

AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR  
MEDIZINISCHE MIKROBIOLOGIE UND HYGIENE  
PROF. DR. DR. ANDRÉ GESSNER  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Generierung und molekulare Charakterisierung  
rekombinanter humaner Zytomegalieviren mit  
spezifischen Mutationen im Immediate Early 1-Gen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Eva-Maria Hauer

2011



AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR  
MEDIZINISCHE MIKROBIOLOGIE UND HYGIENE  
PROF. DR. DR. ANDRÉ GESSNER  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Generierung und molekulare Charakterisierung  
rekombinanter humaner Zytomegalieviren mit  
spezifischen Mutationen im Immediate Early 1-Gen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Eva-Maria Hauer

2011

Dekan:

Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter:

PD Dr. Michael Nevels

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Christian Maihöfner

Tag der mündlichen Prüfung:

15. Dezember 2011

**Meinen Eltern und Großeltern**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>4</b>
<b>2.1</b>	<b>Das humane Zytomegalievirus</b> .....	<b>4</b>
2.1.1	Klassifizierung .....	4
2.1.2	Medizinische Aspekte .....	4
2.1.2.1	Epidemiologie .....	4
2.1.2.2	Klinische Bedeutung .....	5
2.1.2.3	Diagnostische Methoden.....	6
2.1.2.4	Antivirale Strategien und prophylaktische Ansätze .....	6
2.1.3	Virionstruktur .....	7
2.1.4	Genomstruktur .....	8
2.1.5	Viraler Infektionszyklus .....	9
2.1.6	IE-Genprodukte .....	11
<b>2.2</b>	<b>Methoden der Herpesvirusmutagenese</b> .....	<b>12</b>
<b>2.3</b>	<b>HCMV IE1-Mutanten</b> .....	<b>15</b>
<b>2.4</b>	<b>PML-Körper</b> .....	<b>17</b>
<b>2.5</b>	<b>Fragestellung</b> .....	<b>19</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>20</b>
<b>3.1</b>	<b>Antikörper</b> .....	<b>20</b>
3.1.1	Primärantikörper .....	20
3.1.2	Sekundärantikörper .....	20
<b>3.2</b>	<b>Nukleinsäuren</b> .....	<b>21</b>
3.2.1	Oligonukleotide .....	21
3.2.2	Plasmide .....	23
3.2.3	BACmide.....	24
<b>3.3</b>	<b>Bakterienstämme und Zelllinien</b> .....	<b>24</b>
3.3.1	<i>E. coli</i> -Stämme .....	24
3.3.2	Humane Zelllinie MRC-5 .....	25
<b>3.4</b>	<b>DNA-Methoden</b> .....	<b>25</b>
3.4.1	Kultivierung und Lagerung von <i>E. coli</i> -Stämmen .....	25
3.4.1.1	Flüssigkulturen.....	25
3.4.1.2	Plattenkulturen .....	25
3.4.1.3	Glyzerinkulturen .....	25
3.4.2	Präparation von doppelsträngiger DNA aus Bakterien.....	26
3.4.2.1	Isolierung von Plasmid-DNA .....	26
3.4.2.2	Isolierung von BAC-DNA .....	27
3.4.3	Konzentrationsbestimmung von DNA .....	28
3.4.4	Agarosegelelektrophorese .....	28
3.4.5	Polymerasekettenreaktion.....	29

3.4.5.1	Quantitative PCR .....	30
3.4.5.2	Mutagenese durch Fusions-PCR .....	31
3.4.5.3	QuikChange®-Mutagenese .....	32
3.4.6	Klonierung von DNA-Fragmenten .....	33
3.4.6.1	Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme .....	33
3.4.6.2	Spaltung von BAC-DNA durch Restriktionsenzyme .....	34
3.4.6.3	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	34
3.4.6.4	Ligation .....	34
3.4.6.5	Bakterientransformation .....	35
3.4.6.6	Charakterisierung rekombinanter Klone .....	35
3.4.7	BAC-Mutagenese mit Hilfe von Transferkonstrukten .....	36
<b>3.5</b>	<b>Protein-Methoden .....</b>	<b>39</b>
3.5.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	39
3.5.2	WB-Analyse .....	40
3.5.2.1	Proteintransfer .....	40
3.5.2.2	Bindung des spezifischen Antikörpers .....	40
3.5.2.3	Detektion des Enzym-markierten Sekundäntikörpers .....	41
3.5.3	IF-Mikroskopie .....	41
3.5.3.1	Fixierung .....	41
3.5.3.2	Immunfärbung und Mikroskopie .....	42
<b>3.6</b>	<b>Zellkulturverfahren .....</b>	<b>42</b>
3.6.1	Kultivierung humaner Zelllinien .....	42
3.6.2	Bestimmung der Zellzahl .....	43
3.6.3	Transfektion eukaryotischer Zellen durch Elektroporation von BAC-DNA .....	43
3.6.4	Transfektion mittels Lipofektion .....	44
3.6.5	Ernten einer HCMV-Präparation .....	44
3.6.6	Virustitration mit dem Plaque-Test .....	45
3.6.7	Sedimentation von Virionen .....	45
3.6.8	Isolierung viraler DNA für <i>real-time</i> PCR .....	46
3.6.9	HCMV-Wachstumskurven .....	46
3.6.10	Dual-Luciferase Reporter Assay .....	46
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>48</b>
<b>4.1</b>	<b>Gesamtkonzept .....</b>	<b>48</b>
<b>4.2</b>	<b>Auswahl und Herstellung der Virusmutanten .....</b>	<b>50</b>
4.2.1	Vorbemerkungen .....	50
4.2.2	Beschreibung der HCMV-IE1-Mutanten .....	50
4.2.3	Mutagenese der IE1-kodierenden Sequenz und Herstellung der Transferplasmide .....	57
4.2.3.1	Herstellung von Transferplasmiden mit IE1-spezifischer Exon 4-Substitution .....	57
4.2.3.2	Herstellung von Transferplasmiden mit IE1-spezifischer Exon 4-WT-Sequenz .....	63
4.2.3.3	Herstellung von Transferplasmiden mit IE1-spezifischen Exon 4-Punktmutationen .....	66
4.2.4	Herstellung rekombinanter BACmide .....	71
4.2.5	Rekonstitution von HCMV-Partikeln aus BACmid-DNA .....	75
4.2.6	Schlussfolgerungen .....	76
<b>4.3</b>	<b>Charakterisierung der HCMV-IE1-Mutanten .....</b>	<b>77</b>
4.3.1	Quantifizierung infektiöser Viruspartikel .....	77
4.3.2	Analyse von Strukturproteinen der Viruspartikel .....	80
4.3.3	Analyse der Virusreplikation .....	82
4.3.4	IE1-abhängige subzelluläre Lokalisation viraler und zellulärer Proteine .....	87
4.3.5	Einfluss der Punktmutationen auf die transaktivierenden Eigenschaften von IE1-72 kDa .....	92
4.3.6	Schlussfolgerungen .....	94

---

<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>96</b>
<b>5.1</b>	<b>Herstellung und Charakterisierung von HCMV-Mutanten.....</b>	<b>96</b>
5.1.1	Herstellung von Virusmutanten mit Hilfe des BAC-Systems .....	96
5.1.2	Problematik der Titerbestimmung von Virusmutanten .....	98
<b>5.2</b>	<b>Neue Erkenntnisse zur Funktion des 72 kDa IE1-Proteins .....</b>	<b>99</b>
5.2.1	Verlust des 72 kDa IE1-Proteins .....	99
5.2.2	Verlust spezifischer funktioneller Bereiche des 72 kDa IE1-Proteins.....	100
5.2.2.1	Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten .....	101
5.2.2.2	Domänen für die Wechselwirkung des IE1-Proteins mit PML-Körpern .....	104
5.2.2.3	Domänen für die transaktivierenden Eigenschaften des IE1-Proteins .....	107
<b>5.3</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>109</b>
<b>6</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>111</b>

**LITERATURVERZEICHNIS****DANKSAGUNG****LEBENS LAUF**

# 1 Zusammenfassung

Das humane Zytomegalievirus (HCMV) gehört zur Subfamilie der  $\beta$ -Herpesviren und zeichnet sich unter anderem durch eine strikte Spezifität und einen langsamen Replikationszyklus aus. Trotz allgemein hoher Prävalenz des Virus beschränken sich HCMV-bedingte Gesundheitsschäden hauptsächlich auf immunsupprimierte Patienten und intrauterin infizierte Feten nach Primärinfektion von Schwangeren. Die vorhandenen Virustatika können wegen ihres ungünstigen Nebenwirkungsprofils und des Auftretens resistenter Virusstämme nicht immer erfolgreich eingesetzt werden, weshalb die Entwicklung neuer Konzepte zur antiviralen Prävention und Therapie eine wichtige Aufgabe darstellt. Hierfür sind das molekularbiologische Studium des Infektionszyklus und der Einfluss kritischer viraler Komponenten von elementarer Bedeutung.

Die viralen *major immediate-early* (MIE)-Proteine beeinflussen als Schlüsselregulatoren in der initialen Phase der Infektion in entscheidender Weise den weiteren Verlauf der HCMV-Replikation und Pathogenese. Das 72 kDa IE1-Protein (IE1) wird dabei als erstes virales Genprodukt nach Infektion synthetisiert. Es akkumuliert in großen Mengen im Kern der Wirtszelle und moduliert dort unter anderem die Chromatin-Struktur, die zelluläre und virale Genexpression sowie die Integrität subnukleärer Multiproteinkomplexe (PML [*promyelocytic leukemia*]-Körper).

Bisher beschriebene HCMV-Mutanten deuten auf eine wichtige, aber nicht essenzielle Rolle des IE1-Proteins für die Virusvermehrung in Zellkultur hin. Um die Konsequenzen des spezifischen Funktionsverlustes der viralen IE1-Genprodukte eindeutig zu klären, wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Typen von Mutationen sowohl in einem etablierten Laborstamm (Towne, TN), als auch in einem klinischen Primärisolat (*fusion inducing factor x*, FIX) in das IE1-spezifische Exon 4 der HCMV MIE-Transkriptionseinheit eingeführt. Einige davon führten über eine Exon 4-Substitution zum kompletten Verlust der Expression von IE1. Darüber hinaus ist eine genaue Kenntnis regulatorischer Proteindomänen innerhalb des IE1-Proteins für die systematische Manipulation einzelner Funktionen unabdingbar. Deshalb wurden zusätzlich, durch minimal invasiven Austausch von einem bis maximal drei Nukleotiden an relevanten Stellen des IE1-spezifischen Exon 4, diverse vermutete Protein-Motive gezielt

ausgeschaltet. Zu diesem Zweck entstanden im ersten Schritt Transferplasmide mit der jeweiligen Mutation im Bereich der IE1-Sequenz, die im weiteren Verlauf mit Hilfe der neuartigen BAC (*bacterial artificial chromosome*)-Technologie, also über homologe Rekombination mit infektiösen HCMV-BACmiden in *Escherichia coli*, die Generierung IE1-mutierter HCMV-Genome ermöglichten. Diese wurden anschließend zur Rekonstitution von Viruspartikeln in permissive, primäre humane Fibroblasten transfiziert. Aus der erfolgreichen Produktion BACmid-abgeleiteter Viren konnte bereits geschlossen werden, dass die punktmutierten IE1-Genprodukte für die HCMV-Vermehrung in Zellkultur nicht absolut notwendig sind. Eine Rekonstitution der vollständig IE1-defizienten Mutanten war hingegen nicht möglich, wahrscheinlich aufgrund eines IE1-unabhängigen negativen Effekts eines transdominant wirksamen Exon 2/3-kodierten Proteins oder einer inhibitorischen Wirkung der im Austausch für das Exon 4 integrierten Genkassette.

Im nächsten Schritt zeigten detaillierte Replikationskinetiken in infizierten humanen Fibroblasten deutliche Unterschiede im Ausmaß der Vermehrungskapazität einzelner Virusmutanten auf. So zog die Störung des hochkonservierten zentralen Bereichs, einschließlich eines vermuteten Leucinzippermotivs, im IE1 des TN- und FIX-Stammes (Mutanten TN/FIX\_L174P und TN/FIX\_K192P) eine erheblich eingeschränkte Virusreplikation nach sich. Gleiches traf für C-terminal trunke IE1-Mutanten zu, denen charakteristische saure Domänen fehlten (Mutanten TN/FIX\_A373Stopp und TN/FIX\_E421Stopp). Dagegen spielte sowohl die Ausschaltung eines putativen Zinkfingermotivs (Mutanten TN/FIX\_C279A) als auch der Verlust der Bindung an das SUMO (*small ubiquitin like modifier*)-1-Protein (Mutante TN/FIX\_K450R) für eine effektive Virusvermehrung in Zellkultur keine Rolle. Für die Virusmutante G476\_Stopp, bei der die am äußersten C-Terminus gelegene Chromatinbindedomäne des IE1-Proteins deletiert wurde, ergab sich für den FIX-Stamm eine Wildtyp-ähnliche, für den TN-Stamm jedoch eine leicht attenuierte Replikationskinetik, was Spekulationen über stammspezifische Unterschiede zulässt.

Desweiteren konnte mit Hilfe immunfluoreszenzmikroskopischer Kollokalisationsstudien bewiesen werden, dass keine der eingeführten Punktmutationen für eine Kollokalisation zwischen IE1 und PML-Körpern erforderlich ist. Die Ausschaltung der SUMOylierung, der Chromatinbindung sowie des putativen Zinkfingermotivs zeigte außerdem keinerlei

Einfluss auf die IE1-vermittelte Auflösung der PML-Körper. Im Gegensatz dazu wurde gezeigt, dass die Auflösung der PML-Körper in strikter Abhängigkeit des vermuteten Leucinzippermotivs erfolgt und auch bei Verlust der sauren Domänen oder Störung des zentralen Bereichs im viralen Protein weitgehend eingeschränkt ist.

Schließlich wurde mit geeigneten Effektorplasmiden im Dual-Luciferase Reporter Assay nachgewiesen, dass die Transaktivierung verschiedener Promotoren durch IE1 deutlich abnimmt, wenn die Struktur des C-Terminus oder des vermuteten Leucinzippermotivs gestört ist. Die Transaktivatorkapazität des viralen Proteins war jedoch bei Verlust des putativen Zinkfingermotivs oder der SUMOylierung von IE1 unbeeinflusst.

Auffälligerweise waren sämtliche Mutanten mit deutlichem Wachstumsnachteil gegenüber dem Wildtyp-Virus auch in ihrer Fähigkeit zur Auflösung der PML-Körper und in ihren Transaktivierungseigenschaften beeinträchtigt. Diese Beobachtung bestätigt, dass die Zerstörung der potenziell antiviralen PML-Körper eine mögliche Erklärung für den attenuierten Phänotyp IE1-mutierter Viren darstellt.

Insgesamt verdeutlichen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass dem HCMV IE1-Protein eine wichtige Funktion im produktiven viralen Infektionszyklus zukommt, obwohl es, zumindest für die Virusvermehrung in Zellkultur, nicht absolut essenziell ist. Allerdings ist davon auszugehen, dass IE1-defiziente oder -mutierte Viren unter den stringenteren Bedingungen natürlicher HCMV-Infektionen des Menschen apathogen sind. In diesem Zusammenhang bieten sich IE1 und speziell einige der hier beschriebenen Sequenzmotive im IE1-spezifischen Exon 4 als potenzielle neue Zielstrukturen für antivirale Strategien an.

## **2 Einleitung**

### **2.1 Das humane Zytomegalievirus**

#### **2.1.1 Klassifizierung**

Das humane Zytomegalievirus (*human cytomegalovirus*, HCMV) (Smith 1956) gehört zu den acht humanpathogenen Herpesviren und stellt unter ihnen als humanes Herpesvirus 5 (HHV-5) den klassischen Vertreter der  $\beta$ -Herpesviren dar, die sich durch eine strikte Speziespezifität, einen langsamen Replikationszyklus und, wie alle Herpesviren, durch lebenslange Persistenz auszeichnen. Der Name beruht auf einer Größenzunahme infizierter Zellen (Zytomegalie) und wurde 1960 erstmals verwendet (Weller *et al.* 1960). HCMV zählt aufgrund der Größe seines linearen doppelsträngigen DNA-Genoms ( $> 230$  Kilobasenpaare [kbp]) und der damit verbundenen hohen Kodierungsfähigkeit ( $> 200$  Proteine) zu den komplexesten Viren, die wir kennen (Mocarski 2001).

#### **2.1.2 Medizinische Aspekte**

##### **2.1.2.1 Epidemiologie**

HCMV ist ubiquitär verbreitet, wobei der Mensch das einzige Reservoir darstellt. Die Prävalenz steigt nach der Kindheit stetig an. Abhängig vom sozioökonomischen Status variieren die Durchseuchungsraten von etwa 50% in Industrie- bis fast 100% in Entwicklungsländern oder in Bevölkerungsschichten mit schlechteren Hygienestandards (Krech 1973; Kumar *et al.* 1979; Mocarski Jr. *et al.* 2007). Die Übertragung erfolgt horizontal über Tröpfchen- und Schmierinfektion bei Austausch von Körperflüssigkeiten (Speichel, Urin, Blut, Zervix-, Samen-, Tränensekret), vertikal über transplazentare Infektion oder die Muttermilch sowie iatrogen im Rahmen von Bluttransfusionen und Transplantationen (Doerr 1987). Nach der Primärinfektion persistiert das Virus lebenslang, unter anderem in Vorläuferzellen des hämatopoetischen Systems (Smith *et al.* 2005), Monozyten (Soderberg-Naucler *et al.* 2001) und dendritischen Zellen (Reeves *et al.* 2005), wobei immer wieder Phasen der Reaktivierung und transienten Virusausscheidung auftreten können.

### 2.1.2.2 Klinische Bedeutung

HCMV-Infektionen verlaufen bei Immunkompetenten meist asymptomatisch, selten mit einer Mononukleose-ähnlichen Symptomatik gekennzeichnet durch Fieber, Hepatosplenomegalie, Ikterus, Transaminasenanstieg, Lymphadenopathie, atypischer Lymphozytose, usw. Schwere Komplikationen können immer dann auftreten, wenn das Immunsystem des Infizierten geschwächt oder noch nicht vollständig ausgebildet ist (Sinzger *et al.* 1996). Bedingt durch die Infektion eines breiten Spektrums an Zielzellen und hämatogene Dissemination kann in solchen Fällen praktisch jedes Organ befallen werden.

Eine Primärinfektion der Mutter in der Frühphase einer Schwangerschaft hat in etwa 40% der Fälle eine Infektion des Fetus zur Folge (Stagno 1986). Davon bestehen bei etwa 10% zum Zeitpunkt der Geburt schwere Symptome wie Hepatomegalie, Ikterus, Panzytopenie, Mikrozephalie, periventrikuläre Kalzifizierung, Chorioretinitis oder Hepatitis (Boppana *et al.* 1992). Von den bei Geburt asymptomatischen 90% der intrauterin infizierten Kinder entwickeln bis zu 25% Spätschäden wie psychomotorische Entwicklungsstörung, geistige Retardierung oder Hörverlust (Stagno 1986; Doerr 1987; Fowler *et al.* 1997). Dementsprechend stellt HCMV die häufigste Ursache für Geburtsdefekte und Taubheit im Kindesalter dar und ist mit einer Infektionsrate von 0,2-2,2% aller Lebendgeburten gleichzeitig die häufigste kongenitale virale Infektion überhaupt (Pass 2001). Kommt es während der Schwangerschaft zu einer rekurrenden Infektion der Mutter, werden maximal 2% der Kinder infiziert, davon zeigen bis zu 1% bei Geburt Zeichen einer klinischen Manifestation (Stagno *et al.* 1982). Durch peri- oder postnatale Infektion über im Geburtskanal ausgeschiedenes Virus oder virushaltige Muttermilch sind hauptsächlich Frühgeborene bedroht (Yeager *et al.* 1981).

Im Rahmen einer Immunsuppression nach einer Transplantation solider Organe, Stammzellen oder Knochenmark, kann es durch eine Primärinfektion oder durch Reaktivierung des persistierenden Virus zu schweren opportunistischen, generalisierten oder organbezogenen Erkrankungen wie interstitielle Pneumonie, Hepatitis, Kolitis oder Affektion des zentralen Nervensystems kommen, die alle mit hoher Morbidität und Mortalität einhergehen (Meyers 1989; Ljungman *et al.* 2002). Vermutlich begünstigt HCMV ebenfalls eine Dysfunktion oder Abstoßung des Transplantates (Grattan *et al.* 1989; Yilmaz *et al.* 1996). Auch *acquired immunodeficiency syndrome* (AIDS)-Patienten

sind durch eine Primärinfektion oder Reaktivierung besonders gefährdet. Hier stellte vor Einführung der sogenannten HAART (*highly active antiretroviral therapy*) vor allem die HCMV-Retinitis eine gefürchtete Komplikation dar (Macher *et al.* 1983).

Bei genetisch bedingter Immunschwäche, wie dem *severe combined immunodeficiency* (SCID)-Syndrom, können vergleichbare Krankheitsbilder wie nach iatrogenen Immunsuppression vorliegen (Blackman *et al.* 2004). Daneben mehren sich die Hinweise darauf, dass HCMV bei immunkompetenten Menschen mit Arteriosklerose, Autoimmunerkrankungen, chronischen Entzündungen oder bestimmten Tumorarten assoziiert sein könnte (Hendrix *et al.* 1990; Melnick *et al.* 1995; Cobbs *et al.* 2002; Cinatl *et al.* 2004; Elkind *et al.* 2010).

### **2.1.2.3 Diagnostische Methoden**

Diagnostische Methoden zum Nachweis einer bestehenden HCMV-Infektion und einer Zytomegalie-assoziierten Erkrankung umfassen Virusanzüchtung in Zellkultur, histologische Untersuchung, serologische Methoden, Nachweis des viralen pp65-Antigens in Leukozyten und Detektion viraler Nukleinsäuren mittels quantitativer PCR (de Jong *et al.* 1998). Die gebräuchlichsten Methoden zur Identifikation einer HCMV-Infektion und zum Therapiemonitoring sind die Bestimmung der Virus-DNA mittels PCR und der Nachweis einer pp65-Antigenämie.

### **2.1.2.4 Antivirale Strategien und prophylaktische Ansätze**

Als antivirales Chemotherapeutikum steht routinemäßig, als prophylaktischer oder präemptiver Ansatz bei Transplantationen oder zur Therapie schwerer HCMV-Erkrankungen bei Immunsupprimierten oder kongenital infizierten Kindern, in erster Linie das Guanosinanalogen Ganciclovir zur Verfügung (Crumpacker 1996). In infizierten Zellen wird es durch die viruseigene Kinase (UL97) aktiviert (Sullivan *et al.* 1992) und führt in triphosphorylierter Form während der viralen DNA-Replikation zum Kettenabbruch (Matthews *et al.* 1988; Oram *et al.* 1998). Kann Ganciclovir aufgrund von Nebenwirkungen (z. B. Myelosuppression) oder Resistenzentwicklungen nicht mehr eingesetzt werden, sind als Alternativpräparate Foscarnet (Phosphoameisensäure) (Chrisp *et al.* 1991) und Cidofovir (Cytidinanalogon) (Hinkle *et al.* 2000) erhältlich, die ebenfalls die virale DNA-Polymerase hemmen. Deren Einsatz wird jedoch vor allem durch ihre

Nephrotoxizität limitiert. In Zukunft könnten besser verträgliche Präparate mit anderem Wirkansatz wie Maribavir Abhilfe schaffen (Biron *et al.* 2002; Andrei *et al.* 2009).

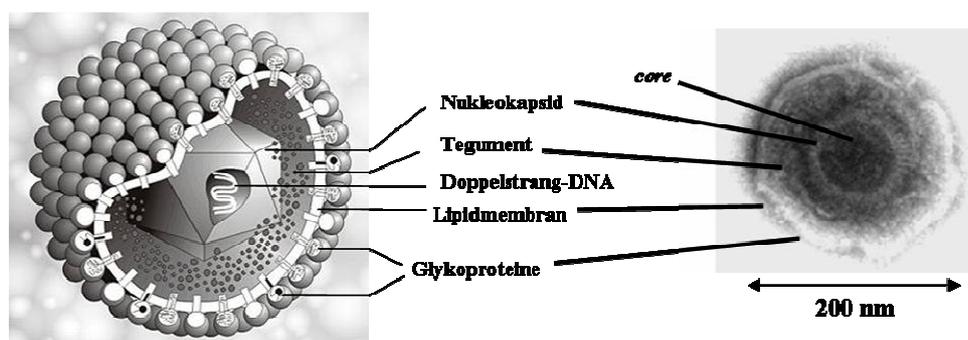
Zur passiven Immunisierung stehen Hyperimmunglobulin-Präparate zur Verfügung, für die zwar keine generelle Indikation im Rahmen von Transplantationen besteht (Hodson *et al.* 2007), die jedoch vor allem bei Auftreten einer interstitiellen Pneumonie in Kombination mit Ganciclovir eingesetzt werden können (Couchoud 2000). Eine adoptive Immuntherapie mit HCMV-spezifischen CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Lymphozytenzellklonen von seropositiven Donoren senkte zwar das Risiko einer CMV-Erkrankung bei allogenen Knochenmarktransplantationen, wird jedoch nicht routinemäßig angewendet (Riddell *et al.* 1992; Walter *et al.* 1995; Einsele *et al.* 2002). Ein wirksamer präventiver Impfstoff gegen HCMV existiert bislang nicht. Studienergebnisse von Vakzinationsversuchen mit lebenden attenuierten Stämmen (z. B. Towne [TN]), immunogenen Glykoprotein-Bereichen, rekombinanter Plasmid-DNA oder Vacciniavirus-Vektoren mit inserierten HCMV-Genen waren unbefriedigend oder bleiben abzuwarten (Adler 1995; Plotkin 2001).

Nicht selten stellt deshalb die Behandlung CMV-bedingter Erkrankungen eine große medizinische Herausforderung dar. Das molekularbiologische Studium der komplexen HCMV-Zell-Wechselwirkungen ist deshalb nicht nur von fundamentaler Bedeutung für das Verständnis viraler Pathogeneseprozesse, sondern stellt auch eine essenzielle Grundlage für die Entwicklung neuer antiviraler Strategien dar.

### 2.1.3 Virionstruktur

HCMV weist die typische Morphologie von Herpesviren auf (Abb. 2.1). Die elektronendichte, innere Strukturkomponente (*core*) der etwa 200 nm großen Virionen besteht aus einem DNA-Komplex und besitzt einen Durchmesser von etwa 75 nm. Sie wird von einem ikosaedrischen Kapsid umgeben, welches sich aus 162 Kapsomeren zusammensetzt und einen Durchmesser von etwa 100 nm umfasst. Zwischen Nukleokapsid und Lipidhülle ist das sogenannte Tegument lokalisiert, eine amorphe, hauptsächlich aus Phosphoproteinen bestehende Proteinmatrix. Drei dieser Phosphoproteine werden als pp150 (ppUL32), pp28 (ppUL99) und pp65 (ppUL83) bezeichnet, wobei pp150 als Antigen in bis zu 90% der Seren von HCMV-positiven Patienten detektiert werden kann (Landini *et al.* 2000) und pp65 bis zu 95% der Proteinmasse des Teguments ausmacht (Gibson *et al.* 1984).

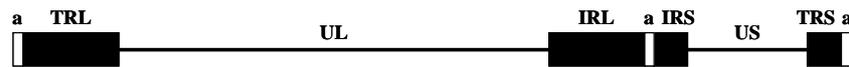
Die Virushülle besteht aus einer etwa 11 nm dicken Lipiddoppelschicht mit eingelagerten zellulären und viralen Glykoproteinen (Tooze *et al.* 1993). Diese vermitteln das Anheften der Viren an den zellulären Rezeptor und leiten die Fusion der Virushülle mit der Zellmembran ein. Durch ihre exponierte Position stellen sie ein Hauptziel für neutralisierende Antikörper im infizierten Wirtsorganismus dar.



**Abb. 2.1: Elektronenmikroskopische und schematische Darstellung des HCMV-Partikels.** Die innerste Strukturkomponente des Virus besteht aus einem DNA-Komplex (*core*), umgeben vom Kapsid. Zwischen der Lipidhülle mit eingelagerten zellulären und viralen Glykoproteinen und dem Nukleokapsid befindet sich die Tegumentschicht (©M. Reschke, 1994).

#### 2.1.4 Genomstruktur

Das doppelsträngige, lineare DNA-Genom des HCMV (Abb. 2.2) hat mit etwa 230 kbp Länge die größte Kodierungskapazität aller humanpathogenen Viren (Chee *et al.* 1990). Das Genom besteht aus einem langen (*unique long*, UL) und einem kurzen (*unique short*, US) nicht-repetitiven Abschnitt. Diese werden durch repetitive Sequenzen voneinander getrennt (*internal repeat short*, IRS bzw. *internal repeat long*, IRL) und an den Enden des Genoms begrenzt (*terminal repeat short*, TRS bzw. *terminal repeat long*, TRL). Im Verbindungsbereich zwischen IRS und IRL sowie an den Genomenden befinden sich in Anzahl und Länge variable, sogenannte  $\alpha$ -Sequenzen, durch deren Rekombination vier isomere Genomformen entstehen können, die in äquimolarer Verteilung in allen HCMV-Populationen vorliegen (Mocarski *et al.* 2001). Basierend auf der oben beschriebenen Nomenklatur erfolgt die Benennung der viralen Gene gemäß ihrer Lokalisation im Genom mit den Präfixen TR, IR, UL und US, wobei die Leserahmen fortlaufend durchnummeriert werden (Spaete *et al.* 1994).



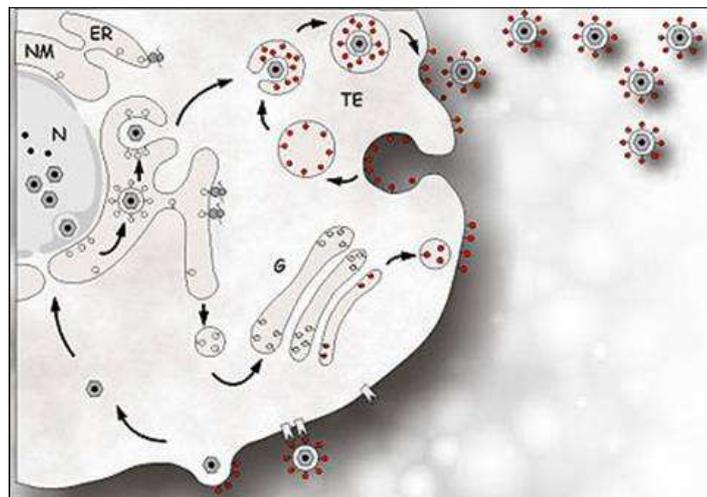
**Abb. 2.2: Schematische Darstellung der HCMV-Genomorganisation.** Das Genom von HCMV umfasst zwei nicht-repetitive Segmente, das UL (*unique long*) und das US (*unique short*) Segment, welche an den Enden von repetitiven Sequenzen, den TR (TRL, *terminal repeat long*; TRS, *terminal repeat short*) und IR (IRL, *internal repeat long*; IRS, *internal repeat short*) begrenzt werden. Die Rekombination der a-Sequenzen resultiert in vier isomeren Genomformen.

### 2.1.5 Viraler Infektionszyklus

In kultivierten humanen Fibroblasten dauert ein Infektionszyklus von HCMV von der Adsorption bis zur Freisetzung der Tochterviren etwa 72 h. Die initiale Anlagerung des Virions erfolgt durch relativ unspezifische Interaktion mit Heparansulfatproteoglykanen der Zelloberfläche (Compton *et al.* 1993). Dadurch wird die nachfolgende spezifische Bindung viraler Glykoproteine an einen zellulären Rezeptor ermöglicht, der bislang jedoch nicht eindeutig identifiziert werden konnte. Im Anschluss daran fusionieren die Membranen von Virus und Wirtszelle in einem pH-unabhängigen Prozess (Compton *et al.* 1993), wodurch die nackten Nukleokapside ins Zytoplasma gelangen. Die Kapside werden vermutlich, analog zu Herpes Simplex Virus Typ 1 (HSV-1), mit Hilfe des zellulären Motorproteins Dynein an den Mikrotubuli entlang zum Zellkern transportiert (Sodeik *et al.* 1997). Nach Bindung der Kapside an die Kernpore wird die Virus-DNA ins Nukleoplasma abgegeben (Ojala *et al.* 2000) und wahrscheinlich zunächst zirkularisiert (LaFemina *et al.* 1983; Marks *et al.* 1984). Die kaskadenartig ablaufende Transkription viraler Gene (Honess *et al.* 1974; Emery *et al.* 1990; Mocarski Jr. *et al.* 2007) sowie die Replikation des DNA-Genoms, finden an „Replikationszentren“ in bestimmten subnukleären Regionen der infizierten Zelle statt (Penfold *et al.* 1997). Diese können durch Kolokalisation viraler Proteine (ppUL44) identifiziert werden.

