

Aus dem Max-von-Pettenkofer-Institut  
für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Abt. Virologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München,  
Vorstand: Prof. Dr. med. Ulrich Koszinowski

# Der Einfluss viraler Gene auf Zelltropismus: Transposonmutagenese des Genoms des murinen Herpesvirus 68 (MHV-68)

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Oliver Fuchs  
aus Bad Kreuznach  
2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. U. Koszinowski

Mitberichterstatter: Prof. Dr. P. B. Becker

Prof. Dr. K. Degitz

Prof. Dr. Dr. W. Neupert

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Markus Wagner

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 24.02.2005

# INHALTSVERZEICHNIS

A. EINLEITUNG.....	1
1. DIE GAMMAHERPESVIREN IN DER FAMILIE DER HERPESVIREN.....	1
1.1 EIGENSCHAFTEN DER HERPESVIREN.....	1
1.1.1 Die Geschichte des murinen Herpesvirus 68 (MHV-68).....	3
1.1.2 Virionstruktur.....	4
1.1.3 Genomorganisation.....	5
1.1.4 Genexpression und Replikation.....	7
1.2 KLINISCHE RELEVANZ DES MURINEN HERPESVIRUS 68 - BIOLOGIE DER INFektion UND IMMUNANTWORT GEGEN HERPESVIREN.....	9
1.3 DAS MURINE HERPESVIRUS 68 BESITZT 80 OFFENE LESERAHMEN, DIE BEDEUTUNG VIELER GENE IST NOCH NICHT BEKANNT.....	12
2. HERSTELLUNG REKOMBINANTER HERPESVIREN.....	15
2.1 ÜBERBLICK ÜBER BISHER ANGEWANDTE MUTAGENESEMETHODEN.....	15
2.1.1 Ungerichtete Chemische Mutagenese.....	16
2.1.2 zielgerichtete Insertionsmutagenese durch homologe Rekombination in Herpesvirus-infizierten Zellen.....	16
2.1.3 zielgerichtete Mutagenese durch homologe Rekombination überlappende Herpesvirus-Cosmide.....	17
2.2 MUTAGENESE MITTELS BAKTERIELLER KÜNSTLICHER CHROMOSOMEN (BACs) IN E.COLI.....	18
2.2.1 Klonierung des MHV-68-Genoms als BAC.....	19
2.2.2 ungerichtete Mutagenese viraler BAC-Plasmide durch zufällige Transposoninsertion und Rekonstitution viraler Rekombinanten mit invasiven Bakterien, ein Verfahren der forward genetics.....	22
3. ZIEL DER ARBEIT.....	24
B. MATERIAL UND METHODEN.....	25
1. MATERIAL.....	25
1.1 REAGENZIEN.....	25
1.2 BAKTERIENSTÄMME.....	26
1.3 PLASMIDE UND VIREN.....	26
1.4 ZELLEN.....	27
1.5 OLIGONUKLEOTIDE.....	27

# INHALTSVERZEICHNIS

2. METHODEN.....	28
2.1 ISOLIERUNG UND REINIGUNG VON NUKLEINSÄUREN.....	28
2.1.1 Plasmid-DNA-Isolierung in analytischem Maßstab (Minipräparation).....	28
2.1.2 Plasmid-DNA-Isolierung in quantitativem Maßstab (Maxipräparation).....	28
2.1.3 BAC-DNA-Isolierung aus Bakterien in analytischem Maßstab (Minipräparation).....	29
2.1.4 BAC-DNA-Isolierung aus Bakterien in quantitativem Maßstab (Maxipräparation).....	30
2.1.5 Isolierung viraler DNA aus mit MHV-68 infizierten Zellen.....	30
2.1.6 Konzentrierung und Konzentrationsbestimmung von DNA.....	31
2.2 KLONIERUNG VON DNA.....	31
2.2.1 Restriktionsenzymverdau von DNA.....	31
2.2.2 Dephosphorylierung von DNA-Enden.....	32
2.2.3 Auffüllen von 5'-überhängenden und Abbau von 3'-überhängenden DNA-Enden mittels Klenow-Fragment.....	32
2.2.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	32
2.2.5 Ligation.....	33
2.2.6 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien.....	33
2.2.7 Herstellung elektrokompenter Bakterien.....	33
2.2.8 Chemische Transformation von Bakterien.....	34
2.2.9 Elektroporation von Bakterien.....	34
2.2.10 Anlegen von Glycerinkulturen.....	35
2.3 ANALYSE VON DNA.....	35
2.3.1 Agarosegel-Elektrophorese.....	35
2.3.2 Southern Blot-Analyse.....	35
2.3.3 DNA-Sequenzierung.....	37
2.4 POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR).....	38
2.5 HERSTELLUNG DES TRANSPOSON-DONOR-PLASMIDS.....	39
2.6 MUTAGENESE DER MHV-68-BAC-PLASMIDE.....	39
2.6.1 MHV-68-BAC-Mutagenese mittels Transposoninsertion.....	39
2.6.2 Entfernen der BAC-Kassette in rekombinanten MHV-68-BACs mittels Expression der Rekombinase Cre in infizierten Fibroblasten.....	41
2.6.3 Virus-Rekonstitution von MHV-68-BAC-DNA.....	41
2.7 ZELLKULTUR.....	42
2.7.1 Auftauen von Zellen.....	43
2.7.2 Einfrieren von Zellen.....	43
2.7.3 Transfektion eukaryontischer Zellen mittels Kalziumphosphatpräzipitation.....	43
2.8 HERSTELLUNG EINES MHV-68 VIRUSSTOCKS.....	44
2.9 MHV-68-TITERBESTIMMUNG DURCH STANDARD-PLAQUE-ASSAY.....	45
2.10 ISOLIERUNG EMBRYONALER MAUS-FIBROBLASTEN AUS DER MAUS.....	45

# INHALTSVERZEICHNIS

C. ERGEBNISSE.....	46
1. ETABLIERUNG DER TRANSPOSONMUTAGENESE FÜR MHV-68.....	46
1.1 KLONIERUNG DES TN-DONOR-KONSTRUKTES pTsTnMax8B-RFP.....	46
1.2 HERSTELLUNG REKOMBINANTER MHV-68-GENOME MIT TRANSPOSONINSERTION - RESTRIKTIONSMUSTER ZWEIER REKOMBINANTER MHV-68-GENOME ALS BEISPIELE.....	48
1.2.1 Einführung des Transposon-Donor-Plasmids pTsTnMax8B-RFP in E.coli mit MHV-68-BAC .....	48
1.2.2 Selektion der das Transposon(Tn)-Element enthaltenden MHV-68-Rekombinanten .....	48
1.2.3 Darstellung der erfolgten Mutagenese mittels Transposoninsertion anhand eines Beispiels .....	49
1.2.4 Beispielhafte Darstellung der aus internen Rekombinationsvorgängen im MHV-68-Genom resultierenden Shifts .....	51
1.3 BESTIMMUNG DER EFFIZIENZ DER TRANSPOSITION.....	52
1.4 SUCHE NACH EINER GEEIGNETEN POSITIV-KONTROLLE FÜR DIE REKONSTITUTION DER VIRALEN REKOMBINANTEN UND EINER WILD-TYP-KONTROLLE FÜR DEN PHÄNOTYPISCHEN VERGLEICH.....	53
2. REKONSTITUTION REKOMBINANTER VIREN.....	56
2.1 HERSTELLUNG INVASIVER E.COLI.....	56
2.1.1 Einführung des Invasionsplasmids pGB2 $\Omega$ inv-hly in E.coli .....	56
2.1.2 Effizienz der Rekonstitution viraler Rekombinanten mittels des Invasionsplasmids pGB2 $\Omega$ inv-hly....	58
2.2 REKONSTITUTION 226 REKOMBINANTER MHV-68-VIREN MIT INVASIVEN E.COLI.....	59
2.2.1 Expansion der einzelnen MHV-68-BAC-Rekombinanten in invasiven E.coli zur Virusrekonstitution .....	59
2.2.2 Entfernen der BAC-Kassette in rekombinanten MHV-68-BACs mittels Expression der Rekombinase Cre in infizierten Fibroblasten .....	59
2.2.3 Expansion rekombinanter Viren .....	61
2.3 CHARAKTERISIERUNG DER REKOMBINANTEN MHV-68-GENOME.....	62
2.3.1 Das Restriktionsmuster und die Southern-Blot-Analyse der rekombinanten MHV-68-Genome zeigen einzelne Transposoninsertionen .....	62
2.3.2 Die Rekombinase Cre entfernt auf effiziente Weise die BAC-Sequenzen, sowie das gpt- und gfp-Gen..	65
2.4 NACH REKONSTITUTION VON 1050 REKOMBINANTEN MHV-68-GENOMEN ERWIESEN SICH 226 ALS REPLIKATIONSFÄHIG .....	67

# INHALTSVERZEICHNIS

3. IDENTIFIZIERUNG VON FÜNF MHV-68-MUTANTEN MIT VERÄNDERTEM ENDOTHELZELL-TROPISMUS.....	68
3.1 FÜNF DER 226 REKOMBINANTEN MHV-68-VIREN ZEIGEN WIEDERHOLT EINE VERMINDERTE REPLIKATIONSFÄHIGKEIT IN DEN VERWENDETEN ENDOTHELZELLINIEN.....	68
3.2 TRANSPOSONINSERTIONEN IN DER REGION UM ORF 10 DES MHV-68-GENOMS SCHEINEN DIE REPLIKATIONSFÄHIGKEIT IN ENDOTHELZELLEN ZU BEEINFLUSSEN.....	69
3.3 DER BEOBACHTETE EFFEKT DES ORF 10 AUF DIE REPLIKATIONSFÄHIGKEIT IN ENDOTHELZELLEN LÄSST SICH MIT WACHSTUMSKURVEN BESTÄTIGEN.....	71
3.4 ORF 10 WEIST INTERESSANTE MOTIVE INNERHALB SEINER AMINOSÄURESEQUENZ AUF.....	74
D. DISKUSSION.....	75
1. ETABLIERUNG DER TRANSPOSONMUTAGENESE DES GENOMS VON MHV-68 UND REKONSTITUTION REKOMBINANTER VIREN MITTELS INVASIVER BAKTERIEN.....	75
1.1 MUTAGENESE DES GENOMS VON MHV-68 MITTELS DES TN-DONOR-KONSTRUKTES pTsTnMax8B-RFP.....	76
1.1.1 Das Transposon-Donor-Konstrukt pTsTnMax8B-RFP leitet sich von Tn1721, einem Abkömmling der TnA/Tn3-Familie der Transposons, ab.....	76
1.1.2 Eine zur Attenuierung des Virus führende Genomüberlänge aufgrund der BAC-Sequenzen und des gfp- und gpt-Gens muss vermieden werden.....	79
1.1.3 Einführung von RFP in die transposable Einheit, um virale Rekombinanten von Wildtypviren unterscheiden zu können.....	79
1.1.4 Das Transposon-Donor-Konstrukt pTsTnMax8B-RFP zeigt eine geringere Effizienz der Tn-Insertion als erwartet.....	80
1.2 EFFIZIENZ DER MUTAGENESE UND NACHFOLGENDEN REKONSTITUTION DER REKOMBINANTEN GENOME.....	82
2. VOR- UND NACHTEILE DER VERWENDETEN METHODE DER PHÄNOTYPISCHEN CHARAKTERISIERUNG LEBENSFÄHIGER KLONE.....	83
2.1 NACHTEILE.....	83
2.2 EIN VORTEIL IST DER HOHE DURCHSATZ REKOMBINANTER VIRALER GENOME.....	83
3. DIE BEDEUTUNG DES ORF 10 FÜR DAS WACHSTUM VON MHV-68 IN ENDOTHELZELLEN.....	84
3.1 VORHERGESAGTER AUFBAU DES GENPRODUKTES VON ORF 10, EIN HINWEIS AUF SEINE FUNKTION?.....	84

# INHALTSVERZEICHNIS

3.2. ORF 10 UND ENDOTHELZELL-TROPISMUS.....	85
3.2.1 Definition des Begriffs „Zeltropismus“ .....	85
3.2.2 Ein genetisch determinierter Endothelzell-Tropismus spielt eine wichtige Rolle in der Virologie.....	85
3.2.3 Zellulärer Hintergrund und Zeltropismus als neuere Erkenntnis.....	87
3.2.4 Eine weiterführende Untersuchung der Rolle und Funktion von ORF 10 ist notwendig.....	88
E. ZUSAMMENFASSUNG.....	89
F. LITERATURVERZEICHNIS.....	90
G. POSTER.....	102
H. ANHANG.....	103
1. ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	103
2. TABELLENVERZEICHNIS.....	103
3. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	104
4. OLIGONUKLEOTIDSEQUENZEN.....	106
5. DANKSAGUNG.....	107
6. ERKLÄRUNG.....	108

## A. EINLEITUNG

### A. EINLEITUNG

#### 1. DIE GAMMAHERPESVIREN IN DER FAMILIE DER HERPESVIREN

##### 1.1 Eigenschaften der Herpesviren

Das murine Herpesvirus 68 gehört zur Gruppe der Gammaherpesvirinae innerhalb der Familie der Herpesviridae, deren Name sich aufgrund des bei einigen Vertretern typischen Hautbefundes vom griechischen Verb *herpein* (deutsch: kriechen) ableitet. Mehr als einhundert verschiedene Herpesviren wurden mittlerweile bei einem weiten Spektrum verschiedener Wirbeltierarten isoliert, hierbei von Primaten und Menschen - es gibt acht bekannte humanpathogene Erreger - bis hin zu Fröschen oder Fischen.

Alle Vertreter gleichen sich bezüglich ihrer Morphologie, der Organisation ihres Genoms und in ihren biologischen Eigenschaften, obwohl die Symptome der von ihnen hervorgerufenen Krankheiten mitunter auch innerhalb einer Wirtsspezies stark variieren können. Die Morphogenese erfolgt im Zellkern. Da sich die Virushülle aus der Membran des Endoplasmatischen Retikulums, bzw. des Golgi-Systems ableitet, besteht diese aus einer Lipiddoppelmembran.

Herpesviren zeichnen sich durch die folgenden Eigenschaften aus: sie besitzen die größten DNA-Genome aller humanpathogenen Viren und sie besitzen die Fähigkeit zur Ausbildung einer Latenz. Hierbei bilden die Viren keine Nachkommenschaft und die Wirtszellen überleben. Geht das Virus jedoch aufgrund eines Stimulus wieder in die lytische Phase über, resultiert die Produktion infektiöser Partikel. Im Folgenden kann ein der Primärkrankheit ähnliches (z.B. Herpes-simplex-Virus-1, HSV 1 und Herpes labialis) oder auch ganz unterschiedliches Bild (z.B. Varizella-Zoster-Virus, VZV und Varizellen / Windpocken als Primärinfektion sowie Zoster nach Reaktivierung aus der Latenz) entstehen.

Die bekanntesten Vertreter der Familie der Herpesviridae lassen sich aufgrund des Krankheitsbildes und der Pathogenität, der Zell- und Wirtsspezifität sowie der Replikationsgeschwindigkeit in vitro drei Unterfamilien zuordnen, den Alpha-, den Beta-, und den Gammaherpesvirinae <sup>(67,68,127)</sup>.

Die neurotrophen Alphaherpesvirinae weisen die kürzesten Replikationszyklen (< 24h), die typische Fähigkeit, Latenz in Ganglienzellen auszubilden und das breiteste Wirtsspektrum auf. Letzteres zeigt die Tatsache, dass aus Menschen isolierte und in Mäuse inokulierte HSV 1-Viruspartikel zu einem beim Menschen ähnlichen Krankheitsbild führen <sup>(194)</sup>, später wurde der Nachweis von HSV-DNA sowohl im Tierversuch, d.h. in murinem Nervengewebe, als auch in Präparaten humanen Nervengewebes erbracht <sup>(42)</sup>. Als wichtige humanpathogene Vertreter wären hier das HSV 1 und 2 (Ausbildung der Latenz im Ganglion trigeminale) und VZV (Ausbildung der Latenz in den sensorischen Spinalganglien des Rückenmarks sowie Hirnnervenganglien) zu nennen. Die

## A. EINLEITUNG

Reaktivierung des VZV kann zur Ausbreitung im Hautsegment der betroffenen Nerven mit Neuralgien führen. Für die Patienten besonders gefährlich sind der Zoster oticus sowie ophthalmicus bei Hirnnervenbefall mit Ausbildung der Latenz im Ganglion trigeminale. Als wichtige tierpathogene Vertreter sollen das Schweine-Herpesvirus-1 als Erreger der Pseudorabies und das bovine Herpesvirus-1 als Erreger der infektiösen Rhinotracheitis des Rindes erwähnt werden.

Die Betaherpesvirinae besitzen hingegen ein sehr enges Wirtsspektrum und einen verhältnismäßig langen Replikationszyklus (> 24h). Die infizierten Wirtszellen zeigen als typische Morphologie die deutliche Vergrößerung mit prominentem Zellkern, die sog. Eulenaugenzellen.

Hier sind als wichtige humanpathogene Typen das Cytomegalievirus (CMV), das humane Herpesvirus 6 (HHV-6) und das humane Herpesvirus 7 (HHV-7) zu nennen.

CMV zeichnet sich durch die Fähigkeit der Ausbildung lebensgefährlich generalisierter Erkrankungen bei immungeschwächten Patienten und der Gefahr der Fruchtschädigung bei Primärinfektion schwangerer Frauen aus und besitzt so eine nicht zu unterschätzende gesundheitsökonomische Bedeutung. HHV-6 kann in Lymphozyten und Monozyten Latenz ausbilden und ist der Erreger des kindlichen Dreitagefiebers (Exanthema subitum) sowie der jugendlichen HHV-6-Mononukleose. HHV-7 bildet in T-Lymphozyten Latenz aus, es ist keine bekannte assoziierte Erkrankung zu nennen.

Als Tiermodell für Infektionen mit Betaherpesvirinae dient das tierpathogene murine Cytomegalievirus (MCMV) <sup>(70, 103)</sup>, da hier ein Überschreiten der Speziesgrenze aufgrund des engen Wirtsspektrums nicht möglich ist.

Die eher lymphoproliferativen Gammaherpesvirinae besitzen ebenfalls ein sehr enges Wirtsspektrum und eine innerhalb dieser Subfamilie inhomogene Dauer der Replikationszyklen. Hier ist als wichtigster humanpathogener Vertreter das Epstein-Barr-Virus (EBV) als Erreger der infektiösen Mononukleose zu nennen. Es ist mit dem Auftreten weiterer menschlicher Erkrankungen wie der seltenen chronisch aktiven EBV-Infektion, der Entstehung von Tumorerkrankungen wie dem Morbus Hodgkin, dem Burkitt-Lymphom, dem Nasopharynxkarzinom sowie einer großen Gruppe lymphoproliferativer Erkrankungen assoziiert und steht im Verdacht für weitere Tumorerkrankungen verantwortlich zu sein <sup>(30)</sup>. Wie die anderen Gammaherpesviren bildet es in Lymphozyten Latenz aus. Das ebenfalls zu dieser Familie gehörende humane Herpesvirus 8 (HHV-8) ist mit dem Auftreten bestimmter Formen des Kaposi-Sarkoms aufgrund des Nachweises dessen DNA in Tumorzellen, dem primary effusion lymphoma und bestimmten Formen des multizentrischen M. Castleman in Verbindung gebracht worden <sup>(108)</sup>. Wichtige tierpathogene Vertreter der Gammaherpesviren sind das murine Herpesvirus 68 (MHV-68), das als Tiermodell für Infektionen mit Gammaherpesviren dient und die Hauptrolle in der vorliegenden Arbeit spielt, sowie das Herpesvirus ateles und das Herpesvirus saimiri (HVS).

## A. EINLEITUNG

### 1.1.1 Die Geschichte des murinen Herpesvirus 68 (MHV-68)

Dieses Virus wurde im November 1976 zusammen mit vier anderen Viren während Feldstudien in der Gegend um Bratislava, damals Teil der CSSR, aus zwei wildlebenden Nagetieren isoliert, wobei die Studien ursprünglich den Zweck hatten, Vektoren für Infektionen mit Flaviviren zu identifizieren. Hierbei wurden MHV-60, -68 und -72 aus einer Wühlmaus-Spezies (*Clethrionomys glareolus*), MHV-76 und -78 aus einer Gelbhalsmaus (*Apodemus flavicollis*) isoliert <sup>(15)</sup>, und anschließend erfolgreich in neugeborenen Labormäusen propagiert. Die elektronenmikroskopische Untersuchung



Abb. 1: Wühlmaus, *Clethrionomys glareolus*, der natürliche Wirt des MHV-68

infizierter embryonaler Rattenfibroblasten (REF, rat embryonal fibroblasts) führte zu dem Schluss, dass diese Isolate der Familie der Herpesviridae zuzuordnen <sup>(15, 28)</sup> und auch bezüglich ihrer antigenen Beschaffenheit und des Aussehens des von ihnen induzierten cytopathischen Effekts (CPE, cytopathic effect) verwandt seien. Daran anschließende Untersuchungen der Wachstumskinetik und des Wirtsspektrums führten zu dem Irrtum, diese Viren gehörten der Subfamilie der neurotrophen Alphaherpesvirinae an <sup>(163)</sup> und könnten als Tiermodell für Infektionen mit Vertretern der Alphaherpesvirinae dienen.

Später konnte jedoch gezeigt werden, dass sowohl neugeborene als auch 5-10 Tage alte Labormäuse sowohl nach oraler als auch nach intranasaler Inokulation eine schwere exsudative Pneumonie mit anschließender hämatogener Dissemination des Virus entwickelten. Virale Antigene wurden im Folgenden in verschiedenen Geweben gefunden, dabei in Alveolarepithel, Herzmuskelzellen, Nierentubulusepithel und Lymphozyten <sup>(16, 122)</sup>. Infizierte Mäuse wiesen jedoch keinerlei Erkrankung des Nervensystems im weitesten Sinne auf.

Somit wurde das murine Herpesvirus 68 im Folgenden eher zu Studien der Kinetik einer Virämie benutzt, bis es aufgrund von Untersuchungen der Genomstruktur und der Feststellung der Verwandtschaft mit HSV und EBV zur endgültigen Zuordnung zu den Gammaherpesvirinae, genauer den Gamma-2-Herpesvirinae, den sog. Rhadinovirinae, kam. Fortan diente es als Tiermodell den Untersuchungen einer Infektion mit Gammaherpesviren <sup>(43, 44, 92, 100, 183)</sup>.

Dies hatte den Vorteil, dass man nun in der Lage war, *in vitro* Ergebnisse über die Primärinfektion mit einem Gammaherpesvirus zu sammeln. Für EBV und HHV-8 standen bisher lediglich latent infizierte Zelllinien zur Verfügung, was bedeutete, dass man für Erkenntnisse über den lytischen Zyklus das Virus jeweils reaktivieren musste.

## A. EINLEITUNG

### 1.1.2 Virionstruktur

Reife Virionen der Herpesviren besitzen eine Größe von 150-200 nm, die Zahl der beteiligten Strukturproteine schwankt bei den verschiedenen Vertretern der Herpesviridae, sie beträgt mehr als 30. Das Innere der Viruspartikel wird aus dem Viruscore gebildet, einer fibrillären Proteinmatrix, die mit dem linearen Genom assoziiert ist und von dem in der auf S.5 folgenden Abbildung die Polyamine als beteiligte Proteine gezeigt sind. Das Core wird von dem ikosaedrischen Capsid umgeben, bestehend aus 162 Capsomeren. Um dieses wiederum befinden sich die Proteine des viralen Teguments, von denen einige als regulatorische, bzw. transaktivierende Proteine nach Eintritt des Virus in die Wirtszelle zum Tragen kommen. Hierzu verschmilzt während des Vorgangs des Eintritts die virale Hülle, in der sich Glykoproteine befinden, mit der Wirtszellmembran. Das ikosaedrische Capsid hat einen Durchmesser von 100nm und besteht aus drei Typen beteiligter Proteine, den Capsomeren. Das Hexonprotein bildet die Flächen des Ikosaeders, das Pentonprotein die Kanten, diese wiederum laufen an den Ecken mit den so genannten Vertexproteinen zusammen.

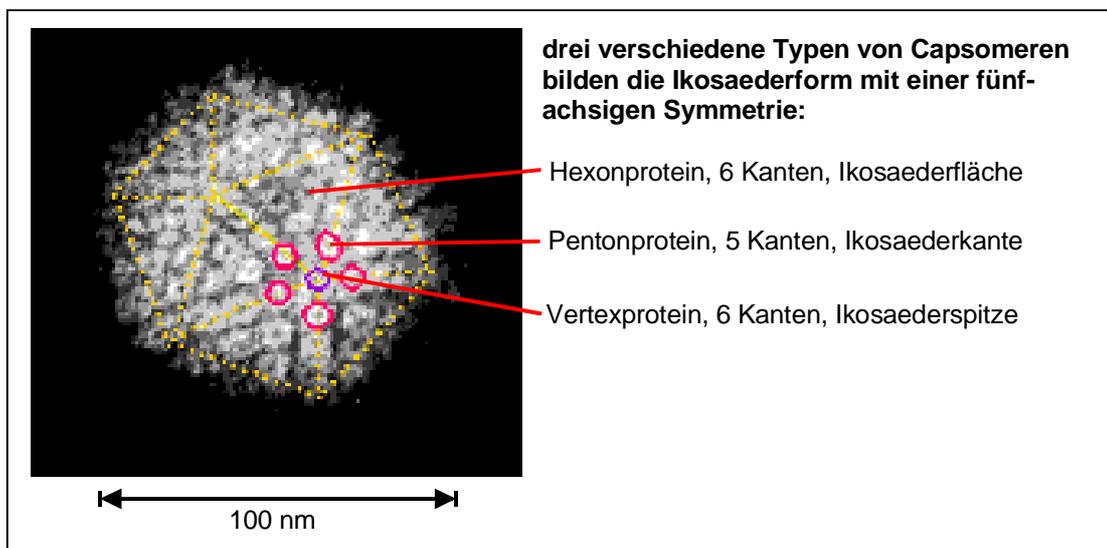


Abb. 2: Elektronenmikroskopische Aufnahme des ikosaedrischen Capsids mit beteiligten Capsomeren. Die Abbildung stammt von der Website <http://www.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/herpes.html> (Original von Linda Stannard)

## A. EINLEITUNG

Das folgende Schema zeigt den Aufbau der Partikel, bestehend aus viralem Core mit Genom, Capsid, Tegument und Hülle.

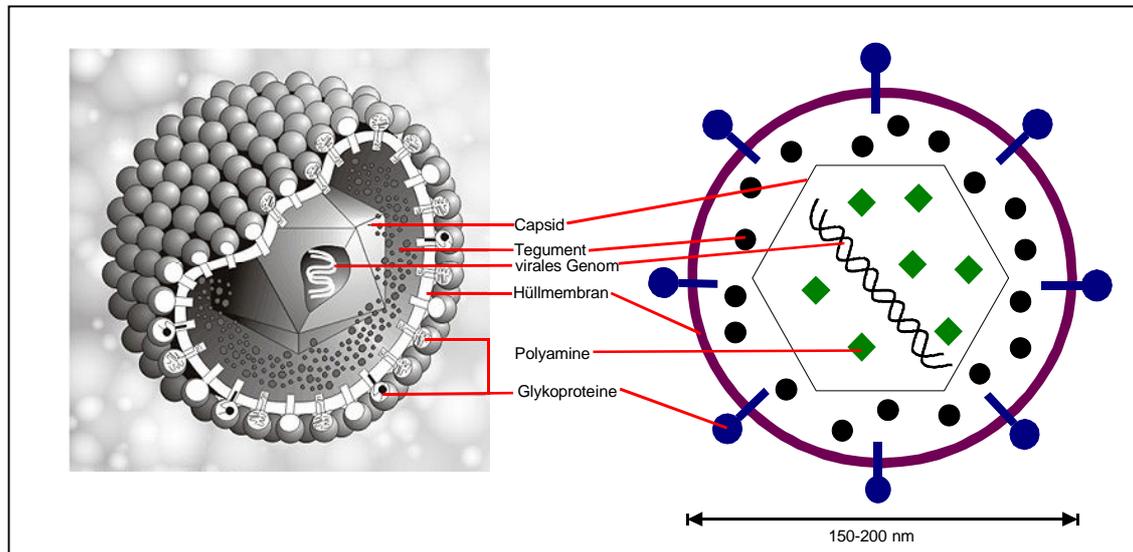


Abb. 3: Schematische Darstellung des Aufbaus eines typischen Herpesviruspartikels, die linke Abbildung stammt von der Website <http://www.biografix.de/metaframe.htm> (Original von M. Reschke und Eickmann).

### 1.1.3 Genomorganisation

Die Genome der verschiedenen Vertreter der Herpesviren liegen grundsätzlich in den Virionen als lineare und doppelsträngige DNA mit einer Länge zwischen 120 und 230 Kilobasenpaaren (kbp) vor. Die größten Genome weisen hierbei HCMV und MCMV mit jeweils ca. 230 kbp auf. Ebenfalls allen gemeinsam ist der Aufbau mit Unterteilung in einmalig (unique) und wiederholt vorkommende (repeat) Sequenzen, die bei den verschiedenen Vertretern jeweils unterschiedlich und charakteristisch angeordnet sind.

Das Genom des murinen Herpesvirus 68 besteht aus einer kodierenden Sequenz mit einer Länge von 118.237 Basenpaaren (bp), die auf beiden Seiten von mehreren Kopien einer terminalen Wiederholungssequenz mit einer Länge von 1.213 bp flankiert wird (<sup>43, 183</sup>). Basierend auf der Orientierung des eng verwandten HVS und des HHV-8 wurde das erste Basenpaar der kodierenden Sequenz, das auf das letzte Basenpaar der links hiervon liegenden terminalen Wiederholungssequenz folgt, mit Nukleotidposition 1 bezeichnet. Unterbrochen wird die kodierende Sequenz von zwei internen Wiederholungssequenzen. Eine besteht aus Kopien mit einer Länge von jeweils 40 bp und ist zusammen mit open reading frame (ORF, offener Leserahmen) M6 an der Position 26.178 bis 28.308 bp lokalisiert. Die andere besteht aus Kopien mit einer Länge von jeweils 100 bp und ist zusammen

## A. EINLEITUNG

mit den ORFs 10a -10c an der Position 98.903 bis 101.367 bp lokalisiert. Die überlappenden ORFs 10a -10c besitzen hierbei eigene carboxyterminale Enden, 10a auch eine eigene aminoternale Sequenz außerhalb der Wiederholungssequenz.

Die Genomanalyse von MHV-68, HVS und HHV-8 zeigte, dass jedes Virus eine Anzahl kollinearere Genomabschnitte besitzt, die wiederum von Abschnitten unterbrochen sind, welche für virusspezifische Genprodukte kodieren. Interessant ist, dass keine der Gene, die mit EBV-Zelltropismus, -Transformation und -Latenz (wie z.B. EBNA oder LMP) assoziiert sind, innerhalb des Genoms erhalten sind, sodass hierfür bei MHV-68 andere Mechanismen vorliegen müssen. Generell ist die Länge der kollinearen Genomabschnitte der anderer  $\gamma$ 2-Herpesviren ähnlich, mit Ausnahme des ORFs 57, das bei MHV-68 signifikant kürzer ist und wahrscheinlich posttranslational gespleißt wird (<sup>183</sup>).

Der Gehalt der Basen Guanin und Cytosin (G+C-Gehalt) der kodierenden Sequenz beträgt 46%, wohingegen der der terminalen Wiederholungssequenz 76% ist (<sup>183</sup>). Diese Werte sind vergleichbar mit denen für HHV-8, welches in der kodierenden Sequenz einen G+C-Gehalt von 53,5% sowie in der terminalen Wiederholungssequenz einen G+C-Gehalt von 84,5% besitzt (<sup>131</sup>). Vergleicht man jedoch die Werte mit HVS, so fällt auf, dass dieser in der kodierenden Sequenz mit 34,5% einen deutlich niedrigeren G+C-Gehalt aufweist, derjenige der terminalen Wiederholungssequenz ist mit 70,8% wiederum vergleichbar groß (<sup>1</sup>). Ein hoher G+C-Gehalt spricht hierbei eher für Genomabschnitte, die weniger transkribiert werden als solche mit einem niedrigeren Gehalt der Basen Cytosin und Guanin. Generell weisen der G+C-Gehalt und das Vorhandensein der terminalen Wiederholungssequenzen zusätzlich zur großen genetischen Übereinstimmung auf die Zugehörigkeit von MHV-68 zu den  $\gamma$ 2-Herpesviren hin.

Interessanterweise hat es mit den übrigen Mitgliedern seiner Familie ebenfalls die geringe Anzahl an CpG-Dinukleotiden gemeinsam. Dies stellt wahrscheinlich eine Folge der mutagenen Wirkung genomischer Methylierung dar und bedeutet eventuell einen Vorteil für MHV-68 wie für die restlichen lymphotropen  $\gamma$ 2-Herpesviren, welche alle gemeinsam haben, dass sie Latenz in B-Lymphozyten zu erzeugen; CpG-Dinukleotide sind potente polyklonale B-Zell-Aktivatoren (<sup>80</sup>).

## A. EINLEITUNG

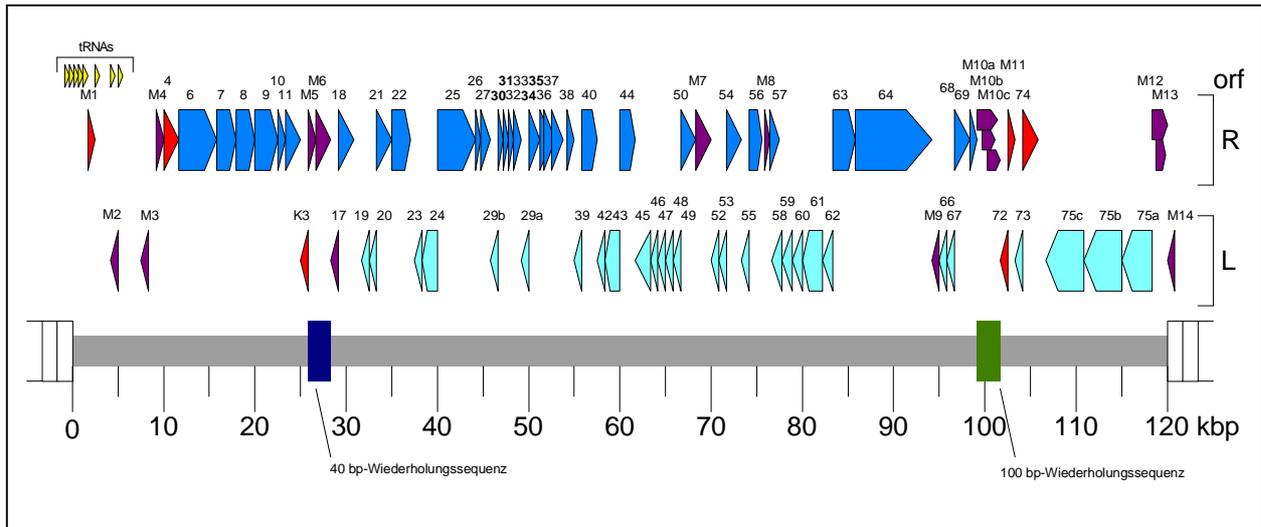


Abb. 4: modifiziert aus <sup>(183)</sup>, Organisation und Analyse der ORFs des MHV-68-Genoms. Dieses ist zusammengesetzt aus einer kodierenden Sequenz der Länge 118.237 bp (dargestellt als ein dicker grauer Balken), flankiert durch mehrfache Kopien einer 1.213 bp langen terminalen Wiederholungssequenz (dargestellt als offene Rechtecke am Ende des Genoms). Zusätzlich gibt es, wie im Text erwähnt, zwei interne Wiederholungssequenzen, hiervon ist die 40 bp-Wiederholungssequenz (blau), die 100 bp-Wiederholungssequenz in grün dargestellt. Diejenigen ORFs mit hinreichender Homologie zu Genen, die in den Genomen des HHV-8 oder des HVS vorkommen, erhielten die jeweils korrespondierenden Nummern der HHV-8 / HVS – Gene. HVS-homologe ORFs mit einer Ausrichtung nach rechts sind in dunklerem, solche mit einer Ausrichtung nach links mit einem helleren blau dargestellt. MHV-68-ORFs mit keiner nachweisbaren Homologie zu anderen Gammaherpesvirusgenen wurden als M-ORFs bezeichnet (M1-M14), von denen diejenigen M-ORFs, die keine signifikante Homologie zu irgendeinem bekannten zellulären oder viralen Gen besitzen, in violett dargestellt wurden. M-ORFs, welche bekannte Homologien zu zellulären Genen oder viralen Genen außer von HVS, HHV-8 und EBV besitzen, wurden in rot dargestellt. In gelb sind die acht potentiellen tRNA-Gene, angehäuft am linken Ende der kodierenden Sequenz, gezeigt.

### 1.1.4 Genexpression und Replikation

Nach Adsorption des Virus mittels Oberflächenproteinen an die Zelloberfläche und der darauf folgenden Penetration samt Abstreifen der Virushüllmembran, die mit der Wirtszellmembran verschmilzt (Uncoating), kommt es zum Transport des viralen Capsids an den zellulären Mikrotubuli zu den Kernporen. Dort verlässt das lineare Genom das Capsid, gelangt in den Kern, wird innerhalb 4 Stunden zirkularisiert und liegt dann episomal vor <sup>(81, 96, 97)</sup>.

Im Unterschied hierzu, ebenfalls im Gegensatz zu den nah verwandten EBV und HVS, ist die schnelle Zirkularisation, für die Infektion primärer Lymphozyten *in vitro* mittels Gardella-Gelanalyse gezeigt, bei MHV-68 weniger effizient. Das Genom liegt vorwiegend in linearer Form vor. Lediglich für die aus mit MHV-68 infizierten Lymphozyten abgeleitete Tumorzelllinie S11 konnten sowohl zirkuläre episomale als auch lineare Formen nachgewiesen werden <sup>(39, 170)</sup>.

Im Nukleus erfolgen dann, wie bei allen Herpesviren, die Genexpression sowie die Replikation von MHV-68 in drei Phasen, der sehr frühen (IE, immediate early, hier erfolgt die Expression transkriptionaler Transaktivatoren von E-, early, und L-, late, Genprodukten), der frühen (E, early, wichtig für virale Replikation) und der späten (L, late, meist Strukturproteine). Der komplette

## A. EINLEITUNG

Replikationszyklus dauert bei MHV-68 nicht so lange wie bei HCMV, wo er 48-72 Stunden benötigt, ebenfalls kürzer ist ein Replikationszyklus bei MCMV mit 24-36 Stunden. Für HCMV konnte gezeigt werden, dass die Replikation in Form eines „rolling-circle“- Mechanismus <sup>(102)</sup> abläuft, bei der Genom-Concatemere mit Überlänge entstehen, welche anschließend an den durch die Sequenz spezifizierten Schnittstellen (cleavage sites) geteilt und anschließend verpackt werden <sup>(78, 105, 165)</sup>. Hemmen lässt sich die Replikation von MHV-68 in vivo wie in vitro durch Nukleosidanaloga wie z.B. Aciclovir, welches schon länger in der Herpesvirologie verwendet wird. Als potentere Hemmstoffe haben sich jedoch 2'-deoxy-5-ethyl-beta-4'-thiouridin (4'-S-EtdU) und Cidofovir erwiesen, da sie nicht nur die Replikation hemmen sondern im Tierversuch auch den Beginn der Latenzausbildung in der Milz verzögern, sie können diese aber nicht verhindern <sup>(11, 113)</sup>.

Nach Entdeckung der neuen Isolate während der Feldstudien in der ehemaligen CSSR zeigten in-vitro-Versuche, dass MHV-68 verschiedenste Zelllinien unterschiedlicher Herkunft infizieren, sich in ihnen replizieren und auch einen CPE induzieren konnte, die höchsten Titer wurden jedoch in Nagerzelllinien erreicht. Als infizierbar zeigten sich CEC (embryonale Hühnerzellen, chicken embryo cells) als Hühnerzellreihe, L (fibroblastenähnliche Zellen von Mausbindegewebe), MEF (murine embryonale Fibroblasten), RKC (Hasennierenzellen, rabbit kidney cells), SIRC (Hasenkorneaepithelzellen), ZP (fibroblastenähnliche Zellen der Hasenlunge), REF (Fibroblasten aus Rattenembryonen, rat embryonal fibroblasts), BHK-21 (Nierenzellen, baby hamster kidney), GPT (Fibroblasten der Meerschweinchenzunge) und CCL-64 (Nerzlungenepithelzellen) als Nagerzellreihen, PS (Nierenepithelzellen des Schweins) als Schweinezellreihe, GMK (Nierenepithelzellen des Primaten *Cereopithecus aethiops*) und VERO (fibroblastenähnliche Zellen des Primaten *Cereopithecus aethiops*) als Primatenzellreihen, sowie Am-57 (humane Amnionepithelzellen), HeLa (Cervixkarzinomzellen) und LEP (fibroblastenähnliche Zellen menschlicher Embryonen) als humane Zelllinien. In REF-Kulturen zeigen sich nach 1-3 Tagen p.i. Zeichen eines CPE wie Zellabrundung, Nekrose und Plaquebildung, Nukleuseinschlüsse sowie Veränderungen des Nukleolus und generell der Form des Nukleus <sup>(163)</sup>.

## A. EINLEITUNG

### 1.2 Klinische Relevanz des Murinen Herpesvirus 68 - Biologie der Infektion und Immunantwort gegen MHV-68

Das Studium der Interaktion von MHV-68 mit dem Immunsystem bietet die Möglichkeit, die Beziehung von Gammaherpesviren zu ihrem Wirt detailliert zu untersuchen.

Dies ist zum einen aufgrund der Ähnlichkeit zu EBV und anderen schon genannten Gammaherpesviren wegen der Ausbildung von Latenz u.a. in B-Lymphozyten und der Assoziation mit lymphoproliferativen Erkrankungen (<sup>160, 170</sup>) aber auch wegen immungenetischer Untersuchungen wie z.B. der des Glykoprotein B-Homologs (gB) der Fall (<sup>155</sup>), dessen Gen eines der meist konservierten innerhalb der Familie der Herpesviren (<sup>111, 171</sup>).

Die Antwort des Wirts auf eine Infektion mit MHV-68 besitzt aus immunologischer Sicht eine große Flexibilität. Dies zeigt sich u.a. darin, dass auch Mäuse mit sowohl veränderter Architektur der Milz als auch ohne vorhandenes Lymphsystem, beides spielt in der Reaktion auf das Virus eine entscheidende Rolle, zu einer effizienten Abwehrreaktion fähig sind (<sup>82</sup>). Die lymphoproliferative Potenz von MHV-68 zeigt sich an der Tatsache, dass ca. 9% von infizierten BALB/c-Mäusen, also immunkompetenten Mäusen, innerhalb von drei Jahren Symptome einer fortschreitenden lymphoproliferativen Erkrankung zeigten. Bei ca. 50% hiervon kam es zur Ausbildung hochgradiger Lymphome (<sup>160</sup>). Es konnte jedoch keine dem EBV gleichwertige Fähigkeit, Lymphozyten in vitro zu transformieren, festgestellt werden (<sup>39</sup>). Aus in vivo Experimenten entstand die Zelllinie S11, welche latent mit MHV-68 infiziert ist und somit zu Latenzstudien dient. Nach Inokulation dieser Zellen in nicht-infizierte SCID-Mäuse (*severe combined immunodeficiency*) kommt es zur Tumorbildung. Diese lässt sich durch parallel erfolgende Übertragung aktivierter CD4<sup>+</sup>-T-Zellen vermindern bis ganz verhindern (<sup>126,170</sup>).

Die Infektion von BALB/c-Mäusen mit MHV-68 führt je nach Inokulationsweg zu einer akut verlaufenden Infektion verschiedener Organe sowie einer nachfolgenden Splenomegalie. Gibt man das Virus oral oder unter Umgehung des Mund-Rachenraums intragastrisch, so erfolgt eine akute Infektion intestinaler Epithelzellen (<sup>117</sup>). Nach intranasaler Inokulation erfolgt die produktive Infektion zunächst in der Lunge (<sup>161</sup>). Die akute Virusinfektion dauert 2-3 Wochen p.i., bei intranasaler Inokulation ca. 10 Tage. Sie wird, im Falle der Infektion der Lunge nachgewiesen, durch CD8<sup>+</sup>-T-Zellen beendet, wobei deren Aktivierung wesentlich länger andauert (<sup>38, 45, 59, 162 190</sup>). Anschließend kommt es am Ort der Primärinfektion, also bei intranasaler Inokulation in der Lunge mit folgender interstitieller Pneumonitis in den Zellen des Alveolarepithels und in Monozyten, auch in Abwesenheit ausgereifter B-Zellen, zur Latenz. Hierbei wird das Virusgenom in den Zellen bewahrt, aber es sind keine infektiösen Partikel nachweisbar. Die Ausbildung der Latenz findet zusammen mit der Entwicklung einer der durch EBV hervorgerufenen infektiösen Mononukleose

## A. EINLEITUNG

ähnlichen Erkrankung trotz der starken CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Antwort statt (<sup>47, 88, 156, 162, 171, 184, 191, 192, 193</sup>). Zu diesem Krankheitsbild führt auch die orale oder direkte intragastrische Gabe des Virus (<sup>117</sup>).

In der nachfolgenden Virämie breitet sich das Virus systemisch aus und befällt verschiedene Organgewebe, wichtig sind hierbei mediastinale Lymphknoten und die Milz. Dort etabliert es sowohl nach intranasaler als auch nach oraler Gabe eine latente Infektion von B-Zellen, u.a. in den Keimzentren. In vitro wurde nachgewiesen, dass hierbei die viralen Genome nach Infektion in vivo in episomaler Form vorliegen (<sup>39, 47, 117, 161, 170</sup>). Zusätzlich zu B-Zellen wird in Peritonealmakrophagen und dendritischen Zellen eine Latenz ausgebildet. Daraus wird ersichtlich, dass B-Zellen für die Ausbildung einer Latenz nicht ausschließlich notwendig sind, es konnte jedoch gezeigt werden, dass sie eine wichtige Rolle bei der Reaktivierung spielen und hierbei ein organspezifisches Muster induzieren (<sup>47, 149, 150, 156, 191, 192, 193</sup>).

