren können (Urban et al., 2010).

### 1.2.1.2 B-Zellen

B-Zellen treten nach ihrer Reifung im Knochenmark als naive B-Zellen in die Peripherie ein. Sie sind wie T-Zellen mit einem klonalen Antigen-spezifischen Rezeptor ausgestattet, in diesem Fall dem B-Zellrezeptor. Der B-Zellrezeptor ist ein Komplex aus einem membranständigen Immunglobulin (mIg) und einem assoziierten Heterodimer aus einer Ig $\alpha$ - und einer Ig $\beta$ -Kette (Reth, 1992). Die spezifische Antigenerkennung erfolgt über das mIg, die Signalübertragung über die assoziierten Signalketten (Ig $\alpha$ /Ig $\beta$ ), die in ihrem zytoplasmatischen Teil jeweils ein ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*)

also ein aktivatorisches Signalmotiv tragen. Nach ihrer Aktivierung proliferieren und differenzieren B-Zellen zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen oder zu Gedächtnis-B-Zellen, die einen langanhaltenden Schutz gegen wiederholte Infektion mit dem gleichen Erreger liefern (Ljunggren und Karre, 1990; Janeway jr. et al., 2002). Zusätzlich nimmt die B Zelle aber auch das gebundene Antigen auf, prozessiert es und präsentiert es auf seiner Oberfläche über MHC-II-Moleküle den  $CD4^+$  T-Helferzellen (Lanzavecchia, 1985), die wiederum die B-Zellproliferation und -differenzierung unterstützen. Der B-Zellrezeptor kann sein Antigen in löslicher Form aber auch in membrangebundener Form erkennen. Es wird angenommen, dass die Aktivierung von B-Zellen durch membrangebundene Antigene und unter Formung einer immunologischen Synapse die effektivere und auch wichtigere Aktivierung *in vivo* ist (Carrasco und Batista, 2006; Depoil et al., 2008).

Die B-Zelle ist die einzige Zelle die Antikörper sezernieren kann und ist ein wichtiger Teil der adaptiven und humoralen Immunantwort.

### 1.2.1.3 Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)

NK-Zellen, die ungefähr 5-10 % der Lymphozytenpopulation im Blut stellen, werden dem angeborenen Immunsystem zugeordnet. Sie besitzen im Gegensatz zu B- und T-Zellen keinen antigenspezifischen klonalen Rezeptor, sondern exprimieren eine Vielzahl verschiedener aktivatorische und inhibitorische Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche, mit denen sie bestimmte Strukturen auf körpereigenen Zellen als „selbst“ oder als „fremd“ erkennen können (Ljunggren und Karre, 1990; Lanier, 2005; Gasser und Raulet, 2006). Die Signalübertragung der meisten inhibitorischen und aktivatorischen Rezeptoren erfolgt über ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*)- bzw. ITAM-Signalmotive, die sich in ihrem zytoplasmatischen Teil oder in assoziierten Adapterketten befinden. Die „Verrechnung“ der aktivatorischen und inhibitorischen Signale entscheidet darüber, ob die NK-Zelle aktiviert wird, d. h. ob sie Zytokine ausschüttet oder die Zielzelle mithilfe zytotoxischer Granula tötet, bzw. nicht aktiviert wird (Moretta et al., 2001; Lanier, 2005). Wurde die NK-Zelle aktiviert, so ist sie, im Gegensatz zu T-Zellen, sofort fähig die Zielzelle zu töten, da die zytotoxischen Granula (gefüllt mit Granzymen und Perforin) bereits im Zytoplasma der NK-Zelle vorliegen. NK-Zellen speichern aber nicht nur eine große Menge an zytotoxischen Granula, sondern auch große Mengen an Interferon  $\gamma$  (IFN  $\gamma$ )-mRNA, um eine schnelle Interferonausschüttung nach ihrer Aktivierung zu gewährleisten (Stetson et al., 2003).

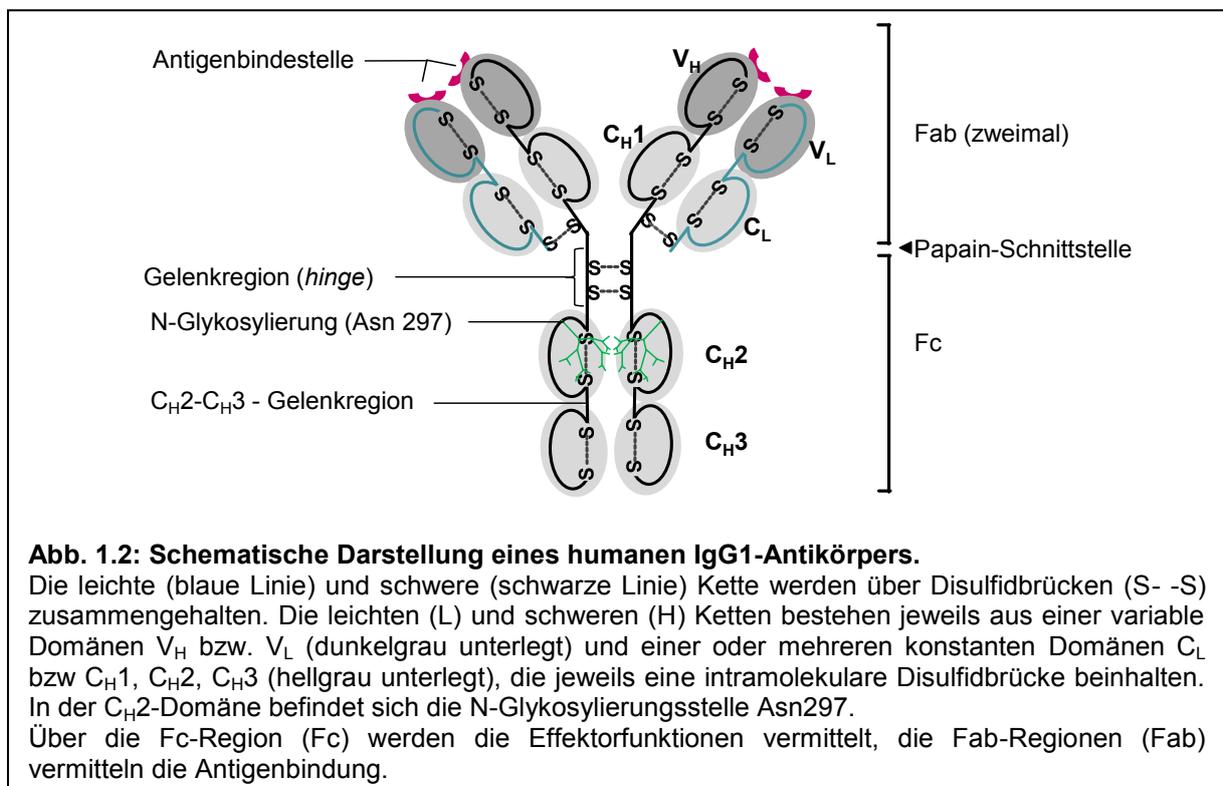
Viele der inhibitorischen NK-Zellrezeptoren erkennen „Selbst“-Moleküle in Form von MHC-I-Molekülen, die auf fast jedem Zelltyp exprimiert werden. Dies verhindert, dass körpereigene gesunde Zellen von NK-Zellen angegriffen werden. Verlieren die Zellen allerdings ihre MHC-I-Oberflächenexpression, so dass sie nur noch geringe oder gar keine MHC-I-Moleküle auf Zelloberfläche tragen, wie das z. B. bei virusinfizierten Zellen oder bei Tumorzellen auftritt, dann wird die Zelle infolge des fehlenden inhibitorischen Signals zu einem Ziel für die NK-Zelle. Die Erkennung und Abtötung von Zellen durch NK-Zellen aufgrund des Verlusts körpereigener MHC-Moleküle wurde als „*Missing-Self*“-Hypothese (Ljunggren und Karre, 1990) formuliert. Das Fehlen von MHC-Molekülen hat aber keine Folgen, wenn die NK-Zelle nicht über andere Strukturen (z. B. aktivatorische Liganden) eine Bindung zu der betroffenen Zellen initiieren kann (Lanier, 2005). Zu den MHC-I-spezifischen inhibitorischen Rezeptoren gehören die Lectin-Ly49-Familie, die z. B. in Mäusen und Ratten, aber nicht beim Menschen exprimiert wird, die KIR (*killer cell immunoglobulin-like receptor*)-Familie, die wiederum beim Menschen und anderen Spezies, aber nicht in Mäusen, beschrieben wurde und der CD94/NKG2A-Rezeptor (Gasser und Raulet, 2006). Inhibitorische Funktionen wurden aber auch schon für andere MHC-I-unabhängige Oberflächenmoleküle wie z. B. 2B4 (Vacca et al., 2006) oder CD66a (Markel et al., 2002) beschrieben. Aktivatorische NK-Zellrezeptoren erkennen zelluläre Liganden, die entweder konstitutiv exprimiert werden oder Stress- bzw. Pathogen-induziert sind. Ebenso erkennen sie aber auch Pathogenkomponenten, wie z. B. virale Proteine auf der Zelloberfläche infizierter Zellen (Raulet und Vance, 2006), direkt. Der aktivatorische NKG2D-Rezeptor (human) bindet vor allem an MHC-ähnliche Moleküle wie z. B. MICA/B oder ULBP/RAET 1 (Lanier, 2005). In der Maus (*Mus musculus*) sind die Moleküle H60, MULT1 und RAE 1 gut beschriebene Liganden von NKG2D (Lanier, 2005). Viele dieser Moleküle werden in Tumorzellen oder infizierten Zellen verstärkt exprimiert. Eine Gruppe von Rezeptoren, die MHC-I-unähnliche Strukturen erkennen, ist die NCR (*natural cytotoxicity receptor*)-Familie, die aus den Mitgliedern NKp30, NKp44, NKp46 besteht (Moretta et al., 2000). Diese Rezeptoren erkennen einerseits zelluläre Strukturen und Moleküle wie z.B. B7-H6 oder BAT3 (Byrd et al., 2007; Pogge et al., 2007; Brandt et al., 2009), aber auch virale Proteine. Das Hemagglutinin des Influenzavirus, die Hemagglutinin-Neuraminidase des Sendai-Virus und des Newcastle-Disease-Virus konnten bereits als Liganden von NCRs identifiziert werden (Arnon et al., 2001; Mandelboim et al., 2001b; Arnon et al., 2005; Jaharian et al., 2009). Als ein weiterer Nkp30-Ligand wurde das HCMV-Protein pp65 identifiziert, das aber im Gegensatz zu den zuvor aufgeführten Liganden NK-Zellen nicht aktiviert, sondern inhibiert (Arnon et

al., 2005). Eine besondere Stellung unter den aktivatorischen NK-Zellrezeptoren nimmt der Fc $\gamma$ RIII A/CD16-Rezeptor ein. Er wird durch Antigen-gebundene Antikörper aktiviert und vermittelt der NK-Zelle die Fähigkeit zur Antikörper-abhängigen zellulären Zytotoxizität (ADCC *antibody dependent cellular cytotoxicity*). Diese Funktion macht die NK-Zelle auch zu einem wichtigen Bestandteil der adaptiven Immunantwort. Deswegen werden NK-Zellen auch als ein Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort angesehen.

### 1.2.2 Antikörper - humorale Immunität

Die durch Antikörper vermittelte spezifische Immunität wird auch als humorale Immunität bezeichnet. Antikörper (Immunglobuline) stellen die sezernierte Form eines B-Zellrezeptors dar. Sie gehören zur Immunglobulin Superfamilie (IGSF), deren Mitglieder sich durch ihre typische Ig-Domänen, welche jeweils aus 2  $\beta$ -Faltblättern, die über 2 konservierte Cysteine durch eine Disulfidbrücke verbunden sind, auszeichnen (Williams und Barclay, 1988). Immunglobuline besitzen eine Y-ähnliche Struktur, bei der zwei identische schwere (*heavy chain*, HC) und zwei identische leichte (*light chain*, LC) Immunglobulinketten über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (s. Abb. 1.2). Die leichte und die schwere Kette besitzen am N-terminalen Ende jeweils eine variable IGSF-Domäne. Die variablen Domänen einer schweren ( $V_H$ ) und einer leichten ( $V_L$ ) Kette bilden zusammen die variable Region des Antikörpers, die für die spezifische Antigenerkennung und -bindung zuständig ist (Virella und Wang, 1993; Janeway jr. et al., 2002). Da in einem Antikörpermolekül diese Region zweimal (identisch) vorliegt, besitzt ein monomeres Antikörpermolekül jeweils zwei Antigenbindungsstellen. Der C-Terminus der leichten Kette besteht aus einer konstanten IGSF-Domäne ( $C_L$ ), der C-Terminus der schweren Ketten aus drei oder vier unterschiedlichen aber konstanten IGSF-Domänen. Aufgrund der Aminosäuresequenz der schweren Kette werden die Immunglobuline in verschiedene Klassen eingeteilt. Im Menschen existieren fünf verschiedene Immunglobulinklassen: IgA, IgD, IgG, deren schwere Ketten jeweils drei konstante Domänen ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$ ) und IgE, IgM, die jeweils vier konstante Domänen ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$ ,  $C_{H4}$ ) besitzen (Janeway jr. et al., 2002; Schroeder, Jr. und Cavacini, 2010). Verdaut man Immunglobuline mit der Protease Papain so entstehen drei Fragmente: das Fc (*fragment crystallizable*)-Fragment und zwei gleiche Fab (*fragment antigen binding*)-Fragmente. Die Fab-Fragmente, die jeweils aus den variablen Domänen  $V_H$  und  $V_L$  und den konstanten Domänen  $C_L$  und  $C_{H1}$  bestehen, vermitteln die Antigenbindung. Das Fc-Fragment, welches aus den restlichen konstanten Domänen der schweren Kette besteht, vermittelt eine

Reihe von Effektorfunktionen. So kann ein Antigen-gebundenes Immunglobulin G oder M von C1q, der ersten Komponente des Komplementsystems, gebunden werden, und damit die Aktivierung der klassischen Komplementkaskade oder Phagozytose initiieren (Lu et al., 2008). Der Fc-Teil kann aber ebenso von spezifischen Rezeptoren, sogenannten Fc-Rezeptoren erkannt und gebunden werden. Für jede Immunglobulinklasse existieren dabei spezifische Fc-Rezeptoren, die u. a. auf Zellen des Immunsystems exprimiert werden. Die Bindung von Antigen-gebundenem Immunglobulin durch Fc-Rezeptoren führt zur Aktivierung der Fc-Rezeptor-exprimierenden Zellen und zu verschiedenen Effektorfunktionen, wie z. B. Endozytose, Phagozytose oder ADCC.



### 1.2.2.1 Immunglobulin G (IgG)

IgG ist das im Serum am konzentriertesten (ca. 70-80 % aller Immunglobuline) vorkommende Immunglobulin mit der längsten Halbwertszeit (ca. 21 Tage, Ausnahme IgG3: 7 Tage). Es ist außerdem das einzige Immunglobulin, das über die Plazenta von der Mutter auf den Fötus übertragen werden kann. Es sind vier verschiedene IgG-Isotypen/Subklassen bekannt, deren Benennung aufgrund ihrer Häufigkeit (IgG1>IgG2>IgG3>IgG4) im Serum erfolgte (Schroeder, Jr. und Cavacini, 2010). Alle IgG-Subklassen liegen als Monomer vor. Sie sind zu 95 % homolog zueinander und unterscheiden sich hauptsächlich in ihrer Gelenkregion

zwischen der C<sub>H</sub>1 und C<sub>H</sub>2 Domäne. Die Gelenkregion der unterschiedlichen IgG-Subklassen unterscheidet sich dabei in der Anzahl der Aminosäuren (AS) und der AS-Sequenz (Papadea und Check, 1989). IgG3 besitzt mit 62 AS die längste Gelenkregion und ist damit ungefähr viermal länger als IgG1 (15 AS) und IgG2 oder IgG4 (12 AS). Mit der unterschiedlichen Aminosäurekomposition in der Gelenkregion verändert sich auch die Anzahl der Disulfidbrücken, die die zwei schweren Ketten des IgG-Moleküls zusammenhalten. So sind es bei IgG1 und IgG4 zwei, bei IgG2 vier und bei IgG3 sogar 11 Disulfidbrücken. Die Unterschiede in der Gelenkregion führen zur unterschiedlichen Flexibilität der Antikörper und damit auch zu verschiedenen Effektorfunktionen, die über den Fc $\gamma$ -Teil des IgGs vermittelt werden (Papadea und Check, 1989; Redpath et al., 1998). So bindet C1q, das erste Protein der klassischen Komplementkaskade, vorrangig an IgG3 und IgG1. Auch die Bindung von Fc $\gamma$ -bindenden Rezeptoren ist IgG-Subklassen-abhängig. Für alle Subklassen aber gilt, dass die Glykosylierung des konservierten Asparagin 297 (Asn297) in der C<sub>H</sub>2-Domäne essentiell für die Interaktion von IgG und Fc $\gamma$ Rezeptor ist (Jefferis et al., 1998).

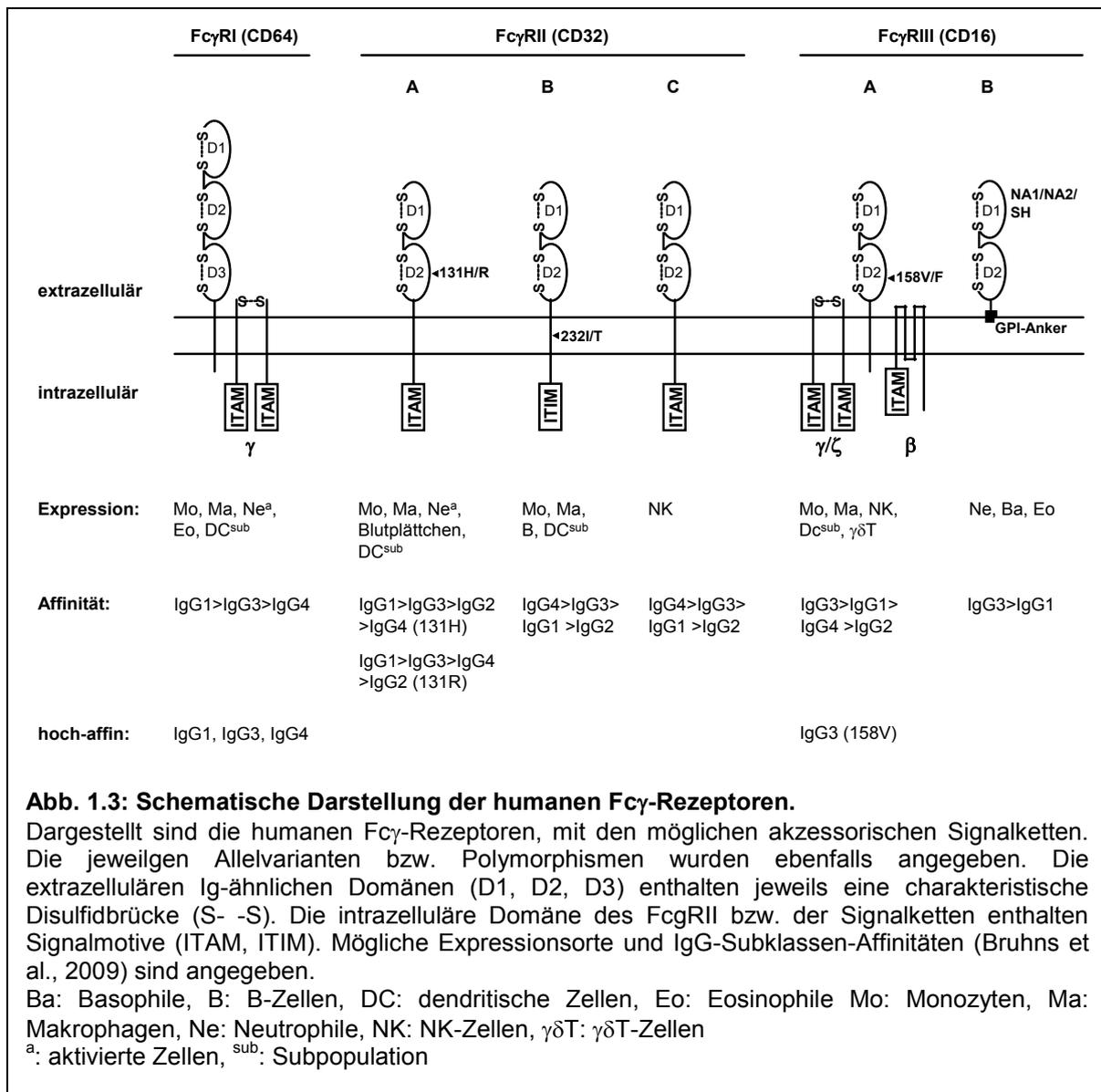
### 1.2.3 Fc $\gamma$ -Rezeptoren

Fc $\gamma$ -Rezeptoren sind IgG-bindende Rezeptoren. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Immunabwehr von Pathogenen wie z. B. Viren, da sie den Antikörper-Antigenkomplex mit zellulären Abwehrmechanismen, wie Phagozytose, Endozytose und ADCC verbinden (Daeron, 1997; Radaev et al., 2001). Im Menschen sind drei verschiedene Fc $\gamma$ -Rezeptorklassen (Fc $\gamma$ RI (CD64), Fc $\gamma$ RII (CD32), Fc $\gamma$ RIII (CD16)) bekannt (s. Abb. 1.3). Von dem Fc $\gamma$ RII existieren drei verschiedene Subtypen (Fc $\gamma$ RIIA, Fc $\gamma$ RIIB, Fc $\gamma$ RIIC), wobei für Fc $\gamma$ RIIA, Fc $\gamma$ RIIB jeweils zwei Allelvarianten bekannt sind. Für den Fc $\gamma$ RIII wurden zwei Rezeptoren (Fc $\gamma$ RIIIA, Fc $\gamma$ RIIIB) ebenfalls mit jeweils zwei Allelvarianten beschrieben (Nimmerjahn und Ravetch, 2008). Die Fc $\gamma$ -Rezeptoren gehören zur IGSF-Familie und sind alle bis auf den Fc $\gamma$ RIIIB, der über einen Glykosylphosphatidylinositol(GPI)-Rest in der Membran verankert ist, Typ I Transmembran-Glykoproteine. Der N-terminale Teil der Rezeptoren befindet sich somit extrazellulär und setzt sich aus zwei oder drei Ig-ähnlichen Domänen zusammen, die die IgG-Bindung vermitteln. Die Fc $\gamma$ RII-Moleküle sind die einzigen Rezeptoren, die direkt in ihrem zytoplasmatischen Teil ein Signalmotiv besitzen. Für Fc $\gamma$ RIIA und Fc $\gamma$ RIIC handelt es sich dabei um ein ITAM- und für den Fc $\gamma$ RIIIB um ein ITIM-Motiv. Der Fc $\gamma$ RI und der Fc $\gamma$ RIIIA übermitteln aktivatorische Signale, benötigen dazu

aber akzessorische  $\beta$ ,  $\gamma$  oder  $\zeta$ -Signalketten. Der GPI-verankerte Fc $\gamma$ RIIIB, der auf Neutrophilen und Basophilen exprimiert wird (Meknache et al., 2009), assoziiert wahrscheinlich mit anderen Rezeptoren wie z. B. dem Fc $\gamma$ RIIA, und mit „*lipid rafts*“, um Signale weiterzuleiten (Willcocks et al., 2009). Fc $\gamma$ -Rezeptoren können nicht nur anhand ihrer Signalübertragung, sondern auch aufgrund ihrer IgG-Affinität und IgG-Subklassenspezifität, unterschieden werden. Dabei wird in hochaffine Rezeptoren, mit einer Assoziationskonstante  $K_a > 10^7 \text{ M}^{-1}$  und niedrigaffine Rezeptoren  $K_a < 10^7 \text{ M}^{-1}$  unterschieden. Die hoch- und niedrigaffinen Rezeptoren können zwar IgG-Immunkomplexe binden, aber nur der hochaffine Rezeptor ist fähig, auch monomeres IgG zu binden. Bisher wurde immer davon ausgegangen, dass es im Menschen nur einen hochaffinen Fc $\gamma$ -Rezeptor, den Fc $\gamma$ RI, gibt. Er ist der einzige Fc $\gamma$ -Rezeptor, dessen extrazelluläre Domäne aus drei (D1, D2, D3) und nicht wie die anderen Rezeptoren aus zwei (D1, D2) Ig-ähnlichen Domänen besteht. Von der zusätzlichen dritten Domäne (D3) wird angenommen, dass sie die hohe Affinität zu dem IgG-Molekül vermittelt (Allen und Seed, 1989). Die Rezeptorklassen Fc $\gamma$ RII und Fc $\gamma$ RIII werden als niedrigaffine Rezeptoren bezeichnet. Innerhalb aller Fc $\gamma$ -Rezeptorklassen zeigen sich allerdings Unterschiede in der Bindungsaffinität einzelner IgG-Subklassen. So ist der Fc $\gamma$ RI zwar hochaffin für IgG1, IgG3 und IgG4 aber nicht für IgG2, welches selbst als Immunkomplex kaum gebunden wird. In neueren Untersuchungen konnte ebenfalls für den Fc $\gamma$ RIIIA, allerdings nur für die Allelvariante Fc $\gamma$ RIIIA<sub>V158</sub>, hochaffine Bindung für monomeres IgG3, aber nur niedrig-affine Bindung für alle anderen IgG-Subklassen gezeigt werden (Bruhns et al., 2009). Die Allelvariante Fc $\gamma$ RIIIA<sub>F158</sub> bindet hingegen alle IgG-Subklassen (monomeres IgG) nur mit niedriger Affinität. In IgG-Bindungsanalysen von NK-Zellen verschiedener Spender mit unterschiedlichem Genotyp bezüglich des Fc $\gamma$ RIIIA-V/F-Polymorphismus konnte sogar einen Gendosiseffekt gezeigt werden (Koene et al., 1997). Die Fc $\gamma$ RII-Moleküle sind niedrigaffine Rezeptoren. Die Affinität der Fc $\gamma$ -Rezeptoren hängt aber nicht nur von der Fc $\gamma$ -Rezeptorklasse, den Polymorphismen und den IgG-Subklassen, sondern auch vom Aufbau des Glykans (Asn297) des IgGs ab (Arnold et al., 2007).

Die Strukturen verschiedener Fc $\gamma$ Rezeptoren wurden durch analysierte Proteinkristalle gut charakterisiert (Sondermann et al., 1999; Maxwell et al., 1999; Zhang et al., 2000). Durch das Ko-Kristall des Fc $\gamma$ RIIIA mit einem humanen Fc $\gamma$ (IgG1)-Fragment und verschiedene Mutationsanalysen konnte die Fc-Rezeptor-IgG-Interaktion gut untersucht und beschrieben

werden. In diesen Analysen wurde eine 1:1 Stöchiometrie von FcγRIIIA mit humanem IgG1-Fcγ-Fragment gezeigt.



Die Funktion der Fcγ-Rezeptoren ist nicht nur vom Rezeptor selbst, sondern auch vom Expressionsort (s. Abb. 1.3), also der FcγR-exprimierenden Zelle, abhängig. In Antigen-präsentierenden Zellen, wie Makrophagen oder dendritischen Zellen, führt die Aktivierung der exprimierten Fcγ-Rezeptoren (FcγRI, FcγRIIA) zu Phagozytose, oxidativem *Burst* und Zytokinausschüttung (Tumornekrosefaktor-α und Interleukin-6). Interessanterweise führt die Aktivierung des durch IFN-γ oder G-CSF (*granulocyte colony-stimulating factor*) hochregulierten FcγRI auf Neutrophilen nicht zur Phagozytose (Rivas-Fuentes et al., 2010).

Die Aktivierung des Fc $\gamma$ RIIIA auf NK-Zellen durch Antigen-Antikörperkomplexe führt zur Degranulation der Zelle, bei der zytotoxische Granula ausgeschüttet werden. Dieser Prozess wird ADCC genannt. Zusätzlich können auch Zytokine wie z. B. IFN- $\gamma$  freigesetzt werden. Der Fc $\gamma$ RIIB ist der einzig bekannte inhibitorische Fc $\gamma$ -Rezeptor und ist ein wichtiger Regulator aktivatorischer Signale, die z. B. durch andere aktivatorische Fc $\gamma$ -Rezeptor initiiert werden (Ravetch und Lanier, 2000). Auf B-Zellen ist er der einzig exprimierte Fc $\gamma$ -Rezeptor, und reguliert die aktivatorischen Signale, die über den B-Zellrezeptor übermittelt werden (Choquet et al., 1993; Coggeshall, 1998).

Ein weiterer IgG-bindender Rezeptor, der aber nicht zu den klassischen Fc $\gamma$ -Rezeptoren gezählt wird, ist der neonatale FcR (FcRn). Der FcRn ist ein Heterodimer, welches sich aus  $\beta_2$ -Microglobulin und einem MHC-ähnlichen Molekül zusammensetzt (Simister und Mostov, 1989). Der FcRn bindet IgG in der Gelenkregion zwischen der CH2- und CH3-Domäne und ist dabei strikt pH-abhängig. Er bindet IgG nicht unter physiologischen (pH 7,4), aber unter sauren (endosomal) Bedingungen (pH 6-6,5) in einer 2:1 (FcRn:IgG) Stöchiometrie (Roopenian und Akilesh, 2007). Der neonatale Fc-Rezeptor vermittelt den diaplazentaren IgG-Transport zwischen Mutter und Fetus und ist wichtig für die passive Immunität des Fetus (Simister und Rees, 1985). Daneben spielt der Rezeptor eine bedeutende Rolle in der Homöostase von Serum-IgG und -albumin (Lencer und Blumberg, 2005; Anderson et al., 2006).

Ein weiterer IgG-bindender zellulärer aber nicht-klassischer Fc $\gamma$ -Rezeptor ist TRIM21 (*tripartite motif* 21). Im Gegensatz zu den vorher genannten Rezeptoren ist TRIM21 ein ausschließlich zytoplasmatisches Protein. Es gehört zu TRIM-Familie, deren Mitglieder aus drei verschiedenen Proteindomänen aufgebaut sind: der RING-, B-Box und *Coiled-Coil*-Domäne. Zusätzlich besitzt das TRIM21 am C-Terminus eine B30.2-Domäne, die für die Interaktion mit dem IgG-Molekül wichtig ist (Rhodes und Trowsdale, 2007). Es bindet alle IgG-Subklassen im nanomolaren Bereich in einer 2:1 (TRIM21:IgG) Stöchiometrie (Keeble et al., 2008). Kompetitionsanalysen mit Protein A und die Kristallisation von murinem TRIM21 in Komplex mit murinem IgG zeigen, dass TRIM21 an die Gelenkregion zwischen der CH2- und CH3-Domäne von IgG bindet und zusätzlich mit Aminosäureresten aus beiden Domänen interagiert (Rhodes und Trowsdale, 2007; Keeble et al., 2008). Mallery und Kollegen konnten die antivirale Funktion dieses Moleküls zeigen, bei der TRIM21 intrazelluläres Adenovirus mithilfe von IgG oder IgM neutralisiert. Dabei wird TRIM21 zu dem Antikörper-bedeckten Viruspartikel rekrutiert, welches daraufhin aufgrund der E3-

Ligasetätigkeit von TRIM21 ubiquitiniert und proteosomal abgebaut wird (Mallery et al., 2010).

### 1.3 Das Immunsystem und HCMV

#### 1.3.1 Immunabwehr gegen HCMV

Infiziert HCMV seinen Wirt, so werden Effektormechanismen der angeborenen Immunabwehr ausgelöst, die eine erste Virusabwehr ermöglichen. Die HCMV-Infektion führt zur Induktion von Typ-I-Interferonen, und damit zur Induktion Interferon-induzierter antiviraler Gene und pro-inflammatorischer Zytokine. Es konnte gezeigt werden, dass der TLR2 (*Toll-like receptor 2*) bei der Erkennung von HCMV-Partikeln eine wichtige Rolle spielt und die Aktivierung der angeborenen Immunabwehr über den NF- $\kappa$ B-Signalweg initiiert, wobei die Koexpression von CD14 unterstützend wirkt (Compton et al., 2003). Die HCMV-Hüllproteine gB und gH binden dabei an ein TLR2/TRL1-Heterodimer und können den TLR2-Signalweg auch unabhängig vom Viruspartikel auslösen (Boehme et al., 2006). Das Virus wird aber nicht nur extrazellulär sondern auch intrazellulär, nach Viruseintritt, von der Zelle erkannt. Das Sensorprotein ZBP1, das als wichtiger Faktor für die Induktion der Typ-I Interferone beschrieben wurde, erkennt die dsDNA von HCMV nach dessen Eintritt in die Zelle (DeFilippis et al., 2010). Für diese Erkennung ist keine Virusreplikation notwendig (DeFilippis et al., 2010). NK-Zellen sind ebenfalls ein wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunantwort. Im Maussystem konnte gezeigt werden, dass NK-Zellen wichtig für die Kontrolle von MCMV in der Primärinfektion sowie in der Reaktivierung sind (Bukowski et al., 1984; Bukowski et al., 1985; Polic et al., 1998). Über die Rolle von NK-Zellen in der Abwehr von HCMV ist wenig bekannt. Es gibt verschiedene Studien von Transplantationspatienten, bei denen ein Anstieg der Zytotoxizität der NK-Zellen mit Beginn der HCMV-Infektion korreliert und auch wichtig für das Überleben der Infektion zu sein scheint (Bowden et al., 1987; van den Berg et al., 1992; Venema et al., 1994; Lanier, 2005). In einem Fallbericht einer weiblichen Jugendlichen ohne NK-Zellen kam es zu immer wiederkehrenden Herpesvirusinfektionen u. a. mit HCMV, die letztendlich zum Tod der Jugendlichen führten (Biron et al., 1989). In einem Bericht über ein NK-Zell-defizientes Zwillingpaar mit gleichzeitiger leichter Neutropenie und transient niedriger CD8<sup>+</sup> T-Zellzahl, verstarb ein Zwilling aufgrund einer HCMV-Erkrankung (Bernard et al., 2004). Beim überlebenden Zwilling konnte keine Herpesvirusinfektion nachgewiesen werden. In

einem weiteren Artikel über ein 3-jähriges T-Zell-defizientes Mädchen wurde gezeigt, dass NK-Zellen in Abwesenheit der T-Zellen fähig sind, die HCMV-Infektion zu kontrollieren (Kuijpers et al., 2008).

Für die endgültige und lebenslange Kontrolle der CMV-Infektion ist die Ausprägung der adaptiven Immunantwort notwendig. Im Verlauf der primären HCMV-Infektion kommt es zur Ausbildung spezifischer Antikörper gegen verschiedene HCMV-Proteine wie z.B. pp65 (Tegumentprotein), gB oder gH (Virushüllproteine), aber auch gegen IE-Proteine wie IE1. Antikörper schützen vor kongenitaler HCMV-Infektionen des Fetus während der Schwangerschaft (Fowler et al., 1992). In Studien mit HCMV-negativen schwangeren Frauen konnte gezeigt werden, dass die Gabe von HCMV-immunen IgG-Präparationen (zur Prävention bzw. zur Therapie) die kongenitale Infektion verhindern bzw. abschwächen kann (Nigro et al., 2005). Die Effektivität solcher Antikörper zur Vorbeugung und Behandlung von HCMV-Infektionen in immunsupprimierten Patienten ist hingegen nicht so eindeutig. In Mäuseexperimenten konnte gezeigt werden, dass Antikörper zwar bei der Primärinfektion kaum eine Rolle spielen, dafür aber in der Reaktivierung limitierend auf die Virusausbreitung wirken (Jonjic et al., 1994). Durch adoptiven Transfer von B-Zellen (präventiv und therapeutisch) konnte die HCMV-Erkrankung in Mäusen eingedämmt und Todesfolgen verhindert werden (Klenovsek et al., 2007).

Die Schlüsselrolle bei der Kontrolle von CMV-Erkrankungen spielen T-Zellen. In Knochenmark- und Nierentransplantationspatienten konnte gezeigt werden, dass die Entwicklung zytotoxischer HCMV-spezifischer T-Zellen notwendig ist, um erfolgreich die HCMV-Erkrankung zu kontrollieren (Quinnan, Jr. et al., 1982; Rook et al., 1984). Durch adoptiven Transfer von zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in immundefiziente Patienten kann die zelluläre Immunität gegen HCMV erreicht und der Empfänger effektiv gegen HCMV-Erkrankung geschützt werden (Riddell et al., 1992; Walter et al., 1995). Neben den CD8<sup>+</sup> T-Zellen spielen aber auch CD4<sup>+</sup> und  $\gamma\delta$  T-Zellen eine Rolle in der Kontrolle der HCMV-Infektion (Crough und Khanna, 2009). Die verzögerte oder ausbleibende Entwicklung dieser Zellen nach einer Knochenmarks- bzw. Nierentransplantation korreliert ebenfalls mit der Schwere der HCMV-Erkrankung.

Alle Komponenten des Immunsystems spielen also bei der Kontrolle der HCMV-Infektion eine Rolle.

### 1.3.2 Immunevasionsmechanismen von HCMV

Damit das HCMV-Virus lebenslang in seinem Wirt, dem Menschen, verbleiben kann, hat es eine Vielzahl von Immunevasionsmechanismen entwickelt, die sich sowohl gegen das angeborene als auch das adaptive Immunsystem richten. In der frühen Infektion wird z. B. die IFN  $\alpha$ - bzw. IFN  $\gamma$ -Signalübertragung durch HCMV blockiert (Miller et al., 1998; Miller et al., 1999; Paulus et al., 2006; Le et al., 2008). Andererseits kodiert HCMV aber auch selbst virale Zytokin-, Chemokin- und Chemokinrezeptorhomologe (Mocarski, Jr., 2002; Crough und Khanna, 2009), um die von ihm induzierte Immunantwort zu supprimieren oder Chemokinrezeptor-tragende Zellen anzulocken. Eine wichtige Rolle im Infektionsverlauf spielt die Inhibition der T-Zellantwort des Körpers. So kodiert HCMV eine Vielzahl von Genen (*US2*, *US3*, *US6*, *US10*, *US11*), die durch unterschiedliche Mechanismen und zu verschiedenen Zeitpunkten in der HCMV-Infektion die MHC-I-Antigenpräsentation stören und herabregulieren (Hengel et al., 1998; Park et al., 2010). Auch die MHC-II-Antigenpräsentation wird durch das HCMV-kodierte US2-Protein verhindert (Tomazin et al., 1999). Die starke Herabregulation der MHC-Moleküle von der Oberfläche der HCMV-infizierten Zelle sollte wiederum zur Aktivierung der NK-Zellen führen (*Missing-self* Hypothese), aber HCMV wirkt auch dieser entgegen. So führt z. B. die Expression des HCMV-kodierten Proteins UL40 zur Heraufregulation der Zelloberflächenexpression von HLA-E-Molekülen in infizierten Zellen (Tomasec et al., 2000). HCMV kodiert auch für das MHC-I-Homolog gpUL18, das wie zelluläre MHC-Moleküle als trimerer Komplex mit  $\beta_2$ -Mikroglobulin und Peptid exprimiert wird. Die Rolle von gpUL18 ist allerdings noch nicht abschließend geklärt. So inhibiert es zwar LIR-1-positive NK-Zellen durch direkte Interaktion mit dem inhibitorischen NK-Zellrezeptor LIR-1, aktiviert aber gleichzeitig LIR-1-negative NK-Zellen (Prod'homme et al., 2007). Andere HCMV-kodierte Glykoproteine wie UL16 oder UL142 verhindern die Oberflächenexpression aktivatorischer NK-Zellliganden, wie MICA, MICB, ULBP-1, ULBP-2 und ULBP-3 und inhibieren so die Aktivierung von NK-Zellen durch die infizierte Zelle (Cosman et al., 2001; Chalupny et al., 2006; Wilkinson et al., 2008; Bennett et al., 2010). HCMV exprimiert aber nicht nur immunevasive Proteine sondern auch microRNAs (miRNA), um die Expression zellulärer Proteine zu regulieren. Die HCMV-miR-UL112 inhibiert die MICB-Expression und verhindert so die Oberflächenexpression des aktivatorischen NK-Zellliganden (Stern-Ginossar et al., 2007).

HCMV kodiert für virale Fc $\gamma$ -Rezeptoren, wahrscheinlich um IgG-vermittelten Effektorfunktionen entgegenwirken zu können (Lilley et al., 2001; Atalay et al., 2002;

Sprague et al., 2008). Erste Beweise dafür wurden in der Doktorarbeit von Eugenia Corrales-Aguilar erbracht (Corrales-Aguilar, 2008).

### 1.4 HCMV-kodierte Fc $\gamma$ -Rezeptoren

Schon Mitte der siebziger Jahre konnte gezeigt werden, dass HCMV infizierte Zellen Fc $\gamma$ -Rezeptoren exprimieren (Furukawa et al., 1975; Keller et al., 1976). Zum damaligen Zeitpunkt war allerdings nicht klar, ob diese Rezeptoren zellulären oder viralen Ursprungs waren. Fc-Binding wurde auf der Oberfläche und im Zytoplasma von HCMV-infizierten Zellen, aber auch im HCMV-Virion (Stannard und Hardie, 1991) beschrieben. Dass die Fc-bindenden Proteine viralen Ursprungs waren, wurde durch Arbeiten aufgeklärt, in denen die Produkte der HCMV-kodierten Gene *TRL/IRL11* und *UL119-118* (Spleißprodukt aus *UL119* und *UL118*) als Fc-bindende Proteine identifiziert wurden (Lilley et al., 2001; Atalay et al., 2002), die aufgrund ihres Laufverhaltens im SDS-Gel gp34 und gp68 benannt wurden. Das Glykoprotein gp34 wird dabei vom HCMV-Gen *TRL11* kodiert. Dieses Gen liegt in verschiedenen HCMV-Laborstämmen wie z.B. AD169 (varATCC) dupliziert als identische Genkopie *IRL11* vor. Das Fc-bindende Glykoprotein gp68 wird durch das gespleißte Genprodukt *UL119-118* kodiert. Der Name der gp68-kodierenden mRNA *UL119-118* geht auf die AD169-Annotation von Chee und Kollegen zurück (Chee et al., 1990; Dolan et al., 2004), in der *UL118*, obwohl es kein Startkodon enthält, als eigenständiges ORF vorhergesagt wurde. In Annotationen anderer HCMV-Stämme wird deswegen kein *UL118*-ORF mehr aufgeführt und die kodierende mRNA für gp68 wird nur noch *UL119* genannt (Dolan et al., 2004).

Gp34 und gp68 sind Typ-I-Transmembranproteine, die ein N-terminales Signalpeptid, eine Ektodomäne mit mehreren putativen N- bzw. O-Glykosylierungsstellen, eine Transmembrandomäne und einen relativ kurzen zytoplasmatischen Teil besitzen (Abb. 1.4). Das Vorhandensein von N-Glykanen konnte für beide Proteine bereits experimentell durch enzymatische Deglykosylierung nachgewiesen werden (Lilley et al., 2001; Atalay et al., 2002).

Das HCMV(AD169)-kodierte gp34-Protein besteht aus 234 AS (Abb. 1.4). In der extrazellulären Domäne befinden sich drei mögliche N-Glykosylierungsstellen. Im zytoplasmatischen Teil findet man ein sogenanntes Sortierungssignal mit einer Überstimmung mit dem Konsensusmotiv [D/E]xxxL[L/I]. Dieses Motiv vermittelt Internalisierung von Proteinen und führt die Proteine endosomal/lysosomalen Kompartimenten zu (Bonifacino und

Traub, 2003). Für gp34 wurde eine solche Internalisierung allerdings noch nicht gezeigt. Die TRL/IRL11-Proteinsequenz besitzt keine Homologie zu anderen herpesviralen Fc-Rezeptoren (Lilley et al., 2001). Aminosäurevergleiche mit den zellulären Fc $\gamma$ -Rezeptoren zeigen nur geringe Sequenzhomologie, trotzdem wurde aufgrund von Homologien einiger konservierter Aminosäurereste eine IGSF-ähnliche Domäne vorhergesagt (Atalay et al., 2002). Diese vorhergesagte Domänenstruktur von pTRL11 ist allerdings umstritten, da in einer anderen Publikation eine Homologie zur CR1 (*conserved region 1*)-Domäne, die Bestandteil von Adenovirusproteinen der E3-Region ist, gefunden wurde (Davison et al., 2003). Gp34-Moleküle bilden Homooligomere, die über intermolekulare Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Reinhard, 2008). Die AS 24-140 von gp34 sind essentiell für die Fc-Bindung (Reinhard, 2008). Die N-Glykosylierung des gp34-Proteins oder des humanen Fc $\gamma$ -Fragments sind jedoch nicht notwendig für die Interaktion (Sprague et al., 2008; Reinhard, 2008). Die genaue Bindungsstelle von gp34 und humanen Fc $\gamma$ -Fragment ist nicht bekannt, da Kristallisation und Analyse der Ultrastruktur des Moleküls aufgrund der starken Homooligomerisierung bisher nicht erfolgreich waren (Sprague et al., 2008). Henrike Reinhard konnte jedoch in ihrer Doktorarbeit anhand von Fc $\gamma$ -Präzipitationsanalysen zeigen, dass das Bindungsverhalten von gp34 vom Bindungsverhalten des HCMV-kodierten Fc $\gamma$ -Rezeptor gp68 (HCMV) sowie den zellulären Fc $\gamma$ -Rezeptoren abweicht (Reinhard, 2008). Das HCMV(AD169)-kodierte gp68 besteht aus 345 AS (Abb. 1.4). In der Ektodomäne werden 12 N- und 25 O-Glykosylierungsstellen (M. Fiedler, unpublizierte Daten) vorhergesagt. Im zytoplasmatischen Teil des Proteins wurde mit der Sequenz WSYKRL ein ITIM-ähnliches Motiv (ITIM-Konsensusmotiv: I/VxYxxL/V) gefunden (Atalay et al., 2002). Eine Funktion dieses Motivs in gp68 wurde bisher nicht gezeigt.

**pTRL11 / gp34 (HCMV)**

GenBank: ACL51080.1, 234 AS

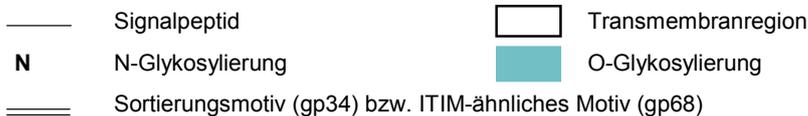
MQTYSTPLTLVIVTSLFLETTQGSSSSNAVEPTKKPLKLANYRATCEDRTRTLVTRLNTSHHSVWQRYDIYSRYMRRMPP  
LCIITDAYKETTRQGGAFACTORQNLTLYNLTVKDTGVYLLQDQYTG DVEAFYLI I HPRSFCRALETRRCFYPGGRVWV  
TDSQEADRAI I S DLKRQWSGLSLHCAWVSGMMIFV GALVICFLRSQRIGE QDAEHLRTDLDTEPLLLTVDGDLQ

**pUL119-118 / gp68 (HCMV)**

GenBank: AAL49993.1, 345 AS

MCSVLAIALVALLGDMHPGVKSS TTS AVTSPSNTT V TSTTS ISTSNVTS AVTTT VQ TSTSSASTSVIATTQKEGHLYT  
VNCEASYSHDQVSLNATCKVILLNNTKNPDILSVTCYARTDCKGPFQVGYLSAFPDPNEGKHLHLSYNATAQELLISGLR  
PQETTEYTCSEFFSWGRHHNATWDLFTYPIYAVYVGRNLNATMTRVRLVLLQEHCHLLNGSSLYHPNSTVHLHQGNQLIPPW  
NISNVTYNGQRLREFVYLN GTYTVVRLHVQIAGRSFTTYYVFIKSDPLFEDRL LAYGVLAFLVFMV ILLYVTYMLARR  
RDWSYKRLEEPVEEKKHPVPYFKQW

Vorhergesagte Proteindomänen und Glykosylierungen:



**Abb. 1.4: Aminosäuresequenz der HCMV-kodierten Fc $\gamma$ -Rezeptoren gp34 und gp68.**

Die Aminosäuresequenzen von gp34 und gp68 wurden dargestellt, putative Proteindomänen und Glykosylierungsstellen gekennzeichnet.

Auch gp68 konnte bisher nicht kristallisiert werden, trotzdem konnte die Bindung von gp68 an humanes IgG mithilfe verschiedener Fc-Bindungsanalysen charakterisiert und beschrieben werden. Die Bindung von gp68 an Fc $\gamma$  ist wie bei gp34 unabhängig von der N-Glykosylierung (Asn297) des Fc $\gamma$ -Fragments. Die Glykosylierungen am gp68-Molekül selbst spielen allerdings eine Rolle bei der Fc $\gamma$ -Bindung. Während die N-Glykosylierung von gp68 wichtig für die Bindung ist, so ist die O-Glykosylierung nicht essentiell (Sprague et al., 2008; Reinhard, 2008). Weitergeführte Fc-Bindungsanalysen mit einem in der C<sub>H2</sub>-C<sub>H3</sub>-Gelenkregion durch sechs Aminosäureaustausche mutierten Fc $\gamma$ -Fragment (nbFc, *nonbinding* Fc) zeigten den Verlust der gp68-Bindung an dieses mutierte nbFc (Sprague et al., 2008). Die Bindungsstelle von gp68 an Fc liegt also in der Gelenkdomäne zwischen der C<sub>H2</sub>- und C<sub>H3</sub>-Domäne des IgG-Moleküls und unterscheidet sich somit von der Bindungsstelle der zellulären Fc $\gamma$ -Rezeptoren, ähnelt aber der Bindungsstelle des HSV-1-kodierten Fc $\gamma$ -Rezeptor gE:gI, dem FcRn, und den bakteriellen Fc-Rezeptoren Protein A und Protein G (Roopenian und Akilesh, 2007; Sprague et al., 2008; Reinhard, 2008). Weitere Analysen ergaben, dass die Bindung von gp68 an Fc einer 2:1 (gp68:Fc) Stöchiometrie folgt und diese Bindung im

Gegensatz zum herpesviralen Fc-Rezeptor gE:gI pH-unabhängig (im pH-Bereich: 5,6-8) ist (Sprague et al., 2008).

### **1.5 Immunevasive Funktionen der HCMV-kodierten Fc $\gamma$ -Rezeptoren**

Die HCMV-kodierten Fc $\gamma$ -Rezeptoren gp34 und gp68 werden auf der HCMV-infizierten Zelle (Lilley et al., 2001; Atalay et al., 2002) und auf dem HCMV-Virion (Reinhard, 2008) exprimiert und könnten jeweils verschiedene Funktionen erfüllen. Von den Fc $\gamma$ -Rezeptoren auf dem HCMV-Virion wurde angenommen, dass sie die Neutralisation und die Komplement-vermittelte Virolyse inhibieren, wie das für den HSV-kodierten Fc-Rezeptor gE:gI gezeigt werden konnte (Frank und Friedman, 1989). Entgegen der Annahme konnte Frau Dr. Henrike Reinhard jedoch keine Inhibition der HCMV-Virusneutralisation oder der komplementverstärkten HCMV-Virolyse durch gp34 und gp68 nachweisen. Auch wenn von Gerna und Kollegen bereits gezeigt werden konnte, dass die Neutralisationskapazität von HCMV-spezifischen Antikörpern (IgG-Präparationen, humanes Serum) auf Endothel- bzw. Epithelzellen stark zunimmt (Gerna et al., 2008), so konnte auf Endothel- wie auf Fibroblastenzellen kein Phänotyp detektiert werden (Henrike Reinhard, unpublizierte Daten). HCMV schützt seine infizierten Zellen gegen komplement-vermittelte Zelllyse, indem es die Expression der Komplement-regulierenden Faktoren CD46 und CD55 heraufreguliert (Spiller et al., 1996). Die Expression der HCMV-kodierten Fc $\gamma$ -Rezeptoren gp34 und gp68 auf der Zelloberfläche hat keine Wirkung auf die Komplementkaskade (Corrales-Aguilar, 2008). Frau Dr. Eugenia Corrales-Aguilar konnte allerdings zeigen, dass die auf der Zelloberfläche exprimierten gp34 und gp68 Moleküle eine inhibierende Wirkung auf die Aktivierung der zellulären Fc $\gamma$ -Rezeptoren Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII und Fc $\gamma$ RIII haben. Mithilfe von Fc $\gamma$ R-tragenden Reporterzellen konnte sie die Antikörper-abhängige Aktivierung von jedem Rezeptor einzeln messen. Die Inhibition der Aktivierung durch virale Fc $\gamma$ -Rezeptoren konnte durch den Vergleich verschiedener HCMV-Deletionsmutanten und ektopen Expression von gp34 und gp68 im Vakziniaexpressionssystem gezeigt werden.

### **1.6 Weitere herpesvirale Fc $\gamma$ -Rezeptoren**

Nicht nur HCMV kodiert für virale Fc $\gamma$ -Rezeptoren, auch andere Vertreter der Cytomegaloviren, wie MCMV (Thale et al., 1994) oder RCMV (Bruggeman et al., 1984;

Budt et al., 2004) exprimieren virale Fc $\gamma$ -Rezeptoren. Auch Vertreter der  $\alpha$ -Herpesviren, wie HSV-1 (Baucke und Spear, 1979; Johnson et al., 1988), HSV-2 (Para et al., 1982), Varizella-Zoster-Virus (Litwin et al., 1992), Pseudorabiesvirus (Van De Walle et al., 2003) exprimieren Fc $\gamma$ -Rezeptoren. Für die viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren von MCMV und HSV-1 konnten neben der Fc-Bindung auch wichtige Antikörper-unabhängige Funktionen gezeigt werden.

### 1.6.1 Der MCMV-kodierte Fc $\gamma$ -Rezeptor m138/fcr-1

MCMV kodiert den gut beschriebenen Fc $\gamma$ -Rezeptor *m138/fcr-1*, der über seine Eigenschaft, der Bindung von murinem IgG, identifiziert werden konnte (Thale et al., 1994). Wie gp34 und gp68 ist *m138/fcr-1* ein glykosyliertes Typ-I-Transmembranprotein. Für den extrazellulären Bereich werden drei IGSF-ähnliche Domänen (Ig1, Ig2, Ig3) vorhergesagt, welche allerdings nur geringe Homologien zu den IGSF-Domänen der murinen Fc $\gamma$ -Rezeptoren aufweisen (Budt et al., 2004; Lenac et al., 2006). Die  $\Delta$ m138-Deletionsmutante zeigt *in vivo* aber nicht *in vitro* einen starken Wachstumsdefekt, der in einer nahezu Antikörper-freien Umgebung (Experimente in  $\mu$ MT-Mäusen) nicht aufgehoben werden konnte (Crnkovic-Mertens et al., 1998). Daraus wurde auf Antikörper-unabhängigen Funktionen des *m138/fcr-1*-Moleküls geschlossen. In Zusammenarbeit mit unserer Arbeitsgruppe konnten zwei dieser Antikörper-unabhängigen Funktionen gezeigt werden. Die NKG2D-Liganden MULT1 und H60 werden in Anwesenheit von *m138/fcr-1* von der Zelloberfläche infizierter wie auch transfizierter Zellen herabreguliert (Lenac et al., 2006). Interessanterweise ist für die Herabregulation von MULT1 die m138-IGSF-Domäne Ig1 essentiell. Diese Domäne ist für die Fc $\gamma$ -Bindung ausreichend, für die H60-Herabregulation ist allerdings die gesamte Ektodomäne von *m138/fcr-1* notwendig (Lenac et al., 2006). Durch *in vivo*-Experimente konnte gezeigt werden, dass die Regulation der NKG2D-Liganden durch *m138/fcr-1* eine wichtige Rolle während der MCMV-Primärinfektion spielt. Das starke Wachstumsdefizit der *m138/fcr-1*-Deletionsmutanten konnte durch NK-Zelldepletion oder selektive NKG2D-Blockierung aufgehoben werden.

Vor kurzem wurde mit Rae-1 $\epsilon$  ein weiterer NKG2D-Ligand publiziert, dessen Oberflächenexpression von *m138/fcr-1* herabreguliert wird (Arapovic et al., 2009).

Von einer anderen Arbeitsgruppe konnte die direkte Interaktion von *m138/fcr-1* mit dem B7-1 (CD80) Molekül, und die Herabregulierung des B7-1 Moleküls von der Oberfläche MCMV-infizierter oder *m138/fcr-1*-transduzierter dendritischer Zellen gezeigt werden (Mintern et al., 2006). Die verminderte Oberflächenexpression des kostimulatorischen Moleküls B7-1 führt

zu einer verminderten Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen und stellt somit einen weiteren Immunevasionsmechanismus von MCMV durch *m138/fcr-1* Expression dar.

### 1.6.2 Der HSV-1-kodierte Fc $\gamma$ -Rezeptorkomplex gE:gI

Der von HSV kodierte nicht-kovalente heterodimere Rezeptorkomplex gE:gI besteht aus den zwei glykosylierten Transmembranproteinen gE und gI, die durch die Gene *US8* und *US7* kodiert werden. Er bindet Subklassen-spezifisch humanes IgG (IgG4>IgG1>>IgG2) und Kaninchen IgG (Johansson et al., 1984). Dabei ist nur der Rezeptorkomplex aus beiden Proteinen fähig, monomeres IgG zu binden. Das Transmembranprotein gE ist, im Gegensatz zu gI, fähig auch allein Immunkomplexe zu binden (Johnson et al., 1988; Dubin et al., 1990; Bell et al., 1990). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass gE:gI das Virus vor Antikörper-Komplement-abhängiger Neutralisation (Frank und Friedman, 1989) und die HSV-1 infizierte Zelle vor ADCC (Dubin et al., 1991) schützt. Der Mechanismus durch den der Rezeptorkomplex verschiedene Effektorfunktionen nach Bindung des immunen IgG inhibieren kann, wird als *antibody bipolar bridging* (Frank und Friedman, 1989; Van Vliet et al., 1992) bezeichnet. Dabei bindet das immune IgG über seinen Fab<sub>2</sub>-Teil an sein Epitop auf der Virushülle bzw. der Virus-infizierten Zelle und wird dabei parallel über seinen Fc-Teil von dem gE:gI-Rezeptorkomplex (auf derselben Virushülle bzw. Zelloberfläche) gebunden. Das Kristall des gE:gI/Fc-Komplexes, das von Sprague und Mitarbeitern erzeugt wurde, würde eine solche bipolare Bindung des Antikörpers erlauben (Sprague et al., 2006). *In vivo* konnte mithilfe verschiedener nicht Fc-bindenden HSV-1-Mutanten (NS-gE<sub>339</sub>, NS-gE<sub>264</sub>) in Antikörper-Transferexperimenten der Einfluss der Fc-bindenden Funktion von gE auf die Virusvermehrung und –erkrankung gezeigt werden (Nagashunmugam et al., 1998; Lubinski et al., 2011). Der Verlust der Fc-Bindungsfähigkeit führt zur Attenuierung des Virus in der Maus in Anwesenheit von HSV-1-spezifischen Antikörpern (Nagashunmugam et al., 1998). Die Fc-bindende Funktion des gE:gI-Komplexes ist notwendig, um u. a. die Antikörper-vermittelte Komplementaktivierung und ADCC zu inhibieren (Lubinski et al., 2011). Neben den beschriebenen Antikörper-abhängigen Funktionen von gE:gI, konnten aber auch für diesen viralen Fc $\gamma$ -Rezeptor Antikörper-unabhängige Funktionen gezeigt werden. Der Rezeptorkomplex gE:gI spielt eine wichtige Rolle für die Zell-zu-Zell-Ausbreitung in Epithelgewebe (Dingwell et al., 1994) und neuronalem Gewebe (Dingwell et al., 1995). Der Rezeptorkomplex ist zudem beteiligt am axonalen Transport von Viruspartikeln, welcher bei

der Virusausbreitung nach Reaktivierung in neuronalen Zellen eine große Rolle spielt (Snyder et al., 2008).

### **Zielsetzung der Arbeit:**

Für den MCMV-kodierten Fc-Rezeptor *m138/fcr-1* war zu Beginn der Doktorarbeit bereits bekannt, dass neben der Fc-bindenden Funktion auch Antikörper-unabhängige Funktionen, wie die Herabregulation aktivatorischer NK-Zellliganden von der Oberfläche MCMV-infizierter Zellen, existieren. Aufgrund dieser Daten wurden für die HCMV-kodierten Fc-Rezeptoren gp34 und gp68 ähnliche Funktionen angenommen. Mithilfe eines offenen Screening-Ansatzes sollte nach neuen Liganden der HCMV-kodierten Fc-Rezeptoren gesucht werden. Dazu sollte zuerst mithilfe löslicher Epitop-markierter Proteine von gp34 und gp68 nach interagierenden Zellpopulationen gesucht werden. Mittels durchflusszytometrischer Analyse sollten diese Zellpopulationen genauer definiert und analysiert werden, um anschließend mithilfe von Protein-Protein-Interaktionsstudien mögliche Liganden von gp34 und gp68 identifizieren zu können. Diese Liganden sollten Hinweise auf neue Funktionen der HCMV-kodierten Fc-Rezeptoren gp34 und gp68 liefern.

## 2 Ergebnisse

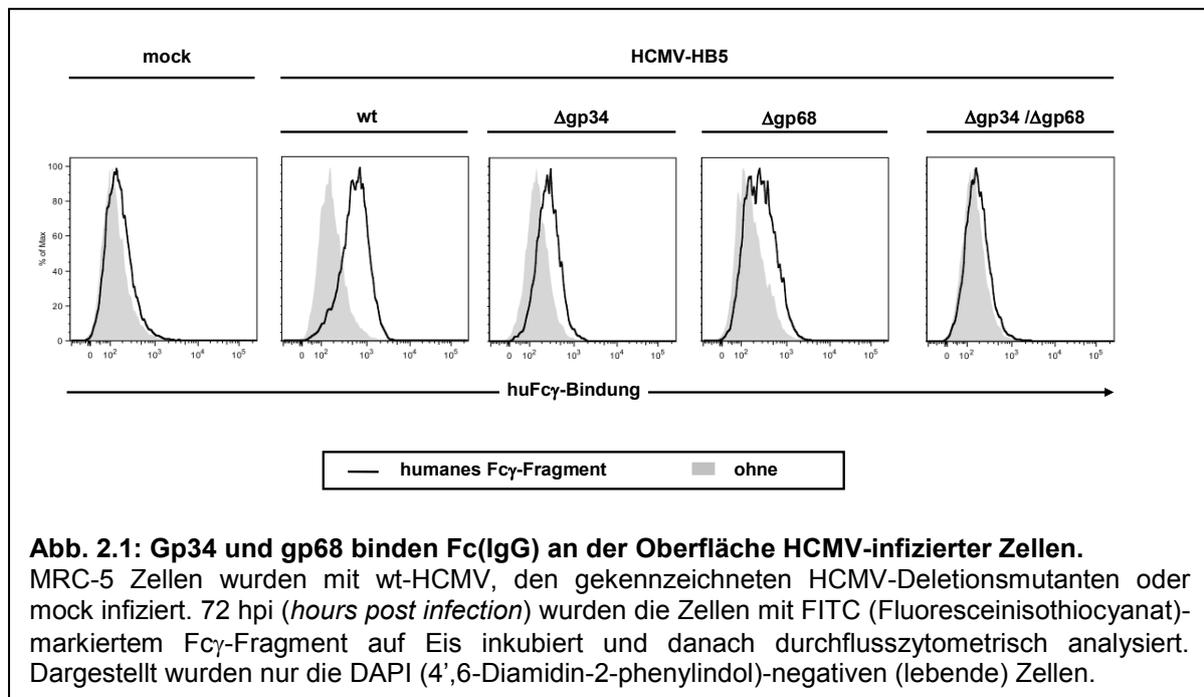
### 2.1 Analyse HCMV-kodierter Fc $\gamma$ -Rezeptoren gp34 und gp68 in HCMV-infizierten Zellen

#### 2.1.1 Die HCMV-kodierten Fc $\gamma$ -Rezeptoren gp34 und gp68 werden an der Oberfläche HCMV-infizierter Zellen exprimiert

Das Humane Cytomegalovirus kodiert die Glykoproteine gp34 und gp68, die spezifisch den Fc-Teil von humanem IgG binden (Lilley et al., 2001; Atalay et al., 2002). In der Publikation von Atalay R. und Zimmermann A. *et al.* wurde die Expression dieser beiden Rezeptoren auf der Zelloberfläche gezeigt, allerdings nur in einem ektopen Expressionssystem (rekombinante Vakziniaviren) und nicht im HCMV-Kontext.

In einer durchflusszytometrischen Analyse sollte der relative Anteil der viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren (vFc $\gamma$ R) gp34 und gp68 auf die Fc $\gamma$ -bindende Eigenschaft HCMV-infizierter Zellen mithilfe von HCMV-Fc $\gamma$ R-Deletionsmutanten untersucht werden. Dazu wurde die HCMV-permissive Fibroblastenzelllinie MRC-5 mit dem wt (Wildtyp)-HCMV (HB5) und den verschiedenen HCMV-Fc $\gamma$ R-Deletionsmutanten HCMV(HB5)- $\Delta$ gp34 ( $\Delta$ IRL/ $\Delta$ TRL11), HCMV(HB5)- $\Delta$ gp68 ( $\Delta$ UL118) und HCMV(HB5)- $\Delta$ gp34/ $\Delta$ gp68 ( $\Delta$ UL118/ $\Delta$ IRL/ $\Delta$ TRL11) infiziert und die Fc $\gamma$ -Bindung an der Zelloberfläche getestet (Abb. 2.1). In der durchflusszytometrischen Analyse zeigten dabei die wt-HCMV-infizierten Zellen im Vergleich zu mock-infizierten Zellen eine deutliche Fc $\gamma$ -Bindung an der Zelloberfläche. Die Infektion mit einer gp34- oder gp68-defizienten HCMV-Deletionsmutanten führte jeweils zu einem partiellen Verlust der Fc $\gamma$ -Bindung an die infizierte Zelle. Die Deletion beider Rezeptoren führte zum vollständigen Verlust der Fc $\gamma$ -Bindung. Beide Glykoproteine, gp34 wie auch gp68, sind also für die Bindung von Fc $\gamma$ -Fragment an die HCMV-infizierte Zelle essentiell. Die durchflusszytometrische Analyse zeigte, dass beide Glykoproteine an der Oberfläche HCMV-infizierter Zellen exprimiert werden, da die genetische Deletion der Expression von gp34 und gp68 zum gesamten Verlust der Fc $\gamma$ -Bindung an die Zellen führte. Für die Suche nach zusätzlichen Liganden für gp34 und gp68 ist dies ein entscheidender Befund, denn die Zelloberflächenexpression von gp34 und gp68 ermöglicht nicht nur die Interaktion der Fc $\gamma$ -Rezeptoren mit Molekülen, die in der gleichen Zelle (*in cis*) exprimiert

werden, sondern auch mit Molekülen, die auf der Zelloberfläche anderer Zellen (in *trans*) exprimiert werden. Auch sekretierte Proteine, lösliche Faktoren, zu denen auch der einzige bisher beschriebene Ligand von gp34 und gp68, d. h. das IgG-Molekül, gehört, sind somit als Interaktionspartner vorstellbar.