Die Transkription im sehr frühen (*immediate early*, IE) Stadium (bis etwa 3 h nach Infektion) führt zur Synthese regulatorischer Proteine und ist unabhängig von der Expression anderer viraler Proteine. Die Aktivierung dieser Gene wird überwiegend durch den major IE (MIE)-Promotor reguliert. Er zählt zu den stärksten bekannten eukaryotischen Promotoren und wird durch zelluläre und virale Faktoren transaktiviert. Die IE-Genprodukte leiten daraufhin die zweite Kaskade der Genexpression ein, die frühe (*early*, E) Phase (3 bis etwa 24 h nach Infektion). Dabei werden die E-Transkripte gebildet,

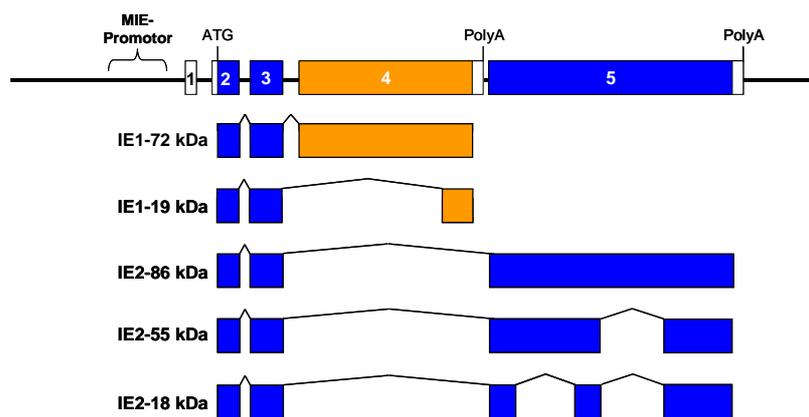
die unter anderem für die virale DNA-Polymerase (ppUL54) und deren Prozessivitätsfaktor (ppUL44) kodieren (Mocarski *et al.* 2001). Das Einsetzen der viralen DNA-Replikation (etwa 24 h nach Infektion), die überwiegend nach dem *rolling circle*-Mechanismus erfolgt (McVoy *et al.* 1994), eröffnet die späte (*late*, L) Phase der Virusvermehrung, während der besonders Strukturkomponenten des Viruspartikels, wie das Tegumentprotein pp150 und virale Kapsid- und Glykoproteine synthetisiert werden. Die Morphogenese der Tochtervirionen beginnt im Zellkern mit dem Zusammenbau der Kapsidstrukturen, in die später virale DNA eingelagert wird. Man unterscheidet entsprechend elektronenmikroskopischer Kriterien drei Kapsidformen, die A-, B- und C-Kapside (Gibson 1996). B-Kapside werden als Vorläufer der A- und C-Kapside angesehen. Während DNA-freie A-Kapside durch fehlerhaftes Verpacken der DNA entstehen, resultiert die korrekte Umhüllung der Genomeinheiten in der Bildung reifer C-Kapside. Während der sogenannten Transportknospung verlassen die Kapside den Zellkern und erreichen zunächst die perinukleäre Zisterne, wobei eine temporäre, von der inneren Kernmembran abgeleitete Lipidhülle angelagert wird (Radsak *et al.* 1989). Diese fusioniert anschließend mit der äußeren Kernmembran, wodurch nackte Nukleokapside ins Zytoplasma transloziert werden. Ihre endgültige Hüllmembran erhalten die neu gebildeten Virionen letztlich an Membranen des Trans-Golgi-Netzwerks oder des frühen tubulären Endosoms im Zuge der sogenannten Reifungsknospung (Tooze *et al.* 1993). Hierbei entstehen durch Abschnürung von Transportvesikeln Kapside mit doppelter Lipidhülle. Die äußere der beiden Hüllen fusioniert mit der Plasmamembran, so dass reife, einfach umhüllte Virionen aus der Zelle freigesetzt werden (Abb. 2.3).



**Abb. 2.3: Schematische Darstellung des HCMV-Infektionszyklus.** Nach spezifischer Interaktion des Virus mit seinem Rezeptor fusioniert die virale Lipidhülle mit der Zellmembran und gelangt zum Zellkern. Dort wird die virale DNA in den Zellkern geschleust, kaskadenartig exprimiert und nach dem *rolling circle*-Mechanismus repliziert. Nach dem Zusammenbau der Kapsidstrukturen wird die DNA verpackt. Die Kapside durchlaufen die Transportknospung und die Reifungsknospung und werden schließlich nach Fusion mit der Zellmembran einfach umhüllt aus der Zelle freigesetzt. Die Pfeile kennzeichnen den Transport von Parental- und Tochterviren und den Transportweg zellulärer und viraler Glykoproteine. Abkürzungen: ER = endoplasmatisches Retikulum, G = Golgi-Apparat, N = Zellkern, NM = nukleäre Membran, TE = tubuläres Endosom (©M. Reschke, 1994).

### 2.1.6 IE-Genprodukte

Die wichtigste Gruppe von HCMV IE-Produkten bilden die IE1- und IE2-Proteinfamilien, die von der viralen MIE-Transkriptionseinheit exprimiert werden. Die kodierende Sequenz der 72 kDa-, 17,5 kDa- und 19 kDa IE1-Proteine entsteht dabei durch alternatives Spleißen aus den Exons 2, 3 und 4. Demgegenüber besteht die cDNA des IE2-Proteins aus den Exons 2, 3 und 5 (Abb. 2.4) (Baracchini *et al.* 1992; Spector 1996; Shirakata *et al.* 2002).



**Abb. 2.4: Die HCMV MIE-Region.** Die Grafik zeigt die MIE-Transkriptionseinheit mit ihren Exons 1-5, dem Startcodon (ATG) sowie Polyadenylierungsstellen (PolyA). Kodierende Exons sind farbig dargestellt. Kürzlich identifizierte Spleißvarianten der IE1- und der IE2-Proteinfamilie sind abgebildet (modifiziert nach Awasthi *et al.* 2004). Die IE1-Proteinfamilie umfasst ein 72 kDa Haupt- und ein 19 kDa Nebenprodukt, die von Sequenzen der Exons 2 bis 4 kodiert werden.

IE2 ist ein nukleäres Phosphoprotein, das durch kovalente Bindung an die Ubiquitin-Homologe SUMO-1 und SUMO-2 modifiziert werden kann (Hofmann *et al.* 2000; Ahn *et al.* 2001; Lee *et al.* 2003). Es fungiert während der Infektion sowohl als Hauptaktivator der viralen Genexpression (Castillo *et al.* 2002), als auch als Repressor des MIE-Promotors (Stenberg 1996) und ist an der Blockade des Zellzyklus der Wirtszelle beteiligt (Wiebusch *et al.* 1999).

Das 72 kDa IE1-Protein ist das erste Protein, das nach der Infektion neu synthetisiert wird. Es wird, wie IE2, ebenfalls durch Phosphorylierung und SUMOylierung posttranslational modifiziert und akkumuliert in großen Mengen im Kern der Wirtszelle (Mocarski *et al.* 2001). Dort kolokalisiert IE1 mit subnukleären Multiproteinkomplexen weitgehend unbekannter Funktion, die als PML-Körper bekannt sind. Im Verlauf der Infektion induziert es deren vollständige Auflösung (Korioth *et al.* 1996; Ahn *et al.* 1997; Nevels *et al.* 2004). Weiterhin interagiert IE1 mit zellulärem Chromatin (Lafemina *et al.* 1989), was mit der Rolle von IE1 als transkriptionellem Aktivator zellulärer und viraler Gene in Verbindung stehen könnte (Castillo *et al.* 2002). So kann IE1 die IE2-vermittelte Transaktivierung verschiedener viraler E-Gene steigern (Malone *et al.* 1990), autoreguliert den MIE-Promotor positiv über NF $\kappa$ B-Bindungsstellen (Cherrington *et al.* 1989; Sambucetti *et al.* 1989) und aktiviert einige zelluläre Promotoren. Daneben wurden IE1 auch antiapoptische, mitogene, mutagene und onkogene Aktivitäten zugeschrieben (Zhu *et al.* 1995; Shen *et al.* 1997; Castillo *et al.* 2002). Desweiteren wird IE1-72 kDa eine intrinsische Kinaseaktivität nachgesagt. Demnach kann IE1 sich selbst, E2F-1, -2, -3 sowie p107 und p130 phosphorylieren (Pajovic *et al.* 1997). Generell übernimmt das virale Protein vermutlich eine Schlüsselrolle während der frühen Phase der HCMV-Infektion, zu der auch die Blockade der Induktion Interferon-induzierter antiviraler Gene durch IE1 maßgeblich beiträgt (Krauss *et al.* 2009).

Weitere IE-Genprodukte sind UL36, UL37, TRS1/IRS1 und US3, die bei Genregulation, Inhibition der Apoptose und Modulation der zellulären MHC (*major histocompatibility complex*) Klasse I-Expression eine Rolle spielen (Stasiak *et al.* 1992; Jones *et al.* 1996; Hayajneh *et al.* 2001; Skaletskaya *et al.* 2001).

## 2.2 Methoden der Herpesvirusmutagenese

Das zufällige Einführen von Punktmutationen in virale Genome ist ein probates Mittel, um eine große Zahl von Virusmutanten zu produzieren, die anschließend phänotypisiert werden können. In den frühen '80er Jahren wurde die Methode der zielgerichteten Mutation individueller Gene für HSV-1 etabliert und später für andere Herpesviren übernommen (Post *et al.* 1981). Seither gestattet es die Insertion eines Selektionsmarkers,

unter Mithilfe des DNA-Rekombinations- und Reparaturapparates der eukaryotischen Zelle, bestimmte virale Gene zu modifizieren oder zu deletieren und die daraus resultierenden Virusnachkommen zu subklonieren und aufzureinigen (Mocarski *et al.* 1996). Diese Mutagenesestrategie ist jedoch sehr aufwändig und teilweise sogar unmöglich, wenn Virusmutanten einen deutlichen Wachstumsdefekt aufweisen. Zudem können Deletionsmutanten essenzieller Gene ausschließlich auf Zelllinien produziert werden, die das betreffende Genprodukt *in trans* komplementieren (DeLuca *et al.* 1985).

Ein neuer Ansatz für die Erforschung herpesviraler Genome wurde etwa zehn Jahre später vorgestellt: Die Klonierung des gesamten viralen Genoms zusammengesetzt aus mehreren überlappenden Cosmidklonen, was die direkte Manipulation klonierter Segmente in *E. coli*, also unabhängig von eukaryotischen Zellen, ermöglicht (van Zijl *et al.* 1988). Durch Kotransfektion der linearisierten überlappenden Cosmide werden unter günstigen Bedingungen vollständige rekombinante infektiöse Viren in Zellen generiert. Ein Vorteil dabei ist, dass die Selektion gegen das Ausgangsvirus wegfällt, da nur die gewünschten Virusmutanten generiert werden. Nachteilig ist sowohl die genetische Instabilität einiger Cosmide, als auch die Notwendigkeit vieler Rekombinationsereignisse um infektiöse Virus-DNA zu rekonstruieren. Beides kann ursächlich für unerwünschte Mutationen sein.

In der Genetik begrenzte oftmals die geringe Größe von Plasmiden und Cosmiden deren Nutzen für die Entschlüsselung großer Säugergenome. Neuere Klonierungsvektoren vermögen auch große DNA-Fragmente aufzunehmen, darunter sind die künstlichen Hefechromosomen (*yeast artificial chromosomes* [YACs]) mit einer Kodierungskapazität von mehr als zwei Megabasenpaaren die größten (Ramsay 1994). Kürzlich wurden Vektoren entwickelt, die auf bakteriellen mini-F (Fertilitäts)-Plasmiden basieren und, in Analogie zu den YACs, *bacterial artificial chromosomes* (BACs, BACmide) genannt wurden (Shizuya *et al.* 1992; Adler *et al.* 2003; Warden *et al.* 2011). F-Plasmide sind etwa 100 bis 250 kbp große, ringförmig geschlossene genetische Elemente und stellen mittlerweile die Vektoren der Wahl bei der Klonierung sogenannter eukaryotischer Genom-Bibliotheken dar. Sie replizieren autonom und liegen in einfacher Kopie in der Bakterienzelle vor. Der F-Faktor ist Voraussetzung für die bakterielle Konjugation und für den genetischen Informationsaustausch unter Prokaryoten. So können BACmide fremde DNA-Sequenzen in einer Größe von bis zu 300 kbp aufnehmen, sind einfach in der Handhabung und relativ stabil. Selbst die herpesviralen Genome können als BACmide

kloniert werden. Das murine Zytomegalievirus (MCMV) war das erste Beispiel dafür (Messerle *et al.* 1997). Seither wurde die BAC-Technologie unter anderem für HCMV (Abb. 2.5), HSV-1 und Pseudorabiesvirus (PRV) erfolgreich etabliert (Borst *et al.* 1999; Smith *et al.* 2000; Saeki *et al.* 2001). Weil die Klonierung des gesamten viralen Genoms in BACmide jedoch äußerst kompliziert wäre, wurde vielmehr die BAC-Kassette mit dem F-Plasmid durch homologe Rekombination in eukaryotischen Zellen in das Virusgenom integriert. Während der Replikation zirkularisiert das lineare doppelsträngige Genom der Herpesviren (Pfuller *et al.* 1996) und die Isolierung ringförmiger Replikationsintermediate ermöglicht es, mit dieser DNA *E. coli*-Zellen zu transformieren, die daraufhin das virale Genom stabil als F-Plasmid vermehren. Der größte Nutzen viraler BACmide liegt jedoch nicht in der bakteriellen Vermehrung, sondern in der von eukaryotischen Zellkultursystemen gänzlich unabhängigen Manipulierbarkeit mittels des bakteriellen Rekombinationsapparates. Durch die klonale Selektion in Bakterien kommt es überdies nicht zur Kontamination mit Wildtyp (WT)-Virus-DNA, was sogar eine Anzüchtung stark attenuierter Virusmutanten ermöglicht. Zur Vermeidung unerwünschter Rekombinationen über repetitive Sequenzmotive im Genom von Herpesviren sollten Herpesvirus-BACmide in *E. coli*-Stämmen propagiert werden, in denen das recABCD Rekombinationssystem nicht funktionell ist (Shizuya *et al.* 1992). Mutagenisierte virale BACmide können in ausreichender Menge aus den Bakterien präpariert werden. Nach Transfektion dieser DNA in permissive eukaryotische Zellen lässt sich das Wachstumsverhalten oder der Phänotyp der Virusmutante *in vitro* bestimmen. Auf diese Weise wurden bereits zahlreiche Informationen über Herpesviren gewonnen (zur Übersicht: (Brune *et al.* 2000)).



**Abb. 2.5: Genom-Struktur eines HCMV-BACmids.** Die F-Plasmid-Sequenzen umfassen Replikations- und Partitions-Funktionen (*repE*, *parA* und *parB*), den Replikationsursprung (*ori*), das Chloramphenicol-Resistenzgen (*Cm<sup>r</sup>*) sowie eine eukaryotische GFP (*green fluorescent protein*)-Expressionskassette. Außerdem ist der Bereich von UL122 (IE2) und UL123 (IE1) in der UL-Region des HCMV-Genoms abgebildet (modifiziert nach (Lee *et al.* 2004)).

### 2.3 HCMV IE1-Mutanten

Bisher wurden in der Literatur nur wenige IE1-spezifische HCMV-Mutanten beschrieben. Davon am besten charakterisiert ist die CR208-Mutante (Greaves *et al.* 1998), die durch homologe Rekombination in eukaryotischen Zellen generiert wurde und bei der das IE1-spezifische Exon 4 der MIE-Region entfernt wurde. Diese 1413 bp umfassende Deletion sollte nur IE1-Genprodukte betreffen, da die MIE-Exons 2, 3 und 5, sowie wichtige Spleißstellen und andere Signale zur Herstellung IE2-spezifischer Transkripte unberührt blieben. Funktionelle Untersuchungen dieser Mutante in humanen Fibroblasten deuteten erstmals darauf hin, dass das IE1-Protein eine Schlüsselfunktion während der sehr frühen nukleären Phase der HCMV-Infektion einnimmt. Infolgedessen zeigt die CR208-Virusmutante schwere Replikationsdefekte, die mit einer globalen Blockierung der Expression viraler E-Gene korrelieren (Greaves *et al.* 1998; Gawn *et al.* 2002; Nevels *et al.* 2004) und am ausgeprägtesten unter „*single hit*“-Bedingungen sind, wenn Zellen von nur jeweils einem einzelnen Viruspartikel infiziert werden (*multiplicity of infection* [MOI]  $\leq 1$  *plaque forming unit* [PFU]/Zelle). Hingegen verhält sich das CR208-Virus nach Infektion mit mehreren infektiösen Partikeln pro Zelle (MOI  $\geq 1$  PFU/Zelle) WT-ähnlich (Greaves *et al.* 1998; Gawn *et al.* 2002). Dieser MOI-abhängige Phänotyp der IE1-Mutante könnte in einem gesteigerten Angebot an viralen Transkriptionsfaktoren aus dem Virustegument (z. B. pp71 und pTRS1/pIRS1) bei hoher MOI begründet sein. Zusätzlich oder alternativ dazu resultiert die vermehrte Anzahl viraler Genome pro Zelle bei hoher MOI möglicherweise in einer beschleunigten und/oder erhöhten Expression viraler IE-Proteine (z. B. IE2), welche das Fehlen von IE1 kompensieren könnte.

Da also ein komplettes Fehlen des IE1-Proteins zumindest konditional zu deutlich eingeschränkter Virusvermehrung in Zellkultur führt, ergibt sich als nächster Schritt die Frage, ob sich dieser Funktionsverlust durch Modifikation spezifischer Bereiche der IE1-spezifischen Exon 4-Sequenz reproduzieren lässt. Dazu müsste man Phänotypen von Viren charakterisieren, bei denen nur gewisse Abschnitte der MIE-Sequenz verändert oder gar nur Punktmutationen an relevanten Stellen eingebracht wurden. In der Literatur gibt es dazu erst wenige Beiträge. Beispielsweise findet man die Beschreibung von IE1-K450R-Virusmutanten der Stämme AD169 (Nevels *et al.* 2004) und TN (Lee *et al.* 2004), die

beide über ortsgerichtete Mutagenese hergestellt wurden und teils attenuiertes Wachstum aufweisen (Tab. 2.1).

Mehr Informationen ergaben sich aus Transfektionsstudien mit mutierten IE1-Proteinen. Hier konnten einige wichtige Sequenzbereiche innerhalb des IE1-Proteins mit bestimmten Funktionen oder Eigenschaften des IE1-Proteins assoziiert werden: Beispielsweise die SUMOylierung von IE1 mit dem Lysinrest an Stelle 450 des Aminosäurecodes oder die Fähigkeit zur Auflösung von PML-Körpern mit dem Leucinrest an Stelle 174. Es ist jedoch essenziell, sämtliche Auswirkungen von Mutationen des IE1-Proteins nicht nur *in vitro* zu untersuchen, sondern im Kontext einer authentischen viralen Infektion. Lange Zeit war dies sehr schwierig, weil es technisch fast unmöglich war, in das große HCMV-Genom genau definierte Mutationen einzubringen. Hier eröffnete die Entwicklung der BAC-Technologie (2.2) neue Möglichkeiten zur Mutagenese von Herpesviren. Die vorliegende Arbeit beschreibt die Etablierung dieser Technik in der Arbeitsgruppe. Auf diese Weise wurden eine IE1-defiziente HCMV-Virusmutante und sieben verschiedene Viruspunktmutanten des laboradaptierten Stammes TN sowie des klinischen FIX-Isolats generiert. Mit der Charakterisierung der Phänotypen dieser Virusmutanten können neue Aussagen zu funktionell relevanten Genombereichen innerhalb der IE1-spezifischen Exon 4-Sequenz getroffen werden. Langfristig gesehen könnten diese Informationen von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung von Strategien zur gezielten antiviralen Prävention oder Therapie sein.

IE1-Mutante	Mutation in der MIE-Sequenz	Phänotyp	Quelle
CR208	1413-bp Deletion von Exon 4	MOI-abhängig	(Greaves <i>et al.</i> 1998)
K450R	Punktmutation K450R in IE1	attenuiert	(Nevels <i>et al.</i> 2004)
IE1 (K450R)	Punktmutation K450R in IE1	rekonstituierbar	(Lee <i>et al.</i> 2004)
IE1( $\Delta$ 421-475)	Deletion der aziden Domäne	MOI-abhängig	(Huh <i>et al.</i> 2008)
TN $\Delta$ IE1AD1-S/P	Deletion der aziden und serin-prolin-reichen Domäne	attenuiert	(Krauss <i>et al.</i> 2009)

**Tab. 2.1: Übersicht über bereits bekannte HCMV IE1-Virusmutanten.**

## 2.4 PML-Körper

PML-Körper werden auch als *PML oncogenic domains* (PODs) oder *nuclear domain 10* (ND10) bezeichnet und sind nukleäre sphärische Multiproteinkomplexe von 0,3 bis 1,0  $\mu\text{m}$  Durchmesser (Ascoli *et al.* 1991) (Abb. 2.6). Sie wurden ursprünglich 1960 mit Hilfe der Elektronenmikroskopie entdeckt (de The *et al.* 1960) und liegen in nahezu jedem eukaryotischen Zelltyp in einer Anzahl von ungefähr zehn bis 20 vor. Typischerweise sind sie im Interchromatinraum lokalisiert und mit der Kernmatrix assoziiert.

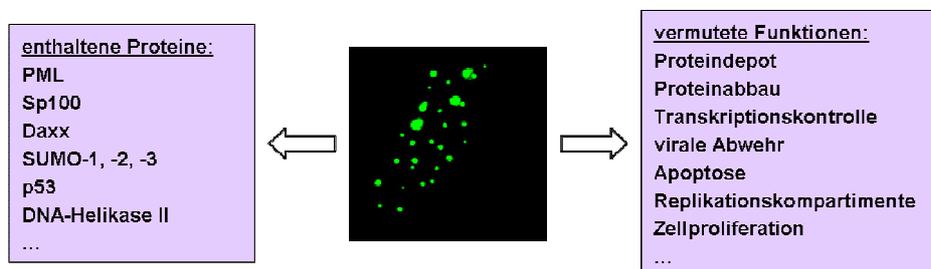
PML-Körper sind an einer Vielzahl zellulärer Vorgänge beteiligt, einschließlich Zellproliferation, Regulation der Transkription, Apoptose, Interferonantwort und Aufrechterhaltung der Stabilität des Genoms (Mu *et al.* 1994; Quignon *et al.* 1998; Wang *et al.* 1998; Zhong *et al.* 2000; Carbone *et al.* 2002) (Abb. 2.6). Aktuelle Vorstellungen zufolge dienen sie ebenfalls der reversiblen Speicherung nukleärer Proteine wie PML, Sp100, Daxx, CBP und dem Ubiquitin-ähnlichen Protein SUMO-1 (Ishov *et al.* 2004). PML ist dabei als definierender Bestandteil anzusehen. Fehlt es, können auch andere Komponenten nicht in die Kerndomänen lokalisieren.

Interessanterweise führt die chromosomische Translokation t(15;17) zwischen den für PML und den *retinoic acid receptor  $\alpha$*  (RAR $\alpha$ ) kodierenden Genen zum Ausbruch der Akuten Promyelozyten-Leukämie (APL). Dabei bewirkt das entstehende Fusionsprotein PML-RAR $\alpha$  die Auflösung der PML-Körper (Daniel *et al.* 1993; Dyck *et al.* 1994; Weis *et al.* 1994). Die Integrität der PML-Körper wird auch bei Infektionen durch einige DNA-Viren wie Adenoviren, HSV-1 und EBV (Epstein-Barr-Virus) gestört (Everett *et al.* 1994; Carvalho *et al.* 1995; Bell *et al.* 2000). Eine Strukturveränderung der PML-Körper scheint also sowohl für zelluläre Prozesse als auch im Laufe viraler Infektionen eine wichtige Rolle zu spielen, wobei die exakte Bedeutung aber noch nicht absolut klar ist. Da viele der in PML-Körpern enthaltenen Proteine Interferon-induzierbar sind und auf Virusinfektionen repressorisch wirken können, deutet dies auf eine eher antivirale Wirkung der PML-Körper hin (Hofmann *et al.* 2002; Woodhall 2003; Tavalai *et al.* 2006). Andererseits befinden sich die Kompartimente für die virale Transkription und Genomreplikation vieler DNA-Viren, wie auch HCMV, in unmittelbarer Nähe der PML-Körper (Ahn *et al.* 1999; Everett 2001). Im Zuge einer HCMV-Infektion lokalisiert das 72 kDa IE1-Protein innerhalb der ersten zwei Stunden *post infectionem* vorübergehend an die PML-Körper. In der Folge werden

durch eine IE1-vermittelte Auflösung dieser Strukturen, PML, Sp100, SUMO und IE1 selbst ins Kernplasma verdrängt (Korioth *et al.* 1996; Ahn *et al.* 1997; Ahn *et al.* 1998; Wilkinson *et al.* 1998). Möglicherweise trägt dies zu einer effizienten lytischen Infektion bei, weil sowohl Sp100 über Interaktion mit dem *heterochromatin protein 1* (HP1) eine Gen-Inaktivierung vermittelt (Lehming *et al.* 1998; Seeler *et al.* 1998; Lechner *et al.* 2000), als auch PML ein Repressor von Zellteilung und Transkription ist (Mu *et al.* 1994; Liu *et al.* 1995). Nachweislich blockiert IE1 diese Unterdrückung der Transkription durch PML vollständig (Xu *et al.* 2001).

Der genaue Mechanismus der Auflösung ist noch unbekannt, für das HSV-1 *infected cell protein 0* (ICP0) wurde ein Proteasom-vermittelter Abbau von PML nachgewiesen (Everett *et al.* 1998; Chelbi-Alix *et al.* 1999; Parkinson *et al.* 2000), der sich für IE1 aber nicht bestätigen ließ (Xu *et al.* 2001). PML und Sp100 bilden vermutlich das eigentliche Gerüst der PML-Körper und werden beide posttranslational über kovalente Konjugation an SUMO-1 verändert, was möglicherweise den strukturellen Zusammenhalt fördert und für die Bildung reifer PML-Körper verantwortlich ist (Muller *et al.* 1998; Ishov *et al.* 1999; Zhong *et al.* 2000). Diese Tatsache wird durch Erkenntnisse unterstützt, die darauf hindeuten, dass sowohl IE1 als auch ICP0 die PML-Körper wahrscheinlich durch blockierte Hinzufügung oder aktive Entfernung von SUMO-1 auflösen (Muller *et al.* 1999). IE2 assoziiert ebenfalls an PML-Körper, jedoch ohne diese aufzulösen (Ahn *et al.* 1997; Ishov *et al.* 1997).

In dieser Arbeit soll unter anderem analysiert werden, welche funktionellen Domänen im 72 kDa IE1-Protein die Interaktion mit den PML-Körpern vermitteln und ob ein Verlust dieser Wechselwirkung mit einem viralen Replikationsdefekt assoziiert ist.



**Abb. 2.6: Aufbau und Funktion der PML-Körper.** Gezeigt sind einige der bislang in PML-Körpern identifizierten Proteine sowie diverse Prozesse, an denen sie vermutlich beteiligt sind.

## 2.5 Fragestellung

Als erste virale Genprodukte nach einer HCMV-Infektion werden die IE1-Proteine neu synthetisiert. Davon interagiert die 72 kDa-Hauptform (IE1) mit bestimmten subnukleären Multiproteinkomplexen (PML-Körpern) sowie dem Chromatin des Wirtszellkerns und moduliert die Transkription viraler und zellulärer Gene. Außerdem moduliert es die Interferonantwort der Wirtszelle, eine der wichtigsten antiviralen Signaltransduktionskaskaden. Durch differenzielles Spleißen entstehen mehrere kleinere IE1-Varianten noch unbekannter Funktion (z. B. IE19). Bisherige genetische Manipulationen der IE1-Sequenzen bei HCMV ergaben Hinweise, dass IE1 eine wichtige, aber nicht essenzielle Bedeutung für die virale Vermehrung und Pathogenese zukommt. Unklar ist, welche Sequenzbereiche genau für die vollständige Funktion des IE1-Proteins verantwortlich sind. Überdies wurden bisher nur IE1-Mutanten nicht-pathogener, laboradaptierter HCMV-Stämme charakterisiert. Um genauere Aussagen zu funktionell relevanten Genombereichen innerhalb der IE1-spezifischen Exon 4-Sequenz zu erhalten und verschiedene IE1-Genvarianten im viralen Kontext funktionell untersuchen zu können, sollten im Rahmen dieser Arbeit eine Reihe rational konzipierter, IE1-spezifischer Viruspunktmutanten in einem laboradaptierten und einem klinischen HCMV-Isolat mittels der BAC-Technologie hergestellt und initial charakterisiert werden. Getestet wurde unter anderem, welche Mutationen zu einem Wachstumsdefekt führen oder das IE1-Protein noch zu einer Kolo-kalisation mit PML-Körpern bzw. deren Auflösung befähigen und ob ein Verlust dieser Wechselwirkung zwischen IE1 und PML-Körpern mit einer eingeschränkten Virusvermehrung oder einer beeinträchtigten Transkriptionsaktivierung durch IE1 assoziiert ist.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Antikörper

##### 3.1.1 Primärantikörper

Die folgenden Antikörper wurden für die immunologische Detektion von HCMV-Genprodukten bzw. humanen zellulären Proteinen im Western Blot (WB)-Verfahren und für Immunfluoreszenz (IF)-Analysen verwendet und in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (*phosphate-buffered saline*, PBS) verdünnt.

Beschreibung/Bezeichnung	Quelle	Verdünnung
Monoklonaler Maus-Antikörper gegen HCMV IE1 (1B12)	T. Shenk, Princeton (USA)	1:2 (IF)
Polyklonales Kaninchenserum GST-IE1ΔN	(Kaps 2006)	1:500 (IF)
Monoklonaler Maus-Antikörper gegen PML (5E10)	(Stuurman <i>et al.</i> 1992)	1:2 (IF)
Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen Sp100	Chemicon AB1380	1:100 bzw. 1:200 (IF)
Monoklonaler Maus-Antikörper gegen HCMV-pp28 (10B4-29)	(Silva <i>et al.</i> 2003)	1:10 (WB)
Monoklonaler Maus-Antikörper gegen HCMV-pp65 (8F5')	T. Shenk, Princeton (USA)	1:20 (WB)

##### 3.1.2 Sekundärantikörper

Folgender Antikörper wurde für WB-Analysen in PBS mit 3% (w/v) Magermilchpulver verdünnt. Für die Detektion der Antikörper-konjugierten Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) mit dem Chemilumineszenzsubstrat SuperSignal West Pico von Pierce wurde er in einer Verdünnung von 1:10000 verwendet.

Bezeichnung/Beschreibung	Quelle
Peroxidase-Conjugated AffiniPure F(ab') <sub>2</sub> Fragment Goat Anti-Mouse IgG (H+L), HRP-konjugiertes anti-Maus F(ab') <sub>2</sub> sd2 Fragment aus der Ziege	Dianova #115-036-003

Für IF-Analysen wurden sowohl Sekundärantikörper von Invitrogen in einer Verdünnung von 1:1000, als auch von Dianova in einer Verdünnung von 1:100 verwendet.

Bezeichnung/Beschreibung	Quelle
Alexa Fluor 488 Goat Anti-Mouse IgG (H+L) Anti-Maus Antikörper aus der Ziege gekoppelt an den grün-fluoreszierenden Farbstoff Alexa Fluor 488	Invitrogen #11001
Alexa Fluor 488 Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) Anti-Kaninchen Antikörper aus der Ziege gekoppelt an den grün-fluoreszierenden Farbstoff Alexa Fluor 488	Invitrogen #11008
Alexa Fluor 594 Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) Anti-Kaninchen Antikörper aus der Ziege gekoppelt an den rot-fluoreszierenden Farbstoff Alexa Fluor 594	Invitrogen #11037
Texas Red Anti-Mouse IgG (H+L) Anti-Maus Antikörper aus der Ziege gekoppelt an den rot-fluoreszierenden Farbstoff Texas Red	Dianova #115-075-003

## 3.2 Nukleinsäuren

### 3.2.1 Oligonukleotide

Sämtliche verwendete Oligonukleotide wurden von den Firmen Metabion, Biomers, Integrated DNA Technologies oder der Synthesizing/Sequencing Facility der Universität Princeton synthetisiert und durch Hochleistungsflüssigkeitschromatografie gereinigt. Um bestimmte amplifizierte DNA-Fragmente in Vektoren klonieren zu können, wurden in die betreffenden Startermoleküle Erkennungsstellen für geeignete Restriktionsendonukleasen integriert. Entsprechende Oligonukleotidbereiche sind in der folgenden Tabelle fett gedruckt und werden von den Enzymen Bgl II (AGATCT), EcoR I (GAATTC), Not I (GCGGCCGC), Pac I (TTAATTAA) oder Sph I (GCATGC) geschnitten.

Nr. <sup>1</sup>	Sequenz in 5'-3'-Orientierung	Verwendung
136	GCG GCA <b>GAT CTC</b> ATG CGG CTC ACC TCG TCA ATC TTG	PCR zur Generierung von pGS284-TN/FIX_ flank 1
137	GCG GCG <b>AAT TCG CGG CCG CTT AAT TAA</b> ACT ATT GTA TAT ATA TAT CAG TTA CTG	PCR zur Generierung von pGS284-TN_ flank 1
138	GCG GCG <b>AAT TCG CGG CCG CTT AAT TAA</b> ACT ATT GTA TAT ATA TCA GTT ACT G	PCR zur Generierung von pGS284-FIX_ flank 1
139	GCG GCG <b>AAT TCG CGG CCG CTT AAT TAA</b> CAA CAC ATA TAA GTA TCC GTC	PCR zur Generierung von pCR <sup>®</sup> 4-TOPO <sup>®</sup> -TN/FIX_ flank 2
140	GCG GCG <b>CAT GCG</b> ATC TCC ACG CGA ATC TCG GGT AC	
141	CGG CAG GTA TAT GTG ATG GG	Sequenzierung
142	CCA CAT GTG GAA TTG TGA GC	Sequenzierung

Nr. <sup>1</sup>	Sequenz in 5'-3'-Orientierung	Verwendung
149	GGT GCG GCA TAG AAT CAA GG	Sequenzierung
150	CTA AGA CCA CCA ATG GCT GT	Sequenzierung
155	GAG TCC GAA GCC GAA CTG CAG	PCR zur Generierung von pUC18-TN/FIX IE1_rv
156	GCG GCG <b>CGG CCG</b> CGA TCT CCA CGC GAA TCT CG	
158	ACG GTT TCA CAG GCG TGA CAC GTT TAT TGA G	Sequenzierung
162	TCA CCG TCC TTG ACA	Sequenzierung
209	GAC ACT GTG TCT GTC CGG TCT GAG CCA GTG TCT G	QuikChange <sup>®</sup> -Mutagenese zur Generierung der FIX_K450R-Mutante
210	CAG ACA CTG GCT CAG ACC GGA CAG ACA CAG TGT C	
213	GCT TGT ATT AAG GAG CCG CAT GAT GTG AGC AAG	QuikChange <sup>®</sup> -Mutagenese zur Generierung der TN_L174P-Mutante
214	CTT GCT CAC ATC ATG CGG CTC CTT AAT ACA AGC	
264	GCT TGT ATT AAG GAG CCG CAT GAT GTG ACC AAG	QuikChange <sup>®</sup> -Mutagenese zur Generierung der FIX_L174P-Mutante
265	CTT GGT CAC ATC ATG CGG CTC CTT AAT ACA AGC	
266	GAT ATC CTC ACT ACA GCT GTG GAA ACA ATG TG	QuikChange <sup>®</sup> -Mutagenese zur Generierung der TN_C279A-Mutante
267	CAC ATT GTT TCC ACA GCT GTA GTG AGG ATA TC	
268	GAT ATC CTC ACT ACA GCT GTG GAA ACC ATG TG	QuikChange <sup>®</sup> -Mutagenese zur Generierung der FIX_C279A-Mutante
269	CAC ATG GTT TCC ACA GCT GTA GTG AGG ATA TC	
270	TCA GTA ATT GTG GCT TAG AAC AGT GAT CAG G	QuikChange <sup>®</sup> -Mutagenese zur Generierung der TN_E421Stopp-Mutante
271	CCT GAT CAC TGT TCT AAG CCA CAA TTA CTG A	
272	TCA GTG ATT GTG GCT TAG AAC AGT GAT CAG G	QuikChange <sup>®</sup> -Mutagenese zur Generierung der FIX_E421Stopp-Mutante
273	CCT GAT CAC TGT TCT AAG CCA CAA TCA CTG A	
278	GAA CCC ACC GCC TCT TGA GGC AAG AGC ACC C	QuikChange <sup>®</sup> -Mutagenese zur Generierung der TN_G476Stopp-Mutante
279	GGG TGC TCT TGC CTC AAG AGG CGG TGG GTT C	
280	GAA CCC ACC ACC TCT TGA GGC AAG AGC ACC C	QuikChange <sup>®</sup> -Mutagenese zur Generierung der FIX_G476Stopp-Mutante
281	GGG TGC TCT TGC CTC AAG AGG TGG TGG GTT C	
294	CAC CAA AGA CAC GTC GTT	Quantifizierung viraler DNA durch <i>real time</i> PCR
295	GTC CTT TGC GAC CAG AAT	
314	GAC CTA CGG TAG ATC GCC GAG GAG TCA GAT GAG	QuikChange <sup>®</sup> -Mutagenese zur Generierung der TN_A373Stopp-Mutante
315	CTC GGC GAT CTA CCG TAG GTC ATC CAC ACT AGG	
316	GAC CTA CGG TAG ATC GCT GAG GAG TCA GAT GAG	QuikChange <sup>®</sup> -Mutagenese zur Generierung der FIX_A373Stopp-Mutante
317	CTC AGC GAT CTA CCG TAG GTC ATC CAC ACT AGG	
318	CTG CAG GCT CCG GCC CGT GCT AAA AAG GAT GAA C	Fusions-PCR zur Generierung der TN_K192P-Mutante
319	AGC ACG GGC CGG AGC CTG CAG TGC ACC CCC CAA C	

Nr. <sup>1</sup>	Sequenz in 5'-3'-Orientierung	Verwendung
320	GTG TCT GTC CCG TCT GAG CCA GTG TCT GAG ATA G	QuikChange <sup>®</sup> -Mutagenese zur Generierung der TN_K450R-Mutante
321	TGG CTC AGA CCG GAC AGA CAC AGT GTC CTC CCG C	
328	CTG AAG GCT CCG GCC CGT GCT AAG AAG GAT GAA C	QuikChange <sup>®</sup> -Mutagenese zur Generierung der FIX_K192P-Mutante
329	AGC ACG GGC CCG AGC CTT CAG TGC ACC CCC TAA C	

<sup>1</sup> Laufende Nummer in der Datenbank der Arbeitsgruppe

### 3.2.2 Plasmide

In der folgenden Tabelle sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Plasmide mit einer kurzen Angabe des Verwendungszweckes und der Bezugsquelle aufgelistet.