Die Etablierung der Latenz in den Zellen der Milz hat ca. drei Wochen p.i. eine Splenomegalie zur Folge. Die Ausbildung der Splenomegalie ist dabei abhängig von MHV-68-infizierten B-Zellen in der Milz. Gesteuert durch einen noch unbekanntem auf aktivierten latent infizierten B-Zellen vorhandenen Liganden exprimieren CD8<sup>+</sup>-T-Zellen sowohl MHC-abhängig wie -unabhängig (<sup>60, 61, 62</sup>) oder aufgrund eines viral kodierten Superantigens vorwiegend den T-Zell-Rezeptor-Typ Vβ4 (<sup>169</sup>).

CD40 wird als typisches Antigen auf B-Zellen, Monozyten und dendritischen Zellen exprimiert und ist, wie zahlreiche In-vitro-Experimente gezeigt haben, zwingend notwendig für die Interaktion von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen mit B-Zellen. Dieser Sachverhalt ermöglicht den Effekt einer Immunstimulation via CD40 mit einer effektiven Umgehung der CD4<sup>+</sup>-T-Zell-Stimulation und impliziert Anwendungsmöglichkeiten in Immundepletierten wie HIV-Patienten (human immunodeficiency virus), für die eine Reaktivierung latenter Herpesviren ein ernstes Problem darstellt (<sup>23, 27, 45, 133, 151, 171, 172, 191</sup>).

Beendet wird die Splenomegalie wiederum durch CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, deren immunologisches Muster wie das der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen in den verschiedenen Phasen der Erkrankung wechselt (<sup>45, 48, 89, 152, 153, 191, 196</sup>).

Die T-Zellantwort spielt unter der Bedingung einer CD4<sup>+</sup>-Stimulation zusammen mit B-Zellen für die langfristige Kontrolle einer Infektion durch MHV-68 eine wichtige Rolle. Ohne Stimulation durch T-Helfer-Zellen kommt es bis zum ca. sechzigsten Tag p.i. zu einer anfänglichen Kontrolle der Infektion. Später entwickelt sich jedoch eine chronisch verlaufende, der AIDS-assoziierten sog. wasting disease ähnliche Erkrankung, deren Ausprägung sich durch Postexpositionsvakzinierung im Gegensatz zur hierbei verstärkten CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Antwort nicht vermindern lässt (<sup>12, 27, 86, 156, 191, 192, 193</sup>).

Zusätzlich zu den bei der Ausbildung einer Immunantwort beteiligten Zellen spielen Zytokine eine wichtige Rolle und werden nach intranasaler Inokulation, wie anhand einiger Beispiele in in-vivo-Versuchen gezeigt, ab dem siebten Tag p.i. zusammen mit ihren Rezeptoren hochreguliert (<sup>134</sup>).

## A. EINLEITUNG

MHV-68 und Herpesviren im Allgemeinen werden zusätzlich mit verschiedenen Formen entzündlicher Gefäßerkrankungen, auch der Atherosklerose, in Verbindung gebracht. Letzteres wurde in vivo mit Apolipoprotein E-defizienten Mäusen (apoE<sup>-/-</sup>) nachgewiesen <sup>(6)</sup>.

Zu ersterem zählt, dass der Nachweis viraler Antigene in vaskulären Läsionen gamma-Interferon-Rezeptor-defizienter Mäuse (IFN $\gamma$ R<sup>-/-</sup>) auf die mögliche Beteiligung von MHV-68 oder der Gammaherpesviren bei der Ätiologie einer Vaskulitis der großen elastischen Arterien hinweist. Dies stellt eine Pathologie ähnlich der der Takayasu-Arteriitis (nicht-granulomatöse Form der Arteriitis temporalis) oder der Kawasaki-Arteriitis beim Menschen dar <sup>(190)</sup>. Hierbei spielt eine persistierende produktive Infektion der Media der betroffenen Gefäßabschnitte und weniger ein Autoimmungeschehen eine Rolle <sup>(34)</sup>.

Diese IFN $\gamma$ R<sup>-/-</sup>-Mäuse weisen ferner Unterschiede zu Wildtyp-Mäusen in Bezug auf die Ausbildung und das Aussehen der Splenitis und Splenomegalie auf, nicht jedoch in der Höhe der Titer infektiöser Partikel oder der Kontrolle der akuten Infektion <sup>(40)</sup>, was ebenfalls auf die Rolle CD4<sup>+</sup>-T-Zellen bei der Ausbildung der Splenitis und Splenomegalie hinweist, aber ebenso die Wichtigkeit anderer Zelltypen nach Infektion mit MHV-68 zeigt.

In Bezug auf die Funktion anderer Zytokine konnte gezeigt werden, dass Interleukin-6 (IL-6) keine wichtige Rolle spielt <sup>(135)</sup>. IL-10 scheint eine Funktion bei der Begrenzung der die akute Infektion begleitenden Leukozytose zu haben, IL-10<sup>-/-</sup>-Mäuse jedoch weisen eine gesteigerte IL-12-Antwort auf, aber auch eine geringere Viruslast in den untersuchten Organen <sup>(118)</sup>. Bezüglich bei der Primärantwort beteiligter Mediatoren ist der Transkriptionsfaktor IRF-1 notwendig für den Schutz vor der oben erwähnten wasting disease, die induzierbare NO-Synthase (iNOS) spielt im Gegensatz zu bakteriellen Infektionen eine untergeordnete Rolle <sup>(41)</sup>.

## A. EINLEITUNG

### 1.3 Das Murine Herpesvirus 68 besitzt 80 offene Leserahmen, die Bedeutung vieler Gene ist noch nicht bekannt

Die einmalig vorkommende (unique) Sequenz von MHV-68 kodiert für mindestens 80 Gene. 63 ORFs zeigen eine große Ähnlichkeit zu Genen von HHV-8 und HVS und wurden deshalb analog des Nummerierungssystems dieser Viren bezeichnet, so korrespondiert ORF 4 z.B. mit HVS-Gen 4. Es wurden aber ebenso 44 ORFs mit identifizierten Start-ATGs gefunden, die wahrscheinlich für Proteine mit einer Länge von mindestens 100aa kodieren und denen keine bekannte Homologie zu anderen Herpesvirusgenen nachgewiesen werden konnte. Diese wurden als ORFs M1-M14 bezeichnet. Drei dieser ORFs (M12, M13 und M14) liegen teilweise oder gänzlich in den terminalen Wiederholungssequenzen <sup>(183)</sup>.

ORF M1 gilt als Homolog der SPI-1-Serpin-Familie (serpin = serin protease inhibitor) der Poxviren. Zwischen ORF M1 und M4 wird für t-RNA-ähnliche Sequenzen mit unklarer Funktion kodiert, da sich nicht alle zu reifen t-RNA-Formen entwickeln, d.h. aminoacetyliert werden <sup>(140, 141)</sup>.

Die Genprodukte werden sowohl in akut produktiv, d.h. lytisch infizierten Geweben, als auch in Keimzentren latent infizierter Mäuse exprimiert und könnten somit als Marker für Latenz dienen <sup>(20, 183)</sup>.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sowohl ORF M1 als auch die vier folgenden t-RNA-ähnlichen Sequenzen nicht notwendig für die Ausbildung einer Latenz oder der Reaktivierung hieraus sind. Ebenso führt das Fehlen von ORF M1 neben einer unverminderten Arteriitis in gamma-Interferon-Rezeptor-defizienten Mäusen (IFN $\gamma$ R<sup>-/-</sup>) und einer wesentlich geringeren Milzpathologie in den gleichen Mäusen zu einer verstärkten Reaktivierung des Virus aus dem Stadium der Latenz, so dass spekuliert wird, ORF M1 könnte für einen Suppressor einer Reaktivierung kodieren <sup>(29, 140)</sup>.

ORF M2 wird im Stadium der Latenz exprimiert und stellt ein Angriffsziel für CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten des Wirts dar. Des Weiteren scheint es in der Milz für die Ausbildung und für die Reaktivierung aus dem Stadium der Latenz nach akuter Infektion nach intranasaler aber nicht nach intraperitonealer Inokulation eine entscheidende Rolle zu spielen. Dies deutet auf die Wichtigkeit des Infektionsweges zur Ausbildung einer latenten Infektion hin. <sup>(71, 72, 173, 174)</sup>.

ORF M3 kodiert für ein sekretiertes Genprodukt der Größe 44 kD, welches in einem E- (early-) Muster exprimiert wird und als löslicher Chemokinrezeptor dient, obwohl es keine Sequenzhomologie zu anderen schon bekannten Chemokinrezeptoren aufweist <sup>(116, 178)</sup>. So blockiert es selektiv die Bindung von Vertretern aller vier bekannten Klassen von Chemokinen (C, CC, CXC und CX<sub>3</sub>C), auch humaner Chemokine, an zelluläre „high affinity“-Chemokinrezeptoren (meist G-Protein-gekoppelt) <sup>(116, 179)</sup>.

## A. EINLEITUNG

Auf diese Weise ist ORF M3 aufgrund der Blockade einer CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Aktivierung für die Etablierung einer latenten Infektion durch ausreichende Viruslast, aber auch wie in vivo gezeigt, für die Ausbildung einer akuten Meningitis nach intrazerebraler Inokulation von MHV-68 wichtig (<sup>22, 142, 180</sup>).

Insgesamt lässt sich sagen, dass die ORFs M1-M4 sowie die acht am linken Ende der kodierenden Sequenz lokalisierten viralen t-RNAs wichtige Funktionen bei der Immunevasion und der Ausbildung der typischen Pathologie der Milz ausüben.

Dies konnte anhand von MHV-76, eines anderen Virusisolates aus den Feldstudien, nachgewiesen werden. Dieses Genom ist bis auf das Fehlen eben dieser ORFs M1-M4 und der acht t-RNAs identisch zu dem von MHV-68. In der Maus wird die Beendigung der Infektion der Lunge nach intranasaler Inokulation des Virus und einer geringer ausgeprägten Splenomegalie als bei MHV-68-Infektion beobachtet (<sup>93</sup>).

Von den übrigen virusspezifischen M-ORFs ist nur ORF M7 und neuerdings auch M9 näher beschrieben. ORF M7 kodiert für das Membranglykoprotein gp 150, ein Homolog zu gp 350 von EBV. Es konnte gezeigt werden, dass es eine Rolle bei der Virusadhäsion und/oder der Fusion mit folgender Penetration spielt. Antikörper gegen dieses Membranprotein neutralisieren MHV-68 in einer komplementunabhängigen Art und Weise (<sup>157, 158</sup>). ORF M9 ist, obwohl anfänglich keine Aussage bezüglich einer Funktion getroffen werden konnte, ein Homolog zu Genen von Kapsidproteinen anderer Herpesviren (<sup>112</sup>).

Es gibt wie bei den anderen  $\gamma$ 2-Herpesviren relativ spät in der evolutionären Laufbahn integrierte Gene mit Homologien zu den eukaryotischen Wirtszellen. Von diesen wurden bis jetzt erst einige beschrieben (<sup>141</sup>).

ORF 4 spielt als CCPH - (complement control protein homolog) eine Rolle bei der Interaktion mit dem Wirts-Komplementssystem und damit sowohl mit der angeborenen als auch mit der adaptiven Immunantwort. Es interagiert hierbei mit der C3-Konvertase und wird sowohl als Membranprotein infizierter Zellen als auch als sekretiertes Protein in einer late-Kinetik exprimiert (<sup>49, 77</sup>).

ORF M11 stellt trotz der im Vergleich zu den Homologen anderer bcl-2-ähnlicher Moleküle geringeren Ähnlichkeit einen potenten Inhibitor TNF $\alpha$ -induzierter Apoptose dar und wird während der lytischen und während der latenten Infektion exprimiert, sodass es sowohl lytisch als auch latent infizierte Zellen vor dem programmierten Zelltod zu schützen scheint (<sup>129, 188</sup>). Es wird ebenfalls von anderen Gammaherpesviren kodiert; im Falle des EBV ist es das Gen BHRF1, diesem wird ebenso eine antiapoptotische Funktion unterstellt (<sup>63, 136</sup>).

ORF 72 kodiert für ein MHV-68 v-cyclin, also ein Molekül vom CyclinD-Typ, diesem wird, unterstützt von der Tatsache, dass EBV die zelluläre CyclinD-Expression und damit den Zellzyklus reguliert, generell eine wichtige Funktion in der Herpesvirusbiologie zugesprochen (<sup>75, 85</sup>).

## A. EINLEITUNG

Für primäre Lymphozyten konnte der Effekt des MHV-68 v-cyclins auf den Zellzyklus im Sinne einer Progression und auch die Inhibition der T-Zell-Differenzierung *in vitro* gezeigt werden. Die onkogene Potenz mit Entwicklung hochgradiger Lymphome zeigte sich *in vivo*. Ca. 50 % v-cyclin exprimierender transgener Mäuse entwickelten Tumoren, von deren Zellen sich Tumorzelllinien ableiten ließen, welche nach Inokulation in SCID-Mäuse wiederum zur weiteren Ausbildung von Lymphomen führten. Des Weiteren kommt v-cyclin trotz hauptsächlichlicher Expression in akut lytisch infizierten Zellen eine wichtige Funktion bei der Etablierung einer persistierenden Infektion und bei der Reaktivierung des Virus aus der Latenz zu <sup>(50, 66, 175, 176)</sup>.

ORF 74 kodiert wahrscheinlich für einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor. Die größte Homologie zeigt dieser ORF zum Gen des IL-8-Rezeptors, es scheint zusammen mit anderen Genen, wie z.B. ORF M11 (v-Bcl-2) mit dem es z.T. zusammen exprimiert wird, anti-apoptotisch zu wirken und wird in der Latenz zusätzlich zu den schon genannten Genen ORF M11 sowie 73 (Homolog des HHV8-LANA, latency associated nuclear antigen), v.a. in Peritonealzellen (PECs, peritoneal exudate cells), d.h. in B-Zellen und Makrophagen exprimiert <sup>(8, 10, 183, 184, 187)</sup>.

ORF K3 ergänzt die Immunevasionsstrategie von MHV-68. Der Evasionsmechanismus zeigt sich u.a. darin, dass sich das Virus in CD4<sup>+</sup>-T-Zell defizienten Mäusen trotz Vorliegen einer anfangs effizienten CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Antwort in großer Zahl repliziert. Interessanterweise ist dieser ORF homolog zu einem Genomabschnitt von HHV-8, aber nicht zu einem von HVS, EBV oder anderen Herpesviren. Das Genprodukt dieses ORFs ist ein Zinkfingerprotein mit zellulärem PHD/LAP-Motif. Es vermag möglicherweise sowohl die Präsenz von MHC-I-Molekülen durch Interaktion auf der Ebene der Chaperone mit der Prozessierung im Endoplasmatischen Retikulum auf der Oberfläche infizierter Zellen zu reduzieren als auch die Antigenpräsentation selbst zu hemmen. So könnte es die lytische Infektion trotz Anwesenheit aktivierter CD8<sup>+</sup>-T-Zellen fördern <sup>(17, 154, 203)</sup>.

Ein weiteres interessantes Gen ist ORF 50. Dieses stellt unter allen mittlerweile charakterisierten Herpesviren das einzige konservierte Homolog mit IE- (immediate-early-) Kinetik dar. Als EBV-Rta-Homolog (replication and transcription transactivator) spielt das Genprodukt sowohl in der de-novo-Infektion und bei der Reaktivierung aus Latenz auch bei MHV-68 eine entscheidende Rolle. So erfüllt es den Rta-Genen anderer verwandter Herpesviren ähnliche Aufgaben als Transaktivator bekannter early- und late- Gene <sup>(90, 197, 198)</sup>.

Für weitere mögliche Funktionen vorhergesagter MHV-68-Gene wird auf Tabelle 1 in Virgin et al. 1997 <sup>(183)</sup> verwiesen.

## A. EINLEITUNG

### 2. HERSTELLUNG REKOMBINANTER HERPESVIREN

Um erste Hinweise auf eine mögliche Funktion eines viralen Gens zu erhalten, kann man die Ergebnisse der Sequenzierung und darauf folgende Homologievergleiche mit anderen schon untersuchten und nah verwandten Herpesviren nutzen. Die wahre Funktion des Gens erhält man jedoch nur, indem man eine Mutation in das Gen einführt und dann den resultierenden Phänotypen des rekombinanten Virus mit dem des Wildtyps vergleicht. Virale Gene, die z.B. Zelltropismus ermöglichen, sind (falls überhaupt bekannt) sehr unterschiedlich (z.B. M45 und M36 von MCMV) und zeigen keine Sequenzhomologien zu anderen bekannten Genen. Daher ist speziell zur Untersuchung dieser Eigenschaft lediglich unspezifisches Suchen mit sog. Knock-out-Mutanten möglich, bei denen jeweils ein Gen ausgeschaltet ist.

#### 2.1 Überblick über bisher angewandte Mutagenesemethoden

Bisher war es sehr schwierig, herpesvirale Rekombinanten zur Untersuchung von Genfunktionen herzustellen. Zum einen mussten alle Mutagenesen in Zellkultur durchgeführt werden, da es bis dato unmöglich war, die sehr großen Genome in gängige Plasmide zu klonieren. Zum anderen erschwerte die langsame Replikationsgeschwindigkeit der Herpesviren, die Instabilität der Genome aufgrund häufig vorkommender Wiederholungssequenzen mit der Folge interner Rekombinationsvorgänge und aufwändige Selektionsverfahren gegen Wildtyp-Viren die Arbeit.

Man unterscheidet grundsätzlich zwei Ansätze der Mutagenese. Einerseits kann man, wie in der vorliegenden Arbeit beschrieben, mittels eines ungerichteten Mutageneseverfahrens durch zufällige Mutation eines unbekanntes Gens einen Phänotypen erzeugen, und, falls dieser erkennbar ist, dessen genetische Ursache untersuchen und so versuchen dem Gen eine Funktion zuzuordnen (forward genetics).

Andererseits kann man z.B. aufgrund vorliegender Homologievergleiche eine Mutation gezielt in ein Gen einführen und anschließend die Rekombinante phänotypisch untersuchen (reverse genetics).

Im folgenden Abschnitt werden kurz mittlerweile historische Mutageneseverfahren geschildert, welche für Herpesviren beschrieben wurden.

## A. EINLEITUNG

### 2.1.1 Ungerichtete Chemische Mutagenese

Diese Methode beruht auf der mutagenen Wirkung der Zugabe bestimmter Chemikalien zu mit Wildtyp-Viren infizierten eukaryontischen Zellen oder deren Bestrahlung mit UV-Licht und wurde erstmals 1977 beschrieben<sup>(200)</sup>. Es entstehen zufällige Mutationen aufgrund einer Transition, Transversion oder Deletion in der DNA des betroffenen Genabschnitts. Dabei hat man sich zu Nutze gemacht, dass das so mutierte Genprodukt bezüglich der Funktion mit Einfluß auf die Replikation des Virus temperatursensitiv werden kann. Dadurch können auch für die Virusreplikation essentielle Gene untersucht werden. Temperatursensitivität heißt, das Genprodukt ist nur bei einer bestimmten permissiven Temperatur aktiv. Wenn man die infizierten Zellen bei einer höheren Temperatur kultiviert, ist das Protein defekt, und das Virus vermehrt sich nicht. Zum einen ist dieses Verfahren mit einer Erfolgsrate von ca. 3% sehr ineffizient und zum anderen die Identifizierung des betroffenen Gens sehr schwierig, zudem lassen sich Doppel- oder Mehrfachmutationen nicht ausschließen<sup>(5, 106, 200)</sup>.

### 2.1.2 Zielgerichtete Insertionsmutagenese durch homologe Rekombination in Herpesvirus-infizierten Zellen

Bei diesem Mutageneseverfahren, welches erstmals 1980 beschrieben wurde, wird ein Gen zielgerichtet unterbrochen bzw. deletiert<sup>(107)</sup>. Dabei macht man sich mittels zellulärer Rekombinasen und DNA-Reparaturmechanismen den Vorgang der homologen Rekombination zu Nutze. Man transfiziert ein von homologen Abschnitten der gewünschten Insertionsstelle flankiertes Fragment in mit Wildtypvirus infizierte Zellen, wonach das Fragment in das Genom inseriert. Je nach Wahl der Homologie hat dies eine reine Insertion eines neuen Abschnitts oder das Herausschneiden nicht gewünschter Sequenzen zur Folge. Für virale Gene mit Einfluß auf die Replikation ist die Erfolgsrate verglichen mit neueren Mutageneseverfahren gering. Zur Identifizierung erzeugter Rekombinanten dienen Markergene wie z.B. das der Thymidinkinase<sup>(107, 120)</sup> oder der  $\beta$ -Galaktosidase (Xgal) innerhalb der inserierten Sequenz. Letztere führt zu spezifisch angefärbten Virusplaques<sup>(95, 148)</sup>. Diese Form der Selektion ist jedoch ebenfalls sehr arbeits- und zeitaufwändig. Ebenso möglich ist eine direkte Selektion durch Einführung von Resistenzgenen wie das der Guanosyl-Phosphoribosyl-Transferase (gpt)<sup>(54, 110)</sup> oder des Antibiotikums Neomycin (neo)<sup>(195)</sup>. Hierbei muss man jedoch beachten, dass im Falle der Mutation innerhalb eines essentiellen Genomabschnitts die Rekombinante ohne eine Maßnahme wie z.B. eine komplementierende Zelllinie, die das virale Genprodukt in „trans“ zur Verfügung stellt, nicht lebensfähig ist<sup>(37)</sup>.

## A. EINLEITUNG

Wie bei der chemischen Mutagenese kann es auch hier zu internen Rekombinationsvorgängen in der infizierten Zelle kommen, welche die Stabilität des rekombinanten Genoms beeinträchtigen und die Erfolgsquote weiter senken <sup>(148, 182)</sup>.

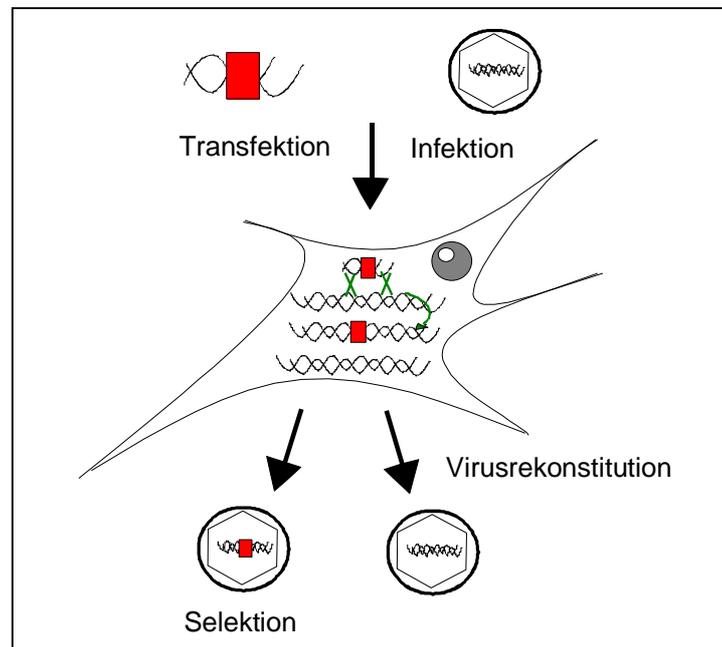


Abb. 5: Schema der Mutagenese in Zellen mittels direkter Insertion eines Markergens. Ein lineares DNA-Fragment, welches die Mutation mit einem Markergen enthält und von Homologien der Zielregion flankiert wird, inseriert nach Transfektion (oberer Pfeil) in die virusinfizierte Zelle mittels homologer Rekombination (grüne Kreuze) in das virale Genom. Es entstehen nach Rekonstitution (untere Pfeile) sowohl Wildtyp- als auch rekombinante Viren (grüner gebogener Pfeil), die durch Selektion auf das inserierte Markergen von den Wildtypviren abgetrennt werden können.

### 2.1.3 Zielgerichtete Mutagenese durch homologe Rekombination überlappender viraler Cosmide

Man macht sich zu Nutze, dass mittels eines Sets von Cosmiden, welche als subklonierte Fragmente des viralen Genoms jeweils überlappende Bereiche besitzen, die Gesamtlänge auch eines großen Herpesvirus-Genoms abgedeckt werden kann. Somit kann nach Mutagenese eines Fragments z.B. mittels PCR und Transfektion der Cosmide in eine permissive Zelle durch homologe Rekombination die Gesamtlänge des Virusgenoms wieder hergestellt werden. Dies wurde erstmals 1988 für das Pseudorabies-Virus gezeigt, später auch für HSV, EBV und VZV, 1996 für HCMV <sup>(31, 33, 79, 167, 177)</sup>. Für HCMV benötigt man aufgrund der Größe des Genoms ein Set aus acht Cosmiden, was wiederum sieben sehr spezifische Rekombinationsvorgänge in der permissiven Zelle nach Transfektion aller Fragmente nötig macht und eine Schwierigkeit darstellt. Verglichen mit dem Verfahren der Mutagenese durch homologe Rekombination besitzt diese Methode den Vorteil, dass eine Selektion auf Rekombinanten nicht mehr notwendig ist. Ein Nachteil wiederum ist der Arbeitsaufwand, die geringere Effizienz verglichen mit neueren Mutageneseverfahren aufgrund der

## A. EINLEITUNG

geringen Frequenz der Rekombinationsereignisse in den notwendigen permissiven eukaryonten Zellen, die aber dennoch zu unerwünschten internen Ereignissen führen können, sowie die Schwierigkeit Revertanten herzustellen.

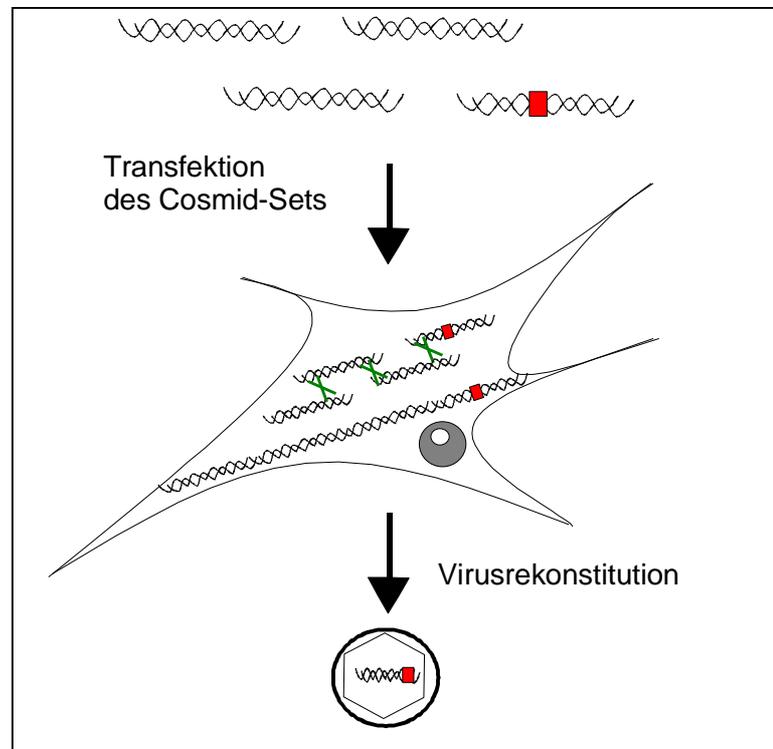


Abb. 6: Mutagenese mittels Cosmiden, ein Genom wird als Cosmid-Set subkloniert (hier exemplarisch 4 Fragmente), ein Fragment trägt eine Mutation (roter Kasten). Transfektion (oberer Pfeil) und homologe Rekombination (grüne Kreuze) führen zur Wiederherstellung eines vollständigen Virusgenoms und zur Rekonstitution rekombinanter Viren (unterer Pfeil).

### 2.2 Mutagenese mittels künstlicher bakterieller Chromosomen (BACs) in *E.coli*

Die geringe Effizienz und der hohe Zeitaufwand, der mit den bisher beschriebenen Mutageneseverfahren verknüpft war, machten es notwendig, nach neuen Verfahren zu suchen. Diese sollten es ermöglichen, eine Mutagenese durch Verlagerung von eukaryontischen Zellen in *E.coli*, für die viele etablierte genetische Verfahren existieren, schnell durchzuführen und nicht mehr auf zelluläre Rekombinationsmechanismen und Selektion auf rekombinante virale Genome angewiesen zu sein. Ebenso sollten die Spuren der Mutagenese so klein wie möglich sein, das heißt wenige oder keine operationalen Sequenzen hinterlassen. Zudem sollten virale Revertanten, welche durch Wiederherstellung der Wildtyp-Sequenz den festgestellten Phänotyp der Mutante verlieren und wieder den des Wildtyps zeigen, leicht herzustellen sein. Denn nur sie zeigen formal, dass die eingeführte Mutation auch wirklich den Grund des beobachteten Phänotyps darstellt und nicht andere, unbeobachtete Veränderungen im viralen Genom.

## A. EINLEITUNG

### 2.2.1 Klonierung des MHV-68-Genoms als BAC

Einen großen Schritt in Richtung der eben genannten Idealvorstellung aus virologischer Sicht stellt die Klonierung des Genoms der Herpesviren als künstliches bakterielles Chromosom (BAC, bacterial artificial chromosome) dar, mit deren Hilfe man erstens das Bakterium mit seiner hohen Replikationsgeschwindigkeit als „Replikationsfabrik“ für das virale Genom und außerdem dessen auf einfache Weise kontrollierbare, gut untersuchte Rekombinationsmechanismen für die Mutagenese ausnutzt.

Bisher war es nicht möglich, ein herpesvirales Genom als Ganzes in ein Plasmid zu klonieren. Dies liegt zum einen daran, dass Plasmide so große Sequenzen (bis zu 230 kbp) nicht stabil in *E.coli* behalten können<sup>(69)</sup>. Zum anderen scheiterten Versuche mit ebenfalls künstlichen Chromosomen in Hefen (YAC, yeast artificial chromosome) trotz großer Kapazitäten wiederum am Auftreten unerwünschter interner Rekombinationsvorgänge aufgrund der in Herpesvirusgenomen vorkommenden sich wiederholenden Sequenzen<sup>(123)</sup>. Außerdem stellt die Isolierung der YACs in ausreichender Qualität aus Hefen ein Problem dar.

Die sich bietenden Vorteile für Geschwindigkeit und Durchführbarkeit der Mutagenese zeigten Messerle et al. indem sie 1997 das MCMV-Genom als BAC klonierten<sup>(104)</sup>. Hierbei wurde das virale Genom in ein Replikon des *E.coli* F-Plasmids kloniert (danach wird es als BAC bezeichnet) und per Transformation in *E.coli* überführt. Dieses F-Plasmid kommt in einer geringen Kopienzahl von 1-2 Plasmiden pro Bakterienzelle vor und trägt sogenannte tra-(Transfer)-Gene, welche bei der Teilung des Bakteriums die Plasmidübertragung gezielt kontrollieren.

Dieses F-Plasmid bietet den Vorteil, Sequenzen von bis zu 300kbp relativ stabil in rekombinationsdefizienten *E.coli* (*recA*<sup>-</sup>) zu bewahren<sup>(139)</sup>. Im Bakterium wiederum kann es dann mit für den jeweiligen Zweck auszuwählenden Methoden mutagenisiert und die rekombinanten viralen Genome anschließend nach Transfektion in eukaryontische Zellen zu Viren rekonstituiert werden.

Zur Klonierung des MCMV-Genoms als BAC wurde das BAC-Plasmid linearisiert, mit Homologien zum viralen Genom und als Selektionsmarker mit dem *gpt*-Gen versehen und in MCMV-infizierte Zellen transfiziert. Mittels homologer Rekombination kommt es zur Insertion der BAC-Sequenzen in das virale Genom. Aufgrund der Tatsache, dass die MCMV-BAC-Plasmide während der Replikation zirkularisiert sind, konnten diese nach Selektion mittels Selektion unter Xanthin/Mycophenolsäure durch Insertion des *gpt*-Gens für die plasmidähnlichen zirkulären Formen mit inserierter BAC-Sequenz mittels der Methode von Hirt aus den Zellen isoliert und in *E.coli* überführt werden<sup>(54, 64)</sup>. Die folgende Abbildung demonstriert nochmals das Prinzip der BAC-Klonierung.

## A. EINLEITUNG

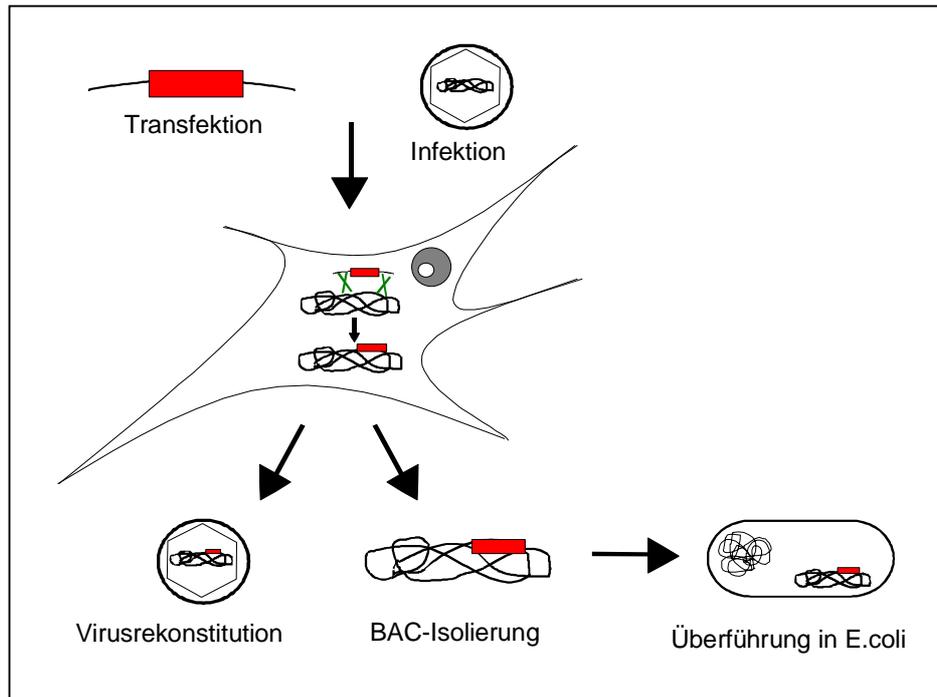


Abb.7: Prinzip der BAC-Klonierung: mit einem Herpesvirus infizierte Zellen werden mit einem Rekombinationsplasmid, welches ein gpt-Gen und Homologien zum viralen Genom zusätzlich zu den BAC Sequenzen trägt (rote Box), transfiziert. Aufgrund homologer Rekombination kommt es zur Insertion von BAC-Sequenzen und gpt-Gen (rote Box) in das virale Genom. Folgend können Viren rekonstituiert sowie das BAC isoliert und in E.coli überführt werden, wo man deren gut untersuchtes System für Replikation und Mutagenese des viralen Genoms ausnutzen kann.

Messerle et al. legten die Grundlage für die folgende Klonierung weiterer Vertreter der Herpesviridae als BAC, es folgten HSV I <sup>(132)</sup>, EBV <sup>(36)</sup>, HCMV <sup>(48)</sup>, Pseudorabiesvirus oder auch Schweine-Herpesvirus I <sup>(146)</sup> und schließlich 2000 durch Adler et al. auch MHV-68 <sup>(2)</sup>. Des Weiteren folgten das Meerschweinchen-CMV (GPCMV, guinea pig cytomegalovirus) <sup>(101)</sup>, das Pferdeherpesvirus I (EHV-1, equine herpesvirus I) <sup>(130)</sup> sowie kürzlich erschienen des HHV-8 als weiteres Gammaherpesvirus <sup>(207)</sup>. Im Unterschied zur beispielhaft dargestellten Methode, das Genom von MCMV als BAC zu klonieren, kam es bei der Klonierung von MHV-68 zusätzlich zum prinzipiell gleichen Vorgehen zu einigen Neuerungen. Als Ort der Insertion der BAC-Sequenzen wurde das linke Ende der kodierenden Sequenz mit ORF1 und den ersten vier der acht vorhandenen viralen t-RNAs gewählt, welche wie schon dargestellt für die lytische Replikation des Virus in vitro sowie für die Ausbildung der Latenz in vivo nicht notwendig sind <sup>(140)</sup>. Um infizierte Zellen besser identifizieren zu können, wurde zusammen mit den BAC-Sequenzen auch das Gen für das grün fluoreszierende Protein (gfp, green fluorescent protein) inseriert. Diese Insertion wurde im Gegensatz zu der dargestellten Methode bei MCMV durch ein einzelnes „crossing-over“-Ereignis am linken Ende herbeigeführt, eine Strategie, wie sie schon zur Erzeugung viraler Rekombinanten des HVS angewendet wurde <sup>(53)</sup>. Das MHV-68-BAC weist eine den anderen Herpesvirus-BACs vergleichbare Stabilität auf. Aufgrund der terminalen und der beiden internen Wiederholungssequenzen bietet das MHV-68-Genom

## A. EINLEITUNG

jedoch gute Voraussetzungen für interne Rekombinationsvorgänge. Um die Möglichkeit für Rekombinationsvorgänge zu minimieren, wird das MHV-68-BAC wie andere BACs auch in DH10B vermehrt, einem E.coli-Stamm mit einer Mutation des RecA-Proteins. Dieses ist ein Enzym, welches in der Bakteriengenetik die Assoziation eines einzelnen DNA-Stranges mit einer homologen Sequenz stabilisiert und somit Rekombinationsvorgänge ermöglicht. Trotz allem kommt es bei der Passage des BACs in diesen E.coli zu Rekombinationsvorgängen. Auf dieses Phänomen, welches jedoch keinen Einfluß auf die Wachstumskinetik in vitro hat <sup>(?)</sup> wird ebenso in Ergebnisse 1.6 eingegangen. Die folgende Abbildung verdeutlicht das Entstehen des MHV-68-BAC-Plasmids:

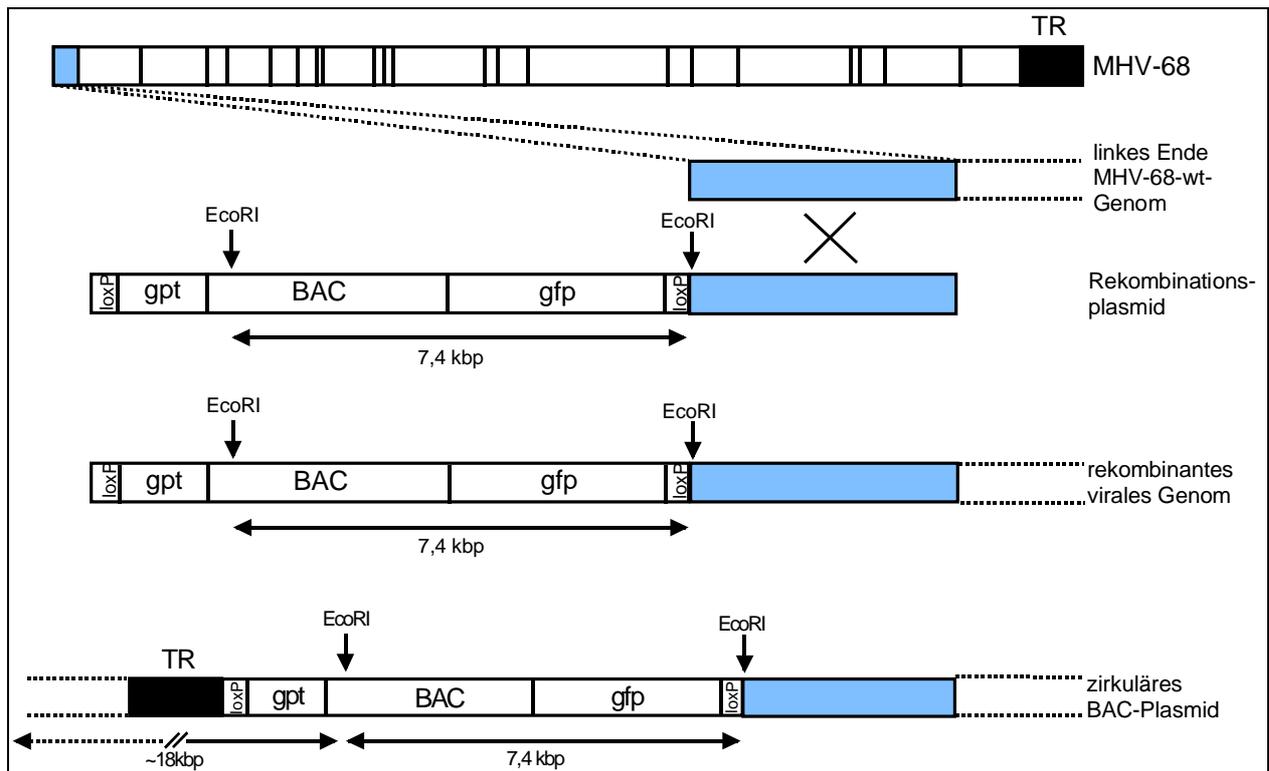


Abb. 8: angelehnt an Abbildung in <sup>(?)</sup>, Darstellung des Prinzips der Klonierung des Genoms von MHV-68 als BAC. Der erste Schritt ist die Insertion eines so genannten Rekombinationsplasmids, welches eine Homologie zum linken Ende des Genoms, sowie von *loxP*-sites eingerahmt das *gpt*-Gen, die BAC-Sequenzen und das *gfp*-Gen besitzt, in die Zielregion des MHV-68-Genoms nach Kotransfektion in mit MHV-68 infizierte Fibroblasten. Es entsteht so ein rekombinantes virales Genom, welches nach Zirkularisierung zum MHV-68-BAC-Plasmid wird. Aufgrund der Insertionen entsteht bei *EcoRI*-Verdau eine zusätzliche Bande bei 7,4 kbp sowie aufgrund der zirkulären Form des BACs mit Verschmelzung der terminalen *EcoRI*-Fragmente eine Bande bei 18 kbp.

## A. EINLEITUNG

### 2.2.2. ungerichtete Mutagenese viraler BAC-Plasmide durch zufällige Transposoninsertion und Rekonstitution viraler Rekombinanten mit invasiven Bakterien, ein Verfahren der forward genetics

Um bislang unerkannte Funktionen von Bestandteilen eines viralen Genoms wie das des MHV-68 zu finden, ist ein Ansatz notwendig, welcher mit möglichst einfachen und schnell durchzuführenden Mitteln eine hohe Ausbeute neu erkannter Genfunktionen verspricht.

Bezüglich eines Zelltropismus determinierender Genfunktionen gibt es für MHV-68 noch keinerlei Erkenntnisse. Dies bedeutet, es gibt keine Konsensus-Sequenzen oder bekannte Homologien, welche eine gezielte Untersuchung ermöglichen würden. Deshalb wählten wir zur Untersuchung des Genoms von MHV-68 die Methode der ungerichteten Mutagenese mittels der Insertion mobiler genetischer Elemente, sog. Transposons. Dieses Verfahren wurde in der Arbeitsgruppe schon zur Mutagenese des MCMV-BACs verwendet <sup>(24)</sup>.

Die Nukleotidsequenzen der Transposons sind fähig, sich selbst und manchmal mit ihnen verbundene Basenabfolgen in andere Genome zu transferieren und dort auch zu inserieren. Aufgrund der Verwendung eines speziell ausgewählten Transposons mit einer Präferenz der Insertion in Plasmide, somit auch in das MHV-68-BAC, kann so eine Ein-Schritt-Mutagenese durchgeführt werden. Dabei entsteht eine große Anzahl mutierter MHV-68-BAC-Genome, die im Idealfall statistisch verteilte Transposoninsertionen aufweisen.

Rekombinante virale Genome mit Transposoninsertionen lassen sich mittels Verdau mit Restriktionsendonukleasen und nachfolgender Untersuchung in der Gelelektrophorese von solchen Genomen ohne Transposoninsertionen auf einfache Weise unterscheiden. Ihr Restriktionsmuster unterscheidet sich aufgrund der inserierten mobilen genetischen Einheiten von dem des Wildtyps. Um die Untersuchung des Genoms von MHV-68 bezüglich Zelltropismus nach dem schon dargestellten Verfahren der „forward genetics“ durchzuführen, sollten rekombinante virale Genome ohne vorherige Analyse in großer Zahl sozusagen blind rekonstituiert werden.

Hierzu wurde das Plasmid pGB2 $\Omega$  inv-hly <sup>(55)</sup> verwendet, welches Bakterien nach erfolgter Transformation invasive Eigenschaften verleiht. Somit konnten arbeitsaufwändige Schritte wie Isolierung viraler Genome und nachfolgende Transfektion in Eukaryonten zum Zwecke der Rekonstitution viraler Mutanten umgangen werden.

Um virale Rekombinanten aber auf einfachere Weise nach deren Rekonstitution von Wildtypviren zu unterscheiden, inserierten wir in die transposable Einheit einen in der Fluoreszenzmikroskopie sichtbaren Marker, das rot-fluoreszierende Protein (RFP, red fluorescent protein). Wir wählten ein rot leuchtendes Protein, da das erwähnte MHV-68-BAC schon das gfp-Gen enthielt.

## A. EINLEITUNG

Auf Einzelheiten des verwendeten Verfahrens der Transposon-Mutagenese, deren Problematik und des Gebrauchs invasiver Bakterien wird in den folgenden Abschnitten der vorliegenden Arbeit eingegangen. Die auf zufällige Weise erfolgende Mutagenese von MHV-68 folgt der Strategie von Brune et al. <sup>(24)</sup>, welche in Abb.9 dargestellt wird.