### 2.1.2 Gp34 und gp68 sind in maturaer Form stark glykosyliert

Die Bindung der Fc $\gamma$ -Rezeptoren gp34 und gp68 an den Fc-Teil von IgG lässt sich ebenso mithilfe einer Fc $\gamma$ -Präzipitation nachweisen. Dabei werden Lysate HCMV-infizierter Zellen mit Fc $\gamma$ -Fragment inkubiert, welches dann mit Protein-A- oder -G-Sepharose präzipitiert werden kann. Fc-bindende Proteine werden entsprechend ko-präzipitiert. In einer solchen Fc $\gamma$ -Präzipitationsanalyse sollten Glykosylierung und Halbwertszeit der viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren in HCMV-infizierten Zellen näher untersucht werden. Dazu wurden HCMV-infizierte Zellen radioaktiv markiert, indem sie kurz mit  $^{35}\text{S}$ -L-Methionin und -L-Cystein haltigem Medium metabolisch markiert wurden (*Pulse*). Die in dieser Zeit translatierten Proteine (*de-novo*-Synthese) werden so durch den Einbau dieser Isotope radioaktiv markiert. Nach dem *Pulse* wurde das radioaktive Medium entfernt und durch „normales“ Medium ersetzt (*Chase*), so dass die im *Chase* synthetisierten Proteine nicht markiert werden. Die Fc $\gamma$ -bindenden Proteine wurden zu verschiedenen Zeitpunkten mit Fc $\gamma$ -Fragment präzipitiert und anschließend mittels SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) analysiert. In der

SDS-PAGE können die Isotop-markierten Proteine dann autoradiographisch visualisiert werden. Prozessierung und Stabilität der Fc $\gamma$ -bindenden Proteine lassen sich somit über die Zeit verfolgen. Wie erwartet, wurden die HCMV-kodierten Fc $\gamma$ -bindenden Proteine aus infizierten Zellen präzipitiert (Abb. 2.2) und sind deutlich in der SDS-PAGE zu erkennen (Spur 3: Proteinbanden bei ca. 30 kDa und 65 kDa). In uninfizierten MRC-5 Fibroblasten (mock-Zellen) konnten, wie erwartet, keine Fc $\gamma$ -bindenden Proteine nachgewiesen werden (s. Spur 1). Um die Identifizierung der glykosylierten Proteine abzusichern, wurde zu jedem Zeitpunkt zusätzlich eine N-Deglykosylierung mit dem Enzym Endoglykosidase H (Endo H) durchgeführt (vergleiche Spur 3: ohne Enzym, Spur 4: mit Endo H). Die bekannten Proteinbanden für gp34 und gp68 wurden gekennzeichnet. Die Enzymaktivität der Endoglykosidase H ist substratspezifisch. Sie schneidet nur zwischen den N-Acetylglucosaminresten des N-Glykans vom Oligomannose-Typ oder Hybrid-Typ und hinterlässt dabei jeweils einen N-Acetylglucosaminrest. N-Glykane vom komplexen Typ können nicht hydrolysiert werden. Am Beispiel von gp34 ist gut zu erkennen, dass verschiedene Glykosylierungsformen des Proteins entstehen, die teilweise Endo H-resistent sind. Die komplexe (Endo H-resistente) und größte Form von gp34 mit ca. 40 kDa ist erst nach 1,5 h *Chase* deutlich sichtbar (siehe Spur 7 und 8). N-Glykane des Komplexen- und des Hybrid-Typs entstehen erst beim Durchlaufen des medialen Golgi-Apparates, und somit spät in der Prozessierung der Glykoproteine. Diese Moleküle erreichen dann über den sekretorischen Weg die Zelloberfläche. Das gp68-Molekül, dessen Proteingerüst ohne Modifikation ein Molekulargewicht von ca. 36 kDa besitzt, wird ebenfalls durch Glykosylierung stark posttranslational modifiziert. Die Endo H-sensitiven Glykosylierungsformen von gp68 (nach denen das Protein auch benannt ist) haben ein Molekulargewicht von ca. 68 kDa (vergleiche Spur 3 und Spur 4). Die Endo H-resistenten Formen haben ein ungefähres Molekulargewicht von ~100 kDa (Abb. 2.2 durch Pfeil gekennzeichnet) und sind damit circa dreimal so groß wie das eigentliche Proteingerüst. In der hier gezeigten Fc $\gamma$ -Präzipitation wurde in HCMV-infizierten Zellen zusätzlich ein bisher unbeschriebenes Protein von ca. 45 kDa nachgewiesen. Dieses Fc $\gamma$ -bindende Protein wird ebenfalls von HCMV kodiert und in der Doktorarbeit von E. Mercé-Maldonado untersucht und charakterisiert (Mercé-Maldonado, 2011, Dissertation in Vorbereitung). Die Halbwertszeit der Fc $\gamma$ -bindenden Proteine gp34 und gp68 konnte ebenfalls aus diesem Experiment bestimmt werden. Sie betrug für beide Proteine ca. 2 h und ist damit konsistent mit den Befunden von Atalay und Zimmermann *et al.* Interessanterweise wurde für das 45 kDa Protein ebenfalls eine Halbwertszeit von ~2 h bestimmt.



Herabregulation aktivatorischer NK-Liganden, wie auch T-Zell-Kostimulatoren durch *m138/fcr-1* führt so zu einer verminderten NK- bzw. T-Zellaktivierung. Vor kurzem wurde mit *Rae-1ε* ein weiteres Molekül publiziert, dessen Oberflächenexpression von *m138* herabreguliert wird (Arapovic et al., 2009). Eine biochemisch nachweisbare Interaktion neben der Bindung an *Fcγ* konnte jedoch bisher nur für *m138/fcr-1* und *B7-1* gezeigt werden (Mintern et al., 2006).

Die Befunde für den MCMV-kodierten *Fcγ*-Rezeptor belegen, wie auch im Falle des HSV-kodierten *Fcγ*-Rezeptors *gE*, die multifunktionelle Rolle viraler *Fcγ*-Rezeptoren und warfen damit natürlich die Frage auf, ob es auch für die HCMV-kodierten *Fcγ*-Rezeptoren Antikörper-unabhängige Funktionen bzw. Liganden gibt. Für die Suche nach neuen Interaktionspartnern der viralen *Fcγ*-Rezeptoren wurden lösliche, aufgereinigte Proteine benötigt. Die Herstellung und Analyse dieser Proteine ist in den folgenden Abschnitten beschrieben.

### 2.2.1 Klonierung der löslichen *Fcγ*-Rezeptoren

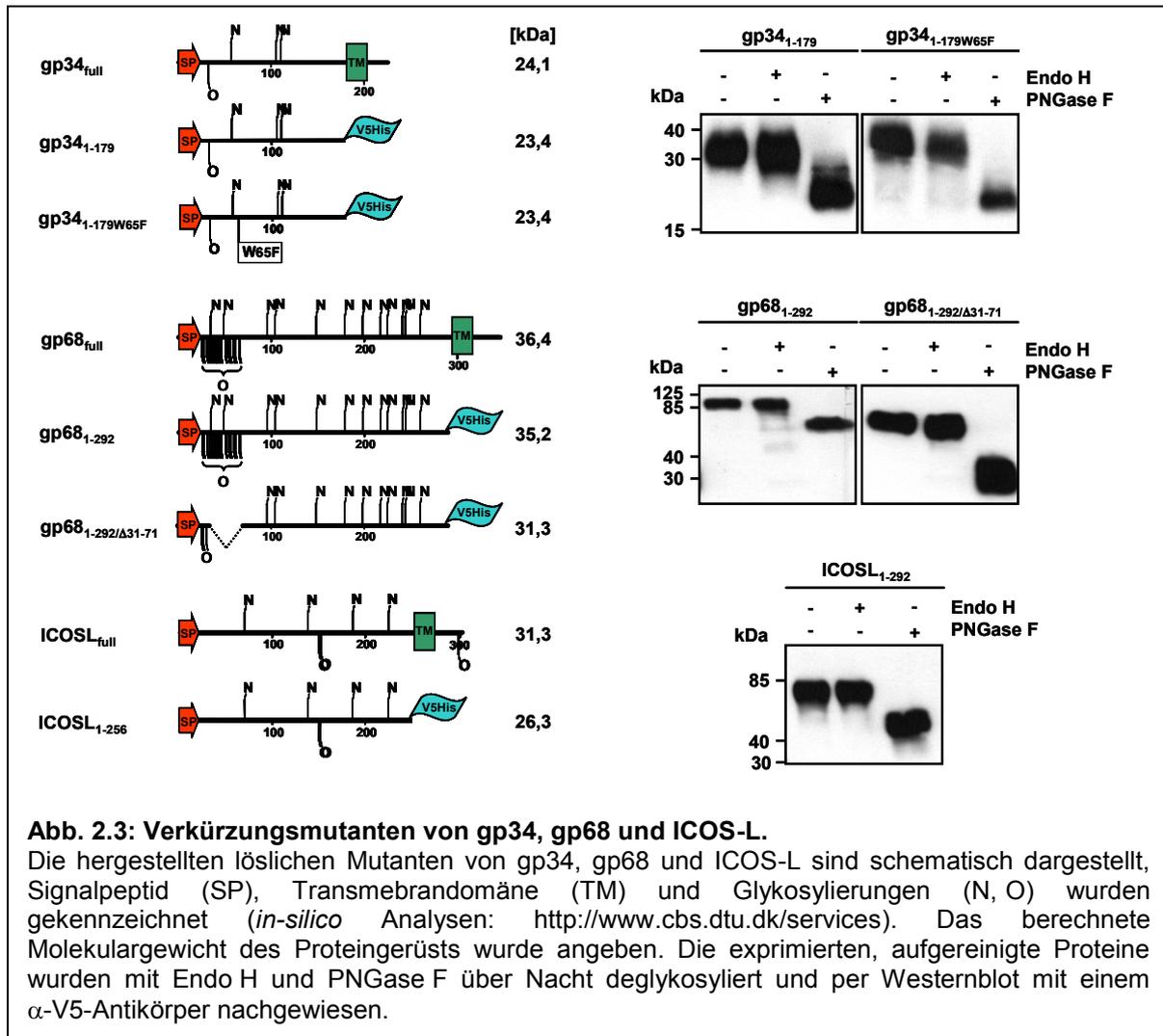
Um lösliche Proteine der viralen *Fcγ*-Rezeptoren zu erzeugen, wurde die Ektodomäne der Moleküle (mit jeweiligem endogenem Signalpeptid) kloniert. Transmembrandomäne und zytoplasmatische Teil fehlen den löslichen Mutanten dementsprechend. Die Ektodomänen wurden so in den kommerziellen *pGene/V5-His* Vektor (Invitrogen, Deutschland) subkloniert, dass am verkürzten C-Terminus der Moleküle das *V5-His<sub>6</sub>*-Epitop *in frame* eingeführt wurde (Klonierung siehe Material und Methoden). Dieser Epitop-*Tag* dient der Anreicherung sowie Detektion der Proteine, wobei das *6xHis*-Epitop für die Aufreinigung des Proteins mittels immobilisierter Metallaffinitätschromatographie (IMAC) und das *V5*-Epitop für den Nachweis im Westernblot (WB) und in der durchflusszytometrischen Analyse genutzt werden sollte.

In der Dissertation von Henrike Reinhard wurden durch Überexpression verschiedener Verkürzungsmutanten von *gp34* und *gp68* im Vakziniavirusystem und *Fcγ*-Präzipitationsanalysen die minimalen *Fcγ*-Bindedomäne von *gp34* und *gp68* ermittelt (Sprague et al., 2008; Reinhard, 2008). Für *gp34* wurden die Aminosäuren (AS) 1-140 als essentiell für die *Fcγ*-Bindekapazität beschrieben. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass die Bindekapazität von *gp34<sub>1-140</sub>* vollständig verloren geht, wenn das Tryptophan 65 (*Trp<sub>65</sub>*) zu einem Phenylalanin mutiert wird. Das *Trp<sub>65</sub>* ist ein konservierter Bestandteil der *RL11*-Domäne (*RL11D*), die für die *RL11-CMV*-Genfamilie (Chee et al., 1990; Davison et al.,

2003; Sekulin et al., 2007) beschrieben wurde. Die RL11-Domäne ist variabel in ihrer Länge, besitzt viele potentielle N-Glykosylierungstellen, und umgibt drei konservierte Aminosäurereste: ein Tryptophan und zwei Cysteine (Trp<sub>65</sub>, Cys<sub>82</sub>, Cys<sub>101</sub> in gp34). Die Domäne ist homolog zur CR1 (*conserved region 1*)-Domäne, die im Adenovirusgenom beschrieben wurde (Davison et al., 2003). Tryptophanreste spielen aber ebenso bei der Interaktion von zellulären Fc $\gamma$ -Rezeptoren mit IgG eine entscheidende Rolle. Durch Kristallisation des Fc $\gamma$ RIII separat oder im Komplex mit humanem Fc $\gamma$ -Fragment konnte gezeigt werden, dass zwei Tryptophane, die in allen zellulären Fc $\gamma$ -Rezeptoren konserviert sind, an der Fc-Fc $\gamma$ RIII Grenzfläche exponiert und über hydrophobe Wechselwirkung an der Fc-Bindung beteiligt sind (Zhang et al., 2000; Radaev et al., 2001). Die Mutation eines dieser Tryptophane im Fc $\gamma$ RIII-Molekül führt zum vollständigen Verlust der Fc $\gamma$ -Bindung (Hibbs et al., 1994). Für die Suche nach neuen Liganden von gp34, im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit, wurde die gesamte Ektodomäne (AS 1-179) kloniert, um auch Ligand-Rezeptor-Interaktionen außerhalb der beschriebenen minimalen Fc $\gamma$ -Bindungsdomäne (AS 1-140) von gp34 finden zu können. Zusätzlich wurde untersucht, ob eine W65F-Mutation auch in einer längeren Version (AS 1-179) von gp34 zum Verlust der Fc-Bindung führt.

Für gp68 wurde neben der Mutante gp68<sub>1-292</sub>, die die gesamte Ektodomäne von gp68 umfasst, auch eine Mutante gp68<sub>1-292/Δ31-71</sub>, der die Serin- und Threonin-reiche Region am N-Terminus fehlt, kloniert. Die Region AS 31-71 wird als putativ O-glykosyliert vorhergesagt. Die Sequenz der löslichen Mutante gp68<sub>1-292/Δ31-71</sub> wurde zusätzlich im Vakziniaexpressionssystem überexprimiert und dann für Fc $\gamma$ -Bindungsstudien von Frau Henrike Reinhard benutzt, die mit dieser Mutante die minimale Bindedomäne von gp68, nämlich AS 71-292, bestimmen und publizieren konnte (Sprague et al., 2008).

Die klonierten löslichen gp34- und gp68-Konstrukte sind in Abbildung 2.3 dargestellt. Die inserierte Epitop-Sequenz und die vorhergesagten Signalpeptide, N- und O-Glykosylierungen sowie Transmembrandomänen (*in silico* Analysen) wurden ebenfalls graphisch dargestellt.



### 2.2.2 Klonierung des löslichen ICOS-Liganden

Um das spätere Screeningsystem testen und kontrollieren zu können, wurde ein bereits beschriebenes Rezeptor-Liganden-Paar ausgewählt und kloniert. Eine in der Literatur gut beschriebene Interaktion besteht zwischen dem ICOS (*inducible costimulator*)-Rezeptor und dessen einzigem bekannten Liganden: ICOS-Ligand (ICOS-L, auch als B7h, GL50, B7RP-1, LICOS und B7-H2 bezeichnet). Der auf T-Zellen exprimierte, induzierbare, kostimulatorische Rezeptor ICOS spielt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von T-Zellen (Hutloff et al., 1999; Coyle et al., 2000). Die Interaktion mit dem ICOS-Liganden wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen zeitgleich beschrieben und publiziert (Yoshinaga et al., 1999; Yoshinaga et al., 2000; Brodie et al., 2000; Wang et al., 2000; Ling et al., 2000; Mages et al., 2000). Der ICOS-Ligand ist wie die viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren ein stark-glykosyliertes Typ I Transmembranprotein (Khayyamian et al., 2002).

Die Ektodomäne des humanen ICOS-L wurde per PCR (Polymerasekettenreaktion) aus HCMV-infizierten MRC-5-Fibroblasten amplifiziert und dann ähnlich den löslichen Fc $\gamma$ -Rezeptoren in den pGene/V5-His Vektor kloniert, um das V5-His<sub>6</sub>-Epitop C-terminal anzuhängen. Die klonierte Sequenz wurde sequenziert und stimmt für den klonierten Bereich mit der veröffentlichten Gensequenz NM\_015259.4:c.382G>A überein. Die Mutation des Nukleotids 382 von Guanin zu Adenin ist ein bereits beschriebener Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP, *single nucleotide polymorphism*), der auch zu einer Mutation auf Aminosäureebene (NP\_056074.1.1:p.Val128Ile) führt.

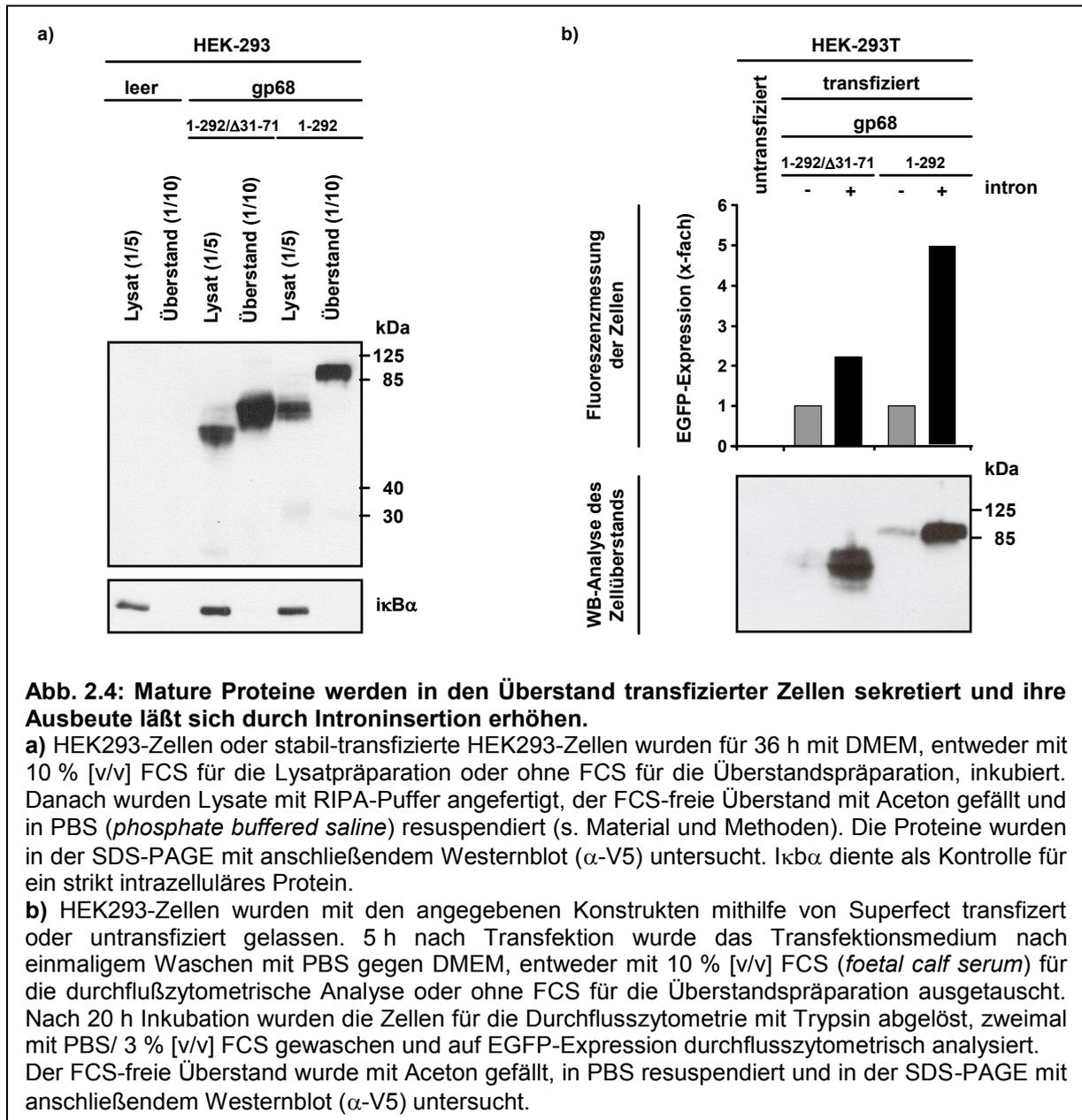
### 2.2.3 Expression und Aufreinigung der löslichen Proteine

Bei der Überexpression der viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren sowie des ICOS-L als lösliche Proteine sollte die Glykosylierung der Moleküle erhalten bleiben, da diese einen entscheidenden Einfluss auf das Bindungsverhalten eines Moleküls haben kann. So führt eine veränderte Glykosylierung von rekombinantem NKp30-Protein (NCR3, zytotoxischer NK-Zellrezeptor) dazu, dass die Interaktion mit dessen Liganden Heperansulfat verloren geht (Hershkovitz et al., 2008). Für gp68 wurde bereits in der Dissertation von Henrike Reinhard gezeigt, dass der Verlust der Glykosylierung innerhalb des Moleküls zum Verlust der Fc $\gamma$ -Bindungskapazität führt (Reinhard, 2008). Eine Expression der Glykoproteine gp34 und gp68 in einem prokaryotischen System (wie z. B. *E. coli*) wurde somit ausgeschlossen, da in diesem keine entsprechende posttranslationelle Modifikation von Molekülen wie z.B. Glykosylierung stattfindet. Bei der Wahl eines eukaryotischen Expressionssystems wurde sich für die Expression in HEK293-Zellen und gegen die Expression in Hefen und in Insektenzellen mithilfe von Baculoviren entschieden. Letztgenannte Systeme garantieren zwar hohe Proteinausbeuten, die Glykosylierungsstrukturen weichen aber stark von denen in Säugetierzellen ab (Wildt und Gerngross, 2005; Kost et al., 2005).

Für die stabile Expression der löslichen Proteine wurden die kodierenden Sequenzen in den bicistronischen Vektor pIRES-EGFP-Vektor kloniert. Dieser erzeugt eine bicistronische mRNA (*messenger Ribonukleinsäure*), die aus dem zu exprimierendem Gen, einer internen Ribosom-Eintrittsstelle (IRES, *internal ribosome entry site*) und der kodierenden Sequenz des EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) besteht. Die IRES erlaubt neben der Translation der klonierten löslichen Proteine, eine gleichzeitige Translation des EGFP-Proteins von derselben mRNA. Die Expression von EGFP kann leicht unter dem Fluoreszenzmikroskop oder im Durchflusszytometer ausgewertet und zur Selektion der grün-fluoreszierenden Zellen

eingesetzt werden. Der pIRES-EGFP Vektor enthält ein *Kanamycin/Neomycin*-Resistenzgen, welches die Selektion stabiler Transfektanten mithilfe des Antibiotikums Geneticin erlaubt. Für jedes Protein wurden mehrere klonale stabil-transfizierte HEK-293-Zelllinien hergestellt. Nur Klone mit hoher Proteinexpression wurden zur späteren Proteinherstellung/-aufreinigung cryokonserviert. Die maturierten Proteine befanden sich im Überstand der Zellen (Abb. 2.4a), da die viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren gp34 und gp68 sowie der ICOS-L eine N-terminale Signalpeptidsequenz aufweisen (Abb. 2.3), die das Protein über das raue endoplasmatische Retikulum und den sekretorischen Weg zur Plasmamembran dirigiert. Aufgrund der fehlenden Transmembrandomänen in den löslichen Mutanten wurden die Proteine nicht in der Plasmamembran verankert, sondern in den Überstand der transfizierten Zellen sekretiert. In den entsprechenden Zelllysaten wurden nur die nicht-mature Zwischenformen der Proteine detektiert (Abb. 2.4a).

Beim Vergleich von gp34 und gp68 mit dem ICOS-L bezüglich der EGFP-Expressionstärke mittels Fluoreszenzmikroskopie sowie der Quantifikation der löslichen Proteine im WB fiel auf, dass die Expression der Proteine gp34 und gp68 sehr schwach war (Daten nicht gezeigt). Um die Expression der viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren zu verstärken, wurde das  $\beta$ -Globin-Intron II (kloniert aus dem pSG5-Vektor) auf Hinweis von Prof. Heiner Schaal (Institut für Virologie, Universität Düsseldorf) in den pIRES-EGFP-Vektor zwischen den CMV-Promotor und das Gen für gp34 oder gp68 inseriert. Schon 1979 konnte von mehreren Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass Intronsequenzen und damit verbundenes Spleißen der RNA zu einer erhöhten mRNA-Stabilität und Genexpression führen können (Hamer und Leder, 1979; Gruss et al., 1979; Hamer et al., 1979). Die Expressionstärke der Vektoren mit und ohne Intron wurden nach transienter Transfektion getestet, dabei wurden die EGFP-Signalstärken in der Durchflusszytometrie und die spezifische Expression des jeweiligen Proteins im Westernblot verglichen. Durch die Insertion des Introns ließ sich die Expression der viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren stark erhöhen (Abb. 2.4b). Mit diesen Konstrukten wurden erneut stabile HEK293-Zellen erzeugt. Die löslichen V5-His<sub>6</sub>-Epitop-markierten Proteine wurden aus dem Überstand der stabilen Transfektanten mit Nickel-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Direkt anschließend wurden die Proteine mithilfe von Filtersäulchen (Amicon) in PBS umpuffert, um die hohe Imidazolkonzentration des Elutionspuffers zu beseitigen, gleichzeitig wurde das Volumen eingengt. Die Proteine wurden in Aliquots bei -80°C gelagert.



Die aufgereinigten löslichen Proteine wurden mit Endoglykosidase H (Endo H) oder N-Glykosidase F (PNGase F) verdaut und im Westernblot detektiert (Abb. 2.3). Die Proteine stellen sich als markante Glykoprotein-typische Banden dar. Sie sind Endo H-resistent und demnach komplex-glykosyliert. Das Enzym PNGase F kann im Gegensatz zur Endo H alle Asparagin-gebundenen N-Glykane spalten, unabhängig von der Komplexität des N-Glykans. Alle löslichen Proteine verkleinern sich nach dem PNGase F Verdau ungefähr auf das jeweils vorhergesagte Molekulargewichte (MW), die lösliche Mutante gp68<sub>1-292</sub> bildet dabei eine Ausnahme. Nach dem PNGase F-Verdau besitzt dieses Protein immer noch eine Größe von ca. 70 kDa und ist damit doppelt so groß, wie die vorhergesagte Proteinmasse von ca. 37 kDa.

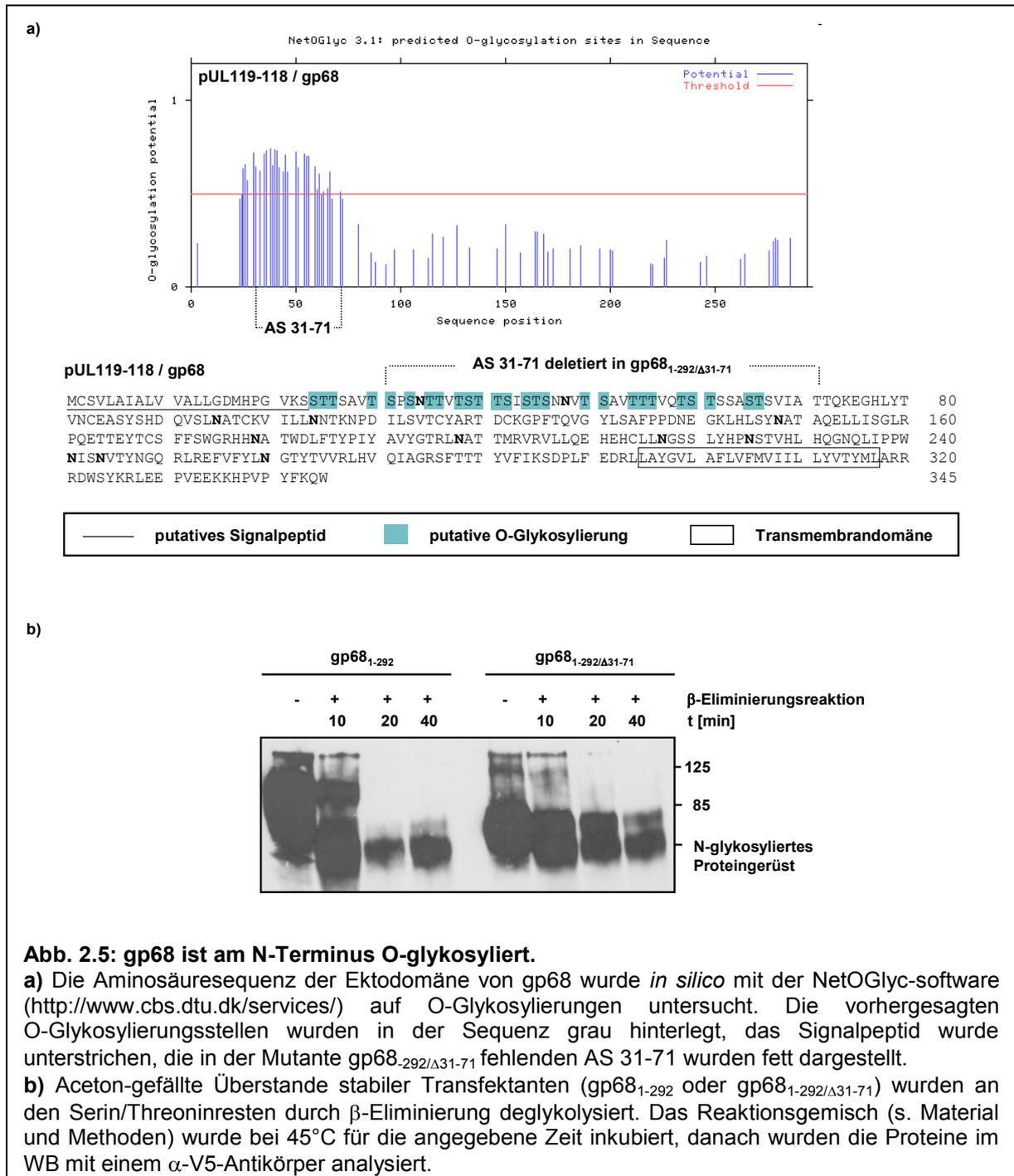
Dieser Größenunterschied ist wahrscheinlich durch die starke O-Glykosylierung des N-terminalen Proteinbereichs zu erklären und wird im nächsten Abschnitt genauer analysiert.

### 2.2.4 Gp68 ist komplex O-glykosyliert

Serine und Threonine sind potentielle O-Glykosylierungsstellen (Varki A, 2009). Obwohl es im Gegensatz zur N-Glykosylierung kein definiertes Sequenzmotiv für die Initiierung der O-Glykosylierung gibt, stehen Algorithmen zur Verfügung, die die Wahrscheinlichkeit der O-Glykosylierung von Serinen und Threoninen ermitteln.

Die Aminosäuresequenz von gp68 zeigt eine auffällige Serin- und Threonin-reiche Region am N-Terminus des Proteins. Nach der Signalpeptidsequenz (AS 1-23) folgen im Aminosäurebereich 24-71 (48 AS) genau 14 Serine und 17 Threonine, d. h. 65 % dieses Bereichs bestehen aus Serinen und Threoninen. Analysiert man mögliche O-Glykosylierungsstellen mit der NetOGly-Software (Julenius et al., 2005), dann werden in diesem Bereich 10 Serine und 16 Threonine als putativ glykosyliert vorhergesagt (Abb. 2.5a). Diese putative O-Glykosylierung sollte experimentell überprüft werden. Im Gegensatz zur N-Glykosylierung, die relativ einfach mit dem Enzym PNGase F abgespalten werden kann, sind O-Glykosylierungen nicht mit einem einzigen Enzym zu entfernen. Bei der De-O-Glykosylierung müssen die Zuckerreste durch das jeweilige spezifische Enzym seriell entfernt werden. Bei komplexen Glykosylierungen ist dies ein komplizierter Vorgang. Bisherige Versuche die O-Glykosylierung durch einen enzymatischen Abbau nachzuweisen blieben erfolglos. O-Glykosylierungen, die über die Hydroxylgruppe von Serin oder Threonin mit dem Protein verknüpft sind, können aber nicht nur durch Enzym-katalysierte Reaktionen, sondern auch durch Alkali-katalysierte  $\beta$ -Eliminierung vom Protein abgelöst werden. Die Freisetzung O-glykosidisch verknüpfter Zucker unter alkalischen Bedingungen in Anwesenheit eines reduzierenden Agens wie  $\text{NaBH}_4$  wurde schon 1968 zur Analyse von Oligosacchariden genutzt (Carlson, 1968). Diese Methode dient allerdings der Analyse des freigesetzten Zuckers und nicht des verbleibenden Proteins, da es bei der Reaktion auch zur Spaltung von den Peptidbindungen des Proteins kommt. Eine Weiterentwicklung dieser Methode, bei der die Peptidspaltung nur in abgeschwächter Form auftritt, ist die  $\beta$ -Eliminierung in DMSO (Downs et al., 1973; Fukuda, 2001). Die beiden löslichen Mutanten von gp68 sollten mit dieser Methode deglykosyliert und anschließend im Westernblot analysiert werden. Dazu wurde der Überstand stabil-transfizierter HEK293-Zellen, die entweder lösliches gp68<sub>1-292</sub> oder gp68<sub>1-292/Δ31-71</sub> exprimierten, mit Aceton gefällt und das

Präzipitat in Wasser resuspendiert. DMSO, KOH und Ethanol wurden zugegeben und bei 45°C inkubiert. Die  $\beta$ -Eliminierungsreaktion wurde zu verschiedenen Zeitpunkten durch Acetonfällung gestoppt und die Präzipitate im Westernblot analysiert (Abb. 2.5b).



Die Eliminierungsreaktion führt bei gp68<sub>1-292</sub> zu einem Größenverlust von ca. 30 kDa und fällt damit auf die ungefähre Größe von gp68<sub>1-292/Δ31-71</sub>. Die Größe der Mutante

gp68<sub>1-292/Δ31-71</sub>, die nur noch 4 von 25 putativen O-Glykosylierungsstellen besitzt, verändert sich im Laufe der Reaktion hingegen nur minimal.

Mithilfe der  $\beta$ -Eliminierung konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die AS 31-71 von gp68 posttranslational modifiziert sind, und diese Modifikation die Proteingröße um ca. 30 kDa verändert. Die Serin/Threonin-reiche Region wird als stark O-glykosyliert vorhergesagt. Diese O-Glykosylierung kann durch die  $\beta$ -Eliminierung abgespalten werden. Ein endgültiger Beweis der O-Glykosylierung wäre der Nachweis der abgespalteten Zucker mittels verschiedenster Chromatographiemethoden.

Die O-Glykosylierung von gp68 ist für die bereits beschriebene biochemische Funktion der Fc $\gamma$ -Bindung nicht essentiell (Sprague et al., 2008; Reinhard, 2008). Die Anwesenheit einer derart auffälligen Domäne lässt andere Funktionen des gp68-Moleküls vermuten.

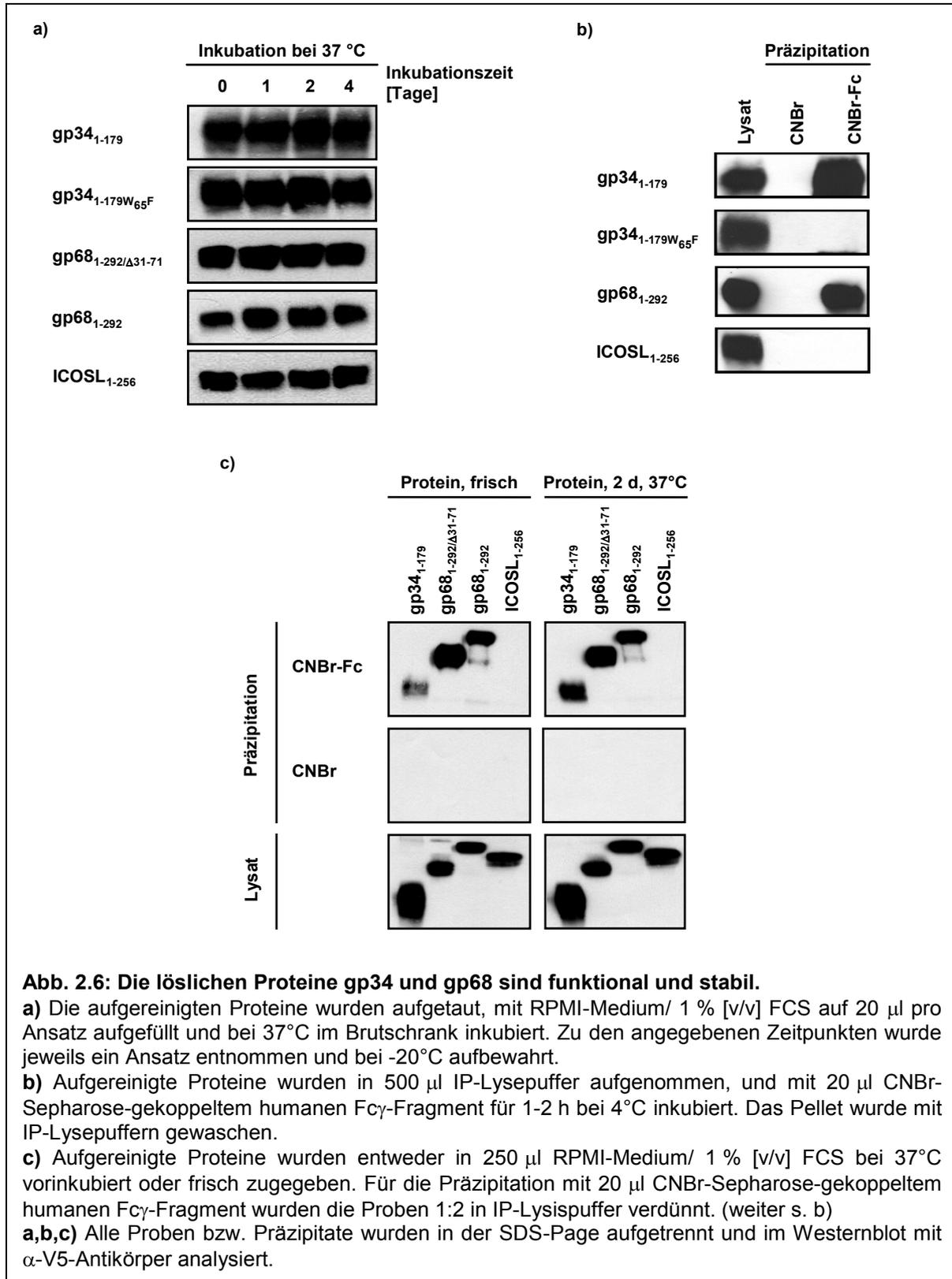
### **2.2.5 Aufgereinigte lösliche Proteine binden humanes Fc $\gamma$ -Fragment und sind stabil**

Die aufgereinigten Proteine sollten im Verlauf der Arbeit für durchflusszytometrische Bindungsanalysen bei 4 °C, aber ebenso für funktionale Studien bei 37 °C, benutzt werden. Um Funktionalität und Stabilität der aufgereinigten löslichen Proteine in diesen Assays garantieren zu können, wurden weitere Vorexperimente durchgeführt.

Zuerst wurde die Proteinstabilität bei 37 °C in Zellkulturmedium getestet. Die Proteine wurden dazu aufgetaut, mit Zellkulturmedium (RPMI-Medium, 1 % [v/v] FCS) verdünnt und für maximal 4 Tage bei 37 °C gelagert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und per Westernblot analysiert (Abb. 2.6a). Alle Proteine waren über einen Zeitraum von 96 h bei 37 °C stabil, im Westernblot konnten keine Degradationsprodukte nachgewiesen werden.

Um die Funktionalität der aufgereinigten Proteine zu testen, wurde die beschriebene Bindung von viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren an humanes Fc $\gamma$ -Fragment für die löslichen Proteine untersucht. Dazu wurden die aufgereinigten Proteine mit Cyanbromid (CNBr)-Sephrose gekoppeltem Fc $\gamma$ -Fragment inkubiert und präzipitiert. Die Präzipitate wurden im Westernblot untersucht. In Abbildung 2.6b ist die Fc-Präzipitation aufgereinigter Proteine zu sehen. Wie erwartet, konnte die gp34<sub>1-179</sub>-Mutante mit Fc $\gamma$ -Fragment präzipitiert werden, die Tryptophanmutante gp34<sub>1-179W65F</sub> jedoch nicht. Das Trp<sub>65</sub> ist also essentiell für die Bindung von humanem Fc, auch wenn die gesamte gp34-Ektodomäne auf Fc $\gamma$ -Bindung getestet wird. Dies wurde hiermit zum ersten Mal dokumentiert. Die gp68<sub>1-292</sub>-Mutante lässt sich ebenfalls mit Fc $\gamma$ -Fragment

präzipitieren, dies war zu erwarten, da die minimale Bindedomäne für gp68 den AS 72-292 zugeordnet wurde (Reinhard, 2008). Der lösliche ICOS-L, ein nicht Fc-bindendes Protein, diente in dem Experiment als Kontrolle und konnte, wie erwartet, nicht präzipitiert werden.



**Abb. 2.6: Die löslichen Proteine gp34 und gp68 sind funktional und stabil.**

**a)** Die aufgereinigten Proteine wurden aufgetaut, mit RPMI-Medium/ 1 % [v/v] FCS auf 20 µl pro Ansatz aufgefüllt und bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde jeweils ein Ansatz entnommen und bei -20°C aufbewahrt.

**b)** Aufgereinigte Proteine wurden in 500 µl IP-Lysepuffer aufgenommen, und mit 20 µl CNBr-Sepharose-gekoppeltem humanen Fcγ-Fragment für 1-2 h bei 4°C inkubiert. Das Pellet wurde mit IP-Lysepuffern gewaschen.

**c)** Aufgereinigte Proteine wurden entweder in 250 µl RPMI-Medium/ 1 % [v/v] FCS bei 37°C vorinkubiert oder frisch zugegeben. Für die Präzipitation mit 20 µl CNBr-Sepharose-gekoppeltem humanen Fcγ-Fragment wurden die Proben 1:2 in IP-Lysispuffer verdünnt. (weiter s. b)

**a,b,c)** Alle Proben bzw. Präzipitate wurden in der SDS-Page aufgetrennt und im Westernblot mit α-V5-Antikörper analysiert.

Da die Proteine im Rahmen der Doktorarbeit in verschiedenen Zellkulturassays bei 37°C mit Inkubationzeiten von 4 bis 24 h untersucht werden sollten, wurde in einem weiteren Experiment untersucht, ob sich eine Vorinkubation der Proteine bei 37°C negativ auf ihre Fc $\gamma$ -Bindungskapazität auswirkt. Die Proteine wurden vor der Präzipitation für zwei Tage in Zellkulturmedium (RPMI-Medium, 1% FCS) bei 37°C inkubiert oder direkt vor der Präzipitation aufgetaut, dann mit CNBr-Sepharose gekoppeltem Fc $\gamma$ -Fragment präzipitiert und im Westernblot verglichen (Abb. 2.6c). Die Vorinkubation der Proteine für zwei Tage bei 37°C, hatte keinen Einfluss auf Fc-bindende Funktion der viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren. Alle vorinkubierten Proteine ließen sich genauso gut präzipitieren wie frisch aufgetaute Proteine. Die Fc $\gamma$ -Bindungskapazität von aufgereinigten gp34- und gp68-Mutanten bleibt also auch bei 37 °C für mindestens zwei Tage erhalten. In diesem Experiment wurde ebenfalls gp68<sub>1-292/Δ31-71</sub> untersucht. Die Mutante lässt sich, wie erwartet, mit Sepharose gekoppeltem Fc $\gamma$ -Fragment präzipitieren, die starke O-Glykosylierung am N-Terminus von gp68 spielt, keine Rolle für die Funktion der Fc $\gamma$ -Bindung.

## 2.3 Screening nach neuen Interaktionspartnern für gp34 und gp68

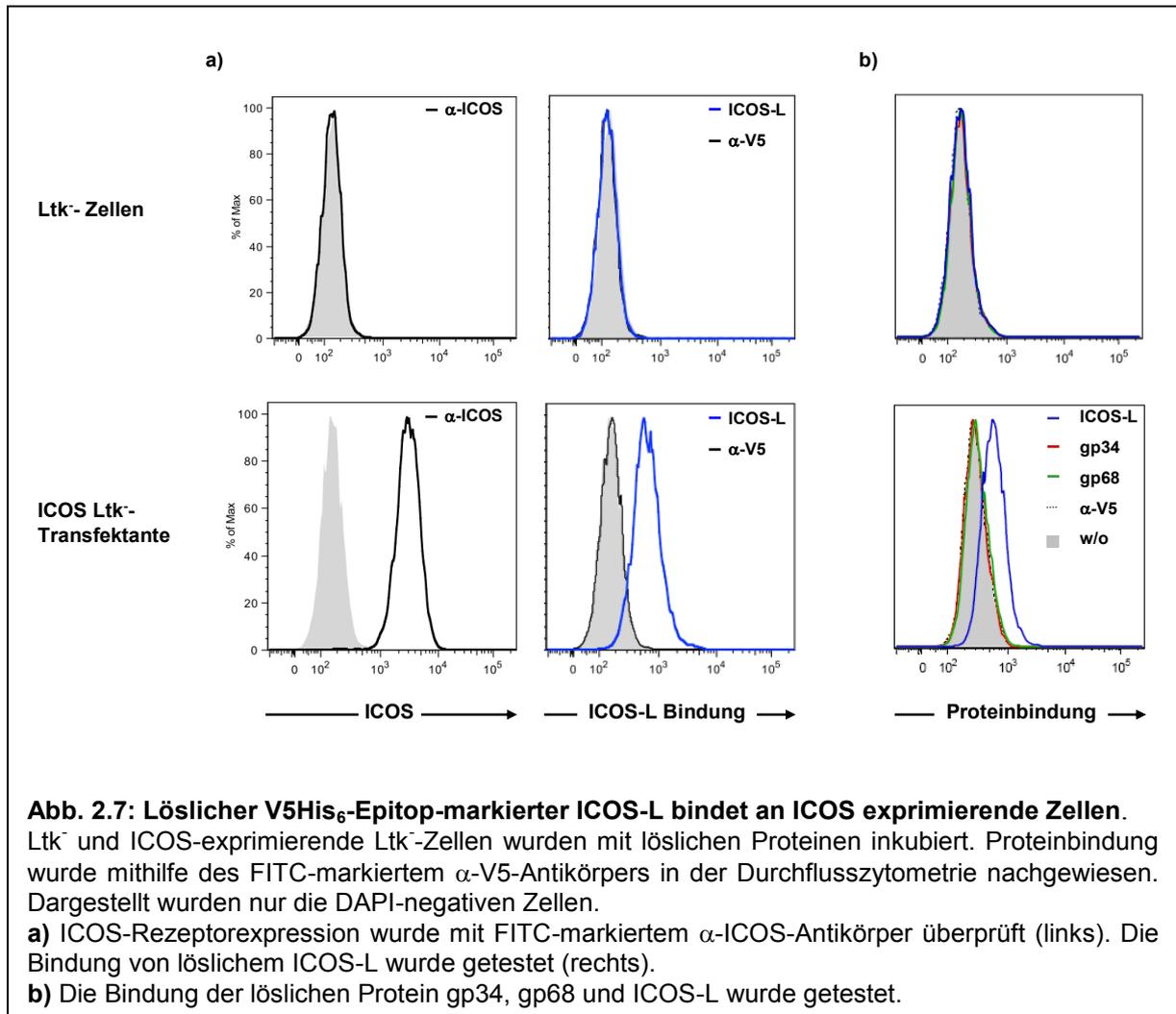
Für die Suche nach potentiellen Interaktionspartnern sollten unterschiedliche Zelltypen mit Hilfe von Oberflächenfärbungen und anschließender durchflusszytometrischer Analysen auf Bindung der löslichen Fc $\gamma$ -Rezeptoren untersucht werden. Mit diesem Vorgehen sollten Zellpopulationen gefunden werden, die Interaktionspartner für gp34 oder gp68 exprimieren. Um dieses *Screening*-System zu validieren, sollte zuerst die bereits beschriebene Interaktion des ICOS-L mit dem ICOS-Rezeptor in diesem System als Kontrolle etabliert werden.

### 2.3.1 Nachweis der Bindung des löslichen ICOS-L an seinen ICOS-Rezeptor mittels Durchflusszytometrie

Für ein lösliches ICOS-L-Fc Fusionsprotein konnte eine spezifische Interaktion mit einer ICOS-exprimierenden Zelle durchflusszytometrisch gezeigt werden (Beier et al., 2000). Diese Bindung sollte mit dem löslichen V5His<sub>6</sub>-Epitop-markierten ICOS-L reproduziert werden. Dazu wurden stabil-transfizierte ICOS-Ltk<sup>-</sup>-Zellen (Beier et al., 2000) und Ltk<sup>-</sup>-Zellen mit dem löslichen ICOS-L inkubiert und anschließend für den Nachweis im Durchflusszytometer mit einem FITC-markierten  $\alpha$ -V5-Antikörper gefärbt. In der anschließenden durchflusszytometrischen Analyse (Abb. 2.7) konnte eindeutig die Interaktion des löslichen ICOS-L mit den ICOS-Rezeptor-exprimierenden Zellen (ICOS-Ltk<sup>-</sup>-Transfektanten) nachgewiesen werden. Wie erwartet fand jedoch keine Bindung des ICOS-L an ICOS-defiziente Zellen (Ltk<sup>-</sup>-Zellen) statt. Die Expression des humanen ICOS-Moleküls wurde mit einem spezifischen Antikörper gegen den ICOS-Rezeptor nachgewiesen (Abb. 2.7a links).

In diesem Experiment konnte somit gezeigt werden, dass mit dem gewählten *Screening*-System bereits beschriebene Rezeptor-Ligand-Interaktionen aufgefunden werden können. Somit sollte es also auch möglich sein, mit diesem System bisher unbekannte Interaktionspartner für gp34 und gp68 zu finden, sofern eine Bindung ähnlicher Affinität besteht.

In einer Wiederholung des Experimentes wurden neben der ICOS-L-Bindung auch die Bindung der löslichen Proteine gp34 und gp68 an die Ltk<sup>-</sup>-Zellen bzw. die ICOS-Ltk<sup>-</sup>-Transfektanten getestet (Abb. 2.7.b) Die spezifische Bindung des ICOS-L an die ICOS-exprimierenden Zellen wurde reproduziert, für die löslichen viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren konnte jedoch keine Bindung an die Zellen nachgewiesen werden.



### 2.3.2 Die viralen Fcγ-Rezeptoren gp34 und gp68 binden an spezifische Lymphozytensubpopulation

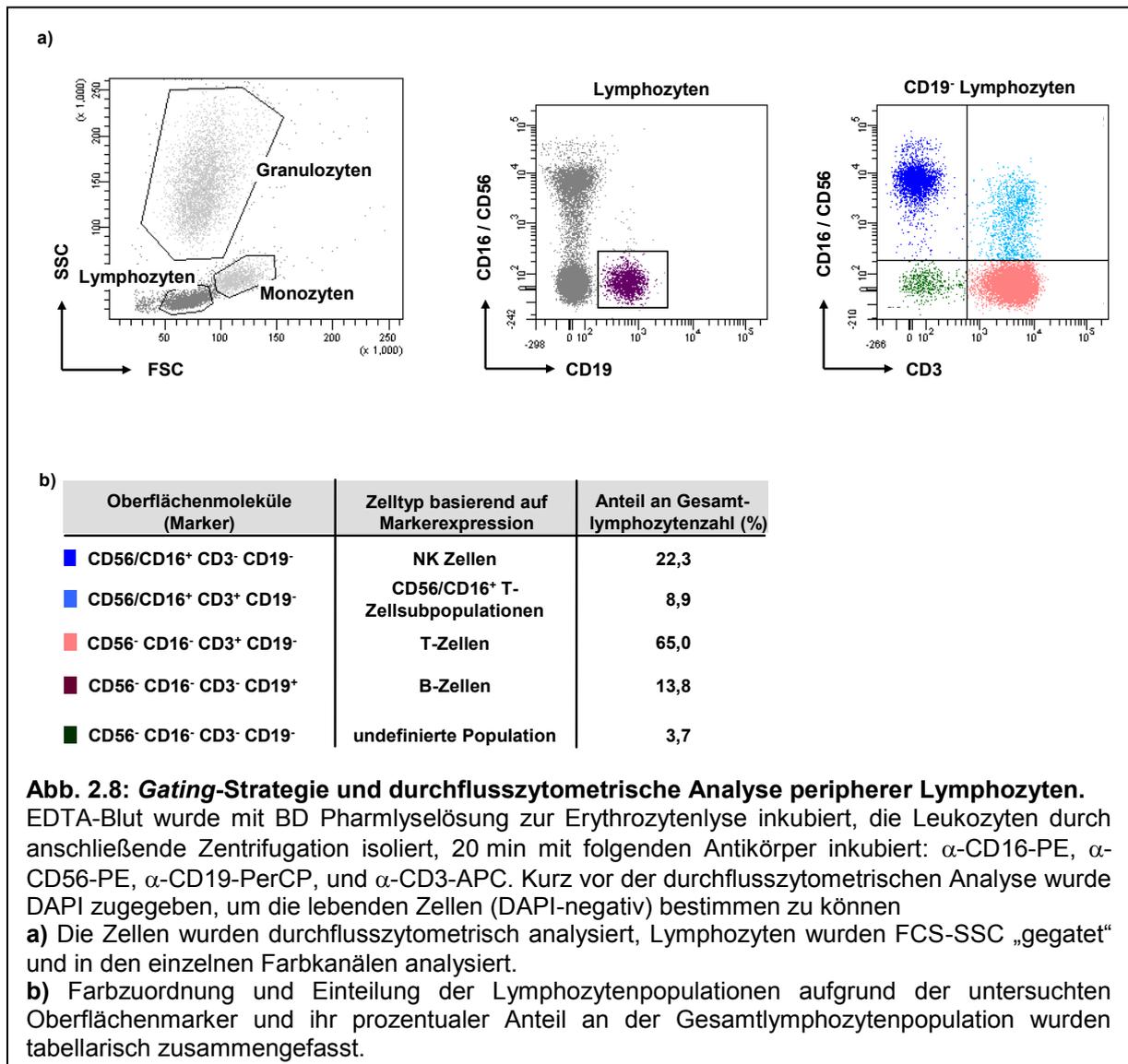
Beim *Screening* nach neuen Interaktionspartnern für gp34 und gp68 wurden zu Beginn verschiedene im Labor vorhandene Zelllinien wie z.B. die Fibroblastenzelllinie (MRC5), die T-Zelllinie (Jurkat) und die B-Zelllinien (Daudi, LCL 721.221) auf Oberflächenbindung der viralen Fcγ-Rezeptoren untersucht. In keiner der durchgeführten Proteinfärbungen konnte eine eindeutig detektierbare Bindung der Proteine an die untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die Suche nach Bindungspartnern wurde deshalb auf primäre humane Zellen ausgeweitet, dabei sollten vor allem Immunzellen wie z. B. NK-Zellen untersucht werden. Dazu wurden Lymphozyten aus dem peripheren Blut gesunder freiwilliger Spender mit bekannten CMV-Serostatus gewonnen. Um die Blutzellen für die Oberflächenfärbung aufzubereiten, wurde eine Erythrozytenlyse (BD PharmLyse™ *lysing buffer*) durchgeführt, nach der die Leukozyten durch einfache Zentrifugation aus dem Blut

isoliert werden konnten. Alternativ wurden die PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*), zu denen die Monozyten und Lymphozyten zählen, mithilfe von Lymphoprep<sup>TM</sup>-Reagenz über eine Dichtezentrifugation direkt aus dem entnommenem Blut isoliert. Um die Haupt-Lymphozytenpopulationen T-, B- und NK-Zellen in der durchflusszytometrischen Analyse identifizieren zu können, wurden gleichzeitig mit der Proteinfärbung verschieden Fluorophor-markierte Antikörper gegen die typischen Oberflächenmoleküle/-marker (CD: *cluster of differentiation*) von Lymphozyten eingesetzt. T-Zellen wurden mithilfe des Pan-T-Zellmarkers CD3, B-Zellen mithilfe des Pan-B-Zellmarkers CD19 und NK-Zellen, die negativ für CD3 und CD19 sind, wurden mittels des CD56-Moleküls, das hauptsächlich auf NK-, aber auch auf einigen CD3<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert wird (Hercend et al., 1985; Lanier et al., 1986), identifiziert.

Auf einen Fc-Rezeptor-Block der zellulären Fc-Rezeptoren, der die Bindung der Detektionsantikörper über ihren Fc-Teil an Fc-Rezeptor-tragende Zellen verhindern soll, wurde beim *Screening* absichtlich verzichtet. Die humanen Fc-Rezeptor-Blockierlösungen enthalten u.a. humanes IgG, welches von den zellulären Fc $\gamma$ -Rezeptoren gebunden wird und diese damit blockiert. Da die viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren gp34 und gp68 aber ebenso humanes IgG binden, würde ihr Bindungsverhalten an Lymphozyten durch die Zugabe von Fc-Rezeptor-Blockierlösung verändert werden und könnte die Detektion eines natürlichen Liganden verdecken.

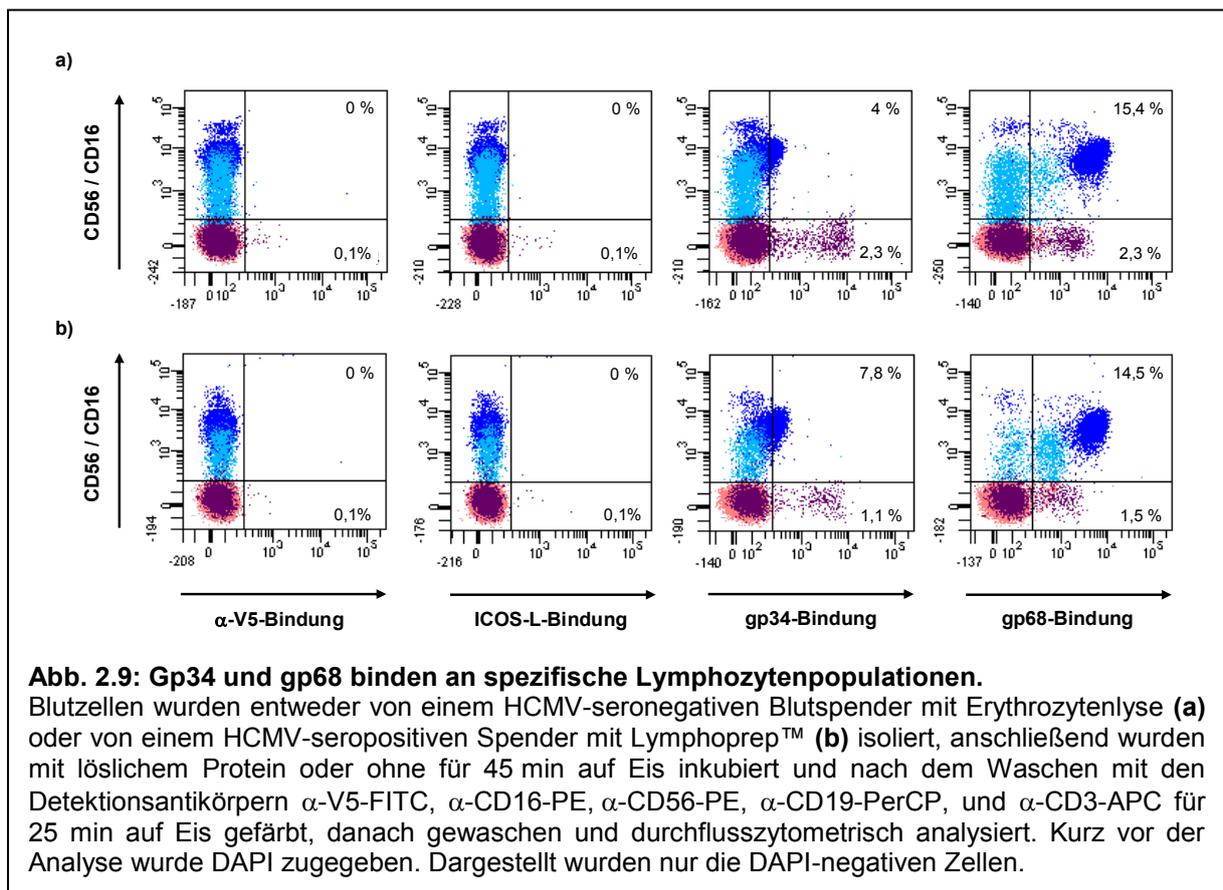
In der durchflusszytometrischen Messung wurden die Blutzellen zuerst im FSC-SSC (*forward scatter-sideward scatter*), in dem Größe und Granularität der untersuchten Zellen dargestellt sind, analysiert. Die Leukozytenpopulationen: Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten lassen sich aufgrund ihrer unterschiedlichen Granularität und ihrer Größe leicht voneinander trennen, und wurden mit Analysefenstern (*Gates*) markiert (s. Abb. 2.8). Das *Gaten* (auswählen/filtrieren einer bestimmten Zellpopulation) der Populationen auf Basis des FSC-SSC ist nicht zu 100 % präzise, wie z.B. Krömer und Grossmüller in ihrer Publikation für das Lymphozytengate zeigen konnten (Kromer und Grossmüller, 1994), dies spielte aber bei der hier durchgeführten Bindungsanalyse keine Rolle, da keine relativen Zellzahlen von ausgewählten Lymphozytenpopulationen bestimmt werden sollten. Die Zellen im Lymphozytengate wurden auf die Oberflächenexpression der verschiedenen Marker: CD3, CD19, CD16 und CD56 untersucht, um die drei Hauptpopulation der Lymphozyten: T-, B- und NK-Zellen identifizieren und *gaten* zu können. In Abbildung 2.8 wurde die *Gating*-Strategie für die einzelnen Lymphozytenpopulationen dargestellt. Jede Lymphozytensubpopulation bzw. jedes *Gate* erhielt zur vereinfachten Darstellung eine andere

Farbe. Um die Oberflächenmarkerfärbung ohne Fc-Block und die *Gating*-Strategie zu kontrollieren, wurden die prozentualen Anteile der einzelnen Populationen mit veröffentlichten Angaben verglichen (Jentsch-Ullrich et al., 2005). Alle Populationsgrößen lagen im Referenzbereich, so dass von der Richtigkeit der Färbung und *Gating*-Strategie ausgegangen werden konnte.



Aufgrund des fehlenden Fc-Blocks war es wichtig, die gp34- bzw. gp68-Bindung an Lymphozyten gut zu kontrollieren, um so nur die spezifischen Interaktionen von gp34 und gp68 mit Lymphozyten zu untersuchen. Die Proteinmarkierungen von gp34 und gp68 wurden immer mit der Antikörperkontrolle, in der nur die Bindung des Detektionsantikörper ( $\alpha$ -V5-FITC) untersucht wurde, und mit der ICOS-L-Färbung verglichen. Der Detektionsantikörper sollte dabei keine oder nur eine geringfügige Bindung an die Zellen zeigen. Der lösliche

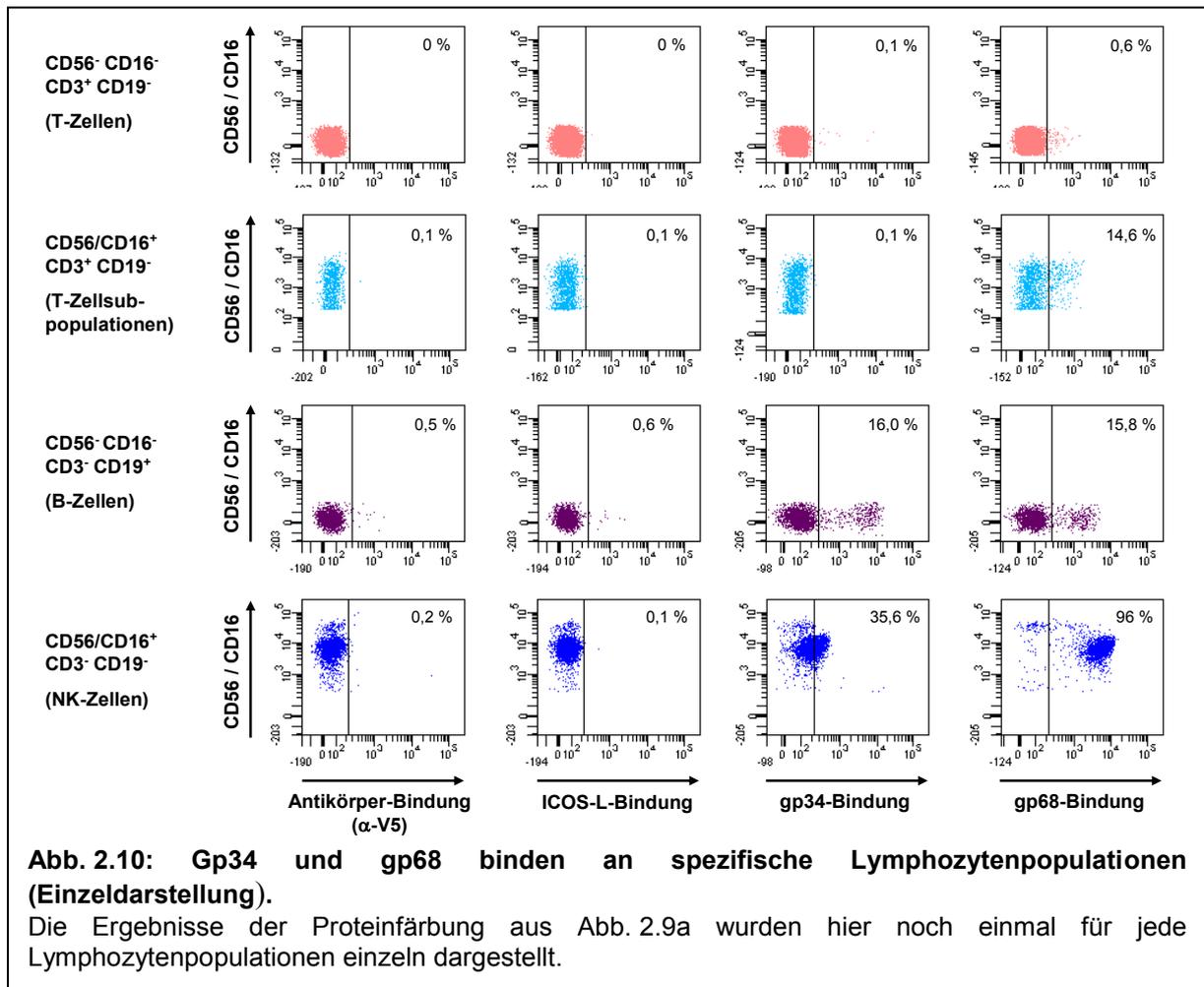
ICOS-L sollte nicht das gleiche Bindungsverhalten wie gp34 und gp68 aufweisen, da sonst nicht von einer spezifischen Bindung der unterschiedlichen Proteine ausgegangen werden kann. Im Gegensatz zu den zuvor getesteten Zelllinien konnte auf frisch isolierten Lymphozyten Bindung von gp34 und gp68 aber nicht vom ICOS-L detektiert werden. In Abb. 2.9 sind dazu zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente dargestellt.



Beide Proteinfärbungen zeigten deutlich, dass gp34 sowie gp68 an spezifische Lymphozytenpopulationen binden (bindende Populationen wandern in der Dotplot-Darstellung nach „rechts“). Dabei konnte für gp34 starke Bindung an einen Teil der CD19<sup>+</sup> B-Lymphozyten (Population lila) und schwache Bindung an die NK-Zellpopulation (dunkelblau) nachgewiesen werden. Für gp68 konnte starke Bindung an NK-Zellen, etwas schwächere Bindung an einen Teil der CD19<sup>+</sup> B-Lymphozyten und an einen Teil der CD3<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> und/oder CD16<sup>+</sup> Population nachgewiesen werden. Die Art der Blutzellisolierung (Erythrozytenlyse oder Dichtezentrifugation), der Donor und der HCMV-Serostatus spielten keine Rolle bei der Bindung von gp34 und gp68 an Lymphozyten, da trotz der unterschiedlichen Versuchsbedingungen keine Unterschiede im Bindungsverhalten von gp34 und gp68 gefunden wurden (vergleiche Abb. 2.9a und 2.9b).

Um die Proteinbindung an die verschiedenen Lymphozytenpopulationen genauer untersuchen zu können, wurden diese mithilfe der verschiedenen *Gates* (s. Abb. 2.8) einzeln analysiert (Abb. 2.10). Die T-Zellen stellen den größten prozentualen Anteil der Lymphozyten im Blut dar. Eine Bindung von gp34 oder gp68 an diese Zellen konnte aber nicht nachgewiesen werden (Abb. 2.10). T-Zellen scheinen also keine Interaktionspartner für gp34 oder gp68 zu exprimieren. Für den ICOS-L ließ sich ebenfalls keine Bindung an frisch-isolierte T-Zellen nachweisen, obwohl T-Zellen als typischer Expressionsort des ICOS-Rezeptors gelten. Da der ICOS-Rezeptor aber nicht konstitutiv von T-Zellen exprimiert, sondern erst durch Aktivierung der T-Zellen heraufreguliert wird (Hutloff et al., 1999; Julenius et al., 2005), war dieses Ergebnis zu erwarten. In einem Kontrollexperiment mit PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat)-stimulierten T-Zellen konnte die Bindung des löslichen ICOS-L an T-Zellen detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Die hellblau-dargestellte Lymphozytenpopulation (Abb. 2.8 bis 2.10) zeichnet sich durch Expression des typischen T-Zellmarkers CD3 und Ko-Expression typischer NK-Zellmarker wie CD56 und/oder CD16 aus. CD56<sup>+</sup> T-Zellen wurden schon früh in der Literatur beschrieben (Lanier et al., 1986; Schmidt et al., 1986). Es ist bekannt, dass diese Population sehr heterogen ist und sich aus verschiedenen T-Zellsubpopulationen wie NKT-,  $\gamma\delta$ T- oder auch CD8<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  T-Zellen zusammensetzt, die neben ihrem T-Zellrezeptor auch verschiedene NK-Zellrezeptoren, wie z.B. CD56, NKG2D oder CD16 auf der Oberfläche tragen (Lanier et al., 1987; van de Griend et al., 1987; Ortaldo et al., 1991; Lantz und Bendelac, 1994; Mingari et al., 1995). Für gp68 ließ sich die Bindung an einen Teil dieser Population (ca. 15 %) nachweisen, für gp34 jedoch nicht (Abb. 2.9 und 2.10). Die CD19<sup>+</sup> B-Zellen stellen ca. 5 bis 15 % der Lymphozytenpopulation. Auch an eine B-Zellsubpopulation konnte eine eindeutige Bindung von gp34 und gp68 nachgewiesen werden (Abb. 2.10). Die Anzahl der von gp34 und gp68 gebunden B-Zellen ist nahezu gleich groß, so dass davon ausgegangen wurde, dass beide Fc $\gamma$ -Rezeptoren die gleiche B-Zellsubpopulation binden. Die Interaktion von gp34 und gp68 mit B-Zellen wird in Kapitel 2.3.3 genauer analysiert. Eine weitere wichtige Lymphozytenpopulation stellen die NK-Zellen dar. Im peripheren Blut treten hauptsächlich zwei NK-Zellsubpopulationen, die phänotypisch anhand ihrer CD56-Oberflächenexpressionsdichte unterschieden werden, auf (Lanier et al., 1986). Die Hauptpopulation (ca. 90 % der peripheren NK-Zellen) zeichnet sich durch eine relativ niedrige Expression von CD56 (CD56<sup>dim</sup>), gleichzeitig aber hohe Expression von CD16 (CD16<sup>bright</sup>), aus. Die andere NK-Zellpopulation (ca. 10 % der peripheren NK-Zellen) bilden die CD56<sup>bright</sup> Zellen, die eine hohe Expressionsdichte von CD56, dafür aber kaum bzw. gar kein CD16 (CD16<sup>dim</sup> bzw. CD16<sup>-</sup>) besitzen (Nagler et al., 1989). In Abb. 2.10 sind deutlich

zwei NK-Zellpopulationen zu erkennen. Da die CD16- und CD56-Expression in den Lymphozytenfärbungen mit dem gleichen Fluorochrom (PE) nachgewiesen wurde, konnten die in der Literatur beschriebenen Subpopulationen in diesem Experiment nicht definitiv unterschieden werden. Es ist aber gut zu erkennen, dass gp68 an die gesamte CD16<sup>dim</sup>/CD56<sup>dim</sup> NK-Zellpopulation bindet, währenddessen von der „oberen“ Population nur vereinzelte Zellen gebunden werden. Die gp34-Bindung konnte nur an die untere NK-Zellpopulation nachgewiesen werden. Auf die Bindung viraler Fcγ-Rezeptoren an NK-Zellsubpopulationen wird in Kapitel 2.3.4 genauer eingegangen.