Nr. <sup>1</sup>	Bezeichnung	Verwendung	Quelle
-	pCR <sup>®</sup> 4-TOPO <sup>®</sup>	Klonierungsvektor	Invitrogen (#K4575-02)
#20	pUC18	Klonierungsvektor	Fermentas (#SD0051)
#46	pRL-CMV	Renilla Luciferase Reporterplasmid mit HCMV MIE-Promotor; Dual-Luciferase Reporter Assay	Promega (#E2261)
#49	pRL-TK	Renilla Luciferase Reporterplasmid mit HSV Thymidinkinase-Promotor; Dual-Luciferase Reporter Assay	Promega (#E2241)
#53	pGS284	Transfervektor zur BAC-Mutagenese	(Smith <i>et al.</i> 1999)
#103	pGL3-ICP36- Promotor	Firefly Luciferase Reporterplasmid mit HCMV UL44-Promotor; Dual-Luciferase Reporter Assay	(Romanowski <i>et al.</i> 1997)
#117	pCGN-pp71	pp71-Expressionsplasmid für die Kotrans- fektion mit BAC-DNA in MRC-5 Zellen	(Baldick <i>et al.</i> 1997)
#167	pGEM-kanlacZ	Ausgangskonstrukt für die Herstellung der IE1-spezifischen Exon 4-Substitution	D. Yu, St. Louis (USA)
#473	pEGFP-TN IE1	TN IE1-Expressionsplasmid; Dual-Luciferase Reporter Assay	(Meinel 2006)
#567	pEGFP-FIX IE1	FIX IE1-Expressionsplasmid; Dual-Luciferase Reporter Assay	
#575	pEGFP-TN IE1_L174P	mutiertes TN IE1-Expressionsplasmid; Dual-Luciferase Reporter Assay	
#576	pEGFP-TN IE1_C279A	mutiertes TN IE1-Expressionsplasmid; Dual-Luciferase Reporter Assay	
#577	pEGFP-TN IE1_A373Stopp	mutiertes TN IE1-Expressionsplasmid; Dual-Luciferase Reporter Assay	
#578	pEGFP-TN IE1_E421Stopp	mutiertes TN IE1-Expressionsplasmid; Dual-Luciferase Reporter Assay	
#579	pEGFP-TN IE1_K450R	mutiertes TN IE1-Expressionsplasmid; Dual-Luciferase Reporter Assay	
#580	pEGFP-TN IE1_G476Stopp	mutiertes TN IE1-Expressionsplasmid; Dual-Luciferase Reporter Assay	

Nr. <sup>1</sup>	Bezeichnung	Verwendung	Quelle
#581	pEGFP-FIX IE1_L174P	mutiertes FIX IE1-Expressionsplasmid; Dual-Luciferase Reporter Assay	(Meinel 2006)
#582	pEGFP-FIX IE1_C279A	mutiertes FIX IE1-Expressionsplasmid; Dual-Luciferase Reporter Assay	
#583	pEGFP-FIX IE1_A373Stopp	mutiertes FIX IE1-Expressionsplasmid; Dual-Luciferase Reporter Assay	
#584	pEGFP-FIX IE1_E421Stopp	mutiertes FIX IE1-Expressionsplasmid; Dual-Luciferase Reporter Assay	
#585	pEGFP-FIX IE1_K450R	mutiertes FIX IE1-Expressionsplasmid; Dual-Luciferase Reporter Assay	
#586	pEGFP-FIX IE1_G476Stopp	mutiertes FIX IE1-Expressionsplasmid; Dual-Luciferase Reporter Assay	

<sup>1</sup> Laufende Nummer in der Datenbank der Arbeitsgruppe

### 3.2.3 BACmide

Die verwendeten BACmide sind in der folgenden Tabelle beschrieben.

Nr. <sup>1</sup>	Bezeichnung	Verwendung	Quelle
121	FIX-EGFP = pFX2	BACmid mit HCMV FIX-spezifischer Sequenz; HCMV-Mutagenese	D. Yu, St. Louis (USA)
167	TN-EGFP = pTN2	BACmid mit HCMV TN-spezifischer Sequenz; HCMV-Mutagenese	J. Alwine, Philadelphia (USA)

<sup>1</sup> Laufende Nummer in der Datenbank der Arbeitsgruppe

## 3.3 Bakterienstämme und Zelllinien

### 3.3.1 *E. coli*-Stämme

Für Klonierungen, Gewinnung von Plasmid-DNA und homologe Rekombinationen wurden die Bakterienstämme DH10B, GM169, GS500 und S17 $\lambda$ pir genutzt.

Bezeichnung	Genotyp	Quelle
DH10B	$\Delta$ (mrr-hsd RMS-mcrBC) mcrA recA1	Bethesda Research Laboratories, Washington (USA)
GM169	<i>E. coli</i> K12 dam <sup>-</sup>	R. Wagner, Regensburg
GS500	<i>E. coli</i> recA <sup>+</sup> , recBCD <sup>+</sup>	L. Enquist, Princeton (USA)
S17 $\lambda$ pir	<i>E. coli</i> lambda-pir	L. Enquist, Princeton (USA)

### 3.3.2 Humane Zelllinie MRC-5

Die primären humanen Lungenfibroblasten MRC-5 (Jacobs 1966) von der *European Collection of Cell Cultures* (ECACC, #97112601) sind permissiv für HCMV und wurden für BAC-Rekonstitutionen und Infektionsexperimente eingesetzt.

## 3.4 DNA-Methoden

### 3.4.1 Kultivierung und Lagerung von *E. coli*-Stämmen

#### 3.4.1.1 Flüssigkulturen

Zur Vermehrung von Bakterien in Flüssigkultur wurde eine Einzelkolonie oder ein Teil einer Glyzerinkultur in steriles Luria-Bertani (LB)-Medium (10 g/l Bacto-Hefeextrakt; 10 g/l Bacto-Trypton; 10 g/l NaCl in H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub>) überführt und gegebenenfalls unter Zusatz eines geeigneten Antibiotikums bei 37°C über Nacht kultiviert (220 rpm, Forma Orbital Shaker, Thermo Fisher Scientific). Die Bakterienkonzentration wurde bei Bedarf fotometrisch bei 600 nm gegen Medium bestimmt ( $1 \text{ OD}_{600} = 8 \times 10^8 \text{ Zellen/ml}$ ).

#### 3.4.1.2 Plattenkulturen

Mit einer sterilen Impföse wurden einer Kolonie, einer Flüssigkultur oder einer Glyzerinkultur Bakterien entnommen und auf einer LB-Agarplatte (LB-Flüssigmedium mit 1,5% (w/v) Bacto-Agar) ausgestrichen. Durch Inkubation bei 37°C über Nacht konnten anschließend Einzelkolonien isoliert werden. Nach Transformation wurden die Bakterien mit einem sterilen Drygalski-Spatel verteilt. Auf diese Weise erhaltene Plattenkulturen können mit Parafilm verschlossen mehrere Wochen bei 4°C gelagert werden.

#### 3.4.1.3 Glyzerinkulturen

Bakterien einer Einzelkolonie wurden in 5 ml Flüssigmedium bei 37°C und 220 rpm (Forma Orbital Shaker, Thermo Fisher Scientific) geschüttelt und vor Erreichen der stationären Phase abzentrifugiert ( $4000 \times g$ ; 4°C; 10 min). Das dabei entstandene Pellet wurde in 1,8 ml sterilem LB-Einfriermedium (30% (v/v) Glycerin in LB-Medium) resuspendiert und danach in CryoTubes (Nunc) bei -80°C gelagert. Derart hergestellte Dauerkulturen sind nahezu unbegrenzt haltbar.

### 3.4.2 Präparation von doppelsträngiger DNA aus Bakterien

Zur Aufreinigung von DNA aus stationären Bakterienflüssigkulturen wurden je nach benötigter Menge Mini-, Midi- oder Maxi-Präparationen durchgeführt.

#### 3.4.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Verifizierung einer erfolgreichen Transformation (3.4.6.4) wurde die Methode der alkalischen Lyse (Sambrook *et al.* 2001) leicht modifiziert. Dazu wurden bakterielle Einzelkolonien unter Zugabe des entsprechenden Antibiotikums in je 3 ml LB-Flüssigmedium überführt und über Nacht bei 37°C bebrütet. Für 20 s wurden 1,5 ml der Bakteriensuspension bei 4°C und 16100 × g sedimentiert und in 200 µl S1-Lösung (50 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA; pH 8,0) unter Zugabe von RNase A (100 µg/ml) resuspendiert. Anschließend erfolgte die alkalische Lyse der Bakterien durch Hinzugabe von 200 µl S2-Lösung (200 mM NaOH; 1% SDS (w/v)) und kurzem Mischen. Mit 200 µl S3-Lösung (2,8 M Kaliumacetat; pH 5,1) wurde die Neutralisierung und die konsekutive Präzipitation von Proteinen und Zelltrümmern nach kurzem Schütteln und Inkubation auf Eis für 5 min erreicht. Der durch die nachfolgende Zentrifugation (15 min, 4°C, 16100 × g) entstandene Überstand wurde abgenommen und die darin enthaltenen Nukleinsäuren mit 600 µl (1 V) Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) durch mehrmaliges Invertieren von Proteinverunreinigungen getrennt. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 16100 × g wurde die obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 400 µl (0,7 V) Isopropanol versetzt. Durch kräftiges Schütteln erfolgte die Präzipitation der Nukleinsäuren, was sich durch Inkubation bei -20°C für etwa 30 min noch verstärken lässt. Nach erneuter Zentrifugation (20 min, 4°C, 16100 × g) wurde der Überstand dekantiert, das Pellet mit 1 ml 75%igem (v/v) Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (10 min, 4°C, 16100 × g). Der Ethanolüberstand wurde vollständig entfernt und die DNA ferner in einem *Savant Speed Vac System* (SPD111V, Thermo Life Sciences) getrocknet. Die Resuspension erfolgte in 25 µl H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub> unter Zugabe von 0,004 µg/µl RNase A.

Für Sequenzierungen oder weitere Klonierungsschritte wurden zur Gewinnung besonders reiner, säuleneluerter Plasmid-DNA kommerzielle Systeme nach Herstellerangaben eingesetzt (NucleoSpin<sup>®</sup> Plasmid, Macherey-Nagel), auch für Midi- und Maxi-Präparationen im großen Maßstab für präparative Restriktionsspaltungen (Nucleobond<sup>®</sup> AX, Macherey-Nagel).

### 3.4.2.2 Isolierung von BAC-DNA

Sollte das Ergebnis einer BAC-Mutagenese (3.4.7) schnell und einfach überprüft werden, wurden kleine Mengen an BAC-DNA mittels BAC-Minipräparationen isoliert, wobei aufgrund der Größe von etwa 230 kbp jegliche Scherkräfte vermieden wurden. Zuerst wurden Einzelkolonien der Bakterien in je 10 ml LB-Medium unter Zugabe des entsprechenden Antibiotikums überführt und über Nacht bei 37°C bebrütet. Jeweils 8 ml davon wurden für 10 min bei 4°C und 1500 × g pelletiert und in 2 ml P1-Lösung (50 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA; pH 8,0) unter Zugabe von RNase A (100 µg/ml) resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde mit 2 ml P2-Lösung (200 mM NaOH, 1% SDS (w/v)) vermischt und kurz bei Raumtemperatur (RT) inkubiert, was die alkalische Lyse auslöste. Durch Zugabe von 2 ml P3-Lösung (3 M Kaliumacetat; pH 5,5), Schütteln und Inkubation auf Eis für 15 min fand die Neutralisierung statt. Anschließend wurden die ausgefällten Proteine und die genomische DNA für 30 min bei 4°C und 19700 × g abzentrifugiert, der Überstand in Phase Lock Gel<sup>TM</sup>-Heavy-Röhrchen (15 ml, Eppendorf) überführt und 6 ml (1 V) Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) zugegeben. Nach sanftem Schütteln (10 min) wurde die Emulsion zur Phasentrennung zentrifugiert (5 min, 4°C, 1500 × g). Das enthaltene Gel diente dabei der Erhöhung der DNA-Ausbeute, indem es als Barriere zwischen der unteren organischen Phase, einschließlich denaturierter Proteine, und der wässrigen, nukleinsäurehaltigen oberen Phase fungiert. Letztere wurde vollständig in neue Reaktionsgefäße überführt, mit 4,2 ml (0,7 V) Isopropanol versetzt und gegebenenfalls 1 h bei RT inkubiert. Erneut wurde zentrifugiert (45 min, 4°C, 1500 × g), der Überstand dekantiert und das entstandene DNA-Präzipitat zweimal mit je 10 ml 75%igem (v/v) Ethanol gewaschen. Nach einer letzten Zentrifugation (15 min, 4°C, 1500 × g) wurde der Überstand vollständig entfernt, die luftgetrocknete DNA in 75-100 µl H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub> über Nacht bei RT gelöst und danach bei 4°C aufbewahrt. Später wurde sie beispielsweise mittels Restriktionsspaltung (vgl. 3.4.6.1) weiter charakterisiert. Für die Isolierung von BAC-DNA im großen Maßstab, z. B. für die Transfektion von Säugerzellen, wurden 400 ml stationäre Bakterienflüssigkulturen kultiviert und daraus reine DNA mit kommerziellen Systemen über Anionenaustauschersäulen nach Herstellerangaben isoliert (Nucleobond<sup>®</sup> AX, Macherey-Nagel).

### 3.4.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration der isolierten DNA und die Reinheit der Präparation wurden mit Hilfe eines Zweistrahl-Spektrofotometers (Lambda 25 UV/VIS Spectrometer, Perkin Elmer) unter Einsatz von Quarzküvetten (Helma) bestimmt. Es wurde ein Absorptionsspektrum im Wellenlängenbereich von 230 bis 300 nm aufgenommen, wobei der Wert bei 260 nm zur Konzentrationsbestimmung verwendet wurde. Dabei entspricht 1 OD<sub>260</sub> einer Konzentration von etwa 50 µg doppelsträngiger DNA (dsDNA) pro ml Lösung. Der Quotient der Absorptionswerte bei 260 und 280 nm lässt Rückschlüsse auf die Reinheit der DNA-Präparation zu. Erwünscht ist ein Absorptionsverhältnis zwischen 1,8 und 2,0, da bei Vorhandensein von Verunreinigungen wie Phenol und Proteinen dieser Wert unter 1,8 fällt.

### 3.4.4 Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese wurden Größenabschätzungen von isolierten oder klonierten DNA-Fragmenten, Intaktheitsüberprüfungen, Konzentrationsbestimmungen und präparative Auftrennungen von Nukleinsäuren durchgeführt. In Abhängigkeit der erwarteten Bandengröße wurden unterschiedliche Konzentrationen des Agarosegels gewählt. Plasmid-DNA-Proben wurden sowohl für analytische als auch für präparative Zwecke in 1%igen (w/v) Agarosegelen aufgetrennt, für große BAC-DNA-Proben wurde stets ein 0,7%iges (w/v) Gel hergestellt. Hierfür wurde eine entsprechende Menge Agarose (Seakem LE Agarose, Biozym) in 1 × TAE-Puffer (40 mM Tris; 20 mM Essigsäure; 1 mM EDTA) durch Aufkochen geschmolzen und danach auf 50°C abgekühlt. Zur späteren Detektion der DNA wurden 0,25 µg/ml Ethidiumbromid (EtBr) zugefügt. Die noch flüssige Agarosegellösung wurde in eine vorbereitete Gelapparatur (HE 33 Mini Submarine Unit oder HE 99X Max Submarine Unit für präparative Gele und BAC-Gelelektrophorese, GE Healthcare Life Sciences) gegossen. Jede DNA-Probe wurde mit 1/6 Volumen Auftragspuffer (0,25% (w/v) Bromphenolblau; 40% (w/v) Saccharose in 6 × TAE) versetzt und neben einem DNA-Längenstandard (1 kbp oder 100 bp DNA Ladder, New England Biolabs) auf das Agarosegel aufgetragen. Als Laufpuffer diente 1 × TAE-Puffer. Die Auftrennung der polyanionischen DNA erfolgte bei analytischen Gelen für etwa 1 h bei 10-12 V/cm, bei der Gelelektrophorese von BAC-Fragmenten etwa 5-8 h mit

4,25 V/cm und bei präparativen Gelen über Nacht mit 2,5 V/cm. Die Qualität der Auftrennung von BAC-DNA-Fragmenten konnte durch Zugabe von 0,25 µg/ml EtBr zum Laufpuffer, durch eine Abdeckung der Gelkammer mit lichtundurchlässiger Folie sowie eine laufende Kühlung der Gelkammer durch Positionierung in Eiswasser optimiert werden. Auf Grund der Interkalation von EtBr in DNA wurden anschließend die DNA-Banden auf einem UV-Durchlichtschirm sichtbar gemacht und fotografiert (Gel Doc 2000 Gel Documentation System, BioRad). Bei präparativen Gelen wurde zur Schonung der DNA mit langwelligem UV-Licht (365 nm) angeregt (UVT-14L, Herolab GmbH Laborgeräte) und im Anschluss daran die DNA aus dem Gel extrahiert (3.4.6.3).

### 3.4.5 Polymerasekettenreaktion

Im Rahmen der Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) werden definierte Nukleinsäuren *in vitro* exponentiell vermehrt.

Ein 50-µl Reaktionsansatz enthielt 100 ng BACmid-DNA bzw. 3-5 ng Plasmid-DNA, je 10 µM der beiden Starteroligonukleotide (3.2.1), je 100 µM dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 5 µl 10 × PCR-Puffer bzw. 10 µl 5 × PCR-Puffer und 5,25 U Taq/Tgo-DNA-Polymerase (Roche Applied Science) bzw. 1 U Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs). Letzteres Enzym ist wegen seiner geringen Fehlerrate ( $4,4 \times 10^{-7}$ ) besonders gut zur Amplifikation von DNA-Fragmenten für Klonierungszwecke geeignet. Sämtliche Ansätze wurden in einem Thermocycler (iCycler, BioRad), abhängig vom zu generierenden PCR-Produkt, der Art der PCR und der Art der Starteroligonukleotide, inkubiert. Allen Inkubationen gemeinsam war das initiale einmalige Erhitzen auf 95°C für 4 min (bzw. 98°C für 30 s bei Ansätzen mit der Phusion High-Fidelity DNA Polymerase) zur Denaturierung sowie eine sieben- bis zehnminütige Inkubation bei 72°C am Ende der Inkubationszeit, um 3'-Enden nicht-vollendeter PCR-Produkte aufzufüllen. Eine Variante ist die *touchdown*-PCR. Hier wird die Hybridisierungstemperatur der zu erwartenden Schmelztemperatur der Starteroligonukleotide zyklusweise angenähert und über diese hinaus abgesenkt. Auf diese Weise binden die Starteroligonukleotide hochspezifisch an ihre Zielsequenz, Oligonukleotid-Dimere werden vermieden und bevorzugt das gewünschte Amplikon vervielfältigt. Nach Abschluss des PCR-Programms wurden 5 µl der amplifizierten DNA in einem EtBr-Agarosegel elektrophoretisch getrennt und unter Anregung mit UV-Licht nach Fragmentgröße und Ausbeute überprüft (3.4.4).

### 3.4.5.1 Quantitative PCR

Zur Quantifizierung der Menge an DNA in einer unbekannt Probe dient die hochsensitive *real-time* oder kinetische PCR. Die Detektion akkumulierender PCR-Produkte in Echtzeit basiert auf der Messung der Fluoreszenz des in Doppelstrang-DNA eingelagerten Farbstoffes SYBR-Green I am Ende der Elongationsphase. Dieser bindet in der kleinen Grube des DNA-Doppelstrangs und zeigt nur dann eine starke Fluoreszenzintensität (Faktor 100 im Vergleich zu ungebundenem SYBR-Green I). Der sogenannte *crossing point* (CP-Wert) markiert den Beginn der exponentiellen Produktzunahme (lineare Log-Phase) der PCR. Er korreliert entsprechend Formel 3.1 mit der Anfangskonzentration der zu amplifizierenden DNA und kann so zur Quantifizierung herangezogen werden. Die PCR-Effizienz für die Ziel- und Referenzgene wurde mit Hilfe einer Standardkurve nach bekanntem Prinzip ermittelt (Pfaffl 2001) und betrug 1,927 für das Starteroligonukleotidpaar #294/295. Bei einer optimalen Amplifikationseffizienz von 2 verdoppeln sich mit jedem Zyklus DNA-Produktmenge und Fluoreszenzsignal.

$$N = N_0 \times E^{CP}$$

N: Menge der Moleküle  
N<sub>0</sub>: Ausgangsmenge der Moleküle  
E: Amplifikationseffizienz  
CP: Zykluszahl bei Einsetzen der linearen Produktzunahme

**Formel 3.1: Zusammenhang zwischen CP-Wert und der Anfangskonzentration der zu amplifizierenden Zielsequenz.**

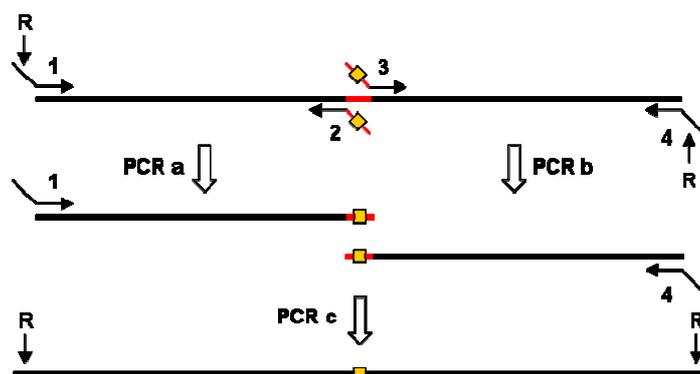
Ein 20- $\mu$ l Reaktionsansatz enthielt 2  $\mu$ l der isolierten und nicht-vermischten viralen DNA (3.6.8), je 10  $\mu$ M der beiden Starteroligonukleotide #294/295 sowie 4  $\mu$ l des SYBR-Green Mastermixes aus dem LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I Kit von Roche, der alle restlichen, für die PCR erforderlichen Komponenten liefert. Die Ansätze wurden in speziellen Kapillaren wie folgt in einem LightCycler-Gerät der Firma Roche inkubiert:

10 s bei 95°C: Aufschmelzen des DNA-Doppelstrangs  
8 s bei 58°C: Hybridisierung der Oligonukleotide an die Zielsequenz  
8 s bei 72°C: DNA-Polymerisation

Nach einmaligem Erhitzen auf 95°C für 10 min, wobei die Polymerase aktiviert wird, wurde der Zyklus insgesamt 40-mal durchlaufen. Im Anschluss an die letzte Elongationsphase der PCR wurde zur Spezifitätskontrolle die Schmelztemperatur des generierten PCR-Produktes ermittelt. Sie betrug für das 71 bp lange Produkt 81°C.

### 3.4.5.2 Mutagenese durch Fusions-PCR

Die Mutagenese durch Fusions-PCR wird meist zur Deletion von DNA-Abschnitten verwendet, in dieser Arbeit jedoch für den gezielten Nukleotidaustausch innerhalb einer dsDNA-Sequenz. Bei dieser Methode wurden in zwei unabhängigen PCR-Reaktionen zunächst die Abschnitte amplifiziert, welche die gewünschte Region flankieren (Abb. 3.3). Die den zu mutierenden Bereich überlappenden Oligonukleotide 2 und 3 trugen hierbei jeweils einen Abschnitt von 21 überhängenden Basenpaaren am 5'-Ende, die zueinander komplementär waren und die beabsichtigte Mutation enthielten. Die jeweiligen Gegenoligonukleotide 1 und 4 wurden so konstruiert, dass sie eine singuläre Schnittstelle enthielten. In einer dritten PCR dienten die Amplifikate aus PCR a und b als Matrize (Abb. 3.3), wobei es, bedingt durch die Überhänge, zu einer Hybridisierung der Amplifikate miteinander kam. Beide konnten nun mit den Oligonukleotiden 1 und 4 amplifiziert werden. Mittels Restriktion an den singulären Schnittstellen konnte das PCR-Produkt in einer Ligationsreaktion in den gewünschten Vektor integriert werden.



**Abb. 3.3: Einbringen von Mutationen in Plasmide durch Fusions-PCR.** R = Restriktionsendonukleaseschnittstelle, 1-4 = Starteroligonukleotide, gelbes Kästchen = gewünschte Mutation.

Die Ansätze von PCR a und PCR b wurden wie folgt inkubiert:

1 ×	30 s bei 98°C	Aufschmelzen des DNA-Doppelstrangs Hybridisierung der Oligonukleotide an die Zielsequenz; die Temperatur wird bei jedem Schritt um 0,5°C erniedrigt ( <i>touchdown</i> )
25 ×	10 s bei 98°C	
	20 s bei 68°C	
	x s bei 72°C	Polymerisation (Zeitkomponente variiert je nach Länge des PCR-Produktes - 15 s/1 kbp)
1 ×	10 min bei 72°C	Auffüllung der 3'-Enden nicht-vollendeter PCR-Produkte

Der Ansatz von PCR c wurde in einer 2-Schritt-PCR wie folgt inkubiert:

Vor Zugabe der Starteroligonukleotide:

1 ×	30 s bei 98°C	
11 ×	10 s bei 98°C	Aufschmelzen des DNA-Doppelstrangs Hybridisierung der Oligonukleotide an die Zielsequenz; die Temperatur wird bei jedem Schritt um 1°C erniedrigt ( <i>touchdown</i> ) Polymerisation (Zeitkomponente variiert je nach Länge des PCR-Produktes - 15 s/1 kbp)
	20 s bei 68°C	
	x s bei 72°C	

Dieser Schritt führt zur Vorhybridisierung der Amplifikate aus PCR a und PCR b und zu einer Auffüllreaktion.

Nach Zugabe der Starteroligonukleotide:

25 ×	10 s bei 98°C	Aufschmelzen des DNA-Doppelstrangs Hybridisierung der Oligonukleotide an die Zielsequenz; die Temperatur wird bei jedem Schritt um 0,5°C erniedrigt ( <i>touchdown</i> ) Polymerisation (Zeitkomponente variiert je nach Länge des PCR-Produktes - 15 s/1 kbp)
	20 s bei 68°C	
	x s bei 72°C	
1 ×	10 min bei 72°C	Auffüllung der 3'-Enden nicht-vollendeter PCR-Produkte

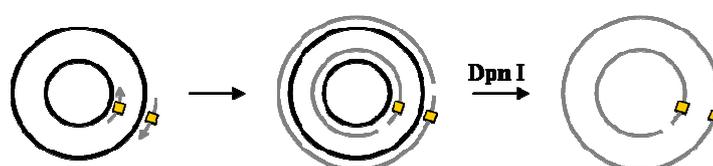
### 3.4.5.3 QuikChange<sup>®</sup>-Mutagenese

Angelehnt an das QuikChange<sup>®</sup>-Mutagenese-System (Stratagene) wurden Punktmutationen in Plasmide eingeführt. Die Mutagenese erfolgte hierbei unter Einsatz zweier komplementärer Starteroligonukleotide mit integrierter gewünschter Mutation. Mit der Phusion-Polymerase wurden sie in mehreren Temperaturzyklen verlängert, wobei ein mutiertes Plasmid mit Lücken generiert wurde (Abb. 3.4). Der 50-µl PCR-Ansatz wurde im Thermocycler (iCycler, BioRad) folgendermaßen inkubiert:

10 s bei 98°C	Aufschmelzen des DNA-Doppelstranges
20 s bei 72°C	Hybridisierung der Oligonukleotide an die Zielsequenz; die Temperatur wird bei jedem Schritt um 0,5°C erniedrigt ( <i>touchdown</i> )
x s bei 72°C	Polymerisation (Zeitkomponente variiert je nach Länge des PCR-Produktes – 15 s/1 kbp)

Nach einmaligem Erhitzen auf 98°C für 30 s wurde dieser Zyklus 20-mal durchlaufen, gefolgt von einer zehnmütigen Inkubation bei 72°C zur Auffüllung der 3'-Enden nicht-vollendeter PCR-Produkte.

Nach Beendigung des PCR-Programmes erfolgte eine zweimalige Spaltung mit der Restriktionsendonuklease Dpn I, die 5'-Gme<sup>6</sup>ATC-3'-Sequenzen in methylierter bzw. hemimethylierter Form schneidet. Dazu wurde jeder Ansatz insgesamt zweimal mit je 1 µl Dpn I (New England Biolabs) versetzt und für jeweils eine Stunde bei 37°C inkubiert. Da nur Bakterien, sofern sie ihre Methyltransferaseaktivität noch besitzen, in der Lage sind, DNA zu methylieren, bleibt nach Dpn I-Restriktion nur die *in vitro* neu-synthetisierte, nicht-methylierte DNA mit der eingefügten Punktmutation übrig. Im Anschluss daran wurde die noch unvollständige zirkuläre DNA in chemisch-kompetente DH10B- oder GM169-Zellen transformiert (3.4.6.5), wodurch ein geschlossenes Plasmid entstand.



**Abb. 3.4: Schematische Darstellung der QuikChange<sup>®</sup>-Mutagenese.** Schwarze Ringe stellen das Ausgangsplasmid dar, graue Pfeile komplementäre Starteroligonukleotide mit der gewünschten Mutation (gelbes Kästchen). Durch Elongation und Abbau des Ausgangsvektors durch Dpn I-Spaltung erhält man ein nicht-geschlossenes mutiertes Plasmid, das nach Transformation in *E. coli* ligiert wird.

### 3.4.6 Klonierung von DNA-Fragmenten

#### 3.4.6.1 Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme

Restriktionsendonukleasen wurden von der Firma New England Biolabs erworben und zusammen mit den entsprechenden 10 × Puffern nach Herstellerangaben eingesetzt. Analytische Spaltungen enthielten üblicherweise 500 ng DNA und wurden mindestens 2 h bei 37°C inkubiert. Für präparative Restriktionsenzymspaltungen zur Vektor-Isolierung wurden 5 µg und zur Isolierung des Inserts 5-10 µg Plasmid-DNA verwendet, bei einer Inkubationszeit von 4 h bei 37°C. Um eine Religation einfach-gespaltener Vektoren zu vermeiden, wurden sie durch Zugabe von 10 U alkalischer Phosphatase (CIP, New England Biolabs) innerhalb der letzten Stunde der Inkubationszeit dephosphoryliert.

PCR-Produkte wurden vor ihrer Spaltung mit Restriktionsendonukleasen mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) gemäß Angaben des Herstellers von den übrigen Bestandteilen des PCR-Ansatzes gereinigt.

### 3.4.6.2 Spaltung von BAC-DNA durch Restriktionsenzyme

Für die analytische Restriktionsspaltung von BACmiden wurde jeweils 1 µg der aus Bakterien isolierten BAC-DNA (3.4.2.2) in einem 30-µl Ansatz mit 3 µl 10 × Puffer und 20 U EcoR I (New England Biolabs) eingesetzt und 4 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss daran konnten die erzeugten DNA-Fragmente durch Gelelektrophorese charakterisiert werden (3.4.4).

### 3.4.6.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte nach einem Verfahren, das sich der Affinität von Nukleinsäuren an SiO<sub>2</sub>-Partikel im Beisein eines chaotropen Salzes bedient.

Zunächst wurde die zu präparierende DNA unter Anregung mit langwelligem UV-Licht mit einem Skalpell aus dem EtBr-gefärbten Agarosegel ausgeschnitten. Anschließend wurden die Agaroseblöckchen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die DNA gemäß Herstellerangaben unter Verwendung des QIAEX II Gel Extraktion Kit (Qiagen) aufgereinigt. Ein Fünftel der entstandenen DNA-Lösung wurde daraufhin zur Qualitätskontrolle auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Über Vergleich der Bandenintensitäten mit ähnlich großen Markerbanden bekannter DNA-Menge konnte die Ausbeute abgeschätzt werden.