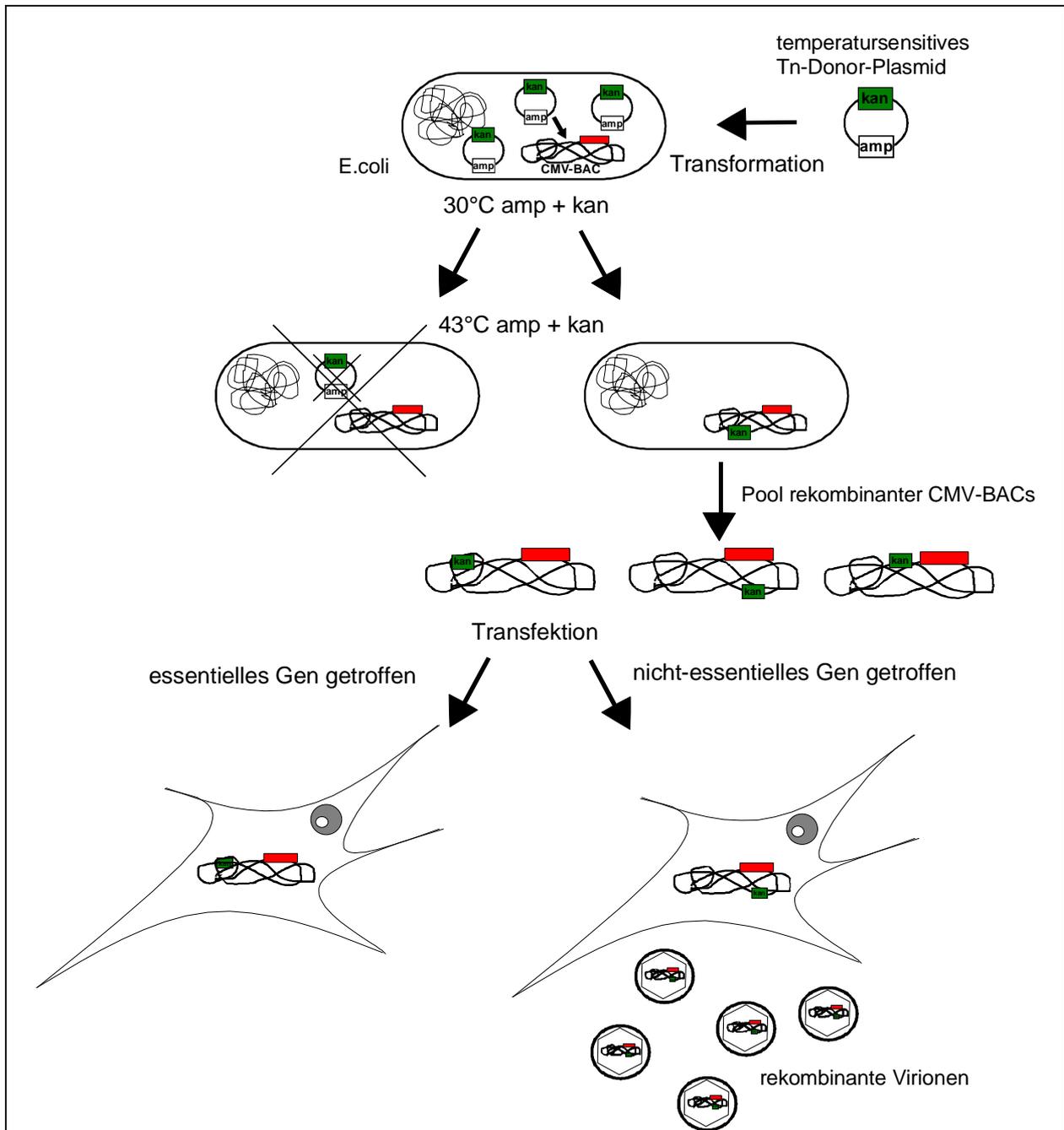


Abb. 9: E.coli, welche das CMV-BAC-Plasmid besitzen, werden mit einem temperatursensitiven Tn-Donor-Plasmid transformiert, wodurch das Transposon in das CMV-BAC-Plasmid inserieren kann. Durch Selektion mit Chloramphenicol (cam, BAC besitzt cam-Resistenzgen, rot) und Kanamycin (kan, Transposon besitzt kan-Resistenzgen, grün) und Inkubation bei 43°C werden E.coli mit CMV-BAC-Genom, in das ein Transposon inseriert wurde, positiv selektiert und angereichert. Nach Isolierung eines Pools rekombinanter BAC-Plasmide werden permissive Zellen mit einzelnen rekombinanten Klonen transfiziert. Es werden nur solche Genome zu Virionen rekonstituiert, bei den das Tn nicht in ein essentielles Gen inseriert hat.

## A. EINLEITUNG

### 3. ZIEL DER ARBEIT

Zur Untersuchung des MHV-68-Genoms bezüglich Zelltropismus determinierender Genfunktionen sollte ein Verfahren der klassischen oder „forward genetics“ verwendet werden. Dieses musste ermöglichen, zufällig hergestellte replikationsfähige virale Rekombinanten nach deren „blinder“ Rekonstitution auf sechs verschiedenen Zelllinien (Fibroblasten, Endothelzellen und Makrophagen) bezüglich ihrer Wachstumskinetik zu untersuchen. Hierzu waren die folgenden einzeln aufgeführten Schritte notwendig:

1. Anwendung der Transposonmutagenese <sup>(24)</sup> auf das Genom des MHV-68, welches als BAC kloniert zur Verfügung stand <sup>(2)</sup>
2. Rekonstitution einer großen Anzahl replikationsfähiger MHV-68-Mutanten durch Kokultivierung von BAC tragenden Zellen mit MHV-68 gegenüber permissiven Zellen. Aufgrund Vermittlung invasiver Eigenschaften durch das Plasmid pGB2 $\Omega$  inv-hly <sup>(55)</sup> dringen die Bakterien hierbei in die Zellen ein und das virale Genom wird anschließend freigesetzt. Die arbeitsaufwändigen Vorgänge der BAC-DNA-Isolierung und nachfolgenden Transfektion wurden somit umgangen. Dieses Verfahren wurde zuvor für MCMV etabliert <sup>(26)</sup>.
3. Test sechs verschiedener Zelllinien (Fibroblasten, Endothelzellen und Makrophagen) mit replikationsfähigen viralen Rekombinanten, um Zelltropismus determinierende virale Gene zu identifizieren

## B. MATERIAL UND METHODEN

### B. MATERIAL UND METHODEN

#### 1. MATERIAL

##### 1.1 Reagenzien

Agar	Life Technologies, Deutschland
Agarose	Biozym, Deutschland
Alkalische Phosphatase	Roche, Deutschland
Ampicillin	Roche, Deutschland
Bacto Hefe und Trypton	Life Technologies, Deutschland
Bromphenolblau	Serva, Deutschland
Chloramphenicol	Life Technologies, Deutschland
Dig DNA Labelling Set	Roche, Deutschland
Digoxigenin/CDP-Star-Kit	Roche, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva, Deutschland
di-Natriumhydrogensulfat	Riedel-de-Haen, Deutschland
Dithiothreitol	Pharmacia/LKB, Schweden
DNA-Gel-Reinigungskit	Qiagen, Deutschland
DNA-Größenstandards (Marker III)	Roche, Deutschland
dNTPs	Roche, Deutschland
Dulbecco´s modified Eagle medium (DMEM)	Gibco, USA
Essigsäure	Roth, Deutschland
Ethanol	Riedel-de-Haen, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat-Na-Salz (Na-EDTA)	Roth, Deutschland
Expand High Fidelity PCR System Polymerase	Roche, Deutschland
Filme, Southern Blot (BioMax MR)	Kodak, USA
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA, Deutschland
Gentamicin	Sigma, Deutschland
Glycerol	Roth, Deutschland
Glycin	Serva, Deutschland
HEPES	Roth, Deutschland
Isopropanol	Riedel-de-Haen, Deutschland
Kaliumacetat	Riedel-de-Haen, Deutschland
Klenow-Polymerase	New England Biolabs (NEB), USA
L-Glutamin	Life Technologies, Deutschland
Methylzellulose	Fluka, Schweiz
Modified Eagle Medium	Life Technologies, Deutschland
10x Modified Eagle Medium	Life Technologies, Deutschland
Natriumacetat	Riedel-de-Haen, Deutschland
Natriumhydroxid	J.T. Baker B.V., Holland
Neugeborenen-Kälberserum (NCS)	PAA, Deutschland
Nucleobond AX (BAC-DNA-Isolierungskit)	Macherey-Nagel, Deutschland
Nylonmembran, Southern Blot	Schleicher&Schuell, Deutschland
PCR-Reinigungskit	Qiagen, Deutschland
PBS (Phosphate buffered saline)	Life Technologies, Deutschland
Penicillin	Life Technologies, Deutschland
Penicillin-Streptomycin	Gibco, USA

## B. MATERIAL UND METHODEN

Phenol/Chloroform	Roth, Deutschland
Plasmid Mini-Kit	Amersham Pharmacia, USA
Proteinase K	Roche, Deutschland
QiaEx Gelpurifikationskit	Qiagen, Deutschland
Qiaprep Spin Plasmid Miniprep Kit	Qiagen, Deutschland
Restriktionsendonukleasen	Roche, Deutschland und New England Biolabs (NEB), USA
RPMI 1640	Life Technologies, Deutschland
T4-DNA-Ligase	Roche, Deutschland
Taq-DNA-Polymerase	Roche, Deutschland
Tetrazyklin	Sigma, Deutschland
Trypsin	Life Technologies, Deutschland
Trypton	Difco, Deutschland

Alle anderen Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt) und Sigma (Deisenhofen) bezogen.

### 1.2 Bakterienstämme

DH10B	recA <sup>-</sup>	Life Technologies, Deutschland
DH5 $\alpha$	recA <sup>-</sup>	Life Technologies, Deutschland

### 1.3 Plasmide und Viren

#### kommerziell erworben

pEGFP-C1	New England Biolabs (NEB), USA
pDsRed1-N1	Clontech, USA

#### von der eigenen Arbeitsgruppe erhalten

pTsTnMax8B	Brune et al. 1999 <sup>(24)</sup>
pHA3 (MHV-68-BAC), ebenso Wildtyp-MHV-68-Virus	Adler et al. 1999 <sup>(2)</sup>

## B. MATERIAL UND METHODEN

### Herstellung der im Rahmen der vorliegenden Dissertation verwendeten Plasmide

#### pTsTnMax8B-RFP

In die nach Eliminierung der zweiten BglII-Schnittstelle noch vorhandene BglII-Restriktionsschnittstelle des Transposon-Donor-Plasmides pTsTnMax8B wurde das durch Restriktionsenzymverdau des Plasmids pDsRed1-N1 mit NsiI (schneidet bei nt-Position 0) und SspI (schneidet bei nt-Position 1625) gewonnene 1,625kbp-Fragment einkloniert. Es enthält das rfp-Gen mit eigenem Promoter (CMV immediate early promoter, P<sub>CMV IE</sub>) und eigener polyA-Sequenz (SV40 polyA) sowie eine multiple Klonierungsstelle (MCS).

#### 1.4 Zellen

BHK-21* Cre <sup>+</sup> -REF	ATCC CCL10, Goldhamster-Nierenzellen embryonale Rattenfibroblasten (rat embryonal fibroblasts), exprimieren Rekombinase Cre stabil, ursprünglich von W. Burns, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland, USA
IC-21*	ATCC TIB-186, SV 40-transformierte murine Makrophagen aus C57BL/6-Maus
J774.A.1* MEF	ATCC TIB-67, murine Makrophagen aus BALB/c-Maus murine embryonale Fibroblasten aus BALB/c-Maus, Präparation laut Protokoll (siehe B.2.1.1)
MHEC-5T	murine Herzendothelzellen, Plendl et al., Virchows Archiv 426: 619-28 (1995), bezogen von J. Plendl, LMU München
NIH-3T3* SVEC 4-10*	ATCC CRL 1658, murine Fibroblasten aus BALB/c-Maus SV 40-transformierte Lymphendothelzellen

\* = wurde über American Type Culture Collection (ATCC) bezogen

#### 1.5 Oligonukleotide

Die für Klonierungen und Sequenzierungen verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Martinsried bei München) hergestellt. Eine Übersicht über alle verwendeten Oligonukleotide wird im Anhang gegeben.

## B. MATERIAL UND METHODEN

### 2. METHODEN

Sofern nichts anderes angegeben, wurden Methoden in Anlehnung an die Protokolle in Maniatis et al. <sup>(94)</sup> durchgeführt. Falls kommerziell erhältliche Kits verwendet wurden, kam das zum Kit gehörige Standardprotokoll zur Anwendung, siehe hierzu auch die genaue Zusammensetzung von Puffern und sonstigen benutzten Reagenzien.

#### 2.1 Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren

##### 2.1.1 Plasmid-DNA-Isolierung aus Bakterien in analytischem Maßstab (Minipräparation)

Die Bakterien wurden in LB-Medium (10 g Bacto-Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g Natriumchlorid und Wasser ad 1000 ml Gesamtvolumen oder auf Agarplatten (ad 1000 ml Gesamtvolumen mit zusätzlich 15 g Agar) unter Zusatz der jeweils zur Selektion der Plasmide benötigten Antibiotika bei 37°C über Nacht (ÜN) kultiviert. In den Fällen, in denen die Plasmide einen temperatursensitiven Replikationsursprung besaßen, wurde bei 30°C ÜN inkubiert. Für Plasmid-Präparationen zu analytischen Zwecken wurde das Plasmid-Mini-Kit der Firma Amersham Pharmacia verwendet. Hierzu wurden 3 ml des LB-Mediums mit einer Bakterienkolonie angeimpft und ÜN entsprechend obiger Angaben bei 30°C bzw. 37°C ÜN inkubiert. Anschließend wurden je Präparation 1,5 ml der Suspension in Eppendorf-Reaktionsgefäßen pelletiert und das Pellet in 150 µl Lösung 1 (25 mM Tris/HCl und 10 mM EDTA, pH 8,0) resuspendiert. Für den nächsten Schritt der alkalischen Lyse wurden 150 µl der Lösung 2 (0,2 M NaOH, 1% SDS) hinzugegeben. SDS, chromosomale bakterielle DNA und Proteinbestandteile wurden durch weitere Zugabe von Lösung 3 (3 M KAc, pH 4,8) ausgefällt. Nach Zentrifugation für 5 min bei 14.000 rpm in der Eppendorffzentrifuge 5415C wurde der Überstand in ein zum Kit gehöriges Ionenaustauschchromatographie-Säulchen überführt und nach einer weiteren Zentrifugation bei 14.000 rpm je 400 µl des Waschpuffers addiert und erneut für 1 min zentrifugiert. Zur Elution der Plasmid-DNA wurde 100 µl destilliertes Wasser auf die Säulchen gegeben und wiederum 1 min bei 14.000 rpm zentrifugiert.

##### 2.1.2 Plasmid-DNA-Isolierung aus Bakterien in quantitativem Maßstab (Maxipräparation)

Für DNA-Maxipräparationen wurde der QIAGEN Plasmid Midi/Maxi Kit der Firma Qiagen verwendet. Hierzu wurden 200 ml LB-Medium mit zur Selektion benötigten Antibiotika mit einem

## B. MATERIAL UND METHODEN

Aliquot einer Bakterien-Glycerin- oder ca. 100  $\mu$ l einer Bakterien-Vorkultur (zuvor für ca. 8 Stunden bei 30°C bzw. 37°C bei 200 rpm geschüttelt) angeimpft und ÜN bei 30°C bzw. 37°C bei 200 rpm geschüttelt und kultiviert. Nach Pelletierung für 15 min bei 4000 rpm in einer Kontron-Hermle-Zentrifuge (Centrikon H-401) wurden die aufzuschließenden Bakterien in 10 ml Lösung P1 resuspendiert und nach Zugabe von 10 ml Lösung P2 und 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur lysiert. Danach wurden durch folgende Zugabe von 10 ml Lösung P3 und 15-minütiger Inkubation auf Eis SDS, bakterielle chromosomale DNA und Proteinbestandteile ausgefällt und diese durch 35-minütige Zentrifugation bei 6000 rpm und 4°C in der vorgekühlten Zentrifuge pelletiert. Eventuell im Überstand verbliebene Reste des Präzipitates wurden durch Filterung über Gaze entfernt. Der Überstand wurde auf die in der Zwischenzeit mit je 10 ml Puffer QBT äquilibrierten Ionenaustauscher-Säulchen des Kits gegeben, die Säulchen anschließend mit je zweimal 30 ml Puffer QC gewaschen. Anschließend wurde die an die Ionenaustauscher-Matrix gebundene Plasmid-DNA mit je 15 ml Puffer QF eluiert und mit je 10,5 ml (0,7 Volumeneinheiten) Isopropanol gefällt und daraufhin für 30 min bei 11.000 rpm und 4°C in einer Sorvall SS-34-Zentrifuge pelletiert. Nach Waschen des Pellets mit 70%igem Ethanol wurde dieses luftgetrocknet und in 200  $\mu$ l TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) gelöst.

### 2.1.3 BAC-DNA-Isolierung aus Bakterien in analytischem Maßstab (Minipräparation)

Bei der Präparation der BAC-DNA war es aufgrund der Größe des Plasmids notwendig, Scherkräfte (starkes Schütteln sowie zu kräftiges Pipettieren) zu vermeiden. Zur Präparation wurden die Lösungen P1, P2 und P3 des QIAGEN Plasmid Midi/Maxi Kits der Firma Qiagen verwendet. Es wurden je 10 ml LB-Medium zusammen mit den zur Selektion benötigten Antibiotika und ÜN bei 37°C und 300 rpm in 15ml Falcon-Gefäßen kultiviert und danach durch eine 5-minütige Zentrifugation bei 3.500 rpm in der Heraeus-Zentrifuge pelletiert. Das Pellet wurde anschließend in 300  $\mu$ l Lösung P1 resuspendiert und die Suspension in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Zur anschließenden alkalischen Lyse wurden je 300  $\mu$ l Lösung P2 hinzugegeben und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. SDS, bakterielle chromosomale DNA und Proteinbestandteile wurden durch die folgende Zugabe von 300  $\mu$ l Lösung P3 und 10-minütige Inkubation auf Eis präzipitiert und anschließende 5-minütige Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4°C in der Eppendorf-Tischzentrifuge 5415C pelletiert. Der Überstand (circa 1000  $\mu$ l) wurde mit je 1000  $\mu$ l Phenol-Chloroform (Volumenverhältnis 1:1) für 5-10 min extrahiert und für 5 min erneut bei 14.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Die BAC-DNA im Überstand wurde durch dessen Zugabe zu je 1000  $\mu$ l Isopropanol gefällt, anschließend wurde wiederum für 20 min bei 14.000 rpm und 4°C

## B. MATERIAL UND METHODEN

zentrifugiert. Nach Waschen in 70%igem Ethanol und erneuter Zentrifugation wurde das Pellet luftgetrocknet und in 100  $\mu$ l TE-Puffer gelöst.

### 2.1.4 BAC-DNA-Isolierung aus Bakterien in quantitativem Maßstab (Maxipräparation)

Hierzu wurde der Nucleobond AX Kit der Firma Macherey-Nagel verwendet. Zur Verringerung der Scherkräfte wurden beim Pipettieren abgeschnittene Spitzen verwendet. Es wurden 200 ml LB-Medium mit zur Selektion benötigten Antibiotika mit einem Aliquot einer Bakterien-Glycerin- oder ca. 100  $\mu$ l einer Bakterien-Vorkultur (zuvor für ca. 8 Stunden bei 30°C bzw. 37°C bei 300 rpm geschüttelt) angeimpft und ÜN bei 30°C bzw. 37°C bei 300 rpm geschüttelt und kultiviert. Nach Pelletierung der Bakterien für 15 min bei 4000 rpm in einer Kontron-Hermle-Zentrifuge (Centrikon H-401) wurde die zur Gewinnung der BAC-DNA notwendige alkalische Lyse entsprechend des im Kit angegebenen speziellen Protokolls durchgeführt, nach der DNA-Fällung durch Isopropanol und Waschen durch 70%igen Ethanol wurde das DNA-Pellet in je 200  $\mu$ l TE-Puffer gelöst.

### 2.1.5 Isolierung viraler DNA aus mit MHV-68 infizierten Zellen

In Zellen, die mit MHV-68 infiziert wurden und einen zytopathischen Effekt (CPE) zeigen, ist die virale DNA im Verhältnis zur zellulären im Überschuss vorhanden. So kann nach dem Protokoll von Hirt <sup>(64)</sup> die zirkuläre virale DNA aus infizierten Zellen isoliert werden.

Hierzu wurden infizierte Zellen mit einem CPE (gewachsen in einer 6cm-Kulturschale) mittels eines Zellschabers vom Boden gelöst und zusammen mit dem Medium in je ein 15 ml-Falcon-Gefäß überführt. Nach Pelletieren mittels 5-minütiger Zentrifugation bei 3.500 rpm und Raumtemperatur in der Heraeus-Zentrifuge und anschließendem zweimaligem Waschen (einmal mit DMEM, einmal mit PBS) wurden die Zellen in 20 mM EDTA, pH 8,0 resuspendiert und in 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt.

Zur Lyse wurden 500  $\mu$ l 1,2%iges SDS (Endkonzentrationen 10 mM EDTA und 0,6% SDS) hinzugegeben, vorsichtig gemischt und anschließend 600  $\mu$ l 5 M NaCl addiert und ÜN bei 4°C inkubiert, wobei Proteine und lineare DNA präzipitieren, zirkuläre DNA im Überstand verbleibt. Am nächsten Tag wurde für 30 min bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand mit einer abgeschnittenen Spitze zur Vermeidung von auf die virale DNA einwirkenden Scherkräften in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und eine Phenol-Chloroform-Extraktion (Volumenverhältnis 1:1) durchgeführt. Nach Zentrifugation zur Phasentrennung wurde die im

## B. MATERIAL UND METHODEN

Überstand enthaltene DNA mit 0,6 Volumeneinheiten Isopropanol gefällt und wiederum für 10 min bei 10.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert, danach mit 70%igem Ethanol gewaschen. Am Ende wurde das Pellet luftgetrocknet und in 50  $\mu$ l TE-Puffer resuspendiert.

### 2.1.6 Konzentrierung und Konzentrationsbestimmung von DNA

Um DNA zu reinigen wurde sie durch Zugabe von Natriumacetat (Endkonzentration 300 mM) und zwei Volumeneinheiten Ethanol aus wässriger Lösung gefällt, wobei für 30 min bei -20°C inkubiert wurde. Das DNA-Präzipitat wurde durch 20-minütige Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4°C pelletiert, mit 70%igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und im neuen Lösungsvolumen aufgenommen.

Die Konzentration der DNA wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von  $\lambda=260$  nm und  $\lambda=280$  nm im Spektralphotometer der Firma Amersham-Pharmacia bestimmt. Das ebenfalls ermittelte Verhältnis der bei 260 und 280 nm ermittelten Absorptionsquotienten gibt hierbei zusätzlich Auskunft über die Reinheit der isolierten Nukleinsäuren, wobei bei reinen DNA-Lösungen der Quotient idealerweise zwischen 1,8 und 1,95 liegen sollte.

## 2.2 Klonierung von DNA

### 2.2.1 Restriktionsenzymverdau von DNA

DNA-Spaltungen wurden in einem Gesamtvolumen von 40-60  $\mu$ l durchgeführt. Hierzu wurde 1  $\mu$ g der DNA-Präparation mit mindestens 3 U (meistens 10 U/ $\mu$ l) und 1/10 Volumenanteil des vom Hersteller der Restriktionsendonuklease mitgelieferten 10x Restriktionspuffers bei der empfohlenen Temperatur (meist 37°C) für 1-2 Stunden inkubiert.

Beim Verdau von BAC-DNA wurden 1  $\mu$ g DNA mit 40 U Restriktionsenzym versetzt und für 4 Stunden bei der empfohlenen Temperatur (meist 37°C) inkubiert, wobei auch bei 350 rpm geschüttelt wurde.

Gegebenenfalls (zum Beispiel bei nachfolgenden Ligationen oder Spaltungen desselben Aliquots mit anderen Restriktionsendonukleasen) wurde das Enzym entsprechend der Angaben des Herstellers hitzeinaktiviert (zumeist 20 min bei 70°C).

## B. MATERIAL UND METHODEN

### 2.2.2 Dephosphorylierung von DNA-Enden

Um die Rezirkularisierung von linearisierten DNA-Fragmenten, z.B. bei Ligationen, zu verhindern, wurden 5'-terminale Phosphatgruppen an DNA-Enden durch Behandlung mit Alkalischer Phosphatase (SAP, shrimp alkaline phosphatase) entfernt. Hierbei wurden je pmol linearer DNA mindestens 1 U SAP verwendet, wobei die SAP direkt zum Restriktionsansatz gegeben wurde und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert wurde. Vor einer weiteren Ligation wurde die SAP für 20 min bei 75°C hitzeinaktiviert.

### 2.2.3 Auffüllen von 5'-überhängenden und Abbau von 3'-überhängenden DNA-Enden

Um die Ligation von DNA-Fragmenten mit terminal nicht komplementären DNA-Überhängen zu ermöglichen, kann man DNA-Enden mit Hilfe der großen Untereinheit der Klenow-Polymerase zum glatt endenden Doppelstrang abbauen bzw. ergänzen.

Für die Reaktion wurden 1 µg DNA in wässriger Lösung mit 1/10 Volumeneinheit 10x Klenow-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 7,5; 50 mM NaCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM DTT), 1/10 Volumeneinheit dNTP-Stammlösung und 1 µl Klenow-Polymerase für 30 min bei 37°C inkubiert. Gegebenenfalls wurde das Enzym für 20 min bei 65°C hitzeinaktiviert.

### 2.2.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach präparativer enzymatischer Spaltung von DNA wurde das erhaltene Gemisch der DNA-Fragmente in einem 0,6-1,5%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und durch Anfärbung mit Ethidiumbromid (in einer Konzentration von 1µg/ml zum Agarosegel hinzugegeben) unter UV-Licht sichtbar gemacht.

Danach wurde die gewünschte Bande ausgeschnitten und mit dem QiaEx-Gelelutionskit der Firma Qiagen entsprechend des im Kit enthaltenen Protokolls eluiert und aufgereinigt.

## B. MATERIAL UND METHODEN

### 2.2.5 Ligation

Zur Ligation wurden DNA-Fragmente im molaren Verhältnis von 1:4 zwischen Vektor und zu inserierendem Fragment mit Hilfe der T4-DNA-Ligase verknüpft, hierzu wurde der Reaktionsansatz mit 1 U T4-DNA-Ligase unter Verwendung des vom Hersteller mitgelieferten 10x Inkubationspuffers ÜN bei 44°C inkubiert.

### 2.2.6 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Im Laufe der Präparation wurden alle Schritte auf Eis durchgeführt. 100 ml LB-Medium wurde mit den zur Selektion benötigten Antibiotika versetzt und mit 1 ml einer ÜN-Kultur inokuliert, daraufhin bei 37°C und 350 rpm für 2-3 Stunden inkubiert. Um die logarithmische Phase der Bakterienwachstumskurve zu bestimmen (idealerweise entspricht diese einer OD<sub>600</sub> von 0,5) wurde mittels eines Spektralphotometers der Firma Amersham-Pharmacia die OD<sub>600</sub> der Bakteriensuspension bestimmt.

Bei Erreichen des Zielwertes wurden je 50 ml der Suspension in 50 ml-Falcon-Gefäße überführt und für 10 min bei 2.300 rpm und 4°C in der Heraeus-Zentrifuge pelletiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 15 ml vorgekühltem Tfb I-Puffer resuspendiert, die Bakterienlösung anschließend für 50 min auf Eis inkubiert und erneut für 10 min bei 2.300 rpm und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 4 ml vorgekühltem Tfb II-Puffer gelöst, in 200 µl Aliquots in vorgekühlte Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben und bei -80°C eingefroren.

Tfb I-Puffer: 100 mM RbCl<sub>2</sub>  
50 mM MnCl<sub>2</sub>  
30 mM KAc  
10 mM CaCl<sub>2</sub>  
pH 5,8  
sterilfiltriert (200 nm-Filter)

Tfb II-Puffer: 10 mM MOPS pH 7,0  
10 mM RbCl<sub>2</sub>  
75 mM CaCl<sub>2</sub>  
15% Glycerin  
pH 7,0  
sterilfiltriert (200 nm-Filter)

### 2.2.7 Herstellung elektrokompenter Bakterien

Im Laufe der Präparation wurden alle Schritte auf Eis durchgeführt. 200 ml LB-Medium wurden mit den zur Selektion benötigten Antibiotika versetzt und mit 2 ml einer ÜN-Kultur inokuliert, daraufhin bei 37°C und 350 rpm für 2-3 Stunden inkubiert. Um die logarithmische Phase der Bakterienwachstumskurve zu bestimmen wurde mittels eines Spektralphotometers der Firma Amersham-Pharmacia die OD<sub>600</sub> der Bakteriensuspension bestimmt.

## B. MATERIAL UND METHODEN

Bei Erreichen des Zielwertes wurde die Bakteriensuspension für 15 min auf Eis gekühlt und anschließend durch 10-minütige Zentrifugation bei 7.000 rpm und 0°C pelletiert.

Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet zur Entfernung der Salze in 200 ml vorgekühltem 10%-igen Glycerin resuspendiert und erneut für 10 min bei 7.000 rpm und -4°C zentrifugiert. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt und das Pellet anschließend in ca. 1,5 ml 10%igem Glycerin resuspendiert, in 60 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

### 2.2.8 Chemische Transformation von Bakterien

Zur Transformation chemisch-kompetenter Bakterien wurden 200 µl-Aliquots auf Eis aufgetaut und die einzuführende DNA hinzugegeben, für 30 min auf Eis und anschließend für 1 min auf 42°C (Hitzeschock) inkubiert. Daraufhin wurden die Bakterien für 2 min auf Eis gekühlt, 500 µl LB-Medium hinzugegeben und für eine Stunde bei 30°C bzw. 37°C und 350 rpm geschüttelt. Danach wurde der Transformationsansatz für 1 min bei 6000 rpm und Raumtemperatur in der Eppendorf-Tischzentrifuge pelletiert und der Überstand bis auf einen Rest von 150 µl verworfen, das Pellet in diesem dann resuspendiert und auf entsprechende zur Selektion bestimmte Antibiotika enthaltende LB-Agar-Platten ausgestrichen. Bakterienkolonie-Bildung wurde nach ÜN-Inkubation bei 30°C bzw. 37°C beobachtet.

### 2.2.9 Elektroporation von elektrokompetenten Bakterien

Um den Salzgehalt der einzuführenden DNA so gering wie möglich zu halten, wurde diese vor Zugabe zum Transformationsansatz für 30 min auf 200 nm-Membranen gegen Wasser dialysiert und anschließend zu je einem 70 µl-Aliquot der kompetenten Bakterien gegeben, die auf Eis gekühlt wurden. Danach wurde der Ansatz in einer vorgekühlten Kondensator-Küvette mit 2,5 kV, 200 Ω, 25 µF und Zeitkonstante ∞ in einem GenePulser (beides Firma Biorad) perforiert. Nach sofortiger Zugabe von 500 µl LB-Medium wurde die Suspension für eine Stunde bei 350 rpm und 30°C bzw. 37°C inkubiert und auf LB-Agar-Platten mit entsprechendem Zusatz von zur Selektion bestimmten Antibiotika ausgestrichen. Bakterienkolonie-Bildung wurde nach ÜN-Inkubation bei 30°C bzw. 37°C beobachtet.

## B. MATERIAL UND METHODEN

### 2.2.10 Anlegen von Glycerinkulturen

Zur längeren Lagerung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  wurden Bakterien in 1000  $\mu\text{l}$ -Aliquots einer ÜN gewachsenen Kultur mit einer 50%-igen Glycerin-Stammlösung zu einer Endkonzentration von 20% (v/v) gemischt und eingefroren.

### 2.3 Analyse von DNA

#### 2.3.1 Agarosegel-Elektrophorese

Für diese Form der DNA-Analyse wurde diese wie in 2.2.1 angegeben mit den jeweils benötigten Restriktionsenzymen verdaut und das hieraus resultierende Fragmentgemisch in horizontalen, nicht-denaturierten Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Dem Fragmentgemisch wurde vor Auftragen in die vorgesehenen Gelkammern des Agarosegels 1/10 Volumeneinheit 10x Auftragspuffer (200 mM EDTA, 40% Ficoll 400; 0,02% (w/v) Bromphenolblau) zugegeben. Die Agarosegelkonzentrationen betragen in der Regel 0,6% für kleinere Plasmide bzw. Fragmente, bei Verdau von BAC-DNA immer 0,8%. Als Elektrolyt wurde mit Ethidiumbromid (Endkonzentration 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) versetzter TAE-Puffer (40 mM Tris/HCl, 20 mM Eisessig, 1 mM EDTA, pH 8,0), bei BAC-DNA TBE-Puffer (90 mM Tris/HCl, 90 mM Borsäure, 1 mM EDTA, pH 8,3) verwendet. Zum Auftrennen der DNA-Fragmente wurde eine Spannung von 70-110 mV für 1-2 Stunden angelegt, für die Auftrennung der besonders großen Fragmente verdauter MHV-68-DNA (bis zu 18 kbp) wurde eine Spannung von 70 mV für 14-44 Stunden angelegt.

#### 2.3.2 Southern Blot-Analyse

Zum Nachweis spezifischer Banden nach Auftrennung eines Fragmentgemisches in einer Agarosegelelektrophorese wurde die aufgetrennte DNA analog des Protokolls nach Maniatis <sup>(34)</sup> auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer Digoxigenin (Dig)-markierten DNA-Sonde hybridisiert. An die spezifisch an der Nylonmembran anhaftenden DNA-Fragmente bindet die Dig-Sonde und an diese in der Folge ein Anti-Dig-Alkalische-Phosphatase-Konjugat, welches nach Bildung eines Komplexes mit dem Chemolumineszenzsubstrat CDP-Star Photonen emittiert und in der Folge photochemisch mit BioMax-Filmen nachgewiesen werden konnte.

## B. MATERIAL UND METHODEN

### 2.3.2.1 DNA-Transfer aus Agarosegel auf Nylonmembran

Die zu transferierende DNA im Agarosegel wurde zweimal für 10 min in 0,25 M HCl bei Raumtemperatur und nach Spülen mit Wasser für 45 min in Denaturierungspuffer (s.u.) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach nochmaliger Spülung mit Wasser wurde das Gel in der Folge erst für 30 min, nach kurzer Zwischenspülung nochmals für 15 min in Neutralisationspuffer (s.u.) bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurde die DNA aus dem Agarosegel auf die Nylonmembran in 20x SSC-Puffer (s.u.) nach Maniatis et. al. <sup>(94)</sup>, Blotaufbau siehe dort, transferiert. Anschließend wurde die Nylonmembran getrocknet und vor der Hybridisierung mit der DNA-Sonde bei 4°C trocken gelagert.

Denaturierungspuffer:	1,5 M NaCl 0,5 M NaOH
Neutralisationspuffer:	1 M Tris/HCl 1,5 M NaCl pH 7,4
20x SSC:	0,3 M Natriumcitrat 3 M NaCl pH 7,0

### 2.3.2.2 Herstellung der Dig-markierten DNA-Sonde

Hierzu wurde das Dig DNA Labelling Kit der Firma Roche verwendet, wobei die Methode auf der Hybridisierung von Oligonukleotiden passender Sequenzkombinationen an die nach der Denaturierung einsträngig vorliegende, zu markierende DNA, basiert. Der zu einem Restriktionsverdaufragment oder zuvor mittels Polymerase-Kettenreaktion synthetisierten Oligonukleotid komplementäre Strang wird hierbei durch die im Kit mitgelieferte große Untereinheit der Klenow-Polymerase synthetisiert.

Die Klenow-Polymerase verwendet u.a. Dig-dUTP markierte Desoxyribonukleotide zur Elongation des neu zu synthetisierenden DNA-Stranges. Zur Herstellung der Sonde wurde 1 µg des zu markierenden DNA-Fragmentes durch Phenol/Chloroform-Extraktion und anschließende Ethanol-Fällung gereinigt und in 15 µl Wasser gelöst. Nach Erhitzen des Fragmentes auf 95°C für 10 min wird die denaturierte DNA sofort auf Eis gestellt, um die Einzelsträngigkeit zu bewahren. Danach wurden 2 µl des Hexanukleotidgemischs, 2 µl des Dig-markierten dNTP-Gemischs und 1 µl Klenow-Polymerase hinzugegeben, gemischt und ÜN bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde am nächsten Tag mit 2 µl 0,2 M EDTA, pH 8,0 gestoppt und die Sonde zur Hybridisierung mit den an die Nylonmembran gebundenen Fragmente benutzt (B 2.3.2.3).

## B. MATERIAL UND METHODEN

### 2.3.2.3 Hybridisierung der Dig-markierten Sonde und photochemischer Nachweis

Zunächst wurde die Nylonmembran mit den gebundenen DNA-Fragmenten für 2 Stunden mit Hybridisierungslösung (s.u.) bei 68°C vorinkubiert. Anschließend wurde ca. 1 µg der Dig-markierten Sonde für 10 min bei 95°C inkubiert und sofort auf Eis gestellt, um die Einzelsträngigkeit zu bewahren. Diese wurden zu 20 ml Hybridisierungslösung gegeben und mit der Nylonmembran ÜN bei 68°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran 2x für je 5 min mit 2x SSC/0,1 % SDS bei Raumtemperatur und zweimal für je 15 min mit 0,1x SSC/0,1 % SDS bei 68°C gewaschen.

Für den photochemischen Nachweis bei Raumtemperatur wurde die Membran für kurze Zeit in TBS-Puffer-1 (s.u.) äquilibriert und 30 min in Blocking-Puffer-2 (s.u.) inkubiert. Zur Vorbereitung der Bindung des Anti-Dig-Alkalische-Phosphatase-Konjugats wurde die Nylonmembran weitere 30 min in 20 ml Blocking-Puffer-2, dem dieses Mal 37,5 mU/ml Konjugat beigemischt wurde, inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit je 100 ml TBS-Puffer-1 für je 15 min wurde die Membran mit 2 ml CDP-Star (Endkonzentration 2,5 mM) in Puffer-3 (s.u.) benetzt, die Flüssigkeit nach 3 min wieder abgenommen und schließlich ein Kodak BioMax-Film damit für 0,5-10 min exponiert.

Blocking-Puffer-2:	1% (w/v) Blocking-Reagens (Roche) In TBS-Puffer-1
Hybridisierungslösung:	5X SSC 0,1% (v/v) N-Lauroylsarcosin 0,02% SDS 1% (w/v) Blocking-Reagens (Roche)
Puffer-3:	0,1 M Tris/HCl 0,1 M NaCl pH 9,5
20x SSC:	0,3 M Natriumcitrat 3 M NaCl pH 7,0
TBS-Puffer-1:	100 mM Tris/HCl 150 mM NaCl pH 7,5

### 2.3.3 DNA-Sequenzierung

Sequenzierungen wurden durch die Firma SEQUISERVE Dr. Metzger (Vaterstetten, Deutschland) durchgeführt. Hierzu wurde jeweils zur Sequenzierung von DNA-Fragmenten und high-copy-Plasmiden 1 µg unbehandelte DNA verwendet, zur Sequenzierung von MHV-68-BAC-DNA

## B. MATERIAL UND METHODEN

wurden jedoch je 5 µg DNA ad 200 µl TE-Puffer aufgefüllt und je 5x für drei Sekunden mit Ultraschall einer Leistung von 120 W behandelt, anschließend wurde mit zwei Volumeneinheiten 70%-igem Ethanol gefällt und die so behandelte DNA in je 10 µl Wasser aufgenommen und solchermaßen vorbereitet verwendet.

### 2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde mit dem Thermocycler T 2400 (Perkin Elmer) durchgeführt, hierbei wurde in der Regel die Taq-DNA-Polymerase der Firma Roche verwendet.

PCRs wurden in der Regel mit folgenden Mengen an Reagenzien durchgeführt:

10-100 ng	Matritzen-DNA
je 300 nM	Oligonukleotid-Primer
je 200 µM	dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Roche)
0,1 Volumeneinheit	10x Taq-Reaktionspuffer (Roche)
3,5 U	Taq-DNA-Polymerase (Roche)
ad xxx	aqua ad injectabilia

PCRs wurden in der Regel unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

1. einmalig 5 min bei 95°C
2. einmalig 1 min bei 40°C
3. ca. 28 sich wiederholende Zyklen mit  
30 sec bei 94°C  
1 min bei entsprechender Hybridisierungstemperatur (s.u., \*)  
1-3 min Elongationszeit \*\* bei 68°C bzw. 72°C \*\*\*
4. 6 min bei 68°C bzw. 72°C \*\*\*

\* = zur Berechnung der Hybridisierungstemperatur ( $T_H$ ) eines Primers wurde die folgende vereinfachende Gleichung angewandt:

$$T_H(^{\circ}\text{C}) = 60 + [(G+C) \times 41 / N_{\text{Anzahl}}] - (600 / N_{\text{Anzahl}})$$

hierbei entsprechen G+C der Anzahl an Cytosinen und Guanidinen in der Primersequenz,  $N_{\text{Anzahl}}$  entspricht der Länge des Oligonukleotidprimers in bp; die letztlich gewählte  $T_H$  lag 2°C unter der kleineren  $T_H$  der zwei Primer

## B. MATERIAL UND METHODEN

\*\* = Minimum 1 min; je 500 bp zu amplifizierende Matrizen-DNA wurden 30 sec Elongationszeit addiert

\*\*\* = war das zu amplifizierende DNA-Fragment kleiner als 1 kbp, wurden 72°C, war es größer als 1 kbp wurden 68°C, entsprechend der Empfehlung des Herstellers, verwendet

### 2.5 Herstellung des Transposon-Donor-Plasmids

Das Transposon-Donor-Plasmid pTsTnMax8B wurde durch Restriktionsenzymverdau mit BglII gespalten. Anschließend wurde das Restriktionsprodukt unter Standardbedingungen (siehe Material und Methoden 2.2.5) Aus dem Plasmid pDsRed1-N1 wurde mittels Restriktionsverdau mit NsiI und SspI ein Fragment herausgeschnittenen, welches einen eigenen Promoter (CMV immediate early promoter,  $P_{CMV IE}$ ), das rfp-Gen, eine eigene polyA-Sequenz (SV40 polyA), sowie eine eigene multiple Klonierungsstelle (MCS) besaß. Das resultierende Fragment wurde ÜN ligiert mit dem linearisierten Plasmid pTsTnMax8B ligiert.

### 2.6 Mutagenese der MHV-68-BAC-Plasmide

#### 2.6.1 MHV-68-BAC-Mutagenese mittels Transposon

Hierzu wurde das Tn-Donor-Plasmid pTsTnMax8B-RFP verwendet, dessen Herstellung in Material und Methoden 2.5 beschrieben ist.

##### 2.6.1.1 Einführung des Transposon-Donor-Plasmids in das MHV-68-BAC-Plasmid enthaltende E.coli

Elektrokompetente E.coli (DH10B), welche das MHV-68-BAC enthielten, wurden unter Standardbedingungen (siehe 2.2.9) mit dem Transposon(Tn)-Donor-Plasmid (pTsTnMax8B-RFP) transformiert, für eine Stunde bei 400 rpm und 30°C in LB-Medium ohne Zusatz von Antibiotika inkubiert. Hiervon wurden 5 µl in 5 ml LB-Medium mit Ampicillin (amp) in einer Konzentration von 100 µg/ml sowie Chloramphenicol (cam) in einer Konzentration von 25 µg/ml gegeben. Nach

## B. MATERIAL UND METHODEN

Inkubation ÜN bei 220 rpm und 30°C wurde ein Aliquot zur Kontrolle der Elektroporation auf einer LB-Agar-Platte mit den gleichen Antibiotika wie die ÜN-Flüssigkultur ausgestrichen und ÜN auf 30°C bebrütet.

### 2.6.1.2 Selektion der das Transposon(Tn)-Element enthaltenden MHV-68-

#### Rekombinanten

Zur Selektion gegen Transposon-Donor-Konstrukte wurde ein 5 µl-Aliquot der ÜN-Kultur in 5 ml LB-Medium mit Kanamycin (kan) in einer Konzentration von 50 µg/ml und Chloramphenicol (cam) in einer Konzentration von 25 µg/ml überführt und danach ÜN bei 220 rpm und 43°C inkubiert sowie die Bakterien der Suspension am folgenden Tag nach Standardprotokoll (siehe Material und Methoden 2.2.7) elektrokompotent gemacht.

### 2.6.1.3 Einführung des Invasionsplasmides pGB2Ω<sub>inv-hly</sub>

Das Invasionsplasmid pGB2Ω<sub>inv-hly</sub> wurde unter Standardbedingungen mittels Elektroporation eingeführt und die Bakteriensuspension LB-Agar-Platten mit Chloramphenicol (cam) in einer Konzentration von 25 µg/ml (s.o.), Kanamycin (kan) in einer Konzentration von 25 µg/ml (s.o.), sowie Spectinomycin (spec) in einer Konzentration von 25 µg/ ausplattiert und ÜN bei 43°C inkubiert.

### 2.6.1.4 Expansion der einzelnen MHV-68-BAC-Rekombinanten für Virusrekonstitution

Zur Expansion wurden Kolonien in je eine Vertiefung einer 96-Loch-Zellkulturplatte mit LB-Medium unter Zusatz von cam, kan und spec in o.g. Konzentrationen überführt. In jede 96-Loch-Zellkulturplatte wurden drei Vertiefungen mit einer Negativ-Kontrolle (MHV-68-BAC mit Tn-Insertion) in LB-Medium unter Zusatz von cam und kan (o.g. Konzentrationen) und drei Vertiefungen mit einer Positiv-Kontrolle (Mutante mit Wildtyp-Eigenschaften) in LB-Medium unter Zusatz von cam kan und spec angeimpft und ÜN bei 150 rpm und 37°C inkubiert. Zur gleichen Zeit wurden Cre<sup>+</sup>-Fibroblasten in DMEM ausgelegt, so dass diese am nächsten Tag eine 40-50%-ige Konfluenz aufwiesen.