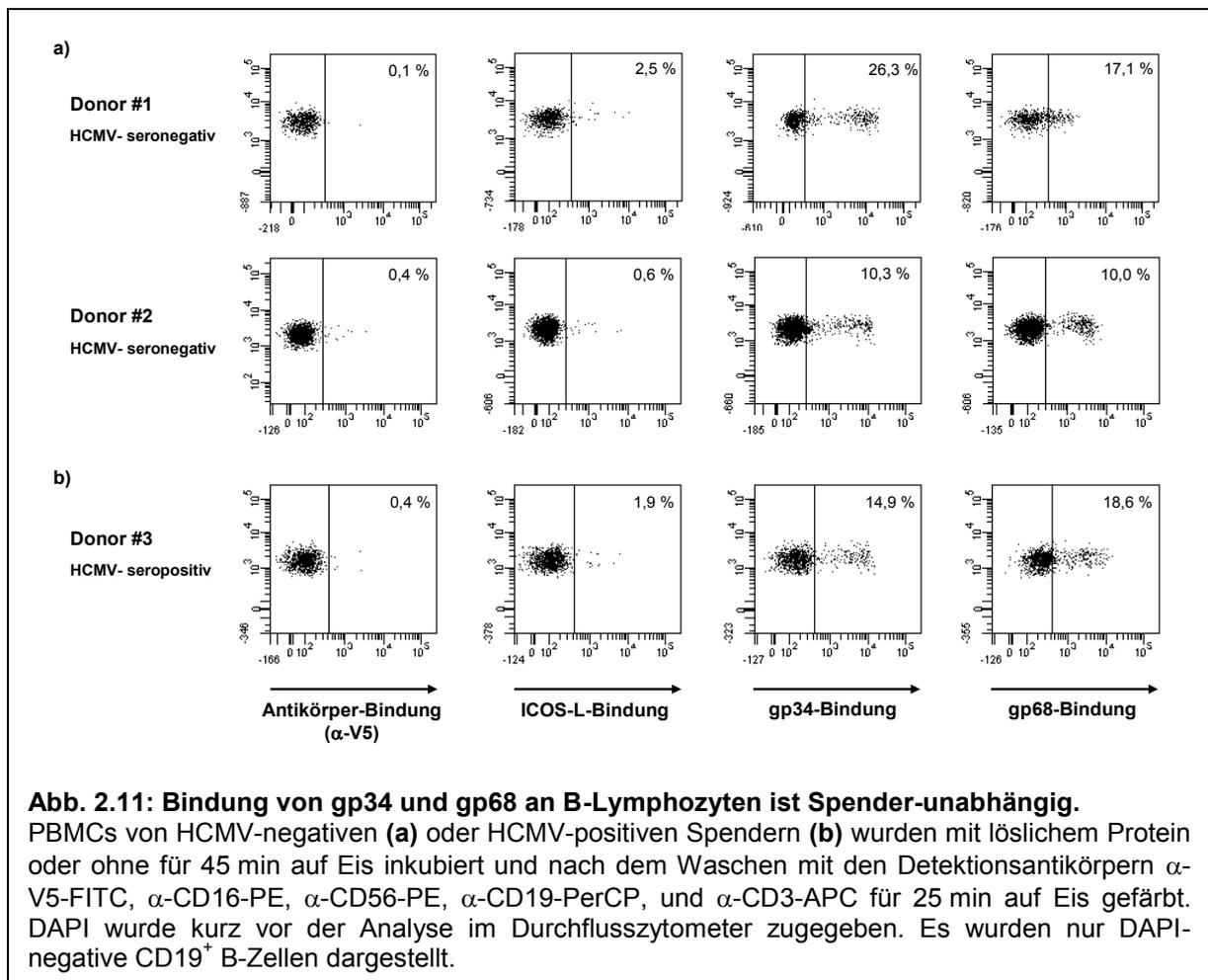
Mit der durchflusszytometrischen Analyse von gp34- bzw. gp68-gefärbten Lymphozyten aus dem Blut konnte zum ersten Mal eine Interaktion von den HCMV-kodierten Fcγ-Rezeptoren gp34 und gp68 mit spezifischen humanen Lymphozytenpopulationen gezeigt werden.

## 2.4 Bindung der viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren an B-Zellen

Nachdem die Bindung der viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren an eine Subpopulation der CD19<sup>+</sup> B-Zellen gezeigt werden konnte (Abb. 2.10), sollte nun in weiteren Analysen diese Subpopulation analysiert und definiert werden. Es wurde die Abhängigkeit der Bindung von Donor und HCMV-Serostatus untersucht. Mit Hilfe verschiedener B-Zellmarker wurde anschließend die bindende Population in der Durchflusszytometrie definiert.

### 2.4.1 Die Bindung von gp34 und gp68 an B-Zellen ist unabhängig vom Spender und dessen HCMV-Serostatus

CD19<sup>+</sup> B-Zellen verschiedener Spender wurden in unabhängigen Experimenten auf Proteinbindung von gp34 und gp68 untersucht (Abb. 2.11). Dazu wurden frisch-isolierte PBMCs mit den löslichen Proteinen inkubiert und im Durchflusszytometer auf Proteinbindung untersucht.

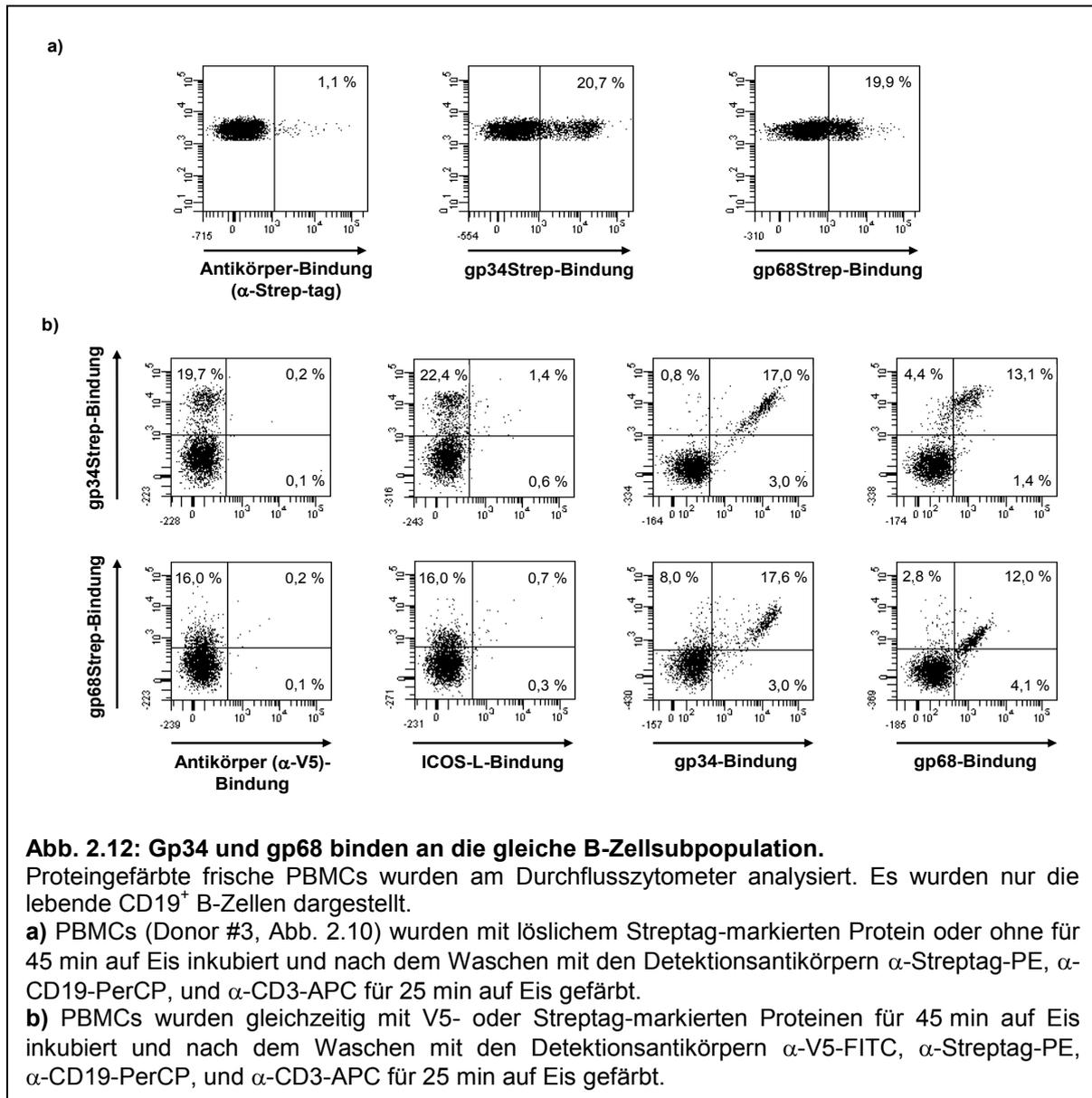


Die Einzelanalyse der CD19<sup>+</sup> Lymphozytenpopulation wurde im Dotplot dargestellt. Es zeigte sich, dass in allen durchgeführten Experimenten die Bindung der viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren an eine Subpopulation der CD19<sup>+</sup> B-Zellen durchflusszytometrisch nachgewiesen werden konnte. Für den ICOS-L ließ sich hingegen nie die Bindung an B-Zellen nachweisen. Die untersuchten Spender unterschieden sich u. a. in ihrem HCMV-Serostatus, dies hatte jedoch keinen Einfluss auf die Proteinbindung, da bei allen bisher untersuchten Spendern Bindung von gp34 und gp68 an B-Zellen nachgewiesen werden konnte. Der Anteil der bindenden B-Zellpopulation an der Gesamtzahl der CD19<sup>+</sup> B-Zellen bewegte sich spenderabhängig zwischen 10-20 %.

### **2.4.2 Gp34 und gp68 binden an die gleiche B-Zellsubpopulation**

Für das *Screening* nach neuen Interaktionspartnern für gp34 und gp68 wurden bisher V5His<sub>6</sub>-Epitop-markierte lösliche Proteine, die in Abb. 2.3 eingeführt wurden, verwendet. Zusätzlich wurden mit dem StarGate-System der Firma IBA lösliche Proteine exprimiert, die einen N-terminalen StrepTag sowie einen C-terminalen His<sub>6</sub>-Tag trugen (s. Material und Methoden). Diese Proteine wurden ebenfalls über ihr His<sub>6</sub>-Epitop aufgereinigt und auf Bindung an B-Zellen getestet. Die Detektion der Proteine erfolgte mit einem  $\alpha$ -StrepTag-Antikörper, der für den durchflusszytometrischen Nachweis mit dem Fluoreszenzfarbstoff PE markiert war. Wie zuvor konnte die Bindung der viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren gp34 und gp68 an B-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 2.12a).

Da die V5His<sub>6</sub>-Epitop-markierten und die StrepTag-markierten Proteine in der Durchflusszytometrie durch die Benutzung unterschiedlicher Detektionsantikörper getrennt analysiert werden können, wurde durch gleichzeitige Färbung von Lymphozyten mit V5His<sub>6</sub>- und Streptag-markierten Proteinen Aufschluss darüber gewonnen, ob gp34 und gp68 an die gleiche B-Zellsubpopulation binden. Die Doppelfärbung fand unter nicht-gesättigten Bedingungen statt und die unterschiedlichen Proteine wurden zur gleichen Zeit mit den Lymphozyten inkubiert. Die durchflusszytometrische Analyse (Abb. 2.12b) der gefärbten B-Zellen zeigte deutlich, dass die B-Zellsubpopulation, die positiv für gp34 ebenso positiv für gp68 war (Zellen wandern im Dot-Plot in den oberen rechten Quadranten).

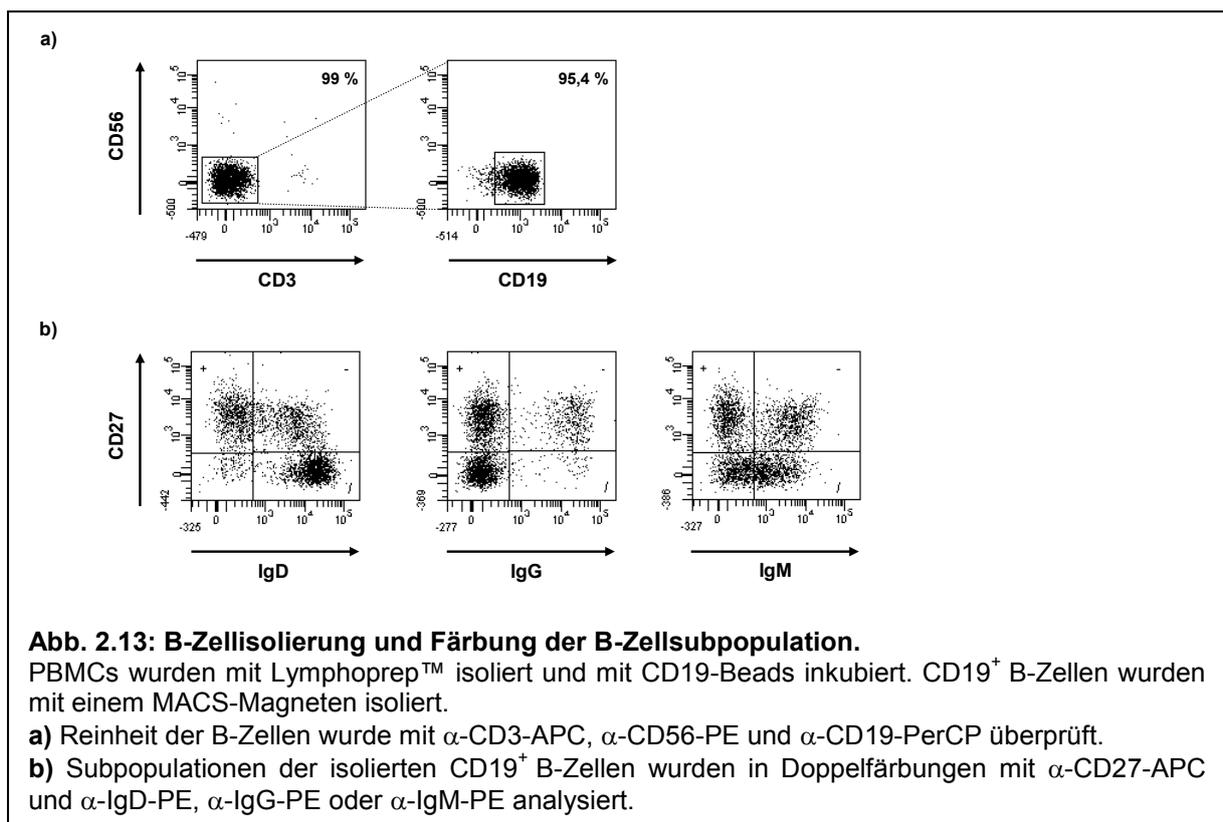


Es kann formal nicht ausgeschlossen werden, dass die Doppelfärbung teilweise durch eine direkte Interaktion, zwischen den viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren gp34 und gp68 selbst, zustande kommen könnte. Dabei würde die B-Zellbindung des einen Proteins indirekt die Bindung des anderen Fc $\gamma$ -Rezeptors an dieselben B-Zellen bedingen. Allerdings konnte noch nie eine direkte Interaktion zwischen gp34 und gp68 in Ko-Präzipitationsanalysen (eigene Beobachtung und Daten von Frau Dr. Henrike Reinhard) und ELISA-Bindungsanalysen nachgewiesen werden, außerdem wurde in den Einzelfärbungen bereits die direkte Bindung beider Proteine an B-Zellen gezeigt, so dass eine Doppelfärbung der B-Zellpopulation aufgrund einer Interaktion zwischen gp34 an gp68 ausgeschlossen wird.

Die Bindung der viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren an die gleiche B-Zellsubpopulation lässt vermuten, dass gp34 und gp68 denselben Liganden binden, ohne in Konkurrenz zu treten.

### 2.4.3 Die viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren binden an IgG+CD27+ B-Zellen

Um die interagierende B-Zellpopulation mithilfe der Durchflusszytometrie genauer definieren zu können, wurden die B-Zellen mithilfe der MACS-Isolation aus Blutzellen aufgereinigt. Dazu wurden CD19 MicroBeads (Miltenyi Biotec) mit aufgereinigten PBMCs inkubiert, die B-Zellen wurden dabei mit paramagnetischen Partikeln markiert und konnten so anschließend mit einem Magneten separiert werden. Die Reinheit der B-Zellen wurde in der Durchflusszytometrie überprüft und lag bei 90-95 % (siehe Abb. 2.13a). Um verschiedene B-Zellsubpopulationen durchflusszytometrisch unterscheiden zu können, wurden verschiedene Antikörper gegen typische Moleküle auf der B-Zelloberfläche, wie CD27, IgM, IgD und IgG eingesetzt.

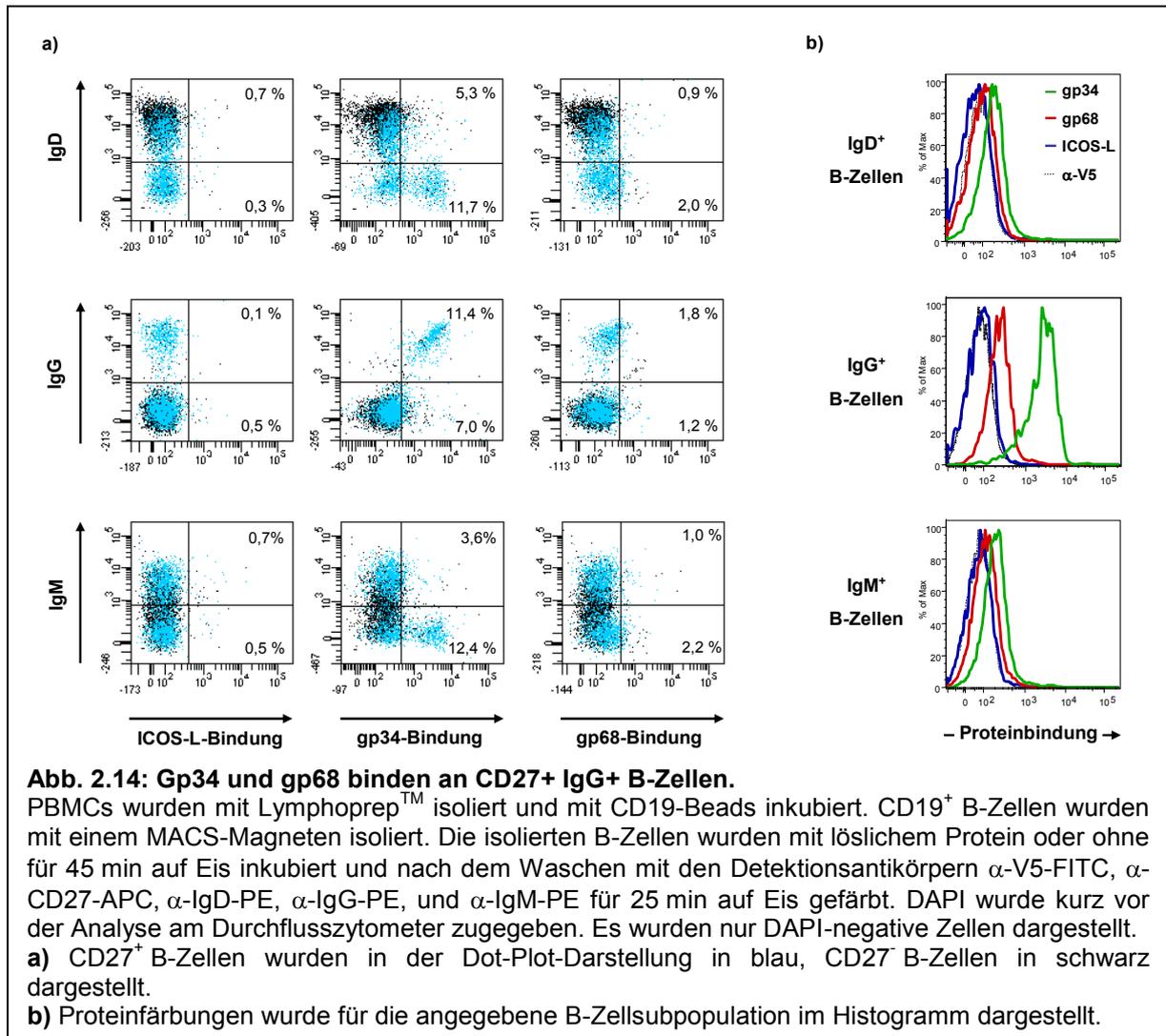


Die CD27-Expression auf B-Lymphozyten dient als Marker für Gedächtnis-B-Zellen (Klein et al., 1998; Tangye et al., 1998). Die auf der B-Zelloberfläche exprimierten membrangebundenen Immunglobuline (Walters und Wigzell, 1970; Pernis et al., 1971) wie

z. B. IgM, IgD und IgG geben Aufschluss über die Reife der B-Zellen. So wird z. B. IgG nur auf B-Zellen exprimiert, die bereits einen Klassenwechsel vollzogen haben (Esser und Radbruch, 1990). Die unterschiedlichen B-Zellpopulationen konnten durchflusszytometrisch gut unterschieden werden. Die durchgeführten Doppelfärbungen der B-Zellen mit  $\alpha$ -CD27-Antikörper und  $\alpha$ -IgD oder  $\alpha$ -IgG oder  $\alpha$ -IgM wurden in Abb. 2.13b dargestellt.

Um herauszufinden, welche der B-Zellpopulation von gp34 und gp68 gebunden wird, wurden die isolierten B-Zellen gleichzeitig mit den löslichen Proteinen und den Antikörpern gegen die verschiedenen B-Zellmarker gefärbt. In der durchflusszytometrischen Analyse wurde die Bindung von gp34 und gp68 an die verschiedenen B-Zellsubpopulation untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass gp34 und gp68 an IgG<sup>+</sup> B-Zellen binden, IgM<sup>+</sup> und IgD<sup>+</sup> B-Zellen wurden nicht bzw. kaum gebunden (Abb. 2.14b). Es wird in der Dot-Plot- (Abb. 2.14a), wie auch in der Histogramm-Darstellung (Abb. 2.14b) deutlich, dass alle IgG<sup>+</sup> B-Zellen von gp34 und gp68 gebunden werden. Die IgG<sup>+</sup> B-Zellen exprimieren gleichzeitig das CD27-Molekül (blaue Zellen in Abb. 2.14a) und stellen somit Gedächtnis-B-Zellen dar. Die Bindungsstärke von gp34 und gp68 an die IgG<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> B-Zellen korrelierte mit der Höhe der IgG-Expression (Abb. 2.14a), je mehr IgG auf der B-Zelle exprimiert wird, desto mehr gp34 oder gp68 Bindung konnte detektiert werden.

Beim Vergleich der durchgeführten Bindungsanalysen von viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren mit peripheren B-Zellen fiel auf, dass die gp68-Bindung immer schwächer an MACS-isolierten als an unbehandelte B-Zellen war (vergleiche Abb. 2.14 mit 2.11). Die MACS-Isolierung von B-Zellen mithilfe von CD19-MicroBeads erfordert die Interaktion der MicroBeads mit dem CD19-Molekül. CD19 ist ein Ko-Rezeptor des B-Zellrezeptors und spielt u. a. eine wichtige Rolle in der Signalübertragung. Die Interaktion der CD19-MicroBeads mit dem CD19-Molekül könnte zu einer Aktivierung des CD19-Moleküls und somit auch der B-Zelle führen, was möglicherweise auch eine veränderte B-Zelloberflächengestaltung zur Folge haben könnte. Auch wenn die Isolierung der B-Zellen auf 4 °C durchgeführt wird, so ist nicht auszuschließen, dass sich die Art der Isolation auf die Bindung von gp68 an die B-Zelle auswirkt. Trotzdem konnte mit den hier durchgeführten Bindungsanalysen zum ersten Mal eine direkte Interaktion der viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren gp34 und gp68 mit B-Zellen gezeigt werden. Die bindende B-Zellsubpopulation wurde aufgrund dieser Analysen als klassengewechselte IgG<sup>+</sup> Gedächtnis-B-Zelle bestimmt.



**Abb. 2.14: Gp34 und gp68 binden an CD27<sup>+</sup> IgG<sup>+</sup> B-Zellen.**

PBMCs wurden mit Lymphoprep™ isoliert und mit CD19-Beads inkubiert. CD19<sup>+</sup> B-Zellen wurden mit einem MACS-Magneten isoliert. Die isolierten B-Zellen wurden mit löslichem Protein oder ohne für 45 min auf Eis inkubiert und nach dem Waschen mit den Detektionsantikörpern α-V5-FITC, α-CD27-APC, α-IgD-PE, α-IgG-PE, und α-IgM-PE für 25 min auf Eis gefärbt. DAPI wurde kurz vor der Analyse am Durchflusszytometer zugegeben. Es wurden nur DAPI-negative Zellen dargestellt.

**a)** CD27<sup>+</sup> B-Zellen wurden in der Dot-Plot-Darstellung in blau, CD27<sup>-</sup> B-Zellen in schwarz dargestellt.

**b)** Proteinfärbungen wurde für die angegebene B-Zellsubpopulation im Histogramm dargestellt.

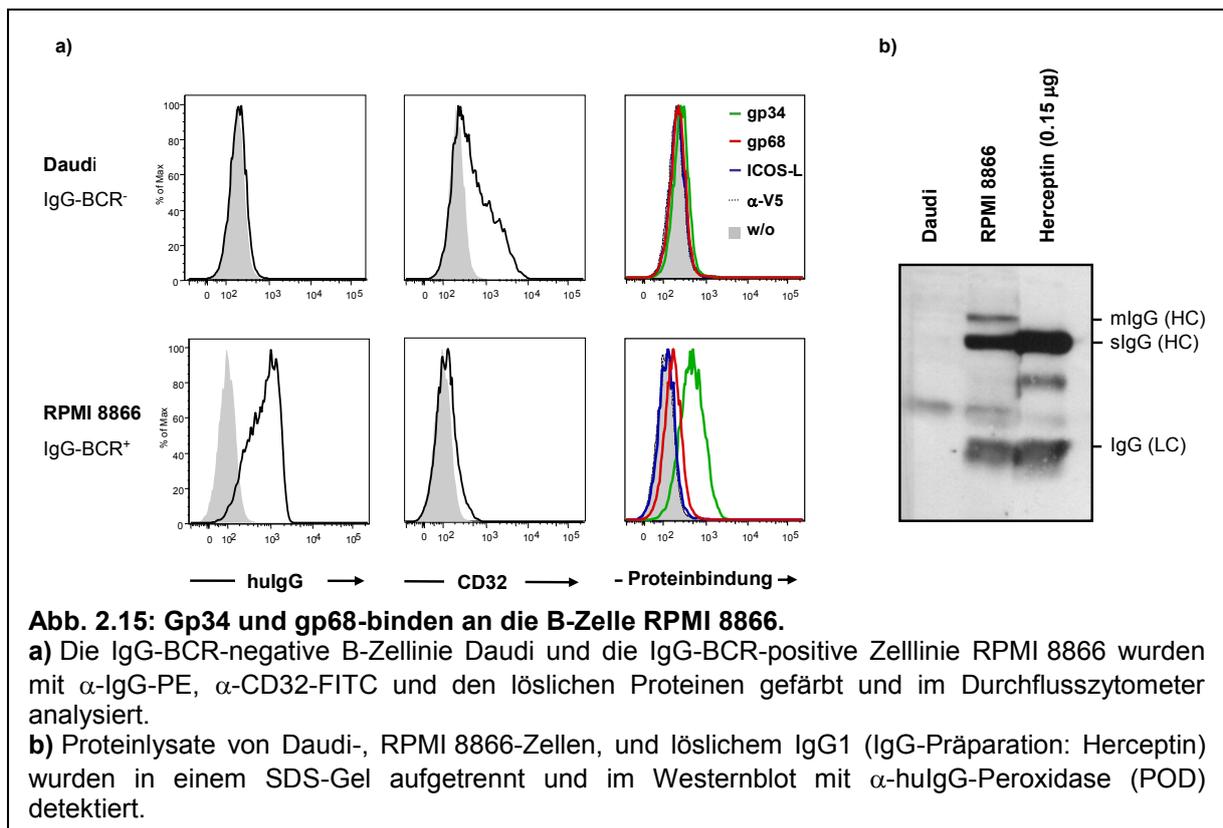
## 2.4.4 Die viralen Fcγ-Rezeptoren binden an die IgG<sup>+</sup> B-Zelllinie

### RPMI 8866

Aufgrund der Fc-bindenden Eigenschaft der viralen Fcγ-Rezeptoren und der Korrelation der gp34- bzw. gp68-Bindung mit der Expression des IgG-B-Zellrezeptors wurde angenommen, dass der IgG-B-Zellrezeptor, also membranständiges IgG (mIgG), der Ligand der viralen Fcγ-Rezeptoren auf B-Zellen ist. Um die Hypothese zu unterstützen, wurde nach B-Zelllinien gesucht, die den IgG-B-Zellrezeptor exprimieren, um ebenfalls gp34- und gp68-Bindung an diese Zellen zu untersuchen. Eine B-Zelllinie, die IgG synthetisiert, ist die lymphoblastoide Zelllinie RPMI 8866 (Finegold et al., 1967). Die EBV-positive B-Zelllinie Daudi exprimiert hingegen membrangebundenes IgM (Dulis et al., 1982), den IgG-B-Zellrezeptor exprimiert sie hingegen nicht. Membrangebundene Immunglobuline ähneln den entsprechenden löslichen Immunglobulinen stark (Walters und Wigzell, 1970), und unterscheiden sich nur in

einem kleinen Teil der C-terminalen Aminosäuresequenz der schweren Kette (HC: *Heavy Chain*) des Immunglobulins. Die schwere Kette membrangebundener Immunglobuline besitzt, im Gegensatz zu den löslichen, eine zusätzliche Transmembrandomäne und einen kurzen zytoplasmatischen Teil (Tyler et al., 1981). Dies führt zu einer Größenveränderung der schweren Kette (HC), die sich im Westernblot durch verändertes Laufverhalten nachweisen lässt. Vergleicht man Zelllysate der B-Zelllinien Daudi und RPMI 8866 mit einer kommerziellen klonalen IgG1-Präparation (Herceptin), so lässt sich lösliches IgG wie auch membrangebundenes IgG in den RPMI 8866 B-Zellen nachweisen (Abb. 2.15b). Daudi-Zellen exprimieren weder das eine noch das andere.

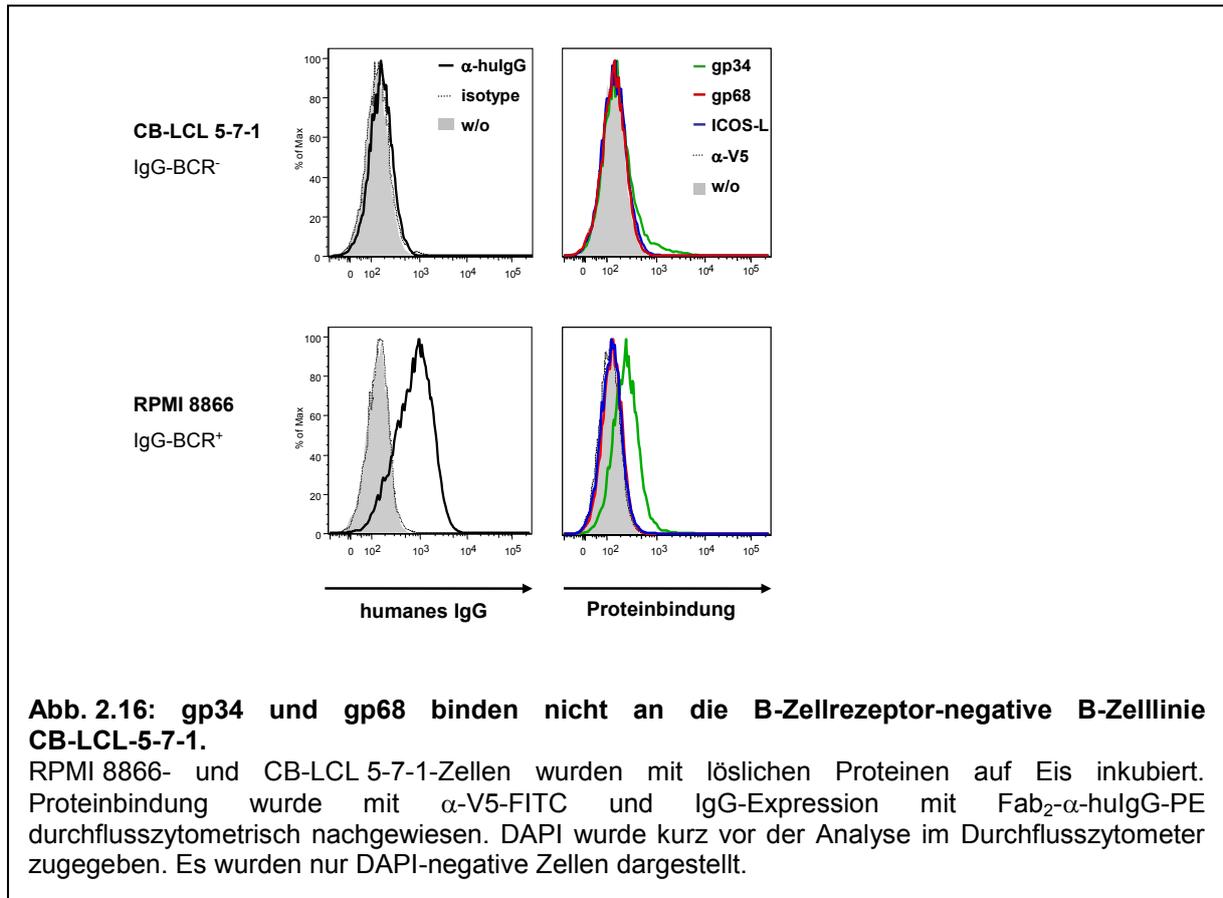
Beide Zelllinien wurden mit den löslichen Proteinen inkubiert und Proteinbindung durchflusszytometrisch analysiert. Dabei konnte Bindung von gp34 und gp68 (sehr schwach) an die RPMI 8866 nicht jedoch an die Daudi B-Zelllinie nachgewiesen werden (Abb. 2.15.a).



Die in der Arbeitsgruppe von Prof. Küppers (Institut für Zellbiologie, Universitätsklinikum Essen, Essen, Deutschland) isolierte B-Zelllinie CB-LCL-5-7-1 (*centroblast-derived lymphoblastoid cell line*) exprimiert keinen B-Zellrezeptor aufgrund einer somatischen Mutation in der V<sub>H</sub>-Genregion (Bechtel et al., 2005). Die Bindung von gp34 und gp68 an diese B-Zelllinie wurde im Vergleich zu RPMI 8866-Zellen getestet. Auf der B-Zelllinie

CB-LCL-5-7-1 konnte weder Bindung von gp34 noch von gp68 nachgewiesen werden (Abb. 2.16).

Die Experimente mit den B-Zelllinien unterstützen die Hypothese, dass der IgG-B-Zellrezeptor der Ligand der viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren ist, da nur auf der IgG-positiven B-Zelllinie RPMI 8866 aber nicht auf den IgG-negativen B-Zelllinien Daudi und CB-LCL-5-7-1 Bindung nachgewiesen werden konnte.

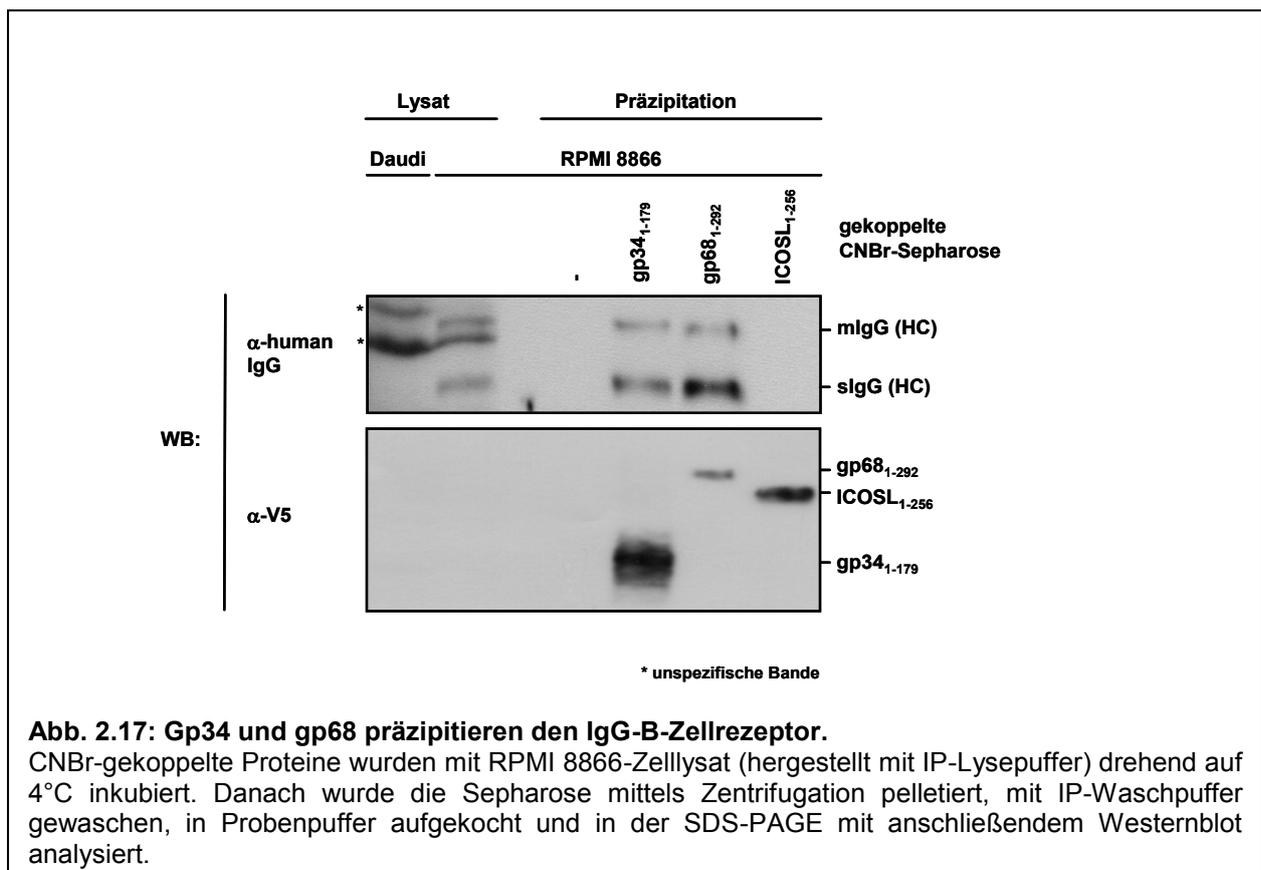


#### 2.4.5 Gp34 und gp68 präzipitieren den IgG-B-Zellrezeptor

Die Ergebnisse der Bindungsanalysen mit primären B-Zellen sowie den B-Zelllinien weisen auf den IgG-B-Zellrezeptor als Liganden von gp34 und gp68 hin. Um dies eindeutig zu beweisen, sollte die Bindung in einer Protein-biochemischen Analyse nachgewiesen werden.

Virale Fc $\gamma$ -Rezeptoren lassen sich einfach mit Fc $\gamma$ -Fragment präzipitieren (Abb. 2.2 oder 2.6). Deshalb sollte es ebenso möglich sein, mit Hilfe von gp34 und gp68 den IgG-B-Zellrezeptor (potentieller Ligand) aus entsprechenden Zelllysaten zu präzipitieren und im Westernblot nachzuweisen. Die löslichen Proteine wurden dazu kovalent an CNBr-Sepharose gekoppelt

und mit Zelllysaten von Daudi-Zellen oder RPMI 8866-Zellen inkubiert. Die Protein-gekoppelte CNBr-Sephrose wurde präzipitiert, gewaschen und per SDS-PAGE mit anschließendem Westernblot auf Präzipitation des IgG-B-Zellrezeptors hin untersucht. In Anwesenheit von gp34 oder gp68 konnte der IgG B-Zellrezeptor aus dem Lysat von RPMI 8866-Zellen präzipitiert werden. CNBr-Sephrose allein oder gekoppelt mit ICOS-L waren nicht fähig den B-Zellrezeptor zu präzipitieren (Abb. 2.17). Im Westernblot wurde die schwere Kette des membranständigen IgG-Antikörpers/B-Zellrezeptor (mIg) sowie des löslichen IgGs nachgewiesen. Die Menge, der für die Präzipitation eingesetzten gekoppelten Proteine gp34, gp68 oder ICOS-L wurden verglichen, indem die Proteine auf derselben Membran nach einem Reblot mit  $\alpha$ -V5-Antikörper detektiert wurden. Mit diesem Präzipitationsexperiment konnte zum ersten Mal eine Interaktion zwischen dem IgG-B-Zellrezeptor und den viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren gp34 und gp68 gezeigt werden. Die Fc-bindende Eigenschaft der viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren und die beschriebenen Experimente deuten sehr stark darauf hin, dass gp34 und gp68 den B-Zellrezeptor direkt binden.



### **Zusammenfassung: Gp34 und gp68 interagieren mit IgG<sup>+</sup> B-Zellen.**

---

Mit der Analyse der gp34- bzw. gp68-Bindung an B-Zellen mittels verschiedener Proteinfärbungen und Präzipitationsexperimente konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass

- 1) virale Fc $\gamma$ -Rezeptoren an IgG-Gedächtnis-B-Zellen binden,
- 2) virale Fc $\gamma$ -Rezeptoren an zellständige IgG-Moleküle (in Form des B-Zellrezeptors) binden.

## 2.5 Bindung der viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren an NK-Zellen

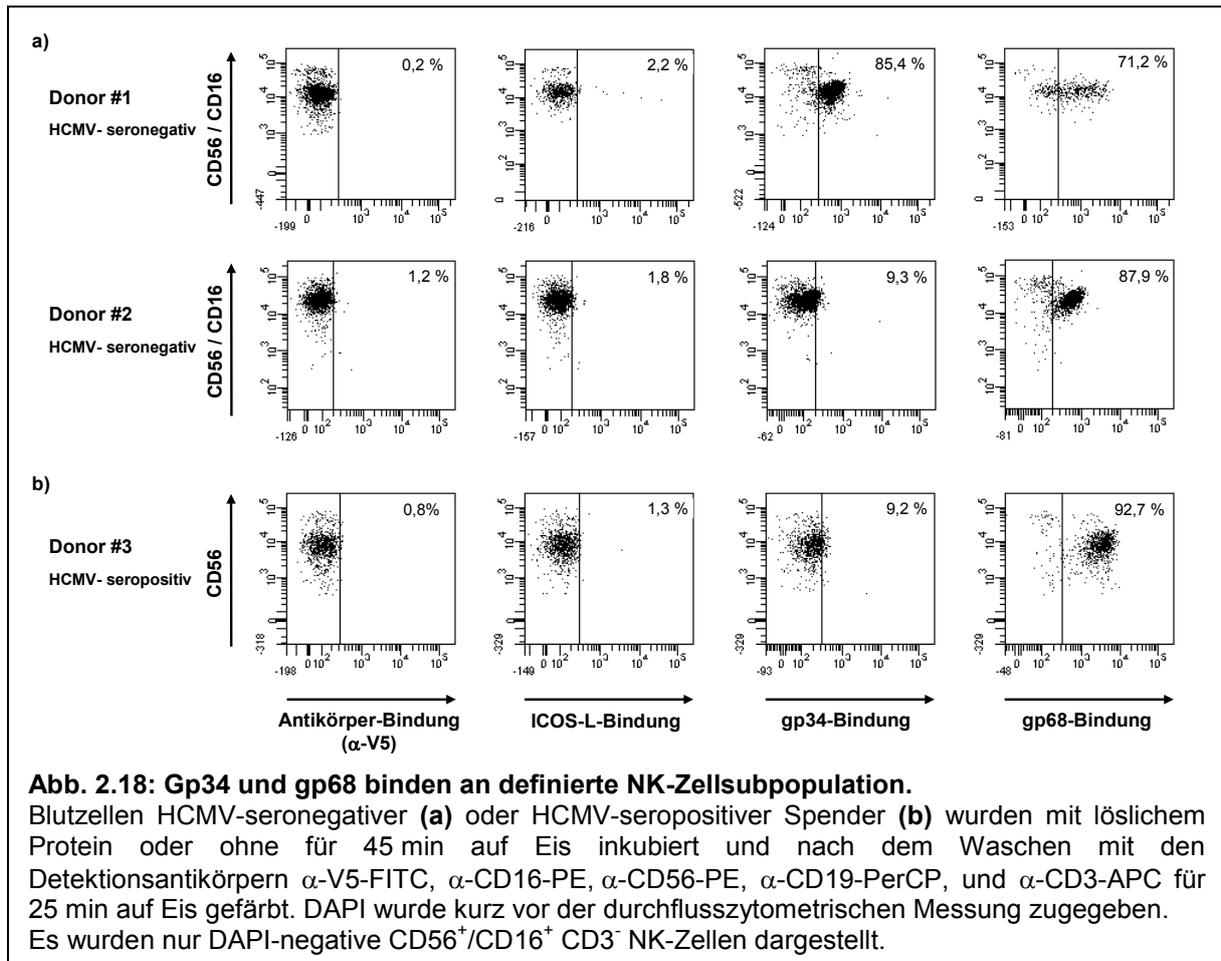
Die Bindung von gp34 und gp68 an NK-Zellen, die in den ersten durchflusszytometrischen Analysen nachgewiesen wurde (Abb. 2.9 und 2.10), sollte genauer untersucht und mögliche gp34- bzw. gp68-Liganden bestimmt werden.

### 2.5.1 gp34 und gp68 binden unabhängig von Spender und dessen HCMV-Serostatus an NK-Zellen

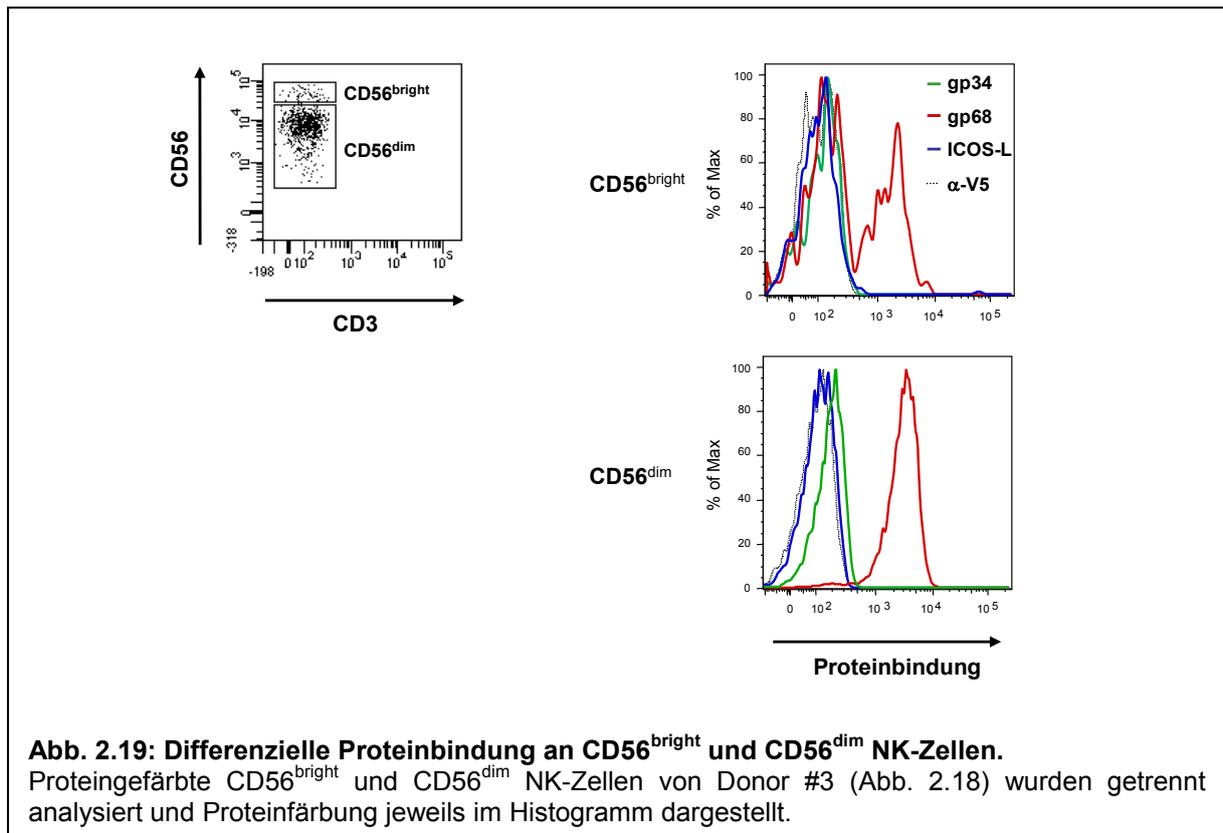
NK-Zellen aus verschiedenen PBMC-gp34/gp68-Markierungsexperimenten mit verschiedenen Spendern wurden durchflusszytometrisch bezüglich Bindung der viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren untersucht und verglichen. Es konnte in allen Experimenten gp68-Bindung an NK-Zellen nachgewiesen werden, wobei die Bindungsintensität (gemessen in MFI [*mean fluorescence intensity*]) Spender-abhängig variierte (Abb. 2.18). Die gp34-Bindung an NK-Zellen war im Vergleich schwächer und in einigen Experimenten kaum nachweisbar. Für den ICOS-L konnte in keinem der durchgeführten Experimente Bindung an NK-Zellen nachgewiesen werden.

Die grundsätzliche Bindungsfähigkeit von gp68 an NK-Zellen war unabhängig von Spender und dessen HCMV-Serostatus. Die Stärke der Bindung schien jedoch Spender- oder Experiment-abhängig sein. Da die Bindung von gp34 an NK-Zellen grundsätzlich sehr schwach war, lässt sich über den Einfluss von Spender- und HCMV-Serostatus auf die Bindung keine finale Aussage machen. Das eingesetzte gp34-Protein war in den gezeigten Färbungen grundsätzlich funktionell, da in derselben Proteinfärbung Bindung an B-Zellen nachgewiesen werden konnte (Abb. 2.11).

Die Bindung von gp34 und gp68 an NK-Zellen erfolgte nicht an die gesamte NK-Zellpopulation, d. h. dass nur bestimmte NK-Zellpopulationen den Liganden von gp34 und gp68 exprimieren.

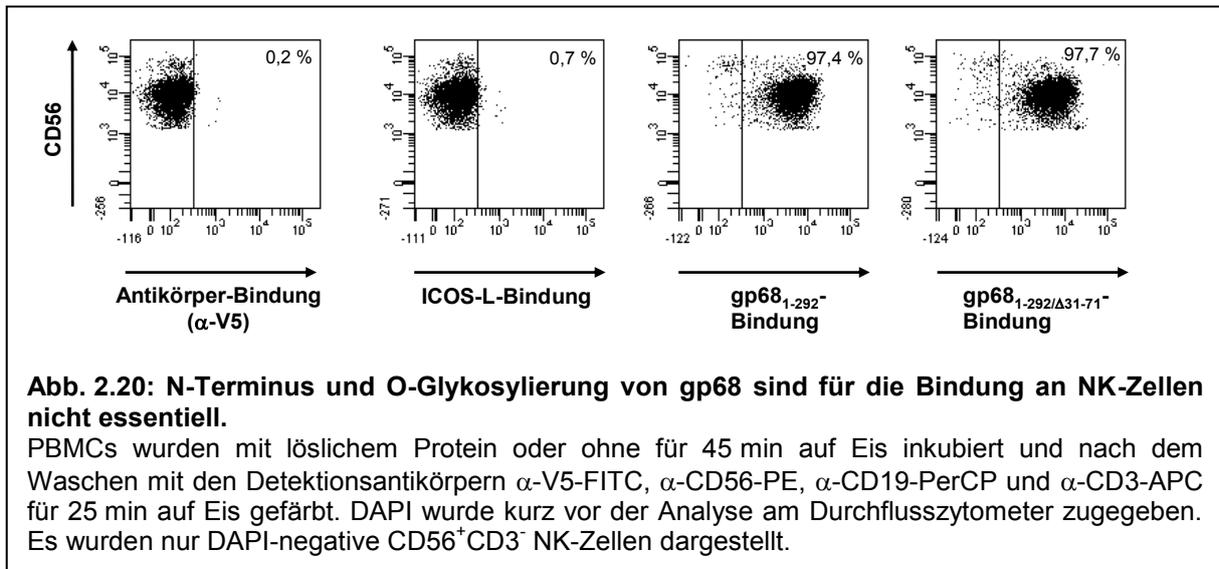


In den NK-Zellbindungsstudien sind deutlich zwei Populationen zu erkennen (s. auch Abb. 2.19), die wahrscheinlich die beiden NK-Zellhauptpopulation CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>bright</sup> (ca. 90 % aller NK-Zellen im Blut) und die CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>dim</sup> (ca. 10 % aller NK-Zellen im Blut) darstellen. Da für die NK-Zellfärbung von Donor #1 und #2 der gleiche Fluoreszenzfarbstoff für den CD16- sowie den CD56-Nachweis benutzt wurde, konnten die zuvor genannten NK-Zellpopulationen in diesen Färbungen nicht getrennt werden. Dies war jedoch in der NK-Zellfärbung von Donor #3 möglich, da in dieser nur der α-CD56-Antikörper (nicht CD16) eingesetzt wurde. Durch entsprechende *Gates* wurden die NK-Zellpopulationen (CD56<sup>dim</sup> und CD56<sup>bright</sup>) getrennt und in separaten Histogrammen auf Proteinbindung analysiert. Die viralen Fcγ-Rezeptoren binden an die gesamte CD56<sup>dim</sup> NK-Zellpopulation, da sich im entsprechenden Histogramm der gesamte Gipfel (*Peak*) der Population durch die Bindung von gp34 oder gp68 nach „rechts“ verschiebt (Abb. 2.19). Für die CD56<sup>bright</sup> NK-Zellpopulation konnte keine Bindung von gp34 nachgewiesen werden. Gp68-Bindung erfolgte nur an einen Teil dieser NK-Zellpopulation, deswegen entstehen zwei Kurven im Histogramm (Abb. 2.19).



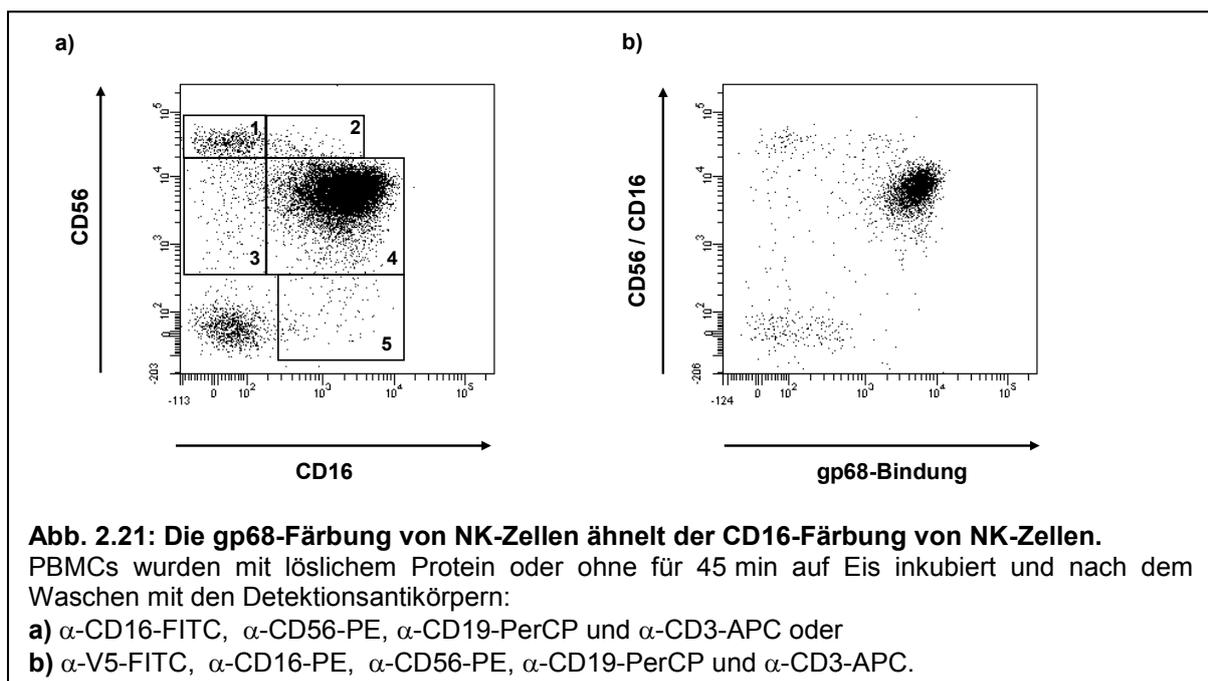
## 2.5.2 Die Bindung von gp68 an NK-Zellen ist unabhängig von der N-terminalen O-Glykosylierung von gp68

Gp34 und gp68 besitzen ein höchst unterschiedliches Bindungsverhalten an NK-Zellen. Ein auffälliger Unterschied beider Moleküle ist die starke O-Glykosylierung, die am N-Terminus des gp68-Moleküls jedoch nicht im gp34-Molekül zu finden ist. Die O-Glykosylierung könnte auch bei der Interaktion mit dem NK-Zellliganden eine wichtige Rolle spielen, und die starke Bindung von gp68 im Gegensatz zu gp34 an NK-Zellen vermitteln. Um diese Vermutung zu überprüfen wurden PBMCs mit gp68 (gp68<sub>1-292</sub>) oder der Mutante gp68<sub>1-292/Δ31-71</sub> inkubiert und durchflusszytometrisch untersucht. Der Vergleich der Färbungen zeigt keinen Unterschied in der Bindungsfähigkeit beider gp68-Moleküle (Abb. 2.20). Somit ist weder die Aminosäuresequenz (AS 31-71) selbst, noch ihre posttranslationale Modifikation (O-Glykosylierung), für die Bindung von gp68 an NK-Zellen notwendig.

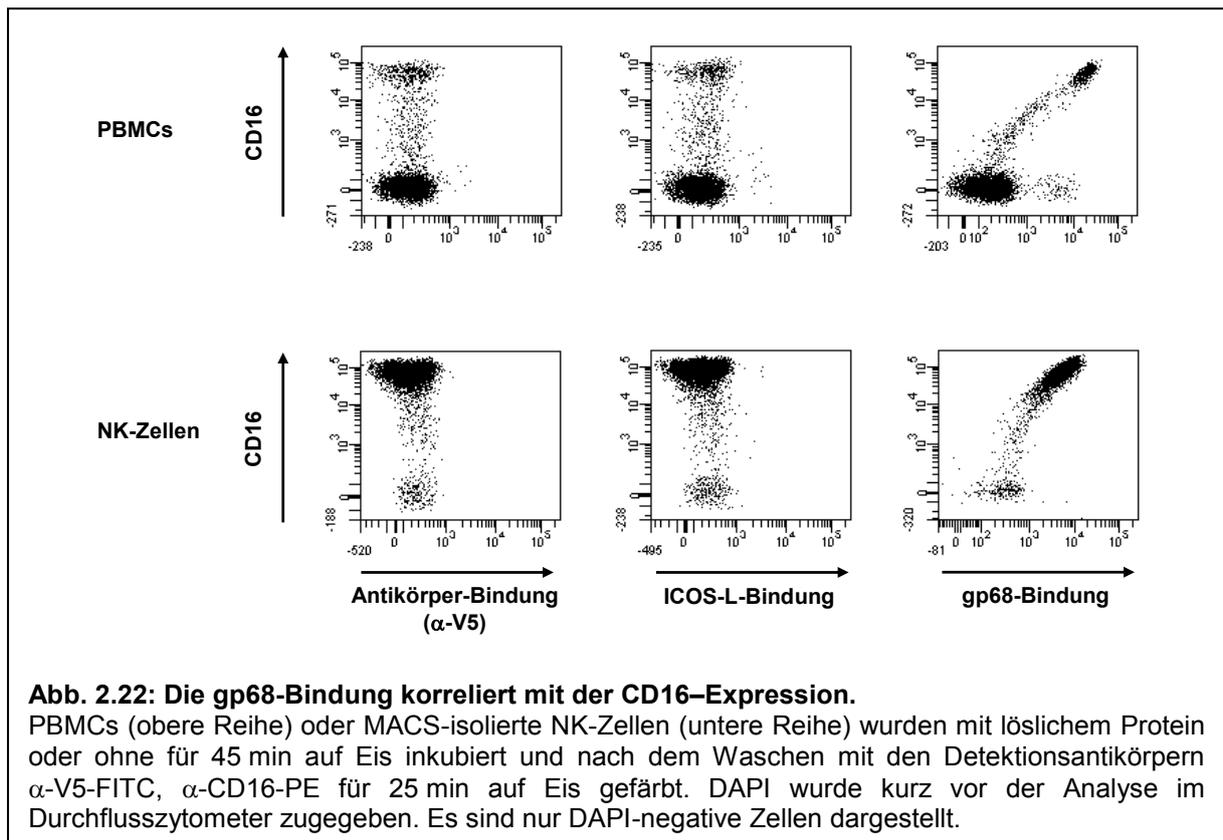


### 2.5.3 Die Bindung von gp68 an NK-Zellen korreliert mit der CD16-Expression

Wie bereits beschrieben, lassen sich die verschiedenen NK-Zellsubpopulationen im peripheren Blut anhand ihrer CD56- und CD16-Expression unterscheiden. Die Populationen lassen sich leicht in der Durchflusszytometrie darstellen. Es wurden in der Literatur bisher 5 verschiedene Subpopulationen beschrieben (Zimmer et al., 2005), die in einer entsprechenden durchflusszytometrischen Analyse (Abb. 2.21a) dargestellt wurden: (1) CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>, (2) CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>dim</sup>, CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>, (4) CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>bright</sup>, (5) CD56<sup>-</sup>CD16<sup>bright</sup>.



Bei der Gegenüberstellung einer CD56/ CD16-NK-Zell-Doppelfärbung und einer CD56 bzw. CD16/ gp68-Färbung fiel die Ähnlichkeit in der *Dot-Plot*-Darstellung auf (Abb. 2.21). Diese Ähnlichkeit ließ vermuten, dass alle NK-Zellen, die CD16 exprimieren, auch die NK-Zellen darstellen, die von gp68 bzw. gp34 gebunden werden. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurden PBMCs oder durch MACS-Separation isolierte NK-Zellen direkt in einer CD16/ gp68-Doppelfärbung durchflusszytometrisch analysiert. Dabei zeigte sich eine direkte Korrelation zwischen CD16 Expression und der gp68-Bindung (Abb. 2.22). Jede CD16-exprimierende Zelle wurde von gp68 gebunden, die Stärke der Bindung von gp68 korrelierte dabei positiv mit der Expressionsstärke von CD16. In der Proteinfärbung der PBMCs wurde zusätzlich eine CD16-negative Population von gp68 gebunden (Abb. 2.22 oben). Diese Population verschwindet nach der Isolierung der NK-Zellen, und repräsentiert damit die IgG<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> B-Zellsubpopulation, die als bindende Population bereits in Abschnitt 2.3.3.3 beschrieben wurde.

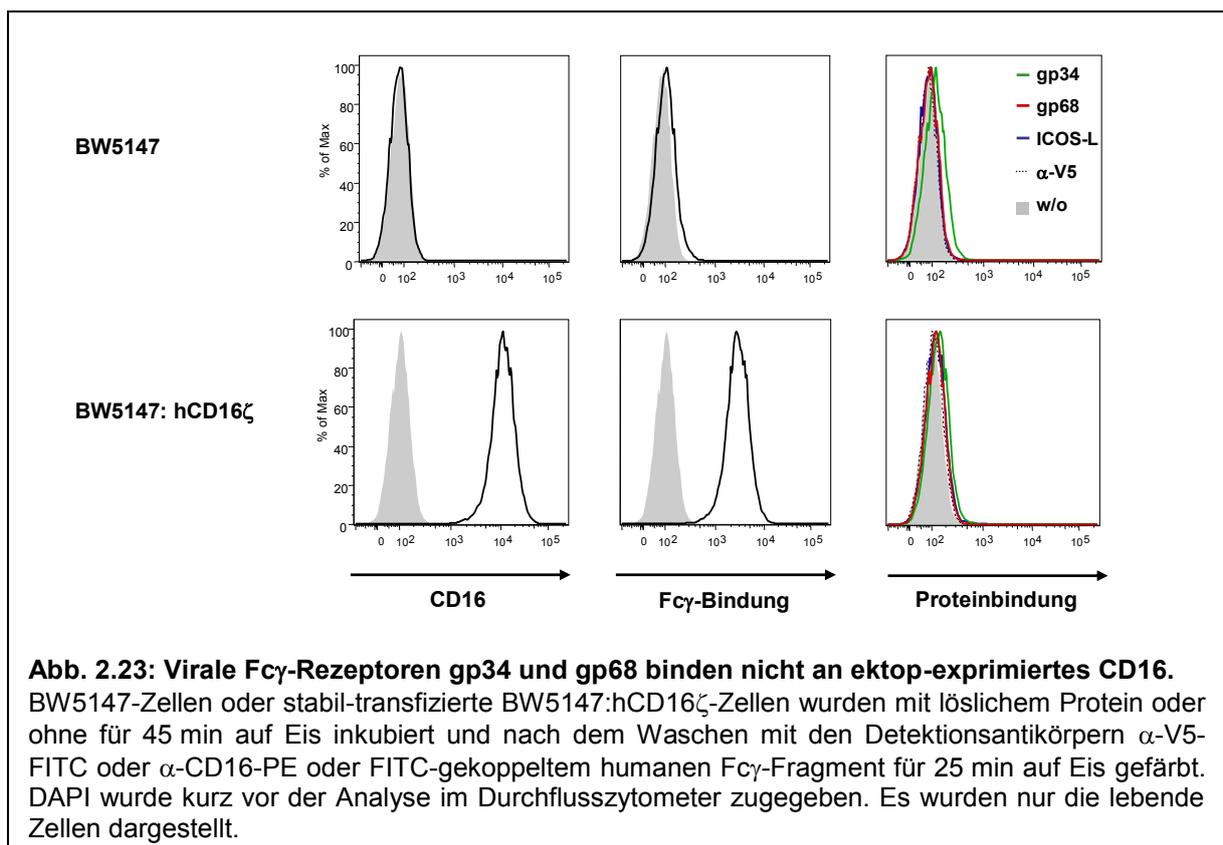


**Abb. 2.22: Die gp68-Bindung korreliert mit der CD16-Expression.**

PBMCs (obere Reihe) oder MACS-isolierte NK-Zellen (untere Reihe) wurden mit löslichem Protein oder ohne für 45 min auf Eis inkubiert und nach dem Waschen mit den Detektionsantikörpern  $\alpha$ -V5-FITC,  $\alpha$ -CD16-PE für 25 min auf Eis gefärbt. DAPI wurde kurz vor der Analyse im Durchflusszytometer zugegeben. Es sind nur DAPI-negative Zellen dargestellt.