### 3.4.6.4 Ligation

Im Ligationsansatz enthalten waren 100 ng linearisierte Vektor-DNA sowie die vierfache molare Menge an zu klonierender Insert-DNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit 2 µl 10 × Ligationspuffer und 1 U T4 DNA Ligase (New England Biolabs). Um die Phosphodiesterbrücken zu verknüpfen wurde der Ansatz über Nacht bei 16°C inkubiert und nachfolgend in die Transformation eingesetzt.

Um vervielfältigte DNA-Stücke in Vektoren zu klonieren, die vorher mit alkalischer Phosphatase behandelt wurden, mussten erst neue 5'-Phosphatreste angefügt werden. Dazu wurden die PCR-Produkte in einem 10-µl Ansatz mit 10 U T4 Polynukleotid Kinase (New England Biolabs) und 1 µl 10 × Kinase-Puffer für 30 min bei 37°C inkubiert und danach für 20 min bei 65°C hitzeinaktiviert.

Für die schnelle und effektive Ligation mit Hilfe des TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kit (Invitrogen) wurden zunächst 3'-A-Überhänge an PCR-amplifizierte DNA-Fragmente angefügt, indem

sie in einem 50- $\mu$ l Ansatz mit 2,5 U Taq DNA-Polymerase (Roche Applied Science), 5  $\mu$ l 10  $\times$  PCR-Puffer und je 50  $\mu$ M dATP, dCTP, dGTP und dTTP für 15 min bei 72°C inkubiert wurden. Anschließend wurde die DNA nach Herstellerangaben in den linearisierten pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup>-Vektor (Invitrogen) kloniert, der über 3'-T-Überhänge und die kovalent gebundene *Vaccinia Virus* Topoisomerase I verfügt.

#### **3.4.6.5 Bakterientransformation**

Plasmid-DNA kann wahlweise in elektro- oder in chemisch-kompetente Zellen transformiert werden.

Für die Transformation von Plasmid-DNA in chemisch-kompetente Zellen wurden 200  $\mu$ l chemisch-kompetente Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 10  $\mu$ l des Ligationsansatzes oder 1  $\mu$ l Plasmidlösung vermischt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte ein „Hitzeschock“ für 45 s bei 42°C im Wasserbad. Anschließend wurden die Bakterien 2 min auf Eis abgekühlt und mit 800  $\mu$ l LB-Medium versetzt.

Die Transformation von DNA in elektro-kompetente Zellen erfolgte in einer Elektroporationsküvette (Gene-Pulser Küvette, BioRad) mit einem Elektrodenabstand von 2 mm. Hierin wurden 40  $\mu$ l Zellsuspension mit 1  $\mu$ l Ligationsansatz vermischt und in einem MicroPulser (BioRad) bei einer Spannung von 2,5 kV, einer Kapazität von 25  $\mu$ F sowie einem Parallelwiderstand von 200  $\Omega$  elektroporiert. Nach dem Puls wurden die Zellen sofort mit 1 ml LB-Medium aus den Küvetten gespült und in geeignete Reaktionsgefäße überführt.

Die auf beide Arten erhaltenen Bakteriensuspensionen wurden danach 90 min bei 37°C und 220 rpm geschüttelt (Forma Orbital Shaker, Thermo Fisher Scientific). Währenddessen kann die Antibiotikaresistenz des transformierten Plasmids exprimiert werden. Schließlich wurden die Bakteriensuspensionen mit einem sterilen Drygalski-Spatel auf passenden LB-Selektionsplatten verteilt und über Nacht bei 37°C bebrütet. Auf diese Weise entstanden  $10^5$  bis  $10^9$  Transformanden pro  $\mu$ g Plasmid-DNA.

#### **3.4.6.6 Charakterisierung rekombinanter Klone**

Einzelkolonien wurden mit einer sterilen Impföse von Transformationsplatten in 3 ml LB-Selektionsmedium überimpft und über Nacht bei 37°C und 220 rpm geschüttelt (Forma Orbital Shaker, Thermo Fisher Scientific). Aus 1,5 ml Übernachtskultur wurde mit Hilfe der alkalischen Lyse und Phenol-Chloroform-Extraktion (3.4.2.1) oder mittels NucleoSpin<sup>®</sup>-

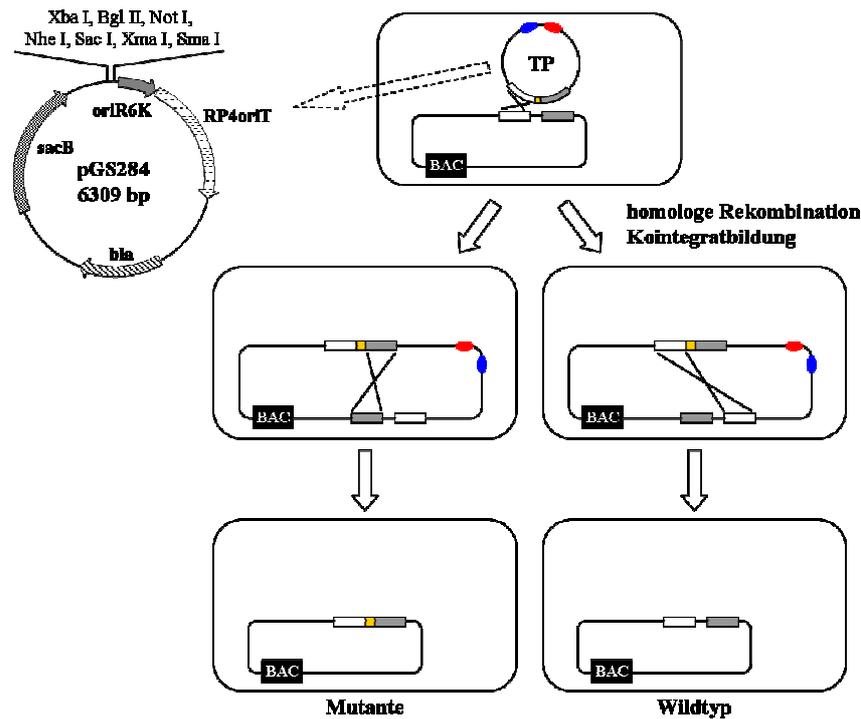
Säulen (Macherey-Nagel) Plasmid-DNA präpariert und in 25-40  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$  aufgenommen. Je 5-10  $\mu\text{l}$  (bei pGS284-Konstrukten bis 25  $\mu\text{l}$ ) DNA-Lösung wurden mit geeigneten Restriktionsenzymen gespalten und das Fragmentmuster nach Agarosegelelektrophorese analysiert. Bei der Klonierung von PCR-Produkten wurde zusätzlich die Nukleotidabfolge der neuen Plasmidkonstrukte im Bereich der inserierten Fremd-DNA durch Sequenzierung verifiziert. Dazu wurde ein 8- $\mu\text{l}$  Ansatz mit 150-300 ng Plasmid-DNA und einem passenden Sequenzieroligonukleotid (1,25  $\mu\text{M}$ ) zur Firma Geneart versendet. Die erhaltenen Sequenzdaten wurden geprüft und unter Einsatz des BLAST-Suchalgorithmus (National Center for Biotechnology Information, NCBI) mit der WT-Sequenz verglichen.

### 3.4.7 BAC-Mutagenese mit Hilfe von Transferkonstrukten

Diese Art der Mutagenese stellt die bevorzugte Methode zum Einbringen gezielter Mutationen in große BAC-Moleküle dar (zur Übersicht: (Brune *et al.* 2000)).

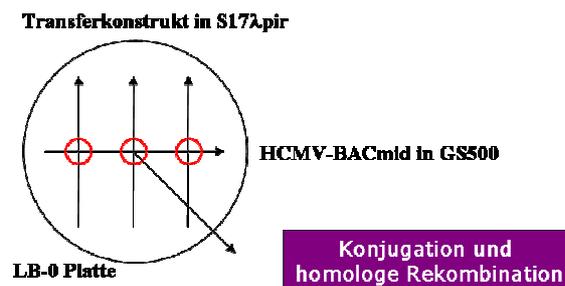
Sämtliche verwendeten Transferplasmide basieren auf pGS284, einem Derivat des Vektors pCVD442 (Donnenberg *et al.* 1991). pGS284 enthält neben den beiden Replikationsursprüngen RP4oriT und oriR6K ein  $\beta$ -Lactamase-Gen (bla) für die Ampicillin-Resistenz und das sacB-Gen (Abb. 3.5). Der Vektor pCVD442 und seine Derivate können nur in Bakterienstämmen propagiert werden, die das pir-Gen besitzen, welches für das  $\pi$ -Protein kodiert und für die Replikation von Plasmiden mit R6K Replikationsursprung unabdingbar ist. Dazu gehört unter anderem der in dieser Arbeit eingesetzte Stamm S17 $\lambda$ pir, welcher zusätzlich durch sogenannte tra-Gene einen effizienten RP4-vermittelten Plasmidtransfer durch Konjugation ermöglicht.

SacB kodiert für das Enzym Levansucrase aus *Bacillus amyloliquefaciens* (Ried *et al.* 1987). Es spaltet Sucrose in Glucose und das für Bakterien toxische Fructan und dient so der negativen Selektion auf Sucrose-haltigem Nährmedium.



**Abb. 3.5: Einbringen von Mutationen in ein BACmid.** Eine von viralen Sequenzen (weißer und grauer Kasten) flankierte Mutation (gelber Kasten) wurde in ein Transferplasmid (TP), z. B. pGS284, kloniert. Übertragung des rekombinanten Transferplasmids mittels Konjugation in *E. coli*, die ein BACmid enthalten, führt zur homologen Rekombination und Bildung eines Kointegrates, welches aufgrund des Antibiotika-Resistenzgens (blauer Punkt) und eines Negativ-Selektionsmarkers (roter Punkt) auf dem Transferplasmid selektioniert werden kann. Durch spontane Auflösung des Kointegrates wird entweder die BAC-Mutante oder der WT erzeugt.

Im ersten Schritt der BAC-Mutagenese wird in pGS284 eine Rekombinationskassette subkloniert, welche den veränderten DNA-Abschnitt und flankierende, je etwa 1 kbp-lange DNA-Abschnitte enthält. Diese sind identisch mit den Genabschnitten, die den zu mutagenisierenden Bereich auf dem parentalen BACmid flankieren. Jedes BACmid besitzt weiterhin unter anderem das Gen für Chloramphenicolresistenz als Selektionsmarker und eine EGFP (*enhanced green fluorescent protein*)-Kassette. Da für die homologe Rekombination bestimmte Enzyme (*recA*, *recBCD*) unabdingbar sind, müssen BACmide in *E. coli*-Stämmen, die diese Enzyme besitzen (z. B. GS500), vorliegen. Die Bakterien wurden für die homologe Rekombination zwischen BAC-Genom und Transferkonstrukt auf LB-0 Agarplatten nach dem Schema in Abb. 3.6 ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert.



**Abb. 3.6: Schematische Darstellung des Ausstreichens der Bakterien für die homologe Rekombination.** Bakterien des Stammes S17λpir mit integriertem Transferkonstrukt wurden mit einer Impföse in drei senkrechten Linien auf eine LB-0 Platte ausgestrichen. Die Bakterien des *E. coli*-Stammes GS500, die das parentale HCMV-BACmid tragen, wurden in einer waagrechten Linie ausgestrichen. An den Schnittstellen erfolgt die Konjugation und homologe Rekombination.

Die Integration der Mutation ins BACmid findet statt, wenn durch Rekombination über den einen homologen Bereich ein Kointegrat gebildet wird, das durch Rekombination über den anderen homologen Bereich wieder aufgelöst wird. Da die Rekombinationshäufigkeit eher gering ist und mit der Länge der homologen Regionen zunimmt, ist entscheidend, dass beide homologen Abschnitte möglichst gleich groß sind. Ansonsten würde die Rekombination bevorzugt über einen Bereich erfolgen, was das Ausgangsmolekül wieder herstellen würde. Der Anteil der rekombinanten Moleküle nach dem Auflösen der Kointegrats kann bei gleich großen homologen Bereichen maximal 50% betragen.

Zur Selektion der Bakterien mit Kointegratbildung wurden im nächsten Schritt die Bakterien aus den Kreuzungen (Abb. 3.6) in 10 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin (Amp) und 20 µg/ml Chloramphenicol (Cam) überimpft und bei 37°C und 220 rpm über Nacht geschüttelt (Forma Orbital Shaker, Thermo Fisher Scientific). Anschließend wurden 5 µl der Übernachtskultur erneut in 10 ml Amp- und Cam-haltiges LB-Medium überimpft und bei gleichen Bedingungen 8 h geschüttelt. Alle Bakterien ohne Kointegrat-Bildung starben in Amp-haltigem Medium ab. Die folgende Inkubation der Bakterien wurde in 10 ml Cam-haltigem LB-Flüssigmedium für 15 h bei 37°C im Schüttelinkubator durchgeführt. Sollte eine Sequenz mit Kanamycin (Kan)-Resistenzgen in das parentale BACmid überführt werden, wurde zusätzlich Kan (25 µg/ml) zum Nährmedium zugegeben. Jetzt konnte das Kointegrat durch erneute Rekombination in den homologen Bereichen spontan wieder aufgelöst werden. Weil dies jedoch ein eher seltenes Ereignis darstellt, waren weitere Selektionsschritte nötig. Die Bakterien, die das Kointegrat aufgelöst und dadurch den Transfervektor-Anteil entfernt hatten, wurden durch eine Inkubation für 48 h bei 30°C

auf Agarplatten mit 15 µg/ml Cam (und 25 µg/ml Kan), 5% (w/v) Sucrose, 20 mg/ml 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal) und 200 mg/ml Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) selektioniert. Sucrosesensitiv sind hier nur die Bakterien, die das Kointegrat nicht wieder aufgelöst haben und noch das SacB-Gen aus dem Transferplasmid pGS284 tragen.

Durch die Generierung einer HCMV-Mutante mit Substitution des Exon 4 der MIE-Sequenz durch eine kanlacZ-Kassette (TN/FIX-BAC\_kanlacZ) kann noch ein weiteres Selektionsverfahren angewendet werden, das sogenannte Blau-Weiß-Screening: In Anwesenheit von IPTG und des Farbstoffes X-Gal bilden Bakterien mit TN/FIX-BAC\_kanlacZ blaue Kolonien und sind Kan-resistent, Bakterien mit BACmiden ohne kanlacZ-Kassette bilden weiße Kolonien und sind zudem Kan-sensitiv.

Als zusätzliche Kontrolle wurde 1/3 einer Kolonie auf eine Agarplatte mit Amp (100 µg/ml), 1/3 derselben Kolonie auf eine Agarplatte mit Kan (25 µg/ml) und 1/3 der Kolonie auf eine Agarplatte mit Cam (150 µg/ml) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Bakterien mit mutierten BACmiden durften entweder nur auf der Platte mit Cam bzw. auf Platten mit Cam oder Kan anwachsen, falls sich im gewünschten BACmid eine kanlacZ-Kassette befindet.

## **3.5 Protein-Methoden**

### **3.5.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese**

Bei der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine in Gegenwart eines hohen SDS-Überschusses elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Bei diesem Verfahren lagert sich das negativ geladene SDS in konstanten Gewichtsverhältnissen an die Proteine an und kompensiert deren positive Ladung, so dass die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine zur Anode primär durch die Proteingröße festgelegt ist. Nach Laemmli (1970) werden die Proteine zuvor in einem niederprozentigen Sammelgel konzentriert und wandern von dort in das Trenngel ein.

Der Aufbau der Apparaturen, das Gießen der Gele und die Einstellung der Stromstärke während der Elektrophorese wurde gemäß Herstellerangaben (Mini-Protean 3 Cell, BioRad) durchgeführt. Die genaue Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgellösungen

ist in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt. Nach erfolgter Sedimentation der Virionen (3.6.7) wurden die entstandenen Viruslysate und zur Größenabschätzung zusätzlich ein Molekulargewichtsstandard für Proteine (Prestained Protein Marker Broad Range, New England Biolabs) aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte in  $1 \times$  Tris-Glycin-Puffer (20 mM Tris; 150 mM Glycin; 1% (w/v) SDS) bis die Bromphenolblaubande gerade herausgelaufen war. Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine immunologisch im WB-Verfahren sichtbar gemacht.

Reagenzien	25 ml 12%iges Trenngel	10 ml 5%iges Sammelgel
30% (w/v) Acrylamid 0,8% (w/v) Bisacrylamid	10,0 ml	1,7 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bid</sub>	8,2 ml	6,8 ml
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	6,3 ml	-
1 M Tris/HCl pH 6,8	-	1,25 ml
10% (w/v) APS	0,25 ml	0,1 ml
10% (w/v) SDS	0,25 ml	0,1 ml
Temed	0,01 ml	0,01 ml

### 3.5.2 WB-Analyse

#### 3.5.2.1 Proteintransfer

Nach ihrer Auftrennung durch SDS-PAGE wurden die entsprechenden Proteine für die immunologische Detektion auf Nitrozellulosemembranen (Optitran BA-S83, Schleicher & Schüll) überführt. Der Transfer erfolgte in Towbin-Puffer (13 mM Tris; 100 mM Glycin; 20% (v/v) Methanol) mit Hilfe einer Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell von BioRad. Die auf der Membran immobilisierten Proteine wurden im Anschluss zur Überprüfung des Transfers mit Ponceau S-Lösung (1% (w/v) Ponceau S; 5% (v/v) Essigsäure) reversibel angefärbt und mit PBS wieder entfärbt.

#### 3.5.2.2 Bindung des spezifischen Antikörpers

Zunächst wurden freie Bindungsstellen abgesättigt, indem die Nitrozellulosemembran nach einem Waschschrift (15 min) mit PBS-Tween (0,1% (v/v) Tween 20 in PBS) in einer Magermilchlösung (5% (w/v) Magermilchpulver in PBS) über Nacht bei 4°C oder 2 h bei RT geschüttelt wurden. Nach nochmaligem Waschen der Membran mit PBS-Tween für 10 min wurde die Membran in einer Verdünnung des spezifischen Antikörpers für 2-4 h bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Im Anschluss an die Bindung des Primärantikörpers

wurde die Membran einmal 15 min und je zweimal 10 min mit PBS-Tween gewaschen und danach für 1 h in dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper in PBS mit 3% (w/v) Magermilchpulver geschüttelt. Daraufhin wurde die Membran erneut dreimal mit PBS-Tween und einmal mit PBS gewaschen. HRP-konjugierte Antikörper konnten nach Chemilumineszenzreaktion durch Schwärzung eines Röntgenfilms nachgewiesen werden.

### **3.5.2.3 Detektion des Enzym-markierten Sekundärantikörpers**

Zum Nachweis des HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers mit Hilfe der Chemilumineszenzreaktion wurde das SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrat der Firma Pierce eingesetzt. Die Methode basiert auf dem Prinzip der verstärkten Chemilumineszenz in Gegenwart des Enzyms HRP und stellt ein nicht-radioaktives hochsensitives Proteinnachweisverfahren dar. Zu diesem Zweck wurden nach Abgießen des letzten Waschpuffers die beiden Detektionslösungen gemäß Herstellerangaben 1:1 vermischt und  $0,125 \text{ ml/cm}^2$  auf den Nitrozellulosefilter übertragen. Nach fünfminütiger Inkubation wurde die Membran kurz abgetropft und in Frischhaltefolie eingeschlagen. Durch Auflegen (1 s bis 1 h) von CL-Xposure-Filmen der Firma Pierce wurden die Signale detektiert. Zur Entwicklung wurden die belichteten Röntgenfilme 3 min in GBX-Entwickler (Kodak) inkubiert, 30 s in Wasser gewaschen, 2 min in GBX-Fixierer (Kodak) geschwenkt und nochmals zweimal mit Wasser gereinigt. Im Anschluss wurden die Filme bei  $37^\circ\text{C}$  getrocknet, gescannt und archiviert. Um die Intensität der Banden zu quantifizieren, wurden die Dateien mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogrammes Scion Image (Version beta 3b, Scion Corporation) densitometrisch analysiert.

## **3.5.3 IF-Mikroskopie**

### **3.5.3.1 Fixierung**

Für den IF-mikroskopischen Nachweis zellulärer und viraler Proteine wurden die Zellen in *6-well*-Platten auf sterilen  $18 \times 18$ -mm Deckgläsern ausgesät und je nach Fragestellung ein bis sieben Tage später infiziert. Im Anschluss an die Plaque-Bildung wurden die infizierten Zellkulturen dreimal mit PBS gewaschen und die Deckgläser mit der bewachsenen Seite nach oben in die mit PBS gefüllten Vertiefungen einer neuen *6-well* Platte gelegt. Für die Fixierung der Zellen mit Methanol wurde der Waschpuffer entfernt und durch 3 ml vorgekühltes Methanol ( $-20^\circ\text{C}$ ) ersetzt. Nach 15-minütiger Inkubation bei  $-20^\circ\text{C}$  wurde das

Methanol vollständig abgesaugt und die Deckgläser bei RT getrocknet. Die Methanol-fixierten Präparate wurden bei -20°C gelagert oder sofort in die Immunfärbung eingesetzt.

### **3.5.3.2 Immunfärbung und Mikroskopie**

Für die folgende Antikörperfärbung wurden die Präparate vorab 1 h bei RT mit Blockierungslösung (2% (w/v) BSA, 0,05% (v/v) Tween 20 und 0,02% (w/v) humanes IgG in PBS) bedeckt, um freie Bindungsstellen abzusättigen und unspezifische Reaktionen der Primärantikörper zu vermeiden. Nach zweimaligem Waschen mit PBS-Tween (0,05% (v/v) Tween 20 in PBS) wurde auf jedes Deckgläschen 50 µl Primärantikörperlösung (Primärantikörper werden in PBS mit 0,3µg/50µl humanem IgG verdünnt) getropft und die Präparate 1 h in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert. Damit währenddessen die Antikörperlösung nicht vom Deckglas herunterläuft, wurden vor deren Aufbringen die Vertiefungen der *6-well*-Platte mit einem Wattestäbchen um das Deckgläschen herum trocken getupft. Nach der ersten Antikörperinkubation wurden die Zellen dreimal in PBS-Tween gewaschen, mit 50 µl Sekundärantikörperlösung betropft und lichtgeschützt nochmals 1 h bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Zum Anfärben zellulärer DNA war in der Sekundärantikörperlösung der interkalierende Fluoreszenzmarker DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid, Roche, 0,2 µg/ml) enthalten. Ungebundene Antikörper wurden danach durch dreimaliges Waschen mit PBS-Tween (5 min) und einmaliges Waschen mit PBS entfernt. Im Anschluss an den letzten Waschschrift wurden die Deckgläschen luftblasenfrei mit der bewachsenen Seite nach unten auf einen Tropfen ProLong Gold Antifade (Invitrogen) gelegt. Die Objektträger wurden über Nacht bei RT getrocknet, nachfolgend bei 4°C gelagert und mit einem Fluoreszenzmikroskop (DMRX, Leica) mit digitalem Bildverarbeitungssystem (Meta View Imaging System) analysiert.

## **3.6 Zellkulturverfahren**

### **3.6.1 Kultivierung humaner Zelllinien**

Die im Rahmen dieser Dissertation benützte Zelllinie wurde als Einschichtkultur in 10- bzw. 15-cm Polystyrolschalen (Falcon) kultiviert. Als Nährlösung diente Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit 0,11 g/l Natriumpyruvat (Invitrogen). Dieses

wurde mit 10% fötalem Kälberserum (Pan) komplementiert unter Zusatz von Penicillin (1000 U/ml) und Streptomycin (10 µg/ml). Darin wurden die Zellen in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 37°C und 5% (v/v) CO<sub>2</sub> in einem HERAcell 240 Inkubator (Heraeus) gezüchtet.

Die langsam wachsenden, der Kontaktinhibition unterliegenden MRC-5 Zellen wurden einmal pro Woche, nach einmaligem Waschen mit PBS, durch Inkubation mit einer Trypsin/EDTA Lösung (0,05 U Trypsin; 0,02% (w/v) EDTA) von den Schalen abgelöst, mit frischem Medium verdünnt und in einem Verhältnis von 1:3 subkultiviert. Um die Kulturen in der G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus zu arretieren, wurde das Medium drei Tage nach dem Aussäen gewechselt und die Zellen für sieben Tage im selben Medium inkubiert.

### **3.6.2 Bestimmung der Zellzahl**

Um die Zellen bei Infektionsexperimenten mit einer bestimmten Virusmenge pro Zelle infizieren zu können, musste die Zellzahl pro Schale mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt werden. Dazu wurden trypsinierte Zellen in vorgewärmtem Medium geeignet verdünnt und durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Die Zählkammer wurde mit 100 µl der Zellsuspension gefüllt und die Zellen in vier Großquadraten mit je 16 Kleinquadraten des Kammerrasters im inversen Lichtmikroskop (Wilovers, Hund) ausgezählt. Nach Multiplikation der mittleren Zellzahl eines Großquadrats mit dem Faktor 10<sup>4</sup> unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors ergibt sich die Zellzahl pro ml.

### **3.6.3 Transfektion eukaryotischer Zellen durch Elektroporation von BAC-DNA**

Für die Generierung der HCMV-Mutanten aus BACmiden wurden diese durch Elektroporation in die Zelllinie MRC-5 eingebracht. Dabei wird durch das Anlegen eines elektrischen Pulses die Permeabilität der Zellmembran kurzzeitig derart erhöht, dass auch größere DNA-Moleküle in die Zellen eindringen können. Zur Transfektion wurden 5 × 10<sup>6</sup> MRC-5 Zellen in 250 µl Kulturmedium verwendet. Drei µg BAC-DNA und 1 µg pCGN-pp71 (kodiert für das HCMV-Tegumentprotein pp71 und verstärkt die Infektiosität viraler DNA) wurden in 40 µl sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub> gelöst und im Anschluss mit der Zellsuspension in einer Elektroporationsküvette (Gene-Pulser Küvette 0,4 cm, BioRad) gemischt. Dieses Gemisch wurde sofort bei 250 V und 1050 µF mit dem EasyjecT Optima Elektroporator

(Peqlab) elektroporiert. Unmittelbar danach wurde den MRC-5 Zellen 1 ml Kulturmedium zugesetzt und die Suspension auf eine 10-cm Schale mit vorgewärmtem Kulturmedium überführt. Vierundzwanzig h nach Transfektion wurde das Kulturmedium der MRC-5 Zellen gewechselt. Nach etwa drei Tagen können erfolgreich transfizierte Zellen anhand ihrer EGFP-Expression fluoreszenzmikroskopisch detektiert werden.

### **3.6.4 Transfektion mittels Lipofektion**

Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Komplexierung der zu transfizierenden DNA mit kationischen Polymeren. MRC-5 Zellen wurden 24 h vor Lipofektion in Kulturmedium ausgesät. Danach wurden zunächst 2 µg der zu transfizierenden Plasmid-DNA in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Außerdem wurden 6 µl des FuGENE 6 Reagenz (Roche) in 94 µl serumfreies DMEM überführt und nach kurzem Vortexen für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde diese DMEM/FuGENE 6-Mischung mit der DNA-Lösung vereinigt und nach kurzem Vortexen für 15 min bei RT inkubiert. Danach wurden 45 µl des jeweiligen Transfektionsansatzes in das Kulturmedium der subkonfluenten Zellen getropft. Letztlich konnten die transfizierten Zellen nach 48 h analysiert werden.

### **3.6.5 Ernten einer HCMV-Präparation**

Infizierte MRC-5 Zellen wurden mit einem Zellheber (Costar) von der Zellkulturplatte gelöst, die Zellsuspension in ein geeignetes Reaktionsgefäß überführt und für 10 min bei 4°C und 4000 × g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 50-ml Röhrchen gegeben und auf Eis gelagert, da auch im Kulturmedium der MRC-5 Zellen Viren enthalten sind. Das Zellpellet wurde in 5 ml kaltem Kulturmedium resuspendiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Wasserbad bei 37°C erneut aufgetaut. Im Anschluss daran wurde die Zellsuspension 20-mal im Becherresonator des Branson Sonifier 450 beschallt (*duty cycle*: 80%; *output control*: 8). Das Einfrieren und Auftauen begünstigt die Freisetzung der Virionen aus den Zellen und die Einwirkung des Ultraschalls fördert die Freisetzung der Viruspartikel von Zellfragmenten. Schließlich wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert (10 min, 4°C, 4000 × g) und der virushaltige Überstand zum abgenommenen Kulturmedium auf Eis gegeben. Die Virussuspension wurde aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### 3.6.6 Virustitration mit dem Plaque-Test

Die Titerbestimmung mittels Plaque-Tests basiert auf der Annahme, dass ein infektiöses Virus eine Zelle infiziert, sich vermehrt und von ihr ausgehend weitere Zellen infiziert, die anschließend absterben. In einem geschlossenen Zellrasen bilden sich auf diese Weise unter dem Lichtmikroskop gut erkennbare Plaques.

Für dieses Verfahren wurden in einer 12-well Platte ( $2 \times 10^5$  Zellen/well) MRC-5 Zellen ausgesät und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> bis zur Konfluenz inkubiert. Die zu titrierende Viruspräparation wurde in Kulturmedium der MRC-5 Zellen von 10<sup>-3</sup> bis 10<sup>-8</sup> logarithmisch verdünnt. Im Anschluss daran wurden die Zellen mit 500 µl der jeweiligen Virusverdünnung in Duplikaten infiziert. Nach 2 h Virusadsorption in reduziertem Volumen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurde das virushaltige Kulturmedium entfernt. Danach wurden die Zellen mit 2 ml Methocel-Medium (10 g Methocel; 500 ml 2 × DMEM, 7,5% NaHCO<sub>3</sub>; 1% (v/v) FBS; 0,1% (v/v) Pen/Strep) überschichtet, was die freie Virusausbreitung über das Medium verhindert. So breiten sich die Viren nur noch über Zell-Zell-Kontakt aus. Nach zehntägiger Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurde das Methocel-Medium abgesaugt und der Zellrasen nach dreimaligem Waschen mit PBS mit Methyleneblau (0,5% (w/v) Methyleneblau in 70% Methanol) für 10 min gefärbt. Im Lichtmikroskop wurde die Anzahl der Plaques gezählt und der Titer wie folgt berechnet:

$$\text{Anzahl der ausgezählten Plaques} \times \text{Virusverdünnung} \times 2 = \text{PFU/ml}$$

### 3.6.7 Sedimentation von Virionen

Zur Vorbereitung wurden Polyallomer-Zentrifugenröhrchen (#331372, Beckman, USA) mit je 2 ml einer 30%igen (w/v) Sucroselösung in PBS gefüllt. Danach wurden 1,2 ml des zelltrümmerfrei geernteten Virusstocks bei 37°C aufgetaut, zehnmal mit dem Becherresonator eines Branson Sonifier 450 beschallt (*duty cycle*: 80%; *output control*: 8) und in PBS auf insgesamt 8 ml verdünnt. Die Verdünnung wurde vorsichtig auf die Sucroselösung aufgetragen, so dass eine klare Abgrenzung zwischen den beiden Flüssigkeiten sichtbar war. Im Rotor gegenüberliegende Proben wurden anschließend auf der Feinwaage austariert und zentrifugiert (Ultrazentrifuge, Kendro, Laboratory Products, Rotor: SW41; 68000 × g; 1 h; 4°C). Nach Verwerfen des Überstandes wurde das virionenhaltige Sediment mit 100 µl Proteinauftragspuffer (100 mM Tris-HCl; 4% (w/v)

SDS; 20% (v/v) Glycerin; 0,2% (w/v) Bromphenolblau; 200 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol; pH 6,8) versetzt und durch Beschallung im Becherresonator (*duty cycle*: 100%; *output control*: 10; 15 s) resuspendiert. Das so erhaltene Viruslysate wurde 5 min bei 95°C erhitzt und bis zur weiteren Verwendung, etwa bei einer SDS-PAGE (3.5.1), bei -80°C gelagert.

### 3.6.8 Isolierung viraler DNA für *real-time* PCR

Kleine Mengen an viraler DNA wurden aus 200  $\mu$ l Viruspräparationen mit dem NucleoSpin<sup>®</sup> Blood Kit (Macherey-Nagel) gemäß Herstellerangaben präpariert und anschließend 2  $\mu$ l davon 1:10 verdünnt als Matrize in die quantitative *real-time* PCR eingesetzt (3.4.5.1).

### 3.6.9 HCMV-Wachstumskurven

Für die Erstellung von HCMV-Wachstumskurven wurden vorab MRC-5 Zellen in einer 6-well Platte ( $6 \times 10^5$  Zellen/well) ausgesät und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> bis zur Konfluenz gezüchtet. Im Anschluss daran wurden die Zellen mit einer MOI von ~0,25 in einem Volumen von 1 ml infiziert. Mit jeder Virusmutante wurden zwei unabhängige Vertiefungen infiziert. Nach zweistündiger Virusadsorption in reduziertem Volumen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden 2 ml Kulturmedium zugegeben und die Platte unter Standardbedingungen inkubiert. Alle drei Tage wurde 1,8 ml Kulturüberstand abgenommen und durch frisches Kulturmedium erneuert. Aus dem virushaltigen Kulturüberstand wurde virale DNA isoliert (3.6.7) und mit Hilfe der *real-time* PCR (3.4.5.1) quantifiziert. Außerdem wurden die Kulturen täglich mit einer Digitalkamera (Sony, Cybershot) am inversen Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Axiovert 200) fotografiert.

### 3.6.10 Dual-Luciferase Reporter Assay

Für den Dual-Luciferase Reporter Assay (Promega) wurden gleichzeitig ein pGL3-Reporterkonstrukt, welches für die Firefly Luciferase kodiert, und ein pRL-Reporter, der die Renilla Luciferase-cDNA trägt, zusammen mit dem jeweiligen IE1-Effektorplasmid oder einem Kontrollplasmid (3.2.2) in MRC-5 Zellen transfiziert (3.6.4). Die 61 kDa Firefly Luciferase emittiert durch Oxidation von Käferluciferin unter Anwesenheit von ATP, Mg<sup>2+</sup> und O<sub>2</sub> Photonen. Durch Zugabe von Coenzym A wird die Lumineszenz

stabilisiert. Für die Lichtemission der 36 kDa Renilla Luciferase sind O<sub>2</sub> und Coelenterazin nötig.