## B. MATERIAL UND METHODEN

### 2.6.2 Entfernen der BAC-Kassette in rekombinanten MHV-68-BACs mittels Expression der Rekombinase Cre in infizierten Fibroblasten

Am folgenden Tag wurden je Vertiefung der in Material und Methoden 2.6.1.4 beschriebenen Fibroblasten 2,5  $\mu$ l der ÜN inkubierten Bakteriensuspension gegeben und für 5 min bei 2000 rpm und Raumtemperatur in der Heraeus Megafuge 1.0 R Zentrifuge mit Einsatz für 96-Loch-Zellkulturplatten sedimentiert. Dann wurde für 2 Stunden bei 37°C im CO<sub>2</sub>-Inkubator bebrütet, die Platten für 1-2 min vorsichtig mittels Vortexer und Aufsatz für 96-Loch-Zellkulturplatten geschüttelt, mit PBS gewaschen und anschließend jede Vertiefung mit DMEM incl. Supplement für Cre<sup>+</sup>-Fibroblasten (siehe Material und Methoden 2.7), hier unter Zusatz von Gentamicin (gent) und amp in Endkonzentrationen von 100  $\mu$ g/ml, bedeckt. Nach drei Stunden wurde mit PBS gewaschen und ein erneuter Medienwechsel durchgeführt, diesmal zu DMEM incl. Supplement für Cre<sup>+</sup>-Fibroblasten (siehe Material und Methoden 2.7) und Zusatz von HEPES in einer Endkonzentration von 20 mM. Anschließend wurde bei 37°C im CO<sub>2</sub>-Inkubator bebrütet, bis sich rot fluoreszierende Plaques bildeten.

### 2.6.3 Virus-Rekonstitution von MHV-68-BAC-DNA

Der Überstand transfizierter Cre<sup>+</sup>-Fibroblasten, welche rote Plaques zeigten, wurde bis auf ein 50  $\mu$ l-Aliquot (dieses wurde bei -20°C aufbewahrt) zur Expansion auf frische Cre<sup>+</sup>-Fibroblasten in einer 6-Loch-Zellkulturplatte gegeben. Nach Erscheinen eines CPE wurden die Zellen mit einem Zellkulturschaber geerntet, der Überstand eingefroren und bei -80°C gelagert. Dieser Überstand wurde in den folgenden phänotypischen Untersuchungen als grober Virusstock verwendet.

## B. MATERIAL UND METHODEN

### 2.7 Zellkultur

Alle Zelllinien wurden unter 5% CO<sub>2</sub>, 95% Luftfeuchtigkeit und 37°C in einem Inkubator der Firma Heraeus Instruments (Heraeus Hera Cell) kultiviert. Die Zusammensetzung der Medien ist im Folgenden aufgeführt:

BHK-21:	BHK-21-Medium (Glasgow MEM, Gibco/BRL) ohne Tryptose-Phosphat mit L-Glutamin 5% (v/v) NCS 5% (v/v) Tryptose-Phosphat (Gibco/BRL) 1/100 Volumeneinheit Penicillin-Streptomycin
Cre <sup>+</sup> -Fibroblasten:	DMEM 10% (v/v) FCS Geneticin (G418, Gibco/BRL, Endkonzentration 300 µg/ml) 1/100 Volumeneinheit Penicillin-Streptomycin
IC-21:	RPMI 10% (v/v) FCS 1/100 Volumeneinheit Penicillin-Streptomycin
J774-A1, MEF:	DMEM 10% (v/v) FCS 1/100 Volumeneinheit Penicillin-Streptomycin
MHEC-5T, NIH-3T3:	DMEM 5% (v/v) NCS 1/100 Volumeneinheit Penicillin-Streptomycin
SVEC 4-10:	DMEM 5% (v/v) FCS 1/100 Volumeneinheit Penicillin-Streptomycin

## B. MATERIAL UND METHODEN

Die Zellen wurden ungefähr alle 3-4 Tage 1:3 bis 1:5 umgesetzt, MEF-Zellen hingegen alle 6 Tage 1:2. Für die Umsetzung wurden die Zellen mit PBS (Gibco/BRL) gewaschen und mit Trypsin/EDTA (0,5 g Trypsin 1:250 in PBS, sowie 0,2 g EDTA/l) für ca. 3 min inkubiert („trypsiniert“). Nach Ablösen der Zellen wurden diese in 10 ml DMEM aufgenommen und durch eine 3-minütige Zentrifugation in der Heraeus-Zentrifuge bei 1.300 rpm und Raumtemperatur sedimentiert, um möglichst viel des Trypsins und alten Mediums zu entfernen. Danach wurden die Zellen in o.g. supplementierten Medien aufgenommen und in den entsprechenden Mengen in neue Zellkulturschalen ausgelegt.

### 2.7.1 Auftauen von Zellen

Die bei -80°C gelagerten Zellen wurden zügig bei 37°C im Wasserbad erwärmt, in supplementiertes DMEM aufgenommen und gemischt. Nach einer 3-minütigen Zentrifugation in der Heraeus-Zentrifuge bei 1300 rpm und Raumtemperatur zur Sedimentation der Zellen wurden diese erneut in der jeweiligen Zelllinie supplementierten Medien aufgenommen und in Zellkulturschalen überführt.

### 2.7.2 Einfrieren von Zellen

Hierbei wurde gewartet, bis die einzufrierenden Zellen ca. 90% Konfluenz zeigten, daraufhin wurden diese trypsiniert (s.o.), durch 3-minütige Zentrifugation in der Heraeus-Zentrifuge bei 1300 rpm und Raumtemperatur sedimentiert und in jeweils 1 ml Einfriermedium aufgenommen. Danach wurden die Zellen für ca. 3 Stunden bei -20°C, dann ÜN bei -80°C und schließlich in flüssigem Stickstoff gelagert.

Einfriermedium:	50% FCS
	40% DMEM
	10% Dimethylsulfoxid (DMSO)

### 2.7.3 Transfektion eukaryontischer Zellen mittels Kalziumphosphatpräzipitation

Hierzu wurden Plasmid- oder MHV-68-BAC-DNA in einer Menge von ungefähr 1-2 µg zu 31 µl CaCl<sub>2</sub> gegeben und mit TE-Puffer ad 250 µl aufgefüllt. Nach vorsichtigem Mischen wurden 250 µl 2x HBS-Lösung hinzugegeben und sofort erneut gemischt. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die gesamte Lösung auf ungefähr 80%-konfluente Zellen in einer 6cm-

## B. MATERIAL UND METHODEN

Zellkulturschale tropfenweise pipettiert, vorsichtig geschwenkt um das verbliebene Medium mit der Lösung zu vermischen und nach Inkubation für 5 Stunden im Inkubator ein Glycerolschock durchgeführt.

### 2.7.3.1 Durchführung des Glycerolschocks

Um die Menge der von den Zellen während der Kalziumphosphatpräzipitation aufgenommenen DNA zu erhöhen, wurden die Zellen nach 5 Stunden mit PBS gewaschen und anschließend der Überstand verworfen. Auf die Zellen wurden danach 1 ml der Glycerolschocklösung (s.u.) gegeben und nach vorherigem Mischen für 2,5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und neues supplementiertes Medium in die Zellkulturschale gegeben.

2x HBS-Lösung:	50 mM HEPES 1,5 mM Na <sub>3</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O 0,28 M NaCl pH 7,13
Glycerolschocklösung:	15% (v/v) Glycerol In 1x HBS-Lösung

### 2.8 Herstellung eines MHV-68 Virusstocks

Zur Herstellung eines MHV-68-Virusstocks wurden ca. 50%-konfluente BHK-21-Zellen in 14,5cm-Zellkulturschalen mit einer MOI von ca. 0,1 infiziert, wobei für die erstmalige Präparation eines Virusstocks ca. 1 ml Überstand einer durchinfizierten 10cm-Zellkulturschale verwendet wurden. Nach ungefähr 3 Tagen zeigten die Zellen einen CPE und wurden dann mittels eines Zellkulturschabers von der Schale abgelöst, zusammen mit dem Medium geerntet und in einen 250 ml-Zentrifugenbecher überführt.

Alle weiteren Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Es folgte eine 3-stündige Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4°C mit der Sorvall SS-34-Zentrifuge. Hiernach wurde der Überstand verworfen, das Zell-Pellet jedoch in ca. 4 ml DMEM resuspendiert, um in einem nachfolgenden Schritt mittels einer 30-maligen Anwendung des Douncer-Homogenisators zellassoziierte Virionen zu isolieren. Um hiernach etwaige Zellreste zu beseitigen wurden die Virionen für 15 min bei 6.000 und 4°C mit der Sorvall SS-34-Zentrifuge pelletiert, das entstandene Virus-Pellet mit ca. 1 ml DMEM überschichtet, resuspendiert und in 50 µl-Aliquots bei -80°C gelagert.

## B. MATERIAL UND METHODEN

### 2.9 MHV-68-Titerbestimmung durch Standard-Plaque-Assay

Um Virustiter zu bestimmen, wurden MEFs in 48-Loch-Zellkulturplatten ausgelegt und nach Erreichen einer ca. 80%-igen Konfluenz mit Verdünnungen der zu titrierenden Virusstockpräparationen oder Überstände ( $10^{-3} - 10^{-8}$  in DMEM) überschichtet und somit infiziert. Um Virusadsorption zu gewährleisten, wurden nach einer einstündigen Inkubation der Zellen im  $\text{CO}_2$ -Inkubator bei  $37^\circ\text{C}$  die Überstände abgesaugt und die Zellen in den Vertiefungen zur Verhinderung der Entstehung sekundärer Virusplaques daraufhin mit Carboxymethylzellulose-Medium (siehe unten) bedeckt. Nach ca. 3-4 Tagen konnten die im Laufe der Infektion entstandenen Plaques unter dem Licht und/oder dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt und hiermit der Virustiter bestimmt werden, wobei folgende Gleichung zur Anwendung kam:

$$\text{Virustiter [PFU/ml]} = \frac{\text{gezählte Plaques} \times \text{Verdünnungsfaktor der ausgewählten Vertiefung}}{\text{auf Zellen gegebenes Volumen der Virusverdünnung [ml]}}$$

Alle Titrationsen wurden dreifach durchgeführt.

Carboxymethylzellulose (0,5l):	3,75 g Carboxymethylzellulose
	25 ml FCS
	50 ml 10x MEM
	5 ml L-Glutamin
	2,5 ml Lösung nicht-essentielle Aminosäuren
	5 ml Penicillin/Streptomycin
	425 ml Wasser
	24,7 ml 7,5%-ige $\text{NaHCO}_3$ -Lösung

### 2.10 Isolierung embryonaler Maus-Fibroblasten

hierzu wird auf die in der Referenz genannte Literatur verwiesen (<sup>186</sup>).

### C. ERGEBNISSE

#### 1. ETABLIERUNG DER TRANSPOSONMUTAGENESE FÜR MHV-68

Wie in der Einleitung dargestellt sollte zur Untersuchung des MHV-68-Genoms bezüglich Zelltropismus determinierender Genfunktionen ein Verfahren der klassischen oder „forward genetics“ verwendet werden. Dieses sollte es erlauben, zufällig hergestellte und replikationsfähige virale Rekombinanten nach deren „blinder“ Rekonstitution auf sechs verschiedenen Zelllinien bezüglich ihrer Wachstumskinetik zu untersuchen. Hierzu war es notwendig, die in der Arbeitsgruppe etablierte Methode der Transposonmutagenese <sup>(24)</sup> von MCMV auf das Genom des MHV-68, welches als BAC kloniert zur Verfügung stand <sup>(2)</sup>, zu übertragen und anzuwenden.

##### 1.1 Klonierung des Tn-Donor-Konstruktes pTsTnMax8B-RFP

Da die in der Arbeitsgruppe vorhandenen Transposon-Donor-Konstrukte ein gfp-Gen im transposablen Element tragen, würden im Zuge einer Transposonmutagenese des MHV-68-Genoms grün-fluoreszierende Viren entstehen. Weil aber das MHV-68-BAC bereits selbst ein gfp-Gen benachbart zu den BAC-Sequenzen besitzt, könnten die rekombinanten Viren von Wildtyp-Viren optisch nicht unterschieden werden. Daher wurde ein neues Transposon-Donor-Konstrukt basierend auf pTnTsMax8B mit einem rfp-Gen hergestellt.

Hierzu wurde das Transposon-Donor-Plasmid pTsTnMax8B durch Restriktionsenzymverdau mit der Restriktionsendonuklease BglII an der BglII-Restriktionsschnittstelle gespalten, nachdem eine zweite BglII-Schnittstelle vorher eliminiert worden war. Aus dem Plasmid pDsRed1-N1 wurde mittels Restriktionsverdau mit NsiI (schneidet bei nt-Position 0) und SspI (schneidet bei nt-Position 1625) ein Fragment mit einer Größe von 1,625kbp herausgeschnitten. Dieses besaß einen eigenen Promoter (CMV immediate early promoter,  $P_{CMV\ IE}$ ), das rfp-Gen, eine eigene polyA-Sequenz (SV40 polyA), sowie eine eigene multiple Klonierungsstelle (multiple cloning site, MCS).

Das resultierende Fragment wurde ÜN mit dem linearisierten Plasmid pTsTnMax8B ligiert. Zur Ligationsvorbereitung wurde das lineare Fragment des Tn-Donor-Plasmids pTsTnMax8B mit Klenow-Polymerase unter Zusatz des zugehörigen Arbeitspuffers und dNTPs behandelt um gerade Enden zu schaffen, sowie mit SAP (shrimp alkaline protease, ebenfalls unter Zusatz des zugehörigen Arbeitspuffers) um die endständigen Phosphatreste abzuspalten. Das lineare Fragment aus pDsRed1-N1 wurde lediglich mit Klenow-Polymerase behandelt, die Phosphatreste mussten hier zur

## C. ERGEBNISSE

Durchführbarkeit der Ligation erhalten bleiben. Die folgende Abbildung zeigt schematisch das Vorgehen zur Herstellung des neuen Transposon-Donor-Konstruktes pTnTsMax8B-RFP.

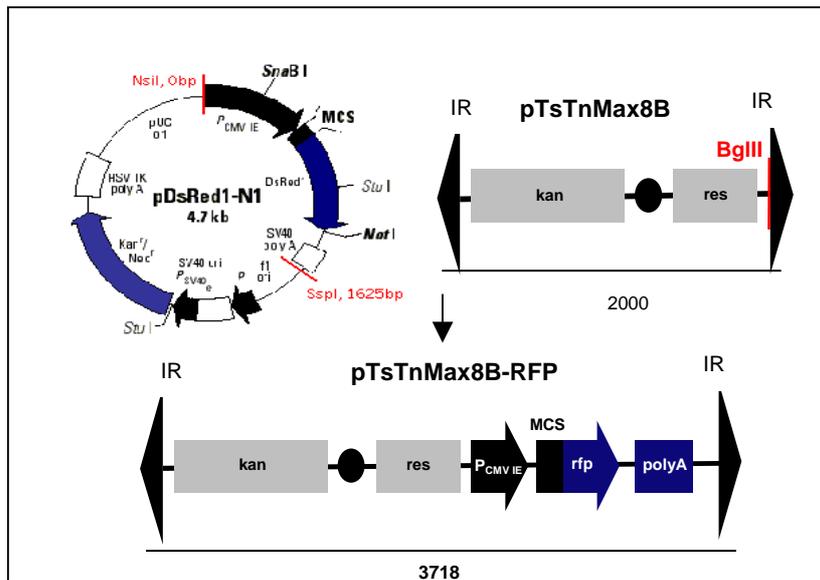


Abb. 10: Nach Restriktionsenzymverdau des käuflich erworbenen Plasmids pDsRed1-N1 wurde das erzeugte Fragment in die BglII-Schnittstelle des Transposon-Donor-Plasmids pTsTnMax8B kloniert, es besitzt einen eigenen Promoter sowie eine eigene polyA-Sequenz, welche die Expression des rfp-Gens unabhängig von der Orientierung der Insertion macht, alle Zahlenangaben in bp.

Die korrekte Insertion des Fragments mit rfp-Gen in das linearisierte Plasmid pTsTnMax8B wurde durch Restriktionsenzymverdau mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und HindIII überprüft.

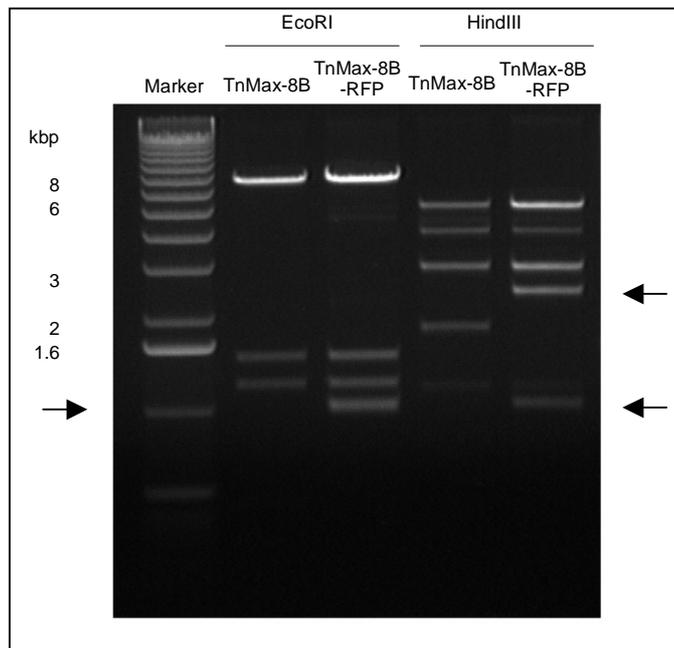


Abb. 11: Agarose-Gelelektrophorese des Verdau der Plasmide pTsTnMax8B sowie des in dieser Arbeit hergestellten Tn-Donor-Konstruktes pTsTnMax8B-RFP mittels der Restriktionsendonukleasen EcoRI und HindIII. Erklärungen des Bandenmusters siehe im Text. Pfeil links zur Markierung der zusätzlichen Fragmente im EcoRI-Verdau, Pfeile rechts zur Markierung der zusätzlichen Fragmente im HindIII-Verdau.

## C. ERGEBNISSE

Der Verdau mit EcoRI ergab hierbei für pTsTnMax8B-RFP ein Muster mit Muster mit Banden bei 1.0, 1.1, 1.3 und 1.5 kbp. Die Banden bei 1.0 und 1.1 kbp stellen zusätzliche Banden aufgrund der Insertion des 1,625kbp-Fragments dar, welches in der MCS eine zusätzliche EcoRI-Schnittstelle besitzt. Dieser Sachverhalt war bei den folgenden Mutagenese-Versuchen zur Überprüfung deren Effizienz und Wirksamkeit wichtig.

Der Verdau mit HindIII ergab aufgrund der Insertion des 1,625kbp-Fragments ein Muster mit zusätzlichen Banden bei 1.0 und 2.5 kbp. Zur genauen Überprüfung der korrekt erfolgten Klonierung wurde das neu hergestellte Konstrukt sequenziert.

### 1.2 Herstellung rekombinanter MHV-68-Genome mit Transposoninsertion - Restriktionsmuster zweier rekombinanter MHV-68-Genome als Beispiele

#### 1.2.1 Einführung des Transposon-Donor-Plasmids pTsTnMax8B-RFP in E.coli mit MHV-68-BAC

Im folgenden ersten Schritt der Transposonmutagenese wurde auf 30°C inkubiert, da das Transposon-Donor-Plasmid einen temperatursensitiven Replikationsursprung besitzt und somit Replikation nur bei Temperaturen von 30°C möglich bzw. effizient ist.

Elektrokompetente E.coli (DH10B), welche das MHV-68-BAC enthielten, wurden unter Standardbedingungen mit dem Transposon-Donor-Konstrukt pTsTnMax8B-RFP transformiert. Danach wurden sie für eine Stunde bei 400 rpm und 30°C in LB-Medium ohne Zusatz von Antibiotika inkubiert. 5 µl wurden in 5 ml LB-Medium überführt, welches folgende Antibiotika zur Selektion enthielt: Ampicillin (amp) in einer Konzentration von 100 µg/ml zur Selektion des Tn-Donor-Plasmids, das ein amp-Resistenz-Gen besitzt, sowie Chloramphenicol (cam) in einer Konzentration von 25 µg/ml zur Selektion des BAC-Plasmids. Dieses besitzt wiederum ein cam-Resistenzgen. Schließlich wurde ÜN bei 220 rpm und 30°C inkubiert.

Zur Kontrolle der Elektroporation wurde ein Aliquot der Bakteriensuspension in einer Verdünnung von 1:100 in 100 µl LB-Medium auf einer LB-Agar-Platte mit den gleichen Antibiotika wie die ÜN-Flüssigkultur ausgestrichen und ÜN auf 30°C bebrütet.

#### 1.2.2 Selektion der das Transposon(Tn)-Element enthaltenden MHV-68-Rekombinanten

Im folgenden Schritt wurden diejenigen E.coli, welche MHV-68-BACs mit im Idealfall gleichverteilten Tn-Insertionen besaßen, gegen solche selektiert, die noch das Tn-Element im

## C. ERGEBNISSE

Donor-Plasmid trugen. Hierzu wurde ein 5 µl-Aliquot der ÜN-inkubierten Bakteriensuspension in 5 ml LB-Medium überführt, welchem die folgenden Antibiotika zugefügt wurden: Kanamycin (kan) in einer Konzentration von 50 µg/ml zur Selektion der Tn-Elemente, welche ein kan-Resistenzgen besitzen sowie Chloramphenicol (cam) in einer Konzentration von 25 µg/ml (s.o.). Um eine weitere Replikation des Transposon-Donor-Plasmides zu verhindern, wurde danach ÜN bei 220 rpm und 43°C inkubiert

Zur Überprüfung der Wirksamkeit der Methode wurden von einer gewissen Anzahl von Kolonien BAC-Minipräparationen, in der Folge aufgrund der besseren Auswertbarkeit jedoch auch Maxi-Präparationen hergestellt. Diese wurden anschließend mittels Restriktionsenzymverdau und Darstellung des Bandenmusters in der DNA-Agarose-Gelelektrophorese untersucht

### 1.2.3 Darstellung der erfolgten Mutagenese mittels Transposoninsertion anhand eines Beispiels

Als Beispiel ist der Verdau einer Mutante A (MUT A) aufgeführt. Die folgende Abbildung zeigt einen Restriktionsenzymverdau des rekombinanten viralen BAC-Genoms nach dessen Präparation mit den Restriktionsenzymen EcoRI und HindIII. Die kombinierte Anwendung dieser beiden Enzyme erlaubt eine hinreichend genaue Lokalisation der Tn-Insertion, da das transposable Element des Transposons in der MCS zusätzliche Schnittstellen für sowohl EcoRI als auch HindIII enthält und somit zu einem veränderten Restriktionsmuster führt, das sich in der Agarose-Gelelektrophorese auswerten lässt.

Dargestellt sind von links nach rechts Marker, Wildtyp (WT) und Mutante (MUT A) erst im EcoRI, dann im HindIII-Verdau. Mit einem rotem Kreis ist die Bande gekennzeichnet, welche bei der Mutante im Vergleich zum Wildtyp verschwindet (EcoRI: 12.699 bp, HindIII 6.155bp) mit einem grünen Kreis sind die dafür neu erscheinenden Banden markiert (EcoRI: ~9.500 bp bzw. ~3.100 bp, HindIII: ~4.600 bp bzw. 1.600 bp).

Die Auswertung des Restriktionsmusters ergab für diese Rekombinante, dass die Tn-Insertion bei ~4.969 bp vom Beginn des MHV-68-BAC-Genoms gerechnet lokalisiert ist, d.h. zwischen den Genen M2 und M3.

## C. ERGEBNISSE

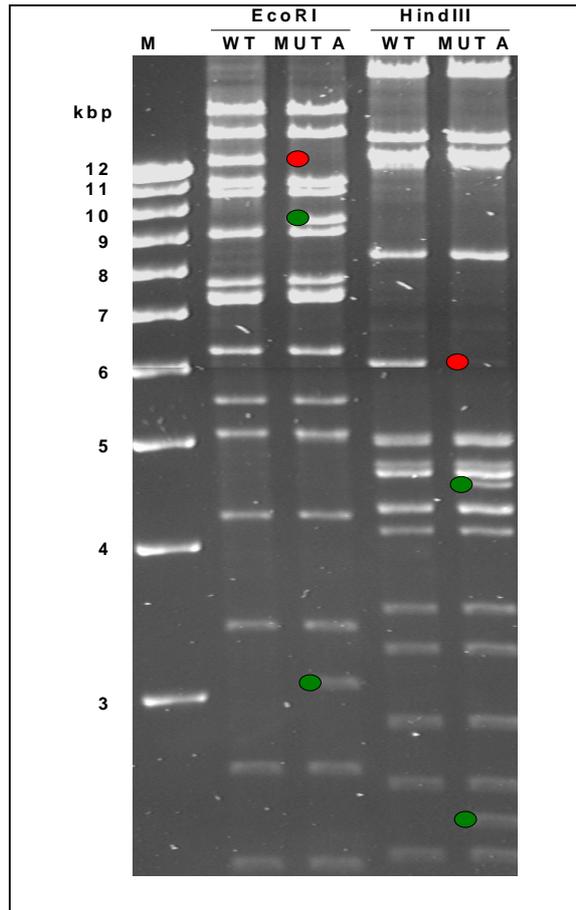


Abb. 12: Agarose-Gelelektrophorese eines Markers (linke Spur) und des Verdauens von WT und MUT A mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI (nächste zwei Spuren) sowie HindIII (rechte zwei Spuren). Dargestellt ist das Bandenmuster sowie dessen Veränderungen, die auf die Tn-Insertion zurückzuführen sind (siehe Text)

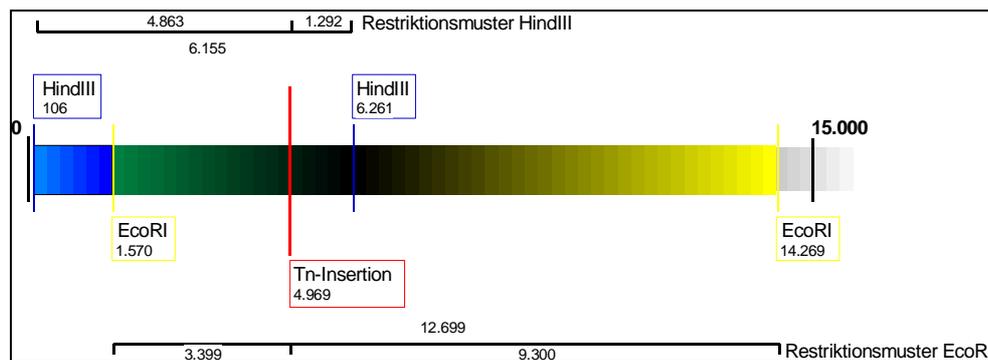


Abb. 13: Schema zur Erklärung der Lokalisation der Tn-Insertion bei MUT A mittels Vergleichs des Restriktionsmusters zweier Enzyme, hier HindIII (oben im Bild, blau) und EcoRI (unten im Bild, gelb), wichtig zur Lokalisation der Tn-Insertion (rot) ist die Überlappung der entstehenden Fragmente (grün), alle Zahlenangaben zur Fragmentlänge in bp.

## C. ERGEBNISSE

### 1.2.4 Beispielhafte Darstellung der aus internen Rekombinationsvorgängen im MHV-68-Genom resultierenden Shifts

Bei der Mutagenese kann es zu Veränderungen des Restriktionsmusters kommen, die nicht auf Tn-Insertion zurückzuführen sind. Sie beruhen auf einer Veränderung der Größe der Restriktionsfragmente aufgrund von Rekombinationsvorgängen innerhalb der internen Wiederholungssequenzen und werden als shifts, also Verschiebungen der Banden in der Agarose-Gelelektrophorese, bezeichnet. Sie komplizieren die Auswertung des Bandenmusters. Einer dieser sog. Shifts ist im Folgenden anhand der Gelelektrophorese des Restriktionsenzymverdaus einer beispielhaft aufgezeigten Mutante B (MUT B), besonders ausgeprägt im Verdau mit dem Restriktionsenzym EcoRI, gezeigt. Hierbei ist mit einem blauen Kreis der Shift einer Bande beim Verdau der Mutante im Vergleich zum Wildtyp gekennzeichnet, der auf die besonders häufigen Rekombinationsvorgänge innerhalb des sog. 40bp-Repeats zurückzuführen ist. Hierbei wird aus einer Doppelbande (EcoRI-WT), die sich in einem EcoRI-Verdau bei 5.169 bp zeigt, eine einzelne Bande bei 5.169 bp sowie eine weitere zwischen 4 und 5 kbp.

Mit einem roten Kreis ist die Bande gekennzeichnet, welche im EcoRI-Verdau ersichtlich bei der Mutante im Vergleich zum Wildtyp aufgrund der Transposoninsertion mit zusätzlicher Schnittstelle für EcoRI verschwindet, mit grünen Kreisen diejenigen Banden die hierfür in der Mutante zusätzlich erscheinen.

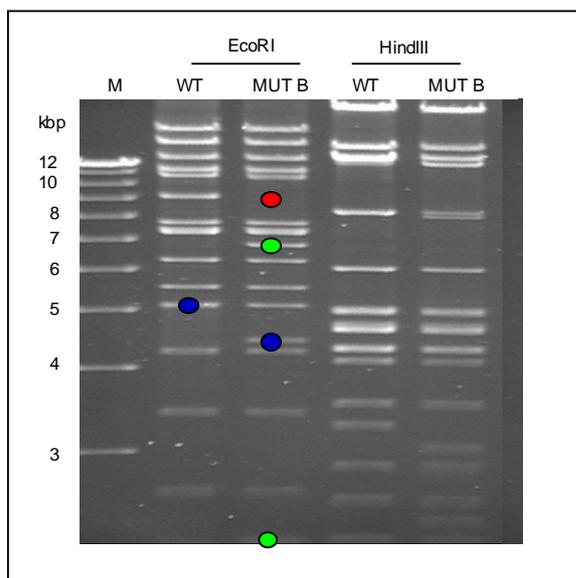


Abb. 14: Agarose-Gelelektrophorese eines Markers (linke Spur) und des Verdau von WT und MUT B mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI (nächste zwei Spuren) sowie HindIII (rechte zwei Spuren). Im EcoRI-Verdau ist der Shift (blaue Punkte, siehe Text) sichtbar, der nicht aufgrund des Verdau eines Fragmentes beruht, der hier beispielhaft durch das Verschwinden einer Bande (roter Punkt) und das Auftreten zweier neuer Banden (grüne Punkte) dargestellt wird

## C. ERGEBNISSE

Für die weiteren Schritte der Mutagenese wurde ein WT-Klon ausgewählt, welcher aufgrund der schon erwähnten spontanen Rekombinationsvorgänge im 40bp-Repeat eine bereits weitestgehende Verarmung dieser Bande aufwies. So musste man nicht mehr mit weiteren Shifts im Laufe der Mutagenese rechnen, welche die Auswertungen mittels Verdau und Agarose-Gelelektrophorese erschweren würden. Die Auswahl des entsprechenden Wildtyp-BAC-Klons (#5 in der folgenden Abbildung) verdeutlicht die folgende Gelelektrophorese eines Restriktionsenzymverdaus mit EcoRI, welche auch den mit einem grünen Pfeil dargestellten Shift der Bande bei 5.196 bp zeigt:

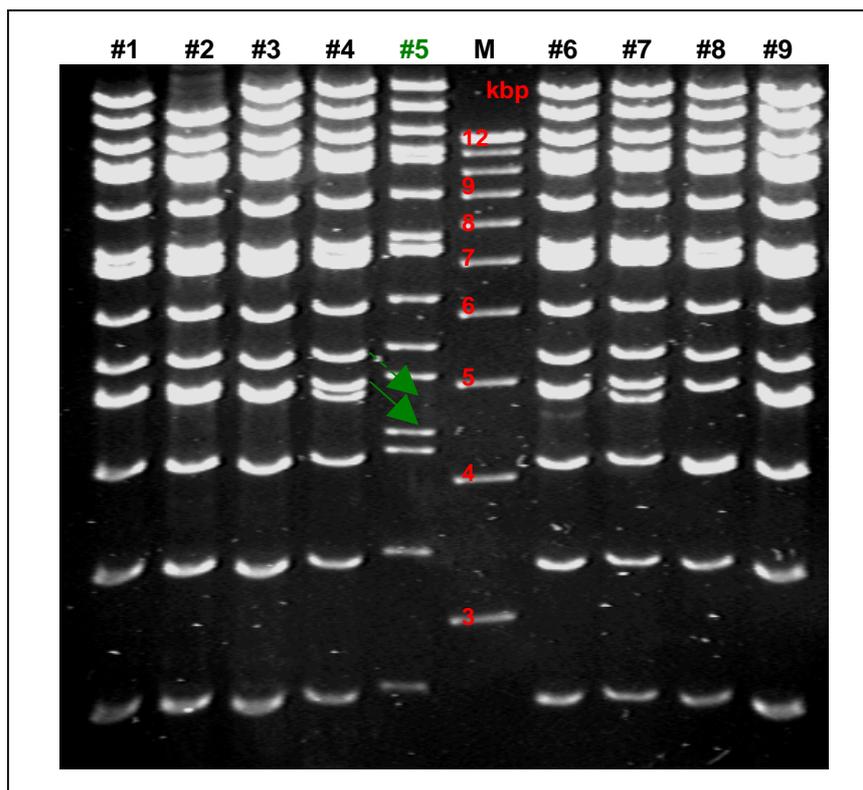


Abb. 15: Agarose-Gelelektrophorese des Verdau verschiedener Wildtyp-MHV-68-BAC-Klone mit der Restriktionsendonuklease EcoRI, die Abbildung verdeutlicht den Sachverhalt des im Text schon erwähnten Shifts der Bande bei 5.169 bp, der zur Auswahl eines Klons mit weitestgehender Verschiebung dieser Bande aufwies (grüne Pfeile).

### 1.3 Bestimmung der Effizienz der Transposition

Anschließend wurde die Effizienz des dargestellten Mutageneseverfahrens hinsichtlich der Transposoninsertion ermittelt. Hierzu wurde die Frequenz der Insertion bei Verwendung des neu klonierten Transposon-Donor-Konstruktes pTsTnMax8B-RFP mit der des in der Arbeitsgruppe bereits verwendeten Ursprungskonstruktes pTsTnMax8B verglichen.

Es zeigte sich, dass im Falle des Konstruktes pTsTnMax8B-RFP eine Insertion in das BAC in 10 von 20 Fällen stattfand, was einer Frequenz von 50% entspricht. Die weiteren

## C. ERGEBNISSE

Transpositionsvorgänge fanden in das bakterielle Genom statt. Gegen diesen Vorgang wurde nicht selektiert, da auch hier eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Kanamycin gegeben war, für welche in der transposablen Einheit kodiert wird (kan-Resistenzgen). Das Transposon-Donor-Konstrukt pTsTnMax8B-RFP war aufgrund der während der Mutagenese verwendeten Temperaturschritte und des temperatursensitiven Replikationsursprunges jedoch nicht mehr vorhanden.

Im Falle des Ursprungskonstruktes pTsTnMax8B lag die Frequenz der Transposoninsertion in das BAC jedoch bei 15 von 20 untersuchten Klonen oder 75%, diesen Sachverhalt verdeutlicht die folgende Grafik.

Hierbei sind auf der x-Achse die Insertionsorte (BAC oder bakterielles Genom), auf der y-Achse das verwendete Tn-Donor-Konstrukt, sowie auf der z-Achse die jeweilige Insertionsfrequenz in % dargestellt.

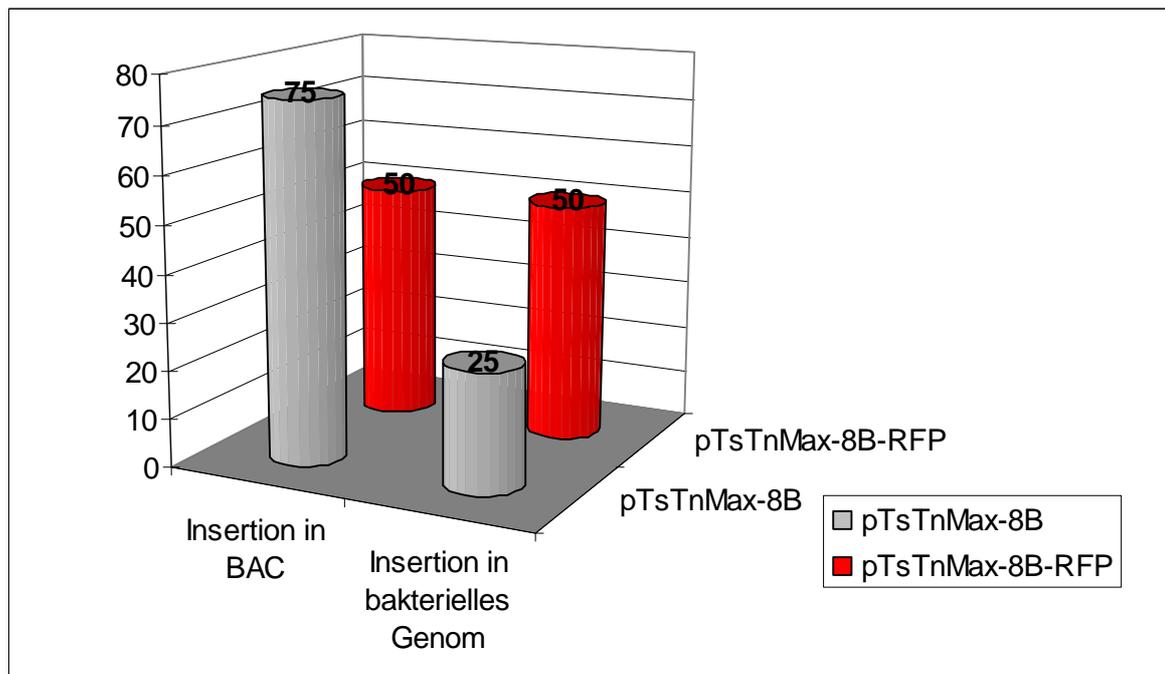


Abb.44: Vergleich der unterschiedlichen Effizienzen der Transposonmutagenesen mit den Transposon-Donor-Konstrukten pTsTnMax8B (grau) und dem in dieser Arbeit hergestellten und verwendeten pTsTnMax8B-RFP (rot) anhand der prozentualen Verteilung der Tn-Insertionen in das bakterielle Genom oder in das BAC. Die Abbildung macht deutlich, dass pTsTnMax8B mit einer wesentlich geringeren Effizienz in das BAC inseriert.

### 1.4 Suche nach einer geeigneten Positiv-Kontrolle für die Rekonstitution der viralen Rekombinanten und einer Wildtyp-Kontrolle für den phänotypischen Vergleich

Zur Rekonstitution von 1050 rekombinanten MHV-68-BAC-Genomen war es notwendig, zusätzlich zu der für die Rekonstitution benötigten Negativkontrolle eine Positivkontrolle zu finden. Diese

## C. ERGEBNISSE

sollte idealerweise auch als Wildtyp-Kontrolle für den anschließenden phänotypischen Test der replikationsfähigen Rekombinanten dienen. Zu diesem Zweck wurde als geeignete Kombination als Positiv-/Wildtyp-Kontrolle ein Klon ausgewählt, welcher die Transposoninsertion in der terminalen Wiederholungssequenz besaß. Dieser wies die gleichen fluoreszenzmikroskopischen Eigenschaften wie die Rekombinanten auf, jedoch keine durch eine Tn-Insertion unterbrochene kodierende Sequenz.

Dies sollte nach allem, was man über die Funktion solcher terminaler Wiederholungssequenzen gegenwärtig weiß, nicht zu einer Beeinträchtigung der Replikationsfähigkeit und des viralen Wachstums führen, was zum Gebrauch des Klons als Positivkontrolle prädestinierte. Das Problem der Genom-Überlänge<sup>(3)</sup> wurde durch Rekonstitution auf Cre<sup>+</sup>-Fibroblasten umgangen. Mittels der Rekombinase Cre wurden dabei die zusätzlichen BAC-Sequenzen entfernt (siehe hierzu auch Ergebnisse 2.2.2). Dies erlaubte die Verwendung als Wildtyp-Kontrolle für die phänotypische Untersuchung der Rekombinanten.

Um dennoch vorliegende Unterschiede in der Replikations- oder Wachstumskinetik feststellen zu können, wurde eine Wachstumskurve erstellt (siehe Material und Methoden 2.9). Um sicherzustellen, dass alle Vertiefungen mit der Fibroblasten-Zellreihe NIH-3T3 mit gleichen Mengen infektiöser Partikel infiziert worden sind, wurde auch die eingesetzte Virusmenge an Tag 0 bestimmt, obwohl die hierzu verwendeten Virusstocks zuvor titriert, d.h. die Anzahl der infektiösen Einheiten pro Volumen worden waren.

Die Bestimmung der Anzahl der infektiösen Einheiten in diesem Experiment wurde nicht in einem Dreifach- sondern lediglich in einem Doppelansatz durchgeführt, sodass eine Standardabweichung der einzelnen Werte nicht ermittelt wurde.

Es wurden zwei mögliche Kandidaten mit Tn-Insertionen in der terminalen Wiederholungssequenz mit WT-MHV-68-Virus verglichen. Bei allen wurde mittels Rekonstitution auf Cre<sup>+</sup>-Fibroblasten durch Wirkung der Rekombinase Cre die BAC-Kassette samt gfp- und gpt-Genen analog der später durchzuführenden Rekonstitution viraler Rekombinanten entfernt, um eine Beeinträchtigung der viralen Replikationsfähigkeit aufgrund von Genom-Überlänge zu verhindern. Es zeigte sich kein Unterschied im Replikationsverhalten. Dieses Ergebnis der Wachstumskurve zeigen folgende Tabelle und die Abbildung auf der nächsten Seite.

## C. ERGEBNISSE

Tage p.i.	Wildtyp-MHV-68 $\Delta$ GFP	Mutante # 295	Mutante # 328
0	$3 \cdot 10^4$	$3,4 \cdot 10^4$	$4,6 \cdot 10^4$
1	$1 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^3$
2	$2,5 \cdot 10^4$	$1,8 \cdot 10^4$	$2,6 \cdot 10^4$
3	$5,6 \cdot 10^4$	$4,8 \cdot 10^4$	$4,5 \cdot 10^4$
4	$3,9 \cdot 10^4$	$3,4 \cdot 10^4$	$2,9 \cdot 10^4$
5	$1,6 \cdot 10^4$	$2,2 \cdot 10^4$	$1,4 \cdot 10^4$
6	$1,5 \cdot 10^4$	$9 \cdot 10^3$	$9 \cdot 10^3$

Tab. 1: Ergebnisse der Titerbestimmungen (PFU/ml Überstand) an den Tagen 0, 1, 2, 3, 4, 5 und 6 p.i., verglichen wurden zwei Rekombinanten mit Tn-Insertion in der terminalen Wiederholungssequenz (#295 und #328) mit einer Wildtyp-BAC-Kontrolle, bei der aufgrund der Rekonstitution in Cre<sup>+</sup>-Fibroblasten die BAC-Kassette samt gfp-Gen wie auch bei den verwendeten Rekombinanten herausgeschnitten war.

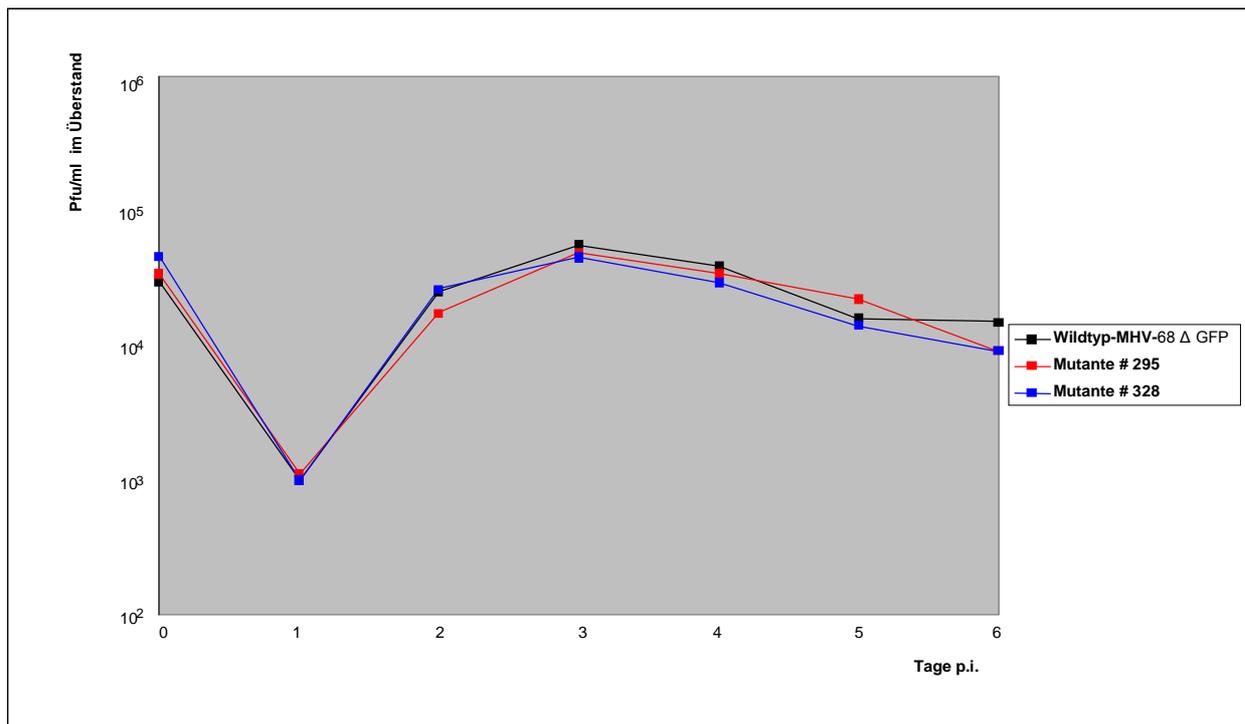


Abb. 17: grafische Darstellung der Wachstumskurve mit Titerbestimmungen (PFU/ml Überstand) an den Tagen 0, 1, 2, 3, 4, 5 und 6 p.i., verglichen wurden zwei Rekombinanten mit Tn-Insertion in der terminalen Wiederholungssequenz (#295, rot, und #328, blau) mit einer Wildtyp-BAC-Kontrolle (schwarz), bei der aufgrund der Rekonstitution in Cre<sup>+</sup>-Fibroblasten die BAC-Kassette samt gfp-Gen wie auch bei den verwendeten Rekombinanten herausgeschnitten war. Aus der Abbildung wird ersichtlich, dass sowohl die verwendete Wildtyp-Kontrolle wie auch die Rekombinanten #295 und #328 ein vergleichbares Wachstumsverhalten aufweisen, sodass im Folgenden wegen der besseren Erkennbarkeit aufgrund der RFP-Expression Rekombinante #328 als „Wildtyp-Kontrolle“ verwendet wurde.