## 2.5.4 CD16 allein ist nicht ausreichend für die Bindung von gp68 an NK-Zellen

Da die CD16-Expression positiv mit gp68-Bindung korreliert, sollte überprüft werden, ob CD16 selbst der Interaktionspartner für gp68 oder gp34 ist. Um CD16 als möglichen Liganden der Fc $\gamma$ -Rezeptoren zu bestätigen oder auszuschließen, sollte CD16 ektop (außerhalb von NK-Zellen) exprimiert und auf gp34- und gp68-Bindung getestet werden. Da im Labor bereits Transfektanten existierten, die stabil die Ektodomäne des zellulären Fc $\gamma$ -Rezeptors CD16 fusioniert mit der Transmembran- sowie Schwanzdomäne der murinen CD3- $\zeta$ -Kette exprimieren (Mandelboim et al., 2001a), wurden diese stabilen Transfektanten, für die Untersuchungen genutzt. Obwohl die Transfektanten sich durch eine hohe CD16-Expression auszeichnen, konnte keine Bindung von gp34 oder gp68 an diese Zellen nachgewiesen werden (Abb. 2.23).



**Abb. 2.23: Virale Fc $\gamma$ -Rezeptoren gp34 und gp68 binden nicht an ektop-exprimiertes CD16.**

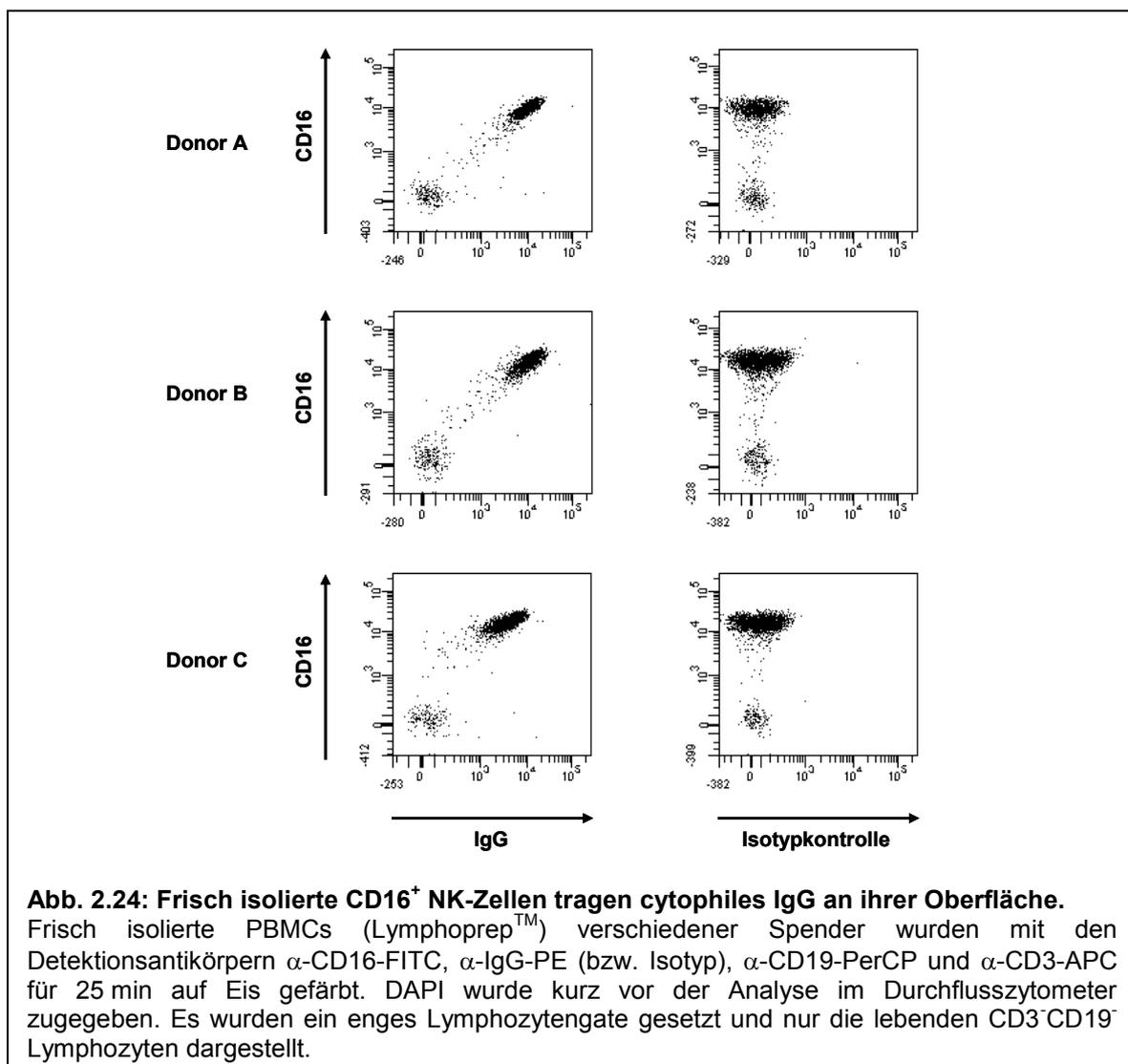
BW5147-Zellen oder stabil-transfizierte BW5147:hCD16 $\zeta$ -Zellen wurden mit löslichem Protein oder ohne für 45 min auf Eis inkubiert und nach dem Waschen mit den Detektionsantikörpern  $\alpha$ -V5-FITC oder  $\alpha$ -CD16-PE oder FITC-gekoppeltem humanen Fc $\gamma$ -Fragment für 25 min auf Eis gefärbt. DAPI wurde kurz vor der Analyse im Durchflusszytometer zugegeben. Es wurden nur die lebende Zellen dargestellt.

Die CD16-Expression ist also allein nicht hinreichend für die Bindung von gp34 oder gp68 an CD16<sup>+</sup> NK-Zellen. Das lässt vermuten, dass die viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren entweder an ein Molekül binden, dass auf der NK-Zelle mit dem CD16-Molekül ko-exprimiert wird, oder an

ein lösliches Molekül binden, welches sich an der Oberfläche frisch isolierter NK-Zellen befindet.

### 2.5.5 Cytophiles IgG vermittelt die Bindung von gp34 und gp68 an NK-Zellen

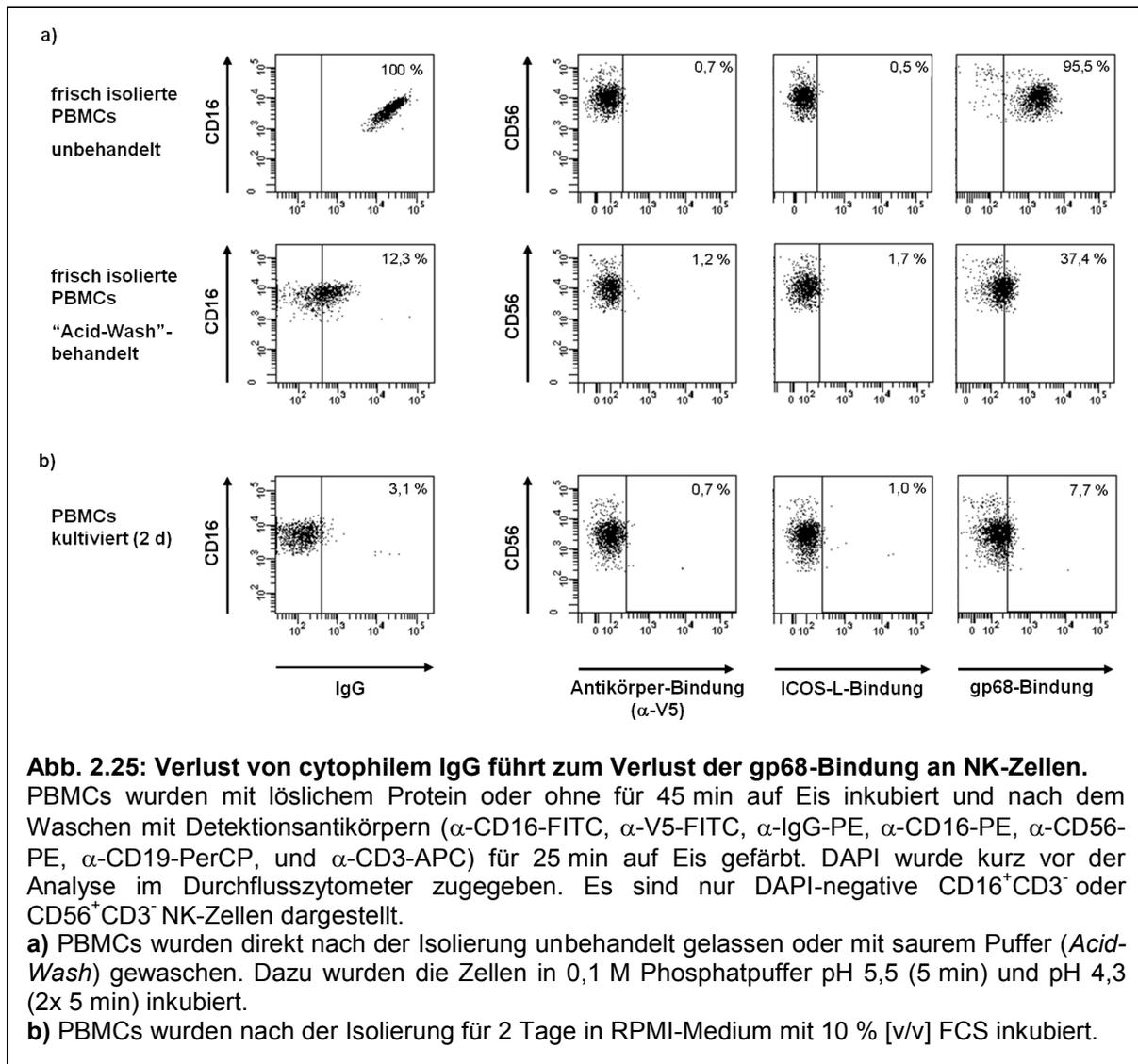
Bei dem CD16-Molekül handelt es sich um den Fc $\gamma$ RIIIA, der IgG-Bindung und ADCC von NK-Zellen vermittelt (Perussia et al., 1984; Unkeless et al., 1988). Trotz der niedrigen Affinität zu monomerem IgG ist beschrieben worden, dass frisch aus humanem Blut isolierte NK-Zellen mit IgG bedeckt sind (Sulica et al., 1982; Lanier et al., 1983). Dieses IgG wird auch als cytophiles IgG bezeichnet. Für frisch isolierte Blutzellen verschiedener Donoren wurde dies in einer einfachen CD16/IgG-Doppelfärbung und anschließender durchflusszytometrischen Analyse überprüft (Abb. 2.24).



**Abb. 2.24: Frisch isolierte CD16<sup>+</sup> NK-Zellen tragen cytophiles IgG an ihrer Oberfläche.**

Frisch isolierte PBMCs (Lymphoprep<sup>TM</sup>) verschiedener Spender wurden mit den Detektionsantikörpern  $\alpha$ -CD16-FITC,  $\alpha$ -IgG-PE (bzw. Isotyp),  $\alpha$ -CD19-PerCP und  $\alpha$ -CD3-APC für 25 min auf Eis gefärbt. DAPI wurde kurz vor der Analyse im Durchflusszytometer zugegeben. Es wurden ein enges Lymphozytengate gesetzt und nur die lebenden CD3<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup> Lymphozyten dargestellt.

Die Gegenüberstellung des IgGs und der CD16-Expression an der NK-Zelloberfläche zeigt eindeutig, dass IgG nur auf CD16<sup>+</sup>, nicht aber auf CD16<sup>-</sup> Zellen, nachweisbar ist. Cytophiles IgG bindet offenbar spezifisch an CD16<sup>+</sup> NK-Zellen. Dieses cytophile IgG könnte aufgrund der Fc-bindenden Eigenschaft von gp34 und gp68 deren Bindung an CD16<sup>+</sup> NK-Zellen vermitteln. Um diese Vermutung zu überprüfen, sollten NK-Zellen, bei denen das lösliche IgG von der Zelloberfläche gewaschen wurde, auf Bindung von gp34 und gp68 getestet werden. Mit dem sogenannten „Acid-Wash“, bei dem Zellen in sauren Puffern (pH-Werte zwischen 5,5 und 3,5) inkubiert und gewaschen werden, ist es möglich lösliche Bestandteile von Zelloberflächen wegzuwaschen. Der Verlust von löslichem IgG auf der NK-Zelloberfläche sollte dann zum Verlust der Bindung von gp34 und gp68 an NK-Zellen führen.



**Abb. 2.25: Verlust von cytophilem IgG führt zum Verlust der gp68-Bindung an NK-Zellen.**

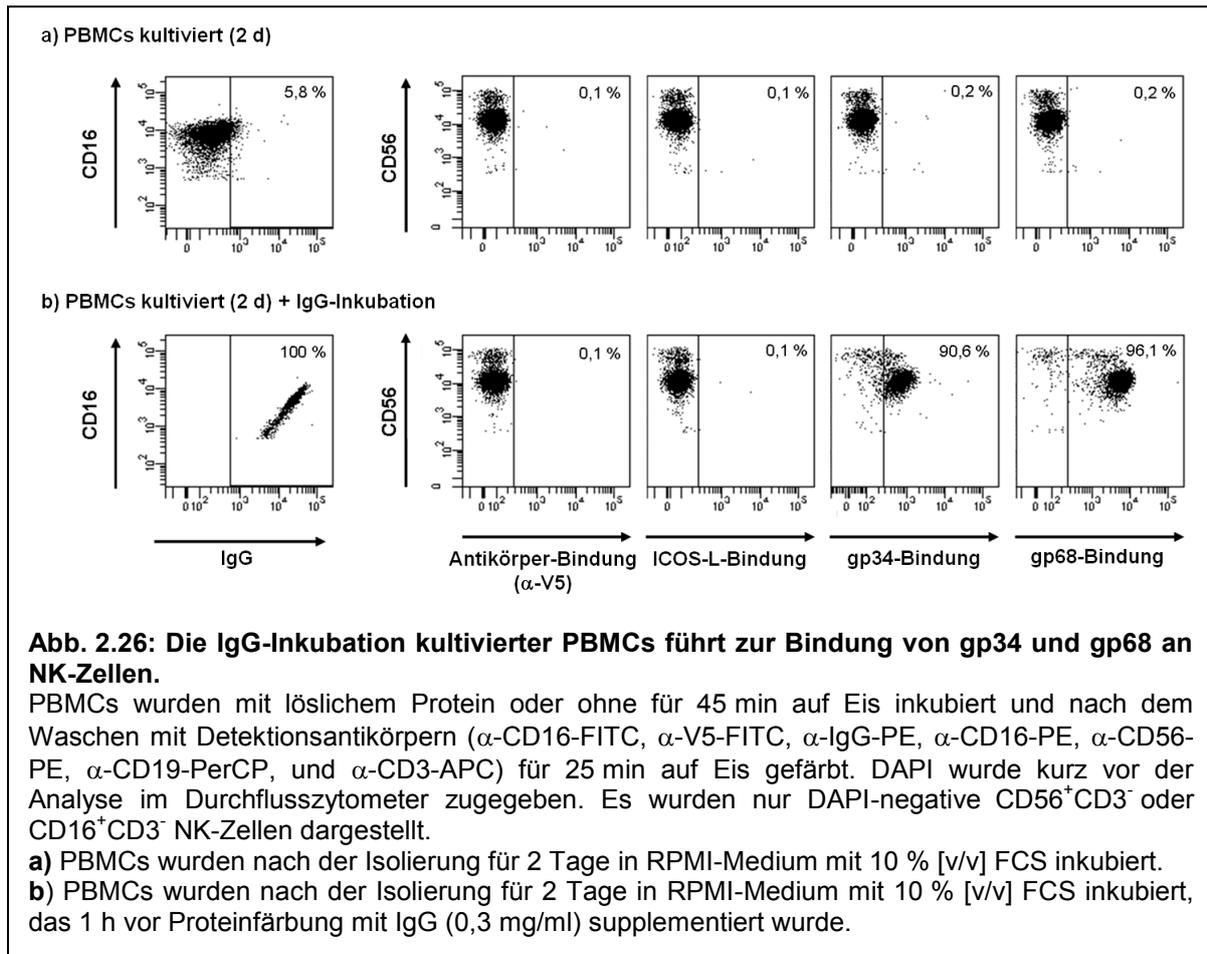
PBMCs wurden mit löslichem Protein oder ohne für 45 min auf Eis inkubiert und nach dem Waschen mit Detektionsantikörpern ( $\alpha$ -CD16-FITC,  $\alpha$ -V5-FITC,  $\alpha$ -IgG-PE,  $\alpha$ -CD16-PE,  $\alpha$ -CD56-PE,  $\alpha$ -CD19-PerCP, und  $\alpha$ -CD3-APC) für 25 min auf Eis gefärbt. DAPI wurde kurz vor der Analyse im Durchflusszytometer zugegeben. Es sind nur DAPI-negative CD16<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> oder CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> NK-Zellen dargestellt.

**a)** PBMCs wurden direkt nach der Isolierung unbehandelt gelassen oder mit saurem Puffer (*Acid-Wash*) gewaschen. Dazu wurden die Zellen in 0,1 M Phosphatpuffer pH 5,5 (5 min) und pH 4,3 (2x 5 min) inkubiert.

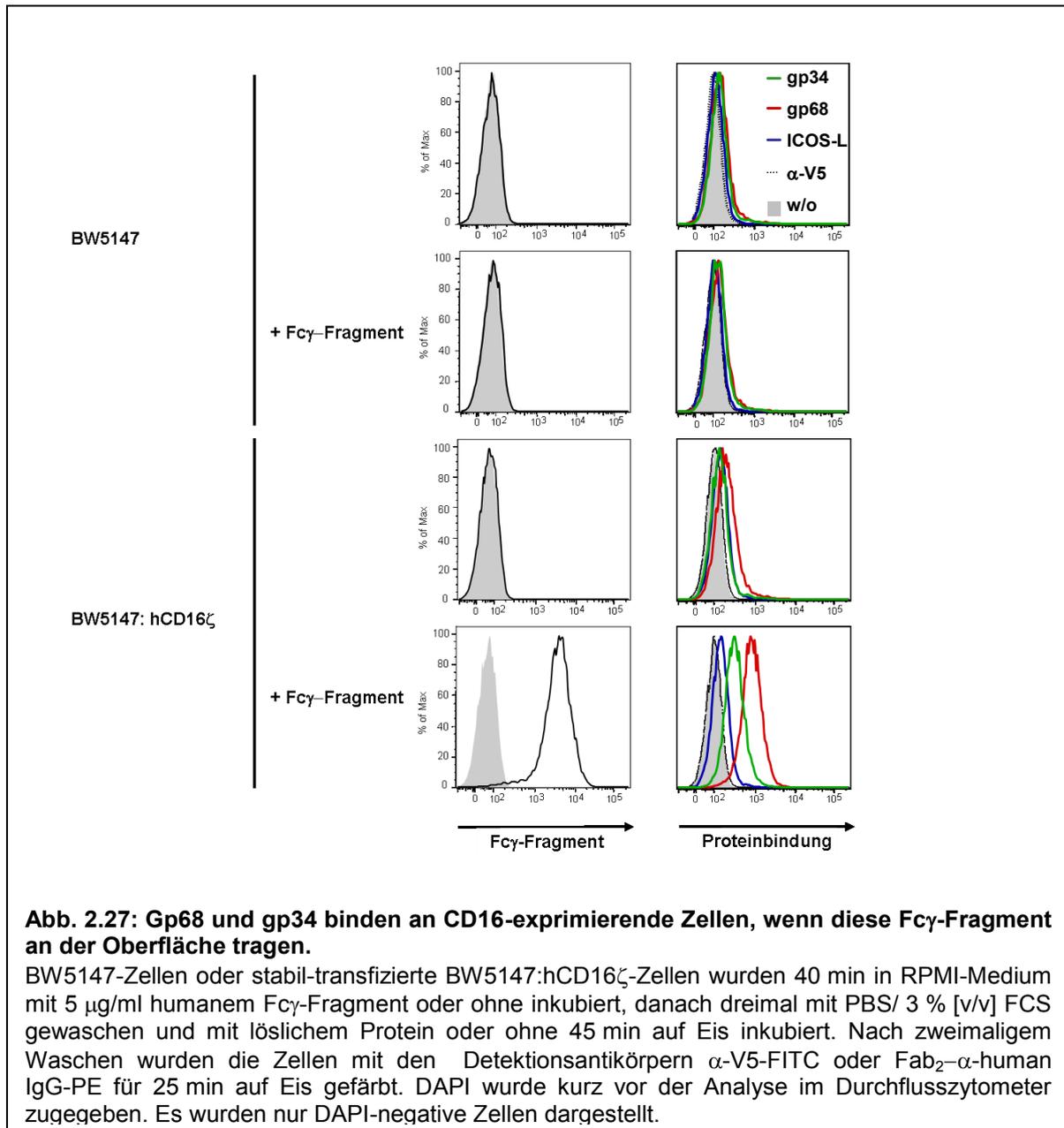
**b)** PBMCs wurden nach der Isolierung für 2 Tage in RPMI-Medium mit 10 % [v/v] FCS inkubiert.

Das auf unbehandelten frisch isolierten NK-Zellen nachgewiesene IgG konnte tatsächlich durch den „*Acid-Wash*“ stark reduziert werden (Abb. 2.25). Kultivierung der PBMCs über zwei Tage in RPMI-Medium mit 10 % [v/v] FCS führte ebenfalls zum Verlust des IgGs an der Zelloberfläche der NK-Zellen. Die Bindung des viralen Fc $\gamma$ -Rezeptors gp68 an NK-Zellen wurde stark durch den „*Acid-Wash*“ und die Kultivierung der Zellen beeinflusst. So konnte auf frischen NK-Zellen deutlich gp68-Bindung an NK-Zellen nachgewiesen werden, die jedoch kaum noch sichtbar war, nachdem die Zellen mit saurem Puffer behandelt wurden. Die Kultivierung der Zellen führte zu einem vollständigen Verlust der gp68-Bindung an die NK-Zellen.

Da der Verlust von IgG an der NK-Zelloberfläche zum Verlust der Bindung viraler Fc $\gamma$ -Rezeptoren führte, sollte eine Re-Inkubation IgG-freier NK-Zellen in IgG-haltigem Medium wieder zur Beladung von CD16 mit cytophilem IgG führen. Dieses IgG sollte dann die Bindung von gp34 und gp68 an NK-Zellen vermitteln können. Diese Hypothese wurde überprüft, indem kultivierte IgG-freie NK-Zellen für eine Stunde mit oder ohne IgG (human)-haltigem Medium auf 37 °C inkubiert und danach auf Bindung von löslichem gp34 und gp68 getestet wurden. In diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass IgG-Beladung der CD16<sup>+</sup> NK-Zellen zur Bindung viraler Fc $\gamma$ -Rezeptoren an NK-Zellen führt (Abb. 2.26). Auch unter diesen Bedingungen war, wie in allen vorangegangenen Experimenten, die gp68-Bindung wesentlich stärker als die gp34-Bindung (bezogen auf Fluoreszenzstärke).



Virale Fc $\gamma$ -Rezeptoren binden also an NK-Zellen, wenn diese cytophiles IgG an der Zelloberfläche tragen. Das cytophile IgG tritt nur auf CD16<sup>+</sup> NK-Zellen auf und vermittelt so die gp34- sowie gp68-Bindung. Dabei entsteht höchstwahrscheinlich ein Komplex aus zellulärem Fc $\gamma$ RIIIA (CD16), humanem IgG und viralem Fc $\gamma$ -Rezeptor. Dieser Komplex sollte NK-unabhängig mittels CD16-transfizierte Zellen reproduziert werden. Stabile CD16-exprimierenden Transfektanten BW5147:hCD16 $\zeta$  wurden mit humanem Fc $\gamma$ -Fragment und danach mit gp34 und gp68 inkubiert. Um zu zeigen, dass für die Bindung der Fc $\gamma$ -Rezeptoren (bzw. für die Bildung des Komplexes) nur der konstante Teil von IgG notwendig ist, wurde in dem durchgeführten Experiment nur humanes Fc $\gamma$ -Fragment und nicht das gesamte IgG-Molekül eingesetzt.



Wie auch schon zuvor gezeigt (Abb. 2.23) vermittelt CD16-Expression allein keine Bindung von gp34 und gp68 an die stabilen CD16-Transfektanten (Abb. 2.27). Auch Fc $\gamma$ -Fragment allein ohne CD16 (BW5147 inkubiert mit humanem Fc $\gamma$ -Fragment) ist nicht hinreichend. CD16-Expression und zusätzliche Inkubation der Zellen in Fc $\gamma$ -Fragment-haltigem Medium führte zur spezifischen Beladung der CD16<sup>+</sup> Transfektanten (BW5147:hCD16 $\zeta$ ) mit dem Fc $\gamma$ -Fragment und nur an diese Zellen konnte Bindung der viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren nachgewiesen werden.

### **Zusammenfassung: Gp34 und gp68 interagieren mit NK-Zellen.**

---

Durch die Analyse der gp34- bzw. gp68-Bindung an NK-Zellen mittels verschiedener Proteinfärbungen konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass

- 1) virale Fc $\gamma$ -Rezeptoren an CD16<sup>+</sup> NK-Zellen binden,
- 2) CD16-gebundenes cytophiles monomeres IgG die Bindung der viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren an die NK-Zelle vermittelt.

## 2.6 HCMV-kodierte Fc $\gamma$ -Rezeptoren und CD16- bzw. NK-

### Zellaktivierung

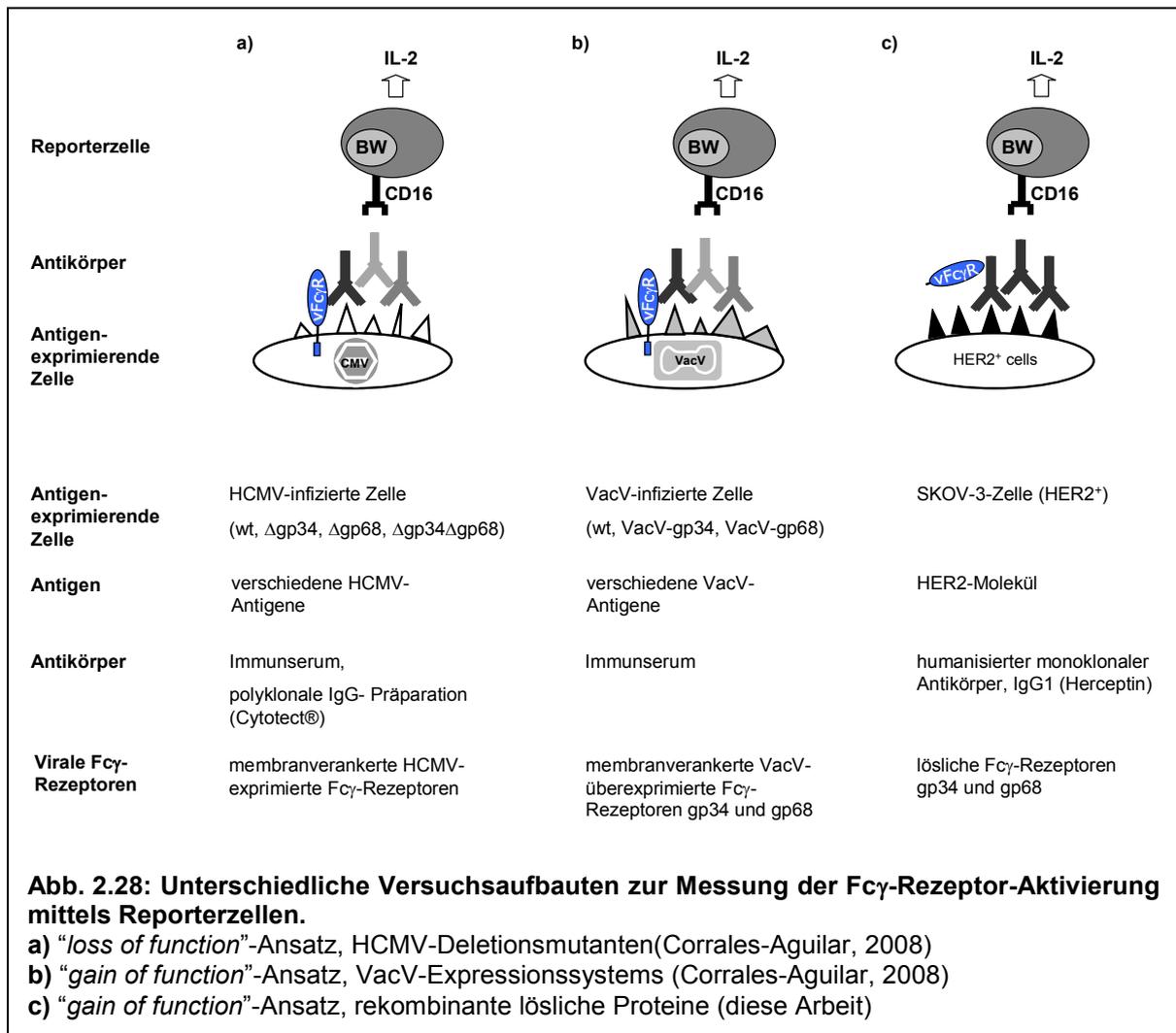
In den Bindungsanalysen mit den löslichen Fc $\gamma$ -Rezeptoren konnte die Interaktion von gp34 und gp68 mit NK-Zellen gezeigt werden. Diese Interaktion war abhängig von der CD16 (Fc $\gamma$ R1IA)-Expression der NK-Zelle und cytophilem IgG. In den folgenden Experimenten sollte die Wirkung von löslichem gp34 und gp68 auf die IgG-abhängige CD16- Aktivierung untersucht werden.

#### 2.6.1 Die HCMV-kodierten Fc $\gamma$ -Rezeptoren inhibieren die Antikörper-abhängige Aktivierung zellulärer Fc $\gamma$ -Rezeptoren

In der Doktorarbeit von Eugenia Corrales-Aguilar wurde die Inhibition zellulärer Fc $\gamma$ -Rezeptoren (CD16, CD32 und CD64) durch virale Fc $\gamma$ -Rezeptoren untersucht. Dazu wurden Reporterzellen (Fc $\gamma$ R- $\zeta$  BW5147-Transfektanten) hergestellt, welche chimäre Rezeptoren exprimieren, die sich aus der extrazellulären Fc-Bindungsdomäne der zellulären Fc $\gamma$ -Rezeptoren und ihrer Transmembrandomäne sowie der zytoplasmatischen Signaldomäne der CD3 $\zeta$ -Kette zusammensetzen. Antikörper-vermittelte Aktivierung der Rezeptoren führt zur NF-AT-Aktivierung und entsprechend zur Expression und Sekretion von murinem IL-2, das in einem IL-2-spezifischen ELISA quantifiziert werden kann (Abb. 2.28). Frau Corrales-Aguilar untersuchte u. a. den Einfluss der HCMV-kodierten Fc $\gamma$ -Rezeptoren auf die Antikörper-vermittelte Aktivierung dieser chimären Rezeptoren. Dazu wurde von ihr sowohl ein „*loss of function*“ (HCMV-Deletionsmutanten der viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren, Abb. 2.28a)- und „*gain of function*“ (Überexpression der viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren mittels rekombinanter VacV (*Vaccinia Virus*), Abb. 2.28b)-Ansatz verfolgt. In diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der Verlust der viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren zu einer erhöhten Antikörper-vermittelten Aktivierung, die Überexpression der viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren (gp34 und gp68) zu einer verminderten Aktivierung der Reporterzellen führt (Corrales-Aguilar, 2008).

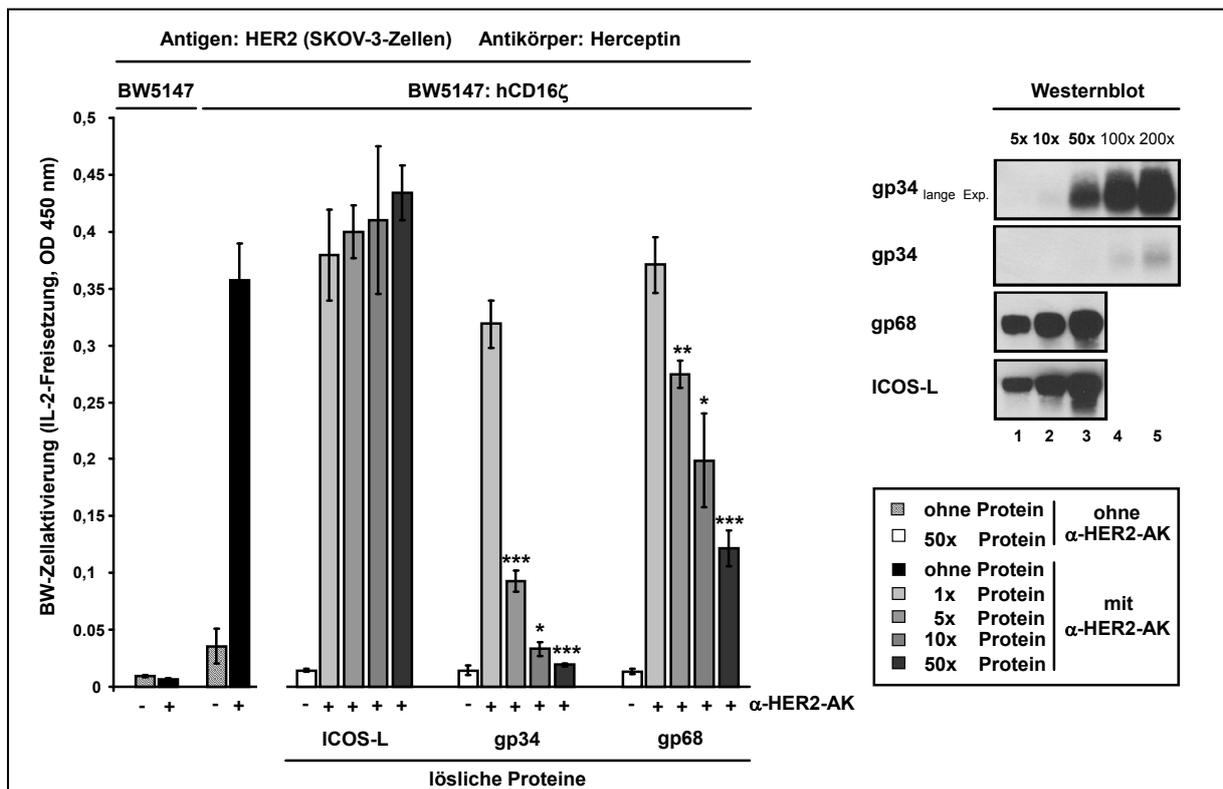
Die Aktivierung der Reporterzellen ist von der Menge der an der Zielzelle gebundenen Antikörper abhängig. Diese Opsonisierung selbst ist wiederum von den Antigenmenge und deren Qualität abhängig. Ein Nachteil des bisher benutzten Experimentalsystems war jedoch, dass Änderungen in der Antigenoberflächenexposition („*display*“) und der Antigenmenge zwischen den verschiedenen Virusmutanten und Antikörper-unabhängige Effekte auf die

Reporterzelle nicht vollständig ausgeschlossen werden konnten. Deswegen sollte ein Reporterzell-Experimentalsystem etabliert werden, in dem die Wirkung der viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren ohne die genannten Einschränkungen getestet werden konnte. Um die Infektion der Zielzelle mit verschiedenen Virusmutanten zu vermeiden, wurden die rekombinanten Proteine (gp34, gp68) eingesetzt. Durch den Einsatz eines monoklonalen Antikörpers wurde das System zusätzlich definiert. Dazu wurde in einem ersten Reporterzellassay mit rekombinanten Proteinen Herceptin® (Trastuzumab), ein humanisierter monoklonaler  $\alpha$ -HER2-Antikörper (IgG1-Subklasse), der an HER2-positive Zellen (hier: SKOV-3-Zelle, Ovarialkarzinom-Zelllinie) bindet, benutzt (s. Abb. 2.28c). Der Versuchsaufbau des Reporterzellassays wurde schematisch dargestellt und mit den von Frau Dr. Corrales-Aguilar benutzten Systemen verglichen (Abb. 2.28).



## 2.6.2 Lösliche HCMV-kodierte Fc $\gamma$ -Rezeptoren inhibieren die Antikörper-abhängige CD16-Aktivierung

Um die Wirkung der löslichen Fc $\gamma$ -Rezeptoren gp34 und gp68 auf die Antikörper-vermittelte CD16-Aktivierung zu untersuchen, wurden Herceptin-opsonisierte SKOV-3-Zellen mit den löslichen Proteinen und der Reporterzelllinie BW5147:hCD16 $\zeta$  inkubiert. Das sezernierte IL-2 wurde per ELISA photometrisch quantifiziert. Die ermittelten OD-Werte (450 nm) wurden verglichen. Zur Kontrolle wurden untransfizierte BW5147-Zellen mitgeführt, die weder durch SKO-V-3-Zellen allein, noch durch Herceptin-opsonisierte SKOV-3-Zellen aktiviert wurden und somit auch kein IL-2 freisetzen. Die CD16-exprimierenden Reporterzellen BW5147:hCD16 $\zeta$ -Zellen ließen sich hingegen durch Herceptin-dekorierte SKOV-3-Zellen, aber nicht durch undekorierte SKOV-3-Zellen, aktivieren (Abb.2.29).

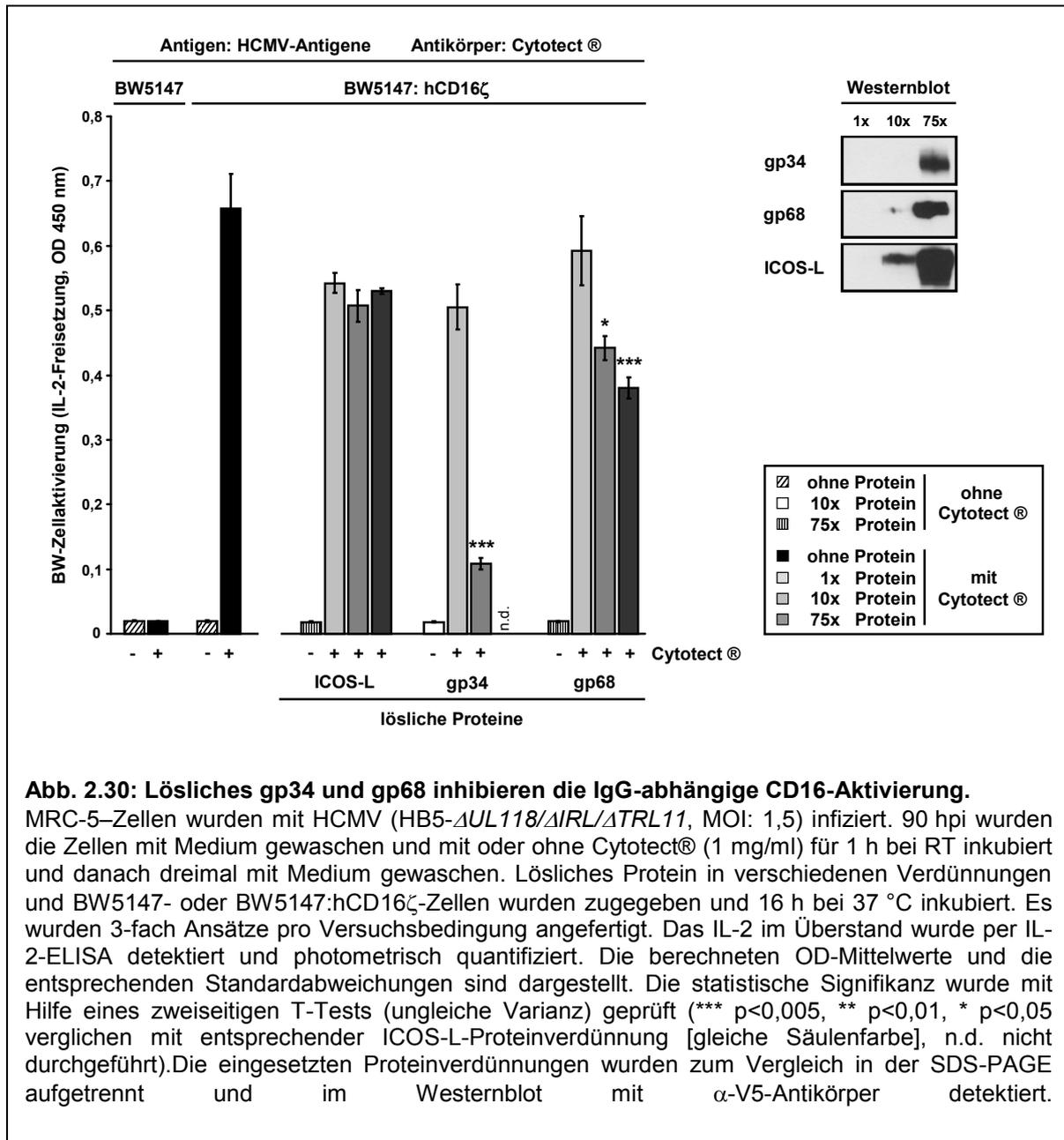


**Abb. 2.29: Lösliches gp34 und gp68 inhibieren die IgG1-abhängige CD16-Aktivierung.**

SKOV-3-Zellen (in 96 wells angelegt) wurden mit oder ohne  $\alpha$ -HER2-AK (0,1  $\mu$ g/ml) für 40 min bei RT inkubiert, danach dreimal mit Medium gewaschen. Verschiedene Verdünnungen löslicher Proteine und BW5147- oder BW5147:hCD16 $\zeta$ -Zellen wurden zugegeben und 16 h bei 37 °C inkubiert. Es wurden 3-fach Ansätze pro Versuchsbedingung angefertigt. Der Überstand wurde per IL-2-ELISA gemessen. Die berechneten OD-Mittelwerte und die entsprechenden Standardabweichungen sind dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe eines zweiseitigen T-Tests (ungleiche Varianz) geprüft. (\*\*\*)  $p < 0,005$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$  verglichen mit entsprechender ICOS-L-Proteinverdünnung [gleiche Säulenfarbe]. Die eingesetzten (Spuren: 1-3) und zusätzlichen (Spuren: 4; 5) Proteinverdünnungen wurden zum Vergleich in der SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot mit  $\alpha$ -V5-Antikörper detektiert.

Die Zugabe von rekombinantem gp34 oder gp68 führt zur signifikanten Inhibition der Antikörper-abhängigen Aktivierung von CD16. Dabei korrelierte die zugegebene Menge des Proteins positiv mit der Stärke der Inhibition. Der ICOS-L, für den in den Bindungsstudien keine Interaktion mit NK-Zellen nachgewiesen werden konnte, ist hier, wie erwartet, nicht fähig, die Antikörper-vermittelte CD16-Aktivierung zu beeinträchtigen. Die Mengen der im Assay eingesetzten Proteine wurden im Westernblot verglichen. Dabei wurde deutlich, dass wesentlich geringere Mengen von gp34 im Vergleich zu gp68 für die Inhibition ausreichend waren.

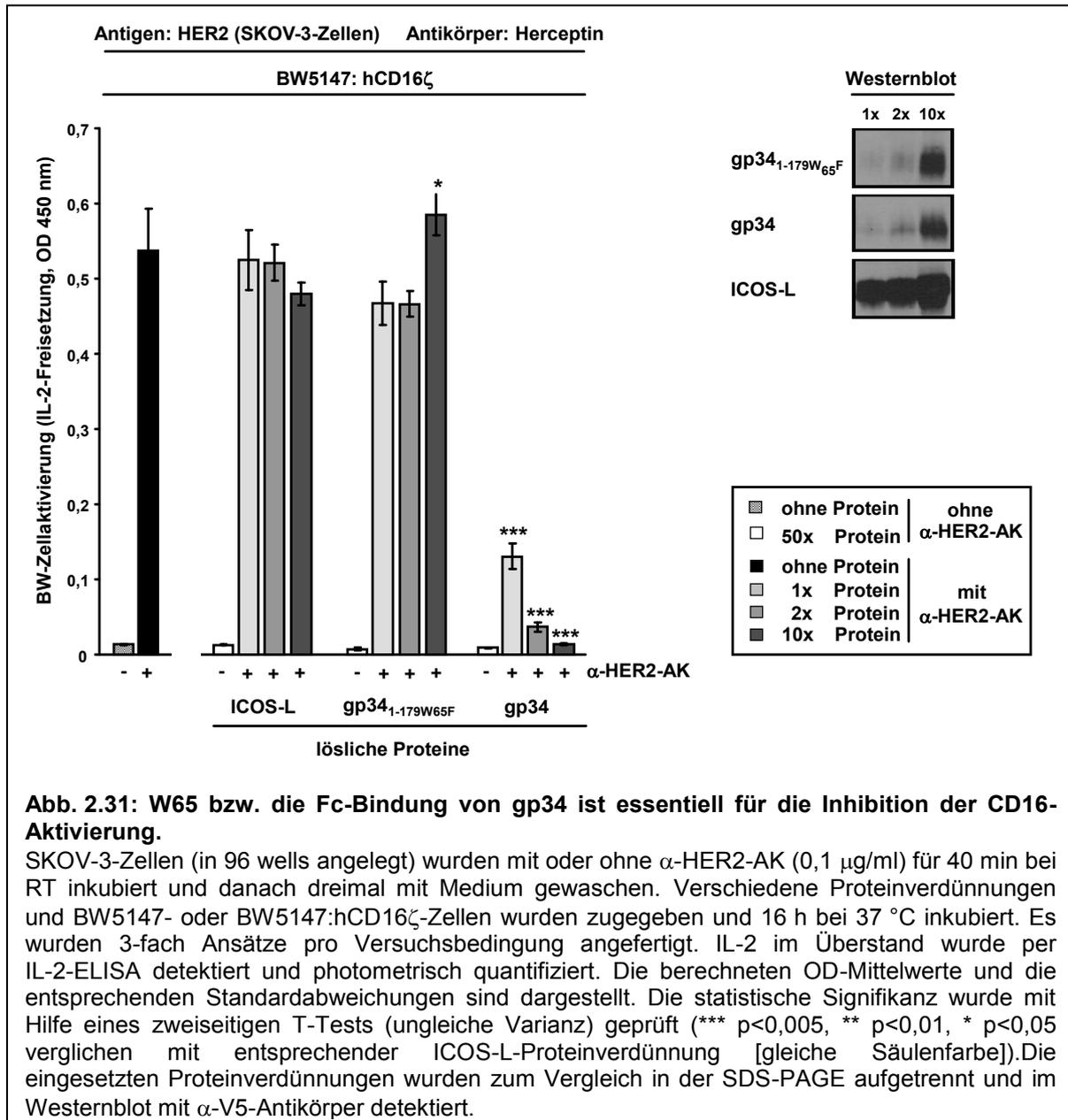
Die monoklonale Antikörperpräparation Herceptin® besteht nur aus einer einzigen IgG-Subklasse, nämlich IgG1. Der zelluläre Fc $\gamma$ -RezeptorIII (CD16) kann aber nicht nur IgG1, sondern auch IgG3 und mit niedriger Affinität auch IgG4 und IgG2 binden (Bruhns et al., 2009). In einem weiteren Experiment sollte deshalb die inhibitorische Wirkung der viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren gegen eine IgG-Präparation getestet werden, deren Subklassenverteilung der IgG-Verteilung im Blut entspricht. Dazu wurde die HCMV-Hyper-Immunglobulinpräparation Cytotect® verwendet, die hauptsächlich in der Transplantationsmedizin zur Vermeidung von Infektionen mit HCMV eingesetzt wird. Das Reporterzellassay wurde wie folgt aufgebaut: MRC-5 Fibroblasten wurden mit der HCMV-Deletionsmutante HB5- $\Delta$ *AUL118*/ $\Delta$ *AIRL*/ $\Delta$ *ATRL11* infiziert und 90 hpi für 1 h bei 37 °C mit Cytotect® inkubiert. Nicht-gebundene Antikörper wurden gewaschen und die löslichen Proteine sowie die Reporterzelllinie BW5147:hCD16 $\zeta$  zugegeben. Die CD16-Aktivierung (respektive IL-2-Produktion) durch die Reporterzellen wurde anschließend bestimmt. Eine Aktivierung erfolgte nur in Anwesenheit von Antikörper (Cytotect®) und Antigen (HCMV-infizierten Zellen). Infizierte Zellen allein waren nicht ausreichend für eine Aktivierung der Reporterzellen. Auch in diesem Versuchsaufbau konnte die CD16-Aktivierung durch lösliches gp34 bzw. gp68 signifikant inhibiert werden. Die inhibitorische Wirkung von gp34 war auch in diesem System deutlich stärker als die von gp68. Der ICOS-L hatte wie erwartet keine inhibitorische Wirkung.



In beiden Experimentalsystemen (Abb. 2.29 und 2.30) konnte erstmalig gezeigt werden, dass rekombinant-hergestellte lösliche virale Fcγ-Rezeptoren (gp34, gp68) Antikörper-vermittelte CD16-Aktivierung inhibieren können. Dabei stellte sich gp34 (zumindest im löslichen Zustand) als der potentere Inhibitor heraus. Gp34 und gp68 sind also unabhängig von der HCMV-Infektion hinreichend für eine Inhibition des zellulären Fcγ-Rezeptors CD16.

### 2.6.3 Die Fc-bindende Eigenschaft von gp34 ist notwendig für die Inhibition der Antikörper-abhängigen CD16-Aktivierung

Um zu prüfen, ob die Fc-bindende Eigenschaft der viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren essentiell für die Inhibition der CD16-Aktivierung ist, wurde die Wirkung der nicht-Fc-bindenden Tryptophanmutante von gp34 (gp34<sub>1-179W65F</sub>) in dem Reporterzellassay getestet. Herceptin-opsonierte SKOV-3-Zellen dienten erneut zur Aktivierung der BW5147:hCD16 $\zeta$ -Zellen.



Lösliches gp34 und die entsprechende lösliche Tryptophanmutante wurden in gleichen Mengen in dem Reporterzellsystem getestet. Die Aktivierung der Reporterzellen in Anwesenheit der beiden gp34-Proteine wurde verglichen. Um gleiche Proteinmengen zu

garantieren, wurden die eingesetzten Proteine im Westernblot verglichen. Die gp34-Mutanten wurden in gleichen Mengen, das ICOS-L-Protein im Überschuss im Experiment eingesetzt. Durch die Zugabe von Fc-bindenden löslichen gp34 konnte, wie erwartet, die Antikörpervermittelte Aktivierung von CD16 dosisabhängig inhibiert werden. Die nicht-Fc-bindende gp34-Tryptophanmutante und der ICOS-L konnten CD16 hingegen nicht inhibieren (Abb. 2.31). Bei der höchsten gp34<sub>1-179W65F</sub>-Proteinkonzentration war eine leichte Aktivierung von CD16 zu erkennen, diese konnte allerdings in nachfolgenden Experimenten nicht bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Die angegebene schwache Signifikanz konnte außerdem nur im Vergleich mit der höchsten ICOS-L-Proteinkonzentration, aber nicht im Vergleich zu den niedrigeren ICOS-L-Konzentrationen, nachgewiesen werden.

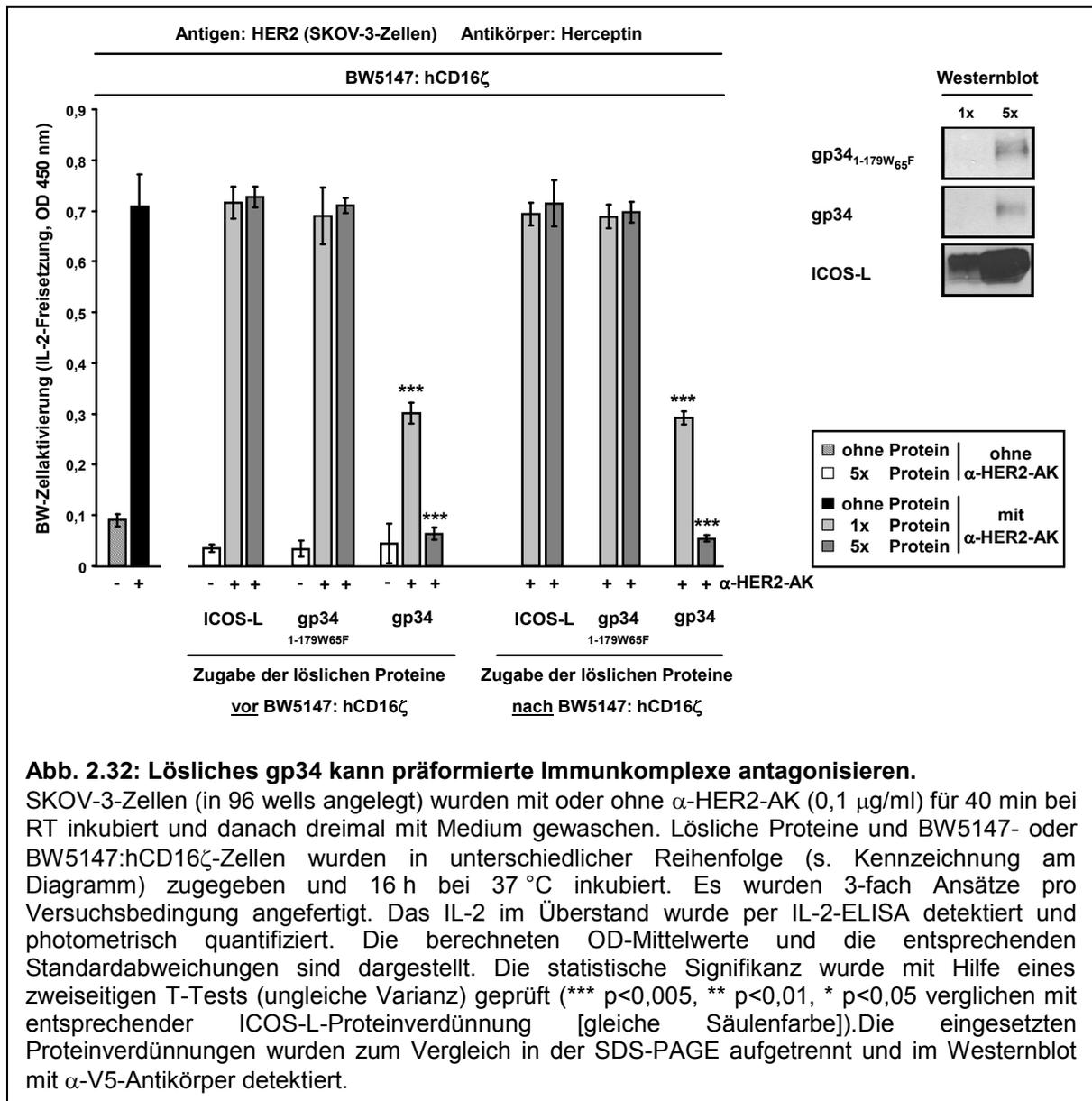
Mit diesem Experiment konnte somit zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Fc-bindende Eigenschaft von gp34 für die Inhibition der CD16-Aktivierung essentiell ist.

### **2.6.4 Gp34 benötigt keine Prä-Inkubation mit dem Antigen-Antikörper-Komplex um die CD16-Aktivierung inhibieren zu können**

Die CD16-Aktivierung erfolgt durch Bindung von IgG-Immunkomplexen. Da die Fc-bindende Funktion von gp34 Voraussetzung für die Inhibition der CD16-Aktivierung ist, konkurriert möglicherweise die gp34-Fc-Interaktion mit der CD16-Fc-Aktivierung. In den von Frau Dr. Corrales-Aguilar durchgeführten Reporterzelleexperimenten waren die viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren schon während der Antikörper-Inkubation, also bei der Bildung des Antigen-Antikörper-Immunkomplexes präsent, konnten demnach in dieser Zeit bereits an den Immunkomplex bzw. Antikörper binden. Die Reporterzellen mit dem zellulären Fc $\gamma$ -Rezeptor (z. B. CD16) wurden jedoch erst nach der Antikörper-Inkubation zugegeben. Die viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren wurden in diesen Experimentalsystemen sozusagen mit dem Immunkomplex präinkubiert. Durch den Einsatz löslicher viraler Fc $\gamma$ -Rezeptoren konnte das Reporterzellsystem so optimiert werden, dass die viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren erst nach der Immunkomplexbildung (Antikörpervorinkubation) kurz vor der Zugabe der Reporterzellen zugegeben wurden. In den zuvor geschilderten Experimenten konnte bei dieser Vorgehensweise signifikante Inhibition der CD16-Aktivierung durch virale Fc $\gamma$ -Rezeptoren gezeigt werden. Um zu überprüfen, ob die Inhibition der CD16-Aktivierung auch von einer sehr kurzen Präinkubation von gp34 mit den Immunkomplexen unabhängig ist (Zugabe der löslichen Proteine kurz vor Zugabe der Reporterzellen), sollte in einem Experiment die

## Ergebnisse

Pipettierreihenfolge so verändert werden, dass die Zugabe der Reporterzellen zu den Herceptin-opsonisierten SKOV-3-Zellen vor der Zugabe der löslichen Proteine erfolgte.



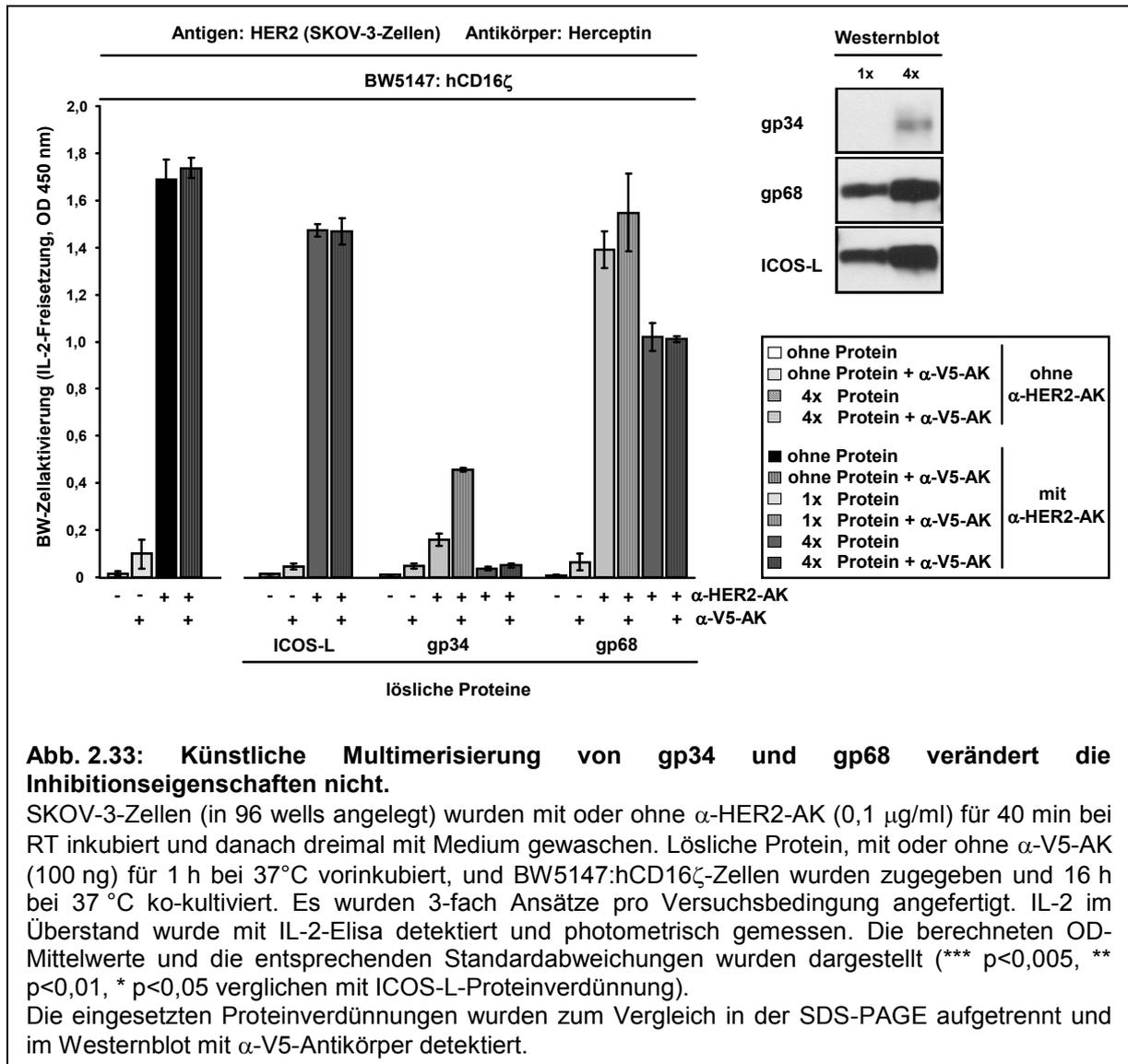
Im direkten Vergleich der beiden Experimentalsysteme konnte jedoch kein Unterschied in der Inhibition der CD16-Aktivierung durch gp34 detektiert werden. In beiden Ansätzen konnte gp34 signifikant die CD16-Aktivierung inhibieren, gp34<sub>1-179W65F</sub> und ICOS-L konnten dies wie in den vorangegangenen Experimenten nicht. Zusätzlich wurden die OD-Mittelwerte der jeweiligen gp34-Proteinkonzentration in beiden Experimentalansätzen verglichen und ebenfalls auf signifikante Unterschiede überprüft, dabei ließen sich aber keine signifikanten

Unterschiede feststellen. Die Inhibition der CD16-Aktivierung durch gp34 unterschied sich also nicht in den verschiedenen Ansätzen.

Gp34 benötigt somit keine Vorinkubation mit dem Immunkomplex, um inhibitorisch auf die Antikörper-abhängige CD16-Aktivierung wirken zu können.

### **2.6.5 Die Vernetzung von gp68-Molekülen führt nicht zu einer verstärkten Inhibition der CD16-Aktivierung**

Gp34 bildet im Gegensatz zu gp68 Homooligomere (Reinhard, 2008). Henrike Reinhard konnte zuvor durch zielgerichtete Mutation aller Cysteine in der gp34-Mutante gp34(24-140)-Flag die Homodimerisierung bzw. -oligomerisierung des Moleküls verhindern. Die gp34-Monomere wurden allerdings als sehr instabil beschrieben, so dass diese gp34-Mutante nicht für die Untersuchungen im hier beschriebenen Experimentalsystem herangezogen werden konnten. Gp68 bildet keine Homodimere bzw. -oligomere. Um lösliches gp68 zu vernetzen (*crosslinking*) und dadurch möglicherweise die Inhibitionsfähigkeit zu erhöhen, sollte das Protein künstliche mit einem  $\alpha$ -V5-AK, der das C-terminal-angehangene V5-Epitop des rekombinanten Proteins bindet, vernetzt werden. Aufgrund der Bivalenz von IgG-Antikörpern sollte diese Inkubation zur Aggregation von gp68 führen. Die löslichen Proteine wurden also mit oder ohne  $\alpha$ -V5-AK vorinkubiert und danach bezüglich der Inhibition der CD16-Aktivierung durch Herceptin-opsonierten SKOV-3-Zellen getestet. In diesem Experimentalsystem konnte keine Verstärkung des inhibitorischen Effekts von gp34 oder gp68 auf die CD16-Aktivierung durch Zugabe von vernetzenden Antikörpern nachgewiesen werden.



## 2.6.6 Die löslichen viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren inhibieren ADCC von NK-Zellen

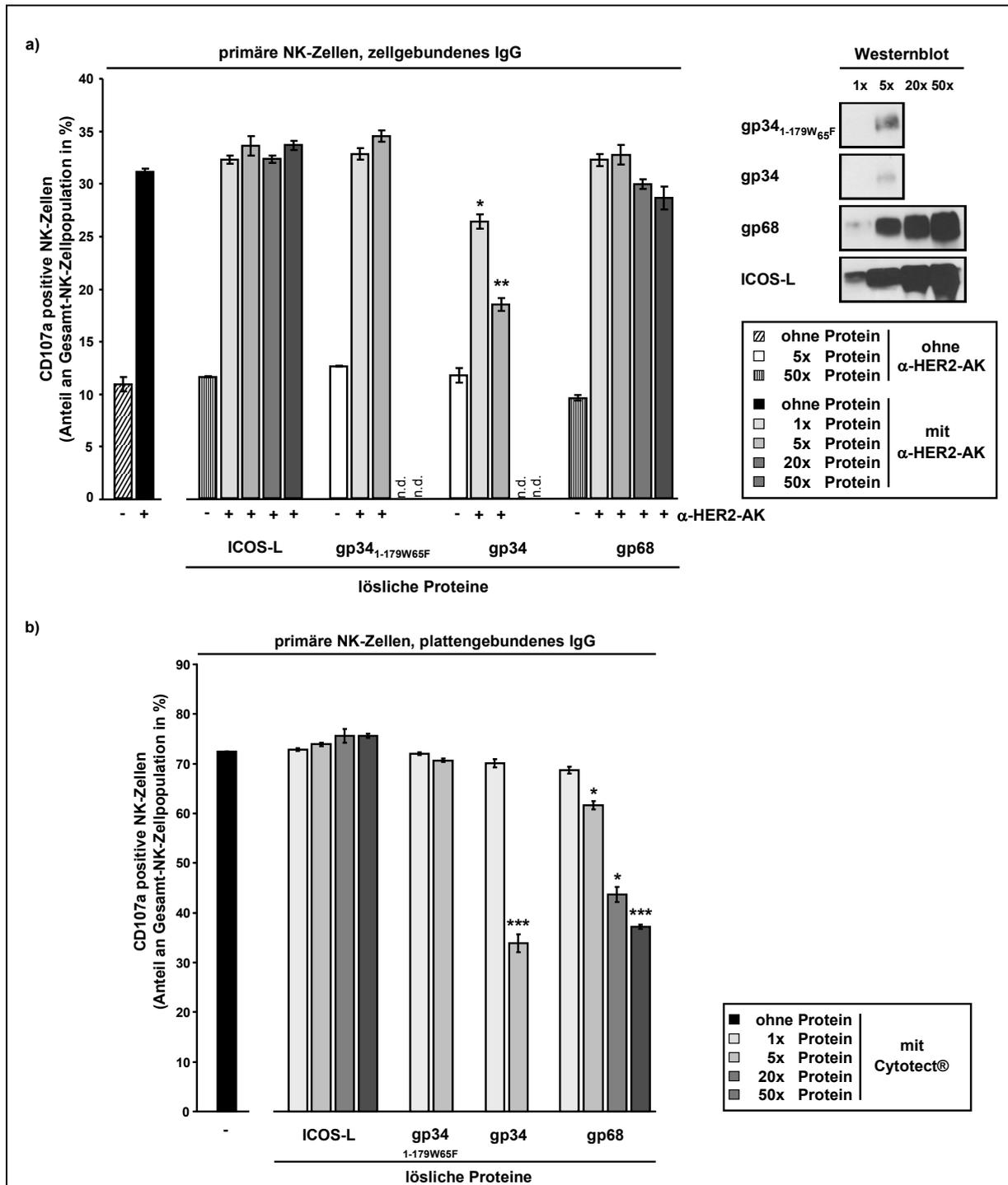
Die Funktion der viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren, die im Reporterassay nachgewiesen werden konnte, sollte nun auf Fc $\gamma$ -Rezeptor-tragenden primären Immunzellen, wie z. B. NK-Zellen, übertragen werden. Die Antikörper-vermittelte Aktivierung des Fc $\gamma$ -RIIIA (CD16A) auf NK-Zellen führt zur Aktivierung der NK-Zelle und u. a. auch zur Ausschüttung von in Granula gespeichertem zytotoxischem Granzym B und Perforin. In der Granulamembran ist das CD107a (Lamp-1, *Lysosomal-associated membrane protein 1*)-Protein eingelagert. Bei der Degranulation der NK-Zelle fusioniert die Granulamembran mit der Zellmembran, Granzym B und Perforin werden ausgeschüttet, das CD107a-Molekül tritt an die NK-Zelloberfläche und kann damit in der Durchflusszytometrie extrazellulär nachgewiesen

werden. Die Menge der CD107a-Moleküle korreliert direkt mit der Degranulation und der Zytotoxizität der NK-Zelle, deshalb wird CD107a als Aktivitätsmarker für NK-Zellen verwendet (Alter et al., 2004).

Um die Inhibition NK-Zell-ADCC durch die löslichen viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren gp34 und gp68 zu testen, wurden primäre NK-Zellen aus dem Blut freiwilliger Spender isoliert und mit löslichen viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren und Antikörper opsonisierten Zellen bzw. an eine Zellkulturplatte adsorbiertem IgG für 2-4 h inkubiert. Die NK-Zellen wurden nach der Ko-Kultivierung bezüglich der CD107a-Oberflächenmenge per Durchflusszytometrie überprüft. Die Anzahl der degranulierten CD107a<sup>+</sup> NK-Zellen bezogen auf die NK-Zellgesamtzahl ist dargestellt (Abb. 2.34). Die eingesetzten Proteinmengen wurden wie immer im Westernblot vergleichend dargestellt.