Nach Transfektion der Zellen in einer 12-*well* Platte ( $3 \times 10^5$  Zellen/*well*), 48-stündiger Inkubation und Waschen mit 2 ml PBS, erfolgte die Zellyse mit 250 µl *Passive Lysis Buffer* und Schütteln der Schalen für 15 min bei RT. Anschließend wurde das Zelllysats in ein 1,5-ml Sammelgefäß überführt und die Zelltrümmer abzentrifugiert (10 min, RT,  $16100 \times g$ ). Die Messung der Lichtemission erfolgte im Luminometer (Lumat LB 9507, Berthold Technologies). Dazu wurden 20 µl des Zelllysats in ein Teströhrchen pipettiert und durch Zugabe von 100 µl Luciferase-Assay-Reagenz II zunächst die Chemielumineszenz der Firefly Luciferase gemessen. Im Anschluss daran wurden 100 µl Stop&Glo-Reagenz zugegeben, wodurch die Firefly Luciferase gehemmt und die Renilla Luciferase aktiviert wird. Die dabei entstandene Lichtemission konnte nun ebenfalls quantitativ erfasst werden.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Gesamtkonzept

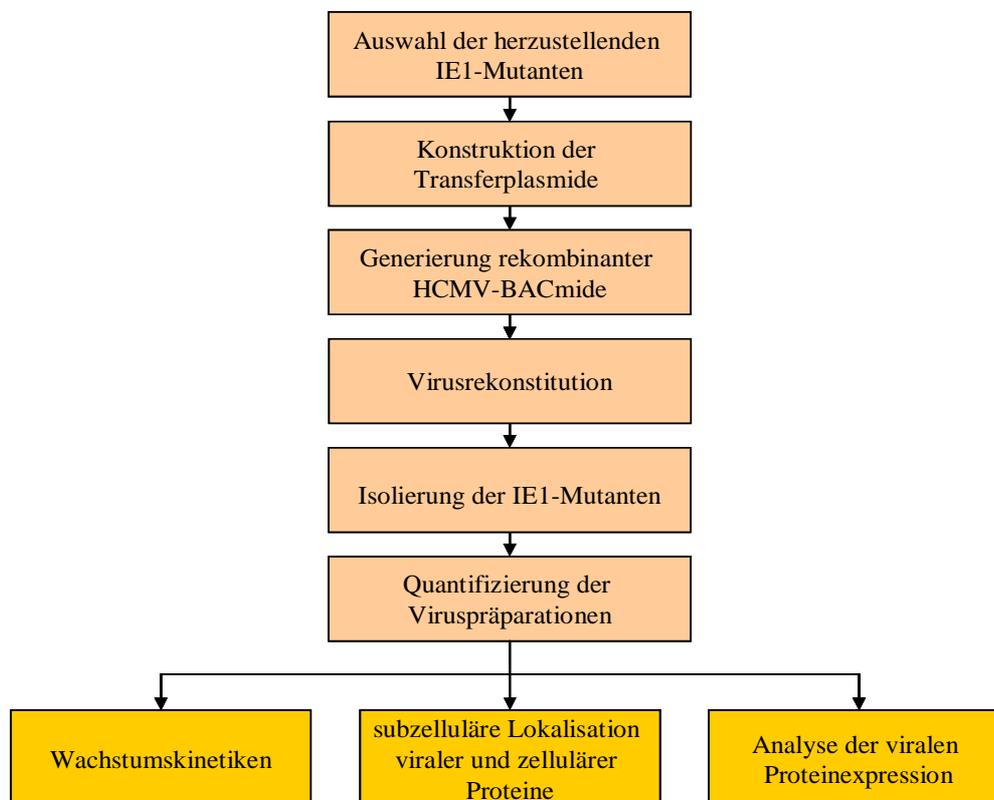
Lange Zeit stellte es ein schwieriges und zeitaufwändiges Unterfangen dar, HCMV-Mutanten mit genau definierten Genomveränderungen herzustellen und deren Phänotypen zu charakterisieren. Dies führte oftmals zu voneinander abweichenden Resultaten in der Literatur. Mit der Etablierung neuer Mutagenesestrategien ergab sich jedoch die Möglichkeit, Mutationsanalysen technisch einfacher und schneller durchzuführen und reproduzierbare Ergebnisse zu liefern.

Auf der Grundlage bisher beschriebener IE1-defizienter HCMV-Mutanten wurden in der vorliegenden Arbeit sowohl für den attenuierten Laborstamm TN als auch für das klinische HCMV-FIX-Isolat mit Hilfe der neuartigen BAC-Technologie IE1-Exon 4-Substitutionsmutanten generiert, bei der keinerlei IE1-spezifische Genprodukte mehr produziert werden sollten. Weiterhin wurden im genomischen Kontext beider Stämme sieben verschiedene, zu Einzelaminosäureaustauschen führende Punktmutationen in das IE1-spezifische Exon 4 der MIE-Transkriptionseinheit eingebracht. Vier davon (L174P, K192P, C279A, K450R) dienten dazu, die Struktur bereits bekannter oder vermuteter wichtiger DNA-Motive im kodierenden Bereich des IE1-Gens zu verändern. Die übrigen drei Nukleotidvariationen (A373Stopp, E421Stopp, G476Stopp) führten zur Bildung neuer Stopp-Codons und somit verkürzter IE1-Proteine, denen wichtige Bereiche des C-Terminus fehlten.

Zunächst wurden IE1-Exon 4-Substitutionsmutanten als Negativkontrollen hergestellt, sowie IE1-Revertanten, um die Korrektheit der angewandten Methoden zu überprüfen. Danach wurden die genannten IE1-Punktmutationen mit Hilfe zweier verschiedener ortsgerichteter *in vitro*-Mutageneseverfahren (Fusions-PCR und QuikChange<sup>®</sup>-Verfahren) in geeignete Transferplasmide integriert (4.2.4). Über homologe Rekombinationsprozesse in *E. coli* wurden daraufhin entsprechende rekombinante HCMV-BACmide generiert (4.2.5). Diese wurden nach Transfektion in permissive Zellen (primäre humane Fibroblasten) zu infektiösen Viren rekonstituiert (4.2.6). Um gleiche Infektionsbedingungen für die folgenden funktionellen Untersuchungen zu schaffen,

erfolgte die Quantifizierung DNA-haltiger Viruspartikel (4.3.1) sowie die nähere Bestimmung des Anteils an DNA-freien defekten Viruspartikeln (4.3.2) in den rekombinanten HCMV-Präparationen. Jetzt konnten die Unterschiede im Replikationsverhalten aller hergestellten Virusmutanten im Vergleich zu den WT-Viren beider Stämme TN und FIX mit einer „Multischritt-Wachstumskinetik“ quantitativ bestimmt werden (4.3.3). Dazu wurden primäre humane Fibroblasten bei niedriger MOI (Verhältnis Virus : Zelle  $\approx 0,25$ ) jeweils mit WT-HCMV, IE1-Revertanten, IE1-Exon 4-Substitutionsmutanten oder einer der IE1-Viruspunktmutanten infiziert und die virale DNA im Kulturüberstand zu verschiedenen Zeitpunkten mittels quantitativer PCR analysiert. Zusätzlich ließ sich die Ausbreitung der verschiedenen Viren anhand ihrer EGFP-Expression fluoreszenzmikroskopisch verfolgen.

Zuletzt wurde durch indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie der Zusammenhang zwischen der Expression von IE1-Proteinen und der Fähigkeit zur Auflösung von PML-Körpern überprüft (4.3.4) und durch den Dual-Luciferase Reporter Assay die transaktivierenden Eigenschaften der IE1-Mutanten gemessen (4.3.5).



**Abb. 4.1:** Schematische Darstellung des Gesamtkonzepts.

## 4.2 Auswahl und Herstellung der Virusmutanten

### 4.2.1 Vorbemerkungen

Viele Jahre lang stellte die gezielte genetische Manipulation des 230 kbp großen HCMV-Genoms eine große technische Herausforderung dar. Isolierte Untersuchungen von HCMV-Genprodukten einschließlich der viralen MIE-Proteine mittels eukaryotischer Überexpressionssysteme lieferten andererseits häufig nur begrenzte Aussagen über die eigentliche Proteinfunktion im Infektionszyklus, die sich meist erst im Zusammenspiel mit anderen viralen Faktoren zeigt. Durch die Herstellung spezifischer Virusmutanten mit der in dieser Arbeit verwendeten neuartigen BAC-Technologie kann jedoch die Funktion jedes beliebigen viralen Genproduktes, auch im authentischen Kontext infizierter Zellen, untersucht werden.

### 4.2.2 Beschreibung der HCMV-IE1-Mutanten

Das 491-Aminosäuren umfassende 72 kDa IE1-Protein ist, zusammen mit dem 86 kDa IE2-Protein, das erste während einer HCMV-Infektion im Überfluss exprimierte Protein. IE1-72 kDa besitzt wichtige Funktionen bezüglich Zellzyklus-Regulation, Interferon-Resistenz, Apoptose, Signaltransduktion und Transkriptionskontrolle von zellulären und viralen Genen. Auf diese Weise übernimmt es eine Schlüsselrolle während der frühen nukleären Phase der HCMV-Infektion. Die Konstruktion rekombinierter Viren mit Mutationen in diesem Protein könnte einen wesentlichen Beitrag dazu leisten, die komplexen Vorgänge während einer viralen HCMV-Infektion besser zu verstehen.

Alle bisher veröffentlichten genetischen Analysen des HCMV IE1-Gens beschränkten sich auf die Laborstämme „Towne“ (TN), „AD169“ und „Toledo“ (Plotkin *et al.* 1975; Quinnan *et al.* 1984; Chee *et al.* 1990; Cha *et al.* 1996; Greaves *et al.* 1998; Davison *et al.* 2003). Im Gegensatz dazu wurde im Rahmen dieser Arbeit neben dem HCMV-Stamm TN auch das „FIX“-Isolat (*fusion inducing factor x*, FIX) verwendet. Der TN-Stamm wurde ursprünglich aus dem Urin eines infizierten Kindes gewonnen und ist über die American Type Culture Collection (ATCC-Nr. VR-977) erhältlich. Im TN-BAC ersetzt der Plasmidanteil (BAC-Kassette) die Regionen US1-US12 des viralen Genoms (Marchini *et al.* 2001). TN wird zu den „laboradaptierten“ Stämmen gezählt, die sich durch eine hohe Anzahl an Zellkultur-Passagen an die Vermehrung in humanen Fibroblasten angepasst

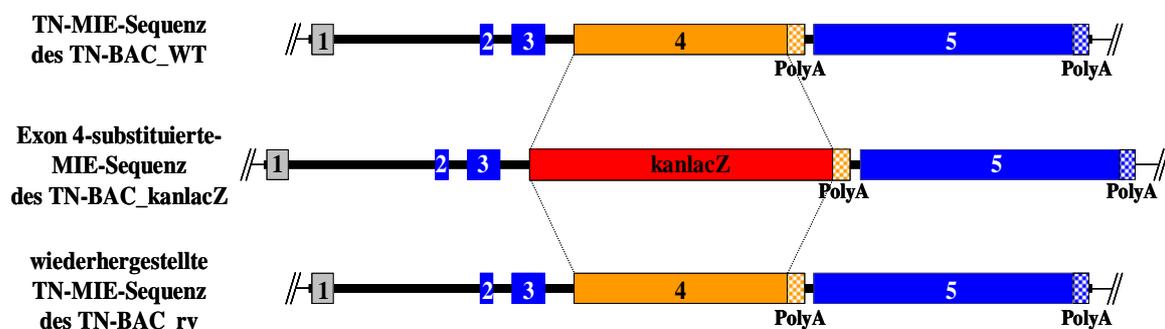
haben und allgemein als apathogen gelten (MacCormac *et al.* 1999; Prichard *et al.* 2001; Murphy *et al.* 2003; Wang *et al.* 2004). Dagegen hat der HCMV FIX-Stamm, der aus dem „klinischen Isolat“ VR1814 einer schwangeren Frau mit primärer HCMV-Infektion gewonnen wurde, nur eine sehr begrenzte Anzahl von Passagen in kultivierten Fibroblasten durchlaufen (Revello *et al.* 1992; Hahn *et al.* 2002). Demzufolge gilt der FIX-Stamm als hoch pathogen und kann sowohl in primären Fibroblasten als auch in anderen Zelltypen (z. B. humanen Endothelzellen) replizieren, was der physiologischen Situation im menschlichen Körper entspricht. Im FIX-BAC ersetzt die BAC-Kassette die Regionen IRS1-US6. Die Einführung gleicher Mutationen im IE1-Gen eines attenuierten Laborstammes und eines pathogenen Primärisolates sollte erstmals eine vergleichende Charakterisierung der zugehörigen Phänotypen ermöglichen.

Es gibt Hinweise darauf, dass genetische Manipulationen in der komplex regulierten viralen MIE-Transkriptionseinheit, die eigentlich zu einer spezifischen Inaktivierung von IE1 führen sollten, zusätzlich unerwünschte, IE1-unabhängige funktionelle Auswirkungen haben können. Dies ist möglicherweise ein Grund für kontroverse Ergebnisse bezüglich der Bedeutung der IE1-Proteine für die virale Vermehrung und Pathogenese (Greaves *et al.* 1998; Ghazal *et al.* 2005). Zur eindeutigen Klärung der Konsequenzen IE1-spezifischer Gendefekte wurden in der vorliegenden Arbeit neun verschiedene Mutationen in das IE1-spezifische Exon 4 der HCMV MIE-Transkriptionseinheit eingeführt, die auf einen vollständigen oder partiellen Funktionsverlust der IE1-Genprodukte abzielten. Da alle Mutationen sowohl im FIX- als auch im TN-Stamm generiert wurden, entstanden so insgesamt 18 neue HCMV-Virusmutanten, welche folgendermaßen benannt wurden:

- Exon 4-Substitutionsmutanten (TN\_kanlacZ, FIX\_kanlacZ)
- IE1-Revertanten (TN\_rv, FIX\_rv)
- L174P-Punktmutanten (TN\_L174P, FIX\_L174P)
- K192P-Punktmutanten (TN\_K192P, FIX\_K192P)
- C279A-Punktmutanten (TN\_C279A, FIX\_C279A)
- K450R-Punktmutanten (TN\_K450R, FIX\_K450R)
- A373-Stoppmutanten (TN\_A373Stopp, FIX\_A373Stopp)
- E421-Stoppmutanten (TN\_E421Stopp, FIX\_E421Stopp)
- G476-Stoppmutanten (TN\_G476Stopp, FIX\_G476Stopp)

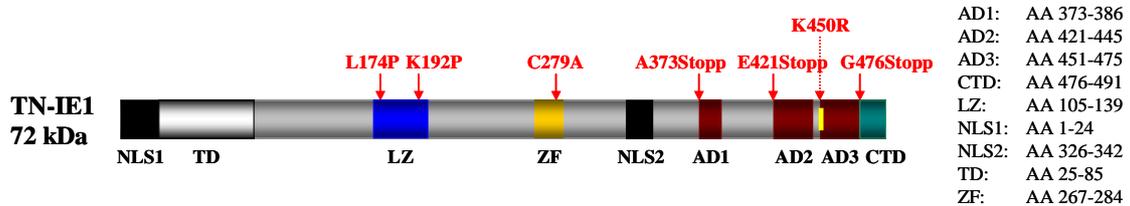
Die Analyse bekannter HCMV-Mutanten mit kompletter Deletion des MIE Exon 4 deutet darauf hin, dass IE1 bei Infektion permissiver primärer humaner Fibroblasten mit hoher MOI nicht, mit niedriger MOI jedoch unbedingt für die Virusvermehrung benötigt wird. Dies ist vermutlich auf einen Mangel oder auf eine verzögerte Bereitstellung viraler Genprodukte der E-Phase zurückzuführen. Außerdem zeigte IE2 in Abwesenheit von IE1 ein verändertes intranukleäres Verteilungsmuster (Mocarski *et al.* 1996; Greaves *et al.* 1998). Alle bisher vorgestellten IE1-Deletionsmutanten wurden allerdings noch nicht mit Hilfe der BAC-Technologie hergestellt. Insofern sollten die beiden im Rahmen dieser Arbeit konstruierten Substitutionsmutanten (TN/FIX\_kanlacZ) vor allem als Ausgangskonstrukte für die unten beschriebenen Punktmutanten und zur Überprüfung der bereits publizierten Daten dienen. Dazu wurde das Exon 4 des MIE-Abschnittes bis auf die Poly-A-Region durch eine kanlacZ-Kassette ersetzt, wodurch die Bildung von IE1 und IE19 vollständig unterbunden wird (Abb. 4.2). Allerdings wurde die Akkumulation von verkürzten MIE-Proteinen (kodiert von den Exons 2 und 3) erwartet, welche nach Infektion von Fibroblasten mit WT-Viren normalerweise nur in sehr geringen Mengen auftreten und wahrscheinlich einen transdominant negativen Effekt auf die Virusreplikation ausüben (Awasthi *et al.* 2004). Die Herstellung IE2-kodierender Transkripte sollte aber erwartungsgemäß nicht beeinträchtigt sein. Mit der Konstruktion von FIX-BAC\_kanlacZ wurde erstmals eine Exon 4-Substitutionsmutante in einem klinischen Isolat geschaffen, was Vergleiche zwischen pathogenen und apathogenen Laborstämmen ermöglicht.

Zur Verifizierung der angewandten Methoden wurden, ausgehend von den Substitutionsmutanten, für TN und FIX jeweils „Revertanten“ generiert (TN/FIX\_rv), die bei korrekter Durchführung wieder WT-Eigenschaften aufweisen sollten (Abb. 4.2).



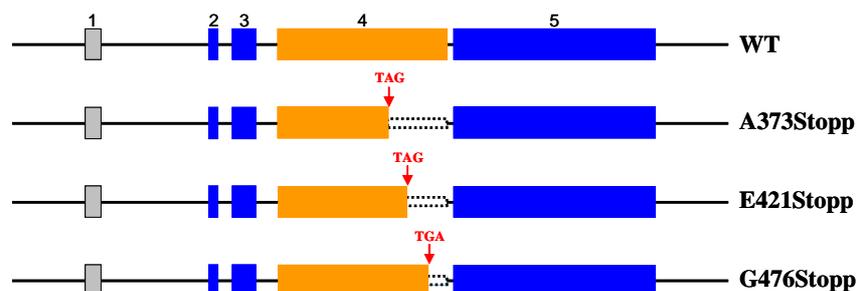
**Abb. 4.2: Schematische Darstellung der Exon 4-Substitution im Kontext der MIE-Sequenz.** Dünne schwarze Balken stellen Introns, dicke Balken Exons dar. Die Exons sind durchnummeriert (1-5), wobei kodierende Abschnitte farblich dargestellt sind. Mittels homologer Rekombination wurde der für das Exon 4 kodierende Bereich des TN-BAC\_WT durch eine kanlacZ-Kassette ersetzt. Danach wurde diese Substitution rückgängig gemacht. Für die Herstellung der FIX\_kanlacZ-Substitutionsmutante sowie der FIX-Revertante gilt Entsprechendes.

Neben den Auswirkungen einer kompletten IE1-Deletion interessierte uns der spezifische Verlust einzelner, kritischer funktioneller Bereiche innerhalb des IE1-Proteins (Abb. 4.3). Zu diesem Zweck sollten mehrere Punktmutanten konstruiert werden, bei denen im Gegensatz zu fast allen bisher bekannten HCMV IE1-Mutanten nur jeweils eine einzige Aminosäure verändert wurde. Sämtliche regulatorische Sequenzen zur Herstellung IE2-spezifischer Transkripte, einschließlich wichtiger Spleißsignale, blieben somit unberührt.



**Abb. 4.3: Schematische Darstellung bekannter struktureller Motive des TN-72 kDa IE1-Proteins und der einzufügenden Aminosäureaustausche.** Der graue Balken kennzeichnet das 491-Aminosäuren lange TN-72 kDa IE1-Protein. Darin sind die zwei Bereiche für die Kernlokalisierung (*nuclear localization signal* [NLS]) (Wilkinson *et al.* 1998; Delmas *et al.* 2005) markiert, desweiteren die Transaktivierungsdomäne (TD) (Pizzorno *et al.* 1991), das putative Leucinezipper- (LZ) und Zinkfingermotiv (ZF), die drei sauren Domänen (*acidic domain* [AD]) sowie die Chromatinbindedomäne (*chromatin tethering domain* [CTD]). Der gelbe Strich kennzeichnet die SUMOylierungsstelle im IE1-Protein an Lys<sub>450</sub>. Rote Pfeile symbolisieren die sieben verschiedenen Stellen für die in dieser Arbeit generierten HCMV-Punktmutanten und ihre Bezeichnungen. Rechts außen sind die jeweiligen Aminosäuren (*amino acids* [AA]) angeführt. Für das FIX-72 kDa IE1-Protein gilt Entsprechendes.

Bei den drei Stoppmutanten führen Nukleotidaustausche zum vorzeitigen Abbruch der Translation der IE1-spezifischen Exon 4-Sequenz (Abb. 4.4).



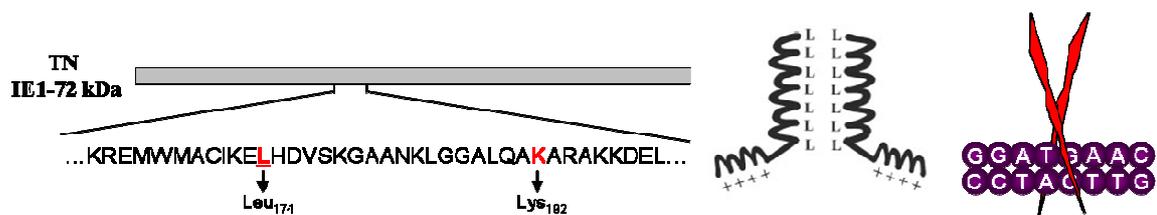
**Abb. 4.4: Schematische Darstellung der HCMV TN-MIE-Transkriptionseinheit (4450 bp) von WT und Stoppmutanten.** Dicke Balken stellen die durchnummerierten Exons dar, wobei kodierende Abschnitte farbig unterlegt sind. Rote Pfeile kennzeichnen die Mutationsstellen im Exon 4 des TN-MIE-Transkripts. Gestrichelte, nicht ausgefüllte Balken markieren Deletionen der Stoppmutanten in der IE1-spezifischen Exon 4-Sequenz. In die FIX-MIE-Transkriptionseinheit wurden entsprechende Mutationen eingeführt.

Durch die Chromatinbindungsdomäne, bestehend aus den 16 C-terminalen Aminosäuren, wird die Bindung von IE1 an Metaphasechromatin während der Mitose vermittelt (Lafemina *et al.* 1989; Wilkinson *et al.* 1998; Reinhardt *et al.* 2005). Dieses Phänomen wird nur gelegentlich beobachtet, weil die Mehrheit der HCMV-infizierten Zellen in einer prämitotischen Phase des Zellzyklus arretiert werden (Jault *et al.* 1995; Bresnahan *et al.* 1996). Möglicherweise trägt die Chromatinbindung zur Aufrechterhaltung der Latenz und zur Replikationskontrolle des Virusgenoms bei. Mit Hilfe der **G476Stopp**-Mutation kann der spezifische Verlust dieser Domäne erstmals selektiv funktionell untersucht werden.

Auffälligerweise liegen im IE1-Protein C-terminal drei extrem saure Aminosäureabschnitte (AD1-3, Abb. 4.3) vor. Die genaue Bedeutung dieser Bereiche im IE1-Protein ist nicht bekannt, obwohl saure Domänen häufig zur Transaktivierungsfunktion regulatorischer Proteine beitragen (Berk *et al.* 1998). Der Sequenzvergleich mit anderen CMV-Spezies offenbarte bei Schimpanse, Affe und Rhesusaffe Übereinstimmungen bezüglich der Sequenz der sauren Domänen (Reinhardt *et al.* 2005). Unterstrichen wird die Bedeutung dieses C-terminalen IE1-Bereiches ebenso durch die Tatsache, dass hier mehrere konservierte Motive mit dem zellulären *signal transducer and activator of transcription 2* (STAT2)-Protein interagieren, einem wichtigen Mediator der antiviralen Interferonantwort. Diese Interaktion hat eine Blockierung der virusinduzierten Aktivierung Interferon-abhängiger zellulärer Gene zur Folge (Paulus *et al.* 2006; Krauss *et al.* 2009). Zur funktionellen Charakterisierung der sauren Motive im IE1-Protein wurden infolgedessen zwei C-terminale Deletionsmutanten hergestellt. Während bei der **A373Stopp**-Punktmutante alle drei sauren Domänen (AD1-AD3) sowie die SUMOylierungs- und Chromatinbindemotive fehlen, unterscheidet sich die **E421Stopp**-Punktmutante davon nur durch den Verbleib der ersten sauren Domäne (AD1, Abb. 4.3).

Die Mutation L174P beruht auf Spekulationen, die im zentralen Bereich des IE1-Proteins ein Leucinzipper-artiges Motiv vermuten lassen. Leucinzipper vermitteln typischerweise das reißverschlussartige Ineinandergreifen von Aminosäure-Seitenketten zwischen DNA-

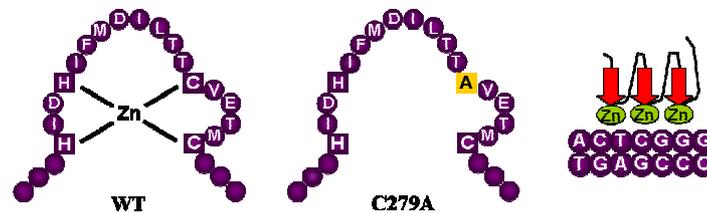
Helices. Normalerweise sind Leucinzipper aus einer heptadischen Aminosäurefolge aufgebaut (*abcdefg*), wobei Reste an Position *a* der Ausbildung einer hydrophoben Berührungsfläche dienen, ebenso wie das an jeder siebten Position angeordnete Leucin. Dadurch ergibt sich die Fähigkeit zur Dimerisierung: Zwei oder mehrere Leucinzipper bilden ineinander verdrehte  $\alpha$ -Helices und es resultiert eine „helikale Gabel“, die DNA-bindende Elemente in der großen Furche von dsDNA positionieren kann (Abb. 4.5) (Landschulz *et al.* 1988). Häufig wird auf diese Weise die Wechselwirkung von DNA mit Proteinen der Transkriptionsmaschinerie vermittelt. So finden sich derartige Motive in vielen transkriptionsregulierenden Faktoren, wozu auch IE1 gehört. Allerdings kann man bei näherer Betrachtung den in Frage kommenden Sequenzabschnitt bei IE1-72 kDa nicht zu den klassischen Leucinzippern zählen. Welchen Einfluss dieser hoch konservierte Bereich dennoch für bestimmte IE1-Funktionen haben könnte, sollte mit der Konstruktion und Analyse der Virusmutanten TN/FIX\_\*\*L174P\*\* und TN/FIX\_\*\*K192P\*\* untersucht werden.



**Abb. 4.5:** Grafische Darstellung des Leucinzipper-artigen Motivs in IE1-72 kDa. Links ist der zentrale relevante Ausschnitt des Aminosäurecodes des IE1-Proteins von HCMV-TN gezeigt (AA 163-200). An Leu<sub>174</sub> und Lys<sub>192</sub> wurden in der vorliegenden Arbeit Punktmutationen eingeführt, um diesen Bereich strukturell zu stören. Rechts sind schematisch der Aufbau eines Leucinzippers und die dadurch vermittelte Wechselwirkung mit dsDNA dargestellt.

Darüber hinaus wird in der DNA-Sequenz des Exon 4 ein dem „Zinkfinger“ ähnliches Motiv vermutet. Zinkfinger spielen als DNA-Bindemotive vieler bekannter Transkriptionsregulierender Proteine eine wichtige Rolle, tragen aber auch zur Protein-Protein-Wechselwirkung bei und finden sich unter anderem bei der RNA-Polymerase II und Metallothioneinen (Miller *et al.* 1985; Klug *et al.* 1987). Bei Zinkfinger-Motiven falten sich wiederholt entweder vier Cystein- oder je zwei Cystein- und Histidinreste um ein Zinkatom. Über Schlaufenbildung aus mehreren basischen Aminosäureresten wird die Interaktion mit DNA vermittelt. Im IE1-Protein von HCMV-TN bzw. HCMV-FIX kann das putative Zinkfingermotiv durch den Austausch Cys<sub>279</sub> gegen Ala<sub>279</sub> (C279A) gestört werden (Abb. 4.6). Da für IE1 bislang keine DNA-Bindung beschrieben wurde,

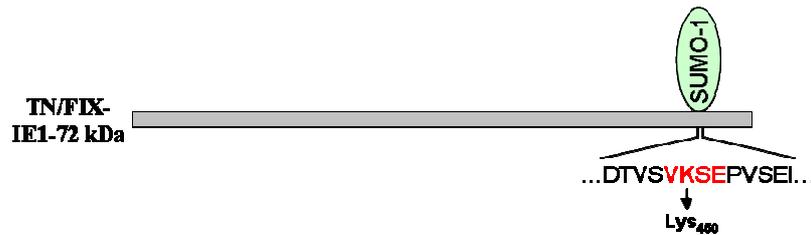
konstruierten wir die **C279A**-Virusmutante, vor allem um den Einfluss einer möglicherweise durch dieses Motiv vermittelten Protein-Protein-Interaktion auf die Aktivität des viralen Proteins und die Virusvermehrung zu untersuchen.



**Abb. 4.6: Grafische Darstellung des putativen Zinkfingermotivs in IE1-72 kDa.** Gezeigt ist der relevante Ausschnitt des Aminosäurecodes (AA 267-284) des IE1-Proteins von HCMV-TN bzw. HCMV-FIX, der durch an charakteristischer Stelle vorhandene Histidin- und Cysteinreste (eckig umrandet) eine Faltung um ein Zinkatom potenziell ermöglicht. Durch die in dieser Arbeit generierte Viruspunktmutation C279A wird dies verhindert. Rechts ist die durch Zinkfinger vermittelte DNA-Bindung schematisch dargestellt.

Bekanntlich sind IE1 und IE2 Substrate für eine kovalente Bindung an das Ubiquitinverwandte, 11,5 kDa große SUMO-1-Protein (Hofmann *et al.* 2000; Ahn *et al.* 2001). Dieses ist auch bekannt als Sentrin, GMP1, PIC1, Ubl1 oder SMT3 (Homolog in *Saccharomyces cerevisiae*). Bei IE2-86 kDa wird durch SUMOylierung die Fähigkeit zur Transaktivierung verstärkt (Hofmann *et al.* 2000; Ahn *et al.* 2001). Viele andere, für die virale Genregulation zuständigen Proteine, sind ebenfalls Substrate für eine SUMOylierung, beispielsweise das ZTA-Protein von EBV (Adamson *et al.* 2001), das E1-Protein des bovinen Papillomavirus (Rangasamy *et al.* 2000), das IE1-Protein des Humanen Herpesvirus 6 (Gravel *et al.* 2002) oder das E1B-Protein des Adenovirus Typ 5 (Endter *et al.* 2001). Die resultierenden Effekte sind jedoch größtenteils unklar. Bei den zellulären Proteinen RanGAP1, PML, Sp100, MDM2 und p53 sind die funktionellen Konsequenzen einer SUMOylierung äußerst divers und führen unter anderem zu Proteinstabilisierung, Wechselwirkung mit anderen Proteinen und modifizierter Genregulation oder Zelllokalisierung (Hochstrasser 2000). Auch ein Zusammenhang mit Apoptose, viraler Onkogenese, Zellzyklusprogression, Aufrechterhaltung der Genomstabilität und PML-Körper-Formation wurde für SUMO-1 beschrieben (Yeh *et al.* 2000; Muller *et al.* 2001). Wie in den gängigen SUMO-1-Substraten, findet sich auch bei IE1 ein konserviertes Motiv „(I/L/V)KXE“ (IE1, AA 449-452: VKSE, Abb. 4.7), welches durch die Punktmutation **K450R** (Lys<sub>450</sub>→Arg<sub>450</sub>) derart verändert werden kann, dass keine

posttranslationale SUMOylierung mehr möglich ist (Spengler *et al.* 2002; Nevels *et al.* 2004). Demzufolge erlaubt eine derartige Virusmutante spezifische Aussagen über die bislang weitgehend unbekanntenen Auswirkungen der SUMOylierung von IE1 auf das Viruswachstum oder andere Eigenschaften. Interessant wäre beispielsweise, ob die Modifikation durch SUMO-1 die Fähigkeit zur Bindung an PML-Körper vermittelt, was bei vielen SUMOylierten Proteinen, wie bei PML, der Fall ist.



**Abb. 4.7: Grafische Darstellung der SUMOylierung von IE1-72 kDa.** Das dafür verantwortliche Motiv „(I/L/V)KXE“ findet sich als „VKSE“ im Aminosäurecode (AA 449-452) des IE1-Proteins von TN und FIX wieder (rot). Durch die Punktmutation K450R wird eine SUMOylierung von IE1 verhindert.