## C. ERGEBNISSE

### 2. REKONSTITUTION REKOMBINANTER MHV-68-VIREN

Eine Suche im Sinne der „forward genetics“ nach Genfunktionen im MHV-68-Genom, welche eine Zelltropismus determinieren, macht es aufgrund der notwendigen „blinden“ Untersuchung der Rekombinanten unabdingbar, eine große Anzahl replikationsfähiger rekombinanter MHV-68-Genome mit Tn-Insertion zu rekonstituieren.

Um die arbeitsaufwändigen Vorgänge der BAC-DNA-Isolierung und nachfolgenden Transfektion von Eukaryonten zur viralen Rekonstitution zu umgehen, geschah dies mittels Bakterien. Diese sollten durch Vermittlung invasiver Eigenschaften aufgrund Einführung des Plasmids pGB2 $\Omega$  *inv-hly* (<sup>55</sup>) Eukaryonten sozusagen mit den rekombinanten Genomen „infizieren“ und somit deren Rekonstitution einleiten. Diese Methodik ist an das Verfahren von Brune et al. angelehnt (<sup>26</sup>).

#### 2.1 Herstellung invasiver E.coli

Für die Rekonstitution rekombinanter Viren nach Mutagenese der Genome war es unerlässlich Kontaminationen mit anderen Bakterien oder Pilzen auszuschließen. Zu diesem Zwecke wurde das MHV-68-WT-BAC von neuem in zuvor getestete kontaminationsfreie und elektrokompetente E.coli DH10B eingeführt.

Im Folgenden wurde die Transposon-Mutagenese analog der in Ergebnisse 1.1 – 1.2 dargestellten Methode durchgeführt. Wiederum wurden diejenigen E.coli, welche MHV-68-BACs mit im Idealfall gleichverteilten Tn-Insertionen besaßen, gegen solche selektiert, die noch das Tn-Element im Donor-Plasmid trugen. Hierzu wurde mit Kanamycin (*kan*) in einer Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  zur Selektion der Tn-Elemente, welche ein *kan*-Resistenzgen besitzen sowie Chloramphenicol (*cam*) in einer Konzentration von 25  $\mu\text{g/ml}$  zur Selektion der BACs gearbeitet. Um jede weitere Replikation des Transposon-Donor-Plasmides zu verhindern, wurde ÜN bei 220 rpm und 43°C inkubiert. Die Suspension wurde im Folgenden jedoch nicht ausplattiert und die Klone entsprechend der in Ergebnisse 1.1-1.2 gezeigten Beispiele analysiert, sondern die enthaltenen E.coli für die nun folgende Transformation elektrokompetent gemacht.

##### 2.1.1 Einführung des Invasionsplasmids pGB2 $\Omega$ *inv-hly* in E.coli

Mittels Elektroporation wurde das Invasionsplasmid pGB2 $\Omega$  *inv-hly* in die Suspension von E.coli, welche rekombinante MHV-68-BACs enthielten, unter Standardbedingungen eingeführt. Dieses Plasmid enthält zum einen das Gen für ein Invasin (*inv*) aus *Yersinia pseudotuberculosis*, welches die

## C. ERGEBNISSE

Bindung der das Plasmid enthaltenden Bakterien an  $\beta_1$ -Integrine auf der Zielzellmembran vermittelt, sowie das Gen für ein Haemolysin (hly) / Bacteriolysin O aus *Listeria monocytogenes*, welches zusätzlich das Endozytose-Vesikel für die MHV-68-BAC-Rekombinanten durchlässig macht <sup>(55)</sup>, so dass deren Genom im Zellkern der Zielzelle zur Expression gelangen konnte.

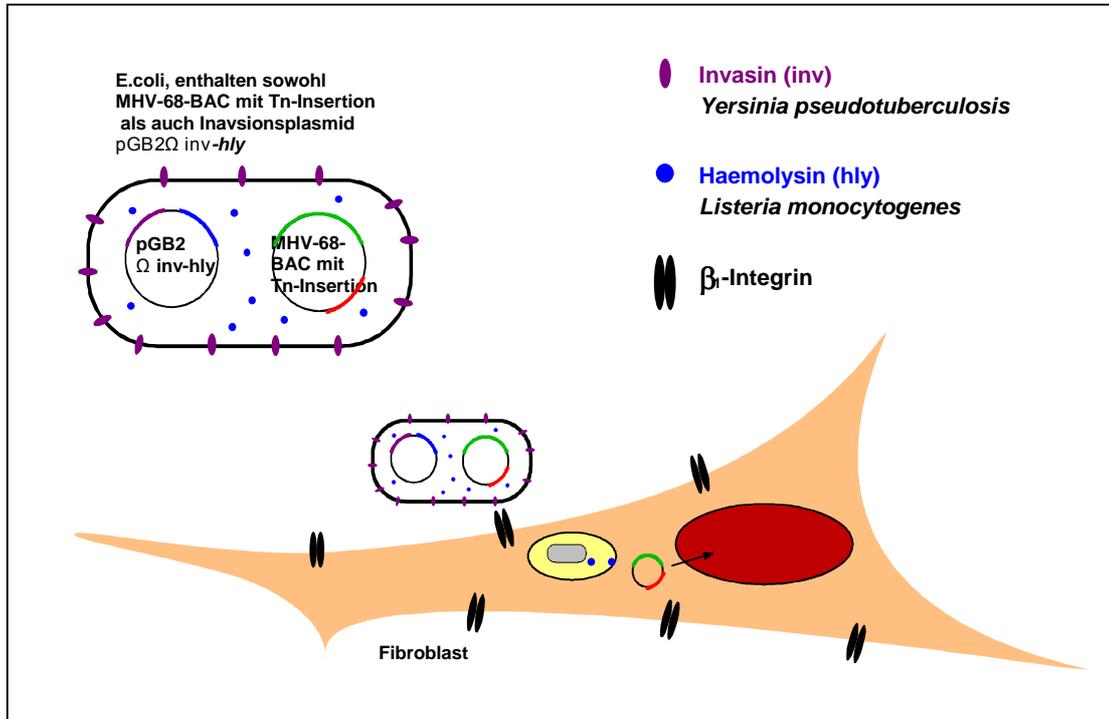


Abb. 18: Durch die auf dem Invasionsplasmid pGB2Ωinv-hly <sup>(55)</sup> kodierte Gene für Invasin (inv) und Haemolysin (hly) binden die Bakterien an zellmembranständige  $\beta_1$ -Integrine (inv-Genprodukt), das MHV-68-BAC gelangt aufgrund der Wirkung des hly-Genproduktes aus dem Endozytose-Vesikel ins Zytoplasma und anschließend in den Zellkern, wo die darauf kodierte Gene exprimiert werden können.

Die Bakteriensuspension wurde im Regelfall in drei Verdünnungen (1:200, 1:500, 1:1000) auf LB-Agar-Platten ausplattiert, welche die folgenden Antibiotika zur Selektion enthielten: Chloramphenicol (cam) in einer Konzentration von 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (s.o.), Kanamycin (kan) in einer Konzentration von 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (s.o.), sowie Spectinomycin (spec) in einer Konzentration von 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  zur Selektion des Invasionsplasmides pGB2Ω inv-hly, welches ein spec-Resistenzgen besitzt. Anschließend wurde ÜN bei 43°C inkubiert. Zur Überprüfung der Effizienz der Selektion gegen E.coli, die noch das Tn-Element im Donor-Plasmid trugen, wurden gewachsene Kulturen bei 43°C ÜN sowohl auf LB-Agar-Platten kultiviert, die cam, kan (zur Selektion für inseriertes Tn-Element, s.o.) und spec in o.g. Konzentrationen enthielten, als auch auf korrespondierenden Stellen von LB-Agar-Platten, die cam, amp (zur Selektion für komplettes Tn-Donor-Plasmid) und spec in o.g. Konzentrationen enthielten.

## C. ERGEBNISSE

### 2.1.2 Effizienz der Rekonstitution viraler Rekombinanten mittels des Invasionsplasmids

#### pGB2 $\Omega$ inv-hly

Um zu prüfen, ob für die Rekonstitution viraler Rekombinanten das Invasionsplasmid pGB2 $\Omega$  inv-hly benötigt wird, wurde in E.coli DH10B, welche das Wildtyp-MHV-68-Genom als BAC enthalten und hierzu elektrokompent gemacht wurden, das Plasmid pGB2 $\Omega$  inv-hly eingeführt. Es zeigte sich, dass es bei pGB2 $\Omega$  inv-hly tragenden Bakterien in 19 von 32 Fällen (= 59,4%) zur Bildung eines CPE und Plaques bei der hierzu verwendeten murinen Fibroblasten-Zellreihe NIH-3T3 kam, welche man aufgrund der im Wildtyp vorhandenen BAC-Kassette mit gfp-Gen durch Fluoreszenzmikroskopie gut erkennen konnte.

In Bakterien ohne Plasmid kam es jedoch in 0 von 32 Fällen (also 0%) zur Ausbildung eines CPE oder Plaques. Dieses Ergebnis schien trotz der geringen Fallzahl ausreichend repräsentativ, da es sich mit früheren Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe deckte. Zudem kam es ohne Plasmid pGB2 $\Omega$  inv-hly zu keinen spontanen Infektionen der benutzen Zellreihe durch E.coli DH10B, welche das virale Genom als BAC trugen. Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung zusammengefasst.

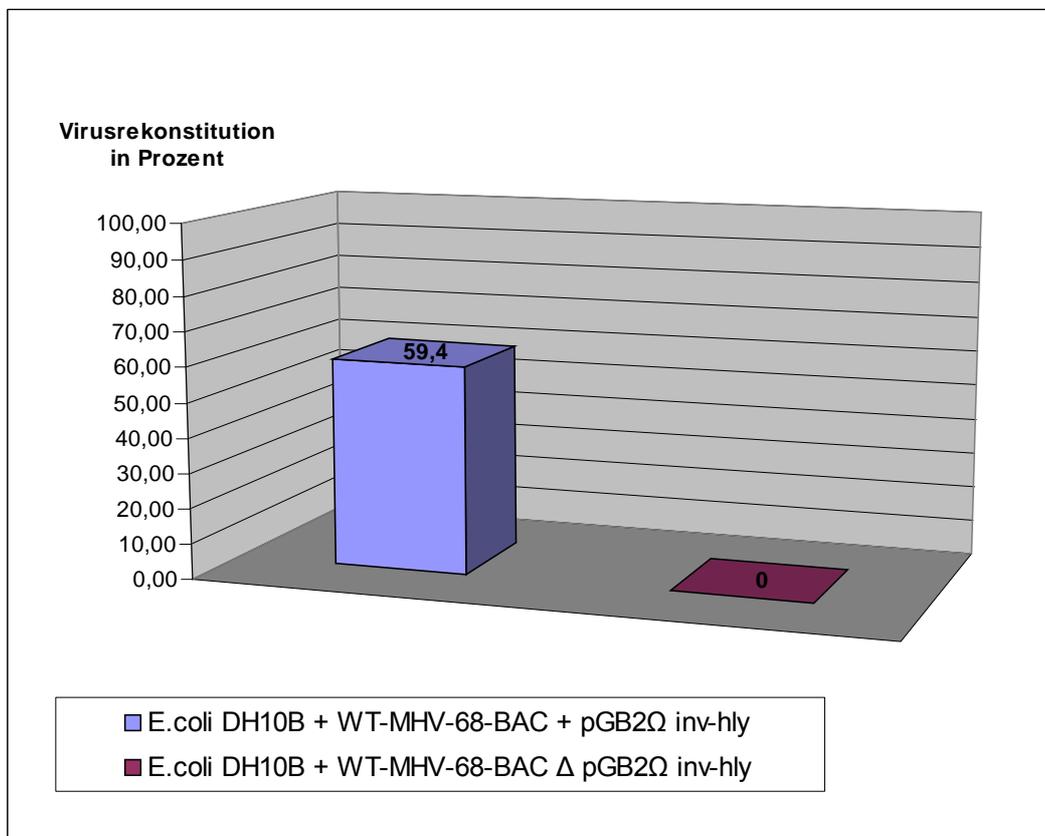


Abb. 19: Darstellung der Effizienz der Rekonstitution viraler Rekombinanten mittels des Invasionsplasmids pGB2 $\Omega$  inv-hly, ohne dieses Plasmid fand keinerlei Rekonstitution viraler Rekombinanten statt, weitere Erläuterungen siehe Text.

## C. ERGEBNISSE

Diese Ergebnisse wurden auch für die anderen verwendeten Zelllinien erwartet und zeigten, dass der Einsatz invasiver Bakterien die Virusrekonstitution ermöglicht. Bezüglich Effizienz und Reproduzierbarkeit ist das Verfahren der arbeits- und zeitaufwändigen DNA-Präparation und – Transfektion unterlegen. Der Nachteil wird jedoch durch die Verwendung hoher Durchsatzraten und großer Zahlen auf diese Weise rekonstituierter Klone durch den Zeitgewinn ausgeglichen.

### 2.2 Rekonstitution 226 rekombinanter MHV-68-Viren mit invasiven E.coli

#### 2.2.1 Expansion der einzelnen MHV-68-BAC-Rekombinanten in invasiven E.coli zur Virusrekonstitution

Im Folgenden wurden solche Klone in LB-Medium überführt, welche nur auf den cam, kan und spec enthaltenden LB-Agar-Platten Kolonien aufwiesen, nicht jedoch an den korrespondierenden Stellen der LB-Agar-Platten, die cam, amp und spec (alles in o.g. Konzentrationen) enthielten (siehe Ergebnisse 2.1.1). Nur bei erstgenannten war die Tn-Insertion erfolgt. Zur Expansion der invasiven Bakterien wurde je eine solche Kolonie in eine Vertiefung einer 96-Loch-Zellkulturplatte überführt, welche LB-Medium unter Zusatz von cam, kan und spec in o.g. Konzentrationen enthielten. Je 96-Loch-Zellkulturplatte wurden als Negativkontrolle drei Vertiefungen mit E.coli angeimpft, welche das MHV-68-BAC mit einer Transposoninsertion, nicht jedoch das Invasionsplasmid  $p_{GB2\Omega}^{inv-hly}$  trugen. Hier wurde LB-Medium unter Zusatz von lediglich cam und kan (o.g. Konzentrationen) verwendet. Als Positivkontrolle dienten E.coli mit dem rekombinanten MHV-68-BAC-Genom der Mutante #328 (siehe Ergebnisse 1.4) mit LB-Medium unter Zusatz von cam, kan und spec (o.g. Konzentrationen). Anschließend wurde ÜN bei 150 rpm und 37°C inkubiert. Zur gleichen Zeit wurden Fibroblasten, welche Rekombinase Cre stabil exprimieren, ausgelegt, so dass diese am nächsten Tag eine 40-50%-ige Konfluenz aufwiesen. Für diesen Schritt wurde das DMEM nicht mit Antibiotika supplementiert, um die am nächsten Tag folgende Infektion mit den MHV-68-BAC-Rekombinanten enthaltenden E.coli zu ermöglichen.

#### 2.2.2 Entfernen der BAC-Kassette in rekombinanten MHV-68-BACs mittels Expression der Rekombinase Cre in infizierten Fibroblasten

Am Tag darauf wurden je Vertiefung der in Ergebnisse 2.2.1 beschriebenen Fibroblasten 2,5 µl der ÜN inkubierten Bakteriensuspension gegeben und hiernach für 5 min bei 2000 rpm und

## C. ERGEBNISSE

Raumtemperatur in der Heraeus Megafuge 1.0 R Zentrifuge mit Einsatz für 96-Loch-Zellkulturplatten sedimentiert, um die Adhäsion der Bakterien an das Fibroblasten-Monolayer zu beschleunigen.

Dann wurde für 2 Stunden bei 37°C im CO<sub>2</sub>-Inkubator bebrütet und die Platten für 1-2 min vorsichtig mittels Vortexer und Aufsatz für 96-Loch-Zellkulturplatten geschüttelt, damit sich diejenigen Bakterien, deren Adhäsion an die Zellmembran der Fibroblasten zu schwach war und die nicht in die Zellen eingedrungen waren, von diesen lösten. Es wurde einmal mit PBS gewaschen und anschließend jede Vertiefung mit DMEM incl. Supplement für Cre<sup>+</sup>-Fibroblasten (siehe Material und Methoden 2.7), hier unter Zusatz von Gentamicin und Ampicillin in Endkonzentrationen von je 100 µg/ml zur effizienteren Abtötung im Medium noch vorhandener E.coli bedeckt. Die Abtötung aller Bakterien war notwendig, da anderenfalls die Infektion die Zellkultur gestört hätte.

Nach drei Stunden wurde nochmals mit PBS gewaschen und ein erneuter Medienwechsel durchgeführt, diesmal zu DMEM incl. Supplement für Cre<sup>+</sup>-Fibroblasten (siehe Material und Methoden 2.7) und Zusatz von HEPES in einer Endkonzentration von 20 mM zur besseren Abpufferung. Es wurde wiederum bei 37°C im CO<sub>2</sub>-Inkubator bebrütet, bis sich in den Vertiefungen, in denen eine erfolgreiche Infektion der Fibroblasten mit den MHV-68-BAC-Rekombinanten enthaltenden E.coli stattgefunden hatte, rot fluoreszierende Plaques bildeten, was mittels Fluoreszenz-Mikroskopie kontrolliert wurde.

Durch Rekonstitution der rekombinanten Virionen auf Fibroblasten, welche die Rekombinase Cre exprimieren, konnte die BAC-Kassette mittels sequenzspezifischer Rekombination entfernt werden. Hierbei interagiert die Rekombinase Cre mit loxP-Sequenzen, von denen die nun überflüssigen Sequenzen sowohl am 3'- als auch am 5'-Ende flankiert werden. Nach Entfernung von BAC-Kassette, gfp- und gpt Gen bleibt nur eine loxP-Sequenz im Genom zurück, dies ist in den folgenden Abbildungen illustriert. Somit konnte eine Genom-Überlänge und eine Attenuierung in vivo verhindert werden (°). Um die Effizienz der Rekonstitution mittels invasiver Bakterien zu erhöhen, wurden alle Infektionen dreifach pro Bakterienklon durchgeführt.

## C. ERGEBNISSE

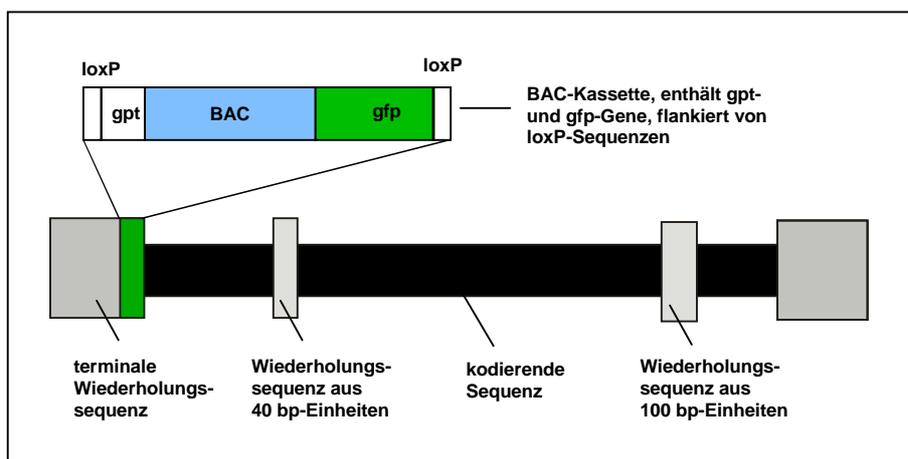


Abb. 20: Genomorganisation des MHV-68-BAC, zeigt die Struktur der inklonierten BAC-Kassette, welche die Gene für die Guanosylphosphoribosyltransferase (gpt, zur Selektion nötig), das grün fluoreszierende Protein (green fluorescent protein, gfp), sowie ein Derivat eines F1-Plasmids besitzt. Diese Region ist sowohl am 5'- wie auch am 3'-Ende von loxP-Sequenzen flankiert. Die kodierende Sequenz wird von zwei internen Wiederholungssequenzen von 40 bp- und 100 bp-Einheiten unterbrochen.

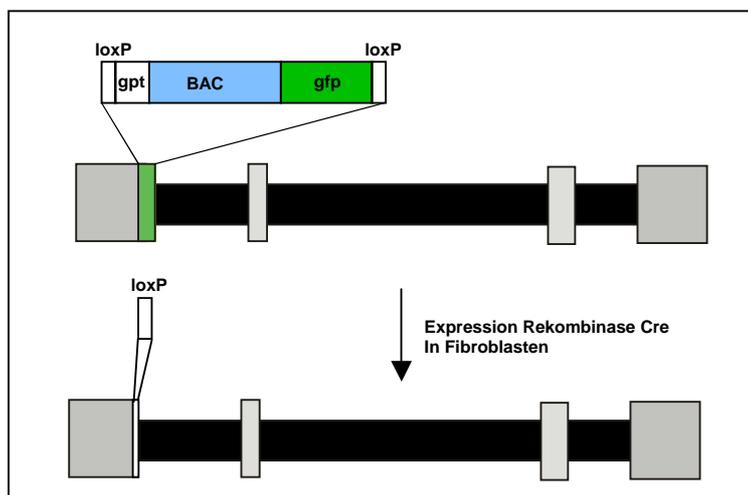


Abb. 21: Durch Rekonstitution der Virionen auf Fibroblasten, welche Rekombinase Cre stabil exprimieren, wird die von loxP- Sequenzen flankierte Region mit BAC-Kassette, gpt- und gfp-Gen mittels sequenzspezifischer Rekombination entfernt, es bleibt an der Stelle der ehemaligen Insertion eine loxP-Sequenz bestehen.

### 2.2.3 Expansion rekombinanter Viren

Der Überstand transfizierter Cre<sup>+</sup>-Fibroblasten, welche rote Plaques zeigten, wurde bis auf ein 50 µl-Aliquot (dieses wurde bei -20°C aufbewahrt) auf frische Cre<sup>+</sup>-Fibroblasten in einer 6-Loch-Zellkulturplatte gegeben, um die Viren zu vermehren und die Effizienz des Herausschneidens der BAC-Kassette mittels Rekombinase Cre zu steigern. Zeigten diese Vertiefungen ca. 2-3 Tage später einen vollen CPE, so wurden die Zellen mit einem Zellkulturschaber geerntet, der Überstand eingefroren und bei -80°C gelagert. Dieser Überstand wurde in den folgenden phänotypischen Untersuchungen als grober Virusstock verwendet.

## C. ERGEBNISSE

Da die Bestimmung der Virustiter der Überstände einen bedeutenden Zeitaufwand erzeugt hätte, wurden die Viren geerntet, wenn alle Zellen einer Vertiefung einen gleich fortgeschrittenen zytopathischen Effekt zeigten, und somit ein vergleichbares Viruswachstum angenommen.

Die folgende Abbildung fasst die bis jetzt dargestellte Methodik der zufälligen Mutagenese mittels Transposoninsertion und der Rekonstitution rekombinanter Viren und anschließender Expansion zusammen.

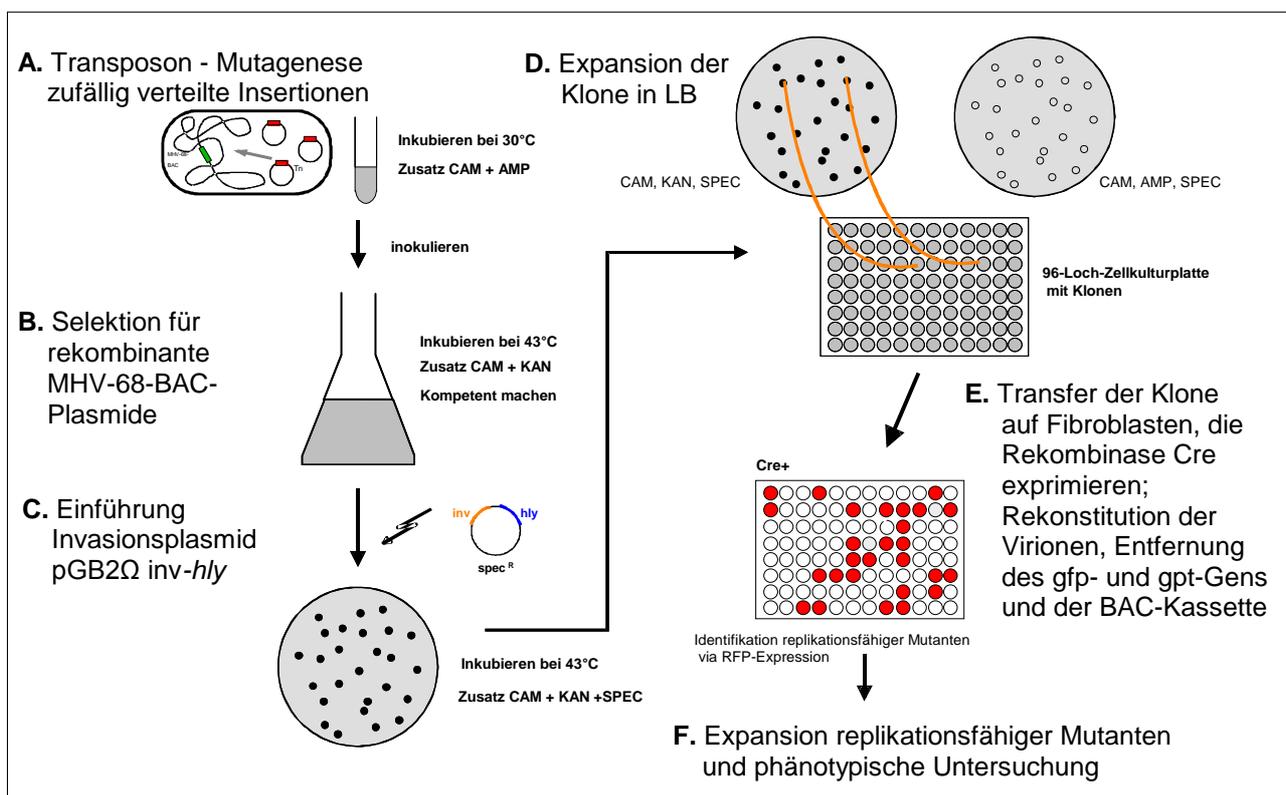


Abb. 22: Übersichtsschema mit allen während der Transposonmutagenese und Rekonstitution der rekombinanten Virionen durchgeführten Schritte, diese sind in Ergebnisse 2.1-2.2 detailliert dargestellt. Die hier beschriebene Mutagenese benötigt bis einschließlich Schritt E im Schema 5 Tage, weitere zwei Tage dauert es, bis replikationsfähige Rekombinanten mittels Fluoreszenz-Mikroskopie erkannt werden können (Zeichnung angelehnt an Brune et al.)

### 2.3 Charakterisierung der rekombinanten MHV-68-Genome

#### 2.3.1 Das Restriktionsmuster und die Southern-Blot-Analyse der rekombinanten MHV-68-Genome zeigt einzelne Transposoninsertionen

Die Mutagenese mittels Transposoninsertion ließ sich mit akzeptabler Effizienz anwenden. Der Gebrauch invasiver Bakterien zur Virusrekonstitution bedeutete einen deutlichen Zeitgewinn. Als

## C. ERGEBNISSE

nächstes wurde getestet, ob es bei der Insertion der transposablen Sequenzen wirklich zu einzelnen unabhängigen Ereignissen kommt.

Hierzu wurden NIH-3T3-Zellen in 24 Zellkulturschalen ausgelegt und mit 24 verschiedenen rekombinanten MHV-68-Klonen per Kalziumphosphattransfektion zur Virusrekonstitution transfiziert. Nachdem die verwendeten Zellen einen CPE zeigten, wurden diese geerntet und im Verfahren nach Hirt <sup>(64)</sup> aus diesen die viralen Genome isoliert und durch Restriktionsenzymverdau mit BamHI und Agarose-Gelelektrophorese untersucht.

Die Gele der Verdau dieser Hirt-Extrakte wurden für einen Southern-Blot benutzt, bei dem als Sonde eine DIG-markierte DNA-Probe verwendet wurde, welche die rfp-Gensequenz erkannte und mittels PCR hergestellt wurde (siehe Abbildung 24, S.64). Diese sollte erwartungsgemäß für alle untersuchten Klone bei singulärer Transposition der Insertionssequenz des Transposons, welche das rfp-Gen enthielt, zu einem einzelnen Signal führen. Die Laufhöhe des sichtbaren Signals war jedoch nicht mit der Lokalisation der Transposoninsertion im BAC-Genom zu korrelieren.

Signale auf gleicher Höhe bedeuteten nicht, dass die Tn-Insertion im selben Genombereich oder sogar an der selben Stelle stattgefunden hatte, da das RFP-Transposon-Konstrukt innerhalb der transposablen Insertionssequenz, genauer einer multiplen Klonierungssequenz (MCS, multiple cloning site), eine BamHI-Schnittstelle besitzt und nur das rechts der BamHI-Schnittstelle (Schema siehe nächste Seite) lokalisierte rfp-Gen mittels der RFP-Sonde erkannt wird.

Diesen komplex erscheinenden Sachverhalt erläutert das folgende Schema. Gezeigt ist ein fiktives 10kb-Fragment nach Verdau des WT-MHV-68-BACs mit dem Restriktionsenzym BamHI, wie es für den Southern Blot zum Nachweis einzelner Tn-Insertionen verwendet wurde.

Nach Insertion des Transposons in das WT-BAC verändert sich die Größe der Fragmente aufgrund der nun zusätzlichen Schnittstelle für BamHI in der MCS, welche in der Insertionssequenz des Transposons gelegen ist.

Der Verdau der Rekombinanten mit BamHI führt zu zwei Fragmenten, die in der Summe das ursprüngliche 10kb-Fragment und zusätzlich 3,6kb der Insertionssequenz ergeben. Beide sind im Agarosegel sichtbar, im Southern Blot wird jedoch nur das Fragment nachgewiesen, welches das rfp-Gen trägt. Hätte das Transposon an einer anderen Stelle in dieser fiktiven 10kb-Bande inseriert, wäre das im Blot nachgewiesene Fragment kleiner oder größer, je nach Lage der Insertion.

Es können somit mehrere Fragmente im Blot erscheinen, welche zwar die gleiche Größe besitzen, jedoch nicht auf eine Tn-Insertion am gleichen Ort schließen lassen.

## C. ERGEBNISSE

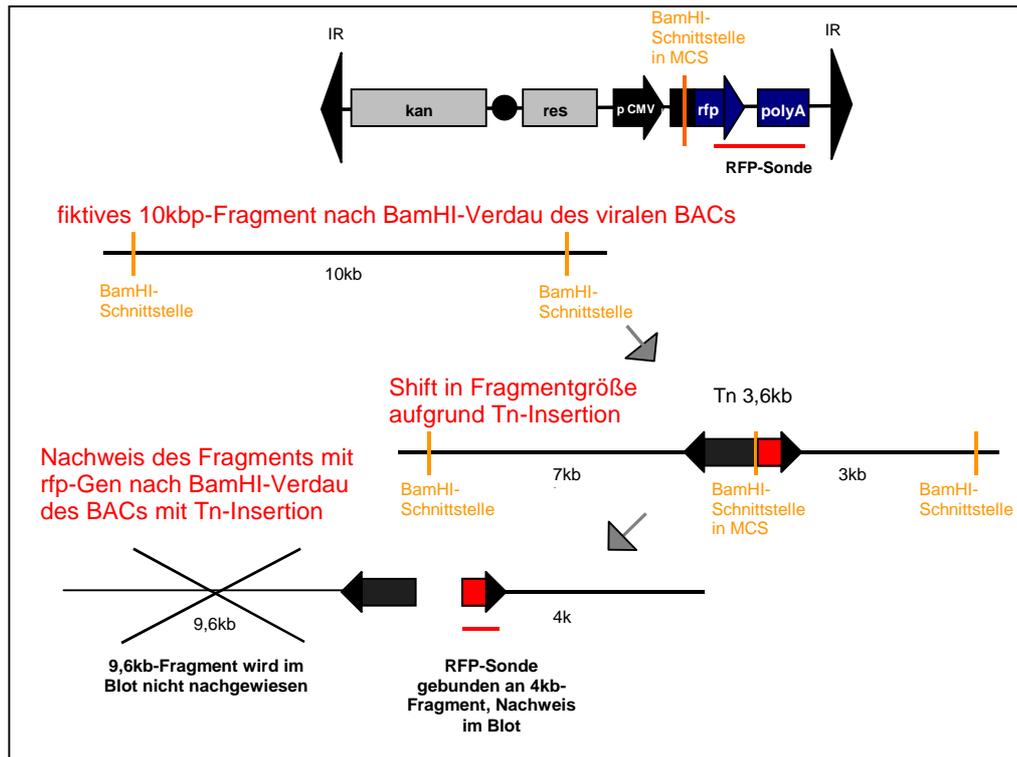


Abb. 23: Strategie des Nachweises einzelner Tn-Insertionen mittels Agarose-Gelelektrophorese und anschließendem Southern-Blot zum Nachweis der Banden, welche ein RFP-Fragment enthalten. Wie im Text erläutert verändert sich aufgrund der Tn-Insertion die Größe der für dieses Beispiel verwendeten fiktiven 10kb-Banden. Nach Verdau mittels der Restriktionsendonuklease BamHI resultieren nun (ebenfalls fiktive) Banden der Größe 9,6kb sowie 4kb. Nur die entstandene 4-kb-Bande jedoch lässt sich durch die im Southern-Blot verwendete RFP-Sonde erkennen.

Die Auswertung der Southern Blots nach Belichtung der verwendeten Filme zeigte einzelne Tn-Insertionen. Dieser Sachverhalt wird in der Abbildung auf der folgenden Seite illustriert.

## C. ERGEBNISSE

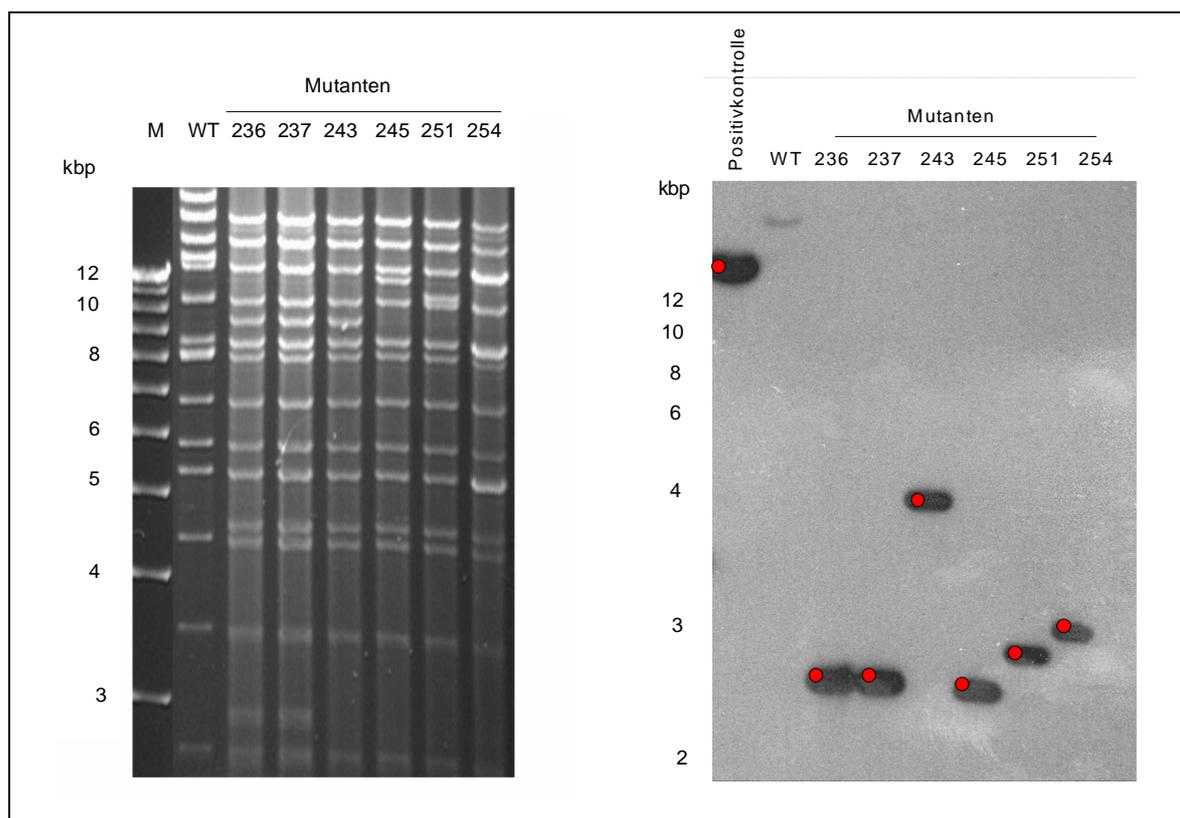


Abb. 24: Agarose-Gelelektrophorese (links) und Southern-Blot (rechts) einer Anzahl ausgewählter MHV-68-Mutanten, Herstellung der Sonde mittels PCR (Primer M13r – IN, RFP 5´- down2, siehe Anhang) zum Nachweis der aufgrund der Tn-Insertion vorhandenen Sequenzen des rfp-Gens. Im Southern Blot sind einzelne Tn-Insertionen erkennbar (rote Punkte). Als Positivkontrolle wurde eine Rekombinante verwendet, bei der aufgrund PCR und Sequenzierung eine einzelne Tn-Insertion sichergestellt war.

### 2.3.2 Die Rekombinase Cre entfernt auf effiziente Weise die BAC-Sequenzen, das gpt- sowie gfp-Gen

Wie bereits bei der Beschreibung der Methode in Ergebnisse 2.1 – 2.2 dargestellt, werden zur Rekonstitution rekombinanter Virionen Fibroblasten verwendet, welche stabil die Rekombinase Cre exprimieren (Cre<sup>+</sup>-Fibroblasten). Hierdurch soll die BAC-Kassette samt gpt- und gfp-Gen, welche am 3´- wie am 5´-Ende von loxP-Sequenzen flankiert werden, entfernt werden.

Um auch die Effizienz dieses Teils der vorliegenden Arbeit zu überprüfen, wurden im Unterschied zum vorhergehenden Abschnitt Cre<sup>+</sup>-Fibroblasten in 24 Zellkulturschalen ausgelegt und mit 24 verschiedenen invasiven E.coli-DH10B-Klonen, die hierzu das Invasionsplasmid pGB2Ω<sub>inv-hly</sub> sowie das MHV-68-BAC-Plasmid mit verteilten Tn-Insertionen trugen, zur Virusrekonstitution infiziert.

Nachdem auch hier die verwendeten Zellen einen CPE zeigten, wurden diese geerntet und nochmals der hierbei gewonnene Überstand auf Cre<sup>+</sup>-Fibroblasten gegeben. Als auch die Zellen der zweiten Runde einen CPE zeigten wurden die viralen Genome analog zum vorher genannten Teil mittels des

## C. ERGEBNISSE

Verfahrens nach Hirt <sup>(64)</sup> isoliert und durch Restriktionsenzymverdau und Agarose-Gelelektrophorese untersucht.

Dieses Mal wurden die Gele der Verdau dieser Hirt-Extrakte für einen Southern-Blot benutzt, bei dem als Sonde eine DIG-markierte DNA-Probe verwendet wurde, welche die gfp-Gensequenz erkannte (Herstellung siehe folgende Abbildung). Diese sollte erwartungsgemäß in allen untersuchten Klonen bei effizienter Entfernung der o.g. BAC-Genom-Abschnitte per Cre-Rekombinase/loxP-Sequenz-Interaktion nicht mehr zu einem Signal führen. Der Wildtyp sollte jedoch im Unterschied zum Blot der RFP-Sonde ein Signal bei 7,4kb zeigen. Dies entspricht dem Fragment, welches die durch die Sonde nachgewiesene Region enthält. Die Auswertung der Southern Blots nach Belichtung der verwendeten Filme illustriert die folgende Abbildung und bestätigt die effiziente Deletion des gfp-Gens in allen getesteten Mutanten.

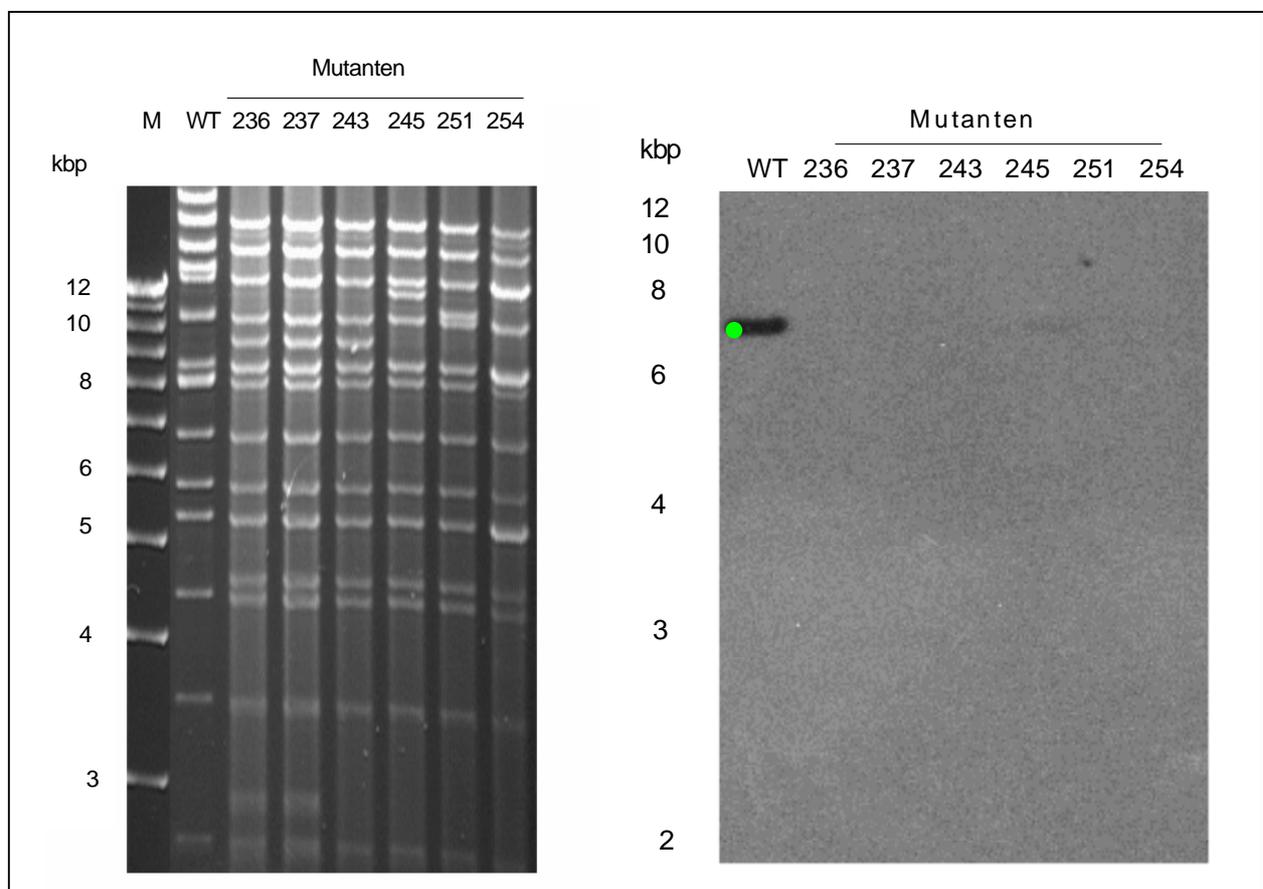


Abb. 25: Agarose-Gelelektrophorese (links) und Southern-Blot (rechts) einer Anzahl ausgewählter MHV-68-Mutanten, Herstellung der Sonde mittels Verdau aus GFP-Ursungsplasmid pEGFP-C1, im Southern Blot effizientes Herausschneiden der BAC-Kassette erkennbar (grüner Punkt bei WT), Erläuterungen siehe Text.

## C. ERGEBNISSE

### 2.4 Nach Rekonstitution von 1050 rekombinanten MHV-68-Genomen erwiesen sich 226 als replikationsfähig

Da bei der Rekonstitution der viralen Rekombinanten auf jeder Platte im Dreifachansatz zusätzlich zu den rekombinanten MHV-68-BAC-Genomen mit je einer Negativ- und einer Positivkontrolle arbeitete, konnten pro 96-well-Platte maximal 30 mutierte Virusklone rekonstituiert werden.

Dies bedeutet, dass für alle zu testenden 1050 Klone 35 solcher Ansätze unternommen wurden, die jeweils nach drei Tagen ausgewertet wurden.

Von den getesteten 1050 Klonen erwiesen sich 226 im Laufe der Rekonstitution als replikationsfähig. Das heißt, dass in deren Fall rot leuchtende Plaques gefunden wurden. Dies entspricht einem Anteil von 20,57% und wird in der folgenden Abbildung verdeutlicht.