In beiden Experimentalansätzen (Platten- oder Zell-gebundenes IgG) konnte eine signifikante Inhibition der NK-Zellaktivierung durch lösliches gp34 gezeigt werden (Abb. 2.34a und b). Die nicht-Fc-bindende gp34-Mutante (gp34<sub>1-179W65F</sub>) konnte die NK-Zellaktivierung nicht inhibieren. Auch die Zugabe von löslichem ICOS-L hatte keine Auswirkungen auf die NK-Zellaktivierung. Lösliches gp68 konnte IgG1(Herceptin)-vermittelte NK-Zellaktivierung nicht signifikant inhibieren, obwohl ein Trend zur Inhibition festzustellen war. Im Gegensatz dazu konnte gp68 aber die Aktivierung der NK-Zelle durch die Gesamt-IgG-Präparation (Cytotect®) signifikant inhibieren. Dieser gp68-Phänotyp wurde in allen NK-Zellexperimenten dieser Art reproduziert.

Hiermit wurde zum ersten Mal die Inhibition von ADCC von NK-Zellen durch lösliche Fc $\gamma$ -Rezeptoren gp34 und gp68 nachgewiesen.



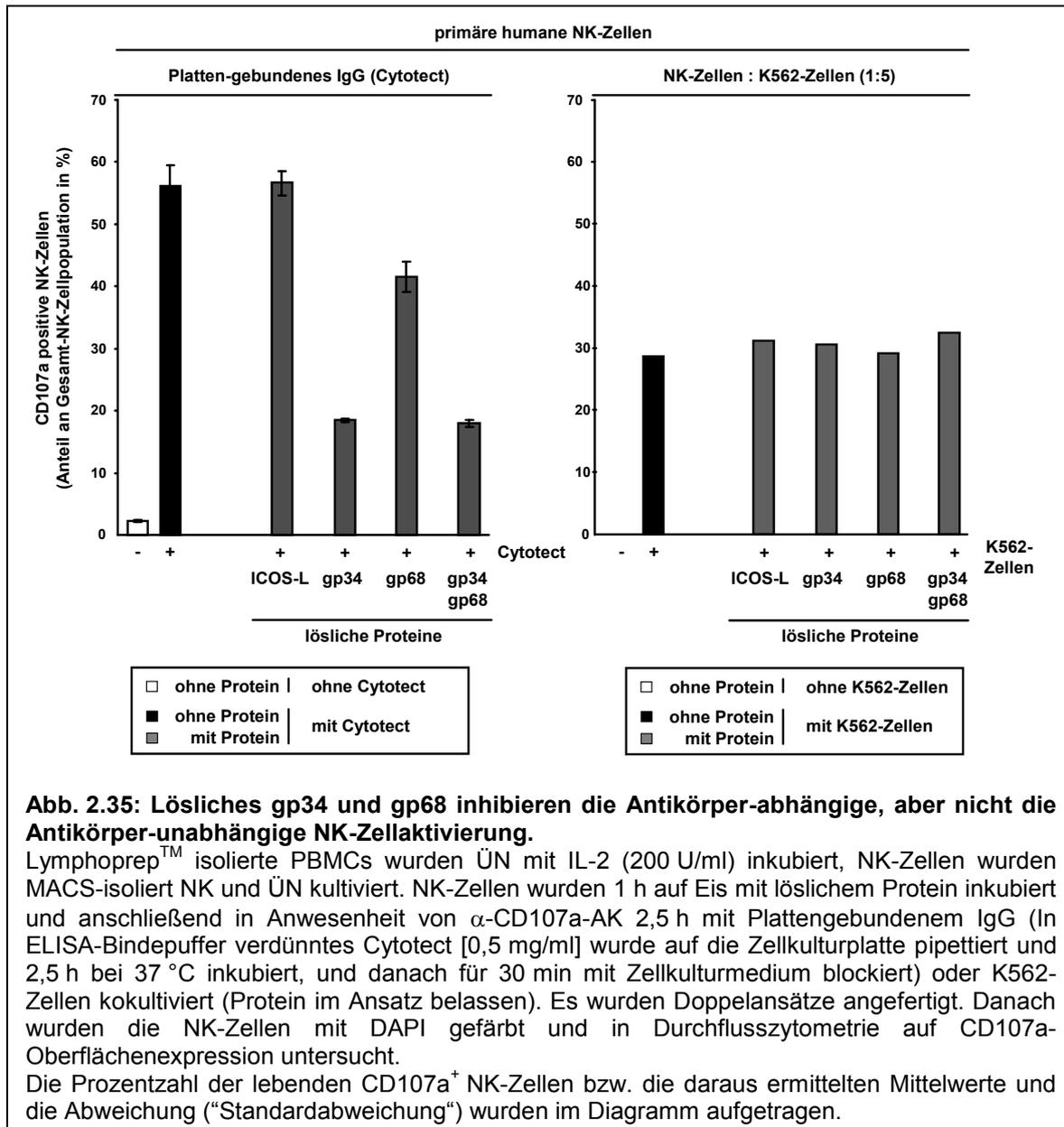
**Abb. 2.34: Lösliches gp34 und gp68 inhibieren die ADCC-Reaktion primärer NK-Zellen.**

SKOV-3-Zellen (96 wells) wurden mit oder ohne  $\alpha$ -HER2-AK (0,5  $\mu$ g/ml) für 40 min bei RT inkubiert und danach dreimal mit Medium gewaschen (a). In ELISA-Bindpuffer verdünntes Cytotect (0,5 mg/ml) wurde auf die Zellkulturplatte pipettiert und 2,5 h bei 37 °C inkubiert, und danach für 30 min mit Zellkulturmedium blockiert (b). Lösliche Proteine, IL-2-aktivierte NK-Zellen und  $\alpha$ -CD107a-AK wurden zugegeben und für 4 h bei 37 °C (dunkel) inkubiert. Es wurden Doppelansätze angefertigt. Lebende DAPI-negative NK-Zellen wurden in der Durchflusszytometrie auf CD107a-Oberflächenexpression getestet. Die Prozentzahl der CD107a<sup>+</sup> NK-Zellen bzw. die daraus ermittelten Mittelwerte und die Abweichung ("Standardabweichung") sind im Diagramm aufgetragen, die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe eines zweiseitigen T-Tests (ungleiche Varianz) geprüft. (\*\*\*) p<0,005, \*\* p<0,01, \* p<0,05 verglichen mit entsprechender ICOS-L-Proteinverdünnung, n.d. nicht durchgeführt)

Die eingesetzten Proteinverdünnungen wurden zum Vergleich per SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot mit  $\alpha$ -V5-Antikörper detektiert.

### **2.6.7 Die löslichen viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren inhibieren nicht die Antikörper-unabhängige NK-Zellaktivierung durch K562-Zellen**

NK-Zellen werden nicht nur Antikörper-abhängig (also durch Immunkomplexe) CD16-Rezeptor-abhängig aktiviert. Eine Vielzahl aktivatorischer und inhibitorischer Rezeptoren auf der NK-Zelloberfläche ist für die Aktivierung durch Antikörper-unabhängige Stimuli zuständig. Die K562-Zelle (Erythrozytenleukämie) wird aufgrund ihrer fehlenden MHC-I-Expression von NK-Zellen getötet (*Missing-Self-Hypothesis*) und deswegen in *in vitro*-NK-Zellstudien als Standard-Zielzelle benutzt. Ko-Kultivierung von NK-Zellen mit der K562-Zelllinie führt zur effizienten Aktivierung der NK-Zelle und zur Zelllyse der K562-Tumorzelle. Mithilfe dieses Antikörper-freien Systems sollte nun getestet werden, ob die viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren auch Antikörper-unabhängige NK-Zellaktivierung inhibieren können. Die löslichen Proteine der viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren wurden der Ko-Kultur aus NK- und K562-Zellen zugesetzt und die NK-Zellaktivierung in Form von CD107a-Oberflächenexpression anschließend verglichen. Gleichzeitig wurde eine Antikörper-abhängige NK-Zellaktivierung (*Cytotect®-crosslinking*) durchgeführt, um die Inhibitionsfähigkeit der eingesetzten Proteine zu überprüfen (Abb. 2.35). Grundsätzlich war die Antikörper-abhängige NK-Zellaktivierung stärker als die Antikörper-unabhängige Aktivierung durch K562-Zellen. Die Antikörper-abhängige Aktivierung der NK-Zelle konnte durch lösliche virale Fc $\gamma$ -Rezeptoren inhibiert werden, die Antikörper-unabhängige Aktivierung der NK-Zelle konnte hingegen nicht durch die Proteine inhibiert werden. Virale Fc $\gamma$ -Rezeptoren haben also in diesem Antikörper-unabhängigen System mit K562-Zellen als Zielzellen keinen Einfluss auf die NK-Zellaktivierung.



**Zusammenfassung: Gp34 und gp68 sind auch in löslicher Form hochpotente Antagonisten der CD16-abhängigen NK-Zellaktivierung.**

Durch den Einsatz der löslichen viralen Fcγ-Rezeptoren gp34 und gp68 im CD16-Reporterzell- und NK-Zellaktivierungsassays konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass lösliche virale Fcγ-Rezeptoren

- 1) die Antikörper-abhängige Aktivierung von CD16 inhibieren,
- 2) ADCC von NK-Zellen inhibieren,
- 3) Antikörper-unabhängige Aktivierung (durch Tumorzelllinie K562) nicht inhibieren.

## **2.7 HCMV-kodierten Fc $\gamma$ -Rezeptoren und cytophiles IgG von NK-Zellen**

Die Bindung der viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren gp34 und gp68 an NK-Zellen ist abhängig von cytophilem IgG auf der Oberfläche humaner CD16<sup>+</sup> NK-Zellen. "Cytophile" Antikörper wurde 1963 von Boyden und Sorkin als Antikörper definiert, die die Fähigkeit besitzen, an spezifische Zellpopulationen anzulagern, ohne (zuvor) ein entsprechendes Antigen gebunden zu haben (Sorkin, 1963; Boyden, 1963). Im Gegensatz dazu werden Antikörper, die zuvor ihr jeweiliges Antigen gebunden haben, als "opsonierte" Antikörper bezeichnet (Sulica und Herberman, 1996). Cytophile Antikörper auf NK-Zellen sind über CD16 (Fc $\gamma$ RIIIA) gebunden. Die Wirkung bzw. Funktion cytophiler Antikörper auf NK-Zellen ist nicht verstanden und wurden in den letzten Jahren kaum wissenschaftlich diskutiert. Cytophiles IgG stammt aus dem Serum und lässt sich auf frisch isolierten peripheren CD16<sup>+</sup> NK-Zellen nachweisen (s. auch Abb. 2.24). 1982 wurde von Sulica und Kollegen die Zytotoxizität von NK-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach PBMC-Isolation aus dem Blut in Chrom-Freisetzungsexperimenten (Chrom-release-Assay) getestet. Dabei wurde festgestellt, dass in Serum-freiem Medium kultivierte NK-Zellen zytotoxischer auf Tumorzellen reagieren als frisch isolierte oder in Serum bzw. IgG-haltigem Medium kultivierte NK-Zellen (Sulica et al., 1982). Aus den Befunden wurde gefolgert, dass cytophiles IgG die NK-Zellaktivität modulieren kann.

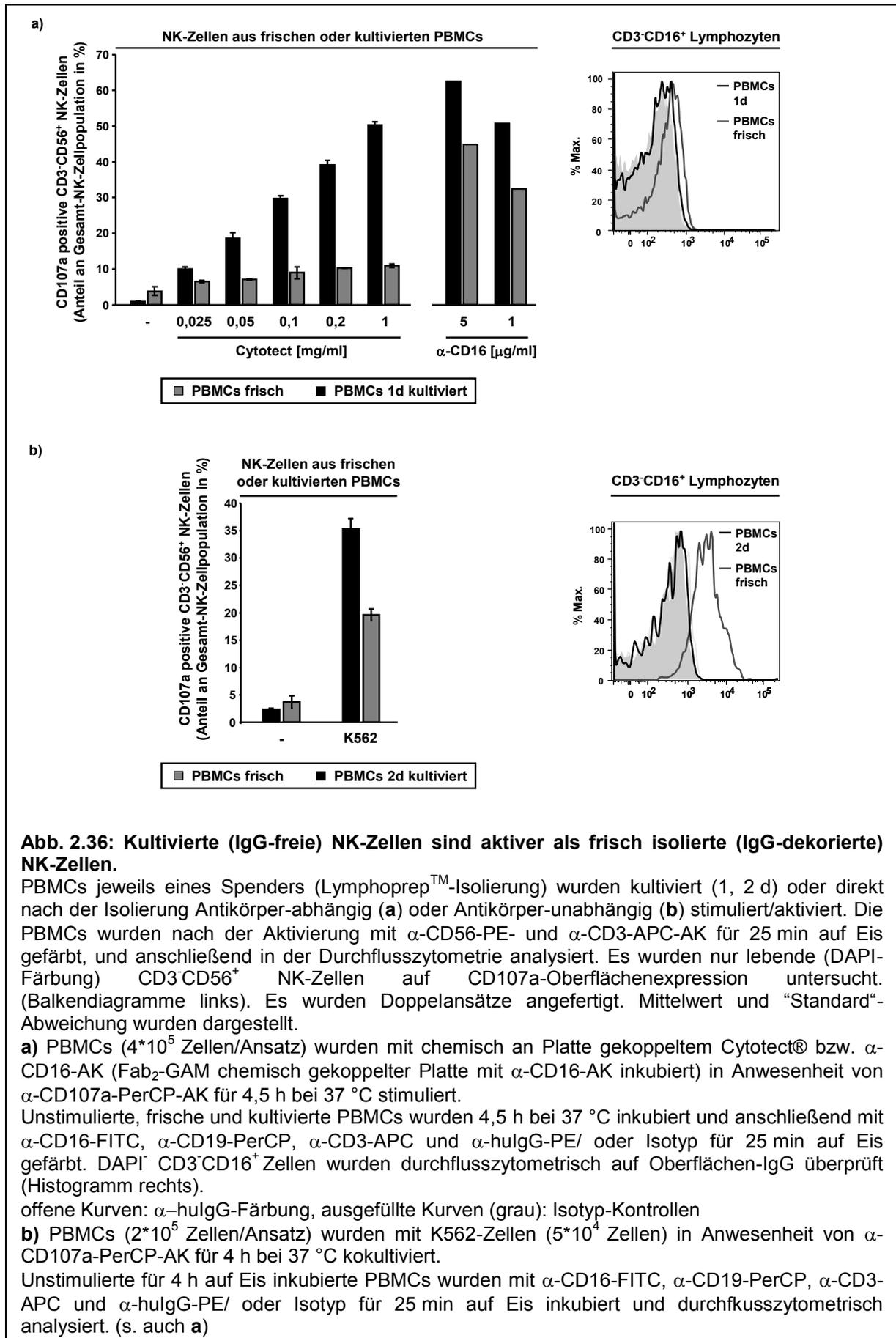
In der vorliegenden Arbeit wurde durch die Bindung der viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren gp34 und gp68 an NK-Zellen die Anwesenheit von cytophilem IgG auf frisch isolierten NK-Zellen bestätigt. Daraufhin sollte die Frage geklärt werden, ob die Bindung von gp34 und gp68 an dieses cytophile IgG die NK-Zellaktivität beeinflussen kann. Im ersten Schritt sollte allerdings die Wirkung/Funktion von cytophilem IgG auf die NK-Zellaktivität überprüft werden.

### **2.7.1 Cytophiles IgG inhibiert Degranulation von NK-Zellen**

In den durchflusszytometrischen Analysen konnte bereits gezeigt werden, dass frisch isolierte NK-Zellen im Gegensatz zu kultivierten NK-Zellen IgG auf der Oberfläche tragen (Abb. 2.25). Die Aktivität IgG-dekorierter und IgG-freier NK-Zellen sollte in verschiedenen Experimenten verglichen werden. Dazu wurden frisch isolierte und kultivierte PBMCs

entweder Antikörper-abhängig (durch an die Zellkulturplatte chemisch-gekoppelten Antikörper [IgG-Präparation: Cytotect®]) oder durch CD16-*Crosslinking*-Antikörper oder Antikörper-unabhängig (durch Ko-Kultivierung mit der bekannten Tumorzelllinie K562) aktiviert. Die NK-Zellaktivierung wurde anhand der CD107a-Oberflächenexpression bestimmt und der prozentuale Anteil der CD107a-exprimierenden CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> NK-Zellen bezogen auf die Gesamt-NK-Zellpopulation (CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>) ermittelt (Abb. 2.36). Es konnte klar gezeigt werden, dass die Antikörper-abhängige Aktivierung von NK-Zellen durch cytophiles IgG inhibiert wird (Abb. 2.36a). Auch die NK-Zellaktivierung über einen CD16-*Crosslinking*-Antikörper, ist bei IgG-freien NK-Zellen höher als bei frisch isolierten, also IgG-dekorierten, NK-Zellen. Nicht nur die über CD16 ausgelöste NK-Zellaktivierung, sondern auch die CD16- bzw. IgG-unabhängige NK-Zellaktivierung, wurde durch cytophiles IgG inhibiert (Abb. 2.36b). Für die Antikörper-unabhängigen Aktivierung wurden die NK-Zellen mit der typischen NK-Zielzelllinie K562 ko-kultiviert. Auch in diesem System waren kultivierte IgG-negative NK-Zellen aktivierbarer (mehr CD107a<sup>+</sup> NK-Zellen) als frisch isolierte IgG-positive NK-Zellen (Abb. 2.36b).

Cytophiles IgG inhibiert somit unabhängig von der Art der Stimulie die NK-Zellaktivierung. Im Gegensatz zu kultivierten NK-Zellen trugen die frisch isolierten NK-Zellen nachweislich cytophiles IgG auf der Oberfläche (Abb. 2.36: Histogramme), welches für die Reduktion der NK-Zellaktivität/-degranulation verantwortlich gemacht werden kann. Die Ergebnisse der durchgeführten Experimente bestätigen die Befunde von Sulica und Herberman (Sulica und Herberman, 1996).



**Abb. 2.36: Kultivierte (IgG-freie) NK-Zellen sind aktiver als frisch isolierte (IgG-dekorierte) NK-Zellen.**

PBMCs jeweils eines Spenders (Lymphoprep<sup>TM</sup>-Isolierung) wurden kultiviert (1, 2 d) oder direkt nach der Isolierung Antikörper-abhängig (a) oder Antikörper-unabhängig (b) stimuliert/aktiviert. Die PBMCs wurden nach der Aktivierung mit  $\alpha$ -CD56-PE- und  $\alpha$ -CD3-APC-AK für 25 min auf Eis gefärbt, und anschließend in der Durchflusszytometrie analysiert. Es wurden nur lebende (DAPI-Färbung) CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NK-Zellen auf CD107a-Oberflächenexpression untersucht. (Balkendiagramme links). Es wurden Doppelansätze angefertigt. Mittelwert und "Standard"-Abweichung wurden dargestellt.

**a)** PBMCs ( $4 \cdot 10^5$  Zellen/Ansatz) wurden mit chemisch an Platte gekoppeltem Cytotect® bzw.  $\alpha$ -CD16-AK (Fab<sub>2</sub>-GAM chemisch gekoppelter Platte mit  $\alpha$ -CD16-AK inkubiert) in Anwesenheit von  $\alpha$ -CD107a-PerCP-AK für 4,5 h bei 37 °C stimuliert.

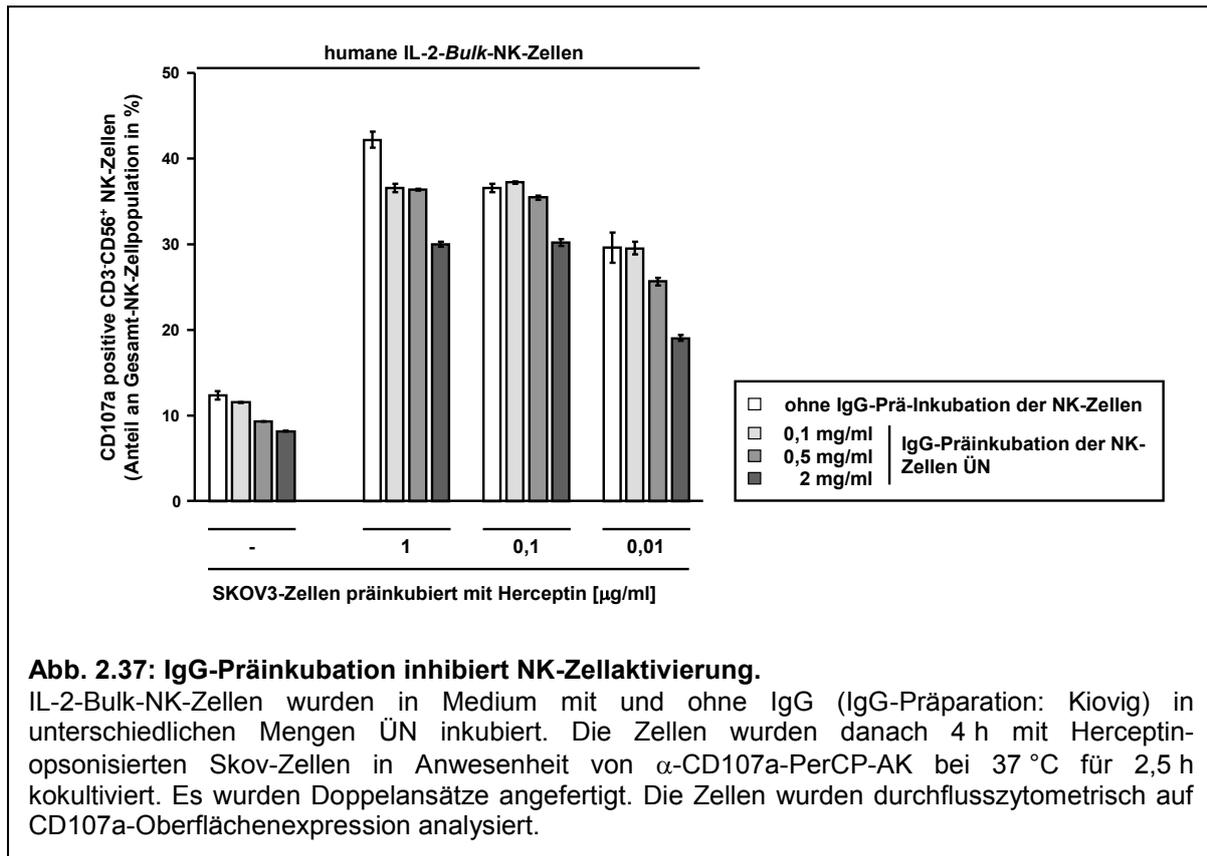
Unstimulierte, frische und kultivierte PBMCs wurden 4,5 h bei 37 °C inkubiert und anschließend mit  $\alpha$ -CD16-FITC,  $\alpha$ -CD19-PerCP,  $\alpha$ -CD3-APC und  $\alpha$ -hulG-PE/ oder Isotyp für 25 min auf Eis gefärbt. DAPI<sup>-</sup> CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Zellen wurden durchflusszytometrisch auf Oberflächen-IgG überprüft (Histogramm rechts).

offene Kurven:  $\alpha$ -hulG-Färbung, ausgefüllte Kurven (grau): Isotyp-Kontrollen

**b)** PBMCs ( $2 \cdot 10^5$  Zellen/Ansatz) wurden mit K562-Zellen ( $5 \cdot 10^4$  Zellen) in Anwesenheit von  $\alpha$ -CD107a-PerCP-AK für 4 h bei 37 °C kokultiviert.

Unstimulierte für 4 h auf Eis inkubierte PBMCs wurden mit  $\alpha$ -CD16-FITC,  $\alpha$ -CD19-PerCP,  $\alpha$ -CD3-APC und  $\alpha$ -hulG-PE/ oder Isotyp für 25 min auf Eis inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert. (s. auch a)

Um auszuschließen, dass keine andere Einflüsse während der Kultivierung der NK-Zellen, außer dem IgG-Verlust, zur verstärkten Aktivität der NK-Zellen führen, sollten IgG-dekorierte und IgG-freie NK-Zellen gleichzeitig isoliert und gleichlang kultiviert werden. Dazu wurden PBMCs bzw. MACS-isolierte NK-Zellen *in vitro* mit oder ohne IgG kultiviert und anschließend in Aktivierungsexperimenten untersucht. In einigen dieser Versuche kam es allerdings durch die IgG-Vorinkubation (humanes Serum oder IgG-Präparation) der PBMCs oder NK-Zellen zu einer Aktivierung der NK-Zellen, so dass die Expression des Aktivierungsmarkers CD107a schon vor der spezifischen Aktivierung (bzw. dem eigentlichen aktivierenden Stimulus) 5-10-fach höher war als ohne IgG-Vorinkubation. Da die Ergebnisse aus diesen Versuchen nicht konsistent waren, wurde entschieden, die Experimente mit NK-Zellen aus IL-2-*Bulk*-Kulturen durchzuführen. IL-2-*Bulk*-NK-Zellen werden hergestellt, indem frisch isolierte NK-Zellen nach der Isolation mit  $\gamma$ -bestrahlten *Feederzellen* (s. Material und Methoden) in IL-2- und Serum-haltigem Medium kultiviert werden, was u. a. zu einer starken Proliferation der NK-Zellen führt. Um den Einfluss von cytophilem IgG zu untersuchen, wurden NK-Zellen derselben IL-2-*Bulk*-NK-Zellkultur in IgG-freiem oder IgG-haltigem Medium inkubiert und anschließend in Aktivierungsexperimenten verglichen. Es konnte erneut gezeigt werden, dass die IgG-Vorinkubation von NK-Zellen zu einer Inhibition der NK-Zellaktivierung führt. Die IL-2-*Bulk*-NK-Zellen wurden nach einer IgG-Präinkubation Immunkomplex-abhängig aktiviert, und anschließend auf CD107a-Expression durchflusszytometrisch quantifiziert (Abb. 2.37). In den unterschiedlichen Ansätzen konnte gezeigt werden, dass die mit IgG präinkubierten NK-Zellen sich weniger aktivieren ließen als die IgG-freien NK-Zellen. In diesen Experimenten war gut sichtbar, dass schon die „unspezifische“ Aktivierung (SKOV-3-Zellen ohne Herceptin) durch Präinkubation der NK-Zellen in IgG abnahm. Je mehr IgG für die Präinkubation eingesetzt wurde, desto geringer war die CD107a-Oberflächenexpression (Abb. 2.37). Der Anteil der inhibitorischen Wirkung durch cytophiles IgG nahm nach Antikörper-abhängiger Aktivierung nicht nachweisbar zu. Der gleiche Phänotyp wurde in Experimenten mit NK-Zellaktivierung durch Antikörper-unabhängige Stimuli (z. B. RPMI 8866 Zielzellen) beobachtet (Daten nicht gezeigt).



In einem weiteren Experiment (Daten nicht gezeigt) wurde nach der IgG-Präinkubation das “ungebunde“ IgG entweder gewaschen oder während der Ko-Kultivierung mit Antikörper-bedeckten Zielzellen im Experiment gelassen. Hier konnten jedoch keine Unterschiede in der Aktivität der NK-Zelle festgestellt werden. Die Wirkung des präinkubierten IgGs war ausreichend für die inhibitorische Wirkung. Die Anwesenheit von monomeren IgG im Aktivierungsexperiment selbst war nicht notwendig für die Inhibition.

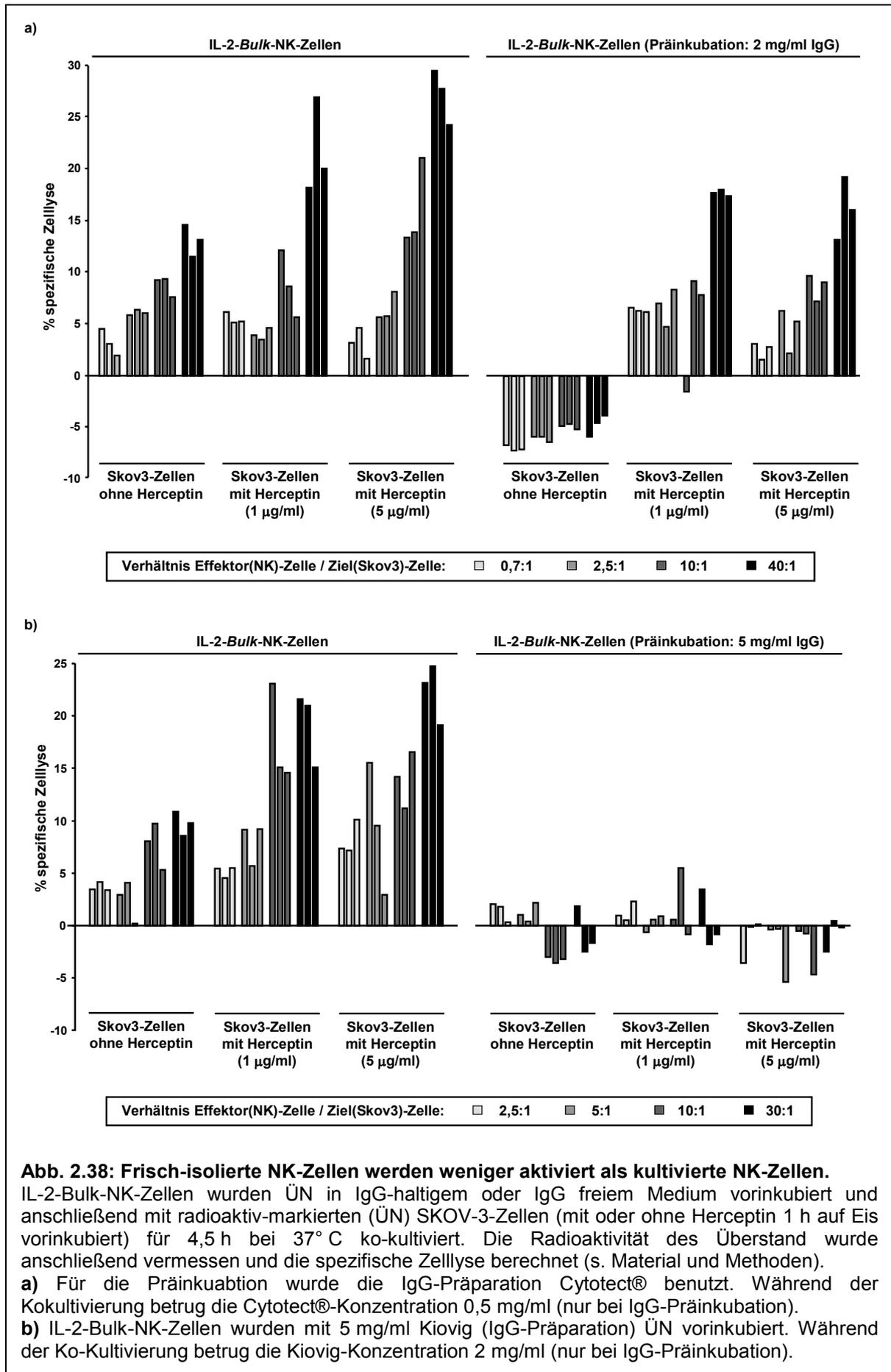
### 2.7.2 Cytophiles IgG inhibiert Zellyse durch NK-Zellen

Da der Nachweis der CD107a-Oberflächenexpression nur ein indirekter Nachweis der NK-Zellyse ist, sollte in zusätzlichen Experimenten der Einfluss von cytophilem IgG direkt auf die Zellyse untersucht werden. Dazu wurden SKOV-3-Zellen ÜN mit Hilfe  $^{35}$ S-L-Methionin und -L-Cystein haltigem Medium metabolisch markiert, und am nächsten Tag mit Herceptin-Antikörper inkubiert. Mit oder ohne IgG vorinkubierte IL-2-Bulk-NK-Zellen wurden mit diesen SKOV-3-Zellen ko-kultiviert. Die durch aktive Zellyse in den Überstand freigesetzte Radioaktivität (cpm) wurde gemessen, die spezifische Zellyse berechnet und im Diagramm dargestellt. Die Stärke der Zellyse war, wie erwartet, abhängig vom Verhältnis der Effektorzelle(NK-Zelle) zur Zielzelle (SKOV-3-Zelle). Je mehr NK-Zellen eingesetzt

wurden, desto mehr Zelllyse konnte nachgewiesen werden. Die Lyse der Zielzellen wurde durch die Inkubation mit Herceptin und der daraus folgenden Antikörper-abhängigen CD16-Aktivierung der NK-Zellen ebenfalls Konzentrations-abhängig erhöht. In den durchgeführten Experimenten (Abb. 2.38a und b) konnte die spezifische Lyse der Zielzellen (SKOV-3-Zelle) durch Vorinkubation der NK-Zellen in IgG inhibiert werden. Wie in den vorangegangenen Experimenten wurde die Antikörper-unabhängige Zelllyse (SKOV-3-Zellen ohne Herceptin) sowie die Antikörper-abhängige Zelllyse durch Anwesenheit von cytophilem IgG inhibiert. Auch hier schien die Inhibitionsstärke von der präinkubierten IgG-Menge (Menge des cytophilen IgGs) abhängig zu sein, da im Experiment mit der höheren Konzentration an cytophilem IgG (Abb. 2.38b) die spezifische Zelllyse vollständig durch cytophiles IgG blockiert werden konnte.

Die Ergebnisse aus den NK-Zelllyseexperimenten (Abb. 2.38) unterstützen die Ergebnisse aus den Degranulationsexperimenten (Abb. 2.36 und 2.37). Die Anwesenheit von bzw. Präinkubation mit cytophilem IgG inhibiert die Aktivität und Zytotoxizität von NK-Zellen.

Vor kurzem wurde ein Datensatz zur Wirkung intravenöser Immunglobulin (IVIG-Präparationen auf NK-Zellaktivierung veröffentlicht (Jacobi et al., 2009). Übereinstimmend mit den hier präsentierten Daten, konnte gezeigt werden, dass IVIG-Präparationen die NK-Zellzytotoxizität *in vitro* und *in vivo* inhibieren.



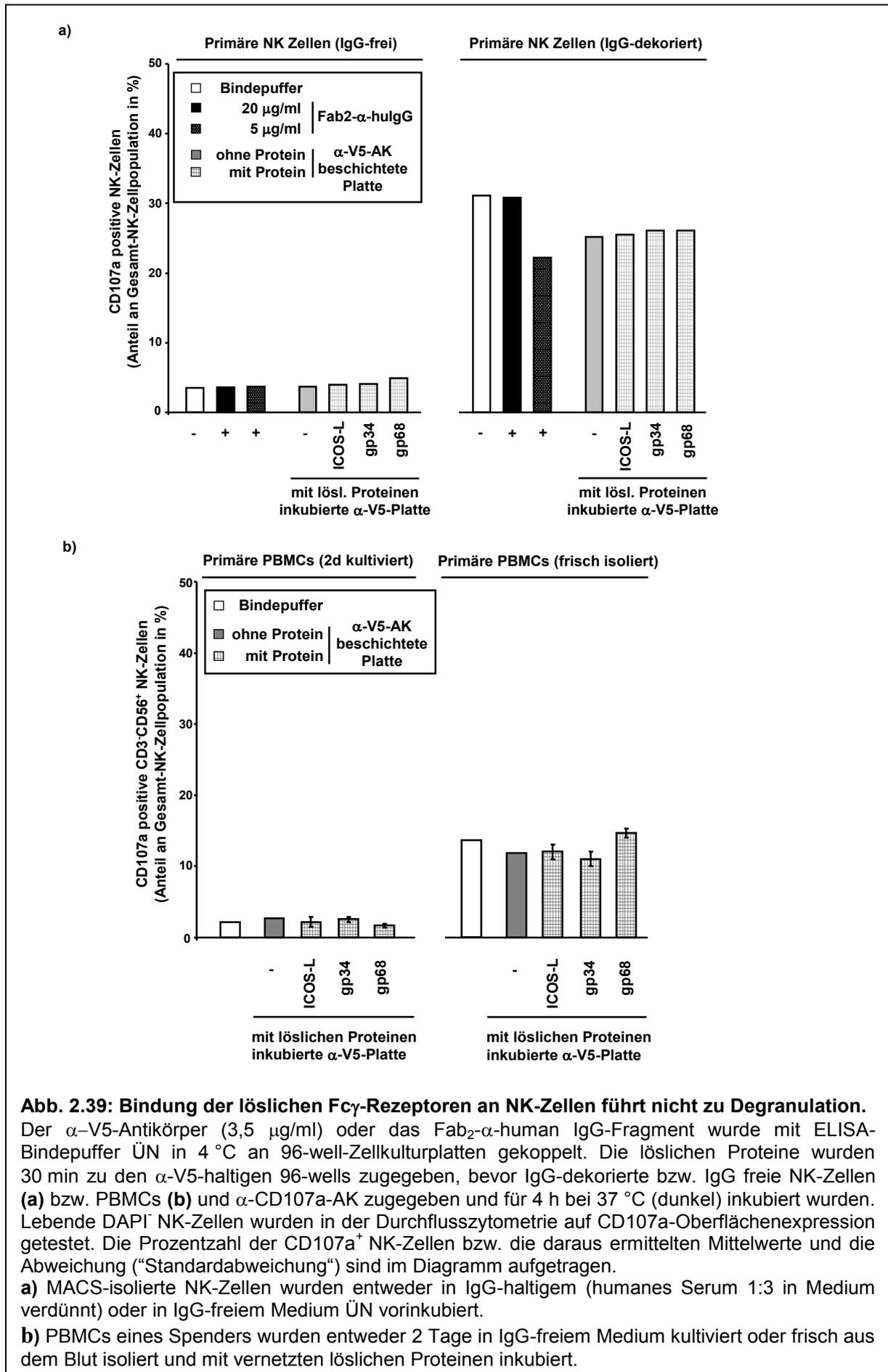
### **2.7.3 Die Bindung von gp34 und gp68 an IgG-dekorierte NK-Zellen führt nicht zu deren Degranulation**

Cytophiles IgG auf peripheren NK-Zellen wirkt regulativ und inhibiert NK-Zellaktivierung (s. vorheriger Abschnitt). Aufgrund der Ergebnisse der Proteinbindungsanalysen, in denen die Interaktion der löslichen Fc $\gamma$ -Rezeptoren mit IgG-tragenden NK-Zellen nachgewiesen wurde, stellte sich natürlich die Frage, ob die viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren gp34 und gp68 NK-Zellen regulieren können. Es wurden verschiedene Experimente aufgesetzt, um diese Hypothese zu untersuchen.

Zuerst wurde getestet, ob die Bindung von gp34 und gp68 an NK-Zellen zu einer Vernetzung des cytophilen IgGs und somit zu einer Aktivierung von NK-Zellen führen kann. Die Proteine gp34 und gp68 wurden an eine Platte gekoppelt und mit IgG-dekorierte und IgG-freie NK-Zellen inkubiert. In den Experimenten konnte keine Veränderung der CD107a-Oberflächenexpression durch gp34- bzw. gp68-Inkubation nachgewiesen werden. Allerdings wurde eine Protein-unabhängige Degranulation der IgG-dekorierten NK-Zellen im Gegensatz zu den IgG-freien NK-Zellen beobachtet werden. Dieser Phänotyp (IgG-abhängige „Background“-Aktivierung) wurde bereits in Kapitel 2.7.1 erwähnt. Interessanterweise wurde nicht nur auf NK-Zellen (s. 2.39 a), die in IgG reinkubiert wurden, eine erhöhte CD107a-Oberflächenexpression gemessen, sondern auch auf frisch isolierten IgG-tragende NK-Zellen (s. 2.39b, NK-Zellen in PBMC-Kultur). In beiden Fällen führte aber die Inkubation der NK-Zellen mit den HCMV-kodierten Fc $\gamma$ -Rezeptoren zu keiner weiteren Erhöhung der CD107a-Oberflächenexpression.

Es wurde auch untersucht, ob die Vernetzung von cytophilem IgG durch einen IgG-spezifischen Antikörper zur Degranulation von NK-Zellen führen kann. IgG-freie und -dekorierte NK-Zellen wurden dazu mit einem IgG-spezifischen Fab<sub>2</sub>-Fragment ( $\alpha$ -human IgG) inkubiert (s. Abb. 2.39a). Auch hier konnte keine spezifische Erhöhung der CD107a-Expression festgestellt werden.

In den durchgeführten Experimenten konnte keine Degranulation der NK-Zellen durch Antigen-unabhängig Vernetzung von cytophilem IgG nachgewiesen werden.

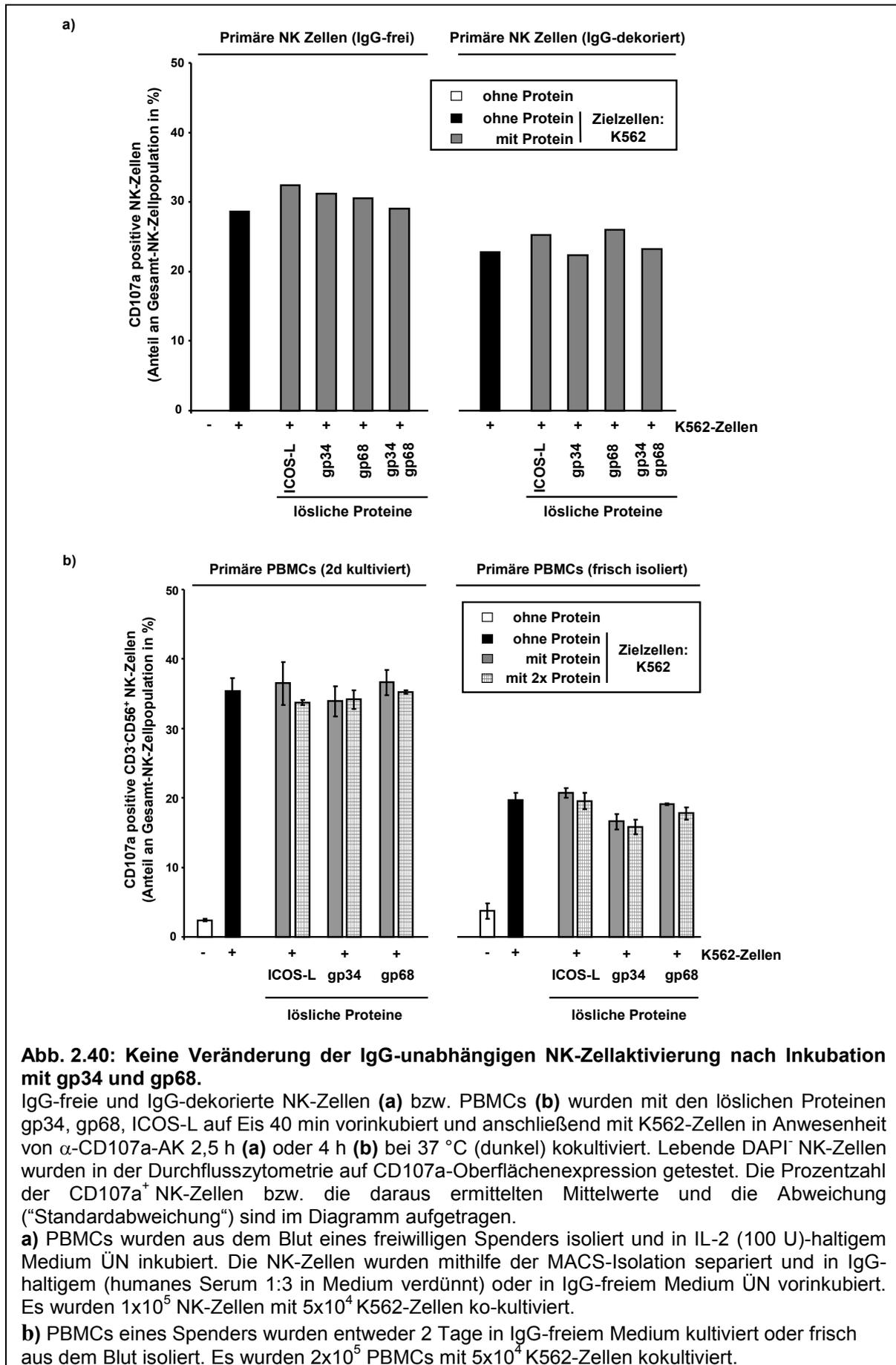


**Abb. 2.39: Bindung der löslichen Fc $\gamma$ -Rezeptoren an NK-Zellen führt nicht zu Degranulation.** Der  $\alpha$ -V5-Antikörper (3,5  $\mu$ g/ml) oder das Fab<sub>2</sub>- $\alpha$ -human IgG-Fragment wurde mit ELISA-Bindepuffer ÜN in 4 °C an 96-well-Zellkulturplatten gekoppelt. Die löslichen Proteine wurden 30 min zu den  $\alpha$ -V5-haltigen 96-wells zugegeben, bevor IgG-dekorierte bzw. IgG freie NK-Zellen **(a)** bzw. PBMCs **(b)** und  $\alpha$ -CD107a-AK zugegeben und für 4 h bei 37 °C (dunkel) inkubiert wurden. Lebende DAPI NK-Zellen wurden in der Durchflusszytometrie auf CD107a-Oberflächenexpression getestet. Die Prozentzahl der CD107a<sup>+</sup> NK-Zellen bzw. die daraus ermittelten Mittelwerte und die Abweichung ("Standardabweichung") sind im Diagramm aufgetragen.  
**a)** MACS-isolierte NK-Zellen wurden entweder in IgG-haltigem (humanes Serum 1:3 in Medium verdünnt) oder in IgG-freiem Medium ÜN vorinkubiert.  
**b)** PBMCs eines Spenders wurden entweder 2 Tage in IgG-freiem Medium kultiviert oder frisch aus dem Blut isoliert und mit vernetzten löslichen Proteinen inkubiert.

#### **2.7.4 Die Bindung von gp34 und gp68 an cytophiles IgG von NK-Zellen hat keinen Einfluss auf dessen regulative Funktion**

In weiteren Experimenten sollte überprüft werden, ob die Bindung der HCMV-kodierten Fc $\gamma$ -Rezeptoren gp34 und gp68 an cytophiles IgG dessen Wirkung verändert. Dies würde bedeuten, dass gp34 und gp68 mithilfe des cytophilen IgGs NK-Zellen regulieren könnten. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden IgG-dekorierte und IgG-freie NK-Zellen mit gp34 und gp68 inkubiert und anschließend mit einem IgG-unabhängigen NK-Zellstimulus (MHCI-defiziente K562-Zellen) ko-kultiviert. Die Aktivierung bzw. Degranulation der NK-Zelle wurde anhand der CD107a-Oberflächenexpression gemessen. Wie zuvor konnte gezeigt werden, dass cytophiles IgG die Aktivierung der NK-Zellen grundsätzlich inhibiert. Es konnte jedoch keine Veränderung der Inhibition durch Anwesenheit der viralen Proteine gp34 und gp68 nachgewiesen werden (s. Abb. 2.40). Auch Experimente mit einem IgG-abhängigen NK-Zellstimulus lieferten keine weiteren Erkenntnisse (Daten nicht gezeigt).

In den durchgeführten Experimenten konnte somit kein Einfluss der HCMV-kodierten Fc $\gamma$ -Rezeptoren gp34 und gp68 auf die regulative Funktion von cytophilem IgG auf NK-Zellen nachgewiesen werden.

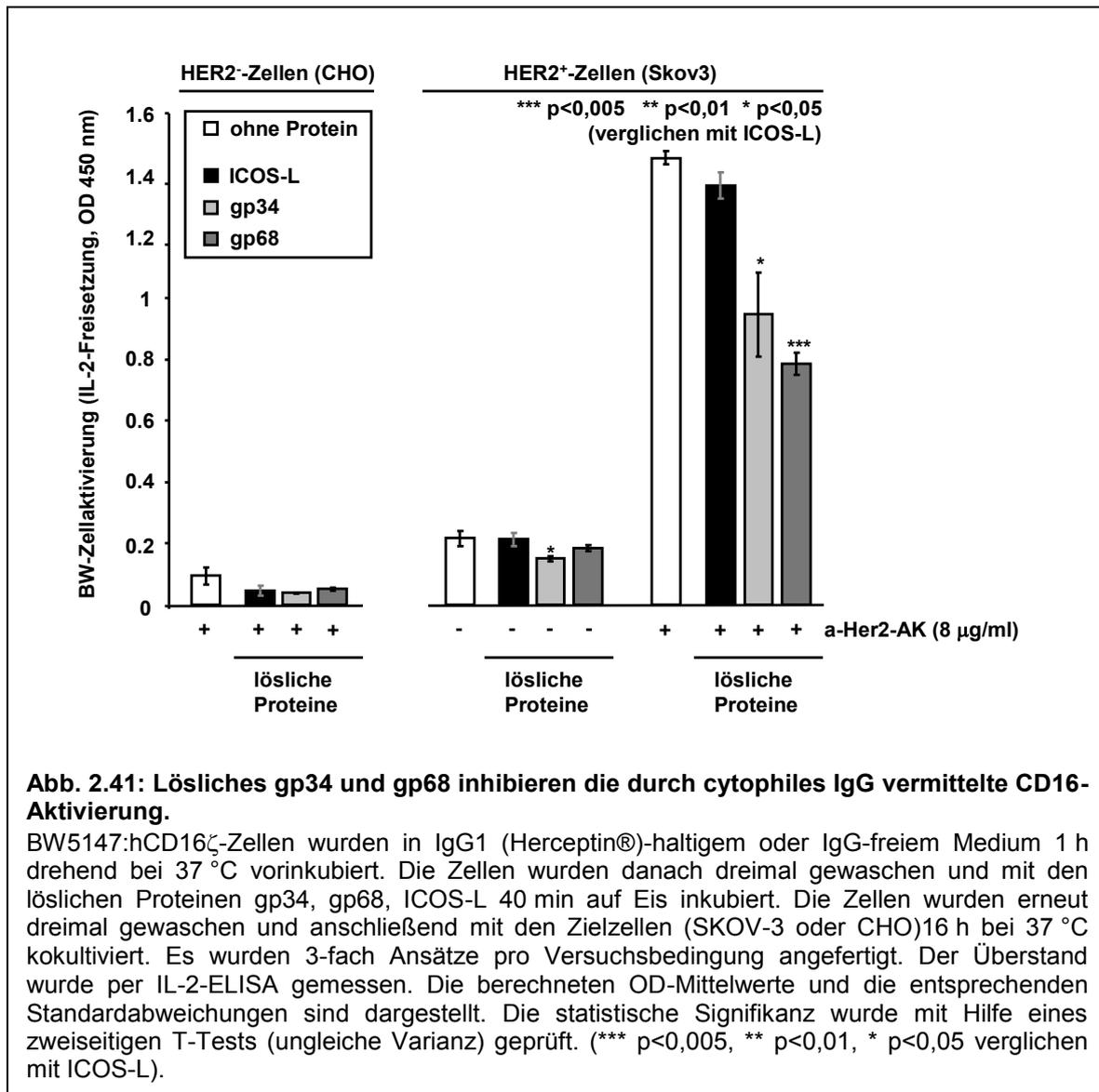


### 2.7.5 gp34 und gp68 inhibieren „cytophile“ ADCC-Aktivität von NK-Zellen

In den bisherigen Experimenten wurde die Wirkung von gp34 und gp68 auf „nicht-immunes“ cytophiles IgG von NK-Zellen untersucht, d. h. dass das cytophile IgG selbst nicht an die Zielzellen binden konnte, weil entsprechende Antigene nicht vorhanden waren. Natürlich kann cytophiles IgG auch immunes IgG darstellen, d. h. dass die NK-Zelle durch die Bindung von cytophilem IgG Antigen-spezifische Rezeptoren besitzt, die durch die Bindung an entsprechende Antigene die NK-Zelle direkt aktivieren können. Die Regulation der NK-Zellzytotoxizität ist also nicht die einzige Funktion des cytophilen IgGs. Die NK-Zelle „bewaffnet“ sich durch die Bindung von cytophilem IgG (Sulica und Herberman, 1996). Direkte Antigen-spezifische Zelllyse durch IgG-dekorierte NK-Zellen wurde auch schon bei *ex-vivo* isolierten NK-Zellen HIV-seropositiver Spender beobachtet, die in Abhängigkeit von cytophilem IgG zytotoxisch gegen gp120 (HIV Glykoprotein)-tragende Zellen (Tyler et al., 1989) waren.

Um zu prüfen, ob die viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren gp34 und gp68 die Aktivität des immunen cytophilen IgGs inhibieren können, wurde ein entsprechendes Versuchssystem mit CD16-exprimierenden Reporterzellen aufgebaut. Die Reporterzellen wurden mit der  $\alpha$ -HER2-Antikörperpräparation (Herceptin®) vorinkubiert, um IgG-dekorierte NK-Zellen nachzustellen. Die IgG-dekorierten Reporterzellen wurden mit den löslichen HCMV-kodierten Fc $\gamma$ -Rezeptoren inkubiert. Wie bereits in vorangegangenen Experimenten gezeigt werden konnte, führt diese Inkubation zu einer Bindung von gp34 und gp68 an die CD16-Reporterzellen (s. Abb. 2.27). Die Zellen wurden anschließend von ungebundenen Proteinen durch wiederholtes Waschen befreit und mit den HER2-exprimierenden Zielzellen ko-kultiviert. Es konnte eine HER2-abhängige Aktivierung der Reporterzellen nachgewiesen werden. Diese Aktivierung konnte durch Anwesenheit von gp34 und gp68 inhibiert werden.

In diesem Experiment konnte somit zum ersten Mal gezeigt werden, dass die viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren gp34 und gp68, durch die Bindung an IgG-bedeckte NK-Zellen, die direkte NK-Zellzytotoxizität durch immunes cytophiles IgG inhibieren können.



**Abb. 2.41: Lösliches gp34 und gp68 inhibieren die durch cytophiles IgG vermittelte CD16-Aktivierung.**

BW5147:hCD16 $\zeta$ -Zellen wurden in IgG1 (Herceptin®)-haltigem oder IgG-freiem Medium 1 h drehend bei 37 °C vorinkubiert. Die Zellen wurden danach dreimal gewaschen und mit den löslichen Proteinen gp34, gp68, ICOS-L 40 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden erneut dreimal gewaschen und anschließend mit den Zielzellen (SKOV-3 oder CHO) 16 h bei 37 °C kokultiviert. Es wurden 3-fach Ansätze pro Versuchsbedingung angefertigt. Der Überstand wurde per IL-2-ELISA gemessen. Die berechneten OD-Mittelwerte und die entsprechenden Standardabweichungen sind dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe eines zweiseitigen T-Tests (ungleiche Varianz) geprüft. (\*\*\*) p<0,005, \*\* p<0,01, \* p<0,05 verglichen mit ICOS-L).

### Zusammenfassung: HCMV-kodierte Fc $\gamma$ -Rezeptoren und cytophiles IgG

Mit Hilfe der Untersuchungen zur Wirkung bzw. Funktion der gp34- bzw. gp68-Bindung an NK-Zellen konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Bindung der viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren an NK-Zellen

- 1) nicht zur Degranulation der NK-Zellen führt,
- 2) scheinbar nicht die regulative Funktion von cytophilem IgG beeinflusst,
- 3) die über cytophiles IgG vermittelte CD16-Aktivierung bei Antigenerkennung inhibieren kann.

### 3 Diskussion

HCMV kodiert für mindestens drei verschiedene virale Fc $\gamma$ -Rezeptoren. Die beiden HCMV-kodierten Glykoproteine gp34 und gp68 und ihre Fc(IgG)-bindende Eigenschaft wurde bereits von unserer Arbeitsgruppe publiziert, der dritte HCMV-kodierte Fc $\gamma$ -Rezeptor wird zur Zeit in unserer Arbeitsgruppe von Frau Eva Mercé-Maldonado untersucht. Mithilfe rekombinanter löslicher Proteine wurde in der vorliegenden Arbeit nach interagierenden Zellpopulationen und Zellliganden von gp34 und gp68 gesucht, um Wechselwirkungen zwischen HCMV-kodierten Fc $\gamma$ -Rezeptoren und neuen Liganden zu finden und die Funktion der Fc $\gamma$ -Rezeptoren weiter aufzuklären. Mit einem vergleichbaren Forschungsansatz gelang uns die Identifizierung von Nkp30 und Nkp46 als Zielstrukturen von VacV-kodierten Hämagglutinin (Jarahian M., Fiedler M. et al, *in revision*).

#### 3.1 Virale Fc $\gamma$ -Rezeptoren interagieren mit IgG-dekorierten

##### Lymphozytensubpopulation

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit konnten zwei Lymphozytensubpopulationen als neuer Expressionsort für putative Interaktionspartner von gp34 und gp68 identifiziert werden, nämlich CD16<sup>+</sup> NK-Zellen und IgG-Gedächtnis-B-Zellen. Die Bindung der HCMV-kodierten Fc $\gamma$ -Rezeptoren an diese Lymphozytenpopulationen war unabhängig vom Spender und dessen CMV-Serostatus. Die interagierenden Moleküle konnten im Laufe der Untersuchungen identifiziert werden. So konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass virale Fc $\gamma$ -Rezeptoren mit B-Zellen interagieren, indem sie den IgG-B-Zellrezeptor binden. Außerdem wurde das cytophile IgG an der Oberfläche peripherer NK-Zellen als Bindungspartner von gp34 und gp68 identifiziert. Die in der Arbeit erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass die viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren gp34 und gp68 IgG binden und so mit verschiedenen IgG-tragenden Immunzellen interagieren können.

Die Analyse der in dieser Arbeit erhaltenen Daten lässt nicht nur Hypothesen über regulative Funktionen von viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren bei Lymphozytenfunktionen zu, sondern erweitert auch das Wissen über die IgG-gp34- bzw. IgG-gp68-Interaktion selbst.

Obwohl die Bindung der viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren gp34 und gp68 an B- und NK-Zellen über einen sehr ähnlichen Liganden (IgG bzw. mIgG) erfolgt, unterscheiden sich die

„Bindungsmuster“ der beiden Proteine deutlich, wie in den durchflusszytometrischen Analysen zu sehen ist (z. B. Abb. 2.9). So bindet gp34 zwar stark an B-Zellen, aber nur schwach an NK-Zellen. Die gp68-Bindung verhält sich genau umgekehrt. Gp68 bindet stark an NK-Zellen aber schwach an B-Zellen. Aus diesen unterschiedlichen Bindungsverhalten und bisherigen Erkenntnissen über die IgG-Interaktion von gp34 und gp68 können Modelle zur jeweiligen Interaktion mit NK- und B-Zellen aufgestellt und in den nachfolgenden Kapiteln erläutert werden.

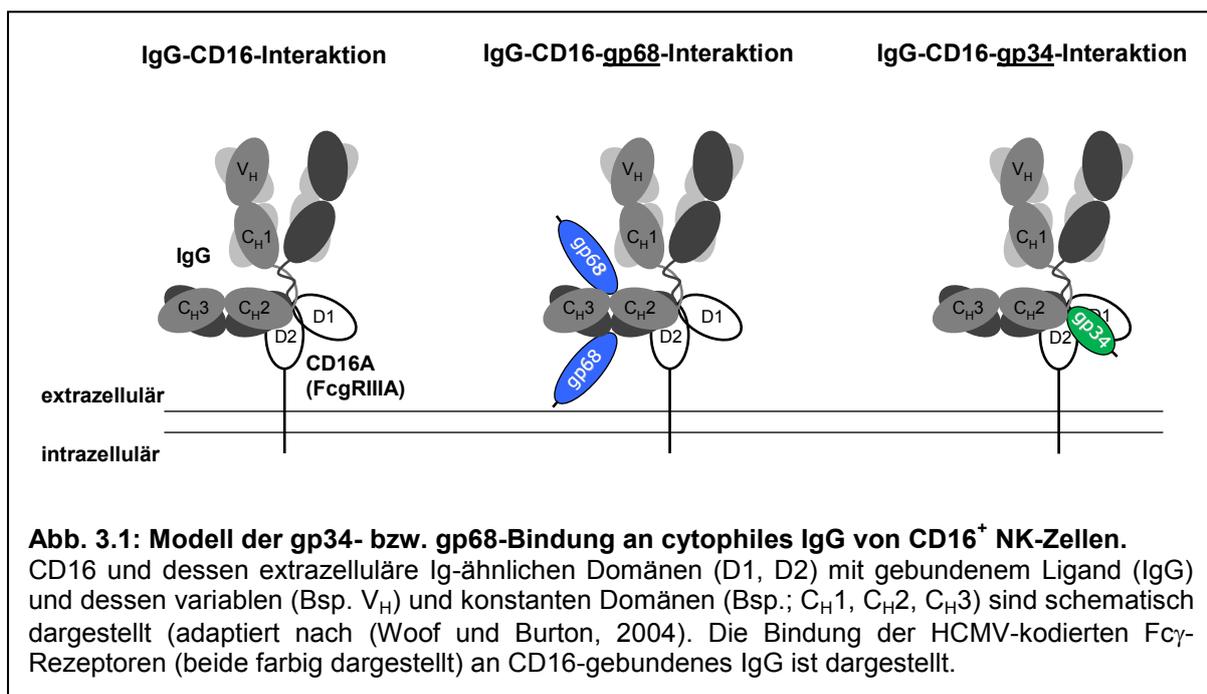
### **3.1.1 Interaktion viraler Fc $\gamma$ -Rezeptoren mit freiem monomeren IgG**

Die HCMV-kodierten Fc $\gamma$ -Rezeptoren gp34 (Lilley et al., 2001) und gp68 (Atalay et al., 2002) binden spezifisch an den Fc-Teil von IgG. Die Interaktion von monomeren IgG und gp68 bzw. gp34 wurde in der Dissertation von Henrike Reinhard und in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Pamela Björkman (Caltech, USA) genauer charakterisiert und u. a. mit der Interaktion von zellulären Fc $\gamma$ -Rezeptoren mit IgG verglichen (Sprague et al., 2008; Reinhard, 2008). Im Gegensatz zu den zellulären Fc $\gamma$ -Rezeptoren binden die viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren gp34 und gp68 alle IgG-Subklassen mit vergleichbarer Affinität (Atalay et al., 2002). Die N-Glykosylierung am Asn 297 von IgG, die zwar für die Bindung der zellulären Fc $\gamma$ -Rezeptoren und ihre Aktivierung eine wichtige Rolle spielt (Walker et al., 1989; Lund et al., 1992; Jefferis et al., 1998), ist für die Bindung der viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren nicht essentiell (Reinhard, 2008). Für gp68 konnte mit Hilfe eines mutierten Fc $\gamma$ -Fragments (nbFc) die C<sub>H2</sub>-C<sub>H3</sub>-IgG-Gelenkregion als Bindungsstelle beschrieben werden (Sprague et al., 2008). Gp34 hingegen nutzt diese Bindungsstelle nicht (Reinhard, 2008). Für die gp34-IgG-Interaktion konnte bisher noch keine Bindungsstelle beschrieben werden.

### **3.1.2 Modell zur Interaktion viraler Fc $\gamma$ -Rezeptoren mit cytophilem IgG auf NK-Zellen**

Cytophiles IgG auf der Zelloberfläche von NK-Zellen ist über den Fc $\gamma$ -Rezeptor (CD16) gebunden (Sulica und Herberman, 1996). Die Bindung von CD16 an monomeres IgG konnte, u. a. durch das von Sondermann und Kollegen hergestellte Ko-Kristall aus humanem Fc $\gamma$ (IgG1)-Fragment und löslichem CD16 (Sondermann et al., 2000), bereits detailliert beschrieben werden. Die Bindung von CD16 an IgG erfolgt an Aminosäurereste in der C<sub>H1</sub>-C<sub>H2</sub>-Gelenkregion und in der N-terminalen C<sub>H2</sub>-Domäne von IgG.

In der vorliegenden Arbeit konnte cytophiles IgG auf der Oberfläche frisch isolierter CD16<sup>+</sup> NK-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 2.24). Es wurde zum ersten Mal gezeigt, dass dieses cytophile IgG von den viralen Fcγ-Rezeptoren gp34 und gp68 gebunden werden kann. In Abwesenheit von cytophilem IgG konnte keine Bindung an NK-Zellen nachgewiesen werden. CD16 und cytophiles IgG sind also nötige Voraussetzungen für die Bindung der viralen Fcγ-Rezeptoren an NK-Zellen. Die Analyse aller durchgeführten Bindungsexperimente macht ebenfalls deutlich, dass die gp34-Bindung an NK-Zellen wesentlich schwächer als die gp68-Bindung an NK-Zellen ist (z. B. Abb. 2.18). Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass die Interaktion des zellulären Fcγ-Rezeptors CD16 mit dem cytophilen IgG, die gp34-Bindung im Gegensatz zur gp68-Bindung zu beeinträchtigen scheint. Die IgG-Bindungsstelle von gp68 liegt zwischen der C<sub>H</sub>2- und der C<sub>H</sub>3-Domäne (Sprague et al., 2008), die trotz der CD16-Bindung an IgG für gp68 noch frei zugänglich ist. Die gp34-Bindungsstelle wurde bisher noch nicht beschrieben. Die schwache Bindung von gp34 an NK-Zellen (auch im Vergleich zu der starken Bindung an B-Zellen) zeigt, dass die gp34-Bindung an das cytophile IgG wahrscheinlich durch die CD16-Bindung beeinträchtigt wird. Dies könnte einerseits bedeuten, dass gp34 und CD16 um eine partiell-überlappende Bindungsstelle kompetitieren, oder dass die IgG-Konformation durch die CD16-Bindung so verändert wird, dass die gp34-Interaktion mit IgG erschwert wird. Wie die Bindung von gp34 und gp68 an CD16-gebundenes IgG erfolgen könnte, ist schematisch in Abb. 3.1 dargestellt.



Aktuelle Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe unterstützen die Annahme, dass gp34 und CD16 um die gleiche IgG-Bindungsstelle partiell kompetitieren. Mithilfe des gp120 (HIV, Humanes Immundefizienz-Virus)-spezifischen Antikörpers B12 und dessen ebenfalls publizierter LALA (L234A, L235A)-Mutante (Hezareh et al., 2001; Hessel et al., 2007), die sich durch starker Verlust der Bindung an zelluläre Fc $\gamma$ -Rezeptoren CD16a, CD32a, CD32b und CD64 im Vergleich zu dem parentalen B12-Antikörper auszeichnet (Hessel et al., 2007), untersuchte Frau Mercé Maldonado aus unserer Arbeitsgruppe den Einfluss dieser IgG-Mutation auf das Bindungsverhalten von HCMV-kodierten Fc $\gamma$ -Rezeptoren. Sie konnte zeigen, dass die Fc-Bindungsfähigkeit des HCMV-kodierten gp34 von der LALA-Mutation stark beeinflusst wird, die von gp68 hingegen nicht (E. Mercé-Maldonado, persönliche Kommunikation). Die LALA-Mutation befindet sich in der C<sub>H</sub>1-C<sub>H</sub>2-Gelenkregion und beeinflusst somit, wie erwartet, nicht die Bindung von gp68 an IgG. Der Verlust der gp34-Bindung an die B12-LALA-Mutante ähnelt dem Bindungsverhalten zellulären Fc $\gamma$ -Rezeptoren und somit auch CD16. Dieser Befund unterstützt die Vermutung, dass sich die IgG-Bindungsstellen von gp34 und CD16 ähneln. Aufgrund der ähnlichen Bindungsstelle konkurrieren CD16 und gp34 teilweise um die IgG-Bindung. Die Bindung von gp34 an cytophiles IgG von NK-Zellen wird demzufolge durch die bereits vorhandene CD16-IgG-Interaktion behindert, die gp68-Bindung hingegen nicht (Abb. 3.1). Die Bindung von gp34 erfolgt somit, ähnlich der zellulären Fc $\gamma$ -Rezeptoren, an die C<sub>H</sub>1-C<sub>H</sub>2-Gelenkdomäne. Bisher wurde, nach meinem Wissen, noch kein mikrobieller Fc-Rezeptor mit einem ähnlichem Bindungsverhalten wie gp34 beschrieben. Der HCMV-kodierte Fc $\gamma$ -Rezeptor gp34 ist somit einzigartig unter den mikrobiellen Fc-Rezeptoren. Wie ähnlich die IgG-Bindungsstellen von CD16 und gp34 allerdings wirklich sind, kann nur durch weitere Untersuchungen aufgeklärt werden. Kristallisationsversuche von gp34 und auch gp68 waren bisher erfolglos. Die Untersuchung von gp34 wird zudem durch die starke Oligomerisierung des gp34-Moleküls erschwert (Sprague et al., 2008; Reinhard, 2008). Es könnten jedoch z. B. weitere Präzipitationsstudien mit zusätzlichen IgG-Mutanten durchgeführt werden. In der Literatur wurden bereits viele IgG-Mutationen und ihr Auswirkung auf Bindung zellulärer Fc $\gamma$ -Rezeptoren und IgG-vermittelte Effektorfunktionen untersucht (Shields et al., 2001). Mit diesen IgG-Mutanten könnten vergleichende Bindungsanalysen von gp34 und CD16 durchgeführt werden. Der Einfluss der Glykosylierung von IgG auf die CD16 bzw. gp34-Bindung sollte ebenfalls vergleichend untersucht werden. In der Literatur gibt es zum Einfluss der Glykosylierung auf die IgG-Bindung von CD16 verschiedene Befunde. In Mutationsanalysen von Shields wurde gezeigt, dass die Glykosylierungsstelle Asn 297

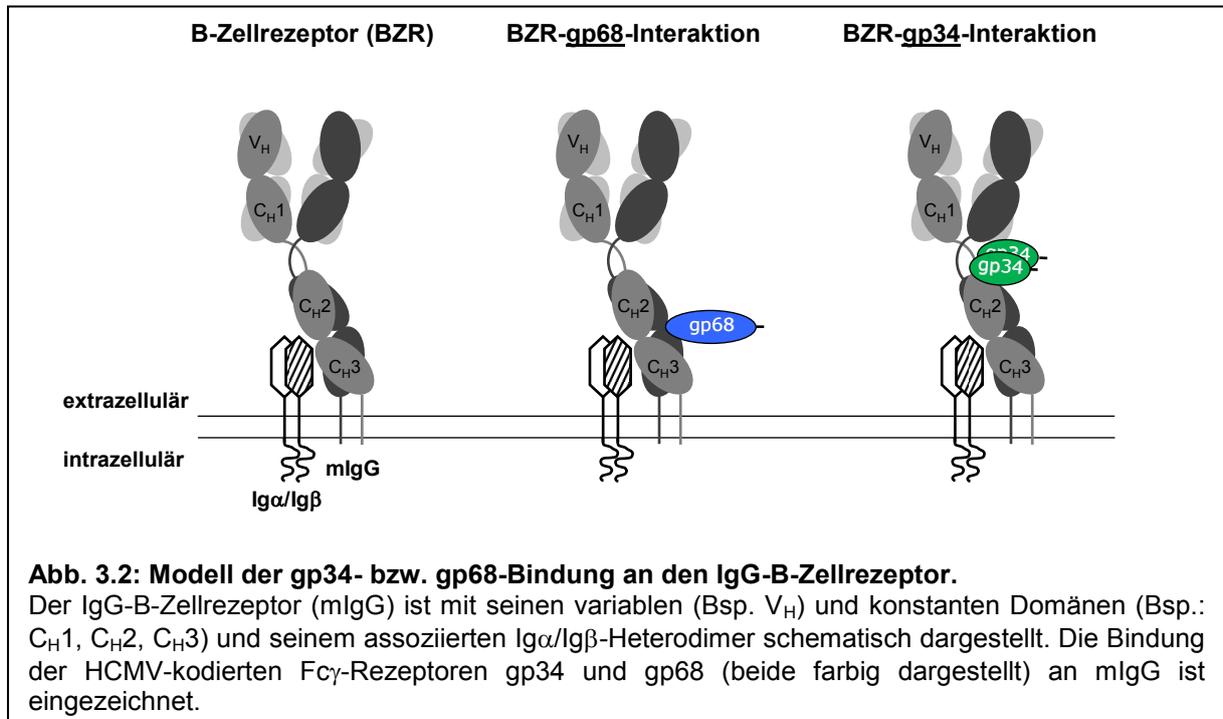
notwendig für die Bindung von CD16 an IgG ist (Shields et al., 2001). Jefferis und Kollegen, die glykosyliertes und nicht-glykosyliertes IgG3 vergleichend untersuchten, konnten keinen großen Einfluss der Glykosylierung auf die IgG-Bindung von CD16 zeigen, dafür allerdings auf die CD16-Aktivierung (Jefferis et al., 1998).