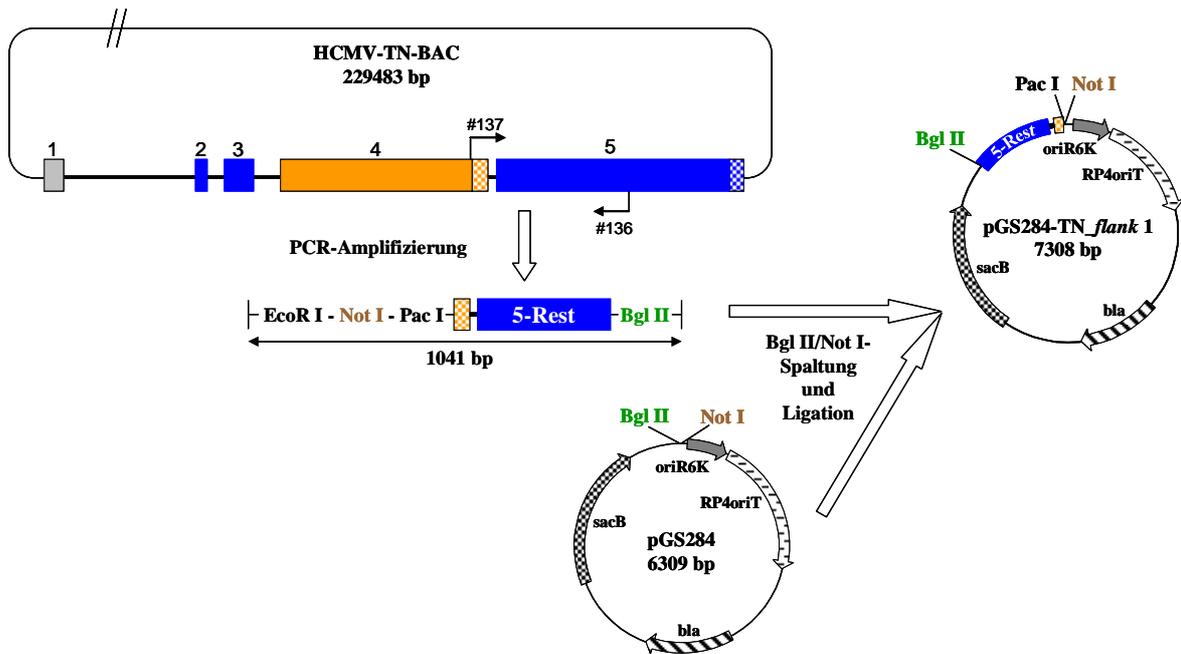
### 4.2.3 Mutagenese der IE1-kodierenden Sequenz und Herstellung der Transferplasmide

#### 4.2.3.1 Herstellung von Transferplasmiden mit IE1-spezifischer Exon 4-Substitution

Zuerst sollte eine Virusmutante generiert werden, bei der, bis auf den Poly-A-Anteil, das komplette Exon 4 der MIE-Transkriptionseinheit deletiert und durch eine kanlacZ-Kassette ersetzt ist. Hierfür mussten zunächst zwei ungefähr gleich große DNA-Stücke (*flanks*), die im HCMV-WT-Genom das Exon 4 zu beiden Seiten flankieren, amplifiziert und in das Transferplasmid pGS284 integriert werden. Danach sollte die kanlacZ-Kassette zwischen die beiden flankierenden DNA-Bereiche eingebaut werden.

Im ersten Schritt wurde ein etwa 1000 bp großes DNA-Stück, das eine Seite des Exons 4 flankiert, in einer ersten PCR-Reaktion amplifiziert. Dazu dienten das HCMV-TN- bzw. das HCMV-FIX-BACmid als Matrizen. Für TN wurden die Starteroligonukleotide #136/#137 eingesetzt, für FIX #136/#138. Die richtige Größe der PCR-Produkte konnte gelelektrophoretisch bestätigt werden (Abb. 4.9). Anschließend wurden sie gereinigt und nach Restriktionsspaltung mit Bgl II und Not I in mehreren gleichen Ansätzen in den ebenfalls Bgl II/Not I-gespaltenen Vektor pGS284 subkloniert. Daraus entstanden die

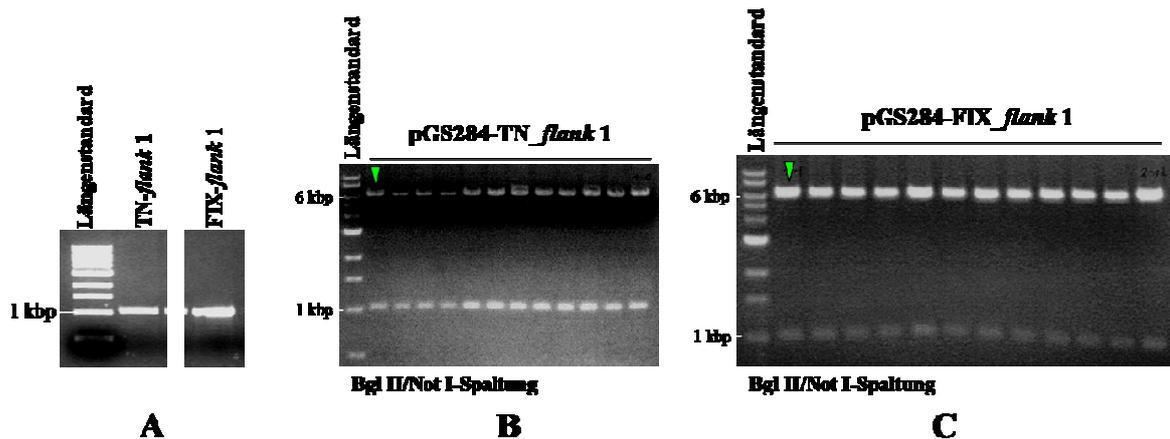
Konstrukte pGS284-TN/*flank* 1 (Abb. 4.8), die zur Vermehrung in den *E. coli*-Stamm S17 $\lambda$ pir transformiert wurden. Zur Verifizierung wurde das neu eingefügte Insert (*flank* 1) sequenziert und die Plasmidgröße mittels Restriktionsspaltung überprüft. Dabei zeigten sich nach Bgl II/Not I-Spaltung in allen Ansätzen die erwarteten Bandenmuster (Tab. 4.1 und Abb. 4.9).



**Abb. 4.8:** Schematische Darstellung der Herstellung von pGS284-TN/*flank* 1. Mittels PCR-Amplifizierung (Matrize: HCMV-TN-BACmid) wurde ein etwa 1000 bp großes DNA-Stück generiert, das das Exon 4 flankiert. Es enthält neue Schnittstellen für die Restriktionsenzyme EcoR I, Not I (braun), Pac I und Bgl II (grün). Nach Restriktionsspaltung mit Bgl II und Not I wurde das PCR-Produkt in den ebenfalls Bgl II/Not I-gespaltenen Vektor pGS284 kloniert. Dadurch entstand das neue Plasmid pGS284-TN/*flank* 1. Für die Herstellung von pGS284-FIX/*flank* 1 gilt Entsprechendes, hier wurde das HCMV-FIX-BACmid als Matrize und das Starteroligonukleotidpaar #136/#138 verwendet, das entstandene PCR-Produkt war 1042 bp lang. Kodierende MIE-Exons sind farbig markiert und durchnummeriert (2-5).

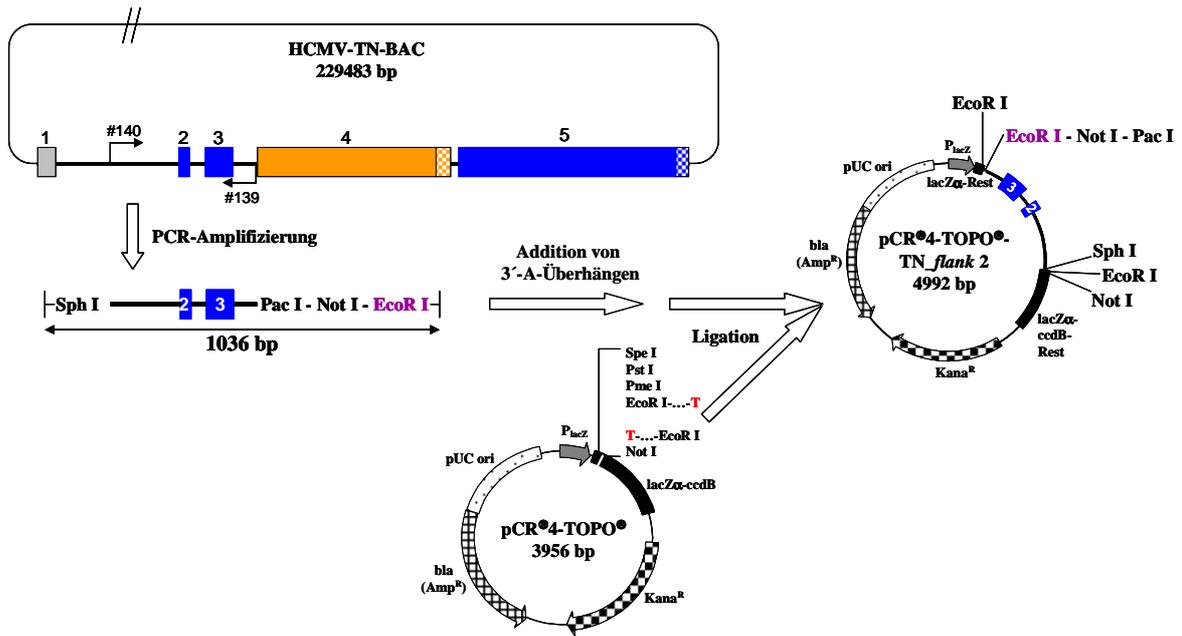
Plasmid-nummer	Plasmidbezeichnung	Plasmidgröße (in bp)	Fragmentgrößen (in bp)	Enzyme für Testspaltung
#672	pGS284-TN/ <i>flank</i> 1	7308	6290 + 1018	Bgl II/Not I
#673	pGS284-FIX/ <i>flank</i> 1	7309	6290 + 1019	Bgl II/Not I

**Tab. 4.1:** Eigenschaften der Plasmide pGS284-TN/FIX/*flank* 1.



**Abb. 4.9:** Gelelektrophoretische Darstellung der PCR-Produkte TN/FIX-*flank 1* und der Konstrukte pGS284-TN/FIX-*flank 1*. Die angegebenen Proben wurden auf 1%ige EtBr-Agarosegele aufgetragen. **A:** Die über PCR-Amplifizierung erhaltenen Fragmente TN/FIX-*flank 1* wurden ungespalten aufgetragen. **B, C:** Bgl II/Not I-Spaltung der Plasmide pGS284-TN/FIX-*flank 1* lieferte das erwartete Bandenmuster (Tab. 4.1). Mit grünem Pfeil markierte Ansätze wurden weiterverwendet.

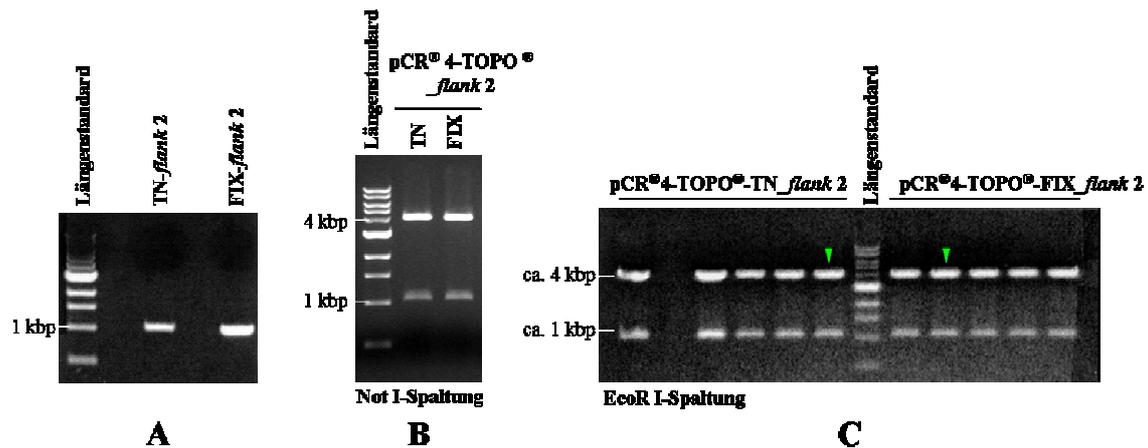
Danach sollte jener DNA-Bereich, der die andere Seite des Exons 4 flankiert, amplifiziert und in das Plasmid pGS284-TN/FIX-*flank 1* eingefügt werden. Hierfür wurde wieder zuerst in einer PCR-Reaktion mit den Starteroligonukleotiden #139/#140 sowie dem HCMV-TN- bzw. dem HCMV-FIX-BACmid als Matrize der zugehörige Abschnitt aus der MIE-Region vervielfältigt und gelelektrophoretisch kontrolliert (Abb. 4.10 und 4.11 A). Nach Reinigung und Addition von 3'-A-Überhängen an die PCR-Produkte wurden diese in mehreren gleichen Ansätzen in den linearisierten Vektor pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup> integriert. Mit dieser schnellen und effizienten Klonierungsmethode entstanden die Konstrukte pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup>-TN-*flank 2* und pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup>-FIX-*flank 2* (Abb. 4.10). Nach Transformation und Vermehrung in *E. coli* DH10B lieferte die gelelektrophoretische Darstellung der Not I- bzw. EcoR I-gespaltenen Plasmide bei allen Ansätzen die berechneten Fragmentgrößen (Tab. 4.2 und Abb. 4.11 B, C). Außerdem wurde mittels Sequenzierung die Korrektheit der eingefügten DNA-Stücke überprüft.



**Abb. 4.10:** Schematische Darstellung der Herstellung von pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup>-TN<sub>flank 2</sub>. Mittels PCR-Amplifizierung (Matrize: HCMV-TN-BACmid) wurde ein 1036 bp großes DNA-Stück mit Schnittstellen für EcoR I, Not I, Pac I und Sph I generiert, das das Exon 4 flankiert. Dieses wurde in die Polylinkerregion des Plasmids pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup> integriert, somit entstand pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup>-TN<sub>flank 2</sub>. Für die Herstellung von pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup>-FIX<sub>flank 2</sub> gilt Entsprechendes, hier wurde das HCMV-FIX-BACmid als Matrize verwendet. Das entstandene PCR-Produkt war 1040 bp lang. Die MIE-Exons sind farbig markiert und durchnummeriert (2-5).

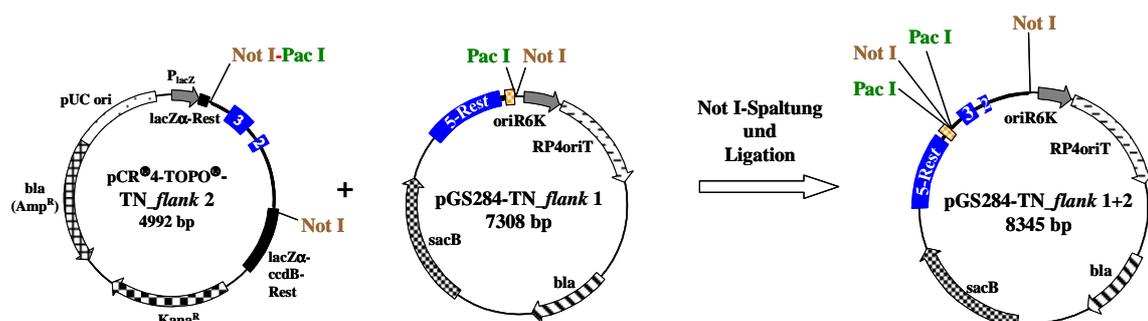
Plasmidnummer	Plasmidbezeichnung	Plasmidgröße (in bp)	Fragmentgrößen (in bp)	Enzyme für Testspaltung
#674	pCR <sup>®</sup> 4-TOPO <sup>®</sup> -TN <sub>flank 2</sub>	4992	3938 + 1038 + 16	EcoR I
			3954 + 1038	Not I
#675	pCR <sup>®</sup> 4-TOPO <sup>®</sup> -FIX <sub>flank 2</sub>	4996	3938 + 1042 + 16	EcoR I
			3954 + 1042	Not I

**Tab. 4.2:** Eigenschaften der Plasmide pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup>-TN/FIX<sub>flank 2</sub>.



**Abb. 4.11: Gelelektrophoretische Darstellung der PCR-Produkte TN/FIX-*flank 2* und Plasmide pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup>-TN/FIX-*flank 2*.** Die angegebenen Proben wurden auf 1%ige EtBr-Agarosegele aufgetragen. **A:** Die über PCR-Amplifizierung erhaltenen Fragmente TN/FIX-*flank 2* wurden ungespalten aufgetragen. **B, C:** Restriktionsspaltung von pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup>-TN/FIX-*flank 2* mit Not I bzw. EcoR I lieferte jeweils das erwartete Bandenmuster (Tab. 4.2). Mit grünem Pfeil markierte Ansätze wurden weiterverwendet.

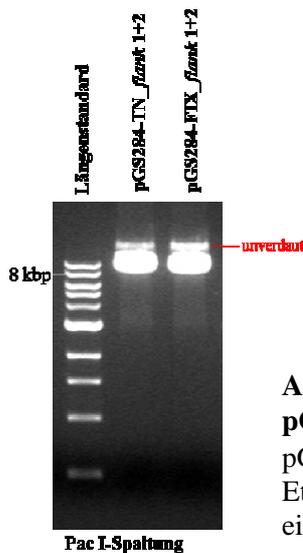
Als nächstes wurde das durch Not I-Spaltung entstandene Fragment des Plasmids pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup>-TN/FIX-*flank 2* mit dem ebenfalls Not I-geschnittenen Vektor pGS284-TN/FIX-*flank 1* ligiert (Abb. 4.12). Weil nur ein Restriktionsenzym verwendet wurde, wurde durch Zugabe von Phosphatase die Religation von pGS284-TN/FIX-*flank 1* verhindert, so dass hauptsächlich die gewünschten Produkte, nämlich pGS284-TN/FIX-*flank 1+2*, entstanden. Diese wurden wiederum in *E. coli* S17 $\lambda$ pir vermehrt. Außerdem wurde mit dem Restriktionsenzym Pac I die Plasmidgröße und die Orientierung des zusätzlich inserierten Fragments (= *flank 2*) überprüft (Tab. 4.3 und Abb. 4.13). Dies war insofern wichtig, da später zwischen die Pac I-Schnittstellen die kanlacZ-Kassette eingefügt werden sollte. Bei falscher Orientierung wäre im Bandenmuster eine etwa 1000 bp große Bande zu erkennen.



**Abb. 4.12: Schematische Darstellung der Herstellung von pGS284-TN\_*flank* 1+2.** Nach Not I-Spaltung von pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup>-TN\_*flank* 2 wurde das entstandene Fragment (= *flank* 2) in den durch Not I-Spaltung linearisierten Vektor pGS284-TN\_*flank* 1 kloniert. Somit entstand das Produkt pGS284-TN\_*flank* 1+2. Für die Herstellung von pGS284-FIX\_*flank* 1+2 gilt Entsprechendes. Die MIE-Exons sind farbig markiert und durchnummeriert (2-5).

Plasmidnummer	Plasmidbezeichnung	Plasmidgröße (in bp)	Fragmentgrößen (in bp)	Enzyme für Testspaltung
#676	pGS284-TN_ <i>flank</i> 1+2	8345	8329 + 16	Pac I
#677	pGS284-FIX_ <i>flank</i> 1+2	8350	8334 + 16	

**Tab. 4.3: Eigenschaften der Plasmide pGS284-TN/FIX\_*flank* 1+2.**



**Abb. 4.13: Gelelektrophoretische Darstellung der Konstrukte pGS284-TN/FIX\_*flank* 1+2.** Nach Pac I-Spaltung der Konstrukte pGS284-TN/FIX\_*flank* 1+2 konnte durch Auftragung auf ein 1%iges EtBr-Agarosegel sowohl die Größe als auch die Orientierung des eingefügten Fragments (= *flank* 2) überprüft werden (Tab. 4.3).

Als letzter Schritt wurde die durch Pac I-Spaltung des Plasmids pGEM-kanlacZ erhaltene 1763 bp große kanlacZ-Kassette in mehreren gleichen Ansätzen in den ebenfalls Pac I-gespaltenen Vektor pGS284-TN/FIX\_*flank* 1+2 integriert. Nach Transformation in S17λpir, Vermehrung, DNA-Isolierung und Testspaltung mit Pac I konnten richtige Transferplasmide pGS284-TN/FIX IE1\_kanlacZ identifiziert und isoliert werden (Tab. 4.4 und Abb. 4.14 A). Da Vektor und umklontes Fragment nur mit einem Enzym gespalten und anschließend ligiert wurden, konnte kein Einfluss auf die Orientierung der kanlacZ-Kassette genommen werden. Diese ist aber für alle späteren Experimente nicht relevant. Durch Bgl II/Not I-Spaltung konnte die Größe des endgültigen, in pGS284 integrierten Fragments (*flank* 1 + kanlacZ-Kassette + *flank* 2) überprüft werden (Tab. 4.4 und Abb. 4.14 B).

Plasmidnummer	Plasmidbezeichnung	Plasmidgröße (in bp)	Fragmentgrößen (in bp)	Enzyme für Testspaltung
#485	pGS284-TN IE1_kanlacZ	10092	8329 + 1763	Pac I
			6290 + 3802	Bgl II/Not I
#486	pGS284-FIX IE1_kanlacZ	10097	8334 + 1763	Pac I
			6290 + 3807	Bgl II/Not I

Tab. 4.4: Eigenschaften der Plasmide pGS284-TN/FIX IE1\_kanlacZ.

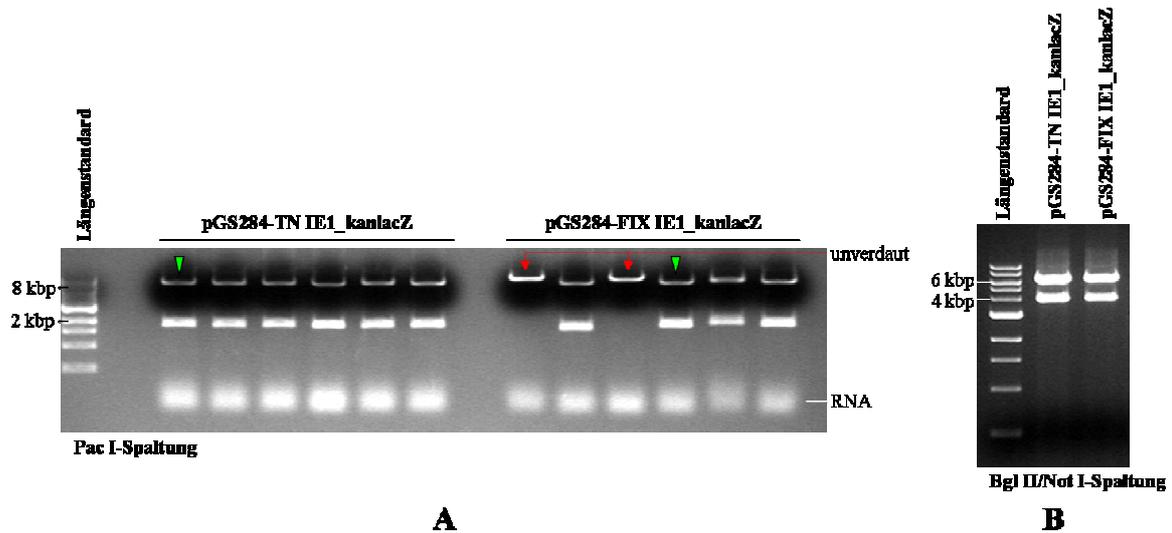
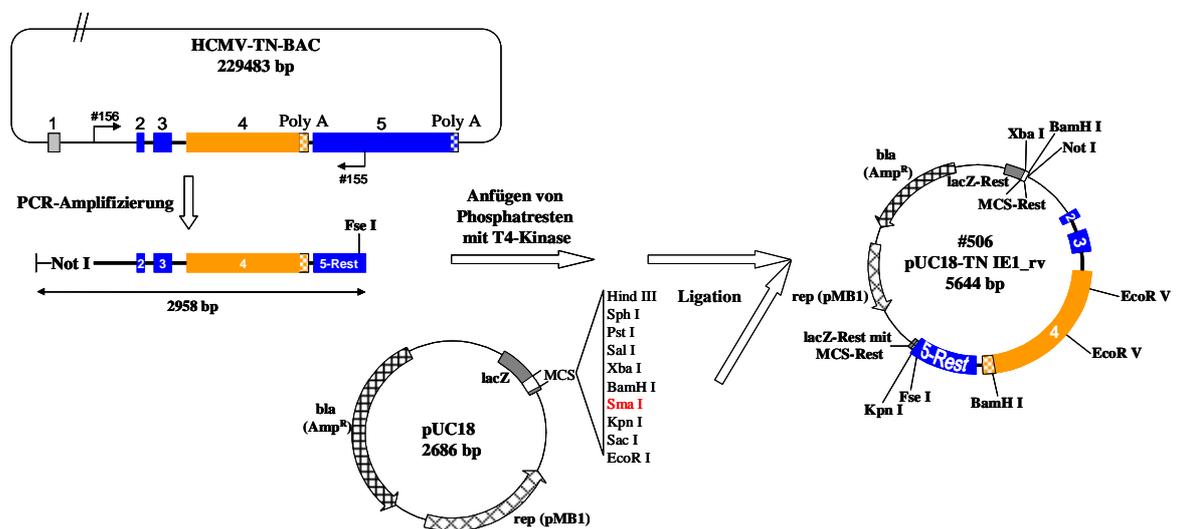


Abb. 4.14: Gelelektrophoretische Darstellung der Konstrukte pGS284-TN/FIX IE1\_kanlacZ. Die angegebenen Proben wurden auf 1%ige EtBr-Agarosegele aufgetragen. A: Nach Pac I-Spaltung zeigten sich im Bandenmuster die 1763 bp große kanlacZ-Kassette sowie das Vektorgerüst. Mit grünem Pfeil markierte Ansätze wurden weiterverwendet. B: Durch Spaltung mit Bgl II/Not I konnte die Größe des gesamten integrierten Fragments (*flank 1* + kanlacZ-Kassette + *flank 2*) überprüft werden (Tab. 4.4).

#### 4.2.3.2 Herstellung von Transferplasmiden mit IE1-spezifischer Exon 4-WT-Sequenz

Um die technische Korrektheit der in dieser Arbeit verwendeten Klonierungstechniken zu überprüfen, sollte ein pGS284-Konstrukt mit IE1-spezifischer Exon 4-WT-Sequenz hergestellt werden, das bei homologer Rekombination mit dem Exon 4-substituierten TN- bzw. FIX-BAC-Genom wieder ein WT-HCMV-BAC-Genom ergeben müsste. Außerdem sollten mittels Fusions-PCR oder dem QuikChange<sup>®</sup>-Verfahren Punktmutationen in die Exon 4-Sequenz integriert werden, wofür ebenfalls ein Ausgangsplasmid mit einer Exon 4-WT-Sequenz nötig war. Für das QuikChange<sup>®</sup>-Verfahren wäre aber pGS284 mit seinen 6309 bp zu groß, deshalb wurde parallel dazu das kleinere und einfacher zu handhabende Plasmid pUC18 als Vektorgerüst benutzt. Zu diesem Zweck wurde zuerst ein etwa 3000 bp großer Abschnitt der MIE-Region mit dem TN-WT- bzw. dem FIX-WT-BACmid als

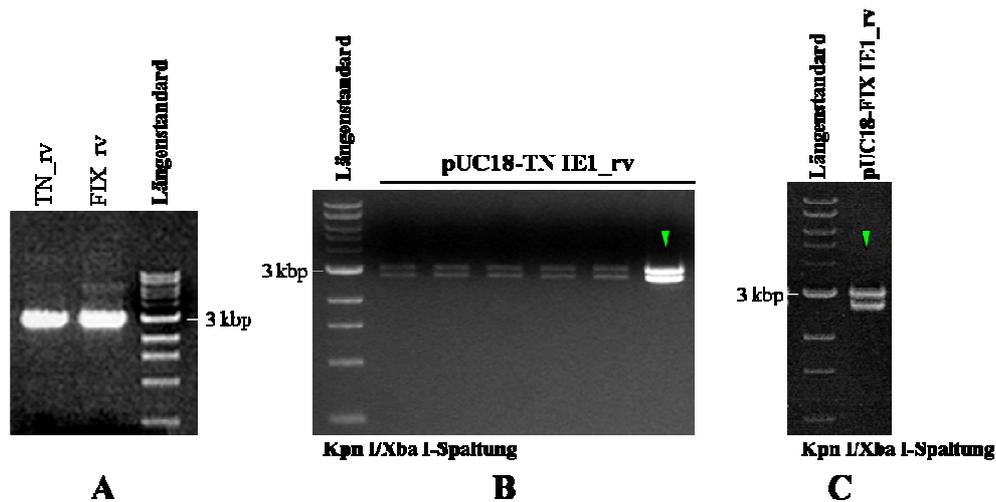
Matrize und den Starteroligonukleotiden #155/#156 in einer PCR generiert und gelelektrophoretisch detektiert (Abb. 4.16 A). Das Fragment wurde nach Anhängen von Phosphatresten durch das Enzym T4-Kinase ungespalten mit dem Sma I-gespaltenen Vektor pUC18 ligiert (Abb. 4.15). Nach Vermehrung von mehreren gleichen Ansätzen in DH10B-Zellen und DNA-Präparation wurden einzelne Proben sequenziert und testgespalten. Durch Kpn I/Xba I-Spaltung konnten sowohl korrekt ligierte Plasmide selektiert werden als auch die Orientierung des neu integrierten MIE-Fragments überprüft werden (Tab. 4.5 und Abb. 4.16 B, C). Sie ist in Schema 4.15 dargestellt. Nun stand ein kleines, handliches Plasmid für Mutationszwecke zur Verfügung, das den gewünschten Exon 4-WT-Bereich der MIE-Region beherbergt.



**Abb. 4.15: Schematische Darstellung der Herstellung von pUC18-TN IE1\_rv.** In einer PCR-Reaktion wurde ein Bereich aus der MIE-WT-Region des HCMV-TN-BACmides mit den Starteroligonukleotiden #155/#156 amplifiziert. Nach Anhängen von Phosphatresten wurde das entstandene Fragment mit dem Sma I-gespaltenen, dephosphorylierten Vektor pUC18 ligiert, es entstand pUC18-TN IE1\_rv. Für die Herstellung von pUC18-FIX IE1\_rv gilt Entsprechendes, hier wurde das HCMV-FIX-BACmid als Matrize für die PCR verwendet, das erhaltene PCR-Produkt war 2963 bp groß. Kodierende MIE-Exons sind farbig markiert und durchnummeriert (2-5).

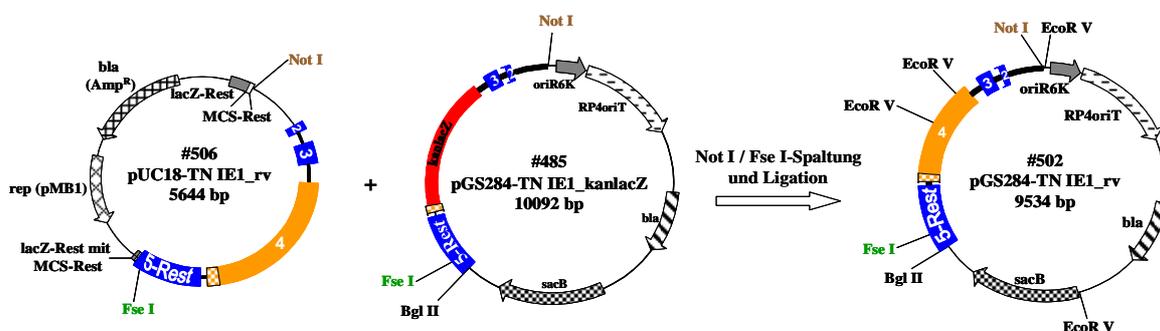
Plasmidnummer	Plasmidbezeichnung	Plasmidgröße (in bp)	Fragmentgrößen (in bp)	Enzyme für Testspaltung
#506	pUC18-TN IE1_rv	5644	2977 + 2667	Kpn I/Xba I
#507	pUC18-FIX IE1_rv	5649	2982 + 2667	

**Tab. 4.5: Eigenschaften der Plasmide pUC18-TN/FIX IE1\_rv mit MIE-WT-Sequenz.**



**Abb. 4.16:** Gelelektrophoretische Darstellung der PCR-Produkte TN/FIX<sub>rv</sub> und der Plasmidkonstrukte pUC18-TN/FIX IE1<sub>rv</sub>. Die angegebenen Proben wurden auf 1%ige EtBr-Agarosegele aufgetragen. **A:** Die über PCR-Amplifizierung erhaltenen, etwa 3 kbp großen Fragmente TN/FIX<sub>rv</sub> wurden ungespalten aufgetragen. **B, C:** Durch Kpn I/Xba I-Spaltung von pUC18-TN/FIX IE1<sub>rv</sub> konnte die Größe des etwa 3 kbp großen Fragments aus der MIE-Sequenz überprüft werden (Tab. 4.5). Mit grünem Pfeil markierte Ansätze wurden weiterverwendet.

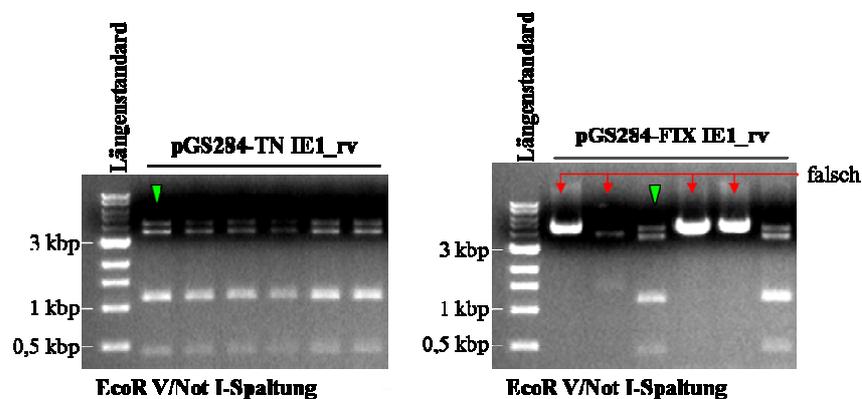
Weil das neu hergestellte pUC18-Konstrukt für die Herstellung der HCMV-BAC-Revertanten und die dafür nötige homologe Rekombination mit Exon 4-substituierten HCMV-BACmiden jedoch als Transferplasmid nicht eingesetzt werden konnte, musste im nächsten Schritt ein pGS284-Konstrukt mit einer Exon 4-WT-Sequenz und flankierenden Bereichen konstruiert werden. Dazu wurde das entsprechende MIE-WT-Stück aus pUC18-TN/FIX IE1<sub>rv</sub> mittels Not I/Fse I-Spaltung isoliert und in das ebenfalls Not I/Fse I-gespaltene Plasmid pGS284-TN/FIX IE1<sub>kanlacZ</sub> ligiert (Abb. 4.17). Nach Vermehrung in S17λpir-Zellen, DNA-Isolierung und Testspaltung mit Not I/EcoR V konnten richtige pGS284-TN/FIX IE1<sub>rv</sub>-Vektoren selektiert werden (Tab. 4.6 und Abb. 4.18).



**Abb. 4.17: Schematische Darstellung der Herstellung von pGS284-TN IE1<sub>rv</sub>.** Mittels Not I/Fse I-Restriktionsspaltung wurde das Fragment mit enthaltener IE1-spezifischer Exon 4-WT-Sequenz und flankierenden Bereichen aus dem Plasmid pUC18-TN IE1<sub>rv</sub> in pGS284-TN IE1<sub>kanlacZ</sub> überführt, es entstand pGS284-TN IE1<sub>rv</sub>. Für die FIX-Konstrukte gilt Entsprechendes. Die MIE-Exons sind farbig markiert und durchnummeriert (2-5).