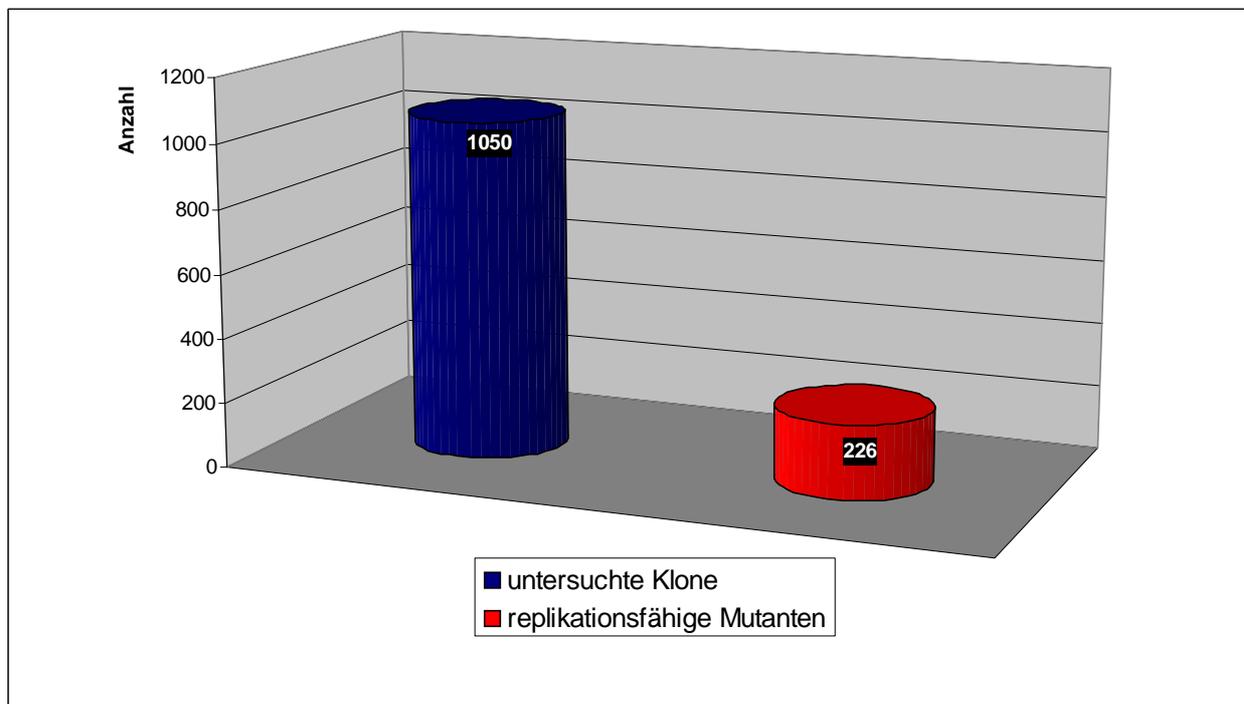


Abb. 26: grafische Darstellung des Anteils an replikationsfähigen Rekombinanten an der Gesamtzahl rekonstituierter rekombinanter Klone mit einer Tn-Insertion im viralen Genom. Aus der Gesamtzahl von 1050 untersuchten Klonen erwiesen sich 226 (20,57%) Rekombinanten als replikationsfähig, was bedeutet, dass bei diesen keine Tn-Insertion in einem für das Virus für die Replikation notwendigen Genomabschnitt vorhanden waren.

## C. ERGEBNISSE

### 3. IDENTIFIZIERUNG VON FÜNF MHV-68-MUTANTEN MIT VERÄNDERTEM ENDOTHELZELLEN-TROPISMUS

#### 3.1 Fünf der 226 MHV-68-Insertionsmutanten zeigen eine verminderte Replikationsfähigkeit in den verwendeten Endothelzelllinien

Als drittes Hauptziel der vorliegenden Arbeit wurde schon der Test sechs verschiedener Zelllinien (Fibroblasten, Endothelzellen und Makrophagen) mit replikationsfähigen viralen Rekombinanten genannt. Somit sollte versucht werden, einen Zelltropismus determinierende virale Gene zu identifizieren

Alle 226 Mutanten, welche in der dargestellten ersten Untersuchung zur Ausbildung rot leuchtender Plaques befähigt, d.h. replikationsfähig, waren, wurden in einem nachfolgenden Experiment bezüglich etwaiger Unterschiede in der Kinetik der Bildung eines CPEs und Plaques auf verschiedenen Zelllinien getestet.

Für diesen Ansatz wurden die aus dem vorhergehenden Experiment zur Verfügung stehenden Überstände der zur Virusexpansion infizierten 6-well-Zellkulturplatten verwendet. Die nun folgende Untersuchung geschah im Format einer 48-well-Zellkulturplatte. Es wurden sechs verschiedene Zelllinien getestet. Als Fibroblasten wurden die schon mehrfach im Laufe dieser Arbeit erwähnte Zellreihe NIH-3T3, als fibroblastoide Zellreihe BHK-21, als Endothelzellreihen SVEC 4-10 sowie MHEC-5T und als Makrophagen die Zelllinien IC21 und J774-A1 verwendet. Dieser Ansatz wurde im Unterschied zum vorhergehenden in einem Einfachansatz durchgeführt, auf jeder Platte wurde als Wildtyp-Kontrolle mit Viren der Mutante #328 (siehe Ergebnisse 2.4.2) infiziert.

Nach jeweils einem, zwei, sowie drei Tagen wurden die Platten der zweiten Untersuchung ausgewertet und das Aussehen der Zellen der jeweiligen im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle notiert. Hierbei wiesen 19 Klone einen Unterschied in der Geschwindigkeit der Ausbildung eines CPE im Unterschied zum verwendeten Wildtyp auf.

Diese wurden in einem dritten Experiment unter den gleichen Bedingungen nochmals getestet, um die Ergebnisse des zweiten zu bestätigen. Hierbei zeigten alle 19 Klone wiederholt einen durch Beobachtung mittels Fluoreszenzmikroskopie erkennbaren Unterschied zu Wildtyp.

Bei fünf dieser Klone war der Unterschied jedoch so offensichtlich, dass ein Defekt in einer für die Replikation auf der jeweiligen Zellreihe wichtigen Funktion angenommen wurde. Bei zwei Klonen war ein ausgeprägter Unterschied zur Wildtyp-Kontrolle im Bezug auf die Replikationsfähigkeit auf den verwendeten Endothelzellreihen SVEC 4-10 sowie MHEC-5T feststellbar. Für die verwendeten

## C. ERGEBNISSE

IC-21 und J 774-A1 wurde kein sichtbarer Effekt gefunden, sodass auf eine weitere Auswertung bezüglich der Makrophagen verzichtet wurde.

### 3.2 Transposoninsertionen in der Region um ORF 10 des MHV-68-Genoms scheinen die Replikationsfähigkeit in Endothelzellen zu beeinflussen

Von den fünf Klonen (Mutanten #26, #190, #329, #535, #727) mit einem sichtbaren Effekt auf die Fähigkeit der Viren, in Endothelzellen zu replizieren, wurden im Folgenden die viralen BACs per Midi-Präparation isoliert, um diese im Anschluss sequenzieren zu lassen.

Die Sequenzierung der o.g. fünf Klone hatte das in der folgenden Tabelle gezeigte Ergebnis:

Nummer Mutante	Tn-Insertion bei bp	Genombereich MHV-68	wahrscheinliche Funktion
# 26	22.060	ORF 9	DNA-Polymerase
#190	22.200	ORF 9	DNA-Polymerase
#329	23.230	ORF 10	unbekannt
#727	119.310	5' nach M14	unbekannt

Tab. 2: mittels Sequenzierung wurden die Lokalisationen der Tn-Insertionen der Rekombinanten #26, #190, #329 und #727 ermittelt. Interessanterweise wiesen drei der Klone (#26, #190 und #329) Tn-Insertionen in unmittelbar benachbarten Regionen des MHV-68-Genoms auf.

Da sich bei der Sequenzierung zeigte, dass Mutante #535 ein Mischklon war, wurde diese bei den weiteren Experimenten nicht mehr verwendet. Auffallend war, dass drei der gefundenen Mutanten (Mutanten #26, #190 und #329) Tn-Insertionen in derselben Genomregion von MHV-68 aufwiesen und gleiche Effekte im Sinne eines verminderten Wachstums auf Endothelzellen zeigten. Dies hatte zur Folge, dass sich die folgenden Untersuchungen auf diese Klone konzentrierten. Die benachbarte Lage der Tn-Insertionen im MHV-68-Genom zeigt das folgende Schema.

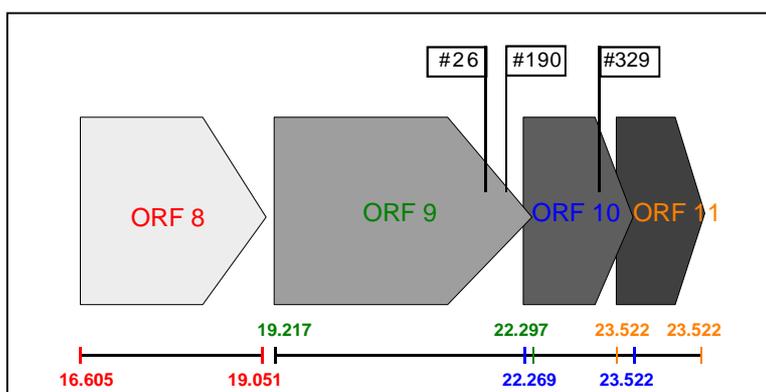


Abb. 27: Schema zur Darstellung der benachbarten Lage der Tn-Insertionen, welche durch Sequenzierung der Klone #26, #190 und #329 ermittelt wurden.

## C. ERGEBNISSE

Zusätzlich wurde aus mit den fünf Klonen infizierten Fibroblasten die virale DNA isoliert. Um zu zeigen, dass die aus den Bakterien isolierten BAC-Genome, welche zur Sequenzierung verwendet wurden identisch mit den Genomen waren, welche aus den mit den jeweiligen Klonen infizierten Fibroblasten präpariert wurden, wurden diese jeweils mittels Verdau mit der Restriktionsendonuklease EcoRI gespalten und per Agarose-Gelelektrophorese untersucht. Die zu erwartenden Veränderungen des Restriktionsmusters der Mutanten #26, #190 und #329 im Vergleich zu WT-MHV-68-BAC zeigt die folgende Tabelle.

Mutante #	Tn-Insertion bei bp	verschwindende Bande in bp	zusätzliche Bande Nr.1 in bp	zusätzliche Bande Nr.2 in bp
26	22.060	11.370	7.791	3.579
190	22.200	11.370	7.931	3.439
329	23.230	11.370	8.961	2.409

Tab. 3: zu erwartende Veränderung des Restriktionsmusters nach Verdau der rekombinanten Genome der Klone #26, #190 und #329 mit der Restriktionsendonuklease EcoRI

Auf der folgenden Seite ist die Gelelektrophorese des Verdau der Klone #26, #190 und #329 mit der Restriktionsendonuklease EcoRI dargestellt.

Als Wildtyp wurde MHV-68-BAC verdaut, welcher aus einem älteren Vorrat stammte und nicht den Shift der eigentlich bei 5.196 bp liegenden Bande zu ~4.300 bp zeigt. Dieser Shift ist bei allen verdauten Klonen bis auf die der zwei Wildtyp-Kontrollen mit einem S (orange markiert) gekennzeichnet.

Mit einem I (türkis markiert) ist jeweils die Bande gekennzeichnet, welche aus der Spaltung des zusammen mit den MHV-68-BAC-Plasmiden aus den Bakterien isolierten Invasionsplasmids pGB2 $\Omega$  *inv-hly* resultiert.

Mit einem roten Punkt sind jene Banden markiert, die aufgrund der Tn-Insertion beim Wildtyp zwar vorhanden sind, bei den Mutanten jedoch jeweils aufgrund der zusätzlichen EcoRI-Schnittstelle innerhalb des MCS der Insertionssequenz verschwunden sind. Bei den Mutanten tauchen hierfür jedoch, wie erwartet und in der oben gezeigten Tabelle dargestellt, jeweils zwei zusätzliche Banden auf (mit grünen Punkten markiert), welche beim Wildtyp nicht vorhanden sind (analog zu Ergebnisse 1.)

## C. ERGEBNISSE

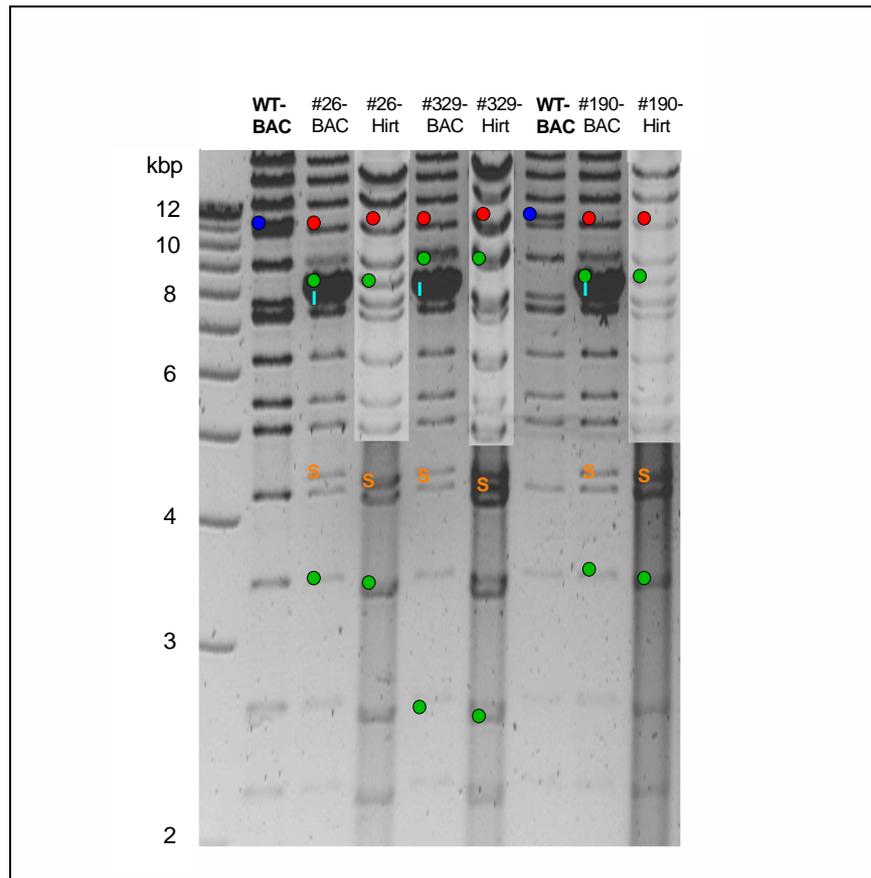


Abb. 28: Agarose-Gelelektrophorese des Verdaus der Klone #26, #190 und #329 mit der Restriktionsendonuklease EcoRI. Erläuterungen siehe Text

### 3.3 Der beobachtete Effekt auf die Replikationsfähigkeit in Endothelzellen lässt sich mit Wachstumskurven bestätigen

Im Folgenden wurden von den drei Mutanten #26, #190 und #329 Virusstocks hergestellt. Diese wurden dazu verwendet, Wachstumskurven zu erstellen, wobei unter kontrollierten Bedingungen gleiche Ausgangsmengen an infektiösen Partikeln eingesetzt wurden.

Getestet wurden wiederum die Fibroblasten-Zellreihe NIH-3T3, die fibroblastoide Zellreihe BHK-21 sowie die beiden Endothelzelllinien SVEC 4-10 sowie MHEC-5T. Als Wildtyp-Kontrolle wurde Mutante #328 verwendet, die wie schon dargestellt Wildtypeigenschaften aufwies, jedoch aufgrund der Tn-Insertion in der terminalen Wiederholungssequenz und der damit verbundenen Ausbildung roter Plaques in der Fluoreszenzmikroskopie gut auszuwerten war.

Am Tag 0 wurde mit einer  $moi=0,1$  infiziert, der Überstand an den Tagen 0, 2, 4 und 6 abgenommen und anschließend die Menge der darin enthaltenen infektiösen Einheiten mittels Titration bestimmt. Diese Titrationen wurden in drei getrennten Versuchen jeweils im Dreifachansatz bestimmt, sodass es hier möglich war, den Mittelwert der einzelnen Virustiter mit der

## C. ERGEBNISSE

dazugehörigen Standardabweichung zu errechnen. Zur Sicherheit wurden die Titer der Überstände ebenfalls an Tag 0 gemessen, obwohl für dieses Experiment Virusstocks mit einer definierten, d.h. zuvor bestimmten Anzahl an infektiösen Einheiten eingesetzt wurde. Der Überstand wurde an Tag 0 nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C im CO<sub>2</sub>-Inkubator abgenommen und bis zur Messung der PFU/ml wie der Überstand aller anderen Tage bei -80°C aufbewahrt.

Die Ergebnisse der Wachstumskurven fassen die folgenden vier Diagramme zusammen, dargestellt sind die Titer der Tage 0 und 4, an denen jeweils Überstand abgenommen wurde.

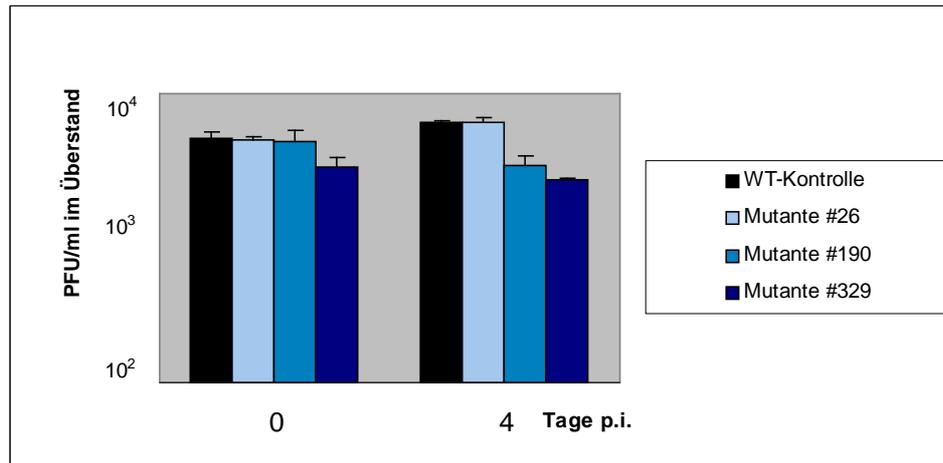


Abb. 29: Wachstumskurve für die Fibroblasten-Zelllinie NIH-3T3, dargestellt sind die Titer der an den Tagen 0 und 4 gewonnenen Überstände in PFU/ml Überstand für die Wildtyp-Kontrolle (Mutante #328, schwarz), sowie die Mutanten #26 (hellblau), #190 (mittelblau) und #329 (dunkelblau).

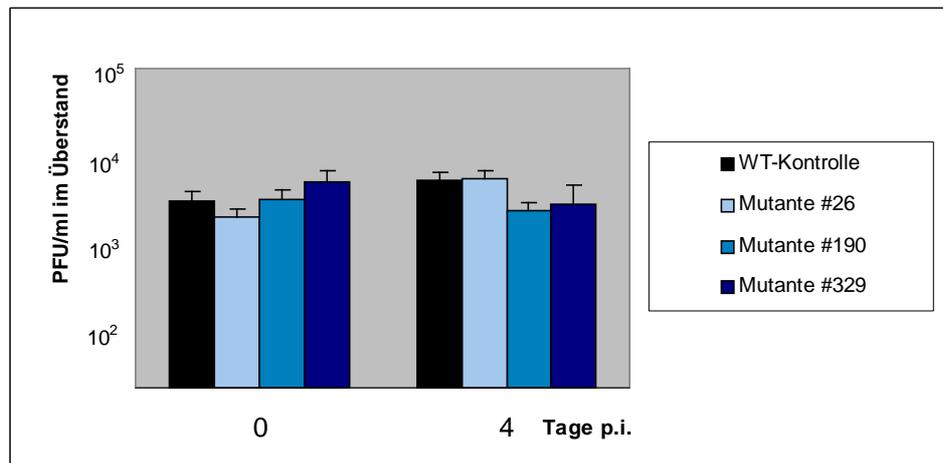


Abb. 30: Wachstumskurve für die Zelllinie der fibroblastoiden BHK-21, dargestellt sind die Titer der an den Tagen 0 und 4 gewonnenen Überstände in PFU/ml Überstand für die Wildtyp-Kontrolle (Mutante #328, schwarz), sowie die Mutanten #26 (hellblau), #190 (mittelblau) und #329 (dunkelblau).

## C. ERGEBNISSE

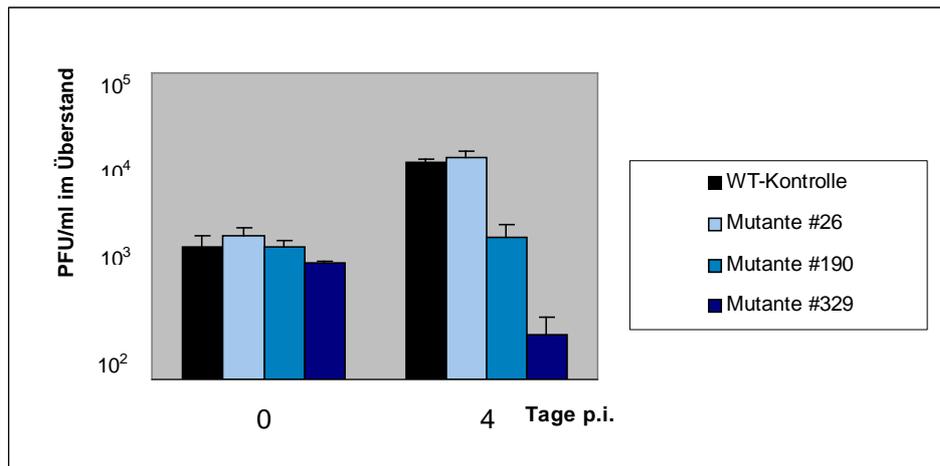


Abb. 31: Wachstumskurve für die Endothelzelllinie SVEC 4-10, dargestellt sind die Titer der an den Tagen 0 und 4 gewonnenen Überstände in PFU/ml Überstand für die Wildtyp-Kontrolle (Mutante #328, schwarz), sowie die Mutanten #26 (hellblau), #190 (mittelblau) und #329 (dunkelblau).

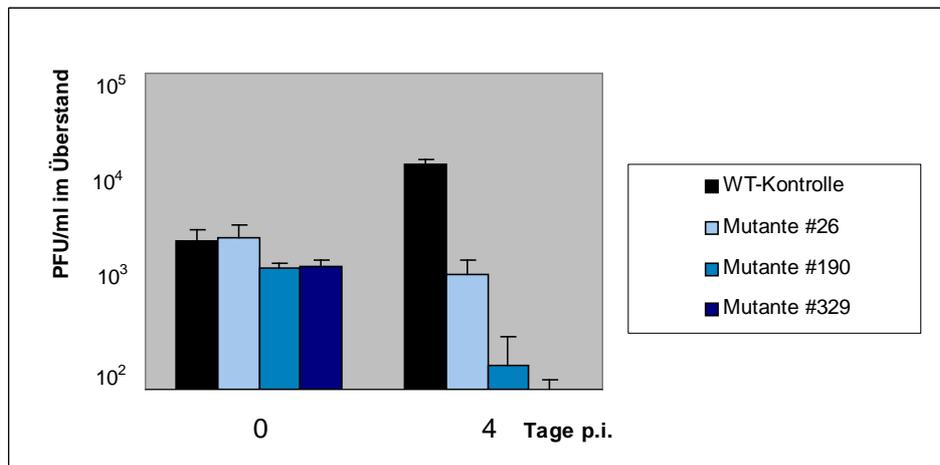


Abb. 32: Wachstumskurve für die zweite Endothelzelllinie MHEC-5T, dargestellt sind die Titer der an den Tagen 0 und 4 gewonnenen Überstände in PFU/ml Überstand für die Wildtyp-Kontrolle (Mutante #328, schwarz), sowie die Mutanten #26 (hellblau), #190 (mittelblau) und #329 (dunkelblau).

Aus den Abbildungen wird ersichtlich, dass sowohl für die Fibroblasten-Zellreihe NIH-3T3 sowie die fibroblastoide Zelllinie BHK-21 kein signifikanter Unterschied zwischen der Kinetik der Produktion infektiöser Einheiten im Zellüberstand durch die verwendete Wildtyp-Kontrolle oder die drei getesteten Mutanten #26, #190 und #329 besteht.

Bei der Endothelzelllinie SVEC 4-10 ist jedoch auffällig, dass für die Mutante #190 eine Reduktion um fast eine log-Stufe gegenüber der Wildtyp-Kontrolle als auch der Mutante #26 besteht, für Mutante #329 sogar annähernd zwei log-Stufen.

Bei der anderen verwendeten Endothelzelllinie MHEC-5T ist die Reduktion noch stärker, hier ist das Wachstum der Mutante #26 um fast eine log-Stufe gegenüber der Wildtyp-Kontrolle reduziert, das der Mutante #190 um fast zwei log-Stufen, wohingegen bei Mutante #329 eine Reduktion annähernd über drei log-Stufen auftrat.

## C. ERGEBNISSE

### 3.4 ORF 10 weist interessante Motive innerhalb seiner Aminosäuresequenz auf

Als interessante Motive weist das hypothetische Genprodukt von ORF 10 des MHV-68 ein RGD-Motiv, ein Leuzin-Zipper-Motiv und andere Motive auf, welche Hinweise auf eine Lokalisation des Genproduktes oder der Art seiner Beteiligung an der Abfolge der Virusinfektion einer eukaryotischen Zelle und der anschließenden Replikation mit Produktion neuer Viren. Für genauere Ausführungen hierzu wird auf den entsprechenden Abschnitt der Diskussion verwiesen, im Folgenden soll lediglich ein Schema gezeigt werden, in welchem die o.g. Motive in der Aminosäuresequenz des Genproduktes dargestellt sind.

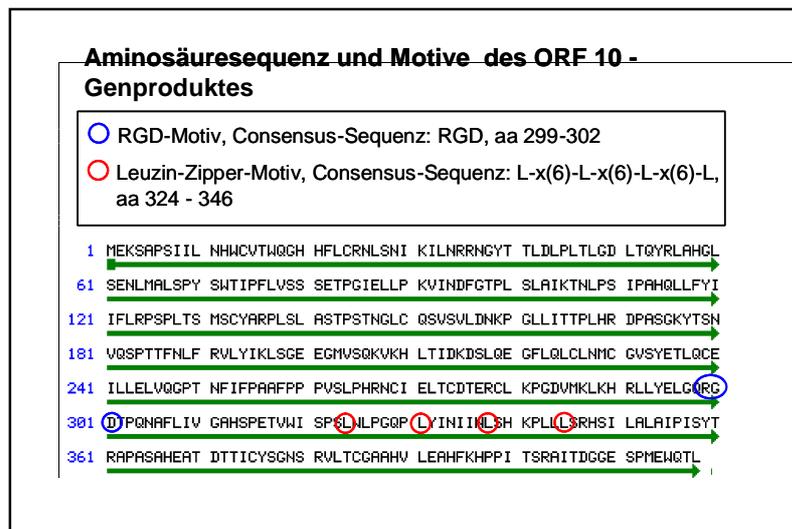


Abb. 33: In der Aminosäuresequenz des Genproduktes von ORF 10, dem hypothetischen 46 kD-Protein, finden sich interessanterweise zwei Motive: zum einen das RGD-Motiv an der Aminosäureposition (aa) 299-302 (blau markiert) und ein Leuzin-Zipper-Motiv an der Position aa 324-346 (rot markiert). Das RGD-Motiv könnte eine Funktion im Sinne einer extrazellulären Bindung bedeuten, das Leuzin-Zipper-Motiv weist auf eine mögliche Beteiligung an genregulatorischen Vorgängen hin.

### D. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde das murine Herpesvirus 68 (MHV-68) erstmals mittels Transposonmutagenese untersucht. Hierzu konnte auf das von Adler et al. 2000 <sup>(2)</sup> als künstliches bakterielles Chromosom (bacterial artificial chromosome, BAC) klonierte virale Genom zurückgegriffen werden.

#### 1. ETABLIERUNG DER TRANSPOSONMUTAGENESE DES GENOMS VON MHV-68 UND REKONSTITUTION REKOMBINANTER VIREN MITTELS INVASIVER BAKTERIEN

##### 1.1 Mutagenese des Genoms von MHV-68 mittels des Tn-Donor-Konstruktes pTsTnMax8B-RFP

Transposons sind mobile genetische Elemente, deren Nukleotidsequenzen fähig sind, sich selbst und manchmal mit ihnen verbundene Basenabfolgen in andere Genome zu transferieren und dort zu inserieren. Sie werden sowohl bei Pro- als auch Eukaryonten gefunden und bedeuten phänotypisch betrachtet oft weder Vor- noch Nachteil. Dies hat ihnen auch die Bezeichnung der „selfish DNA“ eingebracht, da sie nur mit ihrer eigenen Vermehrung beschäftigt scheinen. Ein Merkmal, welches Transposons von z.B. Plasmiden oder Phagen unterscheidet, ist, dass ihre Sequenzen niemals eine vom Genom unabhängige physikalische Form annehmen, sondern sich direkt von einem zum nächsten Genom bewegen.

Der Vorgang ist unabhängig von Beziehungen der Donor- zur Rezipientenstelle und stellt wahrscheinlich eine der wichtigsten Ursachen für Mutationen in verschiedensten Genomen dar. Man teilt Transposons in zwei große Gruppen ein. Eine arbeitet ähnlich wie Retroviren, indem sie DNA-Kopien ihrer RNA-Transkripte herstellen, welche dann an der Zielregion inserieren, die andere kodiert für Proteine, welche auf direkte Weise mit der DNA interagieren und so den Vorgang der Transposition steuern. Auf eine Gruppe der zuletzt genannten wird im Folgenden näher eingegangen.

## D. DISKUSSION

### 1.1.1 Das Transposon-Donor-Konstrukt pTsTnMax8B-RFP leitet sich von Tn1721, einem Abkömmling der TnA/Tn3-Familie der Transposons, ab

Ein bakterielles Transposon, wie es zur Mutagenese in der vorliegenden Arbeit benutzt wurde, beinhaltet Gene, welche für Enzyme kodieren, die zur Transposition notwendig sind. In manchen Fällen werden zusätzlich noch zelluläre Systeme zur Unterstützung herangezogen. Für die nicht-replikative sowie die konservative Form der Transposition wird auf die einschlägige Literatur verwiesen. Das in dieser Arbeit verwendete Transposon leitet sich von der TnA-Familie ab, einer Gruppe größerer Transposons (~5kbp). Innerhalb der TnA-Familie gehört es zur Untergruppe der Transposons vom Typ Tn3.

Diese verwenden ausschließlich einen replikativen Modus der Transposition. Hierbei wird das transposable Element während des Vorgangs dupliziert und stellt somit eine Kopie des originalen Elementes dar. Dieser Vorgang benötigt eine Transposase- und eine Resolvase-Aktivität, deren Gene *tnpA* und *tnpR* innerhalb des Transposons lokalisiert sind, welches von invertierten terminalen Wiederholungssequenzen (inverted terminal repeats, IR) mit einer Länge von ca. 38bp flankiert wird. Die terminalen Wiederholungssequenzen bedingen, wie für Tn3 gezeigt, das Phänomen der „Transposon-Immunität“, welches zur Folge hat, dass die Frequenz der Transposition in ein Plasmid reduziert ist, wenn der Rezipient bereits eine Transposon-Kopie besitzt <sup>(83)</sup>.

Die *tnpA* und *tnpR* beinhaltende Region wird als Transposon-Kontrolleinheit (transposon control unit, TCU) bezeichnet. Die Transposase wird hierbei zur Interaktion mit der IR-Sequenz der Donorsequenz benötigt. Sie stabilisiert mit Hilfe zellulärer Replikationsmechanismen wie z.B. des DNA-bindenden Proteins IHF in E.coli das Crossing-over des aus Donor- und Rezipientenstelle resultierenden Kointegrats. Die Resolvase dient als Repressor der Genaktivität von sowohl *tnpA* als auch *tnpR* und steuert den „resolution“ genannten Vorgang der Lösung dieses Kointegrats. Dies benötigt als markante Eigenschaft der TnA/Tn3-Transposons eine spezifische Sequenz innerhalb des Transposons, die resolution site (*res*). An diese bindet die Resolvase und steuert ohne Energieverbrauch die Rekombinationsvorgänge zur Lösung des Kointegrats. Nach Resolution resultieren zwei unabhängige Replikons mit den duplizierten Kopien der transposablen Elemente sowohl an Donor- wie auch an Rezipientenstelle <sup>(13)</sup>.

Zu Beginn der Anwendung der Transposonmutagenese gab es aus Mutagenese mittels homologer Rekombination sowie zufällig verteilter Insertionen auf der Basis des mini-Mu-Phagen von Zielsequenzen entwickelte Methoden <sup>(73)</sup>.

Schließlich entwickelten Haas et al. ursprünglich zur Shuttle-Mutagenese <sup>(21, 138)</sup> eine Serie Mini-Transposons (Mini-Tn), welche den replikativen Modus der Transposition nutzen und auf Tn1721

## D. DISKUSSION

basierten, das sich wiederum auf Tn21, einer Untergruppe innerhalb des o.g. Typs Tn3 in der Familie der TnA-Transposons zurückverfolgen lässt (<sup>35, 57, 58, 76, 115, 137, 138, 189</sup>).

Diese sollten als mobile genetische Elemente eine möglichst kurze Sequenz umfassen, eine hohe Transpositionsfrequenz in *E.coli* besitzen (ca.  $10^{-2}$  Ereignisse / Kopie des Zielplasmids) und präferenziell in einer zufälligen Weise in kleine episomale Plasmide mit einer „supercoiled“-Konfiguration anstatt in das bakterielle Genom inserieren. Die genannten Bedingungen wurden durch den Aufbau dieser Mini-Tns erfüllt, wobei im Unterschied zum ursprünglichen Tn3-Transposon die IR-Sequenzen mit einer Länge von 38 bp im Falle des Tn-Konstruktes TnMax8 lediglich die resolution site, einen suicide replication origin  $ori_{sd}$  (<sup>52</sup>) und ein auf aphA-3 basierendes Kanamycin-Resistenzgen ( $kan^R$ ) flankierten.

Bindungsstellen für M13-Primer (M13 forward primer, M13FP sowie M13 reverse primer, M13RP) ermöglichen eine schnelle Lokalisation der Tn-Insertion mittels Sequenzierung (<sup>76, 168</sup>). Die TCU ist außerhalb des eigentlichen Transposons lokalisiert und beinhaltet das *tnpA*- sowie *tnpR*-Gen unter der Kontrolle eines induzierbaren  $P_{ter}$ -Promoters, welcher aufgrund seiner kontrollierbaren Induktion in Abwesenheit des Zielplasmids Transpositionsereignisse in *E.coli* minimieren sollte (<sup>58</sup>).

Aufgrund der Tatsache, dass die von Haas et al. beschriebene Form der Transposonmutagenese eine Isolierung des rekombinanten BACs mit nachfolgender Transformation in *E.coli* zur Elimination des Tn-Donor-Plasmids erfordern würde, erwies diese sich zum Zweck der BAC-Mutagenese als ineffizient. Aus diesem Grunde wurde durch Brune et al. 1999 ein neuer temperatursensitiver Replikationsursprung (origin of replication,  $ori_s$ ) in das Tn-Donor-Plasmid eingeführt, welcher eine effiziente Selektion gegen das Tn-Donor-Plasmid ermöglicht (<sup>24</sup>). Die im Folgenden durchgeführte Mutagenese des MCMV mittels des neuen Tn-Konstruktes pTsTnMax8 wurde analog der in Material und Methoden 2.6 beschriebenen Methode durchgeführt.

Der Mutagenese folgende Untersuchungen zeigten, dass das neuartige Transposon-Konstrukt einzelne Tn-Insertionen in das aufgrund des Gebrauchs  $Rec^A$ -defizienter *E.coli* stabile MCMV-BAC in einer zufälligen Weise mit einer Effizienz von über 90% ermöglichte. Dies wiederum erlaubte nach Transfektion der rekombinanten BACs in Fibroblasten die schnelle Identifizierung essentieller sowie nicht-essentieller Gene des MCMV sowie deren Lokalisation mittels Sequenzierung. Die Mutagenese essentieller Gene führte zu sog. Null-Mutanten, welche nicht lebensfähig waren (<sup>24</sup>).

Im Falle des als BAC klonierten HCMV-Laborstamms AD169 (<sup>18</sup>) wurde gezeigt, dass es der Gebrauch eines Sets dreier Primer, des erwähnten M13FPs sowie M13RPs und zusätzlich eines Primers, welcher spezifisch für die gewünschte Genomposition ist, ermöglicht, die Lokalisation einer Tn-Insertion für ein gewünschtes Gen mit Hilfe einer PCR in drei Runden nachzuweisen (<sup>65</sup>).

## D. DISKUSSION

Diese Neuerungen bedeuten zusammen mit der Möglichkeit, virale Genome als BACs zu klonieren, einen großen Fortschritt in der Virologie, da nun eine schnelle, einfache und effiziente Möglichkeit gegeben war, herpesvirale und auch andere virale Genome zu untersuchen. Durch die Übertragung invasiver Eigenschaften auf *E.coli*, welche die rekombinanten viralen Genome tragen, wurde im Folgenden sogar der arbeitsaufwendige Schritt der BAC-DNA-Isolierung und der nachfolgend notwendigen Transfektion in permissive Zellen zur Rekonstitution viraler Rekombinanten umgangen <sup>(24, 25, 26, 147)</sup>.

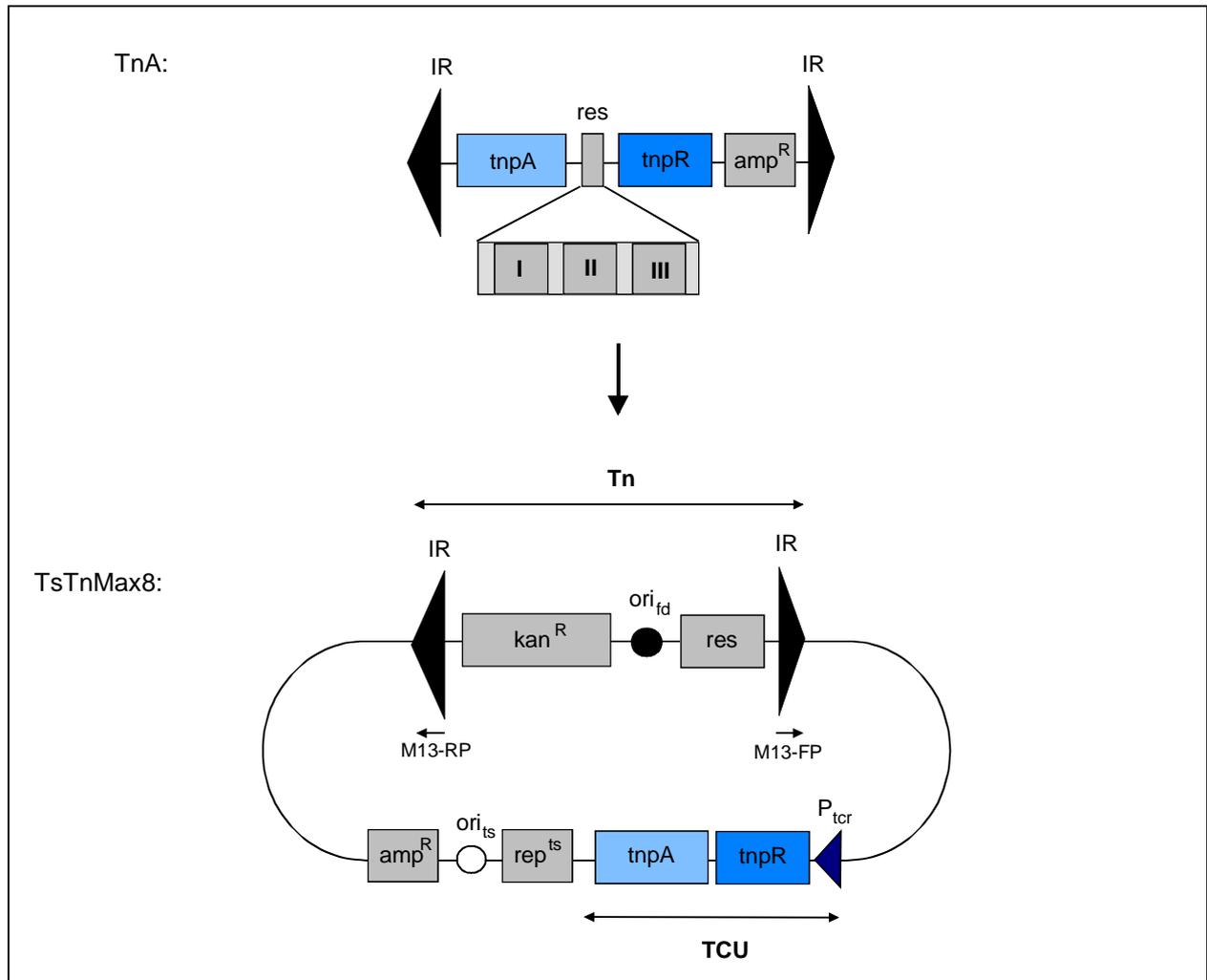


Abb. 34: Die Abbildung zeigt die Entwicklung des zur Konstruktion des in dieser Arbeit verwendeten Transposons ursprünglichen Tn-Donor-Plasmids pTsTnMax8 aus dem zu Grunde liegenden TnA.

Die TCU ist nun außerhalb des eigentlichen Transposons lokalisiert, die IR-Sequenzen werden durch M13-Primer-Bindungsstellen flankiert, welche die Lokalisation der Tn-Insertion mittels Sequenzierung ermöglichen. Zur effektiveren Selektion gegen das Tn-Donor-Plasmid wurde ein temperatursensitiver Replikationsursprung (ori<sub>ts</sub>) mit einer permissiven Temperatur bei 30°C eingefügt. Zur Positivselektion des Tn-Donor-Plasmids dient das Ampicillin-Resistenzgen (amp<sup>R</sup>) außerhalb des eigentlichen Transposons, zur Selektion für das Transposon selbst wurde ein Kanamycin-Resistenzgen (kan<sup>R</sup>) in die Tn-Sequenzen eingeführt. Weitere Erläuterungen siehe im Text.

## D. DISKUSSION

### 1.1.2 Eine zur Attenuierung des Virus führende Genomüberlänge aufgrund der BAC-Sequenzen und des gfp- und gpt-Gens muss vermieden werden

Das als BAC klonierte Genom von MHV-68 enthält das Gen für das grün fluoreszierende Protein (green fluorescent protein, GFP). Das gfp-Gen und die BAC-Sequenzen sind von loxP-Sequenzen eingerahmt. Diese werden durch die Rekombinase Cre erkannt und bieten durch Herausschneiden der BAC-Sequenzen sowie des gpt- und gfp-Gens die Möglichkeit, den Anteil genomfremder Sequenzen gering zu halten. Dies ist notwendig, da sich das Virus sonst aufgrund der Überlänge des Genoms schlechter vermehrt. Diese Attenuierung wird auf das Problem, zusätzliche Sequenzen in das räumlich begrenzte Capsid zu verpacken, zurückgeführt<sup>(3)</sup>. In diesem Zusammenhang muss ebenfalls beachtet werden, dass auch eine Tn-Insertion eine Genom-Überlänge, wenn auch wesentlich kleiner, verursacht.

Dieses Problem stellte sich bereits bei in-vivo-Versuchen mit MCMV, wenn es aus MCMV-BACs rekonstituiert wurde. Es wurde durch Einführung der inserierten Sequenzen flankierender homologer viraler Sequenzen letztendlich gelöst. Nach Transfektion in eukaryontische Zellen kam es aufgrund homologer Rekombinationsvorgänge zu einer Akkumulation viraler Genome ohne inserierte Sequenzen<sup>(185)</sup>. Aufgrund der Einführung der loxP-Sequenzen war im Falle des MHV-68 die Attenuierung dann aufgehoben, wenn die Virionen in Fibroblasten rekonstituiert wurden, welche die Rekombinase Cre stabil exprimierten und somit die o.g. zusätzlichen Sequenzen aus dem viralen Genom entfernt wurden<sup>(3)</sup>.

Smith et al. lösten diese Problematik ebenfalls auf sehr elegante Weise, indem sie das Pseudorabiesvirus sowie den HCMV-Laborstamm AD169 als BACs klonierten, wobei die inserierten Sequenzen ebenfalls durch loxP-Sequenzen flankiert wurden. Innerhalb der BAC-Sequenzen befand sich jedoch auch das Gen, welches für die Rekombinase Cre kodiert. Dessen Aktivität ist im Bakterium durch ein synthetisches Intron vermindert, nach Transfektion in eukaryontische Zellen jedoch wird letzteres „herausgespleißt“ und die inserierten Sequenzen werden entfernt<sup>(147, 202)</sup>.

### 1.1.3 Einführung von RFP in die transposable Einheit, um virale Rekombinanten von Wildtypviren unterscheiden zu können

Da die der Mutagenese zugrunde liegende Methodik mittels eines Transposon-Konstruktes von der Arbeitsgruppe etabliert und in neueren Arbeiten bereits publiziert war<sup>(25, 26)</sup>, bestand die Hauptaufgabe zunächst darin, diese den Anforderungen der Mutagenese des MHV-68-Genoms anzupassen.

## D. DISKUSSION

Hierzu galt es, das Transposon-Konstrukt so zu verändern, dass eine Identifizierung lebensfähiger Rekombinanten nach deren Rekonstitution in permissiven Zellen möglich war. Unsere Wahl fiel aufgrund des deutlich unterschiedlichen Emissionsmaximums (583 nm bei RFP verglichen mit 508 nm bei EGFP) auf das rot fluoreszierende Protein (red fluorescent protein, RFP, unter Kontrolle des CMV<sub>IE</sub>-Promoters), welches mit dem aus der Quallenspezies *Aequorea victoria* isolierten GFP eng verwandt ist. Das für die Fluoreszenz verantwortliche Protein DsRed wurde 1999 aus der den Seeanemonen verwandten korallimorphen *Discosoma*-Spezies isoliert, welche das Protein in den die Mundplatte begrenzenden Zellen exprimieren und so deren rötlichen Schimmer erzeugen <sup>(99)</sup>.