### **3.1.3 Modell zur Interaktion viraler Fc $\gamma$ -Rezeptoren mit dem IgG-B-Zellrezeptor**

Auf der B-Zelloberfläche ist das IgG-Molekül in Form des IgG-B-Zellrezeptorkomplexes vorhanden, der sich aus einem membranständigen IgG (mIgG) und einem assoziierten Heterodimer aus einer Ig $\alpha$ - und einer Ig $\beta$ -Signalkette mit einer Stöchiometrie von 1 (mIg):1 Ig $\alpha$ / $\beta$  zusammensetzt (Reth, 1992). IgG-B-Zellrezeptor-positive B-Zellen tragen somatische Hypermutationen und haben den Klassenwechsel durchlaufen, sie werden deswegen auch als Gedächtnis-B-Zellen bezeichnet. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das mIgG der B-Zellen den Liganden für gp34 und gp68 darstellt. Die B-Zellbindung der viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren war Spender- und HCMV-Serostatusunabhängig. Beim Vergleich der B-Zell- und NK-Zellfärbung innerhalb einer Lymphozytenfärbung wird deutlich, dass gp34 wesentlich besser an B- als an NK-Zellen bindet, die gp68-Bindung an B-Zellen jedoch schwächer als an NK-Zellen ist (s. Abb. 2.9). Im Gegensatz zu CD16-gebundenem IgG scheint gp34-IgG-Bindungsstelle im Fall des B-Zellrezeptors wesentlich zugänglicher für gp34 zu sein. Für die gp68-IgG-Bindungsstelle verhält es sich anscheinend genau andersherum. Aufgrund des Bindungsverhaltens der löslichen Proteine an B- und NK-Zellen wurden folgende Modelle (Abb. 3.2) der gp34- und gp68-Bindung an B-Zellen entwickelt.

Die genaue Struktur des B-Zellrezeptorkomplexes, bestehend aus mIg und dem Heterodimer Ig $\alpha$ /Ig $\beta$ , und auch die Rolle von BCR-*Clustering* bei der Signalübertragung nach Antigenbindung sind noch nicht abschließend geklärt. Erst im letzten Jahr konnte von Radaev und Kollegen ein erstes Strukturmodell vom IgM-B-Zellrezeptor veröffentlicht werden (Radaev et al., 2010). In diesem Modell konnte unter anderem eine Interaktion zwischen der Ectodomäne von Ig $\alpha$  und der Membran-proximalen IgM-Domäne C $\mu$ 4 (C $H$ 4-Domäne von IgM) nachgewiesen werden. Eine ähnliche Interaktion von Ig $\alpha$  mit der C $H$ 3 Domäne des IgG-B-Zellrezeptors konnte experimentell noch nicht nachgewiesen werden. Eine solche Interaktion könnte aber ein Grund für die schwache gp68-Bindung an B-Zellen sein, da

dessen IgG-Bindungsstelle in der C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3-IgG-Gelenkregion liegt. Möglicherweise ist aber auch nur die Nähe des Ig $\alpha$ /Ig $\beta$ -Heterodimer zur C<sub>H</sub>3-Domäne ausreichend für eine Behinderung der gp68-IgG-Interaktion.



In der Literatur werden z. Z. konträre Modelle zur Konformation des B-Zellrezeptors an der B-Zelloberfläche und der Signalübertragung durch *Clustering* des B-Zell Rezeptors diskutiert. Im *Cross-Linking*-Modell (CLM) liegt der B-Zellrezeptor in ruhenden (*resting*) B-Zellen als Monomer vor. Die Bindung eines Antigens an den B-Zellrezeptor führt bei diesem Modell zu dessen Oligomerisierung und *Clustering* und somit zur Aktivierung (Tolar et al., 2008; Liu et al., 2010). Für die Oligomerisierung werden die Membran-proximalen Domänen des mIg verantwortlich gemacht (Tolar et al., 2009). Ein anderes Modell ist das Dissoziationsmodell. Bei diesem Modell wird davon ausgegangen, dass der B-Zellrezeptor bereits an der Oberfläche von ruhenden B-Zellen in Oligomeren vorliegt und die B-Zellaktivierung durch Dissoziation der Oligomere hervorgerufen wird (Yang und Reth, 2010). Oligomere Formen des IgM und des IgD B-Zellrezeptors konnten bereits aus ruhenden B-Zellen präzipitiert werden (Schamel und Reth, 2000). Die oligomere Struktur des B-Zellrezeptors könnte ebenfalls ein Grund für die schwache Bindung von gp68 an mIgG sein, da bei dieser Struktur gp68 wahrscheinlich nur wenige, leicht zugängliche IgG-Bindungsstellen zur Verfügung stehen.

Interessanterweise konnte ebenfalls die Beobachtung gemacht werden, dass nach B-Zellselektion mithilfe von CD19-selektierenden magnetischen *Beads* nur noch eine sehr schwache gp68-Bindung an B-Zellen nachgewiesen werden konnte. CD19 ist ein wichtiger Teil des Ko-Rezeptorkomplexes von B-Zellen. Das Vernetzen des CD19-Moleküls durch entsprechende Antikörper kann zu verschiedenen biologischen Reaktionen wie z. B. zum Kalzium-Anstieg in der B-Zelle oder zur Induktion der Tyrosinkinaseaktivität führen (Tedder et al., 1994). Die B-Zellselektion mithilfe von CD19-*Beads* führt somit wahrscheinlich zur Aktivierung der B-Zellen, was möglicherweise zu einer Veränderung der B-Zelloberfläche und somit zu einer Verringerung der Bindungsfähigkeit von gp68 an B-Zellen führt. Die gp34-Interaktion mit B-Zellen wird durch diese Art der Selektion nicht verändert. Die Struktur des IgG-B-Zellrezeptors und Aktivierungszustand der B-Zelle könnten also zumindest für die gp68-Bindung eine wesentliche Rolle spielen.

### 3.2 Herpesvirale Fc $\gamma$ -Rezeptoren und ihre Fähigkeit ADCC

#### inhibieren zu können

Ein wichtiger spezifischer Mechanismus bei der Eliminierung virusinfizierter Zellen ist die Antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität (ADCC). ADCC-fähige Zellen wie z. B. NK-Zellen erkennen dabei über ihren Fc $\gamma$ -Rezeptor, in diesem Fall CD16, Antikörper-Antigen-Komplexe, was zur Aktivierung der NK-Zelle und z. B. zur Ausschüttung von Granzym B und Perforin führt.

Der erste herpesvirale Fc-Rezeptor für den die Inhibition von ADCC nachgewiesen und publiziert wurde, ist der HSV-1 kodierte Fc-Rezeptor gE:gI (Dubin et al., 1991). Der virale Mechanismus, den man für diese Inhibition verantwortlich macht, wird als *antibody bipolar bridging* bezeichnet (Frank und Friedman, 1989; Van Vliet et al., 1992).

Für die HCMV-kodierte Fc $\gamma$ -Rezeptoren gp34 und gp68 wurde *in vitro* ebenfalls eine inhibitorische Wirkung der ADCC nachgewiesen (Corrales-Aguilar, 2008). Um die bisherigen Daten dazu zu stützen und die Inhibition näher zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Dissertation Experimente mit rekombinanten löslichen Proteinen von gp34 und gp68 durchgeführt. Mithilfe CD16-exprimierender Reporterzellen konnte gezeigt werden, dass die löslichen Ektodomänen von gp34 und gp68 ausreichend sind, Antikörper-vermittelte CD16-Aktivierung zu inhibieren (z. B. Abb. 2.29 und 2.30). In allen Experimenten wurde deutlich, dass lösliches gp34, unabhängig von der eingesetzten Antikörperpräparation, der wesentlich

potentere Inhibitor war als gp68, da geringere Proteinmengen für eine Inhibition der CD16-Aktivierung ausreichend waren (s. Abb. 2.29).

Es wurde nicht nur der Einfluss der löslichen Proteine auf die IgG-abhängige CD16-Aktivierung mithilfe von Reporterzellen, sondern auch die Wirkung auf ADCC von primären NK-Zellen untersucht. In den entsprechenden Ko-Kultivierungsexperimenten, in denen ADCC durch CD107a-Expression nachgewiesen wurde, konnten die Reporterzellergenergebnisse bestätigt werden. Auch in diesen Experimenten war gp34 der deutlich potentere Inhibitor.

### **3.2.1 Mechanismen der HCMV-kodierten Fc $\gamma$ -Rezeptoren gp34 und gp68 zur Inhibition der IgG-abhängigen CD16-Aktivierung**

#### **3.2.1.1 Fc-Bindung ist notwendig für die Inhibition der CD16-Aktivierung**

Es liegt nahe, dass die Fc-Bindung der HCMV-kodierten Fc $\gamma$ -Rezeptoren der Grund für die Inhibition der IgG-abhängigen CD16-Aktivierung ist. In der vorliegenden Arbeit konnte diese Hypothese zum ersten Mal experimentell bestätigt werden, indem Fc-bindendes lösliches gp34-Protein mit einer nicht-Fc-bindenden gp34-Mutante (gp34<sub>1-179W65F</sub>) verglichen wurde. Die Mutation des Tryptophan 65 von gp34, die den Verlust Fc-Bindungs-fähigkeit nach sich zieht, führt ebenfalls zum Verlust der CD16-Inhibitionsfähigkeit. Die Anwesenheit von gp34 allein ohne Fc-Bindungs-fähigkeit ist also nicht ausreichend für eine Inhibition der IgG-abhängigen CD16-Aktivierung. Für gp68 existiert bisher keine vergleichbare Mutante, aber es ist davon auszugehen, dass die Fc-Bindung von gp68 notwendig für die CD16-Inhibition ist. Die Experimente wurden im löslichen System durchgeführt und könnten gegebenenfalls zur Bestätigung mit zellgebundenen HCMV-kodierten funktionalen und nicht-funktionalen Fc $\gamma$ -Rezeptoren wiederholt werden.

#### **3.2.1.2 Konkurrenz als Inhibitionsmechanismus der löslichen Fc $\gamma$ -Rezeptoren**

Obwohl gp34 und gp68 dieselbe biochemische Funktion, d. h. IgG-Bindungs-fähigkeit, besitzen, ist die Inhibition der IgG-abhängigen CD16-Aktivierung durch gp34 wesentlich stärker als durch gp68. Zu erklären wäre dieser Unterschied durch die unterschiedlichen Fc-Bindungsstellen von gp34 und gp68. Während die IgG-Bindungsstelle von gp34 der IgG-Bindungsstelle von CD16 ähnelt, liegt die gp68-IgG-Bindungsstelle abseits der CD16-IgG-Bindungsstelle (Sprague et al., 2008; Reinhard, 2008). Das lösliche gp34-Protein kompetitiert

somit viel stärker als gp68 mit CD16 um die IgG-Bindungsstelle. Diese Stärke der Konkurrenz spiegelt sich auch in der Inhibitionsstärke der CD16-Rezeptoraktivierung wider. Konkurrenz scheint also eine wesentliche Rolle bei der Inhibition der Fc $\gamma$ -Rezeptoraktivierung durch lösliche HCMV-kodierte Fc $\gamma$ -Rezeptoren zu spielen. Unterstützt wird diese Vermutung von Vorbefunden aus Reporterzellexperimenten in dem die IgG-abhängige Rezeptoraktivierung der drei Fc $\gamma$ -Rezeptoren CD16, CD32 und CD64 vergleichend untersucht wurde (eigene Daten, nicht gezeigt). Die IgG-abhängige Fc $\gamma$ -Rezeptoraktivierung wurde in allen Fällen von gp34 wesentlich stärker inhibiert als von gp68. Dies war zu erwarten, da die drei zellulären Fc $\gamma$ -Rezeptoren untereinander ähnliche Interaktionsmodi gegenüber IgG besitzen (Sondermann und Oosthuizen, 2002; Woof und Burton, 2004). Gp34 kompetitiert also mit allen drei Fc $\gamma$ -Rezeptorklassen um die IgG-Bindungsstelle. Interessanterweise konnte in dem Experiment ebenfalls beobachtet werden, dass gp68 die größte Inhibitionsstärke gegenüber der IgG-abhängigen CD32-Aktivierung besitzt (Daten nicht gezeigt). Wenn Konkurrenz eine wichtige Rolle bei der Inhibition der Fc $\gamma$ -Rezeptoraktivierung durch lösliche HCMV-kodierte Fc $\gamma$ -Rezeptoren spielt, dann sollte in diesem Fall gp68 stärker mit CD32 als mit CD16 oder CD64 kompetitieren. Ein Hinweis darauf liefern Ergebnisse aus der Dissertation von Frau Dr. Reinhard. Sie konnte mithilfe des nbFc nicht nur den Verlust der gp68-IgG-Bindung durch bestimmte Aminosäuremutationen in der C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3-Domäne von Fc $\gamma$ , sondern auch eine reduzierte CD32-Bindung an genau dieses nbFc zeigen (Reinhard, 2008). Die CD64-IgG-Interaktion wurde von den Mutationen hingegen nicht beeinflusst. Die Konkurrenzfähigkeit der löslichen viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren scheint mit der Inhibitionsfähigkeit der Fc $\gamma$ -Rezeptoraktivierung direkt zu korrelieren.

### **3.2.1.3 Konkurrenzunabhängige Mechanismen bei membranverankerten Fc $\gamma$ -Rezeptoren**

In den Experimenten zur IgG-abhängigen CD16-Rezeptoraktivierung in Anwesenheit von zellgebundenen HCMV-kodierten Fc $\gamma$ -Rezeptoren konnte kein wesentlicher Unterschied in der Inhibitionsstärke von gp34 und gp68 detektiert werden (Corrales-Aguilar, 2008). In den von Frau Dr. Corrales-Aguilar durchgeführten Experimenten mit Vakzinia-exprimiertem gp34 oder gp68 (beide Proteine wurden *fulllength* exprimiert) besaß zellgebundenes gp34, im Gegensatz zu löslichem gp34 keinen Vorteil gegenüber gp68. Ein Grund dafür könnte sein, dass im zellgebundenen System nicht nur Konkurrenz sondern auch andere Mechanismen,

z. B. sterische Hinderung, bei der Inhibition der IgG-abhängigen CD16-Aktivierung eine Rolle spielen.

Der HCMV-kodierte Fc $\gamma$ -Rezeptor gp68 bindet in ähnlicher Weise an die C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3-Gelenkdomäne von IgG wie der HSV-kodierte Fc-Rezeptorkomplex gE:gI (Sprague et al., 2008). Die gp68-Bindungsstelle überlappt also nicht mit der Bindungsstelle der zellulären Fc $\gamma$ -Rezeptoren wie z. B. CD16. Der gE:gI-Fc-Rezeptor konnte bereits in Komplex mit humanem Fc $\gamma$ -Fragment kristallisiert werden. Mithilfe der Analyse dieses Ko-Kristalls wurde von Sprague und Kollegen das Modell eines ternären Antigen-Antikörper-Fc $\gamma$ -Rezeptor-Komplexes entwickelt (Sprague et al., 2006). Dieses Modell zeigt, dass der zuvor postulierte Mechanismus des „*antibody bipolar bridging*“ wirklich existieren könnte (Frank und Friedman, 1989; Van Vliet et al., 1992). Mit „*antibody bipolar bridging*“ ist der Mechanismus bzw. Zustand gemeint, bei dem ein Antikörper über seinen Fab<sub>2</sub>-Teil das Antigen gebunden hat, und gleichzeitig über seinen Fc-Teil von einem, auf derselben Zelloberfläche exprimierten, Fc-Rezeptor gebunden wird. Es wird davon ausgegangen, dass ein Antikörper in diesem Zustand nicht mehr in der Lage ist, IgG-abhängig Immunzellen wie z. B. NK-Zellen zu aktivieren. Das Modell des ternären Komplexes, das von Sprague und Kollegen entwickelt wurde, kann aber auch nicht abschließend klären, wie es zu einer Inhibition der IgG-abhängigen Fc $\gamma$ -Rezeptoraktivierung durch den gE:gI-Komplex kommt. Konkurrenz ist als Mechanismus ausgeschlossen, da die Bindungsstelle von gE:gI nicht mit der Bindungsstelle der zellulären Fc $\gamma$ -Rezeptoren überlappen. Es wird angenommen, dass die Bindung des zellulären Fc $\gamma$ -Rezeptors an das IgG, das bereits durch das Antigen und den gE:gI-Fc-Rezeptorkomplex gebunden ist, durch die Nähe der verschiedenen Proteine des ternären Komplexes sterisch gehindert wird (Sprague et al., 2006). Ein ähnliches Modell könnte für den HCMV-kodierten Fc $\gamma$ -Rezeptor gp68 aufgrund der Ähnlichkeit der IgG-Bindungsstelle angenommen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden Anhaltspunkte dafür gefunden, dass auch ein quarternärer Komplex aus Antigen, Antikörper, viralem und zellulärem Fc-Rezeptor existieren könnte. So konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass CD16 gebundenes IgG von den viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren gebunden werden kann. Die gleichzeitige Bindung von gp68 (etwas schwächer auch von gp34) und CD16 an ein IgG-Molekül ist somit grundsätzlich möglich (s. Modell Abb. 3.1). Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass nicht jede Art der Vernetzung von CD16-gebundenen IgG zur Aktivierung des Rezeptors führt. So führte die Vernetzung von cytophilem IgG auf NK-Zellen nicht zu deren Aktivierung, was bedeuten könnte, dass IgG-

Konformationen bzw. IgG-Bindungsarten am CD16-Rezeptor existieren, die nicht zu einer Aktivierung (Degranulation) des Rezeptors bzw. der NK-Zelle führen.

### 3.3 HCMV-kodierte Fc $\gamma$ -Rezeptoren und IgG-tragende NK-Zellen

Frisch isolierte CD16<sup>+</sup> NK-Zellen aus dem Blut freiwilliger Spender tragen IgG an der Zelloberfläche (Abb. 2.24), welches als cytophiles IgG bezeichnet wird. Cytophiles IgG auf NK-Zellen ist zwar in einigen älteren Veröffentlichungen beschrieben (Sulica et al., 1982; Sulica und Herberman, 1996), wird aber, obwohl NK-Zellen stark im Fokus der aktuellen Forschung stehen, kaum erwähnt und ist nicht Gegenstand von Modellen zur Funktionsweise von NK-Zellen. Es wurden zwar einige Funktionen des cytophilen IgGs auf NK-Zellen untersucht, trotzdem ist die Bedeutung dieser IgG-Bindung an NK-Zellen nicht geklärt. Eine der beschriebenen Funktionen ist die Herabregulation der Aktivierung und Zytotoxizität von NK-Zellen (Sulica et al., 1982; Sulica und Herberman, 1996). In funktionellen *in vitro*-Studien mit primären NK-Zellen konnte diese inhibitorische Funktion des cytophilen IgGs im Rahmen dieser Dissertation bestätigt werden (Abb. 2.36 bis 2.38).

NK-Zellen sind Teil der angeborenen Immunantwort und wie ihr Name (natürliche Killerzellen) andeutet, sind sie beim ersten Kontakt mit einer Zielzelle (z. B. virusinfizierte Zelle oder Tumorzelle) unmittelbar aktivierbar. Wird die NK-Zelle aktiviert, kann sie umgehend Zytokine oder Perforin und Granzym ausschütten. Um eine unspezifische NK-Zellaktivität zu vermeiden, muss die NK-Zelle präzise reguliert werden. Man nimmt an, dass cytophiles IgG genau in diese Regulierung eingreift, abschließend geklärt ist diese Hypothese allerdings nicht. Einige Beobachtungen und Forschungsarbeiten weisen auf eine regulierende Funktion von IgG auf NK-Zellen hin. So wurde in mehreren Studien eine herabgesetzte NK-Zellaktivität nach IVIG (intravenöses IgG)-Gabe beobachtet (Engelhard et al., 1986; Ruiz et al., 1996; Morikawa et al., 2001). Zudem wird IVIG aufgrund dieser Wirkung bei Schwangeren mit vorangegangenen Fehlgeburten, die mit einer hohen NK-Zellzahl einhergehen („immunologisch“ bedingte Fehlgeburten), als Therapie erfolgreich eingesetzt (Stricker et al., 2000; Stricker et al., 2002). Andererseits wurde reduzierte NK-Zellaktivität aber auch bei gleichzeitiger Hypogammaglobulinämie beobachtet (Duarte et al., 1990; Doshi et al., 2004). Die Wirkungsweise von cytophilen IgG ist besonders in der *in vivo*-Situation noch nicht vollständig verstanden.

Die HCMV-kodierten Fc $\gamma$ -Rezeptoren gp34 und gp68 binden, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, an cytophiles IgG von NK-Zellen. Die Regulation von NK-Zellen durch cytophiles

IgG könnte durch die Bindung der viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren verändert werden. In den durchgeführten Experimenten der vorliegenden Arbeit konnten allerdings bisher keine Hinweise darauf gefunden werden. Cytophiles IgG dient aber nicht nur der Regulation von NK-Zellen, sondern auch der „Bewaffnung“ (*Arming*) von NK-Zellen, da die gebundenen IgG-Moleküle durch ihre Antigen-spezifischen Fab<sub>2</sub>-Teile direkt an die entsprechenden Antigene binden und so die Aktivierung der NK-Zelle auslösen können. Für *ex-vivo* isolierte NK-Zellen von HIV 1-seropositiven Spender konnte solch eine direkte NK-Zellaktivität gegenüber gp120 (Glykoprotein von HIV-1)-exprimierenden oder -dekorierten Zielzellen gezeigt werden (Tyler et al., 1989). Dabei war die NK-Zellzytotoxizität abhängig von der CD16-Oberflächenexpression und der Anwesenheit von cytophilem immunen IgG an der Oberfläche der NK-Zellen. In der vorliegenden Arbeit wurde überprüft, ob die HCMV-kodierten Fc $\gamma$ -Rezeptoren gp34 und gp68 eine solche NK-Zellaktivierung inhibieren würden. In ersten Vorexperimenten mit Herceptin ( $\alpha$ -HER2-Antikörper)-tragenden CD16-Reporterzelle und HER2-exprimierenden Zielzellen konnte gezeigt werden, dass gp34 sowie gp68 fähig waren, die CD16-Aktivierung zu inhibieren (Abb. 2.41). Allerdings bleibt unklar, wie die CD16-Aktivierung in diesem System durch gp34 und gp68 inhibiert wird, da in dem System das immune IgG durch Vorinkubation mit den Reporterzellen bereits durch CD16 gebunden ist, und die viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren erst im Anschluss an die Vorinkubation zugegeben wurden. Die Bindung von löslichem gp34 und gp68 an das CD16-gebundene IgG scheint trotzdem ausreichend für eine Inhibition zu sein. Eine mögliche Erklärung wäre, dass durch die zusätzlich Bindung von gp34 bzw. gp68 der Antikörper sterisch daran gehindert wird, in eine Konformation zu gelangen, die ihm eine Antigenbindung ermöglicht, die wiederum die CD16-Aktivierung erlauben würde. Da bisher kein Kristall eines trimeren Antigen-Antikörper-Fc $\gamma$ -Rezeptor-Komplexes hergestellt und analysiert wurde, ist die Konformation der einzelnen Moleküle in einem solchem Komplex im Vergleich zu der Konformation der Moleküle im freien Zustand ungeklärt. Allerdings ist bereits durch das Ko-Kristall aus CD16 und Fc $\gamma$ -Fragment bekannt, dass sich durch die Interaktion von IgG und Fc-Rezeptor die Konformation beider Moleküle im Vergleich zum freien Zustand ändert (Sondermann et al., 2000; Sondermann et al., 2001). Eine zusätzliche Antigenbindung des Antikörpers in einem solchen Komplex könnte somit zu einer weiteren Konformationsänderung aller beteiligten Moleküle führen. Es wäre deswegen durchaus denkbar, dass die gleichzeitige Bindung eines zellulären und viralen Fc $\gamma$ -Rezeptors an ein IgG-Molekül dazu führt, dass das IgG nicht mehr in eine Konformation gelangen kann, in der ihm eine Antigenbindung ermöglicht wird. Es wäre aber auch möglich, dass ein quarternärer

Komplex (wie unter 3.2 bereits beschrieben) aus Antigen, Antikörper, zellulären und viralem Fc $\gamma$ -Rezeptor existiert, der allerdings keine Aktivierung des zellulären Fc $\gamma$ -Rezeptors zulässt.

### **3.4 HCMV-kodierte Fc $\gamma$ -Rezeptoren gp34 und gp68 und IgG-**

#### **Gedächtnis-B-Zellen**

IgG-Gedächtnis-B-Zellen sind ein wesentlicher Teil der adaptiven Immunität (Ahmed und Gray, 1996). Antigenerkennung und -bindung durch den IgG-B-Zellrezeptor führt zur Aktivierung der Zelle und u.a. zu einer raschen Antikörperproduktion. Virale Glykoproteine, die in der Virushülle integriert oder auf der Oberfläche der infizierter Zellen exprimiert werden, stellen typische Antigene dar. Auch die HCMV-kodierten Fc $\gamma$ -Rezeptoren gp34 und gp68 sind Bestandteil der HCMV-Virushülle (Reinhard, 2008) und der Zelloberfläche HCMV-infizierter Zellen (Atalay et al., 2002) und stellen somit potentielle Antigene dar. Es könnten somit gp34- und gp68-spezifische Antikörper und Gedächtnis-B-Zellen existieren. Für gp68 konnten im Serum HCMV-positiver Spender schon gp68-spezifische Antikörper nachgewiesen werden (persönliche Mitteilung, Eugenia Corrales-Aguilar), d. h. dass wahrscheinlich auch gp68-spezifische Gedächtnis-B-Zellen existieren. Allerdings scheint die Zahl der HCMV(gp68)-spezifischen Gedächtnis-B-Zellen bzw. der Antikörper vernachlässigbar gering zu sein, da andere HCMV-Proteine wie ppUL25, pUL32(pp150), pUL48, pUL55(gB), pUL56, pUL75(gH), pUL83(pp65), pUL100(gM) als immundominante HCMV-Antigene beschrieben wurden (Beghetto et al., 2008). Trotzdem interagieren die HCMV-kodierten Fc $\gamma$ -Rezeptoren mit dem IgG-B-Zellrezeptor, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte (s. Abschnitt 2.3.3). Die Interaktion erfolgt aber nicht, wie bei der Antigenerkennung, über den Fab<sub>2</sub>-Teil, sondern über den Fc-Teil des mIgG, der von gp34 und gp68 erkannt wird. Im Rahmen der Dissertation war es nicht möglich die Auswirkung dieser Bindung auf B-Zellen zu analysieren. In den nächsten Schritten sollte aber untersucht werden, ob die gp34- bzw. die gp68 Bindung an den Fc-Teil des mIgG z. B. zu einer Aktivierung von B-Zellen oder zu einer Inhibition der B-Zellaktivierung führen kann. Wie bereits unter 3.1.3 erläutert, werden in der Literatur verschiedene Modelle zur Signalübertragung durch B-Zellrezeptor-*clustering* diskutiert. Die Bindung der viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren könnte ein *clustering* des B-Zellrezeptors (z. B. durch sterische Hinderung) und somit die Signalübertragung inhibieren. Die HCMV-kodierten Fc $\gamma$ -Rezeptoren gp34 und gp68 könnten also immunmodulatorische Wirkung auf B-Zellen haben.

### 3.5 IgG-unabhängige Funktionen und Liganden herpesviraler Fc $\gamma$ -Rezeptoren

Neben der Fc-Bindung sind für andere herpesvirale Fc $\gamma$ -Rezeptoren Antikörper-unabhängige Funktionen bekannt. So spielt der HSV-1-kodierten Fc-Rezeptorkomplex gE:gI eine wichtige Rolle bei der Zell-Zellausbreitung des Virus in epithalen und neuronalem Gewebe. Es wird davon ausgegangen, dass zelluläre Liganden des Rezeptorkomplexes gE:gI existieren, die notwendig für die Zell-Zellausbreitung des Virus sind (Polcicova et al., 2005). Diese konnten bisher allerdings noch nicht benannt werden. Für den MCMV kodierten Fc-Rezeptor *m138/fcr-1* sind immunmodulatorische Funktionen, wie die Herabregulation verschiedener aktivatorischer NK-Zellliganden bekannt (Lenac et al., 2006; Arapovic et al., 2009). Bisher konnte aber keine direkte Interaktion zwischen den beschriebenen Molekülen und *m138/fcr-1* identifiziert werden (Lenac et al., 2006; Arapovic et al., 2009). Das B7-1-Molekül, das ebenfalls von *m138/fcr-1* reguliert wird, ist bisher das einzige zelluläre Molekül für das in einem Überexpressionssystem (*fcr-1* und B7-1 transient in CHO-Zellen exprimiert) eine Interaktion mit *m138/fcr-1* gezeigt werden konnte (Mintern et al., 2006). Für die herpesviralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren sind also eine Reihe von IgG-unabhängigen Funktionen bekannt, die zellulären (oder auch viralen) Interaktionsmoleküle jedoch weitestgehend unbekannt.

Aufgrund der bekannten IgG-nabhängigen Funktionen der angeführten herpesviralen Fc-Rezeptoren wurde zu Beginn der Arbeit davon ausgegangen, dass solche Funktionen und Liganden auch für die HCMV-kodierten Fc-Rezeptoren gp34 und gp68 existieren müssen. Auch die Aminosäuresequenzen von gp34 und gp68 geben Hinweise auf bisher nicht beschriebene Funktionen der beiden Moleküle. So besitzt gp34 in seinem zytoplasmatischen Teil ein Motiv, welches die Internalisierung von Proteinen zu endosomal/lysosomalen Kompartimenten vermittelt (Atalay et al., 2002). Für den MCMV-kodierten Fc $\gamma$ -Rezeptor *m138/fcr-1* wurde bereits gezeigt, dass dessen Endozytosemechanismus eine wesentliche Rolle bei der Herabregulation der aktivatorischen NK-Zellliganden von der Zelloberfläche spielt. Solch eine Funktion wäre für gp34 aufgrund dessen Internalisierungs-Motivs ebenfalls denkbar. Der HCMV-kodierte Fc $\gamma$ -Rezeptor gp68 besitzt eine Serin- und Threoninreiche Region in seiner Ektodomäne, die stark O-glykosyliert wird, wie in der vorliegenden Dissertation gezeigt werden konnte. Diese Domäne spielt weder für die Fc $\gamma$ -Bindung (Sprague et al., 2008; Reinhard, 2008), noch für die IgG-vermittelte NK- und B-Zellbindung (Daten aus vorliegender Arbeit) eine entscheidende Rolle. Sie ist ebenso nicht notwendig für

die Inhibition der IgG-vermittelten CD16-Aktivierung (Daten aus vorliegender Arbeit). Die Funktion dieser Domäne ist also bisher nicht aufgeklärt, scheint aber IgG-unabhängig zu sein. Glykosylierungen dienen Viren u. a. zum Schutz vor dem Immunsystem, da durch sie virale Epitope verdeckt werden (Rudd et al., 2001), sie spielen aber z. B. auch eine Rolle für die Rezeptorbindung, Infektiösität und Freisetzung des Virus (Vigerust und Shepherd, 2007).

Auch die Tatsache, dass stabile HEK293-Transfektanten der löslichen viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren gp34 und gp68 hergestellt werden konnten, es aber bisher nicht gelang, stabile Transfektanten der zellständigen Vollängen(*fulllength*)-Moleküle von gp34 oder gp68 herzustellen (eigene Beobachtung, H. Reinhard, Eugenia Corrales-Aguilar), könnte einen weiteren Hinweis auf IgG-unabhängige Funktionen von gp34 und gp68 geben.

Die HCMV-kodierten Fc $\gamma$ -Rezeptoren scheinen ähnlich der anderen herpesviralen Fc-Rezeptoren IgG-unabhängige Funktionen zu besitzen. Diese konnten allerdings mit den bisher eingesetzten Methoden und Untersuchungen nicht aufgeklärt werden.

### **3.6 Existieren lösliche Formen der HCMV-kodierte Proteine gp34 und gp68?**

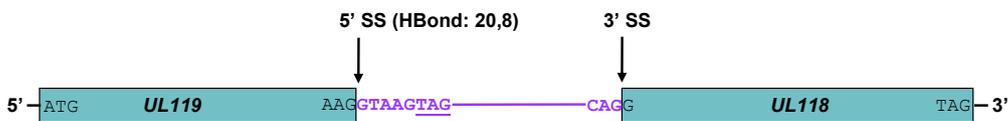
Die Befunde mit den rekombinanten löslichen gp34- und gp68-Proteinen und die vielversprechenden Ergebnisse zu ihrer Funktion warfen die Frage auf, ob lösliche Formen der HCMV-kodierten Fc $\gamma$ -Rezeptoren gp34 und gp68 im Zuge einer natürlichen HCMV-Infektion gebildet und sezerniert werden. Lösliche Formen von Transmembranproteinen können auf verschiedene Weisen entstehen, z. B. durch alternatives Spleißen der prä-mRNA oder durch proteolytische Abspaltung der Ektodomäne (*Shedding*). Ein Fc $\gamma$ -Rezeptor-Molekül, das auch als lösliche Form gefunden wurde, ist CD16. Es entsteht durch proteolytische Spaltung, für die eine bisher unbekannte Metalloprotease verantwortlich ist (Harrison et al., 1991). Eine lösliche Form der HCMV-kodierten Fc $\gamma$ -Rezeptoren gp34 und gp68 wäre also denkbar. Um diese Hypothese zu testen, wurden einige Experimente durchgeführt, bei dem der Überstand radioaktiv metabolisch-markierter HCMV-infizierter Zellen mittels Fc $\gamma$ -Präzipitation auf Fc-bindende Proteine untersucht und im SDS-Gel autoradiographisch analysiert wurde. Es konnten schwache Proteinbanden korrekter Größe detektiert werden, die einen Hinweis auf lösliche Fc-bindende Proteine darstellen könnten. Allerdings lassen die durchgeführten Präzipitationsexperimente keine abschließenden

Schlussfolgerungen zu. Deshalb wurde nach anderen Möglichkeiten für einen Nachweis von löslichen gp34- und gp68-Formen während einer HCMV-Infektion gesucht.

Die Gene von gp34 und gp68 wurden *in silico* auf mögliche Spleißstellen untersucht. Das *TRL11*-Gen, das für gp34 kodiert, wurde mit der Internet-Software „NetGene2 Server“ auf Intronsequenzen bzw. potentielle Spleißdonorstellen untersucht. Bei der Analyse der *TRL11*-Sequenz konnten keine relevanten Hinweise auf Spleißen gefunden werden. Die HCMV-exprimierte mRNA, die für gp68 kodiert, stellt bereits ein Spleißprodukt der Gene *UL119* und *UL118* dar. Beide Gene sind Bestandteil der *UL119-UL115*-Transkriptionseinheit, die alternatives Spleißen zeigt (Leatham et al., 1991), was u. a. zu der gespleißten mRNA *UL119-118* führt, die für gp68 kodiert (Atalay et al., 2002). Interessanterweise würde unter Nichtnutzung der Spleißstellen im *UL119*-ORF eine potentielle mRNA entstehen, die nur für den N-Terminus des gp68-Proteins kodiert. Die Aminosäuresequenz des verkürzten gp68-Proteins (in Abb. 3.3b pUL119 genannt) enthält ein N-terminales Signalpeptid, aber keine Transmembranregion und könnte somit sekretiert werden (Abb. 3.3b). Bisher wurden noch keine Untersuchungen durchgeführt, die eine Expression der *UL119*-mRNA und des dazugehörigen Proteins beweisen würden. Man kann allerdings durch *in silico*-Analyse der DNA- bzw. der prä-mRNA-Sequenz die Wahrscheinlichkeit des Spleißereignisses untersuchen. Dabei werden u. a. die intrinsische Stärke der Spleißstellen und potentielle spleißregulatorische Elemente in der Umgebung der Spleißstellen analysiert. Für das Intron der *UL119-118*-prä-mRNA wurde die intrinsische Stärke der 5'-Spleißstelle (5'-SS) mit dem HBond-Algorithmus für 5'-SS bestimmt [(Freund et al., 2003), [www.uni-duesseldorf.de/rna](http://www.uni-duesseldorf.de/rna)]. Der *HBond-Score* kann anhand der Komplementarität der Spleißdonorsequenz zur U1 snRNA unter Berücksichtigung der Nachbarschaftssequenzen ermittelt werden und ist ein Maß für die intrinsische Stärke einer 5'-Spleißstelle. Der hier ermittelte *HBond-Score* von 20,8 deutet auf eine intrinsisch starke 5'-Spleißstelle hin, d. h. dass es mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit zu einem Spleißereignis an dieser Stelle kommt.

a) HCMV (AD169)-DNA-Sequenz: UL119-UL118 Genregion

ATGTGTTCCGCTACTGGCGATCGCGCTCGTAGTTGCGCTCTTGGGCGACATGCACCCGGGGGTGAAAAGTAGCACCACAA  
 GCGCCGTCACCTCCCTAGTAATACCACCGTCACGTCTACTACGTCAATAAGTACCTCTAACAACGTCACCTCTGCTGT  
 CACCACCACGGTACAAACCTCTACCTCGTCCGCTCCACTTCCGTGATAGCCACGACGAGAAAGAGGGGCACCTGTAT  
 ACTGTGAATTGCGAAGCCAGCTACAGCCACGACCAAGTGTCTCTAAACGCCACCTGCAAAGTTATCCTGTTGAATAACA  
 CCAAAAATCCAGACATTTTATCAGTTACTTGTATGCACGGACAGACTGCAAGGGTCCCTTCACTCAGGTGGGGTATCT  
 TAGCGCTTCCCCCGATAAATGAAGGTAAGTAGCACCTACCTTTCTGTTCAACCCCTTTTCTCCCCGCCAACCTGC  
CAACAAAATAACAACCTTATGAATTTTATCCACAGGAAAACATACATCTCTCTTACAACGCTACTGCTCAAGAGCTGCTT  
 ATCTCGGGACTCAGGCCGAGGAGACCCTGAGTACACGTGCTCTTTCTTACGCTGGGGCCGCATCACAACGCCACTT  
 GGGACCTTTTACCTATCCCATCTACGCCGTGACGGGACTCGCTGAACGCCACCACGATGCGGGTCCGCGTGTCTGCT  
 TCAGGAACACGAACACTGCTTGCTCAACGGTAGCAGCCTCTATCACCCCAACAGCACCGTGCATCTGCATCAGGGCAAC  
 CAGCTCATCCCGCGTGAATATTAGTAACGTGACGTATAACGGACAACGGTTACGCGAGTTTGTCTTCTACCTCAACG  
 GCAGTATACGTGTCGTGCGTCTCCACGTTCCAGATTGCGGGCCGAAAGTTTTACCACCACCTACGTGTTTATCAAGAGCGA  
 CCCGCTGTTTCGAGGACCGGCTGCTGGCCTACGGCGTGTGCTTTTCTGGTTCATGGTGATTATTCTTTGTACGTG  
 ACCTACATGTGGCGCGCCGGGACTGGTCTATAAGAGACTGGAGGAGCCCGTTGAGGAAAAGAAACACCCGGTGC  
 CCTACTTCAAGCAGTGGTAG



b) pUL119 (HCMV)

142 AS

MCSVLAIALVVALLDGMHPGVKSSTTSAVTSPSNTTVTSTTSISTSNNVTSAVTTTVQSTSSASTSVIATTQKEGHL  
YTVNCEASYSHDQVSLNATCKVILLNNTKPNPILSVTCYARTDCKGPFQVGYLSAFPPDNEGK

pUL119-118 / gp68 (HCMV)

GenBank: AAL49993.1, 345 AS

MCSVLAIALVVALLDGMHPGVKSSTTSAVTSPSNTTVTSTTSISTSNNVTSAVTTTVQSTSSASTSVIATTQKEGHL  
YTVNCEASYSHDQVSLNATCKVILLNNTKPNPILSVTCYARTDCKGPFQVGYLSAFPPDNEGKLHLSYNATAQELLISGLR  
 PQETTEYTCSEFFSWGRHHNATWDLFTYPIYAVYGTRLNATMVRVLLQEHEHCLLNGSSLYHPNSTVHLHQGNQLIPPW  
 NISNVTYNGQRLREFVYLNQTYTVVRLHVQIAGRSFTTYYVFIKSDPLFEDRILAYGVLAFLVFMVILLVVTYMIARR  
 RDWSYKRLEEPVEEKKHPVPYFKQW



Abb. 3.3: Die Genregion UL119-118 kodiert für ein potentielles pUL119, das den löslichen N-Terminus von gp68 darstellt.

a) Die HCMV (AD169)-DNA-Sequenz der Genregion UL119-UL118 mit der Intronsequenz (lila) wurde dargestellt. Das Start-ATG und die potentiellen Stopp-Codons (TAG) *in frame* wurden unterstrichen. Die Genregion wurde zusätzlich schematisch in Exon-Intron-Struktur mit den entsprechenden Spleißstellen (SS) dargestellt. Die Exons wurden als Boxen (türkis) mit dem dazwischenliegenden Intron dargestellt. Der ermittelte Wert für die Wasserstoffbrückenbindung zwischen 5'-Spleißstelle und U1 snRNA (*HBond score*) wurde mit *HBond Score* Algorithmus für 5'-SS [(Freund et al., 2003), [www.uni-duesseldorf.de/rna](http://www.uni-duesseldorf.de/rna)] berechnet.

b) Die Aminosäuresequenzen des potentiellen pUL119 und gp68 von HCMV (AD169) wurden dargestellt. Signalpeptid und Transmembranregion wurden gekennzeichnet.

Bei der Analyse der Umgebung der 5'-Spleißstelle konnten unter Zuhilfenahme des ESRsearch-Algorithmus (<http://esrsearch.tau.ac.il/>) zudem keine potentiellen spleißregulatorischen Elemente mit inhibitorischer Wirkung auf die 5'-Spleißstelle gefunden

werden. Die Wahrscheinlichkeit einer mRNA, die nur für den N-Terminus von gp68 kodiert, ist somit sehr gering. Trotzdem sollte die Region genauer untersucht werden, da interessanterweise bereits gezeigt werden konnte, dass zu „starke“ Spleißstellen zu einer Hyperstabilisierung des initialen Spleißkomplexes aus der 5'-Spleißstelle und U1 snRNA führen können und dies wiederum das Spleißereignis verhindert (Staley und Guthrie, 1999).

Ein großer Nachteil bei der Analyse der gp34- und gp68-Proteine ist, dass bisher keine 34- bzw. gp68-spezifischen Antikörper existieren, die einen direkten Nachweis der Proteine z. B. in der Durchflusszytometrie oder im Westernblot ermöglichen würden. Bisher wurden die Gene deswegen mit einer Epitopmarkierungen (auch im HCMV-Genom) am C-terminalen Ende der Proteine versehen. Die Expression der membranverankerten Proteine ließ sich damit u. a. im Westernblot verfolgen. Der Nachteil der C-terminalen Epitopmarkierung ist allerdings, dass kürzere exprimierte Varianten von gp34 und gp68, die z. B. durch Spleißen oder durch *Shedding* den C-terminalen Teil des Proteins verloren hätten, nicht detektiert werden könnten. Deswegen wurde entschieden, die HCMV-kodierten Fc $\gamma$ -Rezeptoren gp34 und gp68 N-terminal mit einer Epitopmarkierung zu versehen, um so auch sekretiertes lösliches gp34 oder gp68 mit einem Epitop-spezifischen Antikörper nachweisen zu können. In der Bachelorarbeit von Frau Stephanie Zumegen (Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf) wurden einige Voruntersuchungen zur N-terminalen Epitopmarkierung dieser beiden Typ-I-Transmembranproteine nach heterologer Expression durchgeführt. Die N-terminale Markierung mit einem HA-Epitop konnte in diesem System erfolgreich von Frau Stephanie Zumegen etabliert werden. Das HA-Epitop wurde in beiden Molekülen am 3'-Ende des Signalpeptidsequenz (Aminosäureposition: 24) eingesetzt. Für weitere Experimente müsste nun die Epitopmarkierung von gp34 und gp68 in das HCMV-System übertragen werden. Mithilfe der N-terminalen Epitopmarkierung der viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren gp34 und gp68 im HCMV-Kontext könnte die Frage nach der Existenz löslicher gp34- bzw. gp68-Formen sehr einfach abschließend beantwortet werden.

## 3.7 Rekombinante Proteine

### 3.7.1 Rekombinante Proteinen zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen

Rekombinante lösliche Proteine werden häufig zur Suche nach bzw. für den Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen benutzt. Die Interaktion von löslichem ICOS mit seinem Liganden ICOS-L wurde so nachgewiesen (Mages et al., 2000). Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde mit verschiedenen zellulären wie auch viralen rekombinanten Proteinen nach deren Interaktionspartnern gesucht.

#### *Lösliche virale Proteine wie gp34 und gp68 zum Nachweis zellulärer Liganden*

In der vorliegenden Dissertation wurden lösliche rekombinante Proteine der HCMV-kodierten Fc $\gamma$ -Rezeptoren gp34 und gp68 hergestellt, um nach deren zellständigen Liganden zu suchen. Die löslichen Proteine wurden aufgrund ihrer starken Glykosylierung in HEK293-Zellen exprimiert und anschließend aufgereinigt. Um die Aufreinigung und Detektion zu ermöglichen, wurden die Proteine gp34 und gp68 mit einem V5- und einem His<sub>6</sub>-Epitop versehen. Die Aufreinigung rekombinanter Proteine mit Hilfe der His<sub>6</sub>-Epitopmarkierung und Nickel-Affinitätschromatographie ist eine häufig eingesetzte Methode und stellte sich als effizient genug heraus

In vielen Publikationen wird mit rekombinanten Fc-Fusionsproteinen gearbeitet, welche sich u. a. durch lange Halbwertszeiten und einfache und effiziente Aufreinigung über Protein A- oder Protein G-Affinitätschromatographie auszeichnen und deshalb auch für viele *in vitro*- und *in vivo*- Studien benutzt werden (Traunecker et al., 1989; Wooley et al., 1993; Ma et al., 2004). Zusätzlich führt die Dimerisierung der Proteine aufgrund der Disulfidbrücke im fusionierten Fc-Teil zu einer höheren Liganden-Affinität. Leider ist diese Art von Fusionsproteinen für gp34 und gp68 ungeeignet, da die namensgebende Eigenschaft der viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren ihre Fc-Bindung ist und diese wahrscheinlich zu intra- und intermolekularen Interaktionen der Fusionsproteine untereinander und somit zur Bildung oligomerer Fusionproteinstrukturen geführt hätte. Neben der Fc-Fusion gibt es mittlerweile viele andere Systeme, welche die Fusion verschiedener Affinitäts-Tags erlauben, um Proteinaufreinigung und Detektion zu erleichtern (Nygren et al., 1994).

In der Dissertation konnten durch den Einsatz löslicher rekombinanter gp34- und gp68-Proteine in Zellfärbungsexperimenten interagierende Lymphozytensubpopulationen

identifiziert werden. Der Nachweis wäre mit den anderen, zu diesem Zeitpunkt etablierten, Methoden in der Arbeitsgruppe wahrscheinlich nicht möglich gewesen.

### *Lösliche zelluläre Proteine zum Nachweis viraler Liganden*

Während der Dissertation wurde neben der Arbeit mit den löslichen HCMV-Proteinen gp34 und gp68 in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Frank Momburg (DKFZ Heidelberg) mit Fc-Fusionsproteinen der zytotoxischen NK-Zellrezeptoren (NCRs) Nkp30, Nkp44 und Nkp46 gearbeitet und nach deren Vakzinia-kodierten Liganden gesucht. Ausgangspunkt der Suche nach den viralen Liganden waren Vorbefunde der Arbeitsgruppe von Dr. Frank Momburg, in denen u. a. Bindung von Nkp30-Fc an Vakzinia-infizierte Zellen nachgewiesen werden konnte. Zusätzlich wurde bei einer Vakziniamutante mit mehreren Gendeletionen der Verlust dieser Bindung beobachtet. Daraufhin wurde *in silico* analysiert, ob die deletierten Gene und entsprechenden Proteine mögliche Liganden von Nkp30 darstellen könnten. Dabei fiel ein Vakzinia-Gen auf, das für das Oberflächenprotein Hämagglutinin (HA) kodiert, welches u. a. die Zell-Zellfusion von infizierten Zellen verhindert (Ichihashi und Dales, 1971). Von mir wurde durch gezielte HA-Deletion eine Vakziniamutante hergestellt, die kein HA-Protein mehr exprimiert. Mithilfe der rekombinanten Proteine der zellulären NCR-Proteine konnte in Zellfärbungsexperimenten VacV-kodiertes Hämagglutinin als deren Ligand identifiziert werden. Ein wesentlicher Vorteil der Nkp30-Bindungsstudien war, dass das Vakzinia-exprimierte Hämagglutinin sehr stark auf der Oberfläche der Vakzinia-infizierten Zellen (besonders in der späten Replikationsphase des Virus) exprimiert wird, was den Nachweis der Interaktion wesentlich erleichtert. Ein weiterer Vorteil war, dass hier mit stabilen Fc-Fusionsproteinen gearbeitet werden konnte, die durch ihre Dimerisierung zusätzlich eine hohe Ligandenaffinität besaßen.

Durch NCR-Proteinbindungsstudien mit anschließender durchflußzytometrischen Analyse (analog zu den Arbeiten in der vorliegenden Dissertation) konnte HA als Ligand von Nkp30 und Nkp46 identifiziert werden (Jarahan M., Fiedler M et al. *in revision*, PLOS Pathogens).

### **3.7.2 Rekombinante virale Proteinen für funktionelle Untersuchungen außerhalb des Viruskontext**

Die HCMV-kodierten Fc $\gamma$ -Rezeptoren gp34 und gp68 inhibieren u. a. die IgG-abhängige Aktivierung von CD16. Diese Funktion der HCMV-kodierten Fc $\gamma$ -Rezeptoren konnte im HCMV-Kontext mit Hilfe von HCMV-Deletionsmutanten („*loss of function*“) und durch

Überexpression im rekombinanten Vakziniavirus-System („*gain of function*“) gezeigt werden (Corrales-Aguilar, 2008). In der vorliegenden Dissertation konnte diese Funktion zum ersten Mal mit Hilfe des rekombinanten Systems in einem virusunabhängigen System nachgewiesen werden.

Das Experimentalsystem in dem die Inhibition der CD16-Aktivierung untersucht wurde, setzt sich zusammen aus Antigen-exprimierenden Zielzelle, einer Antigen-spezifischen IgG-Präparation und einer CD16-exprimierenden Effektorzelle (z. B. Reporter- oder NK-Zelle). Die Aktivierung der Effektorzelle ist dabei abhängig von der Menge der Antigene und der daran gebundenen Antikörper. Ein Nachteil der gp34- und gp68-Funktionsanalyse im Viruskontext ist, dass die Zielzelle infiziert werden muss, um gp34 und gp68 an der Zelloberfläche zu exprimieren. Die HCMV-Infektion wie auch die Vakzinia-Infektion kann jedoch zu einer Änderung in der Antigenoberflächenexposition („*display*“) und Antigenmenge führen. So wurden z. B. HER2<sup>+</sup> SKOV-3-Zellen mit verschiedenen Vakziniaviren infiziert und anschließend auf HER2-Oberflächenexpression untersucht. Bei diesen Analysen konnte festgestellt werden, dass die HER2-Expression zwischen den verschiedenen rekombinanten Vakziniaviren schwankte (Daten nicht gezeigt). Gleichzeitig wurde von Frau Eva Mercé-Maldonado festgestellt, dass die Deletion von einem Gen im HCMV-Genom gleichzeitig zum Verlust ganzer HCMV-Transkriptionseinheiten führen kann (persönliche Mitteilung), was zur Folge hat, dass nicht nur das deletierte Gen, sondern alle Gene dieser Transkriptionseinheit nicht exprimiert werden. Die Oberfläche HCMV-infizierter Zellen unterscheidet sich somit zwischen den verschiedenen HCMV-Deletionsmutanten innerhalb eines Experiments. Im Vakzinia- wie im HCMV-System verändert somit die Infektion die Antigenoberflächenexpression bzw. die Antigenmenge und zwar abhängig von der eingesetzten Virusmutante. Dies führt wiederum zu Unterschieden in der Antikörpermenge, die an die Zielzellen binden können und das bedeutet wiederum, dass nicht nur die Expression der viralen Fcγ-Rezeptoren sondern auch die Antigenmenge Einfluss auf die CD16-Aktivierung nimmt. Der Vorteil des rekombinanten Systems, das in der vorliegenden Arbeit genutzt wurde, ist, dass die Zielzelle nicht mit unterschiedlichen Viren infiziert werden muss, und somit die Antigenoberflächenexpression und die Antigenmenge innerhalb eines Experiments konstant sind. Die CD16-Aktivierung wird nur durch die Zugabe der löslichen Fcγ-Rezeptoren beeinflusst und nicht durch andere Konditionen, wie Antigen- oder Antikörpermenge.

Mithilfe des rekombinanten Systems konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass gp34 bzw. gp68 allein für die Inhibition der IgG-abhängigen CD16-Aktivierung hinreichend sind. Der

Einfluss anderer viraler Komponenten und Nebenwirkungen ist in diesem System völlig ausgeschlossen.

### **3.8 Fc $\gamma$ -Rezeptoren gp34 und gp68 als rekombinante therapeutische Proteine?**

Zelluläre Fc $\gamma$ -Rezeptoren spielen u. a. eine wichtige Rolle in der Immunabwehr von Krebs (Cassard et al., 2006). Bei einigen Krebserkrankungen lassen sich IgG-Antikörper im Serum nachweisen, die die jeweils typischen Tumorantigene erkennen, Immunkomplexe bilden und Fc $\gamma$ -Rezeptor-tragenden Immunzellen aktivieren (Cassard et al., 2006). Diese Art der Tumorabwehr nutzt man heutzutage in vielen Krebs-Therapieansätzen aus, die auf der Gabe therapeutischer Antikörper basieren (Carter, 2006). Die Gabe von therapeutischen Antikörperpräparationen, wie z. B. Rituximab ( $\alpha$ -CD20) oder Herceptin ( $\alpha$ -HER2) führt u. a. zur Aktivierung der zytotoxischen Funktion Fc $\gamma$ -Rezeptor-tragender Zellen und somit zur Zerstörung der Tumorzellen (Uchida et al., 2004; Liu et al., 2008).

Interessanterweise können Fc $\gamma$ -Rezeptoren eine Rolle bei der Tumorentstehung infolge chronischer Entzündungen spielen. So konnten Andreu und Kollegen zeigen, dass durch die Akkumulation von Autoantikörpern in prämaligener Haut eine Fc $\gamma$ -Rezeptoraktivierung erfolgt, die die Entwicklung von Tumoren unterstützt (Andreu et al., 2010). In Abwesenheit der Fc $\gamma$ -Rezeptoren war diese Tumorentstehung aufgehoben (Andreu et al., 2010). Die Inhibition der Fc $\gamma$ -Rezeptoraktivierung in einem solchen Krankheitsbild würde somit ebenso zu einer Inhibition der Tumorbildung führen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die löslichen viralen Fc $\gamma$ -Rezeptoren gp34 und gp68 in der Lage sind IgG-abhängige Fc $\gamma$ -Rezeptoraktivierung zu inhibieren. Es ist zu vermuten, dass rekombinantes gp34 oder gp68 auch die promaligne Fc $\gamma$ -Rezeptoraktivierung durch Autoantikörper inhibieren könnten. Diese Inhibition könnte also die entsprechende Tumorentstehung verhindern.

Rekombinanten therapeutischen Proteinen werden oft zur Behandlung verschiedener Krankheiten eingesetzt, wie z. B. Etanercept bei rheumatischen Erkrankungen oder Insulin glargin in Diabetes mellitus Typ1 und Typ2. Rekombinante HCMV-kodierte Fc $\gamma$ -Rezeptoren könnten einen therapeutischen Ansatz für die Bekämpfung von Tumorentwicklung in chronischen Entzündungen oder bei Autoimmunerkrankungen darstellen.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Geräte

Begasungsbrutschrank	BB6220, Heraeus/ Kendro, Langenselbol
Blottinggerät	Fastblot B33/B34 (klein), Biometra, Göttingen, Deutschland Fastblot B64 (groß), Biometra, Göttingen, Deutschland
Cytometer	BD FACS CANTO II, BD, New Jersey, USA
DNA-Meßgerät	UV-VIS Spectrophotometer UVmini 1240, Shimadzu, Duisburg, Deutschland
Douncer	Wheaton, VWR
Elektrophoresekammer	SDS-Gele: klein: Minigel-Twin, Biometra, Göttingen, Deutschland mittel: MAXI-Vertikal, Roth, Karlsruhe, Deutschland groß: DNA-/RNA-Agarosegele: klein: Agagel mini, Biometra, Göttingen, Deutschland mittel: Agagel maxi, Biometra, Göttingen, Deutschland
ELISA Reader	Rainbow ELISA Reader, TECAN, Männedorf, Schweiz
Entwickler (Foto)	Curix 60, Agfa, Mortsel, Belgien
Geltrockner	Gel dryer 583, Biorad, München, Deutschland
Heizblöcke	Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg, Deutschland Thermostat plus, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Hybridisierungsöfen	OV5, Biometra, Göttingen, Deutschland
MACS Magnet	MidiMACS Separator, Miltenyi biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Mikroskop	Axiovert 25, Zeiss, Göttingen, Deutschland Axiovert 40 CFL, Zeiss, Göttingen, Deutschland TS100, Nikon, Düsseldorf, Deutschland
Mikrowelle	Sharp
Scintillationszähler	1450 MicroBeta TriLux, Perkin Elmer, USA
Spektralphotometer	UV-VIS Spectrophotometer UVmini 1240, Shimadzu, Duisburg, Deutschland
Sterile Arbeitsbank	Hera Safe, Heraeus, Hanau, Deutschland
Stickstoff-Tank	Cryotherm Biosafe MD mit ApolloLIN Versorgungsbehälter

## Material und Methoden

---

Thermoblock/-mixer	Eppendorf Thermomixer comfort, Hamburg, Deutschland Eppendorf Thermomixer 5436 , Hamburg, Deutschland
Thermocycler	T1 und T3000, Biometra, Göttingen, Deutschland
Überkopf-Taumler	Heidolph Reax 2, Kehlheim, Deutschland
Ultraschallgerät	Branson Sonifer II 450 mit Kühlgerät und Becherresonator „High Intensity“, G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd, Deutschland
UV-Transilluminator	Lumi-Imager F1, Roche, Mannheim, Deutschland
Vortex	Labinco L46, Labinco, Breda, Niederlande
Wasserbad	GFL 1092, GFL, Burgwedel, Deutschland
Zentrifugen	3K30 Sigma, Sartorius, Göttingen, Deutschland Centrifuge 5415 (ungekühlt), Eppendorf, Hamburg, Deutschland Centrifuge 5417R (gekühlt), Eppendorf, Hamburg, Deutschland Centrifuge 5810R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland J2-21, Beckman-Coulter, Krefeld, Deutschland OptimaL-70K, Beckman-Coulter, Krefeld, Deutschland

### 4.1.2 Verbrauchsmaterialien

1,5 / 2 ml eppis safe lock	Rettberg
15 / 50 ml Falcontubes	Zentrifugenröhrchen, TPP
Cryoröhrchen	Nunc über Renner
ELISA-Platten	NUNC
Fotofilm	Biomax-Film, Kodak über Hirrlinger
Hyperfilm	Amersham
Größenmarker für WB	Kaleidoscope prestained standards, BioRad
Größenmarker für Gelelektrophorese	Hyperladder I, Bionline
Nitrocellulosemembran:	Protran Nitrocellulose Transfer Membran (0,45 µm), Schleicher&Schuell
Nylonmembran positiv geladen	Nylon membran positively charged, Roche
PCR-tubes	G001-AF, G. Kisker GbR
Polyallomerröhrchen	Beckman
Verpackungsfolie (Saran)	Dow
Whatman-Papier	3mm Chromatographiepapier, Whatman
Zellkulturflaschen/-platten	Renner
Zellkultur-48-Lochplatten	Greiner
Zellschaber	Renner

### 4.1.3 Chemikalien und Biochemikalien

7-Amino-Actinomycin (7-AAD):	BD Pharmingen™, #559925
Aceton:	Merck #1.00014.2511
3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC):	Sigma #6926
Agarose:	LE Agarose, SeaKem, Biozym #840004
Ammoniumpersulfat (APS):	Roth #9592.2
Ampicillin	Roth #K029.2
β-Mercaptoethanol:	Roth #4227.2
Bacitracin:	Fluka #11702
Bacto-Agar:	Oxoid #LP0028
BD Pharm Lyse™	BD Biosciences #555899
Bovines Serumalbumin (BSA):	Sigma #A9418-59
Bromphenolblau:	Merck #1.08122.0005
<sup>14</sup> C-Protein-Marker High Range Rainbow:	Amersham #RPN759
Calciumchlorid:	Roth #A119.1
Ciprofloxacin Hydrochlorid:	ICN Biochemicals
Complete Protease Inhibitors:	Roche #16974498
CNBr-activated Sepharose:	Amersham Biosciences #17-0820-01
4',6-Diamidino-2-phenylindole-dihydrochloride (DAPI):	Polysciences #09224
N,N-Dimethylformamid:	Fluka #40225
Dimethylsulfoxid (DMSO):	Roth #A994.2
Dithiothreitol (DTT):	Serva #20710
DNA-Größenstandard Hyperladder I:	Bioline #Bio-33025
dNTPs (Set):	Roche # 11969064001
Ethylenedinitrilo tetraacetic acid (EDTA)	Serva #11280
Essigsäure (96%)	Roth #X895.2
Essigsäure (100%), Eisessig	Merck #1.00063.2500
Ethanol (100%)	Merck #8.18760
Ethidiumbromid 10mg/ml Lösung	Roth #2218.1
Formaldehyd 37%	Merck #1.04003
Geneticin, G418	Gibco #11811-064
Glycerol	Merck #1.04093.1000
Glycin	Roth #3908.5

## Material und Methoden

---

GolgiPlug™	BD Biosciences #555029
GolgiStop™	BD Biosciences #554724
HEPES	Roth #9105.4
Imidazol ultrapure	AppliChem #A3635
Iodacetamid	Calbiochem #407710
Isopropanol	Merck #1.09634.2511
Kaleidoscope Prestained Protein-Standard	Biorad #161-0324
Kaliumchlorid	Merck #1.04936.1000
Kanamycin	Sigma #K4000
Kaliumhydroxid (KOH)	Roth #6751
LB ( <i>lysogeny broth</i> )-Medium (Lennox)	Roth #X964
Leupeptin	Sigma #L8884
Lymphoprep™	Axis-shield #1114545
Magermilchpulver Sucofin	Comet, Düsseldorf
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Sigma #M-8266
Methanol	Merck #1.06009.2500
Natriumacetat	Roth #6779.1
Natriumchlorid (NaCl <sub>2</sub> )	Roth #3952.2
Natriumcarbonat	Merck #1.06392.1000
Natriumdesoxycholat	Merck #1.06504
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva #20763
Natriumhydroxid	Merck # 6498.1000
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck #1.06346
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck #1.06580
NP40/Igepal	Sigma #I3021-100ml
OptiPhase 'Supermix'	Wallac (Perkin Elmer)
Paraformaldehyd (PFA)	Roth #0335.2
Pepstatin-A	Sigma #P4265
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Roth #A156.2
Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA)	Sigma #P 1585
PMSF	Roth #6367.3
Protein A-Sepharose CL-4S	GE Healthcare #17-0780-01
Protein G-Sepharose 4 Fast Flow	GE Healthcare #17-0618-02
Proteinase K	Roche, #03115879001

Reblot Plus Stripping Solution	Chemicon #2509
rHu IL-2	PromoKine #C-61240 (nicht mehr erhältlich)
Rotiphorese-30-Acrylamid	Roth #3029.1
Saccharose	Roth #4621.1
Salzsäure	Roth #4625.1
D-Sorbitol	Roth #6213
1-Step™ Ultra TMB-ELISA	Thermo Scientific #34028
TEMED	Roth # 2367.1
Tris-Base	Roth #AF15.3
Triton-X-100	Serva #37240

### 4.1.4 Kits

AmpliTaq DNA Polymerase (Applied Biosystems, Carlsbad/CA, USA)  
CD19 Micro beads human (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland)  
ECL und ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare München, Deutschland)  
Expand High Fidelity PCR System (Roche, Mannheim, Deutschland)  
NK Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland)  
QIAfilter Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)  
QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)  
QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)  
QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)  
QIAshredder (Qiagen, Hilden, Deutschland)  
QickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla/CA, USA)  
Stargate® (IBA GmbH, Göttingen, Deutschland)  
Superfect Transfection Reagent (Qiagen, Hilden, Deutschland)  
TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen, Carlsbad/CA, USA)

### 4.1.5 Enzyme

Alkalische Phosphatase  
(Calf Intestinal Phosphatase, CIP): NEB

DNA Restriktionsenzyme  
(ApaI, BamHI, BglII, EcoRI,  
MscI, NcoI, PmeI, PvuI, SacI,  
SmaI, Spe, SphI, XbaI): Fermentas, NewEngland Biolabs (NEB)

Endoglykosidase H (EndoH):	Roche
Neuraminidase (Sialidase)	Roche
N-Glykosidase F (PNGase F):	Roche
O-Glykosidase:	Roche
T4 DNA Ligase:	NEB oder Roche

### 4.1.6 Plasmide

p7.5k-gp68_5L-FLA:	Phillip Lacher, (Sprague et al., 2008)
p7.5k-gp68_1/2L-Flag:	Phillip Lacher, (Sprague et al., 2008)
pGene/V5-His B:	Invitrogen
pIRES2-EGFP:	Clontech
pSG5-Env_dell	Dr. Corinna Asang, AG Schaal, Institut für Virologie, Universität Düsseldorf
pTRL11ΔFlag:	Dr. Albert Zimmermann, AG Hengel, Institut für Virologie, Universität Düsseldorf

### 4.1.7 Oligonukleotide

Alle Primer wurden bei der Firma MWG synthetisiert. Die lyophilisierten Oligonukleotide wurden in DNase- und RNase-freiem Wasser aufgenommen und als 100mM Stocklösung bei -20°C gelagert.