Plasmidnummer	Plasmidbezeichnung	Plasmidgröße (in bp)	Fragmentgrößen (in bp)	Enzyme für Testspaltung
#502	pGS284-TN IE1 <sub>rv</sub>	9534	4357 + 3578 + 1153 + 429 + 17	EcoR V/Not I
#503	pGS284-FIX IE1 <sub>rv</sub>	9539	4357 + 3579 + 1157 + 429 + 17	

**Tab. 4.6: Eigenschaften der Plasmide pGS284-TN IE1<sub>rv</sub> mit MIE-WT-Sequenz.**



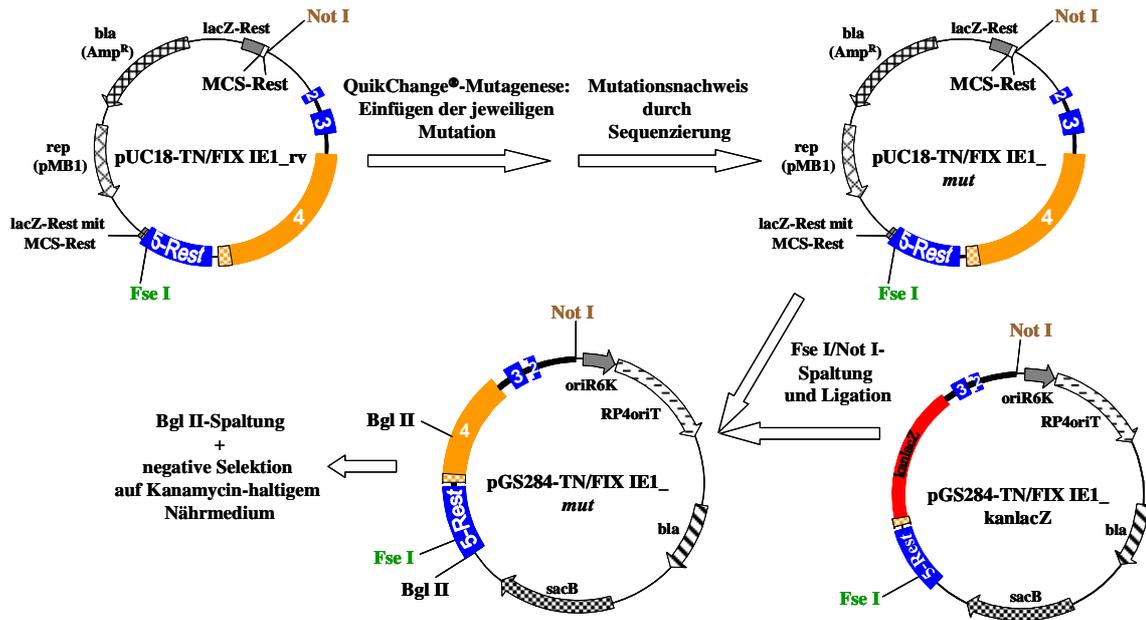
**Abb. 4.18: Gelelektrophoretische Darstellung der Konstrukte pGS284-TN/FIX IE1<sub>rv</sub>.** Die angegebenen Plasmid-DNA-Proben wurden nach Restriktionsspaltung mit EcoR V/Not I auf 1%ige EtBr-Agarosegele aufgetragen (Tab. 4.6). Grüne Pfeile markieren weiterverwendete Ansätze.

#### 4.2.3.3 Herstellung von Transferplasmiden mit IE1-spezifischen Exon 4-Punktmutationen

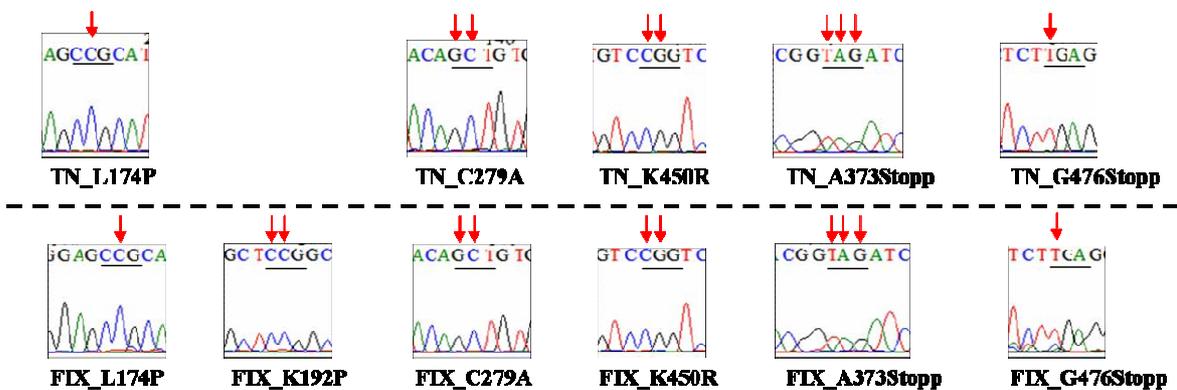
Für die Herstellung von Transferplasmiden mit gezielten Nukleotidaustauschen in der IE1-spezifischen Exon 4-Sequenz kamen in dieser Arbeit das QuikChange<sup>®</sup>-Verfahren und die Fusions-PCR zum Einsatz.

Als Matrizen für das QuikChange<sup>®</sup>-Verfahren zur ortsgerichteten Mutagenese (3.4.5.3) standen die in 4.2.3.2 beschriebenen Plasmide pUC18-TN/FIX IE1<sub>rv</sub> zur Verfügung. Sie enthalten einen MIE-WT-Bereich einschließlich der Exon 4-Sequenz des TN- bzw. FIX-BACmides. Auf diese Weise wurden alle Mutanten, außer TN\_K192P, generiert. Als Startermoleküle wurden jeweils zwei zueinander komplementäre Oligonukleotide verwendet, die denselben Sequenzabschnitt der MIE-Region, mit integrierter Mutation, trugen (3.2.1). Es wurden stets nur ein bis maximal drei Nukleotide ausgetauscht.

Anschließend wurden die pUC18-Plasmide mit den Mutationen TN\_A373Stopp, TN\_K450R und FIX\_K192P in chemisch-kompetente GM169-Zellen transformiert (Plasmide mit den übrigen Mutationen in chemisch-kompetente DH10B-Zellen). Auf diese Weise entstanden pUC18-TN/FIX IE1-Plasmide, die sich von pUC18-TN/FIX IE1\_rv nur durch die gewünschten Nukleotidaustausche in der Exon 4-Sequenz unterschieden. Nach Verifizierung durch Sequenzierung (Abb. 4.20) konnte der punktmutierte IE1-Abschnitt mit Hilfe von Fse I/Not I-Spaltung in den Vektor pGS284-TN/FIX IE1\_kanlacZ integriert werden (Abb. 4.19). Dieses Verfahren wurde angewendet für die TN-Mutationen L174P, C279A, A373Stopp, K450R und G476Stopp, außerdem für die FIX-Mutationen L174P, K192P, C279A, A373Stopp, K450R und G476Stopp. Die beiden E421Stopp-Mutanten wurden in den Vektor pGS284-TN/FIX IE1\_rv integriert (Abb. 4.21). Restriktion mit geeigneten Endonukleasen und analytische Gelelektrophorese sowie erneute Sequenzierung oder Selektion auf Antibiotika-haltigem Nährmedium diente der Kontrolle richtig mutierter Plasmide (Tab. 4.7 und Abb. 4.21). Der Vektor pGS284-TN/FIX IE1\_kanlacZ war für die Umklonierung der zuvor mutierten Fragmente insofern besser geeignet als pGS284-TN/FIX IE1\_rv, weil richtig rekombinierte Plasmide keine Resistenz gegen Kanamycin mehr aufwiesen und so gegen das Ausgangsplasmid selektioniert werden konnten. Weiterhin wurde Bgl II als Restriktionsenzym deshalb ausgewählt, weil es im Exon 4 und im pGS284-Vektor spaltet, nicht aber in der kanlacZ-Kassette oder im pUC18-Vektorgerüst. Damit konnten Proben ausgesondert werden, bei denen fälschlicherweise der pUC18-Vektor in das pGS284-TN/FIX IE1\_kanlacZ-Gerüst kloniert wurde. Schließlich konnten korrekt mutierte Transferplasmide für die homologe Rekombination mit Exon 4-substituierten HCMV-TN/FIX-BACmiden eingesetzt werden.



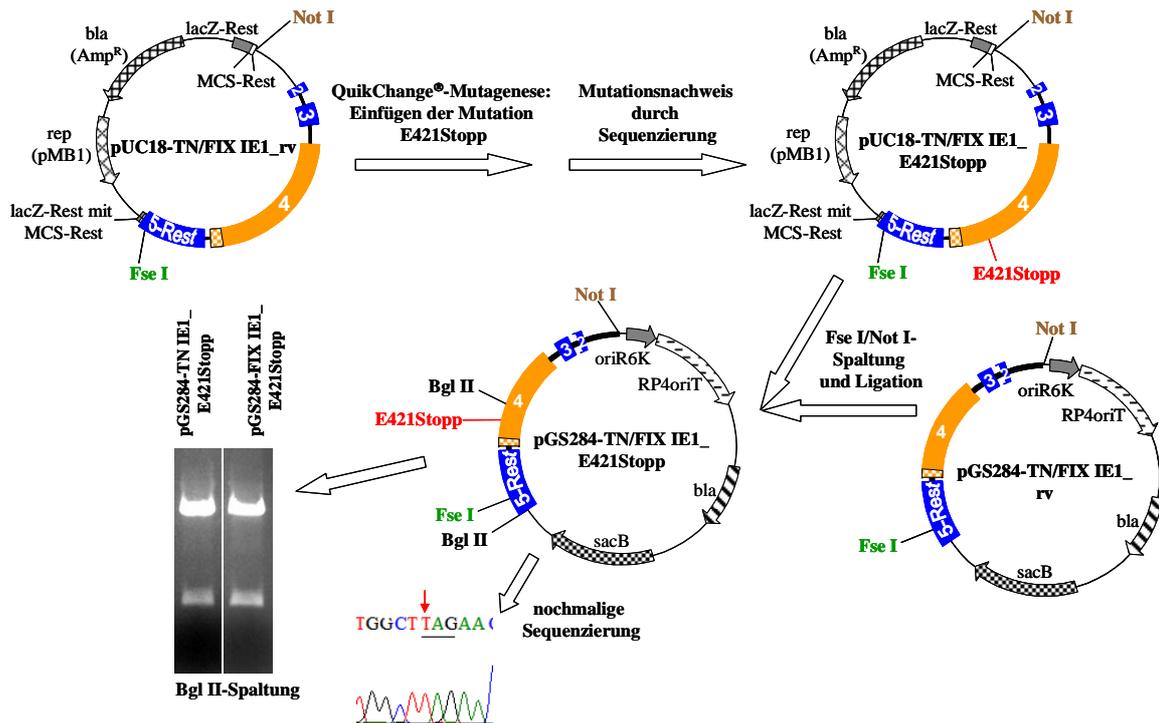
**Abb. 4.19: Allgemeines Prinzip zur Herstellung von pGS284-Transferplasmiden mit einer Punktmutation in der IE1-spezifischen Exon 4-Sequenz.** „mut“ steht für die jeweilige gewünschte Mutation im Exon 4. Als Matrize für den Einzelnukleotidaustausch der jeweiligen Mutation mittels QuikChange<sup>®</sup>-PCR diente das pUC18-TN/FIX IE1\_rv-Plasmid. Nach Kontrolle durch Sequenzierung konnte der mutierte MIE-Abschnitt mittels Fse I/Not I-Spaltung in den pGS284-TN/FIX IE1\_kanlacZ-Vektor subkloniert werden. Die MIE-Exons sind farblich hervorgehoben und durchnummeriert (2-5).



**Abb. 4.20: Mutationsnachweis durch Sequenzierung.** Die durch das QuikChange<sup>®</sup>-Verfahren eingefügten Nukleotidaustausche wurden vor Umklonierung in pGS284-TN/FIX IE1\_kanlacZ durch Sequenzierung verifiziert (rote Pfeile). Das für die jeweils relevante Aminosäure codierende Basentriplett ist schwarz unterstrichen.

Plasmidnummer	Plasmidbezeichnung	Plasmidgröße (in bp)	Fragmentgrößen (in bp)	Enzyme für Testspaltung
#542	pGS284-TN IE1_E421Stopp	9534	8088 + 1446	Bgl II
#543	pGS284-FIX IE1_E421Stopp	9539	8092 + 1447	

**Tab. 4.7: Eigenschaften der Plasmide pGS284-TN/FIX IE1\_E421Stopp.**

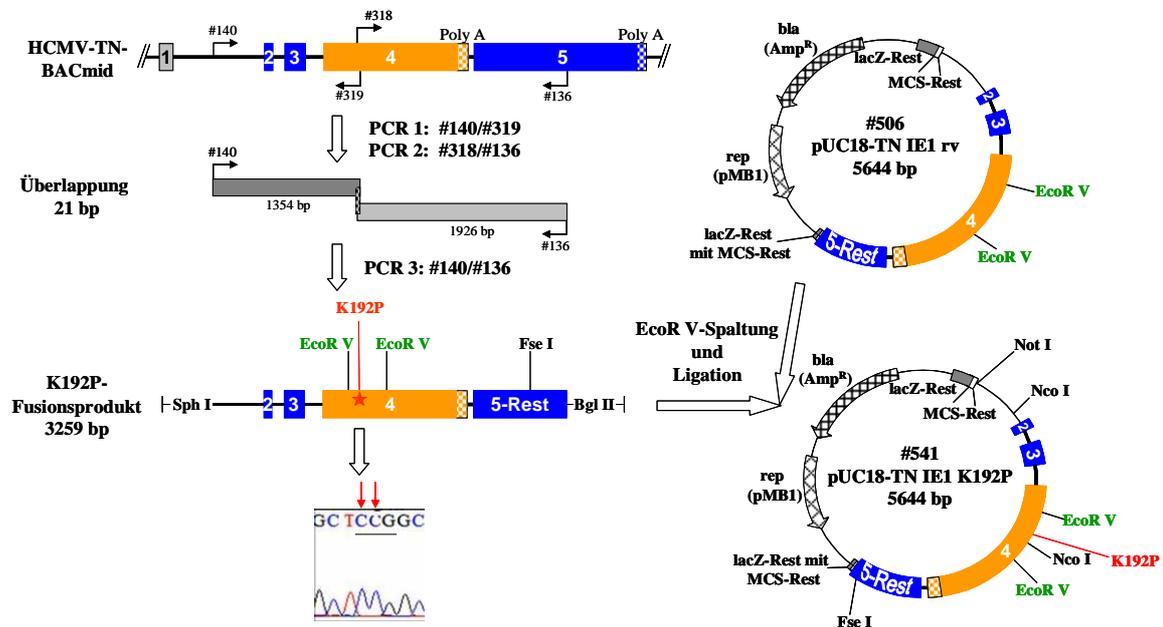


**Abb. 4.21: Übersicht zur Herstellung der pGS284-TN/FIX IE1\_E421Stopp-Transferplasmide.** Als Matrize für den Nukleotidaustausch mittels QuikChange<sup>®</sup>-PCR diente das pUC18-TN/FIX IE1\_rv-Plasmid. Über Fse I/Not I-Spaltung konnte der mutierte MIE-Abschnitt in den pGS284-TN/FIX IE1\_rv-Vektor kloniert werden. Durch Sequenzierung wurde die Mutation vor und nach der Umklonierung nachgewiesen (GAG→TAG, roter Pfeil). Restriktionsspaltung mit Bgl II und Analyse auf einem 1%igen EtBr-Agarose-Gel zeigte das erwartete Bandenmuster (Tab. 4.7). Die MIE-Exons sind farblich markiert und durchnummeriert (2-5).

Trotz wiederholter Versuche gelang es aufgrund unklarer technischer Schwierigkeiten nicht, die Mutation TN\_K192P mittels QuikChange<sup>®</sup>-Mutagenese zu generieren. Versuche mit unterschiedlichen Starteroligonukleotidlängen blieben ebenso erfolglos. Deshalb wurde auf das in 3.4.5.2 beschriebene Verfahren der Fusions-PCR zurückgegriffen. Dabei wurde in einer ersten PCR-Reaktion das Fragment „stromaufwärts“ der gewünschten Mutationsstelle im IE1-spezifischen Exon 4 mit den Oligonukleotiden #140/#319 amplifiziert. Das „stromabwärts“ davon gelegene Stück wurde mit den Oligonukleotiden #318/#136 in einer zweiten PCR-Reaktion vervielfältigt. Als Matrize diente jeweils das HCMV-TN-BACmid (Abb. 4.22). Die Oligonukleotide #318/319 enthielten an ihrem 5'-Ende einen die gewünschte Mutation tragenden überhängenden Bereich von 21 bp, der komplementär zum jeweils anderen Oligonukleotid war. Dadurch waren die aus den ersten beiden Reaktionen resultierenden PCR-Produktpaare in diesem Abschnitt homolog zueinander. Das nicht-komplementäre Ende des Oligonukleotids #140 wies darüber hinaus

eine Erkennungsstelle für das Restriktionsenzym Sph I auf, wohingegen das Oligonukleotid #136 in diesem Bereich eine Bgl II-Schnittstelle besaß.

Für die Herstellung des Gesamtfragments mit der Mutationsstelle wurden in einer dritten PCR-Reaktion die „äußeren“ Oligonukleotide #140/#136 und als Matrizen die beiden Amplifikate aus den ersten zwei PCR-Reaktionen eingesetzt (Abb. 4.22). Im Anschluss an die Aufreinigung konnte durch Restriktionsspaltung des Fusionsproduktes ein EcoR V-Fragment mit der enthaltenen Mutation in den EcoR V-gespaltenen Vektor pUC18-TN IE1\_rv inseriert werden (Abb. 4.22 und 4.23 A). Nach Vermehrung in GM169-Zellen und nach DNA-Präparation wurde zur Orientierungskontrolle das erhaltene Plasmid pUC18\_TN IE1\_K192P Nco I-gespalten und mit dem Ausgangsplasmid pUC18\_TN IE1\_rv verglichen (Tab. 4.8 und Abb. 4.23 B). Da ein Austausch von zwei Nukleotiden im Agarosegel nicht erkennbar ist, wurden wie erwartet gleiche Bandenmuster detektiert. Jedoch konnte mittels Sequenzierung des EcoR V-Fragments der richtig eingefügte Nukleotidaustausch bestätigt werden (Abb. 4.22). Schließlich wurde die Mutation über Fse I/Not I-Spaltung in den parentalen Vektor pGS284-TN IE1\_kanlacZ übertragen und der Erfolg durch analytische Restriktionsspaltung überprüft (Tab. 4.8 und Abb. 4.23 C).



**Abb. 4.22: Schematische Darstellung der Herstellung von pUC18-TN IE1\_K192P.** Als Matrize für die Fusions-PCR diente das HCMV-TN-BACmid. In den ersten beiden PCR-Reaktionen wurden zwei Fragmente mit endständigen, die gewünschte Mutation tragenden homologen Bereichen generiert. Das in der dritten PCR amplifizierte Gesamtfragment enthielt so die Mutation

K192P. Mittels EcoR V-Restriktionsspaltung konnte die Mutation in den Vektor pUC18-TN IE1\_rv überführt werden. Kodierende MIE-Exons sind farbig markiert und durchnummeriert (2-5).

Plasmid-nummer	Plasmidbezeichnung	Plasmidgröße (in bp)	Fragmentgrößen (in bp)	Enzyme für Testspaltung
#506	pUC18-TN IE1_rv	5644	5215 + 429	EcoR V
			4635 + 1009	Nco I
#541	pUC18-TN IE1_K192P	5644	5215 + 429	EcoR V
			4635 + 1009	Nco I
			2898 + 2746	Fse I/Not I
#596	pGS284-TN IE1_K192P	10092	8088 + 1446	Bgl II

Tab. 4.8: Eigenschaften der Plasmide pUC18-TN IE1\_rv, pUC18-TN IE1\_K192P und pGS284-TN IE1\_K192P.

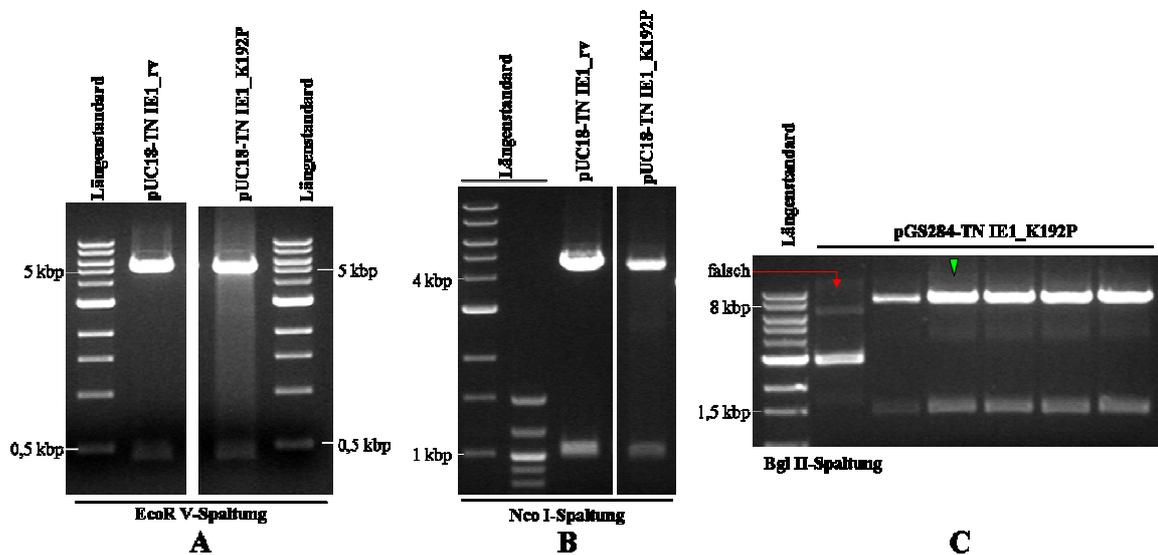


Abb. 4.23: Gelelektrophoretische Darstellung der Konstrukte pUC18-TN IE1\_rv, pUC18-TN IE1\_K192P und pGS284-TN IE1\_K192P. Die angegebenen Proben wurden auf 1%ige EtBr-Agarosegele aufgetragen. A, B: EcoR V- bzw. Nco I-Spaltung der Plasmide pUC18-TN IE1\_rv und pUC18-TN IE1\_K192P diente der Größen- und Orientierungskontrolle des eingefügten MIE-Fragments. C: Mittels Bgl II-Spaltung wurde aus mehreren Ansätzen ein korrektes pGS284-TN IE1\_K192P-Konstrukt ausgewählt (grüne Pfeilspitze) (Tab. 4.6).

#### 4.2.4 Herstellung rekombinanter BACmide

Die gewünschten Veränderungen in der IE1-spezifischen Exon 4-Sequenz der erfolgreich generierten pGS284-Transferplasmide sollten nun in HCMV-TN- bzw. HCMV-FIX-BAC-Genome integriert werden. Dies geschieht über Konjugation zwischen *E. coli*, wobei durch homologe Rekombination gezielt genetisches Material der pGS284-Konstrukte in die HCMV-BAC-Genome überführt wird. Sämtliche beschriebenen pGS284-Derivate wurden

in *E. coli* S17 $\lambda$ pir propagiert, wohingegen die Ausgangs-BACmide in *E. coli* GS500 vorlagen. Dieser Stamm bringt alle für die homologe Rekombination nötigen Enzyme (recA, recBCD) mit (3.4.7). Jedes BAC-Genom enthält zusätzlich eine EGFP-Kassette und als Selektionsmarker ein Cam-Resistenzgen. Um nachfolgende Ergebnisse zu verifizieren, wurden aus jedem Rekombinationsereignis immer zwei bis drei unabhängige Klone zur weiteren Charakterisierung ausgewählt. Außerdem konnten über Analyse des Bandenmusters nach EcoR I-Spaltung größere unerwünschte Rekombinationsereignisse zwischen internen viralen Sequenzwiederholungen oder zwischen viralen und bakteriellen Sequenzen ausgeschlossen werden.

Zuerst wurden die Transferkonstrukte pGS284-TN/FIX IE1\_kanlacZ und die infektiösen WT-BACmide der HCMV-Stämme TN und FIX für die homologe Rekombination eingesetzt (Abb. 4.24 A). Daraus konnten GS500-Zellen mit BACmiden (Cam+, Kan+, lacZ+) isoliert werden, die sowohl auf Cam- als auch auf Kan-haltigem Nährmedium wuchsen. Bei diesen neuen BAC-Genomen TN-BAC\_kanlacZ und FIX-BAC\_kanlacZ war nun die komplette Exon 4-Sequenz, bis auf die nichtkodierenden 3'-Bereiche, gegen eine kanlacZ-Kassette substituiert worden. Wie erwartet, war in der EcoR I-Restriktionsspaltung der Verlust der WT-spezifischen 10 kbp-Bande klar erkennbar (Abb. 4.25 A), da innerhalb der kanlacZ-Kassette jetzt eine neue Schnittstelle für dieses Enzym vorlag. Allerdings waren die neuen, etwa 5,7- und 4,9 kbp-großen Fragmente im Gelbild aufgrund Überlagerung teilweise nur undeutlich zu differenzieren.

Im nächsten Schritt wurden die eben beschriebenen Konstrukte als Ausgangs-BACmide für die homologe Rekombination mit den Transferplasmiden pGS284-TN/FIX IE1\_rv verwendet (Abb. 4.24 B). In diesem Fall wurden BACmide (Cam+, Kan-, lacZ-) erzeugt, die bei korrekter Vorgehensweise wieder WT-Eigenschaften zeigen sollten. Sie konnten mittels Resistenztestung und Blau-Weiß-Screening von Zellen mit nicht rekombinierten BACmiden (Cam+, Kan+, lacZ+) unterschieden werden. Im Gelbild nach EcoR I-Spaltung war die WT-spezifische 10 kbp-Bande wieder eindeutig vorhanden (Abb. 4.25 A).

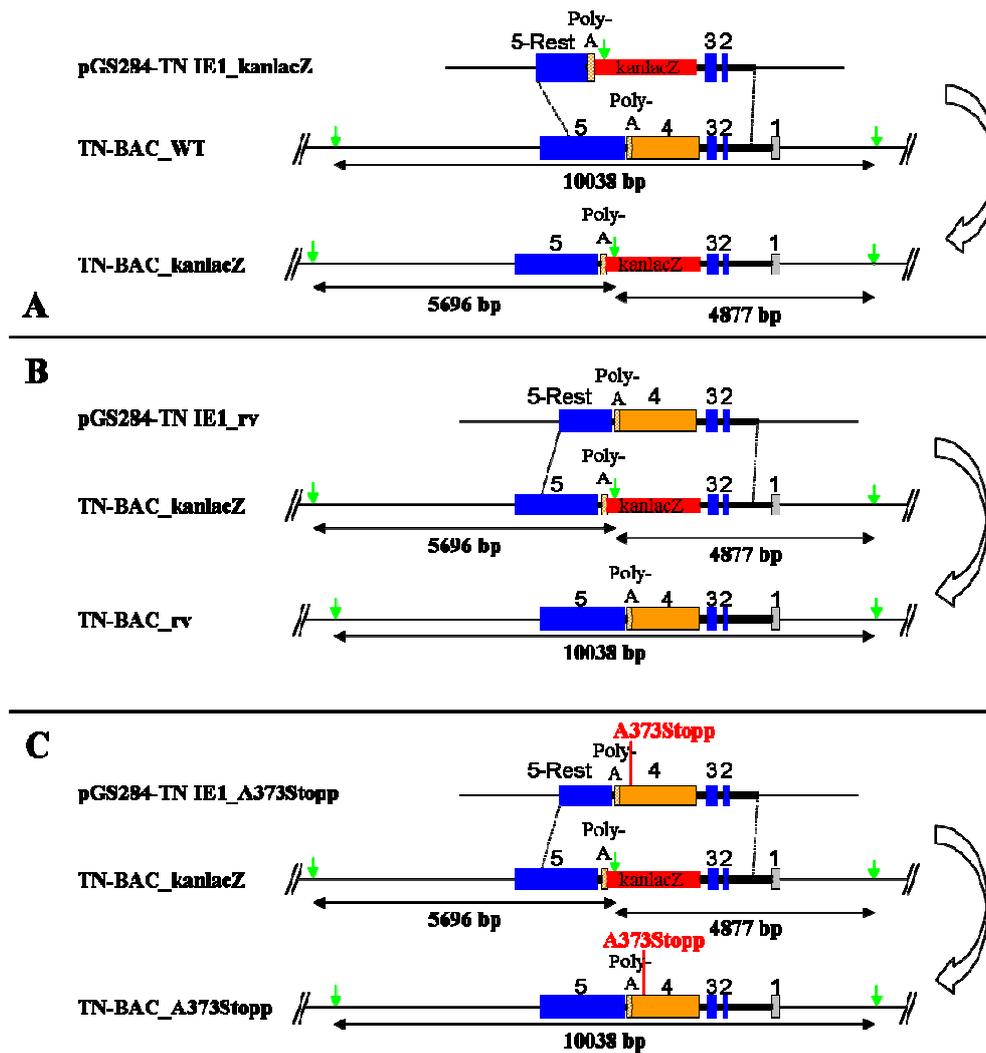
Zuletzt wurden die unter 4.2.3.3 beschriebenen 14 pGS284-Derivate, mit sieben verschiedenen Mutationen im Exon 4, jeweils für die zwei Stämme TN und FIX, eingesetzt (Abb. 4.24 C). Als Ausgangs-BACmide dienten auch hier TN-BAC\_kanlacZ und FIX-BAC\_kanlacZ. Erneut wuchsen sämtliche *E. coli* mit erfolgreich rekombinierten BACmiden (Cam+, Kan-, lacZ-) nicht mehr auf Kan-haltigem Medium. Desweiteren

entsprach das EcoR I-Restriktionsmuster dem des TN- bzw. FIX-WTs, da der jeweils vorliegende Nukleotidaustausch im Gelbild nicht feststellbar war (Abb. 4.25 B).

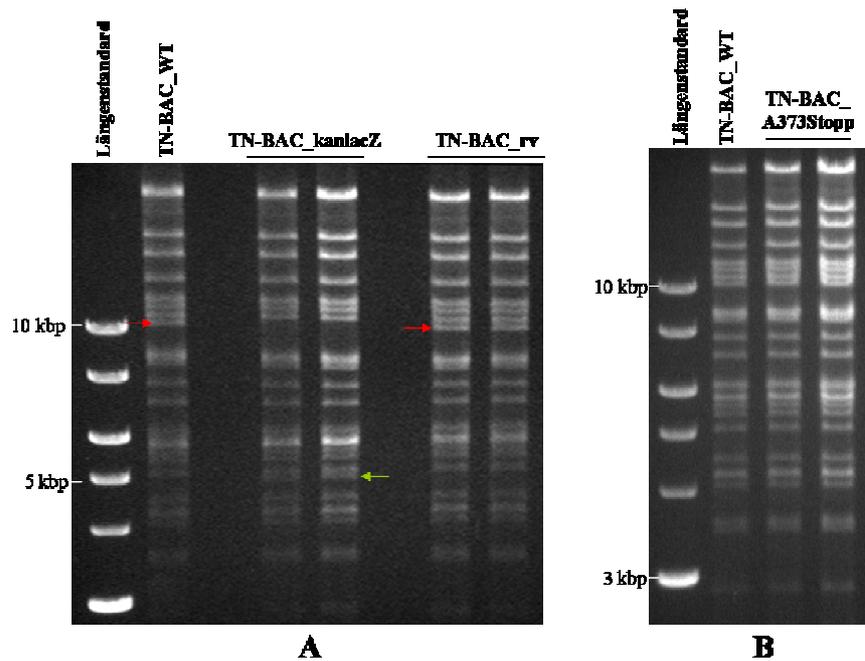
Mit dieser aufwändigen Methode hatte man nun neue HCMV-BAC-Genome der Stämme TN bzw. FIX für weitere Untersuchungen zur Verfügung, bei denen einmal die Exon 4-Sequenz substituiert worden war, eben dieser Austausch wieder rückgängig gemacht worden war, oder bei denen über Nukleotidaustausche ein einziges Triplet verändert worden war (Tab. 4.9).

Transferplasmid	Ausgangs-BACmid	Mutation in der MIE-Sequenz	Rekombinante BACmide
#485 pGS284-TN IE1_kanlacZ	#167 TN-BAC_WT	Substitution Exon 4 → kanlacZ	TN-BAC_kanlacZ
#486 pGS284-FIX IE1_kanlacZ	#121 FIX-BAC_WT	Substitution Exon 4 → kanlacZ	FIX-BAC_kanlacZ
#502 pGS284-TN IE1_rv	#138 FIX-BAC_kanlacZ	Substitution kanlacZ → Exon 4	TN-BAC_rv
#503 pGS284-FIX IE1_rv	#138 FIX-BAC_kanlacZ	Substitution kanlacZ → Exon 4	FIX-BAC_rv
#558 pGS284-TN IE1_L174P	#134 TN-BAC_kanlacZ	Punktmutation CTG → CCG	TN-BAC_L174P
#556 pGS284-FIX IE1_L174P	#138 FIX-BAC_kanlacZ	Punktmutation CTG → CCG	FIX-BAC_L174P
#596 pGS284-TN IE1_K192P	#134 TN-BAC_kanlacZ	Punktmutation AAG → CCG	TN-BAC_K192P
#590 pGS284-FIX IE1_K192P	#138 FIX-BAC_kanlacZ	Punktmutation AAG → CCG	FIX-BAC_K192P
#568 pGS284-TN IE1_C279A	#134 TN-BAC_kanlacZ	Punktmutation TGT → GCT	TN-BAC_C279A
#570 pGS284-FIX IE1_C279A	#138 FIX-BAC_kanlacZ	Punktmutation TGT → GCT	FIX-BAC_C279A
#587 pGS284-TN IE1_A373Stopp	#134 TN-BAC_kanlacZ	Punktmutation GCC → TAG	TN-BAC_A373Stopp
#588 pGS284-FIX IE1_A373Stopp	#138 FIX-BAC_kanlacZ	Punktmutation GCC → TAG	FIX-BAC_A373Stopp
#542 pGS284-TN IE1_E421Stopp	#134 TN-BAC_kanlacZ	Punktmutation GAG → TAG	TN-BAC_E421Stopp
#543 pGS284-FIX IE1_E421Stopp	#138 FIX-BAC_kanlacZ	Punktmutation GAG → TAG	FIX-BAC_E421Stopp
#569 pGS284-TN IE1_K450R	#134 TN-BAC_kanlacZ	Punktmutation AAG → CGG	TN-BAC_K450R
#571 pGS284-FIX IE1_K450R	#138 FIX-BAC_kanlacZ	Punktmutation AAG → CGG	FIX-BAC_K450R
#559 pGS284-TN IE1_G476Stopp	#134 TN-BAC_kanlacZ	Punktmutation GGA → TGA	TN-BAC_G476Stopp
#557 pGS284-FIX IE1_G476Stopp	#138 FIX-BAC_kanlacZ	Punktmutation GGA → TGA	FIX-BAC_G476Stopp

**Tab. 4.9: Übersicht aller neu generierten rekombinanten HCMV-BACmide.**



**Abb. 4.24: Schematische Übersicht zur Herstellung rekombinanter TN-BACmide.** A-C: Die obersten Reihen zeigen relevante Ausschnitte der für die homologe Rekombination eingesetzten pGS284-TN-Transferplasmide. Darunter ist der zu verändernde Abschnitt des parentalen TN-BACmids dargestellt. Gebogene Pfeile rechts außen signalisieren die Insertion der mutagenisierten IE1-Abschnitte durch homologe Rekombination. Auf diese Weise neu entstandene TN-BACmide sind in den untersten Reihen dargestellt. Kodierende MIE-Exons sind farbig hervorgehoben und durchnummeriert (2-5). Die relative Position angrenzender EcoR I-Schnittstellen (grüne Pfeile) sowie die jeweiligen Fragmentlängen sind angegeben. Für die Herstellung der FIX-BACmide gilt Entsprechendes. **A:** Konstruktion Exon 4-substituierter BACmide. **B:** Umkehr der Exon 4-Substitution. **C:** Exemplarisch für alle anderen Punktmutationen ist die Herstellung der Exon 4-Punktmutation TN\_A373Stopp gezeigt.