Während der Auswertung der Rekonstitution viraler Rekombinanten nach Transposonmutagenese war auffällig, dass der Beginn der Fluoreszenz trotz der Verwendung des CMV<sub>IE</sub>-Promoters zeitversetzt mit dem Entstehen eines CPEs bei den hierzu verwendeten Zellen Cre<sup>+</sup>-REF eintrat. Ebenso war ein grünlicher Schimmer bei Beginn der rötlichen Fluoreszenz zu erkennen. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass DsRed abgesehen von den Vorteilen einer starken Fluoreszenz und einer hohen Widerstandskraft gegen extreme pH-Werte und Ausbleichen auch Nachteile besitzt. Diese sind eine langsame Reifung des Proteins mit Zwischenstufen eines GFP-ähnlichen Monomers sowie eine starke Tendenz zur Oligomerisation zum Tetramer in Form eines  $\beta$ -Fasses mit der resultierenden Gefahr einer GFP-ähnlichen Fluoreszenz bei Mischformen unreifer Zwischenstufen mit reifen Formen des DsRed-Proteins <sup>(9, 201, 32, 51, 125)</sup>.

Für GFP wird kontrovers diskutiert, ob das Vorhandensein des Proteins in der Zelle dieser schaden könnte. Es gibt in der Literatur Berichte über Apoptoseinduktion und generelle Toxizität aufgrund der Entstehung freier Radikale, ähnliches konnte für RFP aber noch nicht gezeigt werden <sup>(87)</sup>. Die erwähnte Problematik führte zur Entwicklung neuerer DsRed-Varianten <sup>(14, 181)</sup>.

### 1.1.4 Das Transposon-Donor-Konstrukt pTsTnMax8B-RFP zeigt eine geringere Effizienz der Tn-Insertion als erwartet

Bezüglich der Effizienz der Mutagenese mit Hilfe des hier verwendeten Tn-Konstruktes ist, wie in Ergebnisse 1.1 schon dargestellt, diejenige der Insertion des RFP-Tn-Konstruktes mit lediglich 50% Insertion in das BAC und 50% Insertion in das bakterielle Chromosom geringer ist als jene des ursprünglichen Tn-Konstruktes mit 75% Insertion des Transposons in das BAC und 25% Insertion in das bakterielle Chromosom. Eine Ursache hierfür könnte in der veränderten Sekundärstruktur des Tn-Konstruktes liegen mit Folgen für die Präferenz der Insertion in superspiralisierte Plasmide vs. bakterielles Chromosom.

## D. DISKUSSION

Aber auch die kleinere Präferenz des ursprünglichen Tn-Konstruktes pTsTnMax8B weist auf Unterschiede diesbezüglich im Vergleich zur Mutagenese anderer herpesviraler BACs hin. Tn-Insertionen in das als BAC klonierte Genom von MCMV mit dem nahe verwandten Tn-Konstrukt pTsTnMax8 finden mit einer Effizienz von bis zu 90% statt <sup>(24)</sup>. Unwesentlich größer ist dieser Wert im Falle des als BAC klonierten Genoms von HCMV, wo Tn-Insertionen in das BAC in mehr als 90% der Fälle und in weniger als 10% der Fälle in das bakterielle Genom stattfanden, wo ebenfalls das Tn-Konstrukt pTsTnMax8 verwendet wurde <sup>(65)</sup>.

Dass die Effizienz der in dieser Arbeit vorgestellten gesamten Methodik mit den von der Arbeitsgruppe schon veröffentlichten Ergebnissen dennoch vergleichbar ist, zeigt die Tatsache, dass Brune et al. bei der Transposonmutagenese des als BAC klonierten MCMV-Genoms mittels invasiver Bakterien von 576 Klonen 199 rekonstituieren konnten. Dies entspricht in Anbetracht der Tatsache der Insertion zu ca. 90% in das BAC einer Gesamteffizienz von ca. 38,4%, wobei sich der Wert der Gesamteffizienz aus der Anzahl rekonstituierter viraler Rekombinanten aus der Menge der rekombinanten viralen BACs mit einer Tn-Insertion im BAC ergibt <sup>(26)</sup>. Bei der in der vorliegenden Arbeit dargestellten Mutagenese von MHV-68 und einer 50%-igen Insertion in das MHV-68-BAC entspricht die Rekonstitution von 226 lebensfähigen Rekombinanten aus 1050 Klonen einer Gesamteffizienz von ca. 43%.

Da sich die Effizienz der in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Tn-Mutagenesen herpesviraler Genome nicht mit den in einer Vielzahl durchgeführten Mutagenesen bakterieller Genome mittels unterschiedlicher Tn-Konstrukte (häufig Tn3- oder Tn5-basiert) vergleichen lässt, kommt lediglich eine weitere Betrachtung anderer transposonbasierter Mutagenesen viraler Genome außerhalb der Familie der Beta- und Gammaherpesvirusfamilie oder auch nicht herpesviraler Genome in Betracht. Aus der Arbeit von Weber et al., welcher als einer der Ersten eine Tn5-basierte Tn-Mutagenese eines herpesviralen Genoms, in diesem Fall subklonierter Fragmente von HSV 1, beschreibt, lässt sich aufgrund der Methodik keine für einen Vergleich nutzbare Effizienz ableiten. Ähnlich verhält es sich mit Arbeiten, in welchen subklonierte Genomfragmente für die Mutagenesen benutzt wurden <sup>(1, 73, 84, 107, 120, 128, 189, 199, 204, 205)</sup>.

Smith et al. geben in ihrer Veröffentlichung einer Tn5-basierten Tn-Mutagenese, die der durch unsere Arbeitsgruppe verwendeten Mutagenesemethode sehr ähnlich ist, bezüglich der Mutagenese des als BAC klonierten Genoms des Pseudorabiesvirus (PRV), eines Alphaherpesvirus, keine genauen Daten über die Präferenz und Effizienz der Insertion. Ihre Methodik, alle PRV-BACs nach der Tn-Mutagenese, d.h. rekombinante mit einer Tn-Insertion im BAC und solche ohne Tn-Insertion, zu isolieren, in DH10B zu retransformieren und dabei nochmals für eine Tn-Insertion im BAC zu selektieren, lässt jedoch darauf schließen, dass der Anteil Tn-Insertionen in das bakterielle Genom erheblich war <sup>(146)</sup>.

## D. DISKUSSION

### 1.2 Effizienz der Mutagenese und nachfolgenden Rekonstitution der rekombinanten Genome

Genstransfer von Bakterien in andere Bakterien oder in Hefe- und Pflanzenzellen ist ein natürlicher Prozeß. Die Nutzung der abortiven Invasion nicht-pathogener Bakterien in eukaryontische Zellen unter Nutzung des Invasin-Gens von *Y. pseudotuberculosis*, sowie des Gens für Listeriolysin O von *L. monocytogenes* wurde erstmals von Grillot-Courvalin et al. 1999<sup>(56)</sup> beschrieben.

Der im Abschnitt 1.1.4 der Diskussion dargestellte Sachverhalt der geringen Effizienz der Tn-Insertion in das virale BAC bestimmt zusammen mit der Rekonstitution viraler Rekombinanten mit Hilfe des Invasionsplasmides pGB2 $\Omega$  *inv-hly*, welche selbst eine Effizienz von ~59,4% besitzt, den limitierenden Faktor des vorgestellten Verfahrens.

Deshalb muss eine hinreichend große Anzahl mutierter viraler Genome rekonstituiert werden. Dann ergibt sich eine ausreichende Anzahl lebensfähiger Mutanten für Untersuchungen bezüglich eines Phänotypen, der sich in einem veränderten Wachstumsverhalten der Rekombinanten auf verschiedenen Zelllinien manifestiert.

Obwohl Grillot-Courvalin et al. als bezüglich der Invasin-Produktion optimale Temperatur 30°C vorschlagen, wurden die nach Einführung des Invasionsplasmides in dieser Arbeit verwendeten invasiven DH10B-Klone bei 37°C über Nacht inkubiert. Diese Temperatur zeigte sich aufgrund der gesteigerten Vermehrung der Bakterien und somit eines für die Effizienz wichtigen Verhältnisses Bakterienzahl/Zelle gegenüber der Temperatur von 30°C mit einer besseren Invasin-Produktion aufgrund einer größeren Anzahl rekonstituierter Viren überlegen (Material und Methoden 2.6.3).

Bei Grillot-Courvalin et al. zeigte sich der erfolgte Transfer des verwendeten Plasmids (pEGFP-C1) in den verwendeten Zelllinien COS-1, HeLa und CHO als grüne Fluoreszenz in maximal 20% der jeweiligen Zellen, was jedoch nicht mit der Anzahl internalisierter Bakterien korrelierte und somit auf das aufgrund der limitierten Effizienz der Methodik notwendig hohe Verhältnis Bakterienzahl / Zellzahl hinweist<sup>(55, 56)</sup>.

## D. DISKUSSION

### 2. VOR- UND NACHTEILE DER VERWENDETEN METHODE DER PHÄNOTYPISCHEN CHARAKTERISIERUNG LEBENSFÄHIGER KLONE

#### 2.1 Nachteile

Nach Rekonstitution aller 226 lebensfähigen viralen Rekombinanten und Herstellung grober Virusstocks (siehe Material und Methoden 2.6.3) wurden diese auf Fibroblasten, Endothelzellen und Makrophagen getestet. Hierbei stellte sich heraus, dass Tn-Insertionen in die Nähe des ORFs 10 oder in ORF 10 eine veränderte Wachstumsgeschwindigkeit der Mutanten auf Endothelzellen im Unterschied zur nicht beeinträchtigten Replikation auf Fibroblasten zur Folge hatte (siehe Ergebnisse 3).

Eine ähnliche phänotypische Untersuchung wurde von Brune et al. 2001 beschrieben, wobei in der vorliegenden Arbeit keine Endpunkt-Titer bestimmt wurden (<sup>26</sup>), sondern das Wachstum der Rekombinanten im Vergleich mit der „Wildtyp-Kontrolle“ lediglich durch die Kinetik der Plaquebildung mittels Fluoreszenzmikroskopie beobachtet wurde.

Diese Methodik birgt allerdings das Risiko, Unterschiede bezüglich der Replikationsgeschwindigkeit von Mutanten im Vergleich zu einem Wildtyp zu übersehen, da nicht gewährleistet ist, dass gleiche Titer der jeweiligen Klone eingesetzt werden, und auch mittels der Mikroskopie nur grobe Unterschiede sichtbar werden.

#### 2.2 Ein Vorteil ist der hohe Durchsatz rekombinanter viraler Genome

Aufgrund des geringeren Arbeitsaufwandes ist das in dieser Arbeit dargestellte Vorgehen der groben Untersuchung einer großen Menge von Mutanten einer genaueren Untersuchung mit jeweils vorangehender Herstellung eines titrierten Virusstocks überlegen. Dies setzt jedoch eine ausreichend hohe Anzahl rekonstituierter und zu testender Rekombinanten voraus.

Zeigten sich, wie in der Arbeit beschrieben, augenfällige Unterschiede der Rekombinanten zum Wildtypvirus, wurden virale Stocks hergestellt und diese für eine genauere Untersuchung mittels Wachstumskurven verwendet. Hierbei wurden die Beobachtungen der ersten Untersuchung in allen Fällen bestätigt.

## D. DISKUSSION

### 3. DIE BEDEUTUNG VON ORF 10 FÜR DAS WACHSTUM VON MHV-68 IN ENDOTHELZELLEN

Wie in Ergebnisse 3 dargestellt, scheint der bislang bei MHV-68 wie auch den nahe verwandten Viren der Herpesviridae wenig bis gar nicht näher untersuchte ORF 10 einen selektiven Vorteil für das Wachstum des Virus in Endothelzellen zu besitzen, da eine Transposoninsertion in ORF 10 oder in den benachbarten ORF 9 (aus Sequenzhomologievergleichen vorhergesagte DNA-Polymerase des Virus) eine verminderte Fähigkeit zur Replikation in Endothelzellen zur Folge hat.

#### 3.1. Vorhergesagter Aufbau des Genproduktes von ORF 10, ein Hinweis auf seine Funktion?

Das Genprodukt von ORF 10 ist ein hypothetisches Protein mit einem Molekulargewicht von 46.2 kD und einer Länge von 418 aa. Bezüglich seiner Funktion ist nichts bekannt. Die größte – wenn auch wenig signifikante – Homologie zeigt es zu einem hypothetischen Genprodukt von Stamm 73 des atelinen Herpesvirus (EMBL Datenbank, Albrecht J.C. und Fleckenstein B.). In der Fibroblasten-Zellreihe NIH-3T3 wird es ca. 5h p.i. maximal exprimiert <sup>(4)</sup>.

Die EMBL-Datenbank liefert bezüglich ORF 10 als Eigenschaften zum einen, dass seine Sekundärstruktur fast gänzlich die eines  $\beta$ -Faltblattes ist. Des Weiteren gibt es keinerlei vorhergesagte Transmembranregion.

Als interessantes Motiv findet sich ein Leuzin-Zipper-Motiv an der Aminosäurenposition aa 324 – 346. Dieses Motiv beinhaltet eine Dimerisationsdomäne (der eigentliche Leuzin-Zipper) sowie eine DNA-Bindungsdomäne (basische Region). Als amphipathische Helix besitzt der Leuzin-Zipper Seitenketten, welche auf einer Seite der Helix hydrophil und auf der anderen Seite hydrophob sind und somit aufgrund der hydrophoben Wechselwirkung eine Dimerisierung im Sinne einer „coiled coil“ mit einem anderen Leuzin-Zipper und erst danach eine DNA-Bindung bewirken. Dieses Motiv würde auf eine Beteiligung an intrazellulären Signalkaskaden mit Effekt auf die Transkription spezifischer Gene hinweisen. Es findet sich in vielen bekannten genregulatorischen Proteinen wie z.B. den cAMP response element (CRE) – bindenden Proteinen (CREB, CRE-BP1, AFTs), der Jun/AP1-Familie der Transkriptionsfaktoren sowie den C-myc-, L-myc- und N-myc-Onkogenen, um einige zu nennen.

Des Weiteren findet sich ein RGD-Motiv an der Aminosäurenposition aa 299 – 302. Dieses Motiv würde auf eine Beteiligung an extrazellulärer Bindung hinweisen und ergibt sich aus dem Einbuchstabencode der Aminosäuren. RGD bedeutet das Aufeinanderfolgen der Aminosäuren Arginin (R) – Glycin (G) – Aspartat (D); diese Folge kommt z.B. in Fibronectin und anderen

## D. DISKUSSION

extrazellulären Matrixproteinen vor und wird von einigen Integrinen, die diese Proteine binden, erkannt.

Zusätzlich gibt es mehrere mögliche Stellen für eine PKC-Phosphorylierung, eine CK2-Phosphorylierung (beides auf eine mögliche Beteiligung intrazellulärer Signalkaskaden hinweisend), eine Asn-Glykosylierung (hinweisend auf eine Funktion als extrazelluläres Protein), sowie Myristylierung (ebenfalls hinweisend auf eine Funktion als extrazelluläres Protein nach Verankerung in der Zellmembran mittels eines Myristylankers).

### 3.2 ORF 10 und Endothelzell-Tropismus

#### 3.2.1 Definition des Begriffs „Zelltropismus“

Der Begriff eines spezifischen Zelltropismus ist nicht genau definiert und wird in der vorliegenden Arbeit im Hinblick auf die Ergebnisse den ORF 10 von MHV-68 betreffend im Sinne einer beeinträchtigten Replikation bezüglich Vertretern eines Zelltyps (hier der Endothelzellen mit den Vertretern SVEC 4-10 und MHEC-5T) im Vergleich zu Vertretern eines anderen Zelltyps (der Fibroblasten mit dem Vertreter NIH-3T3 und BHK-21 als fibroblastoide Zelllinie) benutzt. Es gibt mittlerweile für CMV als Vertreter der Herpesviren sowie für HIV als ein Retrovirus mehrere Hinweise, dass eine genetische Basis für das Phänomen des viralen Zelltropismus existiert, und Veränderungen des viralen Genoms mit verändertem Zelltropismus assoziiert sind (<sup>109, 143</sup>).

#### 3.2.2 Ein genetisch determinierter Endothelzell-Tropismus spielt eine wichtige Rolle in der Virologie

Endothelzellen, v.a. Gefäßendothelzellen, spielen eine wichtige Rolle in der Herpesvirologie. Wie schon in der Einleitung erwähnt, werden MHV-68 und Herpesviren im Allgemeinen seit einiger Zeit mit verschiedenen Formen entzündlicher Gefäßerkrankungen, auch der Atherosklerose (<sup>6</sup>), in Verbindung gebracht. Zu ersterem zählt, dass der Nachweis viraler Antigene in vaskulären Läsionen gamma-Interferon-Rezeptor-defizienter Mäuse (IFN $\gamma$ R $^{-/-}$ ) auf die mögliche Beteiligung von MHV-68 oder der Gammaherpesviren bei der Ätiologie einer Vaskulitis der großen elastischen Arterien hinweist, einer Pathologie ähnlich der der Takayasu-Arteriitis (nicht-granulomatöse Form der Arteriitis temporalis) oder der Kawasaki-Arteriitis beim Menschen (<sup>190</sup>). Hierbei spielt eine persistierende produktive Infektion der Media der betroffenen Gefäßabschnitte und weniger ein Autoimmungeschehen eine Rolle (<sup>34</sup>).

## D. DISKUSSION

Für CMV als Vertreter der  $\beta$ -Herpesvirinae konnte für das humanpathogene HCMV nachgewiesen werden, dass es ebenso an der Genese einer Atherosklerose beteiligt ist, genauer an einer progressiven koronaren Herzerkrankung und Endothelialitis in Herztransplantationspatienten und der Entwicklung einer koronaren Restenose nach Angioplastik<sup>(46)</sup>. Gesteigerte Migration glatter Gefäßmuskelzellen aufgrund eines CMV-kodierten Chemokin-Rezeptors wurde der Entwicklung einer verstärkten vaskulären Stenose zugeschrieben<sup>(159)</sup>. Ein Ungleichgewicht zwischen gesteigerter Proliferation glatter Muskelzellen sowie Endothelzellen und einer nicht gesteigerten Apoptose unter dem Einfluß des immediate-early Genprodukts IE2-84 scheint ebenso zu einer Verdickung von Intima und Media arterieller Gefäße beizutragen<sup>(166)</sup>, was auf eine Beteiligung eines viralen Apoptoseinhibitors bei vaskulären Erkrankungen hinzuweisen scheint. Endothelzellen tragen zur viralen Disseminierung bei, indem mit HCMV infizierte Endothelzellen im Blut infizierter Patienten zirkulieren<sup>(119)</sup>.

Auch für MCMV konnte die Wichtigkeit von Endothelzellen in Hinsicht auf virale Disseminierung, Latenz und vaskulärer Erkrankung anhand  $IFN\gamma R^{-/-}$ -Mäuse gezeigt werden, die analog zu einer MHV-68-Infektion eine chronische arterielle Entzündung zeigen, was der fehlenden Kontrolle der viralen Reaktivierung aus dem Stadium der Latenz angelastet wird<sup>(121)</sup>. Die Untersuchung des MCMV-Genoms hinsichtlich eines Zelltropismus ist aufgrund der Tatsache, dass die gängigen HCMV-Laborstämme im Gegensatz zu klinischen Isolaten in Endothelzelllinien und dendritischen Zellen nicht replizieren von großer Bedeutung, wobei die Eigenschaft der klinischen Isolate, denen dieses noch möglich ist, nach deren Propagierung in Fibroblasten verloren geht<sup>(91, 143, 164)</sup>.

Xiao et al. konnten mit in-vivo-Experimenten für m43 des MCMV-Genoms zeigen, dass es eine Rolle für den Tropismus von MCMV für Speicheldrüsen spielt, von denen im Falle des humanpathogenen Analogons HCMV angenommen wird, dass sie eine wichtige Funktion bei der Verbreitung des Virus innerhalb einer gesunden Population spielen. Hierzu wurden die jeweiligen Organtiter der Speicheldrüsen mit denen der Leber, der Milz, der Niere und der Lunge verglichen<sup>(199)</sup>.

Brune et al. wiesen für m45 des MCMV-Genoms nach, dass es als Ribonukleotidreduktase-Homolog eine wichtige Rolle für die Replikationsfähigkeit des Virus in Endothelzellen (wie in der vorliegenden Arbeit für die Endothelzelllinien MHEC-5T und SVEC 4-10 gezeigt), aber auch Makrophagen (verwendeter Vertreter IC-21) spielt, sowie für einen Apoptose-Inhibitor kodiert oder das Genprodukt in einer zelltypabhängigen Weise einen Apoptose-Inhibitor aktiviert<sup>(26, 199)</sup>.

Eine Funktion als Apoptose-Inhibitor in Makrophagen wird m36 zugeschrieben (Menard et al., zur Publikation eingereicht). Sowohl bei Brune et al. als auch bei Menard et al. wurde dieser Sachverhalt im Gegensatz zu den Ergebnissen von Xiao et al. bezüglich m43 in vitro nachgewiesen,

## D. DISKUSSION

wobei die bei Brune et al. angewandte Methodik, wie mehrfach erwähnt, die Grundlage für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Mutagenese und die Untersuchung der Rekombinanten darstellt.

### 3.2.3 Zellulärer Hintergrund und Zelltropismus als neuere Erkenntnis

Zusätzlich zu einer genetisch determinierten Basis für viralen Zelltropismus scheint aber auch der zelluläre Hintergrund wichtig zu sein. Dies zeigt zum einen die Tatsache, dass klinische Isolate von HCMV wie schon dargestellt nach deren Propagierung in Fibroblasten die Fähigkeit verlieren, in Endothelzellen zu replizieren. Dies ist mit einem deutlichen Rückgang in den Nukleus translozierter viraler Genome assoziiert (<sup>91, 143, 144</sup>).

Ein Zusammenhang zwischen veränderten viralen Oberflächenproteinen und einem hierdurch beeinflussten Zelltropismus konnte für verschiedene Viren nachgewiesen werden, so für Adenoviren anhand eines veränderten viralen Liganden des Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptors (CAR), der auf vielen Endothelzellen exprimiert wird, für das murine Leukämie-Virus anhand eines Basenaustauschs im Heparin-bindenden Protein und für das equine Herpesvirus 1 (EHV-1) anhand einer mit der Infektion verbundenen hochregulierten Expression verschiedener zellulärer Adhäsionsmoleküle (<sup>74, 98, 114, 145</sup>).

Zum anderen konnten Borza et al. in einer kürzlich erschienenen Publikation für EBV als ein dem MHV-68 nahe verwandten Vertreter der Gammaherpesvirinae zeigen, dass aus Epithelzellen stammendes Virus effizienter B-Zellen, aus B-Zellen stammendes Virus jedoch besser Epithelzellen infiziert (<sup>19</sup>). Diese offensichtlich zellulär verursachte Eigenschaft ergibt sich aus der Tatsache, dass die Infektion von B-Zellen oder Epithelzellen mit EBV jeweils das Verhältnis für das bezüglich der B-Zellen als Korezeptor wichtigen endogenen HLA-II zu seinem Partner verändert. Dieses fängt sozusagen einen für die eigene Infektion wichtigen und auf der Virushülle lokalisierten Liganden ab und ist für das Attachment des Virus an Oberflächenproteine die jeweilige Zelllinie notwendig. Somit wird gewährleistet, dass der jeweils andere Zelltyp bevorzugt infiziert wird und sich das Virus dadurch besser verbreitet.

Nicht nur der Effekt veränderter viraler Oberflächenproteine, auch ein Einfluß einer veränderten zellspezifischen Promoterfunktion mit der Folge eines alterierten Zelltropismus hierzu verwendeter Adenoviren konnte gezeigt werden (<sup>114</sup>).

## D. DISKUSSION

### 3.2.4 Eine weiterführende Untersuchung der Rolle und Funktion von ORF 10 ist notwendig

Der Nachweis einer Beteiligung von ORF 10 des MHV-68-Genoms an der Fähigkeit, in Endothelzellen zu replizieren, ist viel versprechend. Die genaue biologische Funktion des Genproduktes muss in weiteren Versuchen jedoch erst noch ermittelt werden. So könnte eine gezielte Deletion des viralen ORFs mittels homologer Rekombination in Eukaryonten (ET-Cloning, siehe Übersichtsarbeiten (<sup>26, 206</sup>)) als Bestätigung der Stelle der Tn-Insertion dienen. Ein Vergleich der Ergebnisse beider Verfahren kann des Weiteren einen Aufschluss darüber geben, wie groß der Effekt der Transposoninsertion bei der Ausbildung des beobachteten Phänotyps ist.

Eine im Folgenden durchzuführende Reversion soll dann sichern, dass die Mutation für den Phänotypen verantwortlich ist, und nicht zufällige Mutationen irgendwo im Genom.

Ein HA-Tagging des Genproduktes zur besseren zellulären Lokalisation könnte zusammen mit Untersuchungen bezüglich der Kinetik der Expression in verschiedenen Zelllinien zur gesteigerten Kenntnis der biologischen Rolle beitragen. Mittels in-vivo-Versuchen könnte letztlich untersucht werden, ob der in vitro beobachtete Phänotyp auch im Versuchstier einen Effekt bezüglich der Pathogenese zur Folge hat.

### E. ZUSAMMENFASSUNG

Das zur Familie der Herpesviridae, Unterfamilie Gammaherpesvirinae, gehörende murine Herpesvirus 68 (MHV-68) besitzt mit 118 kbp wie die zu den Betaherpesvirinae gehörenden murinen und humanen Cytomegalieviren (MCMV und HCMV) mit ca. 230 kbp ein sehr großes Genom. Die Mehrzahl der 80 offenen Leserahmen wurde noch nicht charakterisiert. Zur Untersuchung dieser Gene ist die zufällige Herstellung viraler Mutanten die effiziente Methode, um zu neuen Erkenntnissen bezüglich ihrer Funktion zu gelangen.

Aufgrund des großen Anteils nicht oder nur wenig charakterisierter Gene am viralen Genom und der oftmals nur geringen Homologie zu offenen Leserahmen anderer nah verwandter Herpesviren ist für MHV-68 ein Verfahren der „forward genetics“ diejenige Möglichkeit, welche den größten Erfolg verspricht. Dies beinhaltet eine ungezielte Mutagenese des viralen Genoms mit blinder Rekonstitution und nachfolgender Charakterisierung derjenigen Rekombinanten, welche einen interessanten Phänotypen zeigen.

Bisher war die Herstellung rekombinanter MHV-68-Klone sehr arbeitsintensiv, da man diese gänzlich mit den Mitteln durchführen musste, welche die Methodik der Zellkultur zur Verfügung stellte.

Aufgrund der Klonierung des MHV-68-Genoms als ein künstliches bakterielles Chromosom (BAC), der Etablierung des Verfahrens der Transposonmutagenese und mittels der Möglichkeit der Rekonstitution viraler Rekombinanten durch invasive Bakterien wurde diese Methode der klassischen oder forward genetics möglich.

In dieser Arbeit wurde erstmals eine Mutagenese des Genoms von MHV-68 durchgeführt, die resultierenden viralen Rekombinanten rekonstituiert und einer phänotypischen Untersuchung unterzogen. Hierbei wurde das Wachstum der Mutanten auf sechs verschiedenen Zelllinien verglichen.

Dies sollte grob augenscheinliche Unterschiede der rekombinanten Viren im Vergleich zu einer Wildtyp-Kontrolle nachweisen, wobei die von Brune et al. bereits etablierte Methodik an die Erfordernisse des MHV-68-Genoms angepasst werden konnte.

Bezüglich des viralen Wachstums in Endothelzellen auffällig erscheinende Mutanten zeigten eine Häufung der Tn-Insertionen in der Genregion um ORF 10.

Wachstumskurven bestätigten die Rolle von ORF 10 für die Fähigkeit des Virus in Endothelzellen zu replizieren. Dieses ist der erste Hinweis für eine interessante biologische Funktion dieses viralen ORFs, die in weiteren Arbeiten zu sichern und zu analysieren ist.

## F. LITERATURVERZEICHNIS

### F. LITERATURVERZEICHNIS

1. Abenes, G., M. Lee, E. Haghjoo, T. Tong, X. Zhan, and F. Liu. 2001. Murine cytomegalovirus open reading frame M27 plays an important role in growth and virulence in mice. *J. Virol.* 75:1697-1707.
2. Adler, H., M. Messerle, M. Wagner, and U. H. Koszinowski. 2000. Cloning and mutagenesis of the murine gammaherpesvirus 68 genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *J. Virol.* 74:6964-6974.
3. Adler, H., M. Messerle, and U. H. Koszinowski. 2001. Virus reconstituted from infectious bacterial artificial chromosome (BAC)-cloned murine gammaherpesvirus 68 acquires wild-type properties in vivo only after excision of BAC vector sequences. *J. Virol.* 75:5692-5696.
4. Ahn, J. W., K. L. Powell, P. Kellam, and D. G. Alber. 2002. Gammaherpesvirus lytic gene expression as characterized by DNA array. *J. Virol.* 76:6244-6256.
5. Akel, H. M., A. M. Furarah, and C. Sweet. 1993. Further studies of 31 temperature-sensitive mutants of mouse cytomegalovirus: thermal stability, replication and analysis of temperature-sensitive functions by temperature shift. *FEMS Microbiol. Lett.* 114:311-316.
6. Alber, D. G., K. L. Powell, P. Vallance, D. A. Goodwin, and C. Grahame-Clarke. 2000. Herpesvirus infection accelerates atherosclerosis in the apolipoprotein E-deficient mouse. *Circulation* 102:779-785.
7. Albrecht, J. C., J. Nicholas, D. Biller, K. R. Cameron, B. Biesinger, C. Newman, S. Wittmann, M. A. Craxton, H. Coleman, B. Fleckenstein, and . 1992. Primary structure of the herpesvirus saimiri genome. *J. Virol.* 66:5047-5058.
8. Arvanitakis, L., E. Geras-Raaka, A. Varma, M. C. Gershengorn, and E. Cesarman. 1997. Human herpesvirus KSHV encodes a constitutively active G-protein- coupled receptor linked to cell proliferation. *Nature* 385:347-350.
9. Baird, G. S., D. A. Zacharias, and R. Y. Tsien. 2000. Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97:11984-11989.
10. Bais, C., B. Santomasso, O. Coso, L. Arvanitakis, E. G. Raaka, J. S. Gutkind, A. S. Asch, E. Cesarman, M. C. Gershengorn, E. A. Mesri, and M. C. Gerhengorn. 1998. G-protein-coupled receptor of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is a viral oncogene and angiogenesis activator. *Nature* 391:86-89.
11. Barnes, A., H. Dyson, N. P. Sunil-Chandra, P. Collins, and A. A. Nash. 1999. 2'-Deoxy-5-ethyl-beta-4'-thiouridine inhibits replication of murine gammaherpesvirus and delays the onset of virus latency. *Antivir. Chem. Chemother.* 10:321-326.
12. Belz, G. T., P. G. Stevenson, M. R. Castrucci, J. D. Altman, and P. C. Doherty. 2000. Postexposure vaccination massively increases the prevalence of gamma- herpesvirus-specific CD8+ T cells but confers minimal survival advantage on CD4-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97:2725-2730.
13. Berg, D. E. 1985. Mechanisms of transposition in bacteria. *Basic Life Sci.* 30:33-44.
14. Bevis, B. J. and B. S. Glick. 2002. Rapidly maturing variants of the *Discosoma* red fluorescent protein (DsRed). *Nat. Biotechnol.* 20:83-87.
15. Blaskovic, D., M. Stancekova, J. Svobodova, and J. Mistrikova. 1980. Isolation of five strains of herpesviruses from two species of free living small rodents. *Acta Virol.* 24:468.
16. Blaskovic, D., D. Stanekova, and J. Rajcani. 1984. Experimental pathogenesis of murine herpesvirus in newborn mice. *Acta Virol.* 28:225-231.
17. Boname, J. M. and P. G. Stevenson. 2001. MHC class I ubiquitination by a viral PHD/LAP finger protein. *Immunity.* 15:627-636.

## F. LITERATURVERZEICHNIS

18. Borst, E. M., G. Hahn, U. H. Koszinowski, and M. Messerle. 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.
19. Borza, C. M. and L. M. Hutt-Fletcher. 2002. Alternate replication in B cells and epithelial cells switches tropism of Epstein-Barr virus. *Nat. Med.* 8:594-599.
20. Bowden, R. J., J. P. Simas, A. J. Davis, and S. Efstathiou. 1997. Murine gammaherpesvirus 68 encodes tRNA-like sequences which are expressed during latency. *J. Gen. Virol.* 78 ( Pt 7):1675-1687.
21. Boyle-Vavra, S. and H. S. Seifert. 1993. Shuttle mutagenesis: two mini-transposons for gene mapping and for lacZ transcriptional fusions in *Neisseria gonorrhoeae*. *Gene* 129:51-57.
22. Bridgeman, A., P. G. Stevenson, J. P. Simas, and S. Efstathiou. 2001. A secreted chemokine binding protein encoded by murine gammaherpesvirus- 68 is necessary for the establishment of a normal latent load. *J. Exp. Med.* 194:301-312.
23. Brooks, J. W., A. M. Hamilton-Easton, J. P. Christensen, R. D. Cardin, C. L. Hardy, and P. C. Doherty. 1999. Requirement for CD40 ligand, CD4(+) T cells, and B cells in an infectious mononucleosis-like syndrome. *J. Virol.* 73:9650-9654.
24. Brune, W., C. Menard, U. Hobom, S. Odenbreit, M. Messerle, and U. H. Koszinowski. 1999. Rapid identification of essential and nonessential herpesvirus genes by direct transposon mutagenesis. *Nat. Biotechnol.* 17:360-364.
25. Brune, W., M. Messerle, and U. H. Koszinowski. 2000. Forward with BACs: new tools for herpesvirus genomics. *Trends Genet.* 44:254-259.
26. Brune, W., C. Menard, J. Heesemann, and U. H. Koszinowski. 2001. A ribonucleotide reductase homolog of cytomegalovirus and endothelial cell tropism. *Science* 291:303-305.
27. Cardin, R. D., J. W. Brooks, S. R. Sarawar, and P. C. Doherty. 1996. Progressive loss of CD8+ T cell-mediated control of a gamma-herpesvirus in the absence of CD4+ T cells. *J. Exp. Med.* 184:863-871.
28. Ciampor, F., M. Stancekova, and D. Blaskovic. 1981. Electron microscopy of rabbit embryo fibroblasts infected with herpesvirus isolates from *Clethrionomys glareolus* and *Apodemus flavicollis*. *Acta Virol.* 25:101-107.
29. Clambey, E. T., H. W. Virgin, and S. H. Speck. 2000. Disruption of the murine gammaherpesvirus 68 M1 open reading frame leads to enhanced reactivation from latency. *J. Virol.* 74:1973-1984.
30. Cohen, J. I. 2000. Epstein-Barr virus infection. *N. Engl. J. Med.* 343:481-492.
31. Cohen, J. I. and K. E. Seidel . 1993. Generation of varicella-zoster virus (VZV) and viral mutants from cosmid DNAs: VZV thymidylate synthetase is not essential for replication in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90:7376-7380.
32. Cotlet, M., J. Hofkens, S. Habuchi, G. Dirix, M. Van Guyse, J. Michiels, J. Vanderleyden, and F. C. De Schryver. 2001. Identification of different emitting species in the red fluorescent protein DsRed by means of ensemble and single-molecule spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98:14398-14403.
33. Cunningham, C. and A. J. Davison. 1993. A cosmid-based system for constructing mutants of herpes simplex virus type 1. *Virology* 197:116-124.
34. Dal Canto, A. J., H. W. Virgin, and S. H. Speck. 2000. Ongoing viral replication is required for gammaherpesvirus 68-induced vascular damage. *J. Virol.* 74:11304-11310.
35. de, L., V. M. Herrero, U. Jakubzik, and K. N. Timmis. 1990. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J. Bacteriol.* 172:6568-6572.

## F. LITERATURVERZEICHNIS

36. Delecluse, H. J., T. Hilsendegen, D. Pich, R. Zeidler, and W. Hammerschmidt. 1998. Propagation and recovery of intact, infectious Epstein-Barr virus from prokaryotic to human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95:8245-8250.
37. DeLuca, N. A., A. M. McCarthy, and P. A. Schaffer. 1985. Isolation and characterization of deletion mutants of herpes simplex virus type 1 in the gene encoding immediate-early regulatory protein ICP4. *J. Virol.* 56:558-570.
38. Doherty, P. C., D. J. Topham, R. A. Tripp, R. D. Cardin, J. W. Brooks, and P. G. Stevenson. 1997. Effector CD4+ and CD8+ T-cell mechanisms in the control of respiratory virus infections. *Immunol. Rev.* 159:105-117.
39. Dutia, B. M., J. P. Stewart, R. A. Clayton, H. Dyson, and A. A. Nash. 1999. Kinetic and phenotypic changes in murine lymphocytes infected with murine gammaherpesvirus-68 in vitro. *J. Gen. Virol.* 80 ( Pt 10):2729-2736.
40. Dutia, B. M., C. J. Clarke, D. J. Allen, and A. A. Nash. 1997. Pathological changes in the spleens of gamma interferon receptor- deficient mice infected with murine gammaherpesvirus: a role for CD8 T cells. *J. Virol.* 71:4278-4283.
41. Dutia, B. M., D. J. Allen, H. Dyson, and A. A. Nash. 1999. Type I interferons and IRF-1 play a critical role in the control of a gammaherpesvirus infection. *Virology* 261:173-179.
42. Efstathiou, S., A. C. Minson, H. J. Field, J. R. Anderson, and P. Wildy. 1986. Detection of herpes simplex virus-specific DNA sequences in latently infected mice and in humans. *J. Virol.* 57:446-455.
43. Efstathiou, S., Y. M. Ho, and A. C. Minson. 1990. Cloning and molecular characterization of the murine herpesvirus 68 genome. *J. Gen. Virol.* 71 ( Pt 6):1355-1364.
44. Efstathiou, S., Y. M. Ho, S. Hall, C. J. Styles, S. D. Scott, and U. A. Gompels. 1990. Murine herpesvirus 68 is genetically related to the gammaherpesviruses Epstein-Barr virus and herpesvirus saimiri. *J. Gen. Virol.* 71 ( Pt 6):1365-1372.
45. Ehtisham, S., N. P. Sunil-Chandra, and A. A. Nash. 1993. Pathogenesis of murine gammaherpesvirus infection in mice deficient in CD4 and CD8 T cells. *J. Virol.* 67:5247-5252.
46. Epstein, S. E., E. Speir, Y. F. Zhou, E. Guetta, M. Leon, and T. Finkel. 1996. The role of infection in restenosis and atherosclerosis: focus on cytomegalovirus. *Lancet* 348 Suppl 1:s13-s17.
47. Flano, E., S. M. Husain, J. T. Sample, D. L. Woodland, and M. A. Blackman. 2000. Latent murine gamma-herpesvirus infection is established in activated B cells, dendritic cells, and macrophages. *J. Immunol.* 165:1074-1081.
48. Flano, E., D. L. Woodland, M. A. Blackman, and P. C. Doherty. 2001. Analysis of virus-specific CD4(+) t cells during long-term gammaherpesvirus infection. *J. Virol.* 75:7744-7748.
49. Fodor, W. L., S. A. Rollins, S. Bianco-Caron, R. P. Rother, E. R. Guilmette, W. V. Burton, J. C. Albrecht, B. Fleckenstein, and S. P. Squinto. 1995. The complement control protein homolog of herpesvirus saimiri regulates serum complement by inhibiting C3 convertase activity. *J. Virol.* 69:3889-3892.
50. Gangappa, S., L. F. van Dyk, T. J. Jewett, S. H. Speck, and H. W. Virgin. 2002. Identification of the in vivo role of a viral bcl-2. *J. Exp. Med.* 195:931-940.
51. Garcia-Parajo, M. F., M. Koopman, E. M. van Dijk, V. Subramaniam, and N. F. van Hulst. 2001. The nature of fluorescence emission in the red fluorescent protein DsRed, revealed by single-molecule detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98:14392-14397.
52. Geider, K., C. Hohmeyer, R. Haas, and T. F. Meyer. 1985. A plasmid cloning system utilizing replication and packaging functions of the filamentous bacteriophage fd. *Gene* 33:341-349.
53. Grassmann, R. and B. Fleckenstein. 1989. Selectable recombinant herpesvirus saimiri is capable of persisting in a human T-cell line. *J. Virol.* 63:1818-1821.

## F. LITERATURVERZEICHNIS

54. Greaves, R. F., J. M. Brown, J. Vieira, and E. S. Mocarski. 1995. Selectable insertion and deletion mutagenesis of the human cytomegalovirus genome using the *Escherichia coli* guanosine phosphoribosyl transferase (gpt) gene. *J. Gen. Virol.* 76 ( Pt 9):2151-2160.
55. Grillot-Courvalin, C., S. Goussard, F. Huetz, D. M. Ojcius, and P. Courvalin. 1998. Functional gene transfer from intracellular bacteria to mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* 44:862-866.
56. Grillot-Courvalin, C., S. Goussard, and P. Courvalin. 1999. Bacteria as gene delivery vectors for mammalian cells. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10:477-481.
57. Grinsted, J., C. F. de la, and R. Schmitt. 1990. The Tn21 subgroup of bacterial transposable elements. *Plasmid* 24:163-189.
58. Haas, R., A. F. Kahrs, D. Facius, H. Allmeier, R. Schmitt, and T. F. Meyer. 1993. TnMax--a versatile mini-transposon for the analysis of cloned genes and shuttle mutagenesis. *Gene* 130:23-31.
59. Hamilton-Easton, A. M., J. P. Christensen, and P. C. Doherty. 1999. Turnover of T cells in murine gammaherpesvirus 68-infected mice. *J. Virol.* 73:7866-7869.
60. Hardy, C. L., S. L. Silins, D. L. Woodland, and M. A. Blackman. 2000. Murine gamma-herpesvirus infection causes V(beta)4-specific CDR3- restricted clonal expansions within CD8(+) peripheral blood T lymphocytes. *Int. Immunol.* 12:1193-1204.
61. Hardy, C. L., E. Flano, R. D. Cardin, I. J. Kim, P. Nguyen, S. King, D. L. Woodland, and M. A. Blackman. 2001. Factors controlling levels of CD8+ T-cell lymphocytosis associated with murine gamma-herpesvirus infection. *Viral Immunol.* 14:391-402.
62. Hardy, C. L., L. Lu, P. Nguyen, D. L. Woodland, R. W. Williams, and M. A. Blackman. 2001. Identification of quantitative trait loci controlling activation of TRBV4 CD8+ T cells during murine gamma-herpesvirus-induced infectious mononucleosis. *Immunogenetics* 53:395-400.
63. Henderson, S., D. Huen, M. Rowe, C. Dawson, G. Johnson, and A. Rickinson. 1993. Epstein-Barr virus-coded BHRF1 protein, a viral homologue of Bcl-2, protects human B cells from programmed cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90:8479-8483.
64. Hirt, B. 1967. Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *J. Mol. Biol.* 26:365-369.
65. Hobom, U., W. Brune, M. Messerle, G. Hahn, and U. H. Koszinowski. 2000. Fast screening procedures for random transposon libraries of cloned herpesvirus genomes: mutational analysis of human cytomegalovirus envelope glycoprotein genes. *J. Virol.* 74:7720-7729.
66. Hoge, A. T., S. B. Hendrickson, and W. H. Burns. 2000. Murine gammaherpesvirus 68 cyclin D homologue is required for efficient reactivation from latency. *J. Virol.* 74:7016-7023.
67. Honess, R. W. and D. H. Watson. 1977. Unity and diversity in the herpesviruses. *J. Gen. Virol.* 37:15-37.
68. Honess, R. W. 1984. Herpes simplex and 'the herpes complex': diverse observations and a unifying hypothesis. The eighth Fleming lecture. *J. Gen. Virol.* 65 ( Pt 12):2077-2107.
69. Horsburgh, B. C., M. M. Hubinette, and F. Tufaro. 1999. Genetic manipulation of herpes simplex virus using bacterial artificial chromosomes. *Methods Enzymol.* 306:337-352.
70. Hudson, J. B., J. K. Chantler, L. Loh, V. Misra, and M. T. Muller. 1979. Model systems for analysis of latent cytomegalovirus infections. *Can. J. Microbiol.* 25:245-253.
71. Husain, S. M., E. J. Usherwood, H. Dyson, C. Coleclough, M. A. Coppola, D. L. Woodland, M. A. Blackman, J. P. Stewart, and J. T. Sample. 1999. Murine gammaherpesvirus M2 gene is latency-associated and its protein a target for CD8(+) T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96:7508-7513.