#### **Primer für Klonierungen:**

MF-K6L-SpeI:	5'-TCTCACTAGTGGACCACTGGCGTTTTAAATC-3'
IRL11-1 (BamHI):	5'-GCTTAGGGATCCATGCAGACCTACAGCACCCC-3'
MF-ICOS-L-BglII:	5'-GAGGTAAGATCTCGCACCATGCGGCTGGGC-3'
MF-solhICOSL (SpeI):	5'-CTCTCACTAGTCGTGGCCGCGTTTTTC-3'
b-globin intron5:	5'-GAGAGATCTTGGAGGCCTAGGCTTTTGC-3'
b-globin intron3:	5'-GAGGAGCTCCAATTCTTTGCCAAAATGATGAG-3'

#### **Primer für Punktmutation:**

HR-mtrp-f1:	5'-GCCATCACAGCGTAGTCTTCCAGCGTTATGATATCTA-3'
HR-mtrp-r2:	5'-TAGATATCATAACGCTGGAAGACTACGCTGTGATGGC-3'

**Primer für Sequenzierung:**

BGHrev: 5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3'  
 MF-pIRES-in-seq: 5'-CTCCTGGGCAACGTGCTG-3'  
 pGene forw: 5'-CTGCTATTCTGCTCAACCT-3'  
 pIRESfor: 5'-GGTAGGCGTGTACGGTGG-3'  
 pIRESrev: 5'-CACCGGCCTTATTCC-3'

**Primer für StarGate® (IBA)-Klonierungen:**

Die Primer wurden mit einem 5'-Phosphat und 3'-Phosphorothioate hergestellt (Firma MWG).

MF-gp34K6L-P-for: 5'-AATGCAGACCTACAGCACCCCC-3'  
 MF-gp34K6L-P-rev: 5'-TCCCGGACCACTGGCGTTTTAAATCCG-3'  
 MF-gp68-5L-P-for: 5'-AATGTGTTCCGTACTGGCGATCG-3'  
 MF-gp68-5L-P-rev: 5'-TCCCGTCCTCGAACAGCGGGTTCG-3'

**4.1.8 Antikörper**

**4.1.8.1 Ungekoppelte Antikörper**

<b>Antikörper/ Epitop</b>	<b>Spezies</b>	<b>Applikation</b>	<b>Verdünnung, Menge</b>	<b>Hersteller</b>
IκBα (C-21)	K	WB	1:2000	Santa Cruz
<i>Strep</i> MAB	M	WB	1:1000	IBA GmbH
V5	M	WB	1:10000	Invitrogen
Fc(IgG)-Fragment	H	IP	2 µg	Rockland

**H:** Mensch, **IP:** Immunpräzipitation, **K:** Kanninchen, **M:** Maus, **WB:** Westernblot,

#### 4.1.8.2 Gekoppelte Antikörper

Antikörper/ Epitop/Protein	Kopplung	Spezies	Applikation	Verdünnung, Menge	Hersteller
$\alpha$ -IgD (H)	PE	M	F	3 $\mu$ l	BD Biosciences
$\alpha$ -IgG (H)	PE	M	F	3 $\mu$ l	BD Biosciences
$\alpha$ -IgG (H)	POD	Z	WB	1:1000	Sigma
$\alpha$ -IgM (H)	PE	M	F	3 $\mu$ l	BD Biosciences
$\alpha$ -Kanninchen	POD	Z	WB	1:5000	Sigma
$\alpha$ -Maus	POD	Z	WB	1:5000	Sigma
CD3 (H)	FITC,APC	K	F	0,5-3 $\mu$ l	BD Biosciences, Miltenyi Biotec
CD16 (H)	FITC, PE	M	F	2-3 $\mu$ l	BD Biosciences, Miltenyi Biotec
CD19 (H)	PerCP	M	F	2-3 $\mu$ l	BD Biosciences, Miltenyi Biotec
CD27	APC	M	F	3 $\mu$ l	BD Biosciences
CD56 (H)	PE	M	F	2-3 $\mu$ l	BD Biosciences, Miltenyi Biotec
CD107a (H)	PE-Cy5	M	F	3 $\mu$ l	BD Biosciences
Fc(IgG)-Fragment	FITC	M	F	1:200	Rockland
ICOS (H,M,R)	FITC	H	F	1:200	BioLegend
Strep-Tactin	PE	-	F	5 $\mu$ l	IBA GmbH
V5	FITC	Maus	F	1:400	Invitrogen

**F:** Durchflusszytometrie, **H:** Mensch, **K:** Kanninchen, **M:** Maus, **R:** Ratte, **WB:** Westernblot, **Z:** Ziege

#### 4.1.8.3 Antikörperpräparationen für *in vitro* Experimente

Für *in vitro* Analysen wurde die HER2-spezifische Antikörperpräparation Herceptin® (Trastuzumab) der Firma Roche und die  $\alpha$ -CMV-Hyperimmunglobulinpräparationen Cytotect® der Firma Biotest und Kiovig® der Firma Baxter AG benutzt. Humanes Serum wurde aus dem Blut freiwilliger Spender präpariert (Studiennummer: 3414, Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf).

#### 4.1.9 Zellkulturmedien und Zusätze

Alfazyme	PAA
DMEM ( <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> ) mit L-Glutamin und Natriumpyruvat:	GIBCO über Invitrogen
FCS (fetal calf serum)	GIBCO über Invitrogen
Geneticin G-418 Sulphate	GIBCO über Invitrogen
Natriumpyruvat (NaPyruvat)	GIBCO über Invitrogen
PBS ( <i>phosphate buffered saline</i> ):	GIBCO über Invitrogen
Penicillin-Streptomycin (PS, 10.000 U/ml)	GIBCO über Invitrogen
RPMI ( <i>Roswell Park Memorial Institute</i> ) 1640 mit GlutaMAX I, 25mM HEPES:	GIBCO über Invitrogen
RPMI 1640 ohne Cystein und Methionin:	Cambrex
Trypsin 2,5 %	GIBCO über Invitrogen

#### 4.1.10 Zellen

##### Zelllinien:

BW5147:	murine Thymom-Zelllinie (ATCC ( <i>American Type Culture Collection</i> ): TIB-47)
BW5147:hCD16 $\zeta$ :	hCD16 $\zeta$ -transfizierte BW5147-Zellen (Corrales-Aguilar, 2008)
CB-LCL-5-7-1	<i>centroblast-derived lymphoblastoid cell line</i> (Bechtel et al., 2005)
CHO:	<i>Chinese Hamster Ovary</i> -Zelllinie (TJIO und PUCK, 1958)
Daudi:	Burkitt B-Zell-Lymphom (ATCC: CCL-213)
ICOS-Ltk $\bar{c}$ :	ICOS-transfizierte Ltk- Zellen (Beier et al., 2000)
HEK293:	humane embryonal Nierenzellen (ATCC: CRL-1573)
HEK293T:	humane embryonale Nierenzellen (ATCC: CRL-11269)
Jurkat:	humane T-Zell-Leukämie (Schneider et al., 1977)
K562:	humane akute myelozytische Leukämie (ATCC: CCL-243)
LCL 721.221:	humane lymphoblastoide B-Zelllinie (Shimizu und DeMars, 1989)
Ltk $\bar{c}$ :	murine Fibroblasten (ATCC: CCL-1.3)
MRC-5:	humane Lungenfibroblasten (ATCC: CCL-171)
RPMI8866	humane B-Lymphozyten (ECACC: 95041316)
SKOV-3:	humane Ovar Adenokarzinom Zelle (ATCC: HTB-77)

Alle Zelllinien, außer die BW5147-Zellen und die BW5147:hCD16 $\zeta$ -Transfektanten wurden in DMEM mit 10 % FCS und 1 % PS kultiviert. Die murinen BW5147-Zellen und die BW5147:hCD16 $\zeta$ -Transfektanten wurden in RPMI 1640-Medium mit 10 % Penicillin/Streptomycin und 1 % NaPyruvat kultiviert.

### **Primäre Zellen:**

Humane Lymphozyten wurden aus dem Blut freiwilliger Spender isoliert. Die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf erlaubte die Blutentnahme und Isolierung von Blutbestandteilen für die Durchführung der Studie „Charakterisierung herpesviraler Proteine mittels Immunzellen und Serumkomponenten“ (Studiennummer: 3414). PBMCs und NK-Zellen wurden in DMEM mit 10 % Penicillin/Streptomycin kultiviert.

### **4.1.11 Viren**

#### **HCMV:**

HB5, (Borst et al., 1999)

HB5-  $\Delta$ gp34 ( $\Delta$ IRL/ $\Delta$ TRL11), Dr. H. Reinhard, Institut für Virologie, Universität Düsseldorf

HB5-  $\Delta$ gp68 ( $\Delta$ UL118), (Atalay et al., 2002)

HB5- $\Delta$ gp34/ $\Delta$ gp68 ( $\Delta$ UL118/ $\Delta$ IRL/ $\Delta$ TRL11), (Halenius et al., 2011)

### **4.1.12 Computer-Programme**

Die durchflußzytometrischen Daten wurden mit BD FACSDiva Software oder FlowJo (Tree star, Inc.) analysiert. Alle Grafiken wurden mit Powerpoint (Microsoft) zusammengestellt und bearbeitet. Alle Berechnungen und statistischen Tests wurden mit Excel (Microsoft) durchgeführt. Alle *in silico*-Analysen der Proteine wurden mit den online verfügbaren Vorhersageprogrammen auf der Internetseite <http://www.cbs.dtu.dk/services/> durchgeführt.

Bei der Analyse der Umgebung der 5'-Spleißstelle wurde der ESRsearch-Algorithmus auf der Internetseite <http://esrsearch.tau.ac.il/> zu Hilfe genommen.

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Zellkultur

Alle Zellen wurden bei 37°C, 80 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt in den unter Punkt 4.1.10 angegebenen Medien kultiviert. Zum Splitten der adhärenen Zellen wurde das FCS-haltige Medium entfernt, der Zellrasen einmal mit PBS gewaschen, danach abhängig von der Flaschengröße 0,5 bis 1 ml Trypsin (0,5% [v/v] in PBS) auf dem Zellrasen gut verteilt und wieder abgenommen. Bei sichtbarem Ablösen der Zellen von der Zellkulturflasche wurde die Trypsinwirkung mit frischem Medium gestoppt. Die Zellen wurden gut in dem Medium resuspendiert und anschließend ausplattiert. HEK293-, HEK293T- und stabil-transfizierte HEK293-Zellen wurden bei jedem Splitten auf eine neue Zellkulturflasche gesetzt, alle anderen Zellen wurden zwei- bis dreimal auf derselben Flasche kultiviert. Suspensionszellen wurden zum Splitten in ihrem Medium resuspendiert und ein Teil davon in frisches Medium gegeben.

#### 4.2.1.1 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Zur dauerhaften Aufbewahrung wurden alle Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Einfrieren der Zellen wurden diese in 1 ml Einfriermedium (90 % [v/v] FCS, 10 % [v/v] DMSO) aufgenommen, in Einfrieröhrchen überführt und über Nacht in Cryo-Einfrierbehältern (Qualifreeze, Qualilab) auf -80°C eingefroren. Zur dauerhaften Aufbewahrung wurden die Einfrieröhrchen in flüssigen Stickstoff übertragen. Zum Auftauen der Zellen wurde diese kurz im Wasserbad bei 37°C inkubiert, danach in ca. 5-10 ml frischem Medium aufgenommen und bei 120 bis 200 g zentrifugiert, um das Einfriermedium zu entfernen.

#### 4.2.1.2 Superfect-Transfektion von HEK293- und HEK293T-Zellen

Die Transfektion der HEK293-Zellen erfolgt grundsätzlich mit Superfect Reagenz (Qiagen). Die Zellen wurden am Vortag der Transfektion ausgesät, und am nächsten Tag bei ca. 80 %iger Konfluenz transfiziert. Dazu wurde das alte Medium abgenommen und neues Medium mit dem Transfektionsmix, nach Herstellerangaben (Qiagen) gemischt und inkubiert, zugegeben. Nach 13 bis 16 h Inkubation wurde das Transfektionsmedium entfernt und frisches Zellkulturmedium zugegeben.

### 4.2.1.3 Herstellung stabiler HEK293-Transfektanten

Die Transfektion von ca.  $7 \cdot 10^5$  HEK293-Zellen erfolgte in 6 wells mit Superfect-Transfektionsreagenz (s. 4.1.1.2). Am nächsten Tag wurde das Transfektionsmedium gegen Selektionsmedium (Medium mit 1,25 mg/ml Geneticin) ausgetauscht. Nach einem Tag Inkubation in Selektionsmedium wurde ein Viertel des 6 wells auf Hybridomenschalen ausplattiert, um die Zellen zu vereinzeln. Wachsende Zellklone wurden gepickt und unter Selektionsmedium expandiert. Die Klone bzw. der Zellüberstand wurden per Westernblot auf Proteinexpression getestet. Stark-exprimierende Klone wurden expandiert und in Stickstoff eingefroren.

### 4.2.2 Blutzellaufreinigung

#### 4.2.2.1 Erythrozytenlyse

Erythrozyten wurden mit dem Lyse Puffer „BD Pharm Lyse™“ nach Herstellerangaben lysiert. Die PBMCs wurden durch Zentrifugation (200 g, 5 min) anschließend abgetrennt.

#### 4.2.2.2 Präparation von PBMCs mithilfe von Lymphoprep™

PBMCs wurden durch Dichtezentrifugation mithilfe von Lymphoprep™ aus frischem EDTA-Blut oder Buffy coats (Blutbank, Uniklinikum Düsseldorf) präpariert. Dazu wurde in einem 50 ml Falcon 15 ml Lymphoprep™-Lösung vorgelegt und mit dem Blut, das 1:2 in PBS verdünnt wurde, überschichtet. Die Zentrifugation erfolgte nach Herstellerangaben für 25 min bei 800 g und 20 °C ohne Bremse. Der PBMC-Ring wurde danach vorsichtig mit einer 10 ml Pipette abgesaugt, die Zellen in 50 ml RPMI 1640-Medium (1 % [v/v] FCS) aufgenommen und für 10 min bei 300 g abzentrifugiert. Danach wurden die Zellen erneut in 50 ml RPMI-Medium (1 % [v/v] FCS) resuspendiert und bei 200 g zentrifugiert, um die Blutplättchen (Thrombozyten) von den PBMCs abzutrennen. Die PBMCs (im Zellpellet) wurden dann entweder direkt für die Proteinfärbungen verwendet, oder kultiviert.

#### 4.2.2.3 NK-Zell-Isolation

Um NK-Zellen aus Blut zu isolieren, wurden zuerst die PBMCs mithilfe der Dichtezentrifugation aufgereinigt (siehe 4.1.2.2). Anschließend wurden diese in RPMI 1640-Medium (10 [v/v] % FCS, 1 % [v/v] PS, 1 % [v/v] NaPyruvat) aufgenommen und für 3 h auf einer Zellkulturflasche (Zellen aus 40 ml Blut auf T75-Zellkulturflasche) ausplattiert, um

Makrophagen und Monozyten, die nach dem Ausplattieren sofort am Flaschenboden adhäreren, von den Lymphozyten abzutrennen. Nach 3 h konnten die Lymphozyten einfach von der Flasche abgespült und für die NK-Zellisolation eingesetzt werden. Für die NK-Zell-Isolation wurde anschließend das NK Cell Isolation Kit nach Herstellerangaben verwendet. Die isolierten NK-Zellen verblieben in Zellkultur oder wurden sofort für Experimente eingesetzt.

Für CD107a-Assays wurden die PBMCs nach Entfernen der Monozyten und Makrophagen über Nacht in RPMI 1640-Medium mit 100-200 U/ml humanem IL-2 inkubiert. Erst am nächsten Tag wurden die NK-Zellen isoliert.

### 4.2.3 Virologische Methoden

#### 4.2.3.1 Präparation eines gereinigten HCMV-Stocks

Die HCMV-Stocks wurden nach einem Protokoll von Dr. Vu Thuy Khanh Le (beschrieben in Le et al. 2008) präpariert, das eine Abwandlung des ursprünglichen Protokolls von Stinski (Stinski, 1976) darstellt.

#### **HCMV-Überstandsstock:**

Eine T175-Zellkulturflasche MRC-5-Zellen wurden mit Virus infiziert (MOI 0,05-0,5) und so lange inkubiert, bis alle Zellen infiziert waren und anfangen sich abzulösen (4 bis 10 Tage, je nach Virus und Start-MOI). Mit diesem Virusvorstock (Zellen und Überstand) wurden 20 bis 30 T175-Zellkulturflaschen MRC5-Zellen infiziert, indem der Überstand und die Zellen des Vorstocks gut resuspendiert und gleichmäßig auf alle Flaschen verteilt wurden. Die infizierten Zellen wurden unter Zugabe von Medium so lange inkubiert, bis alle Zellen infiziert waren und sich ablösten (7 bis 14 Tage, je nach Virus). Der Überstand der infizierten Zellen wurde in Zentrifugenbecher übertragen und für 10 min bei 5000 g (J2-21 Zentrifuge) und 15°C zentrifugiert, um Zellreste abzutrennen. Der Überstand, der das freie Virus enthält, wurde für 3 h bei 20.000 g (J2-21 Zentrifuge) und 15°C zentrifugiert, um die Viren zu pelletieren. Das Viruspellet wurde in 10 ml Überstandsmedium gelöst und mit einem vorgekühlten *Douncer* 20 Mal „gedouncet“ und danach in einem Ultrazentrifugenröhrchen über ein 20 %iges Sorbitolkissen (20 ml Sorbitolpuffer) geschichtet. Dieses Röhrchen wurde in einer Ultrazentrifuge für 75 min bei 60.000 g (OptimaL-K70 Beckman Ultrazentrifuge) und 10°C zentrifugiert, danach der Überstand verworfen, das Pellet je nach Pelletgröße mit 1 bis 2 ml

PBS überschichtet und mind. 3 h oder über Nacht auf Eis inkubiert. Das Viruspellet wurde in dem PBS resuspendiert, erneut 20-mal gedouct, und in Aliquouts bei -80°C eingefroren.

### **HCMV-Stock (kein Überstandsstock):**

Zur Erhöhung der Virusausbeute kann auch das Virus aus den infizierten Zellen geerntet werden. Dazu wurden die infizierten MRC-5 Zellen von den T175 Zellkulturflaschen abgekratzt und mit dem Überstand für 10 min bei 5.000 g (J2-21 Zentrifuge) und 15°C zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde 10 bis 20 ml Überstand gedouct und erneut für 15 min bei 5000 g (J2-21 Zentrifuge) und 15°C zentrifugiert. Der Überstand aus diesem Zentrifugationsschritt wurde mit dem Überstand der vorangegangenen Zentrifugation vereint und es wurde mit dem Protokoll, wie oben beschrieben (HCMV-Überstandsstock), fortgefahren.

### **Sorbitolpuffer:**

20 % (w/v) Sorbitol

1 mM MgCl<sub>2</sub>

50 mM Tris (pH 7,4)

100µg/ml Bacitracin

Der Puffer wurden nach dem Mischen sterilfiltriert (Porengröße: 0,45 µm).

### **4.2.3.2 Titration eines gereinigten HCMV-Stocks**

Die Titer der hergestellten HCMV-Stocks wurden auf MRC5-Zellen in einer Dreifachbestimmung ermittelt. Die MRC-5 Zellen wurden in 96-well-Zellkulturplatten ausgesät und bis zu einer ca. 80 %igen Konfluenz wachsen gelassen, um die Viren in seriellen 1:10 Verdünnungsschritten zu titrieren. Dazu wurde das Medium von den MRC5-Zellen abgesaugt, 180 µl frisches DMEM-Medium zugegeben und mit 20 µl Virussuspension gut vermischt. Mit einer neuen Pipettenspitze wurden 20 µl aus dieser Virusverdünnung ins nächste well übertragen. Die Titrationsplatten wurden anschließend zweimal bei 750 g und 25 bis 28 °C zentrifugiert und danach für 60 bis 72 h inkubiert. Der Nachweis HCMV-infizierter Zellen erfolgte mithilfe einer Immunfärbung, die das p52 HCMV-Antigen in infizierten Zellen nachweist. Für diese Färbung wurden die Zellen mit Methanol fixiert, dazu wurde das Medium abgesaugt und pro well 100 µl eiskaltes Methanol zugegeben. Die Titrationsplatte

wurde ü.N. (oder mind. 4 h) auf -20 °C gelagert. Danach wurde das Methanol vollständig von der Platte entfernt (gut trocknen lassen), und diese einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 50 µl primäre Antikörperlösung (CCH2 in 1 % (w/v) Milch in PBS) pro *well* zugegeben und für mind. 30 min bei RT inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper (POD-GaM in 1 % (w/v) Milch in PBS) für mind. 30 min bei RT. Danach wurde die Platte erneut zweimal mit PBS gewaschen und pro *well* 50 µl Substratlösung zugegeben. Die Platte wurde 15 bis 20 min im Dunkeln inkubiert. Das an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidaseenzym katalysiert die Oxidation des zugegebenen Farbstoffes AEC, der durch die Reaktion als roter Niederschlag sichtbar wird. Nach Ablauf der Reaktion wurde die Platte nochmals mit PBS gewaschen und die HCMV-infizierten Zellen konnten mithilfe des roten Niederschlags unter dem Lichtmikroskop ausgezählt und der Titer (pfu/ml) berechnet werden.

### **Substratlösung:**

1 Tablette 3-Amino-9-ethyl-carbazol (AEC) wird in 4 ml N,N-Dimethylformamid gelöst. Es werden 16 ml Natrium-Acetatpuffer (0,1 M, pH 5,5) zugeben und kurz vor Gebrauch werden 20 µl 30 %ige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pro 10 ml Lösung zugesetzt.

### **4.2.3.3 HCMV-Infektion *in vitro***

Um eine synchrone und gleichmäßige HCMV-Infektion *in vitro* zu erhalten, wurde bei jeder (ausgenommen HCMV-Virusstockpräparation) HCMV-Infektion (auch Titration) ein *centrifugal enhancement* durchgeführt. Dazu erfolgte die Infektion der Zellen in Plattenformaten, die es erlaubten nach der Zugabe des Virus, die Zellkulturplatten in einer Plattenfuge (Eppendorf 5810R) für 15 min bei 750 g und 25 bis 28 °C zu zentrifugieren.

## **4.2.4 Molekularbiologische Methoden**

### **4.2.4.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien**

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien wurde entsprechend der Menge zu präparierender DNA das „QIAprep Spin Miniprep Kit“ oder das „QIAfilter Plasmid Midi Kit“ der Firma Qiagen nach den Angaben des Herstellers eingesetzt.

### 4.2.4.2 Restriktionsverdau und -analyse von DNA

Für den analytischen Verdau wurden 0,2 bis 1 µg DNA, für den präparativen 1 bis 4 µg DNA, mit den notwendigen Restriktionsenzymen (TypII) nach Herstellerangaben für 1 bis 2h bei 37°C (oder anders vom Hersteller angegeben) verdaut. Der Restriktionsverdau wurde mit 6x TBE Probenpuffer versetzt und auf ein Agarosegel (0,5 bis 1,5 % Agarose in 1x TBE-Puffer), das bereits Ethidiumbromid (0,1 bis 0,5 µg/ml) enthielt, aufgetragen. Die Proben wurden bei 120 V aufgetrennt. Die DNA-Banden wurden unter UV-Licht (nm) sichtbar gemacht, die Hyperladder I (ebenfalls auf das Gel aufgetragen) diente als Größenstandard.

#### 6x TBE-Probenpuffer:

900 mM Tris Base

900 mM Borsäure

20 mM EDTA (pH 8,0)

#### 10x TBE-Puffer:

6x TBE

10 % (v/v) Glycerol

Bromphenolblau

### 4.2.4.3 Elution von DNA aus Agarosegelen

Das zu eluierende DNA-Fragment wurde unter UV-Licht (Exposition so kurz, wie möglich) aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ aus dem Gel eluiert.

### 4.2.4.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation linearisierter Vektorfragmente mit der jeweiligen zu inserierenden DNA (DNA-Insert) erfolgte mit der T4-DNA Ligase (Roche oder NEB) nach Herstellerangaben in 10 µl Ansätzen. Bei gleichen oder glatten Enden (*blunt ends*) des Vektorfragments wurde dieses vor der Ligation mit CIP (*calf intestine phosphatase*) nach Herstellerangaben dephosphoryliert, um eine Religation der kompatiblen Enden zu verhindern.

### 4.2.4.5 PCR

Präparative PCRs wurden mit „Expand High Fidelity PCR System“ (Roche, Mannheim, Deutschland), analytische PCRs mit dem Amplitaqkit durchgeführt.

### Präparativer PCR-Ansatz (20 bis 50 µl):

10-50 ng	PCR template (cDNA, Plasmid)
0,3-0,5 mM	dNTP-Mix
0,33 µM	Primer 1
0,33 µM	Primer 2
1x	PCR-Puffer (MgCl <sub>2</sub> -enthaltend)
1 U	Polymerase

Die PCR-Reaktion wurde in einem Thermocycler mit den folgenden typischen Programmschritten durchgeführt:

Initialer Denaturierungsschritt:	95°C; 5-10 min
25-35 wiederholende Zyklen:	
Denaturierung	95°C; 30 sec
Annealing	50-56°C (abhängig von Primern); 30 sec
Elongation	72°C; 0,5-2 min je nach <i>Template</i> -Länge
finaler Elongationsschritt:	72°C; 10 min.

#### 4.2.4.6 Sequenzierung von Plasmiden und PCR-Produkten

Alle Sequenzierungen von Plasmiden und PCR-Produkten wurden am BMFZ (Biomedizinisches Forschungszentrum) durchgeführt. Die erhaltenen Sequenzen, wurden mit den Computerprogrammen Chromas (Technelysium Pty Ltd), bioedit (Ibis biosciences) oder BLAST-Programm (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) analysiert und ausgewertet.

#### 4.2.4.7 Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien

Grundsätzlich wurde mit dem *Escherichia coli* –Stamm XL1-Blue (recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)], Stratagene) gearbeitet.

Für die Herstellung kompetenter Zellen wurden ca. 4 ml LB-Medium mit *E. coli*-Zellen angeimpft und über Nacht bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert. 1 ml dieser Übernachtskultur wurde zum Animpfen von frischem 100 ml LB-Medium genutzt, welches dann bei 37 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 bis 0,5 geschüttelt wurde. Für die Präparation der kompetenten Zellen wurde auf Eis gearbeitet. Die Kultur wurde in 50 ml Falcons für 10 min bei 3000 g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen, die Pellets in 50 ml 0,1 M MgCl<sub>2</sub> (auf Eis vorgekühlt) vereint und resuspendiert, 5 min auf Eis inkubiert, anschließend wieder

für 10 min bei 3000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen, das Pellet in 50 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub> (auf Eis vorgekühlt) resuspendiert, für 5 min inkubiert und erneut für 10 min bei 3000 g und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 2 ml 0,05 M CaCl<sub>2</sub>/15 % (v/v) Glycerol (auf Eis vorgekühlt) resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Aliquots von 50 µl wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

#### **4.2.4.8 Transformation chemisch-kompetenter Bakterien**

Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit der zu transformierenden DNA (z.B. 5 µl Ligationsansatz) versetzt und 25 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Bakterien 70 sec bei 42 °C inkubiert (Hitzeschock) und sofort auf Eis zurückgestellt. Nach ca. 2 min erfolgte die Zugabe von 1 ml vorgewärmtem LB-Medium, gefolgt von einer 30minütigen Inkubation bei 37 °C schüttelnd. Die Zellen wurden auf LB-Agar mit dem jeweiligen Selektionsantibiotikum (abhängig vom Plasmid) mit einem Drygalskispatel ausplattiert.

#### **4.2.4.9 Klonierung der löslichen Proteine**

Die Klonierung der kodierenden Sequenzen der löslichen Proteine ist im Folgenden näher beschrieben. Die eingesetzten Restriktionsenzyme der jeweiligen Klonierung wurden in Klammern vermerkt. Die klonierten Sequenzen wurden sequenziert und auf Richtigkeit überprüft.

##### **ICOS-L:**

Die Ektodomäne des humanen ICOS-L wurde mittels PCR und den Primern MF-ICOS-L-BglII und MF-solhICOSL (SpeI) von der cDNA HCMV(AD169)-infizierter (24 h) MRC-5-Zellen (cDNA hergestellt durch Dr. Vu Thuy Khanh Le) amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mit BglII und SpeI verdaut und mit dem Vektor pGene/V5-His B (BamHI / SpeI) ligiert. Die mit dem V5-His-Epitop versehene ICOS-L-Sequenz wurde in den pIRES2-EGFP-Vektor subkloniert.

##### **gp34<sub>1-179</sub>:**

Die Ektodomäne (AS 1-179) des HCMV-kodierten Fcγ-Rezeptors gp34 wurde mittels PCR und den Primern IRL11-1 und MF-K6L-SpeI von dem Plasmid pTRL11ΔFlag amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen BamHI und SpeI verdaut und in Vektor p7.5k-131A kloniert. Die kodierende gp34-Sequenz wurde in den Vektor pGene/V5-

His B umkloniert, um die V5-His-Epitopmarkierung *in frame* einzuführen. Die mit dem V5His<sub>6</sub>-Epitop versehene gp34<sub>1-179</sub>-Sequenz (BamHI / PmeI) wurde in den pIRES2-EGFP-Vektor (BglII / SmaI) subkloniert.

### **gp34<sub>1-179</sub>W65F:**

Die Punktmutation des Tryptophan (AS 65) von gp34 zu Phenylalanin wurde mittels des „QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit“ und den von Frau Dr. Henrike Reinhard entworfenen Primern HR-mtrp-f1 und HR-mtrp-r2 in den zuvor klonierten Vektor pIRES-Intron-gp34<sub>1-179</sub>-V5His<sub>6</sub> eingeführt.

### **gp68<sub>1-292</sub>:**

Die Ektodomäne (AS 1-292) des HCMV-kodierten Fcγ-Rezeptors gp68 wurde von dem Plasmid p7.5k-gp68<sub>5L</sub>-FLA (BglII / SpeI) in den pGene/V5-His B-Vektor (BamHI / SpeI) umkloniert. Die mit dem V5-His-Epitop versehene gp68<sub>1-292</sub>-Sequenz (SacI / PmeI) wurde in den pIRES2-EGFP-Vektor (SacI / SmaI) subkloniert.

### **gp68<sub>1-292/Δ31-71</sub>:**

Die Ektodomäne (AS 1-292/Δ31-71) von gp68 wurde aus dem Plasmid p7.5k-gp68<sub>1/2L</sub>-Flag (BglII / SpeI) in den pGene/V5-His B-Vektor (BamHI / SpeI) umkloniert. Die mit dem V5-His-Epitop versehene gp68<sub>1-292/Δ31-71</sub>-Sequenz (SacI / PmeI) wurde in den pIRES2-EGFP-Vektor (SacI / SmaI) subkloniert.

### **Insertion des β-Globin Introns:**

Um die Expression der löslichen Proteine zu verstärken wurde das β-Globin Intron in die pIRES2-EGFP-Expressionsplasmide zwischen den Promotor und der jeweiligen kodierenden Sequenz der viralen Fcγ-Rezeptoren kloniert. Dazu wurde zuerst das β-Globin Intron mittels PCR und den Primern b-Globin intron5 und b-Globin intron3 aus dem pSG5-Env<sub>del1</sub>-Plasmid amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde entweder direkt über die BglII- und SacI-Restriktionsschnittstellen in die zuvor klonierten Vektoren pIRES2-EGFP-gp68<sub>1-292</sub>-V5His<sub>6</sub> und pIRES2-EGFP-gp68<sub>1-292/Δ31-71</sub>-V5His<sub>6</sub> kloniert oder mit Hilfe des TOPO TA Cloning® Kit nach Herstellerangaben in den pcr2.1-TOPO-Vektor eingeführt und anschließend mit einem NheI-Restriktionsverdau in den pIRES2-EGFP-gp34<sub>1-179</sub>-V5His<sub>6</sub> subkloniert.

Aufgrund der ungerichteten Klonierung (NheI-Restriktionsverdau) wurde die angestrebte Richtung des  $\beta$ -Globin Introns anschließend mit einem ApaI-Verdau überprüft.

### **4.2.4.10 StarGate®-Klonierung der löslichen Proteine**

Die Ektodomänen der viralen Proteine gp34 und gp68 wurden ebenfalls in die Expressionsvektoren pESG-IBA144 und pESG-IBA142 des Stargate®-Klonierungssystems der Firma IBA kloniert. Die Ektodomänen wurden nach Herstellerangaben per PCR mit den Primerpaaren MF-gp34K6L-P-for/MF-gp34K6L-P-rev und MF-gp68-5L-P-for/MF-gp68-5L-P-rev aus den Plasmiden pIRES2-EGFP-gp34<sub>1-179</sub>-V5His<sub>6</sub> bzw. pIRES2-EGFP-gp68<sub>1-292</sub>-V5His<sub>6</sub> amplifiziert. Die anschließende Klonierung der PCR-Produkte erfolgte nach Herstellerangaben.

### **4.2.4.11 Zielgerichtete Mutagenese**

Der Austausch einer einzelnen Aminosäure wurde durch die zielgerichtete Mutation von Nukleotiden (nt) innerhalb des entsprechenden kodierenden Codons mit Hilfe des „QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit“ durchgeführt. Die Mutagenese erfolgte nach Herstellerangaben.

## **4.2.5 Proteinbiochemische und immunologische Methoden**

### **4.2.5.1 Aufreinigung His-getaggtter Proteine**

Die Aufreinigung löslicher His-getaggtter Proteine aus dem Überstand von eukaryontischen Zellen erfolgte über immobilisierte Metallion-Affinitätschromatographie (IMAC). Für His-getaggtte Proteine wird dabei meist Nickel (Ni<sup>2+</sup>) verwendet, welches über eine Chelatgruppe an der Matrix (z.B. Agarose) befestigt wird.

Die Proteinaufreinigung wurde mit Hilfe einer *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC)-Anlage (Äkta™ Basic System) der Firma GE Healthcare durchgeführt. Die Nutzung eines solchen Systems hatte u.a. den Vorteil große Mengen an Überstand automatisch über die Nickelsäule fördern zu lassen.

Für die Aufreinigung der Proteine wurde der Überstand von 15 bis 25 T175-Zellkulturflaschen (ca. 300 bis 400 ml Überstand) benötigt. Um einen FCS-freien Überstand für die Proteinaufreinigung zu erzeugen wurden die jeweiligen stabil-transfizierten HEK293-Zellen bis zu einer 80-100 %igen Konfluenz kultiviert. Danach wurde das Medium

abgenommen und mit DMEM-Medium (ohne FCS, 1 %PS) ersetzt. Die Zellen wurden 4-6 Tage in diesem Medium kultiviert. Um Zellreste aus dem Überstand zu entfernen wurde das Medium in Zentrifugenbecher übertragen und bei 3000 g für 15 min zentrifugiert. Dieser Überstand wurde dann in einen neuen Zentrifugenbecher gegeben und bei 20.000 g für 1 h zentrifugiert. Um die Nickelsäulen bei der Proteinbeladung zu schonen und die Bindung der His-getaggten Proteine zu optimieren, sollte wenn möglich das Medium gegen Bindepuffer ausgetauscht werden. In der hier durchgeführten Proteinaufreinigung wurde der Ausgangsüberstand mithilfe von Zentrifugation (3000 g, 4°C, Ausschwingrotor) durch Filtriersäulchen (vorher mit PBS äquilibriert) mit einem 15 bzw. 30 kDa Ausschlussvolumen (Amicon) auf 60 bis 100 ml eingengt. Dieser Überstand wurde dann mit sterilem PBS 1:3 verdünnt und mit Elutionspuffer auf 10 mM (gp34) oder 15 mM (gp68, ICOS-L) Imidazol eingestellt. Dieser Überstand wurde dann mit dem Äktsystem auf die Ni-Säule (1 ml HisTRAP FF crude) geladen. Für die Proteinaufreinigung wurden die in Tab. 4.3 aufgeführten Programmschritte durchgeführt.

**Programm zur Aufreinigung der His-markierten Proteine über eine 1 ml HisTRAP FF crude-Säule am Äktasystem**

Programmschritt	Imidazolkonzentration [mM]	Flussrate [ml/min]	Anzahl der Säulenvolumen
<b>Equilibrieren der Säule</b>	10 (für gp34) 15 (für gp68)	1	≥ 5 (bis stabile Basislinie)
<b>Laden des Überstandes</b>	Überstand bereits mit Imidazol versetzt	1	gesamter Überstand
<b>Waschen</b>	0	1	10
	10	1	5
	20	1	5
	25	1	5
nur für gp68, sICOSL	30	1	5
<b>Elution</b>	250	1	10
<b>Regenerieren der Säule</b>	500	1	5
	10	1	5

**Phosphatpuffer:**

20 mM Natriumphosphat

500 mM NaCl<sub>2</sub>

**Imidazolpuffer:**

20 mM Natriumphosphat

500 mM NaCl<sub>2</sub>

500 mM Imidazol

**4.2.5.2 Entsalzen und Aufkonzentrieren der aufgereinigten Proteine**

Die mittels Affinitätschromatographie aufgereinigten Proben wurden direkt nach der Elution mithilfe eines AMICON-Filters entsalzt und aufkonzentriert. Das Eluat wurde dazu durch Amicon-Filtriersäulchen (vorher mit PBS äquiliert) mit einem 15 kDa (gp34) bzw. 30 kDa (gp68, ICOS-L) Ausschlussvolumen zentrifugiert (3200 g, 4°C, Ausschwingrotor) Dabei wurde darauf geachtet, dass die Flüssigkeit nicht vollständig durch den Filter zentrifugiert

wurde, um zu verhindern, dass sich das Protein am Filter festsetzt. Der restliche Überstand wurde 1:10 mit PBS verdünnt und erneut durch das Amicon-Filtriersäulchen zentrifugiert. Dies wurde 4mal wiederholt. Die Proteine wurden anschließend aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

### 4.2.5.3 Herstellung von Gesamzelllysaten für Westernblot-Analysen

Die zu lysierenden Zellen wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß oder 15 ml Falcon überführt, adhärente Zellen wurden dazu mit einem Zellschaber von dem Zellkulturgefäß gelöst, bei 100 bis 300 g abzentrifugiert und anschließend dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde anschließend in Lysepuffer resuspendiert und entweder bei -20 °C eingefroren (LUC-Lysispuffer aus dem Luciferase Reporter Gene Assay, high sensitivity von Roche) oder 25 min auf Eis inkubiert (RIPA-Lysispuffer). Nach dem Auftauen bzw. 25 minütiger Inkubation wurden die Lysate für 30 min bei 4 °C und 16.000 g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand sofort in ein neues Reaktionsgefäß übertragen, weiterverarbeitet oder bei -20 °C weggefroren.

#### **RIPA-Lysispuffer:**

50 mM	TrisHCl; pH 7,5
150 mM	NaCl
1 % (v/v)	IGEPAL
1 % (w/v)	Na-Deoxycholate
0,1 % (w/v)	SDS
1 mM	DTT
0,2 mM	PMSF
1 µg/ml	Leupeptin
1 µg/ml	Pepstatin
50 mM	NaF
0,1 mM	Na-Vanadat (aktiviert)
Complete Protease Inhibitors (Roche)	

### 4.2.5.4 Acetonfällung

Ein Teil Proteinlösung (z.B. Zellkulturüberstand) wurde mit 2 Teilen eiskaltem Aceton gut gemischt und 20 min bei 4 C und 16.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde gut abgesaugt,

das Pellet ca. 10 min bei RT trocknen gelassen und in PBS bzw. in 1,5x SDS-Probenpuffer resuspendiert.

#### 4.2.5.5 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE (Laemmli, 1970) werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Interaktion der SDS-Moleküle mit den Proteinen führt zur Denaturierung und Neutralisierung der Eigenladung der Proteine, aufgrund derer nur noch die molekulare Masse der Proteine Einfluss auf ihre Laufgeschwindigkeit nehmen kann.

Die Auftrennung von Proteine erfolgte in einem diskontinuierlichen Gel, bei dem das Polyacrylamid-Trenngel mit einem Polyacrylamid-Sammelgel überschichtet wurde. Der Anteil von Polyacrylamid am Trenngelvolumen bestimmt dabei die Stärke der Vernetzung (Trenngelprozentigkeit).

In der folgenden Übersicht ist das Pipettierschema für SDS-Gele angegeben.

	2 kleine Gele				2 mittelgroße Gele			
	Trenngel			Sammelgel	Trenngel			Sammelgel
	8%	10%	12%		8%	10%	12%	
Polyacrylamid 30% [ml]	3,2	4	4,8	1,5	19,2	24	28,8	6
Tris/HCl 2 M; pH8,0 [ml]	2,5	2,5	2,5	-	15,2	15,2	15,2	-
Tris/HCl 0,5 M; pH 6,8 [ml]	-	-	-	1,2	-	-	-	4,8
SDS 20% (w/v) [µl]	60	60	60	45	360	360	360	180
Saccharose 60% (w/v) [ml]	-	-	-	2,1	-	-	-	8,4
dest. Wasser [ml]	6,1	5,3	4,5	4,2	36,6	31,8	27	16,8
Temed [µl]	24	24	24	12	144	144	144	48
APS 10% (w/v) [µl]	144	144	144	120	800	800	800	240

Die Proteinproben wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und vor dem Auftragen auf das Gel für 5 min bei 95 °C erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte für die kleinen Gele bei 20 mA pro Gel für 60 bis 90 min bei RT. Die mittleren Gele wurden über Nacht bei 4°C mit für 17 h mit folgender Einstellung laufen gelassen:

1 Gel: 10 mA, 60 V

2 Gele: 10 mA, 100 V.

**5x SDS-Probenpuffer:**

0,5 M Tris/HCl (pH 6,8)  
25 % (v/v) Glycerol  
2 % (w/v) SDS  
2 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol  
Bromphenolblau

**10x Lämmli-Puffer:**

252 mM Tris  
1,92 M Glycin  
1 % (w/v) SDS

### 4.2.6 Immunologische Methoden

#### 4.2.6.1 Westernblot

Die aufgetrennten Proteinbanden aus der SDS-Page wurden mittels des Halbtrocken (*semi dry*)-Blotverfahrens (Kyhse-Andersen, 1984) auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Dazu wurden zwischen zwei Plattenelektroden auf die Anode in der angegebenen Reihenfolge 3 in Blotpuffer getränkte Whatman-Papiere, die in Blotpuffer äquilibrierte Nitrozellulosemembran und dann das SDS-Gel übereinander geschichtet, dabei sollten sich zwischen SDS-Gel und Nitrozellulosemembran keine Luftblasen befinden. Anschließend wurden wieder 3 in Blotpuffer getränkte Whatman-Papiere darüber gelegt. Die Proteine wurden durch das Blotting bei 1.000 mA, 13-16V (je nach Größe und Anzahl der Membran) für 80 min auf die Membran übertragen. Dies wurde in einer anschließenden Ponceaufärbung überprüft, bei der die Ponceaulösung mit der Membran kurz inkubiert wurde. Nach dem die unspezifische Färbung mit Wasser gewaschen wurde, konnte man die Proteinbanden zwischen den einzelnen Spuren vergleichen, und somit die gleiche Beladung und die Qualität des Blotverfahrens überprüfen. Danach wurde die Färbung mit TBST gewaschen, und die Membran in 5%-Milchpulver in TBST (w/v) für mind. 45 min inkubiert. Nach der Blockierung wurde die Membran mit dem Primärantikörper (in 1-3% Milchpulver in TBST) für mindestens 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nachdem die Membran 3x 5 min mit TBST gewaschen wurde, erfolgte die Inkubation mit dem Peroxidasegekoppelten Sekundärantikörper (in 1-3% Milchpulver in TBST) für mind. 45 min bei RT. Für die anschließende Detektion wurde die Membran 3x 5 min mit TBST gewaschen, zwischen 2 Whatman-Papieren kurz getrocknet mit der Entwicklerlösung (ECL-Kit) 5 min inkubiert, wieder getrocknet und in Frischhaltefolie gewickelt. Mit den entsprechenden Filmen (Amersham Hyperfilme ECL) wurden die Proteinbanden sichtbar gemacht.

**10x Semidry-Blotpuffer:**

480 mM Tris Base  
280 mM Glycin  
20% (v/v) Methanol

**10x TBST:**

0,1 M Tris/HCl (pH 8,0)  
1,5 M NaCl  
5% (v/v) Tween 20

### 4.2.6.2 Durchflusszytometrie

Bei der durchflusszytometrischen Analyse, auch oft als FACS (*Fluorescence activated cell sorting*)-Analyse bezeichnet, wird hauptsächlich die Proteinexpression an der Zelloberfläche untersucht. Mittlerweile wird die durchflusszytometrische Analyse aber auch zum Nachweis von intrazellulären Proteinen eingesetzt. Die Analysen wurden am BD FACS-CANTOII Durchflusszytometer durchgeführt.

#### **FACS-Analyse von Fc $\gamma$ -Fragment-Bindung an HCMV-infizierte Zellen:**

MRC-5-Zellen, uninfiziert oder infiziert mit HCMV wurden mit PBS gewaschen, mit Trypsin (Stocklösung 1:10 verdünnt) bei 37°C für 2 min inkubiert, sofort danach in FACS-Puffer (PBS mit 3%FCS) aufgenommen und zweimal in diesem gewaschen. FITC-gekoppeltes humanes Fc $\gamma$ -Fragment wurde 1:100 (Endkonzentration: 10  $\mu$ g/ml) in FACS-Puffer verdünnt, die Zellen (ca.  $2 \times 10^5$  Zellen/Ansatz) wurden jeweils in 50  $\mu$ l FACS-Puffer mit FITC-Fc $\gamma$ -Fragment oder ohne resuspendiert und im Dunkeln (Lichtempfindlichkeit des Fluorochroms) auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden danach zweimal gewaschen, um überschüssiges FITC-Fc $\gamma$ -Fragment zu entfernen, in 300  $\mu$ l FACS-Puffer aufgenommen und kurz vor der Messung mit DAPI (Endkonzentration 0,1-0,5  $\mu$ g/ml) versetzt.

#### **FACS-Analyse von Proteinbindung an Zelllinien und Blutzellen:**

Die zu untersuchenden Zellen wurden in FACS-Puffer gewaschen, und mit löslichem Protein auf Eis für 45-60 min inkubiert. Die Zellen wurden danach zweimal gewaschen und mit FITC-gekoppeltem  $\alpha$ -V5-Antikörper inkubiert, um gebundenes Protein zu detektieren. Für die Analyse von Blutzellen wurden in diesem Schritt ebenfalls Antikörper (jeweils Fluorochromgekoppelt) gegen typische Lymphozytenmarker wie CD3, CD16, CD56, CD19 usw. zugegeben, um so die verschiedenen Lymphozytenpopulationen bei der FACS-analyse definieren zu können. Die Zellen wurden 25-40 min im Dunkeln auf Eis inkubiert, zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und in 200-300  $\mu$ l FACS-Puffer aufgenommen. Kurz vor der Messung wurde DAPI zugesetzt (Endkonzentration 0,1-0,5  $\mu$ g/ml).

### **FACS-Puffer:**

3 % (v/v) FCS in PBS

### **4.2.6.3 Präzipitationsanalysen mit Fc $\gamma$ -Fragment**

#### **Präzipitation aus dem Lysat radioaktiv-markierter Zellen:**

Für die radioaktive Präzipitation wurden die Zellen (in 6-wells ausgesät) mit radioaktivem L-Methionin und L-Cystein markiert. Dazu wurden die Zellen zuerst mit warmem PBS/ 3 % FCS gewaschen und anschließend 1 h in L-Methionin und L-Cystein-freiem Medium inkubiert (gehungert). Anschließend wurden das alte Hungermedium gegen neues Hungemedium (1 ml/well), zu dem 10  $\mu$ l (~10 MBq/~10<sup>6</sup> Zellen) EasyTag Express <sup>35</sup>S *protein labeling mix* (PerkinElmer) pro 6-well zugegeben wurden, ausgetauscht. Je nach Versuch wurden die Zellen für 30-90 min im radioaktivem Medium inkubiert, danach im well dreimal mit PBS gewaschen und mit IP-Lysispuffer (1 ml pro 6-well) für 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden mit dem Lysispuffer von der Platte gespült und für 30 min bei 16700 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit humanem Fc $\gamma$ -Fragment (2  $\mu$ g) versetzt und bei 4°C rotiert. Nach 1-2 h wurde PAS (30  $\mu$ l/Ansatz, zuvor dreimal in Waschpuffer B gewaschen) zugesetzt und alles erneut für 1 h bei 4°C rotieren gelassen. Die Sepharose wurde durch Zentrifugation (10000rpm, 30 sec, 4 °C) pelletiert, und auf diese Weise dreimal mit 1 ml Waschpuffer B, zweimal mit Waschpuffer C und einmal mit Waschpuffer D gewaschen. Die Sepharosepellets wurden trocken gesaugt, für die Deglykosylierung wurden die Pellets in dem entsprechenden Puffer aufgenommen, 5 min bei 95 °C aufgeköcht, abkühlen gelassen, um dann das Enzym zuzusetzen und über Nacht bei 37 °C zu inkubieren. Die entsprechenden unverdauten Kontrollen wurden gleich behandelt, Enzym wurde hier natürlich nicht zugesetzt. Anschließend wurden die Proben mit Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95 °C inkubiert und auf ein großes oder mittleres SDS-Gel aufgetragen. Nach der SDS-PAGE wurde das Gel in IP-Fixierpuffer fixiert und entwässert und im Gelrockner getrocknet. Die Proteine wurden durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

#### **Präzipitation aus dem Überstand radioaktiv-markierter Zellen:**

Um radioaktive Proteine aus dem Überstand zu präzipitieren wurden die Zellen über Nacht (ca.12-16 h) gelabelt (s. oben). Der Überstand wurde abgenommen und bei 280 g 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut bei 20 min bei 4 °C zentrifugiert. Der

Überstand wurde in einem Ultrazentrifugenröhrchen über ein 20 %iges Sorbitolkissen (20 ml Sorbitolpuffer) geschichtet und bei 70 min bei 60.000 g (OptimaL-K70 Beckman Ultrazentrifuge) und 10°C zentrifugiert. Der Überstand wurde auf 1,5 ml-safe lock-Eppis verteilt und mit jeweils 30 µl CNBr-Sepharose 1 h bei 4 °C drehend inkubiert (*pre-clearing*). Die Sepharose wurde im Anschluss abzentrifugiert der Überstand mit Fcγ-CNBr-Sepharose erneut 1 bei 4 °C drehend inkubiert. Anschließend mit dem Sepharose-Pellet, wie oben erläutert, verfahren.

### **Fcγ-CNBr-Sepharose:**

Fcγ-Fragment wurde laut Herstellerangaben an Cyanbromid (CNBr)-aktivierte Sepharose (Amersham Biosciences) gekoppelt.

### **Präzipitation mittels Sepharose-gekoppeltem Fcγ-Fragment (nicht-radioaktiv):**

Für die Fcγ-Präzipitation aufgereinigter löslicher Proteine wurde diese entweder in 500 µl IP-Lysispuffer oder DMEM-Medium (1 %FCS, 1 %PS) resuspendiert und mit Fcγ-CNBr-Sepharose (5-12 µl/Ansatz) oder CNBr-Sepharose allein für 1 h rotierend bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Sepharose ähnlich wie PAS mittels Zentrifugation präzipitiert und mit den IP-Waschpuffern (siehe oben) gewaschen.

### **IP-Lysepuffer:**

140 mM NaCl  
5 mM MgCl<sub>2</sub>  
20 mM Tris/HCl (pH 7,6)  
1 % (v/v) Nonidet P-40  
1 mM PMSF (frisch zugeben)  
10 µM Leupeptin (frisch zugeben)  
1 µM Pepstatin (frisch zugeben)

### **Waschpuffer B:**

150 mM NaCl  
10 mM Tris/HCl (pH 7,6)  
2 mM EDTA  
0,2 % (v/v) Nonidet P-40

### **Waschpuffer C:**

500 mM NaCl  
10 mM Tris/HCl (pH 7,6)  
2 mM EDTA  
0,2 % (v/v) Nonidet P-40

### **Waschpuffer D:**

10 mM Tris/HCl (pH 8)

### **4.2.6.4 Präzipitation mit Sepharose-gekoppelten löslichen Proteinen**

Die löslichen Proteine wurden laut Herstellerangaben an CNBr-aktivierte Sepharose gekoppelt. Die gekoppelte Proteinmenge wurde im Westernblot ( $\alpha$ -V5-AK) verglichen. Die Protein-gekoppelte Sepharose wurde mit Zelllysaten (Lyse mit IP-Lysepuffer) drehend ca. 2 h bei 4 ° inkubiert. Die weiteren Abläufe wurden im vorherigen Absatz 4.2.6.3 bereits geschildert.

### **4.2.6.5 Deglykosylierung von Proteinen**

#### **Deglykosylierung mit Hilfe der Enzyme Endo H und PNGase F:**

Die Enzyme Endo H und PNGase F schneiden nur N-glykosidische Bindungen, die sich an Asparaginresten befinden. Das Enzym Endo H schneidet dabei nur zwischen den N-Acetylglucosaminresten des N-Glykans vom Oligomannose-Typ oder Hybrid-Typ und hinterlässt dabei jeweils einen N-Acetylglucosaminrest. N-Glykane vom komplexen Typ können von der Endo H nicht hydrolysiert werden. Das Enzym PNGase F kann im Gegensatz zur Endo H alle Asparagin-gebundenen N-Glykane spalten, unabhängig von deren Komplexität.

Zur Endo H-Deglykosylierung von präzipitierten Proteinen wurde das Sepharosepellet in 1x Endo H-Puffer aufgenommen, kurz durch Vortexen gemischt und für 5 min bei 95°C inkubiert. Nach kurzem Abkühlen auf Eis wurden 6  $\mu$ l 1 M  $\beta$ -Mercaptoethanol und 5 mU Endo H dazu gegeben. Der Reaktionsmix wurde für mindestens 4 h oder über Nacht bei 37 °C inkubiert.

#### **5x Endo H-Puffer**

250 mM Na-Phosphat (pH 5,0)

100 mM EDTA

0,1 % (w/v) SDS

1 % (v/v) Nonidet P-40

Für die Deglykosylierung aufgereinigter rekombinanter Proteine oder Proteinlysaten wurden folgende Reaktionsansätze gefertigt:

**PNGase F –Verdau:**

x µl Protein oder Proteinlysate  
6 µl PNGase F-Puffer  
2 µl PNGase F  
auf 30 µl mit PBS auffüllen

**Endo H-Verdau:**

x µl Protein oder Proteinlysate  
6 µl Endo H-Puffer  
3 µl 1 M β-Mercaptoethanol  
2 µl Endo H  
auf 30 µl mit PBS auffüllen

Die Reaktionen wurden mindestens 4 h oder aber über Nacht bei 37 °C inkubiert.

**5x PNGase F-Puffer**

250 mM Na-Phosphat (pH 6,5)  
50 mM EDTA  
1 % (w/v) SDS  
1 % (v/v) Nonidet P-40  
1 % (v/v) 1 M β-Mercaptoethanol

**Deglykosylierung durch Alkali-katalysierte β-Eliminierung:**

O-Glykosylierungen, die über die Hydroxylgruppe von Serin oder Threonin mit dem Protein verknüpft sind, können über Alkali-katalysierte β-Eliminierung vom Protein abgelöst werden. Die Freisetzung O-glykosidisch verknüpfter Zucker unter alkalischen Bedingungen in Anwesenheit eines reduzierenden Agens wie NaBH<sub>4</sub> wurde schon 1968 zur Analyse von Oligosacchariden benutzt (Carlson, 1968). Eine Weiterentwicklung dieser Methode ist die β-Eliminierung in DMSO (Downs et al., 1973; Fukuda, 2001).

Für die β-Eliminierung wurde der Überstand von HEK293-Transfektanten zweier 6-wells mit Aceton gefällt und in 160 µl H<sub>2</sub>O bidest gelöst. Es wurde folgender Reaktionsmix angesetzt:

20 µl Protein (aus Acetonfällung)  
92 µl Protein  
200 µl DMSO  
68 µl 0,425 M KOH  
20 µl Ethanol (100%)

Der Reaktionsmix wurde für 0, 10, 20 oder 40 Minuten bei 45 °C inkubiert. Zu den gegebenen Zeitpunkten wurde die Reaktion gestoppt indem 1 ml Aceton zugegeben wurde und die Proteine erneut gefällt wurden.

### 4.2.6.6 IL-2 Elisa

IL-2 wurde in einem sogenannten „Sandwich“-ELISA gemessen. Dazu wurde der *Capture*-Antikörper ( $\alpha$ -IL-2, 1  $\mu$ g/ ml) mit 50  $\mu$ l ELISA-Bindepuffer über Nacht bei 4°C oder 3 h bei 37 °C an die ELISA-Platten gekoppelt. Die Platte wurde anschließend mit 10 % FCS in PBS für mind. 1 h bei RT blockiert, danach dreimal mit ELISA-Waschpuffer gewaschen. Die ELISA-Platte wurde mit dem IL-2-haltige Überstand (1:2 verdünnt in ELISA-Probenpuffer, 100  $\mu$ l/well) beladen und über Nacht bei 4 °C inkubiert (auch 3 h bei 37°C möglich). Anschließend wurde die Platte dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem biotinylierten Detektionsantikörper ( $\alpha$ -IL-2 1  $\mu$ g/ ml) für 1-2 h bei RT, nach der die Platte erneut dreimal mit Waschpuffer gewaschen wurde. Es wurden nun 50  $\mu$ l Peroxidasegekoppeltes Streptavidin (1:1000 in ELISA-Probenpuffer) pro well zugegeben und für 30 min bei RT inkubiert. Danach wurde viermal mit Waschpuffer gewaschen und die Substratzugabe erfolgte. Dazu wurden 50  $\mu$ l 1-Step™ Ultra TMB-ELISA-Lösung pro well zugegeben und bis zum sichtbaren Farbumschlag inkubiert. Der Farbumschlag wurde sofort mit 50  $\mu$ l/well ELISA-Stopplösung (1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) gestoppt.

**ELISA-Bindepuffer:**

0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

pH 9.0

**ELISA-Probenpuffer:**

10 % FCS in PBS

0,1 % Tween-20

**ELISA-Waschpuffer:**

0,1 % Tween-20 in PBS

**ELISA-Stopplösung:**

1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

### 4.2.7 BWFC $\gamma$ R- $\zeta$ -Assay

Das BWFC $\gamma$ R- $\zeta$ -Assay ist ein neues Assay mit dem antikörper-abhängige Aktivierung von zellulären Fc $\gamma$ -Rezeptoren gemessen werden kann. Die BWFC $\gamma$ R- $\zeta$ -Transfektanten, die die jeweiligen extrazellulären Domänen der Fc $\gamma$ -Rezeptoren fusioniert mit der CD3 $\zeta$ -Kette exprimieren, dienen dabei als Reporterzellen, die nach Aktivierung des jeweiligen Fc $\gamma$ -

Rezeptors durch Antikörper IL-2 in den Überstand produzieren. Dieses IL-2 kann dann leicht im Elisa gemessen werden. Dieses BWFcγR-ζ-Assay wurde von Eugenia Corrales-Aguilar etabliert und ist in ihrer Doktorarbeit (Corrales-Aguilar, 2008) ausführlich beschrieben.

### **4.2.7.1 Lösliche Proteine im BWFcγR-ζ-assay**

#### **Aktivierung der BW5147:hCD16ζ-Zellen durch Platten-gebundenes IgG:**

IgG wurde an 96-well-Zellkulturplatten gekoppelt, indem die IgG-Präparation in sterilem ELISA-Bindpuffer verdünnt und 50 µl Antikörperverdünnung pro 96-well über Nacht bei 4°C oder 3 h bei 37 °C mit der Zellkulturplatte inkubiert wurden. Die Platte wurde anschließend mit DMEM, 10 %FCS, 1 % PS für mind. 30 min bei RT blockiert, danach dreimal mit Medium gewaschen. Pro well wurden  $1 \times 10^5$ - $2 \times 10^5$  BWFcγR-ζ-Transfektanten in 50 µl RPMI-Medium und die löslichen Proteine, ebenfalls in 50 µl RPMI-Medium zugegeben. Die Ko-Kultivierung erfolgte ÜN (ca. 16 h) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Danach wurde 100 µl Elisa-Probenpuffer pro well zugeben und mit dem Überstand gemischt. Dieser wurde dann entweder bei -20°C eingefroren oder direkt im IL-2 Elisa gemessen.

#### **Aktivierung der BW5147:hCD16ζ-Zellen durch präformierte Immunkomplexe:**

SKOV-3-Zellen oder HMCV-infizierte MRC5-Zellen wurden in 96well-Zellkulturplatten ausgesät. Für die Antikörperopsonisierung wurde das Medium abgesaugt, die Zellen einmal mit Medium gewaschen und mit der jeweiligen Antikörperpräparation (verdünnt in Zellkulturmedium, ca. 60 µl) inkubiert. Die Antikörperinkubation erfolgte für 30-60 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Die Zellen wurden dann dreimal mit Medium gewaschen, um die überschüssigen Antikörper zu entfernen. Pro well wurden  $1 \times 10^5$ - $2 \times 10^5$  BWFcγR-ζ-Transfektanten in 50 µl RPMI-Medium und die löslichen Proteine, ebenfalls in 50 µl RPMI-Medium zugegeben. Die Ko-Kultivierung erfolgte über Nacht (ca. 16 h) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Danach wurde 100 µl Elisa-Probenpuffer pro well zugeben und mit dem Überstand gemischt. Dieser wurde dann entweder bei -20°C eingefroren oder direkt im IL-2 Elisa gemessen.

#### **Aktivierung der BW5147:hCD16ζ-Zellen über Antigenbindung des cytophilien IgGs:**

BW5147:hCD16ζ-Zellen wurden in IgG1 (Herceptin®)-haltigem oder IgG-freiem Medium 1 h drehend bei 37 °C vorinkubiert. Die Zellen wurden danach dreimal gewaschen und mit löslichem Protein oder ohne für 40 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden erneut dreimal

gewaschen und anschließend mit den Zielzellen (Skov3 oder CHO in 96 wells) 16 h bei 37 °C ko-kultiviert ( $2 \times 10^5$  BW5147:hCD16 $\zeta$ -Zellen pro well). Danach wurde 100  $\mu$ l Elisa-Probenpuffer pro well zugeben und mit dem Überstand gemischt. Dieser wurde dann entweder bei -20°C eingefroren oder direkt im IL-2 Elisa gemessen.

### 4.2.8 CD107a-Assay (NK-Zell-Degranulationsassay)

Im Zytoplasma von NK-Zellen liegen zytotoxische Granula vor, die Granzyme B und Perforin enthalten. Bei der Degranulation von NK-Zelle fusioniert die Granulamembran mit der Zellmembran, Granzyme B und Perforin werden ausgeschüttet, das CD107a-Molekül tritt an die NK-Zelloberfläche und kann damit in der Durchflusszytometrie extrazellulär nachgewiesen werden. Die Menge der CD107a-Moleküle korreliert direkt mit der Degranulation und der Zytotoxizität der NK-Zelle, deshalb wird CD107a als Aktivitätsmarker für NK-Zellen verwendet (Alter et al., 2004).

Für das CD107a-Assay wurden NK-Zellen oder PBMCs 2,5 bis 5 h in Anwesenheit von Golgi Stop (6  $\mu$ g/ml) und Golgi Plug (10  $\mu$ g/ml), CD107-Cy5 mAb (3  $\mu$ l/Ansatz), und dem entsprechenden Stimulus ko-kultiviert (s. auch 4.2.7.1) Die Zellen wurden danach, wenn nötig mit 2 mM EDTA von der Inkubationsplatte abgelöst, mit FACS-Puffer (3 % FCS in PBS) gewaschen. Die Zellen wurden anschließend durchflusszytometrisch auf CD107a-Expression untersucht. PBMCs wurden zuvor noch mit  $\alpha$ -CD3-FITC- und  $\alpha$ -CD56-FITC-Antikörper gefärbt, um in der durchflusszytometrischen Analyse die NK-Zellpopulation definieren zu können.

### 4.2.9 <sup>35</sup>S-Release-Assay

Das <sup>35</sup>S-Release-Assay wurde durchgeführt, um die NK-Zellzytotoxizität und die daraus resultierende Lyse der Zielzellen nachzuweisen. Die Zielzellen (hier: SKOV-3-Zellen) wurden in 6-well ausplattiert und über Nacht mit 1  $\mu$ l ( $\sim 1$  MBq/ $\sim 10^6$  Zellen) EasyTag Express <sup>35</sup>S *protein labeling mix* (PerkinElmer) markiert. Die Zellen wurden am nächsten Tag mit Alfazyme abgelöst, mit Medium gewaschen, mit oder ohne Herceptin-Antikörperlösung (in 50  $\mu$ l DMEM, 10%FCS, 1% PS) versetzt und auf eine 96-well-U-Boden-Platte verteilt (ca. 5000 Zellen in 50  $\mu$ l/well). Die Zellen wurden 1 h auf Eis inkubiert. Danach wurden die NK-Zellen (50  $\mu$ l /well) zugegeben. Es wurden unterschiedliche Effektor:Zielzell-Raten angesetzt. Die NK-Zellen wurden mit den Skov-Zellen 4,5 h bei 37 °C ko-kultiviert. Der Überstand wurde anschließend vorsichtig abgenommen und entweder bei -20 °C eingefroren oder direkt

zur Messung verwendet. Für die Messung wurden 50 µl vom Überstand in Messplatten mit 150 µl vermischt und anschließend im vermessenen. Für die Bestimmung der spontanen Zelllyse bzw. spontane Freisetzung von <sup>35</sup>S wurden die radioaktiv-markierten Zielzellen (SKOV-3) ohne NK-Zellen kultiviert. Für die totale Zelllyse wurden die Zielzellen (in 50 µl DMEM, 10 %FCS, 1 % PS) mit 50 µl 1 M NaOH versetzt.

Für die Auswertung wurde die spezifische Zelllyse (in %) wie folgt berechnet:

$$\text{spezifische Zelllyse (\%)} = \frac{\text{Zelllyse -spontane Lyse}}{\text{totale Lyse -spontane Lyse}} \times 100 \% .$$

## Referenzen

Adler,S.P. and Nigro,G. (2009). Findings and conclusions from CMV hyperimmune globulin treatment trials. *J. Clin. Virol.* *46 Suppl 4*, S54-S57.

Ahmed,R. and Gray,D. (1996). Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* *272*, 54-60.

Akashi,K., Reya,T., ma-Weiszhausz,D., and Weissman,I.L. (2000). Lymphoid precursors. *Curr. Opin. Immunol.* *12*, 144-150.

Akter,P., Cunningham,C., McSharry,B.P., Dolan,A., Addison,C., Dargan,D.J., Hassan-Walker,A.F., Emery,V.C., Griffiths,P.D., Wilkinson,G.W., and Davison,A.J. (2003). Two novel spliced genes in human cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.* *84*, 1117-1122.

Alford,C.A., Stagno,S., Pass,R.F., and Britt,W.J. (1990). Congenital and perinatal cytomegalovirus infections. *Rev. Infect. Dis.* *12 Suppl 7*, S745-S753.

Allen,J.M. and Seed,B. (1989). Isolation and expression of functional high-affinity Fc receptor complementary DNAs. *Science* *243*, 378-381.

Alter,G., Malenfant,J.M., and Altfeld,M. (2004). CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J. Immunol. Methods* *294*, 15-22.

Anderson,C.L., Chaudhury,C., Kim,J., Bronson,C.L., Wani,M.A., and Mohanty,S. (2006). Perspective-- FcRn transports albumin: relevance to immunology and medicine. *Trends Immunol.* *27*, 343-348.

Andreu,P., Johansson,M., Affara,N.I., Pucci,F., Tan,T., Junankar,S., Korets,L., Lam,J., Tawfik,D., DeNardo,D.G., Naldini,L., de Visser,K.E., De,P.M., and Coussens,L.M. (2010). FcRgamma activation regulates inflammation-associated squamous carcinogenesis. *Cancer Cell* *17*, 121-134.

Arapovic,J., Lenac,R.T., Reddy,A.B., Krmpotic,A., and Jonjic,S. (2009). Promiscuity of MCMV immunoevasin of NKG2D: m138/fcr-1 down-modulates RAE-1epsilon in addition to MULT-1 and H60. *Mol. Immunol.* *47*, 114-122.

Arnold,J.N., Wormald,M.R., Sim,R.B., Rudd,P.M., and Dwek,R.A. (2007). The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Annu. Rev. Immunol.* *25*, 21-50.

Arnon,T.I., Achdout,H., Levi,O., Markel,G., Saleh,N., Katz,G., Gazit,R., Gonen-Gross,T., Hanna,J., Nahari,E., Porgador,A., Honigman,A., Plachter,B., Mevorach,D., Wolf,D.G., and Mandelboim,O. (2005). Inhibition of the NKp30 activating receptor by pp65 of human cytomegalovirus. *Nat. Immunol.* *6*, 515-523.

Arnon,T.I., Lev,M., Katz,G., Chernobrov,Y., Porgador,A., and Mandelboim,O. (2001). Recognition of viral hemagglutinins by NKp44 but not by NKp30. *Eur. J. Immunol.* *31*, 2680-2689.

- Atalay,R., Zimmermann,A., Wagner,M., Borst,E., Benz,C., Messerle,M., and Hengel,H. (2002). Identification and expression of human cytomegalovirus transcription units coding for two distinct Fcγ receptor homologs. *J. Virol.* *76*, 8596-8608.
- Aubin,J.T., Collandre,H., Candotti,D., Ingrand,D., Rouzioux,C., Burgard,M., Richard,S., Huraux,J.M., and Agut,H. (1991). Several groups among human herpesvirus 6 strains can be distinguished by Southern blotting and polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* *29*, 367-372.
- Baldick,C.J., Jr. and Shenk,T. (1996). Proteins associated with purified human cytomegalovirus particles. *J. Virol.* *70*, 6097-6105.
- Baucke,R.B. and Spear,P.G. (1979). Membrane proteins specified by herpes simplex viruses. V. Identification of an Fc-binding glycoprotein. *J. Virol.* *32*, 779-789.
- Bechtel,D., Kurth,J., Unkel,C., and Kuppers,R. (2005). Transformation of BCR-deficient germinal-center B cells by EBV supports a major role of the virus in the pathogenesis of Hodgkin and posttransplantation lymphomas. *Blood* *106*, 4345-4350.
- Beghetto,E., Paolis,F.D., Spadoni,A., Del,P.P., Buffolano,W., and Gargano,N. (2008). Molecular dissection of the human B cell response against cytomegalovirus infection by lambda display. *J. Virol. Methods* *151*, 7-14.
- Beier,K.C., Hutloff,A., Dittrich,A.M., Heuck,C., Rauch,A., Buchner,K., Ludewig,B., Ochs,H.D., Mages,H.W., and Kroczeck,R.A. (2000). Induction, binding specificity and function of human ICOS. *Eur. J. Immunol.* *30*, 3707-3717.
- Bell,S., Cranage,M., Borysiewicz,L., and Minson,T. (1990). Induction of immunoglobulin G Fc receptors by recombinant vaccinia viruses expressing glycoproteins E and I of herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* *64*, 2181-2186.
- Bennett,N.J., Ashiru,O., Morgan,F.J., Pang,Y., Okecha,G., Eagle,R.A., Trowsdale,J., Sissons,J.G., and Wills,M.R. (2010). Intracellular sequestration of the NKG2D ligand ULBP3 by human cytomegalovirus. *J. Immunol.* *185*, 1093-1102.
- Bernard,F., Picard,C., Cormier-Daire,V., Eidenschenk,C., Pinto,G., Bustamante,J.C., Jouanguy,E., Teillac-Hamel,D., Colomb,V., Funck-Brentano,I., Pascal,V., Vivier,E., Fischer,A., Le Deist,F., and Casanova,J.L. (2004). A novel developmental and immunodeficiency syndrome associated with intrauterine growth retardation and a lack of natural killer cells. *Pediatrics* *113*, 136-141.
- Biron,C.A., Byron,K.S., and Sullivan,J.L. (1989). Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. *N. Engl. J. Med.* *320*, 1731-1735.
- Boehme,K.W., Guerrero,M., and Compton,T. (2006). Human cytomegalovirus envelope glycoproteins B and H are necessary for TLR2 activation in permissive cells. *J. Immunol.* *177*, 7094-7102.
- Bonifacino,J.S. and Traub,L.M. (2003). Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu. Rev. Biochem.* *72*, 395-447.

- Boppana,S.B., Pass,R.F., Britt,W.J., Stagno,S., and Alford,C.A. (1992). Symptomatic congenital cytomegalovirus infection: neonatal morbidity and mortality. *Pediatr. Infect. Dis. J.* *11*, 93-99.
- 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.
- Borst,E.M., Hahn,G., Koszinowski,U.H., and Messerle,M. (1999). Cloning of the human cytomegalovirus (HCMV) genome as an infectious bacterial artificial chromosome in *Escherichia coli*: a new approach for construction of HCMV mutants. *J. Virol.* *73*, 8320-8329.
- Bowden,R.A., Day,L.M., Amos,D.E., and Meyers,J.D. (1987). Natural cytotoxic activity against cytomegalovirus-infected target cells following marrow transplantation. *Transplantation* *44*, 504-508.
- Boyden,S.V. (1963). Cytophilic antibodies. In *Cell-bound antibodies*, B.Amos and H.Koprowski, eds. (Philadelphia: Wistar Institute Press), pp. 7-17.
- Brandt,C.S., Baratin,M., Yi,E.C., Kennedy,J., Gao,Z., Fox,B., Haldeman,B., Ostrander,C.D., Kaifu,T., Chabannon,C., Moretta,A., West,R., Xu,W., Vivier,E., and Levin,S.D. (2009). The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans. *J. Exp. Med.* *206*, 1495-1503.
- Breitbart,M. and Rohwer,F. (2005). Here a virus, there a virus, everywhere the same virus? *Trends Microbiol.* *13*, 278-284.
- Brodie,D., Collins,A.V., Iaboni,A., Fennelly,J.A., Sparks,L.M., Xu,X.N., van der Merwe,P.A., and Davis,S.J. (2000). LICOS, a primordial costimulatory ligand? *Curr. Biol.* *10*, 333-336.
- Bruggeman,C.A., Reinders,R., Debie,W.M., Frederik,P.M., Engels,W., and van Boven,C.P. (1984). Demonstration of an IgG-Fc receptor in ratcytomegalovirus infected cells. *Arch. Virol.* *81*, 79-89.
- Bruhns,P., Iannascoli,B., England,P., Mancardi,D.A., Fernandez,N., Jorieux,S., and Daeron,M. (2009). Specificity and affinity of human Fcgamma receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood* *113*, 3716-3725.
- Budt,M., Reinhard,H., Bigl,A., and Hengel,H. (2004). Herpesviral Fcgamma receptors: culprits attenuating antiviral IgG? *Int. Immunopharmacol.* *4*, 1135-1148.
- Bukowski,J.F., Warner,J.F., Dennert,G., and Welsh,R.M. (1985). Adoptive transfer studies demonstrating the antiviral effect of natural killer cells in vivo. *J. Exp. Med.* *161*, 40-52.
- Bukowski,J.F., Woda,B.A., and Welsh,R.M. (1984). Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection in natural killer cell-depleted mice. *J. Virol.* *52*, 119-128.
- Byrd,A., Hoffmann,S.C., Jarahian,M., Momburg,F., and Watzl,C. (2007). Expression analysis of the ligands for the Natural Killer cell receptors NKp30 and NKp44. *PLoS. One.* *2*, e1339.
- Carlson,D.M. (1968). Structures and immunochemical properties of oligosaccharides isolated from pig submaxillary mucins. *J. Biol. Chem.* *243*, 616-626.

- Carrasco, Y.R. and Batista, F.D. (2006). B cell recognition of membrane-bound antigen: an exquisite way of sensing ligands. *Curr. Opin. Immunol.* 18, 286-291.
- Carter, P.J. (2006). Potent antibody therapeutics by design. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 343-357.
- Cassard, L., Cohen-Solal, J., Camilleri-Broet, S., Fournier, E., Fridman, W.H., and Sautes-Fridman, C. (2006). Fc gamma receptors and cancer. *Springer Semin. Immunopathol.* 28, 321-328.
- Cha, T.A., Tom, E., Kemble, G.W., Duke, G.M., Mocarski, E.S., and Spaete, R.R. (1996). Human cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains. *J. Virol.* 70, 78-83.
- Chalupny, N.J., Rein-Weston, A., Dosch, S., and Cosman, D. (2006). Down-regulation of the NKG2D ligand MICA by the human cytomegalovirus glycoprotein UL142. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 346, 175-181.
- Chee, M.S., Bankier, A.T., Beck, S., Bohni, R., Brown, C.M., Cerny, R., Horsnell, T., Hutchison, C.A., III, Kouzarides, T., Martignetti, J.A., and . (1990). Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 154, 125-169.
- Choquet, D., Partiseti, M., Amigorena, S., Bonnerot, C., Fridman, W.H., and Korn, H. (1993). Cross-linking of IgG receptors inhibits membrane immunoglobulin-stimulated calcium influx in B lymphocytes. *J. Cell Biol.* 121, 355-363.
- Coggeshall, K.M. (1998). Inhibitory signaling by B cell Fc gamma RIIb. *Curr. Opin. Immunol.* 10, 306-312.
- Compton, T., Kurt-Jones, E.A., Boehme, K.W., Belko, J., Latz, E., Golenbock, D.T., and Finberg, R.W. (2003). Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. *J. Virol.* 77, 4588-4596.
- Corrales-Aguilar, E. A Novel Method for Measuring IgG-Dependent Triggering of Host FcγRs CD16, CD32 and CD64 Reveals a Selective Inhibition through Herpesviral FcγRs. 16-10-2008.  
Ref Type: Thesis/Dissertation
- Cosman, D., Mullberg, J., Sutherland, C.L., Chin, W., Armitage, R., Fanslow, W., Kubin, M., and Chalupny, N.J. (2001). ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity.* 14, 123-133.
- Coyle, A.J., Lehar, S., Lloyd, C., Tian, J., Delaney, T., Manning, S., Nguyen, T., Burwell, T., Schneider, H., Gonzalo, J.A., Gosselin, M., Owen, L.R., Rudd, C.E., and Gutierrez-Ramos, J.C. (2000). The CD28-related molecule ICOS is required for effective T cell-dependent immune responses. *Immunity.* 13, 95-105.
- Craig, J.M., Macauley, J.C., Weller, T.H., and Wirth, P. (1957). Isolation of intranuclear inclusion producing agents from infants with illnesses resembling cytomegalic inclusion disease. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 94, 4-12.

- Crnkovic-Mertens,I., Messerle,M., Milotic,I., Szepan,U., Kucic,N., Krmpotic,A., Jonjic,S., and Koszinowski,U.H. (1998). Virus attenuation after deletion of the cytomegalovirus Fc receptor gene is not due to antibody control. *J. Virol.* *72*, 1377-1382.
- Crough,T. and Khanna,R. (2009). Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin. Microbiol. Rev.* *22*, 76-98, Table.
- Daeron,M. (1997). Fc receptor biology. *Annu. Rev. Immunol.* *15*, 203-234.
- Davison,A.J., Akter,P., Cunningham,C., Dolan,A., Addison,C., Dargan,D.J., Hassan-Walker,A.F., Emery,V.C., Griffiths,P.D., and Wilkinson,G.W. (2003). Homology between the human cytomegalovirus RL11 gene family and human adenovirus E3 genes. *J. Gen. Virol.* *84*, 657-663.
- Davison,A.J., Eberle,R., Ehlers,B., Hayward,G.S., McGeoch,D.J., Minson,A.C., Pellett,P.E., Roizman,B., Studdert,M.J., and Thiry,E. (2009). The order Herpesvirales. *Arch. Virol.* *154*, 171-177.
- DeFilippis,V.R., Alvarado,D., Sali,T., Rothenburg,S., and Fruh,K. (2010). Human cytomegalovirus induces the interferon response via the DNA sensor ZBP1. *J. Virol.* *84*, 585-598.
- Dekker,C.L. and Arvin,A.M. (2009). One step closer to a CMV vaccine. *N. Engl. J. Med.* *360*, 1250-1252.
- Depoil,D., Fleire,S., Treanor,B.L., Weber,M., Harwood,N.E., Marchbank,K.L., Tybulewicz,V.L., and Batista,F.D. (2008). CD19 is essential for B cell activation by promoting B cell receptor-antigen microcluster formation in response to membrane-bound ligand. *Nat. Immunol.* *9*, 63-72.
- Dingwell,K.S., Brunetti,C.R., Hendricks,R.L., Tang,Q., Tang,M., Rainbow,A.J., and Johnson,D.C. (1994). Herpes simplex virus glycoproteins E and I facilitate cell-to-cell spread in vivo and across junctions of cultured cells. *J. Virol.* *68*, 834-845.
- Dingwell,K.S., Doering,L.C., and Johnson,D.C. (1995). Glycoproteins E and I facilitate neuron-to-neuron spread of herpes simplex virus. *J. Virol.* *69*, 7087-7098.
- Dolan,A., Cunningham,C., Hector,R.D., Hassan-Walker,A.F., Lee,L., Addison,C., Dargan,D.J., McGeoch,D.J., Gatherer,D., Emery,V.C., Griffiths,P.D., Sinzger,C., McSharry,B.P., Wilkinson,G.W., and Davison,A.J. (2004). Genetic content of wild-type human cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.* *85*, 1301-1312.
- Doshi, D. R., Lu, E., and Ballas, Z. K. NK cell dysfunction and hypoglobulinemia in a patient presenting with invasive rhinocerebral. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* . 2004.  
Ref Type: Abstract
- Downs,F., Herp,A., Moschera,J., and Pigman,W. (1973). Beta-elimination and reduction reactions and some applications of dimethylsulfoxide on submaxillary glycoproteins. *Biochim. Biophys. Acta* *328*, 182-192.
- Duarte,A.J., Vasconcelos,D.M., Sato,M.N., Sales,J.M., Yamaguchi,N.H., Brigido,L.F., Ko-Huey,J., Yamashiro-Kanashiro,E.H., Kaneno,R., Tanji,M.M., and . (1990). [Common variable immunodeficiency (hypogammaglobulinemia of late onset or acquired

hypogammaglobulinemia): initial follow-up of 11 cases]. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. Sao Paulo* 45, 95-104.

Dubin,G., Frank,I., and Friedman,H.M. (1990). Herpes simplex virus type 1 encodes two Fc receptors which have different binding characteristics for monomeric immunoglobulin G (IgG) and IgG complexes. *J. Virol.* 64, 2725-2731.

Dubin,G., Socolof,E., Frank,I., and Friedman,H.M. (1991). Herpes simplex virus type 1 Fc receptor protects infected cells from antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J. Virol.* 65, 7046-7050.

Dulis,B.H., Kloppel,T.M., Grey,H.M., and Kubo,R.T. (1982). Regulation of catabolism of IgM heavy chains in a B lymphoma cell line. *J. Biol. Chem.* 257, 4369-4374.

Engelhard,D., Waner,J.L., Kapoor,N., and Good,R.A. (1986). Effect of intravenous immune globulin on natural killer cell activity: possible association with autoimmune neutropenia and idiopathic thrombocytopenia. *J. Pediatr.* 108, 77-81.

Esser,C. and Radbruch,A. (1990). Immunoglobulin class switching: molecular and cellular analysis. *Annu. Rev. Immunol.* 8, 717-735.

Finegold,I., Fahey,J.L., and Granger,H. (1967). Synthesis of immunoglobulins by human cell lines in tissue culture. *J. Immunol.* 99, 839-848.

Fowler,K.B., Stagno,S., Pass,R.F., Britt,W.J., Boll,T.J., and Alford,C.A. (1992). The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status. *N. Engl. J. Med.* 326, 663-667.

Frank,I. and Friedman,H.M. (1989). A novel function of the herpes simplex virus type 1 Fc receptor: participation in bipolar bridging of antiviral immunoglobulin G. *J. Virol.* 63, 4479-4488.

Freund,M., Asang,C., Kammler,S., Konermann,C., Krummheuer,J., Hipp,M., Meyer,I., Gierling,W., Theiss,S., Preuss,T., Schindler,D., Kjems,J., and Schaal,H. (2003). A novel approach to describe a U1 snRNA binding site. *Nucleic Acids Res.* 31, 6963-6975.

Fukuda,M. (2001). Beta-elimination for release of O-GalNAc-linked oligosaccharides from glycoproteins and glycopeptides. *Curr. Protoc. Mol. Biol. Chapter 17*, Unit17.

Furukawa,T., Hornberger,E., Sakuma,S., and Plotkin,S.A. (1975). Demonstration of immunoglobulin G receptors induced by human cytomegalovirus. *J. Clin. Microbiol.* 2, 332-336.

Gasser,S. and Raulet,D.H. (2006). Activation and self-tolerance of natural killer cells. *Immunol. Rev.* 214, 130-142.

Gerna,G., Sarasini,A., Patrone,M., Percivalle,E., Fiorina,L., Campanini,G., Gallina,A., Baldanti,F., and Revello,M.G. (2008). Human cytomegalovirus serum neutralizing antibodies block virus infection of endothelial/epithelial cells, but not fibroblasts, early during primary infection. *J. Gen. Virol.* 89, 853-865.

Godfrey,D.I., MacDonald,H.R., Kronenberg,M., Smyth,M.J., and Van,K.L. (2004). NKT cells: what's in a name? *Nat. Rev. Immunol.* 4, 231-237.

- Greijer,A.E., Dekkers,C.A., and Middeldorp,J.M. (2000). Human cytomegalovirus virions differentially incorporate viral and host cell RNA during the assembly process. *J. Virol.* *74*, 9078-9082.
- Gruss,P., Lai,C.J., Dhar,R., and Khoury,G. (1979). Splicing as a requirement for biogenesis of functional 16S mRNA of simian virus 40. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *76*, 4317-4321.
- Halenius,A., Hauka,S., Dolken,L., Stindt,J., Reinhard,H., Wiek,C., Hanenberg,H., Koszinowski,U.H., Momburg,F., and Hengel,H. (2011). Human cytomegalovirus disrupts the major histocompatibility complex class I Peptide-loading complex and inhibits tapasin gene transcription. *J. Virol.* *85*, 3473-3485.
- Hamer,D.H. and Leder,P. (1979). Splicing and the formation of stable RNA. *Cell* *18*, 1299-1302.
- Hamer,D.H., Smith,K.D., Boyer,S.H., and Leder,P. (1979). SV40 recombinants carrying rabbit beta-globin gene coding sequences. *Cell* *17*, 725-735.
- Harrison,D., Phillips,J.H., and Lanier,L.L. (1991). Involvement of a metalloprotease in spontaneous and phorbol ester-induced release of natural killer cell-associated Fc gamma RIII (CD16-II). *J. Immunol.* *147*, 3459-3465.
- Hayday,A.C. (2000). [gamma][delta] cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annu. Rev. Immunol.* *18*, 975-1026.
- Hengel,H., Brune,W., and Koszinowski,U.H. (1998). Immune evasion by cytomegalovirus--survival strategies of a highly adapted opportunist. *Trends Microbiol.* *6*, 190-197.
- Hercend,T., Griffin,J.D., Bensussan,A., Schmidt,R.E., Edson,M.A., Brennan,A., Murray,C., Daley,J.F., Schlossman,S.F., and Ritz,J. (1985). Generation of monoclonal antibodies to a human natural killer clone. Characterization of two natural killer-associated antigens, NKH1A and NKH2, expressed on subsets of large granular lymphocytes. *J. Clin. Invest* *75*, 932-943.
- Hershkovitz,O., Jarahian,M., Zilka,A., Bar-Ilan,A., Landau,G., Jivov,S., Tekoah,Y., Glicklis,R., Gallagher,J.T., Hoffmann,S.C., Zer,H., Mandelboim,O., Watzl,C., Momburg,F., and Porgador,A. (2008). Altered glycosylation of recombinant NKp30 hampers binding to heparan sulfate: a lesson for the use of recombinant immunoreceptors as an immunological tool. *Glycobiology* *18*, 28-41.
- Hessell,A.J., Hangartner,L., Hunter,M., Havenith,C.E., Beurskens,F.J., Bakker,J.M., Lanigan,C.M., Landucci,G., Forthal,D.N., Parren,P.W., Marx,P.A., and Burton,D.R. (2007). Fc receptor but not complement binding is important in antibody protection against HIV. *Nature* *449*, 101-104.
- Hezareh,M., Hessell,A.J., Jensen,R.C., van de Winkel,J.G., and Parren,P.W. (2001). Effector function activities of a panel of mutants of a broadly neutralizing antibody against human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* *75*, 12161-12168.
- Hibbs,M.L., Tolvanen,M., and Carpen,O. (1994). Membrane-proximal Ig-like domain of Fc gamma RIII (CD16) contains residues critical for ligand binding. *J. Immunol.* *152*, 4466-4474.

- Ho, M. (2008). The history of cytomegalovirus and its diseases. *Med. Microbiol. Immunol.* *197*, 65-73.
- Hutloff, A., Dittrich, A.M., Beier, K.C., Eljaschewitsch, B., Kraft, R., Anagnostopoulos, I., and Kroczeck, R.A. (1999). ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* *397*, 263-266.
- Ichihashi, Y. and Dales, S. (1971). Biogenesis of poxviruses: interrelationship between hemagglutinin production and polykaryocytosis. *Virology* *46*, 533-543.
- Jacobi, C., Claus, M., Wildemann, B., Wingert, S., Korporal, M., Romisch, J., Meuer, S., Watzl, C., and Giese, T. (2009). Exposure of NK cells to intravenous immunoglobulin induces IFN gamma release and degranulation but inhibits their cytotoxic activity. *Clin. Immunol.* *133*, 393-401.
- Janeway jr., C.A., Travers, P., Walport, M., and Shlomchick, M.J. (2002). *Immunologie, aus dem Englischen übersetzt.* (Heidelberg, Berlin: Spektrum, Akademischer Verlag GmbH).
- Jarahian, M., Watzl, C., Fournier, P., Arnold, A., Djandji, D., Zahedi, S., Cerwenka, A., Paschen, A., Schirmacher, V., and Momburg, F. (2009). Activation of natural killer cells by newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase. *J. Virol.* *83*, 8108-8121.
- Jefferis, R., Lund, J., and Pound, J.D. (1998). IgG-Fc-mediated effector functions: molecular definition of interaction sites for effector ligands and the role of glycosylation. *Immunol. Rev.* *163*, 59-76.
- Jentsch-Ullrich, K., Koenigsmann, M., Mohren, M., and Franke, A. (2005). Lymphocyte subsets' reference ranges in an age- and gender-balanced population of 100 healthy adults--a monocentric German study. *Clin. Immunol.* *116*, 192-197.
- Johansson, P.J., Hallberg, T., Oxelius, V.A., Grubb, A., and Blomberg, J. (1984). Human immunoglobulin class and subclass specificity of Fc receptors induced by herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* *50*, 796-804.
- Johnson, D.C., Frame, M.C., Ligas, M.W., Cross, A.M., and Stow, N.D. (1988). Herpes simplex virus immunoglobulin G Fc receptor activity depends on a complex of two viral glycoproteins, gE and gI. *J. Virol.* *62*, 1347-1354.
- Jonjic, S., Pavic, I., Polic, B., Crnkovic, I., Lucin, P., and Koszinowski, U.H. (1994). Antibodies are not essential for the resolution of primary cytomegalovirus infection but limit dissemination of recurrent virus. *J. Exp. Med.* *179*, 1713-1717.
- Julenius, K., Molgaard, A., Gupta, R., and Brunak, S. (2005). Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. *Glycobiology* *15*, 153-164.
- Keeble, A.H., Khan, Z., Forster, A., and James, L.C. (2008). TRIM21 is an IgG receptor that is structurally, thermodynamically, and kinetically conserved. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 6045-6050.
- Keller, R., Peitchel, R., Goldman, J.N., and Goldman, M. (1976). An IgG-Fc receptor induced in cytomegalovirus-infected human fibroblasts. *J. Immunol.* *116*, 772-777.

- Kenneson,A. and Cannon,M.J. (2007). Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *Rev. Med. Virol.* *17*, 253-276.
- Khayyamian,S., Hutloff,A., Buchner,K., Grafe,M., Henn,V., Kroczeck,R.A., and Mages,H.W. (2002). ICOS-ligand, expressed on human endothelial cells, costimulates Th1 and Th2 cytokine secretion by memory CD4+ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *99*, 6198-6203.
- Kilpatrick,B.A. and Huang,E.S. (1977). Human cytomegalovirus genome: partial denaturation map and organization of genome sequences. *J. Virol.* *24*, 261-276.
- Klein,U., Rajewsky,K., and Kuppers,R. (1998). Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J. Exp. Med.* *188*, 1679-1689.
- Klenovsek,K., Weisel,F., Schneider,A., Appelt,U., Jonjic,S., Messerle,M., Bradel-Tretheway,B., Winkler,T.H., and Mach,M. (2007). Protection from CMV infection in immunodeficient hosts by adoptive transfer of memory B cells. *Blood* *110*, 3472-3479.
- Koene,H.R., Kleijer,M., Algra,J., Roos,D., dem Borne,A.E., and de Haas,M. (1997). Fc gammaRIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell Fc gammaRIIIa, independently of the Fc gammaRIIIa-48L/R/H phenotype. *Blood* *90*, 1109-1114.
- Kondo,K., Kaneshima,H., and Mocarski,E.S. (1994). Human cytomegalovirus latent infection of granulocyte-macrophage progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *91*, 11879-11883.
- Kost,T.A., Condreay,J.P., and Jarvis,D.L. (2005). Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* *23*, 567-575.
- Kromer,E. and Grossmuller,F. (1994). Light scatter based lymphocyte gate--helpful tool or source of error? *Cytometry* *15*, 87-89.
- Kuijpers,T.W., Baars,P.A., Dantin,C., van den,B.M., van Lier,R.A., and Roosnek,E. (2008). Human NK cells can control CMV infection in the absence of T cells. *Blood* *112*, 914-915.
- Kyhse-Andersen,J. (1984). Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* *10*, 203-209.
- La Scola,B., Desnues,C., Pagnier,I., Robert,C., Barrassi,L., Fournous,G., Merchat,M., Suzan-Monti,M., Forterre,P., Koonin,E., and Raoult,D. (2008). The virophage as a unique parasite of the giant mimivirus. *Nature* *455*, 100-104.
- Lanier,L.L. (2005). NK cell recognition. *Annu. Rev. Immunol.* *23*, 225-274.
- Lanier,L.L., Le,A.M., Civin,C.I., Loken,M.R., and Phillips,J.H. (1986). The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol.* *136*, 4480-4486.
- Lanier,L.L., Le,A.M., Ding,A., Evans,E.L., Krensky,A.M., Clayberger,C., and Phillips,J.H. (1987). Expression of Leu-19 (NKH-1) antigen on IL 2-dependent cytotoxic and non-cytotoxic T cell lines. *J. Immunol.* *138*, 2019-2023.

- Lanier, L.L., Le, A.M., Phillips, J.H., Warner, N.L., and Babcock, G.F. (1983). Subpopulations of human natural killer cells defined by expression of the Leu-7 (HNK-1) and Leu-11 (NK-15) antigens. *J. Immunol.* *131*, 1789-1796.
- Lantz, O. and Bendelac, A. (1994). An invariant T cell receptor alpha chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4+ and CD4-8- T cells in mice and humans. *J. Exp. Med.* *180*, 1097-1106.
- Lanzavecchia, A. (1985). Antigen-specific interaction between T and B cells. *Nature* *314*, 537-539.
- Le, V.T., Trilling, M., Wilborn, M., Hengel, H., and Zimmermann, A. (2008). Human cytomegalovirus interferes with signal transducer and activator of transcription (STAT) 2 protein stability and tyrosine phosphorylation. *J. Gen. Virol.* *89*, 2416-2426.
- Leatham, M.P., Witte, P.R., and Stinski, M.F. (1991). Alternate promoter selection within a human cytomegalovirus immediate-early and early transcription unit (UL119-115) defines true late transcripts containing open reading frames for putative viral glycoproteins. *J. Virol.* *65*, 6144-6153.
- Lenac, T., Budt, M., Arapovic, J., Hasan, M., Zimmermann, A., Simic, H., Krmpotic, A., Messerle, M., Ruzsics, Z., Koszinowski, U.H., Hengel, H., and Jonjic, S. (2006). The herpesviral Fc receptor fcr-1 down-regulates the NKG2D ligands MULT-1 and H60. *J. Exp. Med.* *203*, 1843-1850.
- Lencer, W.I. and Blumberg, R.S. (2005). A passionate kiss, then run: exocytosis and recycling of IgG by FcRn. *Trends Cell Biol.* *15*, 5-9.
- Lilley, B.N., Ploegh, H.L., and Tirabassi, R.S. (2001). Human cytomegalovirus open reading frame TRL11/IRL11 encodes an immunoglobulin G Fc-binding protein. *J. Virol.* *75*, 11218-11221.
- Ling, V., Wu, P.W., Finnerty, H.F., Bean, K.M., Spaulding, V., Fouser, L.A., Leonard, J.P., Hunter, S.E., Zollner, R., Thomas, J.L., Miyashiro, J.S., Jacobs, K.A., and Collins, M. (2000). Cutting edge: identification of GL50, a novel B7-like protein that functionally binds to ICOS receptor. *J. Immunol.* *164*, 1653-1657.
- Litwin, V., Jackson, W., and Grose, C. (1992). Receptor properties of two varicella-zoster virus glycoproteins, gpI and gpIV, homologous to herpes simplex virus gE and gI. *J. Virol.* *66*, 3643-3651.
- Liu, W., Sohn, H.W., Tolar, P., and Pierce, S.K. (2010). It's all about change: the antigen-driven initiation of B-cell receptor signaling. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *2*, a002295.
- Liu, X.Y., Pop, L.M., and Vitetta, E.S. (2008). Engineering therapeutic monoclonal antibodies. *Immunol. Rev.* *222*, 9-27.
- Ljunggren, H.G. and Karre, K. (1990). In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol. Today* *11*, 237-244.
- Ljungman, P., de la, C.R., Cordonnier, C., Einsele, H., Engelhard, D., Reusser, P., Styczynski, J., and Ward, K. (2008). Management of CMV, HHV-6, HHV-7 and Kaposi-sarcoma herpesvirus

(HHV-8) infections in patients with hematological malignancies and after SCT. *Bone Marrow Transplant.* *42*, 227-240.

Lu, J.H., Teh, B.K., Wang, L., Wang, Y.N., Tan, Y.S., Lai, M.C., and Reid, K.B. (2008). The classical and regulatory functions of C1q in immunity and autoimmunity. *Cell Mol. Immunol.* *5*, 9-21.

Lubeck, P.R., Doerr, H.W., and Rabenau, H.F. (2010). Epidemiology of human cytomegalovirus (HCMV) in an urban region of Germany: what has changed? *Med. Microbiol. Immunol.* *199*, 53-60.

Lubinski, J.M., Lazear, H.M., Awasthi, S., Wang, F., and Friedman, H.M. (2011). Herpes simplex virus type 1 IgG Fc receptor blocks antibody-mediated complement activation and antibody-dependent cellular cytotoxicity in vivo. *J. Virol.*

Ludwig, A. and Hengel, H. (2009). Epidemiological impact and disease burden of congenital cytomegalovirus infection in Europe. *Euro. Surveill* *14*, 26-32.

Lund, J., Pound, J.D., Jones, P.T., Duncan, A.R., Bentley, T., Goodall, M., Levine, B.A., Jefferis, R., and Winter, G. (1992). Multiple binding sites on the CH2 domain of IgG for mouse Fc gamma R11. *Mol. Immunol.* *29*, 53-59.

Lurain, N.S. and Chou, S. (2010). Antiviral drug resistance of human cytomegalovirus. *Clin. Microbiol. Rev.* *23*, 689-712.

Ma, Q., DeMarte, L., Wang, Y., Stanners, C.P., and Junghans, R.P. (2004). Carcinoembryonic antigen-immunoglobulin Fc fusion protein (CEA-Fc) for identification and activation of anti-CEA immunoglobulin-T-cell receptor-modified T cells, representative of a new class of Ig fusion proteins. *Cancer Gene Ther.* *11*, 297-306.

Maciejewski, J.P., Bruening, E.E., Donahue, R.E., Mocarski, E.S., Young, N.S., and St Jeor, S.C. (1992). Infection of hematopoietic progenitor cells by human cytomegalovirus. *Blood* *80*, 170-178.

Mages, H.W., Hutloff, A., Heuck, C., Buchner, K., Himmelbauer, H., Oliveri, F., and Kroczyk, R.A. (2000). Molecular cloning and characterization of murine ICOS and identification of B7h as ICOS ligand. *Eur. J. Immunol.* *30*, 1040-1047.

Mallery, D.L., McEwan, W.A., Bidgood, S.R., Towers, G.J., Johnson, C.M., and James, L.C. (2010). Antibodies mediate intracellular immunity through tripartite motif-containing 21 (TRIM21). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*

Mandelboim, O., Lieberman, N., Lev, M., Paul, L., Arnon, T.I., Bushkin, Y., Davis, D.M., Strominger, J.L., Yewdell, J.W., and Porgador, A. (2001a). Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature* *409*, 1055-1060.

Mandelboim, O., Lieberman, N., Lev, M., Paul, L., Arnon, T.I., Bushkin, Y., Davis, D.M., Strominger, J.L., Yewdell, J.W., and Porgador, A. (2001b). Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature* *409*, 1055-1060.

Markel, G., Lieberman, N., Katz, G., Arnon, T.I., Lotem, M., Drize, O., Blumberg, R.S., Bar-Haim, E., Mader, R., Eisenbach, L., and Mandelboim, O. (2002). CD66a interactions between

- human melanoma and NK cells: a novel class I MHC-independent inhibitory mechanism of cytotoxicity. *J. Immunol.* *168*, 2803-2810.
- Martin,D. and Gutkind,J.S. (2008). Human tumor-associated viruses and new insights into the molecular mechanisms of cancer. *Oncogene* *27 Suppl 2*, S31-S42.
- Maxwell,K.F., Powell,M.S., Hulett,M.D., Barton,P.A., McKenzie,I.F., Garrett,T.P., and Hogarth,P.M. (1999). Crystal structure of the human leukocyte Fc receptor, Fc gammaRIIa. *Nat. Struct. Biol.* *6*, 437-442.
- McVoy,M.A. and Adler,S.P. (1994). Human cytomegalovirus DNA replicates after early circularization by concatemer formation, and inversion occurs within the concatemer. *J. Virol.* *68*, 1040-1051.
- Meknache,N., Jonsson,F., Laurent,J., Guinépain,M.T., and Daeron,M. (2009). Human basophils express the glycosylphosphatidylinositol-anchored low-affinity IgG receptor FcgammaRIIIB (CD16B). *J. Immunol.* *182*, 2542-2550.
- Mendelson,M., Monard,S., Sissons,P., and Sinclair,J. (1996). Detection of endogenous human cytomegalovirus in CD34+ bone marrow progenitors. *J. Gen. Virol.* *77 (Pt 12)*, 3099-3102.
- 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.
- Miller,D.M., Zhang,Y., Rahill,B.M., Waldman,W.J., and Sedmak,D.D. (1999). Human cytomegalovirus inhibits IFN-alpha-stimulated antiviral and immunoregulatory responses by blocking multiple levels of IFN-alpha signal transduction. *J. Immunol.* *162*, 6107-6113.
- Mingari,M.C., Vitale,C., Cambiaggi,A., Schiavetti,F., Melioli,G., Ferrini,S., and Poggi,A. (1995). Cytolytic T lymphocytes displaying natural killer (NK)-like activity: expression of NK-related functional receptors for HLA class I molecules (p58 and CD94) and inhibitory effect on the TCR-mediated target cell lysis or lymphokine production. *Int. Immunol.* *7*, 697-703.
- Mintern,J.D., Klemm,E.J., Wagner,M., Paquet,M.E., Napier,M.D., Kim,Y.M., Koszinowski,U.H., and Ploegh,H.L. (2006). Viral interference with B7-1 costimulation: a new role for murine cytomegalovirus fc receptor-1. *J. Immunol.* *177*, 8422-8431.
- Minton,E.J., Tysoe,C., Sinclair,J.H., and Sissons,J.G. (1994). Human cytomegalovirus infection of the monocyte/macrophage lineage in bone marrow. *J. Virol.* *68*, 4017-4021.
- Mocarski,E.S., Jr. (2002). Immunomodulation by cytomegaloviruses: manipulative strategies beyond evasion. *Trends Microbiol.* *10*, 332-339.
- Moretta,A., Biassoni,R., Bottino,C., Mingari,M.C., and Moretta,L. (2000). Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediated cytotoxicity. *Immunol. Today* *21*, 228-234.
- Moretta,A., Bottino,C., Vitale,M., Pende,D., Cantoni,C., Mingari,M.C., Biassoni,R., and Moretta,L. (2001). Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu. Rev. Immunol.* *19*, 197-223.

- Morikawa,M., Yamada,H., Kato,E.H., Shimada,S., Kishi,T., Yamada,T., Kobashi,G., and Fujimoto,S. (2001). Massive intravenous immunoglobulin treatment in women with four or more recurrent spontaneous abortions of unexplained etiology: down-regulation of NK cell activity and subsets. *Am. J. Reprod. Immunol.* *46*, 399-404.
- Murphy,E. and Shenk,T. (2008). Human cytomegalovirus genome. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *325*, 1-19.
- Nagashunmugam,T., Lubinski,J., Wang,L., Goldstein,L.T., Weeks,B.S., Sundaresan,P., Kang,E.H., Dubin,G., and Friedman,H.M. (1998). In vivo immune evasion mediated by the herpes simplex virus type 1 immunoglobulin G Fc receptor. *J. Virol.* *72*, 5351-5359.
- Nagler,A., Lanier,L.L., Cwirla,S., and Phillips,J.H. (1989). Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural killer cells. *J. Immunol.* *143*, 3183-3191.
- Nigro,G., Adler,S.P., La Torre,R., and Best,A.M. (2005). Passive immunization during pregnancy for congenital cytomegalovirus infection. *N. Engl. J. Med.* *353*, 1350-1362.
- Nimmerjahn,F. and Ravetch,J.V. (2008). Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* *8*, 34-47.
- Nygren,P.A., Stahl,S., and Uhlen,M. (1994). Engineering proteins to facilitate bioprocessing. *Trends Biotechnol.* *12*, 184-188.
- Ortaldo,J.R., Winkler-Pickett,R.T., Yagita,H., and Young,H.A. (1991). Comparative studies of CD3- and CD3+ CD56+ cells: examination of morphology, functions, T cell receptor rearrangement, and pore-forming protein expression. *Cell Immunol.* *136*, 486-495.
- Papadea,C. and Check,I.J. (1989). Human immunoglobulin G and immunoglobulin G subclasses: biochemical, genetic, and clinical aspects. *Crit Rev. Clin. Lab Sci.* *27*, 27-58.
- Para,M.F., Goldstein,L., and Spear,P.G. (1982). Similarities and differences in the Fc-binding glycoprotein (gE) of herpes simplex virus types 1 and 2 and tentative mapping of the viral gene for this glycoprotein. *J. Virol.* *41*, 137-144.
- Park,B., Spooner,E., Houser,B.L., Strominger,J.L., and Ploegh,H.L. (2010). The HCMV membrane glycoprotein US10 selectively targets HLA-G for degradation. *J. Exp. Med.* *207*, 2033-2041.
- Paulus,C., Krauss,S., and Nevels,M. (2006). A human cytomegalovirus antagonist of type I IFN-dependent signal transducer and activator of transcription signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *103*, 3840-3845.
- Pellet,P.E. and Roizman,B. (2007). The Family *Herpesviridae*: A brief introduction. In *Fields Virology*, D.M.Knipe, P.M.Howley, Griffin D.E., R.A.Lamb, M.A.Martin, B.Roizman, and S.E.Straus, eds. (New York, N.Y.: pp. 2479-2500.
- Pernis,B., Forni,L., and Amante,L. (1971). Immunoglobulins as cell receptors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *190*, 420-431.
- Perussia,B., Trinchieri,G., Jackson,A., Warner,N.L., Faust,J., Rumpold,H., Kraft,D., and Lanier,L.L. (1984). The Fc receptor for IgG on human natural killer cells: phenotypic, functional, and comparative studies with monoclonal antibodies. *J. Immunol.* *133*, 180-189.

- Pogge, v.S., Simhadri, V.R., von Tresckow, B., Sasse, S., Reiners, K.S., Hansen, H.P., Rothe, A., Boll, B., Simhadri, V.L., Borchmann, P., McKinnon, P.J., Hallek, M., and Engert, A. (2007). Human leukocyte antigen-B-associated transcript 3 is released from tumor cells and engages the Nkp30 receptor on natural killer cells. *Immunity*. 27, 965-974.
- Polcicova, K., Goldsmith, K., Rainish, B.L., Wisner, T.W., and Johnson, D.C. (2005). The extracellular domain of herpes simplex virus gE is indispensable for efficient cell-to-cell spread: evidence for gE/gI receptors. *J. Virol.* 79, 11990-12001.
- Polic, B., Hengel, H., Krmpotic, A., Trgovcich, J., Pavic, I., Luccaroni, P., Jonjic, S., and Koszinowski, U.H. (1998). Hierarchical and redundant lymphocyte subset control precludes cytomegalovirus replication during latent infection. *J. Exp. Med.* 188, 1047-1054.
- Prod'homme, V., Griffin, C., Aicheler, R.J., Wang, E.C., McSharry, B.P., Rickards, C.R., Stanton, R.J., Borysiewicz, L.K., Lopez-Botet, M., Wilkinson, G.W., and Tomasec, P. (2007). The human cytomegalovirus MHC class I homolog UL18 inhibits LIR-1+ but activates LIR-1- NK cells. *J. Immunol.* 178, 4473-4481.
- Quinnan, G.V., Jr., Kirmani, N., Rook, A.H., Manischewitz, J.F., Jackson, L., Moreschi, G., Santos, G.W., Saral, R., and Burns, W.H. (1982). Cytotoxic T cells in cytomegalovirus infection: HLA-restricted T-lymphocyte and non-T-lymphocyte cytotoxic responses correlate with recovery from cytomegalovirus infection in bone-marrow-transplant recipients. *N. Engl. J. Med.* 307, 7-13.
- Raanani, P., Gafter-Gvili, A., Paul, M., Ben Bassat, I., Leibovici, L., and Shpilberg, O. (2009). Immunoglobulin prophylaxis in hematopoietic stem cell transplantation: systematic review and meta-analysis. *J. Clin. Oncol.* 27, 770-781.
- Radaev, S., Motyka, S., Fridman, W.H., Sautes-Fridman, C., and Sun, P.D. (2001). The structure of a human type III Fc $\gamma$  receptor in complex with Fc. *J. Biol. Chem.* 276, 16469-16477.
- Radaev, S., Zou, Z., Tolar, P., Nguyen, K., Nguyen, A., Krueger, P.D., Stutzman, N., Pierce, S., and Sun, P.D. (2010). Structural and functional studies of Igalphabeta and its assembly with the B cell antigen receptor. *Structure*. 18, 934-943.
- Raulet, D.H. and Vance, R.E. (2006). Self-tolerance of natural killer cells. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 520-531.
- Ravetch, J.V. and Lanier, L.L. (2000). Immune inhibitory receptors. *Science* 290, 84-89.
- Redpath, S., Michaelsen, T.E., Sandlie, I., and Clark, M.R. (1998). The influence of the hinge region length in binding of human IgG to human Fc $\gamma$  receptors. *Hum. Immunol.* 59, 720-727.
- Reinhard, H. Struktur-Funktions-Beziehung der HCMV-kodierten Fc $\gamma$ -Rezeptoren gp34 und gp68. 2008.  
Ref Type: Thesis/Dissertation
- Reth, M. (1992). Antigen receptors on B lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 10, 97-121.
- Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., and Weissman, I.L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414, 105-111.

- Rhodes,D.A. and Trowsdale,J. (2007). TRIM21 is a trimeric protein that binds IgG Fc via the B30.2 domain. *Mol. Immunol.* *44*, 2406-2414.
- Riddell,S.R., Watanabe,K.S., Goodrich,J.M., Li,C.R., Agha,M.E., and Greenberg,P.D. (1992). Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science* *257*, 238-241.
- Rivas-Fuentes,S., Garcia-Garcia,E., Nieto-Castaneda,G., and Rosales,C. (2010). Fcγ receptors exhibit different phagocytosis potential in human neutrophils. *Cell Immunol.* *263*, 114-121.
- Rook,A.H., Quinnan,G.V., Jr., Frederick,W.J., Manischewitz,J.F., Kirmani,N., Dantzler,T., Lee,B.B., and Currier,C.B., Jr. (1984). Importance of cytotoxic lymphocytes during cytomegalovirus infection in renal transplant recipients. *Am. J. Med.* *76*, 385-392.
- Roopenian,D.C. and Akilesh,S. (2007). FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat. Rev. Immunol.* *7*, 715-725.
- Ross,S.A., Fowler,K.B., Ashrith,G., Stagno,S., Britt,W.J., Pass,R.F., and Boppana,S.B. (2006). Hearing loss in children with congenital cytomegalovirus infection born to mothers with preexisting immunity. *J. Pediatr.* *148*, 332-336.
- Rowe,W.P., Hartley,J.W., Waterman,S., Turner,H.C., and Huebner,R.J. (1956). Cytopathogenic agent resembling human salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* *92*, 418-424.
- Rudd,P.M., Elliott,T., Cresswell,P., Wilson,I.A., and Dwek,R.A. (2001). Glycosylation and the immune system. *Science* *291*, 2370-2376.
- Ruiz,J.E., Kwak,J.Y., Baum,L., Gilman-Sachs,A., Beaman,K.D., Kim,Y.B., and Beer,A.E. (1996). Intravenous immunoglobulin inhibits natural killer cell activity in vivo in women with recurrent spontaneous abortion. *Am. J. Reprod. Immunol.* *35*, 370-375.
- Sauer,A., Wang,J.B., Hahn,G., and McVoy,M.A. (2010). A human cytomegalovirus deleted of internal repeats replicates with near wild type efficiency but fails to undergo genome isomerization. *Virology* *401*, 90-95.
- Savin,K.W., Cocks,B.G., Wong,F., Sawbridge,T., Cogan,N., Savage,D., and Warner,S. (2010). A neurotropic herpesvirus infecting the gastropod, abalone, shares ancestry with oyster herpesvirus and a herpesvirus associated with the amphioxus genome. *Virol. J.* *7*, 308.
- Schamel,W.W. and Reth,M. (2000). Monomeric and oligomeric complexes of the B cell antigen receptor. *Immunity.* *13*, 5-14.
- Scheffczik,H., Savva,C.G., Holzenburg,A., Kolesnikova,L., and Bogner,E. (2002). The terminase subunits pUL56 and pUL89 of human cytomegalovirus are DNA-metabolizing proteins with toroidal structure. *Nucleic Acids Res.* *30*, 1695-1703.
- Schirmer,E.C., Wyatt,L.S., Yamanishi,K., Rodriguez,W.J., and Frenkel,N. (1991). Differentiation between two distinct classes of viruses now classified as human herpesvirus 6. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *88*, 5922-5926.

- Schleiss, M.R. (2008). Cytomegalovirus vaccine development. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 325, 361-382.
- Schmidt, R.E., Murray, C., Daley, J.F., Schlossman, S.F., and Ritz, J. (1986). A subset of natural killer cells in peripheral blood displays a mature T cell phenotype. *J. Exp. Med.* 164, 351-356.
- Schneider, U., Schwenk, H.U., and Bornkamm, G. (1977). Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int. J. Cancer* 19, 621-626.
- Schroeder, H.W., Jr. and Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, S41-S52.
- Sekulin, K., Gorzer, I., Heiss-Czedik, D., and Puchhammer-Stockl, E. (2007). Analysis of the variability of CMV strains in the RL11D domain of the RL11 multigene family. *Virus Genes* 35, 577-583.
- Shields, R.L., Namenuk, A.K., Hong, K., Meng, Y.G., Rae, J., Briggs, J., Xie, D., Lai, J., Stadlen, A., Li, B., Fox, J.A., and Presta, L.G. (2001). High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R. *J. Biol. Chem.* 276, 6591-6604.
- Shimizu, Y. and DeMars, R. (1989). Production of human cells expressing individual transferred HLA-A, -B, -C genes using an HLA-A, -B, -C null human cell line. *J. Immunol.* 142, 3320-3328.
- Simister, N.E. and Mostov, K.E. (1989). An Fc receptor structurally related to MHC class I antigens. *Nature* 337, 184-187.
- Simister, N.E. and Rees, A.R. (1985). Isolation and characterization of an Fc receptor from neonatal rat small intestine. *Eur. J. Immunol.* 15, 733-738.
- Smith, M.G. (1956). Propagation in tissue cultures of a cytopathogenic virus from human salivary gland virus (SGV) disease. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 92, 424-430.
- Snyder, A., Polcicova, K., and Johnson, D.C. (2008). Herpes simplex virus gE/gI and US9 proteins promote transport of both capsids and virion glycoproteins in neuronal axons. *J. Virol.* 82, 10613-10624.
- Sondermann, P., Huber, R., and Jacob, U. (1999). Crystal structure of the soluble form of the human fcgamma-receptor IIb: a new member of the immunoglobulin superfamily at 1.7 Å resolution. *EMBO J.* 18, 1095-1103.
- Sondermann, P., Huber, R., Oosthuizen, V., and Jacob, U. (2000). The 3.2-Å crystal structure of the human IgG1 Fc fragment-Fc gammaRIII complex. *Nature* 406, 267-273.
- Sondermann, P., Kaiser, J., and Jacob, U. (2001). Molecular basis for immune complex recognition: a comparison of Fc-receptor structures. *J. Mol. Biol.* 309, 737-749.
- Sondermann, P. and Oosthuizen, V. Mediation and Modulation of Antibody Function. *Biochemical Society Transactions* 30, 481-486. 2002.  
Ref Type: Magazine Article

- Sorkin,E. (1963). Cytophilic antibody. In *The immunologically competent cell: its nature and origin*, G.E.W.Wolstenholme and J.Knight, eds. (London: Churchill), pp. 38-53.
- Spaete,R.R. and Mocarski,E.S. (1985). The alpha sequence of the cytomegalovirus genome functions as a cleavage/packaging signal for herpes simplex virus defective genomes. *J. Virol.* *54*, 817-824.
- Spiller,O.B., Morgan,B.P., Tufaro,F., and Devine,D.V. (1996). Altered expression of host-encoded complement regulators on human cytomegalovirus-infected cells. *Eur. J. Immunol.* *26*, 1532-1538.
- Sprague,E.R., Reinhard,H., Cheung,E.J., Farley,A.H., Trujillo,R.D., Hengel,H., and Bjorkman,P.J. (2008). The human cytomegalovirus Fc receptor gp68 binds the Fc CH2-CH3 interface of immunoglobulin G. *J. Virol.* *82*, 3490-3499.
- Sprague,E.R., Wang,C., Baker,D., and Bjorkman,P.J. (2006). Crystal structure of the HSV-1 Fc receptor bound to Fc reveals a mechanism for antibody bipolar bridging. *PLoS. Biol.* *4*, e148.
- Staley,J.P. and Guthrie,C. (1999). An RNA switch at the 5' splice site requires ATP and the DEAD box protein Prp28p. *Mol. Cell* *3*, 55-64.
- Stannard,L.M. and Hardie,D.R. (1991). An Fc receptor for human immunoglobulin G is located within the tegument of human cytomegalovirus. *J. Virol.* *65*, 3411-3415.
- Stern-Ginossar,N., Elefant,N., Zimmermann,A., Wolf,D.G., Saleh,N., Biton,M., Horwitz,E., Prokocimer,Z., Prichard,M., Hahn,G., Goldman-Wohl,D., Greenfield,C., Yagel,S., Hengel,H., Altuvia,Y., Margalit,H., and Mandelboim,O. (2007). Host immune system gene targeting by a viral miRNA. *Science* *317*, 376-381.
- Stetson,D.B., Mohrs,M., Reinhardt,R.L., Baron,J.L., Wang,Z.E., Gapin,L., Kronenberg,M., and Locksley,R.M. (2003). Constitutive cytokine mRNAs mark natural killer (NK) and NK T cells poised for rapid effector function. *J. Exp. Med.* *198*, 1069-1076.
- Stricker,R.B., Steinleitner,A., Bookoff,C.N., Weckstein,L.N., and Winger,E.E. (2000). Successful treatment of immunologic abortion with low-dose intravenous immunoglobulin. *Fertil. Steril.* *73*, 536-540.
- Stricker,R.B., Steinleitner,A., and Winger,E.E. (2002). Intravenous immunoglobulin (IVIg) therapy for immunologic abortion. *Clinical and Applied Immunology Reviews* *2*, 187-199.
- Sulica,A., Gherman,M., Galatiuc,C., Manciulea,M., and Herberman,R.B. (1982). Inhibition of human natural killer cell activity by cytophilic immunoglobulin G. *J. Immunol.* *128*, 1031-1036.
- Sulica,A. and Herberman,R.B. (1996). Cytophilic immunoglobulins revisited via natural killer cells. *FASEB J.* *10*, 1495-1504.
- Tamashiro,J.C., Filpula,D., Friedmann,T., and Spector,D.H. (1984). Structure of the heterogeneous L-S junction region of human cytomegalovirus strain AD169 DNA. *J. Virol.* *52*, 541-548.

- Tamashiro, J.C. and Spector, D.H. (1986). Terminal structure and heterogeneity in human cytomegalovirus strain AD169. *J. Virol.* 59, 591-604.
- Tangye, S.G., Liu, Y.J., Aversa, G., Phillips, J.H., and de Vries, J.E. (1998). Identification of functional human splenic memory B cells by expression of CD148 and CD27. *J. Exp. Med.* 188, 1691-1703.
- Tedder, T.F., Zhou, L.J., and Engel, P. (1994). The CD19/CD21 signal transduction complex of B lymphocytes. *Immunol. Today* 15, 437-442.
- Terhune, S.S., Schroer, J., and Shenk, T. (2004). RNAs are packaged into human cytomegalovirus virions in proportion to their intracellular concentration. *J. Virol.* 78, 10390-10398.
- Thale, R., Lucin, P., Schneider, K., Eggers, M., and Koszinowski, U.H. (1994). Identification and expression of a murine cytomegalovirus early gene coding for an Fc receptor. *J. Virol.* 68, 7757-7765.
- TJIO, J.H. and PUCK, T.T. (1958). Genetics of somatic mammalian cells. II. Chromosomal constitution of cells in tissue culture. *J. Exp. Med.* 108, 259-268.
- Tolar, P., Hanna, J., Krueger, P.D., and Pierce, S.K. (2009). The constant region of the membrane immunoglobulin mediates B cell-receptor clustering and signaling in response to membrane antigens. *Immunity.* 30, 44-55.
- Tolar, P., Sohn, H.W., and Pierce, S.K. (2008). Viewing the antigen-induced initiation of B-cell activation in living cells. *Immunol. Rev.* 221, 64-76.
- Tomasec, P., Braud, V.M., Rickards, C., Powell, M.B., McSharry, B.P., Gadola, S., Cerundolo, V., Borysiewicz, L.K., McMichael, A.J., and Wilkinson, G.W. (2000). Surface expression of HLA-E, an inhibitor of natural killer cells, enhanced by human cytomegalovirus gpUL40. *Science* 287, 1031.
- Tomazin, R., Boname, J., Hegde, N.R., Lewinsohn, D.M., Altschuler, Y., Jones, T.R., Cresswell, P., Nelson, J.A., Riddell, S.R., and Johnson, D.C. (1999). Cytomegalovirus US2 destroys two components of the MHC class II pathway, preventing recognition by CD4+ T cells. *Nat. Med.* 5, 1039-1043.
- Tookey, P.A., Ades, A.E., and Peckham, C.S. (1992). Cytomegalovirus prevalence in pregnant women: the influence of parity. *Arch. Dis. Child* 67, 779-783.
- Trauneker, A., Schneider, J., Kiefer, H., and Karjalainen, K. (1989). Highly efficient neutralization of HIV with recombinant CD4-immunoglobulin molecules. *Nature* 339, 68-70.
- Tyler, B.M., Cowman, A.F., Adams, J.M., and Harris, A.W. (1981). Generation of long mRNA for membrane immunoglobulin gamma 2a chains by differential splicing. *Nature* 293, 406-408.
- Tyler, D.S., Nastala, C.L., Stanley, S.D., Matthews, T.J., Lyerly, H.K., Bolognesi, D.P., and Weinhold, K.J. (1989). GP120 specific cellular cytotoxicity in HIV-1 seropositive individuals. Evidence for circulating CD16+ effector cells armed in vivo with cytophilic antibody. *J. Immunol.* 142, 1177-1182.

- Uchida,J., Hamaguchi,Y., Oliver,J.A., Ravetch,J.V., Poe,J.C., Haas,K.M., and Tedder,T.F. (2004). The innate mononuclear phagocyte network depletes B lymphocytes through Fc receptor-dependent mechanisms during anti-CD20 antibody immunotherapy. *J. Exp. Med.* *199*, 1659-1669.
- Unkeless,J.C., Scigliano,E., and Freedman,V.H. (1988). Structure and function of human and murine receptors for IgG. *Annu. Rev. Immunol.* *6*, 251-281.
- Urban,E.M., Chapoval,A.I., and Pauza,C.D. (2010). Repertoire development and the control of cytotoxic/effector function in human gammadelta T cells. *Clin. Dev. Immunol.* *2010*, 732893.
- Vacca,P., Pietra,G., Falco,M., Romeo,E., Bottino,C., Bellora,F., Prefumo,F., Fulcheri,E., Venturini,P.L., Costa,M., Moretta,A., Moretta,L., and Mingari,M.C. (2006). Analysis of natural killer cells isolated from human decidua: Evidence that 2B4 (CD244) functions as an inhibitory receptor and blocks NK-cell function. *Blood* *108*, 4078-4085.
- van de Griend,R.J., Tax,W.J., van Krimpen,B.A., Vreugdenhil,R.J., Ronteltap,C.P., and Bolhuis,R.L. (1987). Lysis of tumor cells by CD3+4-8-16+ T cell receptor alpha beta- clones, regulated via CD3 and CD16 activation sites, recombinant interleukin 2, and interferon beta 1. *J. Immunol.* *138*, 1627-1633.
- Van De Walle,G.R., Favoreel,H.W., Nauwynck,H.J., and Pensaert,M.B. (2003). Antibody-induced internalization of viral glycoproteins and gE-gI Fc receptor activity protect pseudorabies virus-infected monocytes from efficient complement-mediated lysis. *J. Gen. Virol.* *84*, 939-948.
- van den Berg,A.P., van Son,W.J., Janssen,R.A., Brons,N.H., Heyn,A.A., Scholten-Sampson,A., Postma,S., van der,G.M., Tegzess,A.M., de Leij,L.H., and . (1992). Recovery from cytomegalovirus infection is associated with activation of peripheral blood lymphocytes. *J. Infect. Dis.* *166*, 1228-1235.
- Van Vliet,K.E., Graaf-Miltenburg,L.A., Verhoef,J., and Van Strijp,J.A. (1992). Direct evidence for antibody bipolar bridging on herpes simplex virus-infected cells. *Immunology* *77*, 109-115.
- Varki A,C.R.E.J.F.H.S.P.B.C.H.G.E.M. (2009). *Essentials in Glycobiology*. (Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Varnum,S.M., Strelow,D.N., Monroe,M.E., Smith,P., Auberry,K.J., Pasa-Tolic,L., Wang,D., Camp,D.G., Rodland,K., Wiley,S., Britt,W., Shenk,T., Smith,R.D., and Nelson,J.A. (2004). Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome. *J. Virol.* *78*, 10960-10966.
- Venema,H., van den Berg,A.P., van Zanten,C., van Son,W.J., van der,G.M., and The,T.H. (1994). Natural killer cell responses in renal transplant patients with cytomegalovirus infection. *J. Med. Virol.* *42*, 188-192.
- Vigerust,D.J. and Shepherd,V.L. (2007). Virus glycosylation: role in virulence and immune interactions. *Trends Microbiol.* *15*, 211-218.
- Virella,G. and Wang,A.C. (1993). Immunoglobulin structure. *Immunol. Ser.* *58*, 75-90.

- Walker, M.R., Lund, J., Thompson, K.M., and Jefferis, R. (1989). Aglycosylation of human IgG1 and IgG3 monoclonal antibodies can eliminate recognition by human cells expressing Fc gamma RI and/or Fc gamma RII receptors. *Biochem. J.* 259, 347-353.
- Walter, E.A., Greenberg, P.D., Gilbert, M.J., Finch, R.J., Watanabe, K.S., Thomas, E.D., and Riddell, S.R. (1995). Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N. Engl. J. Med.* 333, 1038-1044.
- Walters, C.S. and Wigzell, H. (1970). Demonstration of heavy and light chain antigenic determinants on the cell-bound receptor for antigen. Similarities between membrane-attached and humoral antibodies produced by the same cell. *J. Exp. Med.* 132, 1233-1249.
- Wang, D. and Shenk, T. (2005). Human cytomegalovirus UL131 open reading frame is required for epithelial cell tropism. *J. Virol.* 79, 10330-10338.
- Wang, S., Zhu, G., Chapoval, A.I., Dong, H., Tamada, K., Ni, J., and Chen, L. (2000). Costimulation of T cells by B7-H2, a B7-like molecule that binds ICOS. *Blood* 96, 2808-2813.
- Weller, T.H., Hanshaw, J.B., and Scott, D.E. (1960). Serologic differentiation of viruses responsible for cytomegalic inclusion disease. *Virology* 12, 130-132.
- Wildt, S. and Gerngross, T.U. (2005). The humanization of N-glycosylation pathways in yeast. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 119-128.
- Wilkinson, G.W., Tomasec, P., Stanton, R.J., Armstrong, M., Prod'homme, V., Aicheler, R., McSharry, B.P., Rickards, C.R., Cochrane, D., Llewellyn-Lacey, S., Wang, E.C., Griffin, C.A., and Davison, A.J. (2008). Modulation of natural killer cells by human cytomegalovirus. *J. Clin. Virol.* 41, 206-212.
- Willcocks, L.C., Smith, K.G., and Clatworthy, M.R. (2009). Low-affinity Fc gamma receptors, autoimmunity and infection. *Expert. Rev. Mol. Med.* 11, e24.
- Williams, A.F. and Barclay, A.N. (1988). The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 6, 381-405.
- Wintergerst, U., Hübener, C., Strauss, A., Jäger, G., Bise, K., Herms, J., and Schulze, A. Schwere kongenitale CMV-Infektion trotz maternem CMV-Durchseuchungstiter Fallbericht und Review der Literatur. *Monatsschrift Kinderheilkunde* 154[6], 558-564. 2006. Ref Type: Magazine Article
- Woof, J.M. and Burton, D.R. (2004). Human antibody-Fc receptor interactions illuminated by crystal structures. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 89-99.
- Wooley, P.H., Dutcher, J., Widmer, M.B., and Gillis, S. (1993). Influence of a recombinant human soluble tumor necrosis factor receptor FC fusion protein on type II collagen-induced arthritis in mice. *J. Immunol.* 151, 6602-6607.
- Yang, J. and Reth, M. (2010). The dissociation activation model of B cell antigen receptor triggering. *FEBS Lett.* 584, 4872-4877.

Yoshinaga,S.K., Whoriskey,J.S., Khare,S.D., Sarmiento,U., Guo,J., Horan,T., Shih,G., Zhang,M., Coccia,M.A., Kohno,T., Tafuri-Bladt,A., Brankow,D., Campbell,P., Chang,D., Chiu,L., Dai,T., Duncan,G., Elliott,G.S., Hui,A., McCabe,S.M., Scully,S., Shahinian,A., Shaklee,C.L., Van,G., Mak,T.W., and Senaldi,G. (1999). T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature* *402*, 827-832.

Yoshinaga,S.K., Zhang,M., Pistillo,J., Horan,T., Khare,S.D., Miner,K., Sonnenberg,M., Boone,T., Brankow,D., Dai,T., Delaney,J., Han,H., Hui,A., Kohno,T., Manoukian,R., Whoriskey,J.S., and Coccia,M.A. (2000). Characterization of a new human B7-related protein: B7RP-1 is the ligand to the co-stimulatory protein ICOS. *Int. Immunol.* *12*, 1439-1447.

Zaia,J.A. (2002). Prevention and management of CMV-related problems after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* *29*, 633-638.

Zhang,Y., Boesen,C.C., Radaev,S., Brooks,A.G., Fridman,W.H., Sautes-Fridman,C., and Sun,P.D. (2000). Crystal structure of the extracellular domain of a human Fc gamma RIII. *Immunity.* *13*, 387-395.

Zimmer,J., Andres,E., and Hentges,F. (2005). NK cell subsets and CD107a mobilization assay. *Leukemia* *19*, 1849-1851.

## Anhang

### Präsentationen

#### 2006

*Work in progress: Identification of ligands for orphan HCMV-encoded Fcγ receptors gp34 and gp68*

Fiedler M., Corrales-Aguilar E., Reinhard H., Zimmermann A., Mages HW., Hengel H.  
5th Workshop of GfV study-group “Immunobiology of viral infections“, Zeilitzheim,  
Deutschland, Vortrag

#### 2007

*Identification of ligands for orphan HCMV-encoded Fcγ-receptors gp34 and gp68*

Manuela Fiedler, Eugenia Corrales-Aguilar, Miguel López-Botet, Hartmut Hengel  
NK Defence & Therapy –Summer School, Božava (Dugi Otok), Kroatien, Poster und Vortrag

*Work in progress: Identifikation zellulärer Liganden Cytomegalovirus-kodierter Fcγ-Rezeptoren*

Manuela Fiedler, Eugenia Corrales-Aguilar, Henrike Reinhard, Albert Zimmermann, Hans-Werner Mages and Hartmut Hengel  
Tag des wissenschaftlichen Nachwuchses der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf,  
Deutschland, Vortrag

#### 2008

*Work in progress: Selective interaction of orphan HCMV-encoded Fcγ receptors gp34 and gp68 with human lymphocyte subsets*

Fiedler M., Corrales-Aguilar E., Hengel H.,  
7th Workshop of GfV study-group “Immunobiology of viral infections“, Deidesheim,  
Deutschland, Vortrag

**2009**

*Selective binding pattern of HCMV-encoded Fcγ receptors gp34 and gp68 to distinct human lymphocyte subsets*

Fiedler M., Corrales-Aguilar E., Hengel H.

19<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Virology (GfV), Leipzig, Deutschland, Poster

*Selective interaction of orphan HCMV-encoded Fcγ receptors gp34 and gp68 with human lymphocyte subsets*

Fiedler M., Corrales-Aguilar E., Hengel H

2<sup>nd</sup> European Congress of Immunology – ECI 2009, Berlin, Deutschland, Poster und Vortrag

## Publikationen (mit eigener Beteiligung)

*Identification of DNA-Damage DNA-Binding Protein 1 as a Conditional Essential Factor for Cytomegalovirus Replication in Interferon- $\gamma$ -stimulated Cells*

Mirko Trilling, Vu Thuy Khanh Le, Manuela Fiedler, Albert Zimmermann, Elke Bleifuß and Hartmut Hengel

*accepted* 30.03.2011, PLOS Pathogens

*Modulation of NKp30- and NKp46-Mediated Natural Killer Cell Responses by Poxviral Hemagglutinin*

Mostafa Jarahian, Manuela Fiedler, André Cohnen, Dominik Djandji, Günter J. Hämmerling, Cornelius Gati, Adelheid Cerwenka, Peter C. Turner, Richard W. Moyer, Carsten Watzl, Hartmut Hengel, and Frank Momburg

*in revision* (seit 17.04.2011), PLOS Pathogens

*CD16+ Natural Killer Cells and IgG+ Memory B Cells Are Targets for HCMV-encoded Fc $\gamma$  Receptors*

Manuela Fiedler, Mirko Trilling and Hartmut Hengel

Manuskript in Vorbereitung

### Danksagung

An dieser Stelle danke ich:

Prof. Dr. Hartmut Hengel	für die Bereitstellung meines Forschungsthemas und für seine Begeisterungsfähigkeit und Visionen,
Prof. Dr. Dieter Willbold	für die Betreuung meiner Arbeit an der Math.-Nat. Fakultät,
Dr. Mirko Trilling	für so viel Wissen, entscheidende Hinweise, das Auseinandersetzen mit meiner Arbeit, unendlich viel Aufmunterung und das Korrekturlesen,
Dr. Vu Thuy Khanh Le	für Ihren großen Speicher voller RNAs und Viren, für so viel Hilfsbereitschaft und die vielen Kniffe und Tricks bei so vielen Methoden,
Dr. Eugenia Corrales-Aguilar	für das Heranführen an die Arbeit mit Blut- und NK-Zellen,
Dr. Anne Halenius	für das Heranführen an die Arbeit im Isolab,
Stefanie Jeschke	für die Unterstützung und die ruhige Hand bei allen <i>in vivo</i> Experimenten,
Alexandra Niepel, Sarah Determann	für die Hilfe bei der Genotypisierung der CXCL14-Mäuse,
Prof. Dr. Heiner Schaal, Marek Widera, Steffen Erkelenz	für die Hilfe bei allen Fragen, die das Spleißen betreffen,
allen CMV'lern und HIV'lern	für die gute Laboratmosphäre, in der jeder auch so seine Macken haben darf,
Dr. Noah Stern-Ginossar	für die Hinweise und Hilfe beim <sup>35</sup> S-Release-Assay,
Dr. H.-W. Mages	für die Bereitstellung der ICOS bzw. ICOS-L-Transfektanten,
Prof. Dr. Ralf Küppers, Claudia Müller, Dörte Bechtel	für die Hilfe bei der B-Zellfärbung und die Bereitstellung der CB-LCL-5-7-1-Zelllinie
Kerstin	für das sorgfältige Korrekturlesen.

Für die wichtigen Momente neben der Arbeit möchte ich mich ebenso bedanken. Ich danke:

Eva	für Ihre Wärme,
Khanh, Mirko, Eugi, Steffi	für die Freundschaft und Unterstützung und die vielen langen und vor allem leckeren Abende,
BILK	für das „Rockstar“-Gefühl,
Daniel	für ein Happy-End,
meiner Familie	für das Füreinander-Dasein.

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst und nur die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Die Arbeit wurde bisher noch nicht anderweitig als Dissertation eingereicht oder veröffentlicht.

Düsseldorf, den 30.04.2011

Manuela Fiedler