## F. LITERATURVERZEICHNIS

72. Jacoby, M. A., H. W. Virgin, and S. H. Speck. 2002. Disruption of the M2 gene of murine gammaherpesvirus 68 alters splenic latency following intranasal, but not intraperitoneal, inoculation. *J. Virol.* 76:1790-1801.
73. Jenkins, F. J., M. J. Casadaban, and B. Roizman. 1985. Application of the mini-Mu-phage for target-sequence-specific insertional mutagenesis of the herpes simplex virus genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82:4773-4777.
74. Jinno-Oue, A., M. Oue, and S. K. Ruscetti. 2001. A unique heparin-binding domain in the envelope protein of the neuropathogenic PVC-211 murine leukemia virus may contribute to its brain capillary endothelial cell tropism. *J. Virol.* 75:12439-12445.
75. Jung, J. U., M. Stager, and R. C. Desrosiers. 1994. Virus-encoded cyclin. *Mol. Cell Biol.* 14:7235-7244.
76. Kahrs, A. F., S. Odenbreit, W. Schmitt, D. Heuermann, T. F. Meyer, and R. Haas. 1995. An improved TnMax mini-transposon system suitable for sequencing, shuttle mutagenesis and gene fusions. *Gene* 167:53-57.
77. Kapadia, S. B., H. Molina, B. van, V, S. H. Speck, and H. W. Virgin. 1999. Murine gammaherpesvirus 68 encodes a functional regulator of complement activation. *J. Virol.* 73:7658-7670.
78. Kemble, G. W. and E. S. Mocarski. 1989. A host cell protein binds to a highly conserved sequence element (pac- 2) within the cytomegalovirus a sequence. *J. Virol.* 63:4715-4728.
79. Kemble, G., G. Duke, R. Winter, and R. Spaete. 1996. Defined large-scale alterations of the human cytomegalovirus genome constructed by cotransfection of overlapping cosmids. *J. Virol.* 70:2044-2048.
80. Krieg, A. M. 1996. Lymphocyte activation by CpG dinucleotide motifs in prokaryotic DNA. *Trends Microbiol.* 4:73-76.
81. LaFemina, R. L. and G. S. Hayward. 1983. Replicative forms of human cytomegalovirus DNA with joined termini are found in permissively infected human cells but not in non-permissive Balb/c-3T3 mouse cells. *J. Gen. Virol.* 64 (Pt 2):373-389.
82. Lee, B. J., S. Santee, S. Von Gesjen, C. F. Ware, and S. R. Sarawar. 2000. Lymphotoxin-alpha-deficient mice can clear a productive infection with murine gammaherpesvirus 68 but fail to develop splenomegaly or lymphocytosis. *J. Virol.* 74:2786-2792.
83. Lee, C. H., A. Bhagwat, and F. Heffron. 1983. Identification of a transposon Tn3 sequence required for transposition immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80:6765-6769.
84. Lee, M., J. Xiao, E. Haghjoo, X. Zhan, G. Abenes, T. Tuong, W. Dunn, and F. Liu. 2000. Murine cytomegalovirus containing a mutation at open reading frame M37 is severely attenuated in growth and virulence in vivo. *J. Virol.* 74:11099-11107.
85. Li, M., H. Lee, D. W. Yoon, J. C. Albrecht, B. Fleckenstein, F. Neipel, and J. U. Jung. 1997. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes a functional cyclin. *J. Virol.* 71:1984-1991.
86. Liu, H., S. Andreansky, G. Diaz, T. Hogg, and P. C. Doherty. 2002. Reduced functional capacity of CD8+ T cells expanded by post-exposure vaccination of gamma-herpesvirus-infected CD4-deficient mice. *J. Immunol.* 168:3477-3483.
87. Liu, H. S., M. S. Jan, C. K. Chou, P. H. Chen, and N. J. Ke. 1999. Is green fluorescent protein toxic to the living cells?. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260:712-717.
88. Liu, L., E. J. Usherwood, M. A. Blackman, and D. L. Woodland. 1999. T-cell vaccination alters the course of murine herpesvirus 68 infection and the establishment of viral latency in mice. *J. Virol.* 73:9849-9857.
89. Liu, L., E. Flano, E. J. Usherwood, S. Surman, M. A. Blackman, and D. L. Woodland. 1999. Lytic cycle T cell epitopes are expressed in two distinct phases during MHV-68 infection. *J. Immunol.* 163:868-874.
90. Liu, S., I. V. Pavlova, H. W. Virgin, and S. H. Speck. 2000. Characterization of gammaherpesvirus 68 gene 50 transcription. *J. Virol.* 74:2029-2037.

## F. LITERATURVERZEICHNIS

91. MacCormac, L. P. and J. E. Grundy. 1999. Two clinical isolates and the Toledo strain of cytomegalovirus contain endothelial cell tropic variants that are not present in the AD169, Towne, or Davis strains. *J. Med. Virol.* 57:298-307.
92. Mackett, M., J. P. Stewart, V. P. de, M. Chee, S. Efstathiou, A. A. Nash, and J. R. Arrand. 1997. Genetic content and preliminary transcriptional analysis of a representative region of murine gammaherpesvirus 68. *J. Gen. Virol.* 78 ( Pt 6):1425-1433.
93. Macrae, A. I., B. M. Dutia, S. Milligan, D. G. Brownstein, D. J. Allen, J. Mistrikova, A. J. Davison, A. A. Nash, and J. P. Stewart. 2001. Analysis of a novel strain of murine gammaherpesvirus reveals a genomic locus important for acute pathogenesis. *J. Virol.* 75:5315-5327.
94. Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook. 1989. *Molecular Cloning: a laboratory manual.*
95. Manning, W. C. and E. S. Mocarski. 1988. Insertional mutagenesis of the murine cytomegalovirus genome: one prominent alpha gene (ie2) is dispensable for growth. *Virology* 167:477-484.
96. Marks, J. R. and D. H. Spector . 1984. Fusion of the termini of the murine cytomegalovirus genome after infection. *J. Virol.* 52:24-28.
97. Marks, J. R. and D. H. Spector . 1988. Replication of the murine cytomegalovirus genome: structure and role of the termini in the generation and cleavage of concatenes. *Virology* 162:98-107.
98. Masuda, M., C. A. Hanson, N. V. Dugger, D. S. Robbins, S. G. Wilt, S. K. Ruscetti, and P. M. Hoffman. 1997. Capillary endothelial cell tropism of PVC-211 murine leukemia virus and its application for gene transduction. *J. Virol.* 71:6168-6173.
99. Matz, M. V., A. F. Fradkov, Y. A. Labas, A. P. Savitsky, A. G. Zarausky, M. L. Markelov, and S. A. Lukyanov. 1999. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat. Biotechnol.* 17:969-973.
100. McGeoch, D. J., S. Cook, A. Dolan, F. E. Jamieson, and E. A. Telford. 1995. Molecular phylogeny and evolutionary timescale for the family of mammalian herpesviruses. *J. Mol. Biol.* 247:443-458.
101. McGregor, A. and M. R. Schleiss. 2001. Molecular cloning of the guinea pig cytomegalovirus (GPCMV) genome as an infectious bacterial artificial chromosome (BAC) in *Escherichia coli*. *Mol. Genet. Metab* 72:15-26.
102. McVoy, M. A. and S. P. Adler. 1994. Human cytomegalovirus DNA replicates after early circularization by concatemer formation, and inversion occurs within the concatemer. *J. Virol.* 68:1040-1051.
103. Mercer, J. A., C. A. Wiley, and D. H. Spector. 1988. Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection: identification of infected cells in the spleen during acute and latent infections. *J. Virol.* 62:987-997.
104. Messerle, M., I. Crnkovic, W. Hammerschmidt, H. Ziegler, and U. H. Koszinowski. 1997. Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94:14759-14763.
105. Mocarski, E. S., A. C. Liu, and R. R. Spaete. 1987. Structure and variability of the a sequence in the genome of human cytomegalovirus (Towne strain). *J. Gen. Virol.* 68 ( Pt 8):2223-2230.
106. Mocarski, E. S., Jr. and G. W. Kemble. 1996. Recombinant cytomegaloviruses for study of replication and pathogenesis. *Intervirology* 39:320-330.
107. Mocarski, E. S., L. E. Post, and B. Roizman. 1980. Molecular engineering of the herpes simplex virus genome: insertion of a second L-S junction into the genome causes additional genome inversions. *Cell* 22:243-255.
108. Moore, P. S. and Y. Chang. 2001. Molecular virology of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 356:499-516.

## F. LITERATURVERZEICHNIS

109. Moses, A. V., S. G. Stenglein, J. G. Strussenberg, K. Wehrly, B. Chesebro, and J. A. Nelson. 1996. Sequences regulating tropism of human immunodeficiency virus type 1 for brain capillary endothelial cells map to a unique region on the viral genome. *J. Virol.* 70:3401-3406.
110. Mulligan, R. C. and P. Berg. 1981. Factors governing the expression of a bacterial gene in mammalian cells. *Mol. Cell Biol.* 1:449-459.
111. Nash, A. A. and N. P. Sunil-Chandra. 1994. Interactions of the murine gammaherpesvirus with the immune system. *Curr. Opin. Immunol.* 6:560-563.
112. Nash, A. A., B. M. Dutia, J. P. Stewart, and A. J. Davison. 2001. Natural history of murine gamma-herpesvirus infection. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 356:569-579.
113. Neyts, J. and E. De Clercq. 1999. Hydroxyurea potentiates the antiherpesvirus activities of purine and pyrimidine nucleoside and nucleoside phosphonate analogs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:2885-2892.
114. Nicklin, S. A., D. J. Von Seggern, L. M. Work, D. C. Pek, A. F. Dominiczak, G. R. Nemerow, and A. H. Baker. 2001. Ablating adenovirus type 5 fiber-CAR binding and HI loop insertion of the SIGYPLP peptide generate an endothelial cell-selective adenovirus. *Mol. Ther.* 4:534-542.
115. Odenbreit, S., M. Till, and R. Haas. 1996. Optimized BlaM-transposon shuttle mutagenesis of *Helicobacter pylori* allows the identification of novel genetic loci involved in bacterial virulence. *Mol. Microbiol.* 20:361-373.
116. Parry, C. M., J. P. Simas, V. P. Smith, C. A. Stewart, A. C. Minson, S. Efstathiou, and A. Alcami. 2000. A broad spectrum secreted chemokine binding protein encoded by a herpesvirus. *J. Exp. Med.* 191:573-578.
117. Peacock, J. W. and K. L. Bost. 2000. Infection of intestinal epithelial cells and development of systemic disease following gastric instillation of murine gammaherpesvirus-68. *J. Gen. Virol.* 81:421-429.
118. Peacock, J. W. and K. L. Bost. 2001. Murine gammaherpesvirus-68-induced interleukin-10 increases viral burden, but limits virus-induced splenomegaly and leukocytosis. *Immunology* 104:109-117.
119. Percivalle, E., M. G. Revello, L. Vago, F. Morini, and G. Gerna. 1993. Circulating endothelial giant cells permissive for human cytomegalovirus (HCMV) are detected in disseminated HCMV infections with organ involvement. *J. Clin. Invest* 92:663-670.
120. Post, L. E. and B. Roizman. 1981. A generalized technique for deletion of specific genes in large genomes: alpha gene 22 of herpes simplex virus 1 is not essential for growth. *Cell* 25:227-232.
121. Presti, R. M., J. L. Pollock, A. J. Dal Canto, A. K. O'Guin, and H. W. Virgin. 1998. Interferon gamma regulates acute and latent murine cytomegalovirus infection and chronic disease of the great vessels. *J. Exp. Med.* 188:577-588.
122. Rajcani, J., D. Blaskovic, J. Svobodova, F. Ciampor, D. Huckova, and D. Stanekova. 1985. Pathogenesis of acute and persistent murine herpesvirus infection in mice. *Acta Virol.* 29:51-60.
123. Ramsay, M. 1994. Yeast artificial chromosome cloning. *Mol. Biotechnol.* 1:181-201.
124. Reichel, M., J. Matis, J. Lesso, and M. Stancekova. 1991. Polypeptides synthesized in rabbit cells infected with murine herpesvirus (MHV): a comparison of proteins specified by various MHV strains. *Acta Virol.* 35:268-275.
125. Remington, S. J. 2002. Negotiating the speed bumps to fluorescence. *Nat. Biotechnol.* 20:28-29.
126. Robertson, K. A., E. J. Usherwood, and A. A. Nash. 2001. Regression of a murine gammaherpesvirus 68-positive b-cell lymphoma mediated by CD4 T lymphocytes. *J. Virol.* 75:3480-3482.
127. Roizman, B. and M. Tognon. 1982. Restriction enzyme analysis of herpesvirus DNA: stability of restriction endonuclease patterns. *Lancet* 1:677.
128. Roizman, B. and F. J. Jenkins . 1985. Genetic engineering of novel genomes of large DNA viruses. *Science* 229:1208-1214.

## F. LITERATURVERZEICHNIS

129. Roy, D. J., B. C. Ebrahimi, B. M. Dutia, A. A. Nash, and J. P. Stewart. 2000. Murine gammaherpesvirus M11 gene product inhibits apoptosis and is expressed during virus persistence. *Arch. Virol.* 145:2411-2420.
130. Rudolph, J., D. J. O'Callaghan, and N. Osterrieder. 2002. Cloning of the genomes of equine herpesvirus type 1 (EHV-1) strains KyA and racL11 as bacterial artificial chromosomes (BAC). *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 49:31-36.
131. Russo, J. J., R. A. Bohenzky, M. C. Chien, J. Chen, M. Yan, D. Maddalena, J. P. Parry, D. Peruzzi, I. S. Edelman, Y. Chang, and P. S. Moore. 1996. Nucleotide sequence of the Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (HHV8). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93:14862-14867.
132. Saeki, Y., T. Ichikawa, A. Saeki, E. A. Chiocca, K. Tobler, M. Ackermann, X. O. Breakefield, and C. Fraefel. 1998. Herpes simplex virus type 1 DNA amplified as bacterial artificial chromosome in *Escherichia coli*: rescue of replication-competent virus progeny and packaging of amplicon vectors. *Hum. Gene Ther.* 9:2787-2794.
133. Sarawar, S. R., B. J. Lee, S. K. Reiter, and S. P. Schoenberger. 2001. Stimulation via CD40 can substitute for CD4 T cell function in preventing reactivation of a latent herpesvirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98:6325-6329.
134. Sarawar, S. R., B. J. Lee, M. Anderson, Y. C. Teng, R. Zuberi, and S. Von Gesjen. 2002. Chemokine induction and leukocyte trafficking to the lungs during murine gammaherpesvirus 68 (MHV-68) infection. *Virology* 293:54-62.
135. Sarawar, S. R., J. W. Brooks, R. D. Cardin, M. Mehrpooya, and P. C. Doherty. 1998. Pathogenesis of murine gammaherpesvirus-68 infection in interleukin-6- deficient mice. *Virology* 249:359-366.
136. Sarid, R., T. Sato, R. A. Bohenzky, J. J. Russo, and Y. Chang. 1997. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes a functional bcl-2 homologue. *Nat. Med.* 3:293-298.
137. Schmitt, R., E. Bernhard, and R. Mattes. 1979. Characterisation of Tn1721, a new transposon containing tetracycline resistance genes capable of amplification. *Mol. Gen. Genet.* 172:53-65.
138. Seifert, H. S., E. Y. Chen, M. So, and F. Heffron. 1986. Shuttle mutagenesis: a method of transposon mutagenesis for *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 83:735-739.
139. Shizuya, H., B. Birren, U. J. Kim, V. Mancino, T. Slepak, Y. Tachiiri, and M. Simon. 1992. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89:8794-8797.
140. Simas, J. P., R. J. Bowden, V. Paige, and S. Efstathiou. 1998. Four tRNA-like sequences and a serpin homologue encoded by murine gammaherpesvirus 68 are dispensable for lytic replication in vitro and latency in vivo. *J. Gen. Virol.* 79 ( Pt 1):149-153.
141. Simas, J. P. and S. Efstathiou . 1998. Murine gammaherpesvirus 68: a model for the study of gammaherpesvirus pathogenesis. *Trends Microbiol.* 6:276-282.
142. Simas, J. P., D. Swann, R. Bowden, and S. Efstathiou. 1999. Analysis of murine gammaherpesvirus-68 transcription during lytic and latent infection. *J. Gen. Virol.* 80 ( Pt 1):75-82.
143. Sinzger, C., K. Schmidt, J. Knapp, M. Kahl, R. Beck, J. Waldman, H. Hebart, H. Einsele, and G. Jahn. 1999. Modification of human cytomegalovirus tropism through propagation in vitro is associated with changes in the viral genome. *J. Gen. Virol.* 80 ( Pt 11):2867-2877.
144. Sinzger, C., M. Kahl, K. Laib, K. Klingel, P. Rieger, B. Plachter, and G. Jahn. 2000. Tropism of human cytomegalovirus for endothelial cells is determined by a post-entry step dependent on efficient translocation to the nucleus. *J. Gen. Virol.* 81:3021-3035.
145. Smith, D. J., A. S. Hamblin, and N. Edington. 2001. Infection of endothelial cells with equine herpesvirus-1 (EHV-1) occurs where there is activation of putative adhesion molecules: a mechanism for transfer of virus. *Equine Vet. J.* 33:138-142.

## F. LITERATURVERZEICHNIS

146. Smith, G. A. and L. W. Enquist. 1999. Construction and transposon mutagenesis in *Escherichia coli* of a full-length infectious clone of pseudorabies virus, an alphaherpesvirus. *J. Virol.* 73:6405-6414.
147. Smith, G. A. and L. W. Enquist. 2000. A self-recombining bacterial artificial chromosome and its application for analysis of herpesvirus pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97:4873-4878.
148. Spaete, R. R. and E. S. Mocarski. 1987. Insertion and deletion mutagenesis of the human cytomegalovirus genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 84:7213-7217.
149. Stevenson, P. G., G. T. Belz, J. D. Altman, and P. C. Doherty. 1998. Virus-specific CD8(+) T cell numbers are maintained during gamma-herpesvirus reactivation in CD4-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95:15565-15570.
150. Stevenson, P. G. and P. C. Doherty. 1998. Kinetic analysis of the specific host response to a murine gammaherpesvirus. *J. Virol.* 72:943-949.
151. Stevenson, P. G. and P. C. Doherty. 1999. Non-antigen-specific B-cell activation following murine gammaherpesvirus infection is CD4 independent in vitro but CD4 dependent in vivo. *J. Virol.* 73:1075-1079.
152. Stevenson, P. G., G. T. Belz, M. R. Castrucci, J. D. Altman, and P. C. Doherty. 1999. A gamma-herpesvirus sneaks through a CD8(+) T cell response primed to a lytic-phase epitope. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96:9281-9286.
153. Stevenson, P. G., G. T. Belz, J. D. Altman, and P. C. Doherty. 1999. Changing patterns of dominance in the CD8+ T cell response during acute and persistent murine gamma-herpesvirus infection. *Eur. J. Immunol.* 29:1059-1067.
154. Stevenson, P. G., S. Efstathiou, P. C. Doherty, and P. J. Lehner. 2000. Inhibition of MHC class I-restricted antigen presentation by gamma 2-herpesviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97:8455-8460.
155. Stewart, J. P., N. J. Janjua, N. P. Sunil-Chandra, A. A. Nash, and J. R. Arrand. 1994. Characterization of murine gammaherpesvirus 68 glycoprotein B (gB) homolog: similarity to Epstein-Barr virus gB (gp110). *J. Virol.* 68:6496-6504.
156. Stewart, J. P., E. J. Usherwood, A. Ross, H. Dyson, and T. Nash. 1998. Lung epithelial cells are a major site of murine gammaherpesvirus persistence. *J. Exp. Med.* 187:1941-1951.
157. Stewart, J. P., N. J. Janjua, S. D. Pepper, G. Bennion, M. Mackett, T. Allen, A. A. Nash, and J. R. Arrand. 1996. Identification and characterization of murine gammaherpesvirus 68 gp150: a virion membrane glycoprotein. *J. Virol.* 70:3528-3535.
158. Stewart, J. P., N. Micali, E. J. Usherwood, L. Bonina, and A. A. Nash. 1999. Murine gamma-herpesvirus 68 glycoprotein 150 protects against virus-induced mononucleosis: a model system for gamma-herpesvirus vaccination. *Vaccine* 17:152-157.
159. Streblov, D. N., C. Soderberg-Naucler, J. Vieira, P. Smith, E. Wakabayashi, F. Ruchti, K. Mattison, Y. Altschuler, and J. A. Nelson. 1999. The human cytomegalovirus chemokine receptor US28 mediates vascular smooth muscle cell migration. *Cell* 99:511-520.
160. Sunil-Chandra, N. P., J. Arno, J. Fazakerley, and A. A. Nash. 1994. Lymphoproliferative disease in mice infected with murine gammaherpesvirus 68. *Am. J. Pathol.* 145 :818-826.
161. Sunil-Chandra, N. P., S. Efstathiou, J. Arno, and A. A. Nash. 1992. Virological and pathological features of mice infected with murine gamma-herpesvirus 68. *J. Gen. Virol.* 73 ( Pt 9):2347-2356.
162. Sunil-Chandra, N. P., S. Efstathiou, and A. A. Nash. 1992. Murine gammaherpesvirus 68 establishes a latent infection in mouse B lymphocytes in vivo. *J. Gen. Virol.* 73 ( Pt 12):3275-3279.
163. Svobodova, J., M. Stancekova, D. Blaskovic, J. Mistrikova, J. Lesso, G. Russ, and P. Masarova. 1982. Antigenic relatedness of alphaherpesviruses isolated from free-living rodents. *Acta Virol.* 26:438-443.

## F. LITERATURVERZEICHNIS

164. Tabi, Z., M. Moutaftsi, and L. K. Borysiewicz. 2001. Human cytomegalovirus pp65- and immediate early 1 antigen-specific HLA class I-restricted cytotoxic T cell responses induced by cross- presentation of viral antigens. *J. Immunol.* 166:5695-5703.
165. Tamashiro, J. C. and D. H. Spector. 1986. Terminal structure and heterogeneity in human cytomegalovirus strain AD169. *J. Virol.* 59:591-604.
166. Tanaka, K., J. P. Zou, K. Takeda, V. J. Ferrans, G. R. Sandford, T. M. Johnson, T. Finkel, and S. E. Epstein. 1999. Effects of human cytomegalovirus immediate-early proteins on p53- mediated apoptosis in coronary artery smooth muscle cells. *Circulation* 99:1656-1659.
167. Tomkinson, B., E. Robertson, R. Yalamanchili, R. Longnecker, and E. Kieff. 1993. Epstein-Barr virus recombinants from overlapping cosmid fragments. *J. Virol.* 67:7298-7306.
168. Trieu-Cuot, P., A. Klier, and P. Courvalin. 1985. DNA sequences specifying the transcription of the streptococcal kanamycin resistance gene in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* 198:348-352.
169. Tripp, R. A., A. M. Hamilton-Easton, R. D. Cardin, P. Nguyen, F. G. Behm, D. L. Woodland, P. C. Doherty, and M. A. Blackman. 1997. Pathogenesis of an infectious mononucleosis-like disease induced by a murine gamma-herpesvirus: role for a viral superantigen? *J. Exp. Med.* 185:1641-1650.
170. Usherwood, E. J., J. P. Stewart, and A. A. Nash. 1996. Characterization of tumor cell lines derived from murine gammaherpesvirus-68-infected mice. *J. Virol.* 70:6516-6518.
171. Usherwood, E. J., A. J. Ross, D. J. Allen, and A. A. Nash. 1996. Murine gammaherpesvirus-induced splenomegaly: a critical role for CD4 T cells. *J. Gen. Virol.* 77 ( Pt 4):627-630.
172. Usherwood, E. J., J. P. Stewart, K. Robertson, D. J. Allen, and A. A. Nash. 1996. Absence of splenic latency in murine gammaherpesvirus 68-infected B cell-deficient mice. *J. Gen. Virol.* 77 ( Pt 11):2819-2825.
173. Usherwood, E. J., D. J. Roy, K. Ward, S. L. Surman, B. M. Dutia, M. A. Blackman, J. P. Stewart, and D. L. Woodland. 2000. Control of gammaherpesvirus latency by latent antigen-specific CD8(+) T cells. *J. Exp. Med.* 192:943-952.
174. Usherwood, E. J., K. A. Ward, M. A. Blackman, J. P. Stewart, and D. L. Woodland. 2001. Latent antigen vaccination in a model gammaherpesvirus infection. *J. Virol.* 75:8283-8288.
175. van Dyk, L. F., J. L. Hess, J. D. Katz, M. Jacoby, S. H. Speck, and H. W. Virgin, IV. 1999. The murine gammaherpesvirus 68 v-cyclin gene is an oncogene that promotes cell cycle progression in primary lymphocytes. *J. Virol.* 73:5110-5122.
176. van Dyk, L. F., H. W. Virgin, and S. H. Speck. 2000. The murine gammaherpesvirus 68 v-cyclin is a critical regulator of reactivation from latency. *J. Virol.* 74:7451-7461.
177. van Zijl, M., W. Quint, J. Briaire, T. de Rover, A. Gielkens, and A. Berns. 1988. Regeneration of herpesviruses from molecularly cloned subgenomic fragments. *J. Virol.* 62:2191-2195.
178. van, B., V. K. Preiter, H. W. Virgin, and S. H. Speck. 1999. Identification and initial characterization of the murine gammaherpesvirus 68 gene M3, encoding an abundantly secreted protein. *J. Virol.* 73:4524-4529.
179. van, B., V. J. Barrett, H. L. Tiffany, D. H. Fremont, P. M. Murphy, G. McFadden, S. H. Speck, and H. W. Virgin, IV. 2000. Identification of a gammaherpesvirus selective chemokine binding protein that inhibits chemokine action. *J. Virol.* 74:6741-6747.
180. van, B., V. B. Levine, S. B. Kapadia, J. E. Goldman, S. H. Speck, and H. W. Virgin. 2002. Critical role for a high-affinity chemokine-binding protein in gamma- herpesvirus-induced lethal meningitis. *J. Clin. Invest* 109:905-914.
181. Verkhusha, V. V., H. Otsuna, T. Awasaki, H. Oda, S. Tsukita, and K. Ito. 2001. An enhanced mutant of red fluorescent protein DsRed for double labeling and developmental timer of neural fiber bundle formation. *J. Biol. Chem.* 276:29621-29624.

## F. LITERATURVERZEICHNIS

182. Vieira, J., H. E. Farrell, W. D. Rawlinson, and E. S. Mocarski. 1994. Genes in the HindIII J fragment of the murine cytomegalovirus genome are dispensable for growth in cultured cells: insertion mutagenesis with a lacZ/gpt cassette. *J. Virol.* 68:4837-4846.
183. Virgin, H. W., P. Latreille, P. Wamsley, K. Hallsworth, K. E. Weck, A. J. Dal Canto, and S. H. Speck. 1997. Complete sequence and genomic analysis of murine gammaherpesvirus 68. *J. Virol.* 71:5894-5904.
184. Virgin, H. W., R. M. Presti, X. Y. Li, C. Liu, and S. H. Speck. 1999. Three distinct regions of the murine gammaherpesvirus 68 genome are transcriptionally active in latently infected mice. *J. Virol.* 73:2321-2332.
185. Wagner, M., S. Jonjic, U. H. Koszinowski, and M. Messerle. 1999. Systematic excision of vector sequences from the BAC-cloned herpesvirus genome during virus reconstitution. *J. Virol.* 73:7056-7060.
186. Wagner, M., A. Gutermann, and U. H. Koszinowski. 2002. Major histocompatibility complex class I allele-specific cooperation and competitive interactions between immune evasion proteins of cytomegalovirus. *J. Exp. Med.* 44:8805-816.
187. Wakeling, M. N., D. J. Roy, A. A. Nash, and J. P. Stewart. 2001. Characterization of the murine gammaherpesvirus 68 ORF74 product: a novel oncogenic G protein-coupled receptor. *J. Gen. Virol.* 82:1187-1197.
188. Wang, G. H., T. L. Garvey, and J. I. Cohen. 1999. The murine gammaherpesvirus-68 M11 protein inhibits Fas- and TNF- induced apoptosis. *J. Gen. Virol.* 80 ( Pt 10):2737-2740.
189. Weber, P. C., M. Levine, and J. C. Glorioso. 1987. Rapid identification of nonessential genes of herpes simplex virus type 1 by Tn5 mutagenesis. *Science* 236 :576-579.
190. Weck, K. E., A. J. Dal Canto, J. D. Gould, A. K. O'Guin, K. A. Roth, J. E. Saffitz, S. H. Speck, and H. W. Virgin. 1997. Murine gamma-herpesvirus 68 causes severe large-vessel arteritis in mice lacking interferon-gamma responsiveness: a new model for virus- induced vascular disease. *Nat. Med.* 3:1346-1353.
191. Weck, K. E., M. L. Barkon, L. I. Yoo, S. H. Speck, and H. W. Virgin, IV. 1996. Mature B cells are required for acute splenic infection, but not for establishment of latency, by murine gammaherpesvirus 68. *J. Virol.* 70:6775-6780.
192. Weck, K. E., S. S. Kim, H. W. Virgin, IV, and S. H. Speck. 1999. B cells regulate murine gammaherpesvirus 68 latency. *J. Virol.* 73:4651-4661.
193. Weck, K. E., S. S. Kim, H. W. Virgin, IV, and S. H. Speck. 1999. Macrophages are the major reservoir of latent murine gammaherpesvirus 68 in peritoneal cells. *J. Virol.* 73:3273-3283.
194. Wildy, P., P. G. Gell, J. Rhodes, and A. Newton. 1982. Inhibition of herpes simplex virus multiplication by activated macrophages: a role for arginase? *Infect. Immun.* 37:40-45.
195. Wolff, D., G. Jahn, and B. Plachter. 1993. Generation and effective enrichment of selectable human cytomegalovirus mutants using site-directed insertion of the neo gene. *Gene* 130:167-173.
196. Woodland, D. L., E. Flano, E. J. Usherwood, L. Liu, I. J. Kim, S. M. Husain, J. T. Sample, and M. A. Blackman. 2001. Antigen expression during murine gamma-herpesvirus infection. *Immunobiology* 204:649-658.
197. Wu, T. T., E. J. Usherwood, J. P. Stewart, A. A. Nash, and R. Sun. 2000. Rta of murine gammaherpesvirus 68 reactivates the complete lytic cycle from latency. *J. Virol.* 74:3659-3667.
198. Wu, T. T., L. Tong, T. Rickabaugh, S. Speck, and R. Sun. 2001. Function of Rta is essential for lytic replication of murine gammaherpesvirus 68. *J. Virol.* 75:9262-9273.
199. Xiao, J., T. Tong, X. Zhan, E. Haghjoo, and F. Liu. 2000. In vitro and in vivo characterization of a murine cytomegalovirus with a transposon insertional mutation at open reading frame M43. *J. Virol.* 74:9488-9497.
200. Yamanishi, K. and F. Rapp. 1977. Temperature-sensitive mutants of human cytomegalovirus. *J. Virol.* 24:416-418.

## F. LITERATURVERZEICHNIS

201. Yarbrough, D., R. M. Wachter, K. Kallio, M. V. Matz, and S. J. Remington. 2001. Refined crystal structure of DsRed, a red fluorescent protein from coral, at 2.0-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98:462-467.
202. Yu, D., G. A. Smith, L. W. Enquist, and T. Shenk. 2002. Construction of a self-excisable bacterial artificial chromosome containing the human cytomegalovirus genome and mutagenesis of the diploid TRL/IRL13 gene. *J. Virol.* 76:2316-2328.
203. Yu, Y. Y., M. R. Harris, L. Lybarger, L. A. Kimpler, N. B. Myers, H. W. Virgin, and T. H. Hansen. 2002. Physical association of the K3 protein of gamma-2 herpesvirus 68 with major histocompatibility complex class I molecules with impaired peptide and beta(2)-microglobulin assembly. *J. Virol.* 76:2796-2803.
204. Zhan, X., M. Lee, J. Xiao, and F. Liu. 2000. Construction and characterization of murine cytomegaloviruses that contain transposon insertions at open reading frames m09 and M83. *J. Virol.* 74:7411-7421.
205. Zhan, X., M. Lee, G. Abenes, R. Von, I. C. Kittinunvorakoon, P. Ross-Macdonald, M. Snyder, and F. Liu. 2000. Mutagenesis of murine cytomegalovirus using a Tn3-based transposon. *Virology* 266:264-274.
206. Zhang, Y., F. Buchholz, J. P. Muyrers, and A. F. Stewart. 1998. A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *Nat. Genet.* 20:123-128.
207. Zhou, F. C., Y. J. Zhang, J. H. Deng, X. P. Wang, H. Y. Pan, E. Hettler, and S. J. Gao. 2002. Efficient infection by a recombinant Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus cloned in a bacterial artificial chromosome: application for genetic analysis. *J. Virol.* 76:6185-6196.

## G. POSTER

### G. POSTER

Wagner M, Fuchs O, Koszinowski U K. ORF 10 of murine herpesvirus 68 (MHV-68) seems to confer properties important for replication in endothelial cell lines. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie. Erlangen, 2002.

Fuchs O, Menard C, Koszinowski U K and Wagner M. Generation of a library of 226 viable murine herpesvirus 68 (MHV-68) mutants with random transposon insertion using invasive bacteria and their phenotypic screening. 26<sup>th</sup> International Herpesvirus Workshop. Regensburg, 2001.

Wagner M, Fuchs O, Koszinowski UK. New techniques for herpesvirus mutagenesis. EMBO Meeting. Stockholm, Schweden, 2001.

H. ANHANG

1. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1 .....	3
Abb. 2 .....	4
Abb. 3 .....	5
Abb. 4 .....	7
Abb. 5 .....	17
Abb. 6 .....	18
Abb. 7 .....	20
Abb. 8 .....	21
Abb. 9 .....	23
Abb. 10 .....	47
Abb. 11 .....	47
Abb. 12 .....	50
Abb. 13 .....	50
Abb. 14 .....	51
Abb. 15 .....	52
Abb. 44 .....	53
Abb. 17 .....	55
Abb. 18 .....	57
Abb. 19 .....	58
Abb. 20 .....	61
Abb. 21 .....	61
Abb. 22 .....	62
Abb. 23 .....	64
Abb. 24 .....	65
Abb. 25 .....	66
Abb. 26 .....	67
Abb. 27 .....	69
Abb. 28 .....	71
Abb. 29 .....	72
Abb. 30 .....	72
Abb. 31 .....	73
Abb. 32 .....	73
Abb. 33 .....	74
Abb. 34 .....	78

2. TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1. ....	55
Tab. 2. ....	69
Tab. 3. ....	70

## H. ANHANG

### 3. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

aa	Aminosäure
Abb.	Abbildung
apoE	Apolipoprotein E
BAC	bacterial artificial chromosome (künstliches bakterielles Chromosom)
ca.	circa
bp	Basenpaar(e)
cam	Chloramphenicol
CD	cluster of differentiation
CMV	Cytomegalovirus
CPE	cytopathic effect (zytopathischer Effekt)
C-terminal	carboxyterminal
d	Tag(e)
D	Dalton
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
EBV	Ebstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EHV	equine herpesvirus (Pferde-Herpesvirus)
gent	Gentamicin
gfp	green fluorescent protein (grün-fluoreszierendes Protein)
GPCMV	guinea pig CMV (Meerschweinchen-CMV)
gpt	Guanosyl-Phosphoribosyl-Transferase
h	Stunde(n)
HA	Hämagglutinin
HCMV	humanes Cytomegalievirus
HHV-6	Humanes Herpesvirus 6
HHV-8	Humanes Herpesvirus 8
HIV	human immunodeficiency virus (humanes Immundefizienzvirus)
HSV	Herpes-simplex-Virus
IFN	Interferon
IL	Interleukin
INOS	induzierbare NO (Stickstoffmonoxid) - Synthetase
i.p.	intraperitoneal
kbp	Kilobasenpaar(e)
kan	Kanamycin
kD	Kilodalton
kV	Kilovolt
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
M	molar
MCMV	murines Cytomegalievirus
MCS	multiple cloning site
MEF	murine embryonale Fibroblasten
MHC	major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MHV-68	murines Herpesvirus 68
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
moi	multiplicity of infection
neo	Neomycin
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei einer Wellenlänge $\lambda=600$ nm
ORF	open reading frame (offener Leserahmen)

## H. ANHANG

PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PFU	plaque forming unit
p.i.	post infectionem
PKC	Phosphokinase C
PRV	Pseudorabiesvirus
-R	-Rezeptor
REF	rat embryonal fibroblasts
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SAP	shrimp alkaline phosphatase
SDS	sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
sec	Sekunde(n)
s.o.	siehe oben
sog.	so genannt(e/er/en)
spec	Spectinomycin
s.u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
TE	Tris/EDTA
U	Unit(s)
ÜN	über Nacht
V	Volt
v.a.	vor allem
Vol.	Volumen/ina
VZV	Varizella-Zoster-Virus
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
µl	Mikroliter
Ω	Ohm

Bei der Angabe von Nukleotidsequenzen wurden die Basen entsprechend ihrer Anfangsbuchstaben bezeichnet:

Adenin	A	Thymin	T
Cytosin	C	Guanin	G

Aminosäuren wurden in Anlehnung an den Einbuchstaben-Code angegeben:

Alanin	A	Cystein	C
Asparaginsäure	D	Glutaminsäure	E
Phenylalanin	F	Glycin	G
Histidin	H	Isoleucin	I
Lysin	K	Leucin	L
Methionin	M	Asparagin	N
Prolin	P	Glutamin	Q
Arginin	R	Serin	S
Threonin	T	Valin	V
Tryptophan	W	Tyrosin	Y

## H. ANHANG

### 4. OLIGONUKLEOTIDSEQUENZEN

Name	Nukleotidsequenz 5'-3'
M13r - IN	GGT CAT AGC TGT TTC CTG CGG CC
M13f - IN	ACT GGC CGT CGT TTT ACA GCG GC
KAN – aphA - down	CTG GGG ATC AAG CCT GAT TGG GA
KANm - down	GGT ATC TTT AAA TAC TGT AG
KANm – down2	GCG AAA ACT GGG AAG AAG ACA
KAN 5' - down	GGT AAG ATT ATA AGG TA
KAN 5' - up	CAT AGA GTA ATT CTG TAA AGG TCC
KAN 3' - down	GTT CGC TAG ATA GGG GTC CCG
RFP 5' - down	CAT GGT GAT GCG GTT TTG GC
RFP 5' - down2	GCC ACA ACA GCG TGA AGC TGA
RFP 5' - down3	CCG TGC AGC TGC CCG GCT ACT

## H. ANHANG

### 5. DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Koszinowski am Max-von-Pettenkofer-Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Abteilung Virologie, durchgeführt.

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Koszinowski für die Betreuung der Promotion, die großzügige Bereitstellung der Mittel zur Durchführung der Arbeit und seine Diskussionsbereitschaft bedanken.

Bei Herrn Prof. Heesemann als Sprecher des DFG-Graduiertenkollegs „Infektion und Immunität“ möchte ich mich herzlich für den Anteil des Graduiertenkollegs an der Bereitstellung der Mittel zur Durchführung der Arbeit, sowie für die Möglichkeit der Teilnahme am Graduiertenkolleg bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Markus Wagner für die exzellente praktische Betreuung meiner Arbeit und die vielen Möglichkeiten zur Diskussion. Ohne seine Hilfestellung und Anregungen wäre die Durchführung dieser Arbeit unmöglich gewesen.

Für die Bereitstellung von Materialien möchte ich folgenden Mitarbeitern des Institutes danken: Sabine Linke, Michael Fitz, Carine Menard, Eva Borst und Wolfram Brune.

Außerdem möchte ich mich bei allen übrigen Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe für die Hilfsbereitschaft, für nützliche Diskussionen und das kollegiale Arbeitsklima bedanken.

Mein außerordentlicher Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, ohne die diese Arbeit niemals möglich gewesen wäre.

## H. ANHANG

### 6. ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Die aus fremden Quellen stammenden Daten sind als solche kenntlich gemacht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

# Curriculum vitae

## Oliver Fuchs

### Persönliche Daten

---

**Geburtsdatum** : 25.10.1974  
**Geburtsort** : Bad Kreuznach  
**Staatsangehörigkeit** : deutsch  
**Adresse** : Pfarrweg 2a, c/o Fehringer  
81539 München  
**Telefon:** : 089-681402  
0179-4765103  
**E-Mail** : oli\_fuchs@gmx.de

### Ausbildung

---

**Mai 2004** : 3. Staatsexamen (1.0)  
**April 1999 – Mai 2004** : Studium der Humanmedizin, Ludwig-Maximilians-Universität,  
München, klinischer Studienabschnitt  
**März 2003** : 2. Staatsexamen (1.0)  
**April 2000** : 1. Staatsexamen (1.0)  
**April 1997 - April 1999** : Studium der Humanmedizin, Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg,  
vorklinischer Studienabschnitt, Physikum (1.3)  
**1997 / 1998** : Sommersprachkurse Schwedisch in Storvik, Schweden  
und Stockholm, Schweden  
**1995 - 1997** : Studium Biologie, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf  
**1994 - 1995** : Zivildienst in Bad Münster a.St. - Ebernburg  
**1987 - 1994** : Alfred-Delp-Schule, Hargesheim; Abitur 1994 mit Abschlussnote 1.0;  
Schüleraustausch mit „Upplands-Bro-Gymnasiet“, Stockholm,  
Schweden  
**1985 - 1987** : Geschwister-Scholl-Gymnasium, Ludwigshafen/Rhein  
**1982 - 1985** : Grundschule in Hargesheim

## H. ANHANG

### praktische Erfahrung

---

- 06/2004 – jetzt** : AiP/Assistent Päd. Endokrinologie/Diabetologie, Leitung Prof. Dr. med. H.-P. Schwarz, Dr. von Haunersches Kinderspital der LMU München
- 11 / 2003 – 02 / 2004** : Praktisches Jahr im Fach Anästhesie (perioperative Anästhesie sowie Herzchirurgischer Intensivstation) an der Klinik für Anästhesiologie des Universitätsklinikums Großhadern der LMU München
- 08 / 2003 – 11 / 2003** : Praktisches Jahr im Fach Chirurgie (Unfallchirurgie und Plastische sowie Handchirurgie) an der Chirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Großhadern der LMU München
- 03 / 2003 – 08 / 2003** : Praktisches Jahr im Fach Innere Medizin im Rahmen der München-Harvard-Allianz (Harvard Medical International), Aufenthalte am Massachusetts General Hospital (MGH), Boston, USA und am Mt. Auburn Hospital, Cambridge, USA; Stipendium der LMU München
- 04 / 2000 – 02 / 2003** : Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Humanmedizin (Dr.med.) mit dem Thema „Der Einfluß viraler Gene auf Zelltropismus: Transposonmutagenese des murinen Herpesvirus 68 (MHV-68)“ in der Arbeitsgruppe Dr.rer.nat. Markus Wagner; Doktorvater Prof. Dr.med. Ulrich H. Koszinowski; Leiter des Max-von-Pettenkofer-Instituts für Med. Mikrobiologie und Hygiene der LMU, München; hierzu Mitglied und DFG-Stipendiat des Graduiertenkollegs „Infektion und Immunität“
- 10 / 2001 – 02 / 2003** : studentische Hilfskraft für PD Dr. Erika von Mutius, MSc, an der Dr. von Haunerschen Kinderspital der LMU München; Organisator der Münchner Gruppe für epidemiologische Studie HEPMEAP (Health Effects of Particulate Matter Exhaust Ambient Pollution), Effekte der Abgasstaubbelastung auf die Entwicklung kindlicher Atemwegserkrankungen; Teilnahme an Treffen in Rom, Italien, und Bilthoven, Niederlande
- 09 – 10 / 2001** : vierwöchige Famulatur in der Abteilung Kardiologie / Innere Medizin am Städt. Krankenhaus München-Harlaching
- 09 / 2001** : Teilnahme an der McKinsey & Company Summer Academy 2001 in Passau, Deutschland
- 08 / 2001** : vierwöchige Famulatur in Anästhesie am Universitätskrankenhaus in Lund, Schweden, dabei Absolvierung eines dreitägigen Postgraduierten-Kurses „Basiswissen Intensivmedizin“
- 07 / 2001** : Teilnahme am 26. Internationalen Herpesvirus-Workshop in Regensburg, dabei Vorstellung der bis dato im Rahmen der Dissertation erhaltenen Ergebnisse
- 03 / 2001** : Teilnehmer des “US-EU Medical Educational Exchange (US-EU MEE) - Programmes”, vierwöchiger Aufenthalt und Famulatur am Childrens´ Hospital, Boston, USA (Harvard Medical School), Erstellung eines Fallberichts bezüglich der Erfahrungen einer Patientin mit zystischer Fibrose mit dem US-Gesundheitssystem, einem Bericht über das Gesundheitssystem der USA i.A. und einem Vergleich mit dem der

## H. ANHANG

Bundesrepublik Deutschland in diesem spezifischen Fall; Stipendium der LMU, München

- 08 / 1999** : vierwöchige Famulatur im Institut für Pathologie der LMU München
- Juni 1999 - Juli 2000** : wissenschaftlicher Mitarbeiter von PD Dr. Erika von Mutius am Dr. von Haunerschen Kinderspital der LMU, München
- 1998 - 1999** : Präparierassistent im Rahmen der Anatomiekurse während der vorklinischen Ausbildung an der Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg
- 1997 / 1998** : Laborpraktika im Bereich Tumorummunologie und allgemeiner Immunologie am „Deutschen Krebsforschungszentrum“, Heidelberg und Institut für Immunologie, Heidelberg, sowie im Bereich Neurophysiologie („patch-clamp“) am Institut für Physiologie, Heidelberg
- 1997** : Kopfklinik, Heidelberg, Abt. für Ophthalmologie, Pflegepraktikum
- 1996** : Evangelisches Krankenhaus Düsseldorf, Abt. für Innere Medizin und Onkologie, Pflegepraktikum

### Stipendien

---

- 09 / 2001 – 06 / 2004** : Online-Stipendium durch „e-fellows.net“
- 03 – 08 / 2003** : Stipendium der LMU München; Austauschprogramm mit Harvard-Medical School, Tertiär im Fach „Innere Medizin“ an einem der Harvard Medical School angeschlossenen Lehrkrankenhäuser
- 03 – 04 / 2001** : Stipendium der LMU München; US-EU Medical Educational Exchange (US-EU MEE) - Programm für Fallbericht
- 04 / 2000 – 09 / 2001** : Stipendium der DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft), Mitglied des „Graduiertenkollegs Infektion und Immunität“, Doktorarbeit

### Publikationen

---

- jetzt** : Publikation über Ergebnisse der Dissertation in Arbeit
- 04 / 2002** : Poster mit Titel „ORF 10 of murine herpesvirus 68 (MHV-68) seems to confer properties important for replication in endothelial cell lines“, Deutsche Virologen-Tagung 2002 in Erlangen
- 07 / 2001** : Poster mit Titel „Generation of a library of 226 viable murine herpesvirus 68 (MHV-68) mutants with random transposon insertion using invasive bacteria and their phenotypic screening“, 26<sup>th</sup> International Herpesvirus Workshop 2001 in Regensburg
- 06 / 2001** : Poster mit dem Titel „New techniques for herpesvirus mutagenesis“ EMBO-Meeting 2001 in Stockholm, Schweden

## H. ANHANG

### Sprachen

---

Deutsch : Muttersprache  
Englisch, Schwedisch : sehr gut  
Latein : Schulniveau  
Spanisch : gut  
Norwegisch, Holländisch,  
Italienisch : Grundwissen

### Interessen

---

- Forschung, Virologie, Infektiologie, Immunologie, Kardiologie
- Sprachen
- Politik (1989-1993 aktives Mitglied der "Schüler-Union" und "Junge Union", medizinische Ausbildung (Mitglied von EMSA [European Medical Students' Association], Kongress in Amsterdam 1998)
- Sport: Fitness, Jogging, Hockey, Schwimmen
- Malerei, Musik, Museen, Theater, Oper, Ballett