**Abb. 4.25: Vergleich der Restriktionsmuster rekombinanter HCMV-TN-BACmide. A, B:** Die BAC-DNA wurde mit EcoR I geschnitten und in einem 0,7%igen EtBr-Agarosegel aufgetrennt. **A:** Rote Pfeile kennzeichnen die WT-spezifische 10 kbp-Bande. Diese verschwindet bei BACmiden mit Exon 4-Substitution (TN-BAC\_kanlacZ) zugunsten zweier 4,9 und 5,7 kbp großer Fragmente (grüne Pfeile, Abb. 4.24). TN-BAC\_rv ließ wie erwartet ein dem TN-BAC-WT entsprechendes Bandenmuster erkennen. **B:** Exemplarisch für alle Punktmutanten ist TN-BAC\_A373Stopp gezeigt.

#### 4.2.5 Rekonstitution von HCMV-Partikeln aus BACmid-DNA

Nach abgeschlossener Herstellung aller gewünschter rekombinierter HCMV-BACmide der Stämme TN und FIX (4.2.4), galt es nun, ausgehend von der reinen BAC-DNA, durch Transfektion in permissive primäre humane Fibroblasten (MRC-5) Viruspartikel zu rekonstituieren und erste Anhaltspunkte über die Infektiosität der einzelnen Mutanten zu erhalten. Dies erfolgte wie unter 3.6.3 beschrieben mittels Elektroporation. Jedesmal wurden etwa 3  $\mu$ g BAC-DNA und zur Steigerung der Infektiosität je 1  $\mu$ g pp71-Expressionsplasmid transfiziert. Als Positivkontrolle dienten die parentalen BACmide TN-BAC\_WT und FIX-BAC\_WT. Für jede Mutation wurden immer zwei aus der homologen Rekombination unabhängig entstandene Klone transfiziert. Aufgrund der in allen BAC-Genomen enthaltenen EGFP-Expressionskassette konnte die erfolgreiche Transfektion und Virusrekonstitution fluoreszenzmikroskopisch verfolgt werden. So wurden erste grün fluoreszierende Zellen in den Ansätzen TN-BAC\_WT nach etwa drei bzw. FIX-BAC\_WT nach etwa vier Tagen entdeckt. Erwartungsgemäß verhielten sich die Proben TN-BAC\_rv

und FIX-BAC\_rv in gleichartiger Weise. Dagegen konnte bei allen Proben mit einer Exon 4-Substitution (TN-/FIX-BAC\_kanlacZ) zu keinem Zeitpunkt ein grünes Signal detektiert werden. Was die verschiedenen Exon 4-Punktmutanten betraf, ließen sich grüne Zellen regelmäßig erstmals nach etwa drei bis vier Tagen beobachten, danach präsentierten sie aber ein relativ unterschiedliches Wachstumsverhalten. Am WT-ähnlichsten war die Mutante C279A, nur geringfügige Wachstumseinschränkung zeigten K450R und G476Stopp, wohingegen K192P, E421Stopp und vor allem A373Stopp und L174P deutliche Attenuierung gegenüber den WT-Viren erkennen ließen. Die entsprechenden Mutanten der Stämme TN und FIX verhielten sich ungefähr gleichförmig. In den folgenden Tagen und Wochen nahm die Anzahl fluoreszierender Zellen bei den WT-Viren, Revertanten und allen Punktmutanten stetig zu, wodurch eine langsame Ausbreitung rekonstituierter Viren nachgewiesen wurde. Sobald eine Schale vollständig durchinfiziert war, wurden die darauf befindlichen Zellen einschließlich dem Überstand geerntet. Bei den WT-ähnlichen Proben war dieser Zeitpunkt nach durchschnittlich 11-15 Tagen, bei den leicht attenuierten Ansätzen nach etwa 15-20 Tagen und bei den stark attenuierten erst nach 20 Tagen oder länger erreicht. Bezüglich der Exon 4-Substitutionsmutanten wurde dafür ein Moment ausgewählt, bei dem kein Auftreten einer Fluoreszenz mehr zu erwarten war (Tag 30). Insgesamt ergaben sich bereits erste Hinweise auf möglicherweise wichtige DNA-Bereiche in der IE1-Gensequenz, die für eine uneingeschränkte Proteinfunktion unabdingbar zu sein scheinen. Im Gegensatz zum vollständigen Exon 4-Verlust (TN-/FIX-BAC\_kanlacZ) war jedoch keiner der mutierten Reste/Abschnitte absolut essenziell für die Vermehrung von laboradaptierten oder klinischen HCMV-Isolaten in kultivierten humanen Fibroblasten.

#### **4.2.6 Schlussfolgerungen**

Zunächst wurden pGS284-Transferplasmide mit IE1-spezifischer Exon 4-Substitution (pGS284-TN/FIX IE1\_kanlacZ, 4.2.3.1) und pUC18-Plasmide mit Exon 4-WT-Sequenz hergestellt (pUC18-TN/FIX IE1\_rv, 4.2.3.2). In letztere wurden mit dem QuikChange<sup>®</sup>-Verfahren bzw. durch Fusions-PCR ausgesuchte Nukleotidaustausche eingefügt, von denen erwartet wurde, dass sie die Funktion des IE1-72 kDa-Proteins beeinflussen (4.2.3.3). Danach wurden alle Mutationen in pGS284-Derivate überführt, da sich nur dieses Vektorgerüst als Transferplasmid eignet (Abb. 4.19 und 4.21). Mit Hilfe von

Konjugation und homologen Rekombinationsprozessen in *E. coli* zwischen den einzelnen Transferplasmiden und parentalen BAC-Genomen wurden anschließend generiert:

Durch Exon 4-Substitution IE1-defiziente HCMV-BAC-Genome, desweiteren BACmide, bei denen diese Substitution wieder rückgängig gemacht worden war, sowie sieben verschiedene HCMV-Exon 4-Punktmutanten (4.2.4). Da dies im Kontext zweier unterschiedlicher Virusisolate (TN und FIX) geschah, hatte man nun für die Transfektion in permissive humane Fibroblasten insgesamt 18 rekombinante HCMV-BACmide, davon jeweils zwei unabhängige Klone, zur Verfügung. Daraus konnten, bis auf die Exon 4-substituierten BAC-Genome, alle rekombinanten BACmide zu infektiösen Viren rekonstituiert werden (4.2.5). Im nächsten Abschnitt wird auf die Phänotypen der neuen Virusmutanten genauer eingegangen.

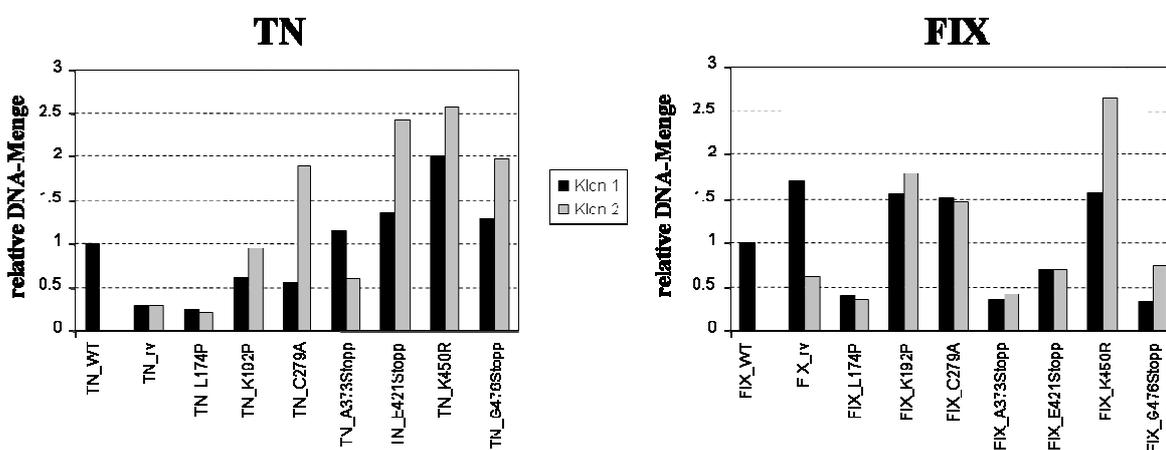
### **4.3 Charakterisierung der HCMV-IE1-Mutanten**

#### **4.3.1 Quantifizierung infektiöser Viruspartikel**

Für eine genaue und reproduzierbare Charakterisierung der HCMV-IE1-Mutanten in verschiedenen Infektionsexperimenten war es erforderlich, gleiche Ausgangsbedingungen zu gewährleisten. Dazu mussten zunächst die Titer, also die Konzentrationen infektiöser Viruspartikel in den einzelnen Viruspräparationen, ermittelt werden. Diese wurden für die beiden WT-Viren im Plaque-Test (3.6.6) bestimmt und betragen für TN  $2,6 \times 10^7$  PFU/ml und für FIX  $2 \times 10^7$  PFU/ml. Auf die IE1-Punktmutanten ließ sich dieses Verfahren aufgrund des „Initiationsdefektes“ (5.1.2) nicht anwenden, da die tatsächlichen Titer dadurch unterschätzt werden würden. Es war jedoch möglich, die Partikelkonzentration der mutanten Viruspräparationen indirekt durch Quantifizierung der viralen DNA zu bestimmen. Über einen Vergleich der DNA-Daten von WT und Mutanten und dem bekannten WT-Titer ließen sich so die Titer der jeweiligen IE1-Punktmutanten berechnen. Im ersten Schritt wurde aus allen geernteten Viruspräparationen Gesamt-DNA isoliert (3.6.8) und als Matrize für die quantitative *real-time* PCR (3.4.5.1) eingesetzt. Mit dem für sämtliche *real-time* PCR-Versuche dieser Arbeit verwendeten Starteroligonukleotidpaar #294/#295 wurde ein 71 bp-Fragment aus dem viralen UL54-Promotor amplifiziert.

Sobald alle CP-Werte, welche die Zykluszahl beim Eintritt der Amplifizierungsreaktion in die logarithmische Phase kennzeichnen, bekannt waren, konnten die relativen Ausgangsmengen an viraler DNA ermittelt werden. Als zusätzliche Kontrolle der Spezifität der PCR-Produkte dienten die entsprechenden Schmelzkurven.

Wie aus den Ergebnissen ersichtlich ist, verhielten sich die DNA-Mengen der einzelnen Viruspräparationen im Vergleich zum WT sehr unterschiedlich (Abb. 4.26). Die beiden unabhängigen Klone der jeweiligen rekombinanten Viren zeigten jedoch größtenteils (mit Ausnahme von TN\_C279A, TN\_E421Stopp und FIX\_K450R) ähnliche Werte. Bezüglich des FIX-Stammes ließ sich erkennen, dass diejenigen Mutanten, die nach späterer Infektion humaner Fibroblasten attenuiertes Wachstum gegenüber dem WT zeigten (FIX\_L174P, FIX\_A373Stopp, FIX\_E421Stopp, 4.3.3), auch eine entsprechend geringere Menge an viraler DNA enthielten. Im Gegensatz dazu traf dieser Effekt bei TN nur auf die L174P-Mutante zu. Eindeutige Parallelen zwischen den entsprechenden Mutanten bei TN und FIX ergaben sich nicht. Insgesamt sollte allerdings darauf hingewiesen werden, dass nicht alle Viruspräparationen im genau gleichen Infektionsstadium geerntet wurden. Dies könnte, neben spezifischen Replikationsdefekten der Virusmutanten, die relativ stark divergierenden DNA-Mengen erklären.



**Abb. 4.26: Quantifizierung viraler DNA zur Bestimmung der Virustiter.** Die virale DNA der einzelnen Viruspräparationen wurde im *real-time* PCR-Verfahren quantifiziert und relativ zu den WT-Viren der Stämme TN und FIX (= 1,0) grafisch dargestellt.

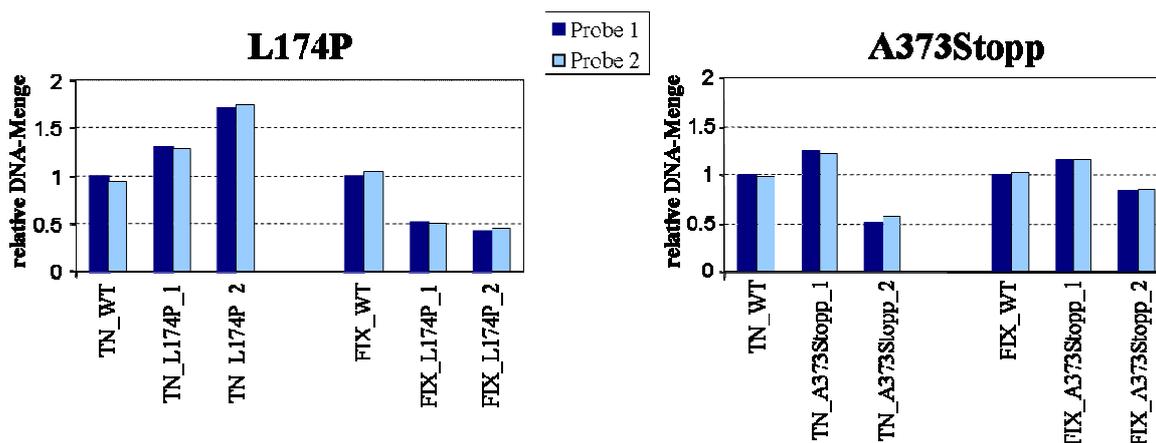
Mit Hilfe der viralen DNA-Daten aus Abb. 4.26 und den aus dem Plaque-Test bekannten Virion-Konzentrationen der WT-Präparationen konnten anschließend die Titer der IE1-Mutanten berechnet werden (Tab. 4.10). Einzelne Mutanten wie TN\_C279A\_2,

TN\_E421Stopp\_2 oder FIX\_K192P übertrafen mit ihren Werten dabei sogar die WT-Viren. Dies könnte dadurch bedingt sein, dass die WT-Viren beim Erntezeitpunkt bereits in einem fortgeschrittenen Infektionsstadium waren, in dem viele Zellen die Virusproduktion schon eingestellt hatten.

HCMV-TN-BACmid	Klon-Nummer	Titer (PFU/ml)	HCMV-FIX-BACmid	Klon-Nummer	Titer (PFU/ml)
WT	#167	$2,6 \times 10^7$	WT	#121	$2 \times 10^7$
rv_1	#155	$0,49 \times 10^7$	rv_1	#158	$3,39 \times 10^7$
rv_2	#157	$0,47 \times 10^7$	rv_2	#160	$1,21 \times 10^7$
L174P_1	#170	$0,41 \times 10^7$	L174P_1	#172	$0,79 \times 10^7$
L174P_2	#171	$0,36 \times 10^7$	L174P_2	#174	$0,68 \times 10^7$
K192P_1	#198	$1,03 \times 10^7$	K192P_1	#201	$3,1 \times 10^7$
K192P_2	#192	$1,6 \times 10^7$	K192P_2	#190	$3,59 \times 10^7$
C279A_1	#177	$0,93 \times 10^7$	C279A_1	#180	$3,02 \times 10^7$
C279A_2	#178	$3,24 \times 10^7$	C279A_2	#181	$2,92 \times 10^7$
A373Stopp_1	#188	$1,97 \times 10^7$	A373Stopp_1	#179	$0,69 \times 10^7$
A373Stopp_2	#189	$1,01 \times 10^7$	A373Stopp_2	#166	$0,83 \times 10^7$
E421Stopp_1	#161	$2,34 \times 10^7$	E421Stopp_1	#164	$1,39 \times 10^7$
E421Stopp_2	#163	$4,14 \times 10^7$	E421Stopp_2	#165	$1,39 \times 10^7$
K450R_1	#185	$3,42 \times 10^7$	K450R_1	#183	$3,11 \times 10^7$
K450R_2	#186	$4,41 \times 10^7$	K450R_2	#184	$5,3 \times 10^7$
G476Stopp_1	#168	$2,2 \times 10^7$	G476Stopp_1	#173	$0,65 \times 10^7$
G476Stopp_2	#169	$3,36 \times 10^7$	G476Stopp_2	#175	$1,47 \times 10^7$

**Tab. 4.10: Berechnete Virustiter der HCMV Mutanten.**

Um nachzuweisen, dass die angewendete Methode der DNA-Isolierung aus Viruspräparationen mit dem NucleoSpin<sup>®</sup> Blood Kit (3.6.8) reproduzierbare Ergebnisse in der *real-time* PCR-Quantifizierung liefert, wurden exemplarisch die WT-Viren der Stämme TN und FIX sowie die Virusmutanten TN/FIX\_L174P und TN/FIX\_A373Stopp genauer untersucht. Dazu wurden nach erneuter Transfektion der entsprechenden BAC-Genome in humane Fibroblasten alle Proben nach dem gleichen Schema zelltrümmerfrei geerntet. Anschließend wurde aus denselben Viruspräparationen je zweimal ein definiertes Volumen entnommen, daraus die DNA isoliert und mittels *real-time* PCR quantifiziert. Abb. 4.27 zeigt deutlich, dass sich bei der Quantifizierung viraler DNA für die beiden unabhängigen Proben aller Ansätze jeweils annähernd gleiche Werte ergaben.



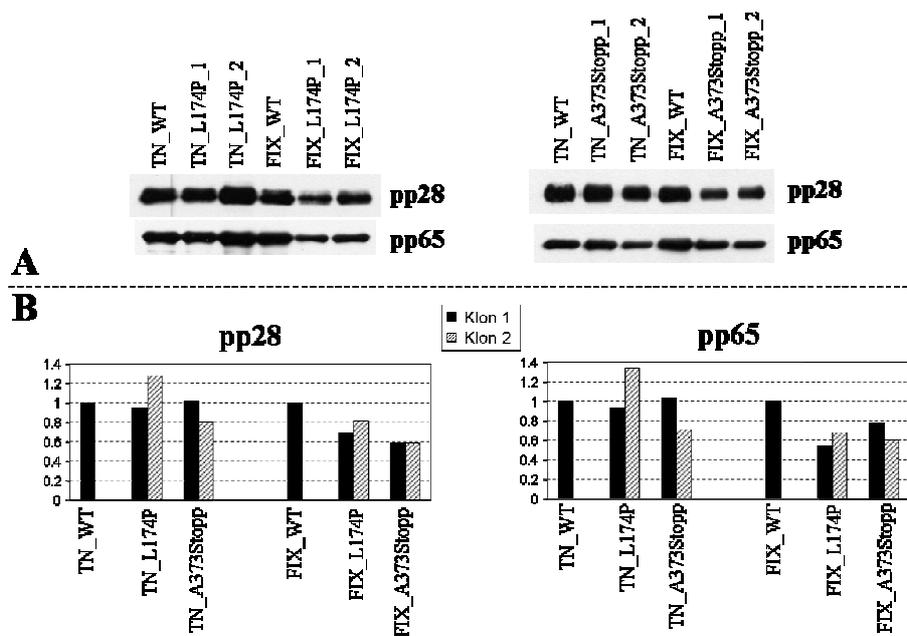
**Abb. 4.27: Reproduzierbarkeit der Quantifizierung viraler DNA.** Diese wurde exemplarisch für die WT-Viren beider Stämme (TN und FIX) sowie für die Virusmutanten TN/FIX\_L174P und TN/FIX\_A373Stopp getestet. Aus den einzelnen Viruspräparationen wurde ein definiertes Volumen zweimal unabhängig voneinander für die DNA-Isolierung eingesetzt (Probe 1, Probe 2). Die daraus erhaltene DNA wurde im *real-time* PCR-Verfahren quantifiziert und relativ zu den entsprechenden WT-Viren (= 1,0) grafisch dargestellt.

#### 4.3.2 Analyse von Strukturproteinen der Viruspartikel

Durch die alleinige Quantifizierung von Viruspartikeln mittels *real-time* PCR ist keine Unterscheidung zwischen DNA-haltigen infektiösen und DNA-haltigen nicht-infektiösen Viren möglich. Zusätzlich könnten die berechneten Virustiter einer Beeinflussung durch DNA-freie, nicht-infektiöse Virionen unterliegen. Erreichen solche defekten Viruspartikel zusammen mit kompletten Virionen die gleiche Zelle, könnten virale Tegumentfaktoren bereits unmittelbar nach Beginn der Infektion und somit unabhängig vom Einsetzen der viralen Genexpression aktiv werden (Mocarski 2001). Das Protein pp65 blockiert beispielsweise zelluläre Immunmechanismen, wohingegen pp71 als Transkriptionsaktivator die Infektiosität von HCMV-DNA verstärkt (Liu *et al.* 1992; Gilbert *et al.* 1996; Baldick *et al.* 1997), was auch für BAC-Transfektionen ausgenutzt wird (3.6.3). Durch das übermäßige Angebot DNA-freier defekter Viruspartikel könnte also die Infektiosität intakter Viren erheblich gesteigert werden.

Ein Vergleich der Gesamtmengen an infektiösen und nicht-infektiösen Partikeln in den einzelnen Ansätzen könnte diesen Effekt ausschließen. Dafür wurden Präparationen der beiden WT-Viren (TN und FIX) sowie exemplarisch die Mutanten TN/FIX\_L174P und TN/FIX\_A373Stopp, auf Proteinebene im Western Blot charakterisiert. Nach Sedimentation der zelltrümmerfrei geernteten Viruspartikel (3.6.7) konnte dann der Gehalt

an den viralen Tegumentproteinen pp28 und pp65 bestimmt werden (Abb. 4.28). Die dabei gewonnenen Ergebnisse korrelierten größtenteils mit denen der DNA-Quantifizierung (4.3.1 und Abb. 4.26). Obwohl die auf Proteinebene ermittelten Unterschiede zwischen WT-Virus und Mutanten generell etwas geringer als bei der DNA-Quantifizierung ausfielen, ist davon auszugehen, dass der Gehalt an Tegumentproteinen bei den Virusmutanten im Vergleich zum entsprechenden WT mit dem Gehalt an viraler DNA übereinstimmt. Sollte dennoch unerwarteterweise in einer hier nicht untersuchten Viruspräparation ein größerer Anteil an DNA-freien, defekten Viruspartikeln im Vergleich zum WT vorliegen, würde dies nicht übermäßig stören, weil dieser Effekt besonders nach Infektion mit mehreren infektiösen Partikeln pro Zelle ( $\text{MOI} > 1$ ) relevant wird und in dieser Arbeit ausschließlich Infektionsexperimente unter *single hit*-Bedingungen ( $\text{MOI} \leq 1$ ) durchgeführt wurden.



**Abb. 4.28: Western Blot-Analyse viraler Strukturproteine in den HCMV-Präparationen.** Viruspartikel der WT-Viren (TN und FIX) sowie der Mutanten TN/FIX\_L174P und TN/FIX\_A373Stopp wurden aus zelltrümmerfrei geernteten Präparationen pelletiert, in 12%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und im Western Blot-Verfahren mit Antikörpern gegen pp28 bzw. pp65 nachgewiesen (A). Die Proteinbanden wurden densitometrisch quantifiziert (*ScionImage* Software) und als Änderung im Vergleich zu den WT-Viren (= 1,0) als Säulendiagramm grafisch dargestellt (B).

### 4.3.3 Analyse der Virusreplikation

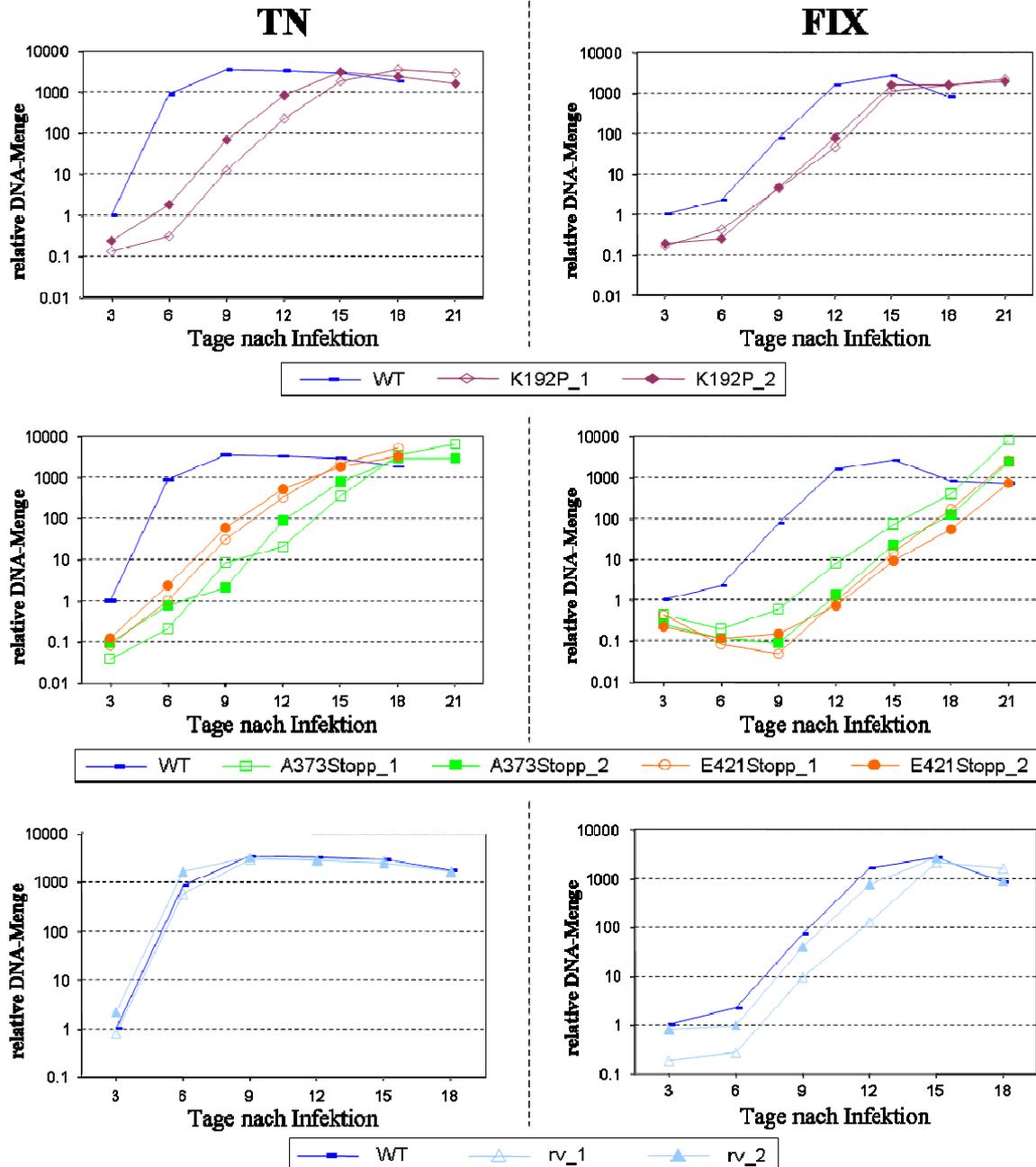
Nachdem zur Schaffung gleicher Ausgangsbedingungen die Konzentrationen aller Viruspräparationen ermittelt waren, konnte das Replikationsverhalten der generierten Virusmutanten näher charakterisiert werden. In einer Multischritt-Wachstumskinetik (3.6.9) wurden zunächst primäre Fibroblasten ( $6 \times 10^5$  Zellen je Ansatz) mit einer MOI von  $\sim 0,25$  PFU/Zelle infiziert. Für jeden Klon einer IE1-Mutante und für beide WT-Viren wurden dabei jeweils zwei unabhängige Ansätze untersucht. Um das unterschiedliche Wachstumsverhalten der Mutanten genau zu bestimmen, wurde alle drei Tage virale DNA aus dem Kulturmedium isoliert und mittels *real-time* PCR quantifiziert. Darüber hinaus wurde die EGFP-Expression aller Proben regelmäßig im Fluoreszenzmikroskop verfolgt und dokumentiert.

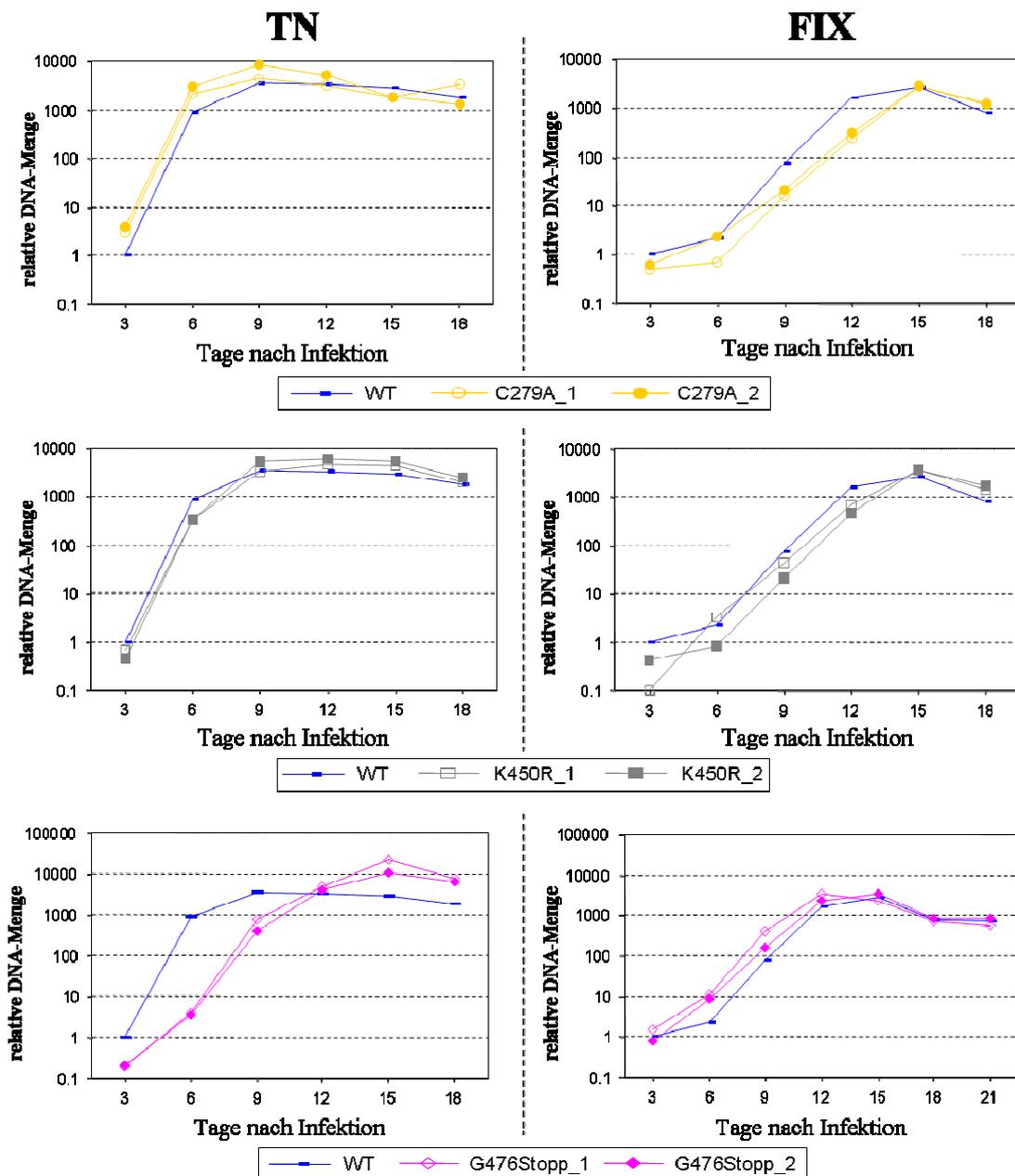
Insgesamt zeigte sich, dass alle FIX-Viren gegenüber dem TN-Stamm eine deutlich langsamere Kinetik und niedrigere DNA-Mengen aufwiesen (Abb. 4.29). Die entsprechenden Mutanten der beiden Stämme sowie die zwei Klone derselben Mutante verhielten sich aber im Wesentlichen analog zueinander. Daher können Replikationsdefekte durch fehlerhafte Klonierung oder zufällige Rekombination der BACmide weitgehend ausgeschlossen werden.

Bei den Revertanten beider Stämme ergab sich, wie erwartet, ein WT-ähnliches Wachstumsverhalten mit deutlichem Anstieg der viralen DNA ab Tag drei bis neun (TN) bzw. ab Tag neun bis 15 (FIX) (Abb. 4.29). Eine ähnliche WT-Charakteristik ergaben die Mutanten C279A und K450R. Bezüglich der Mutation G476Stopp zeigte sich bei FIX ein WT-ähnliches Replikationsverhalten, bei TN jedoch eine etwas verlangsamte Kinetik. Eine deutlich verzögerte Zunahme der viralen DNA ließ sich hinsichtlich der Mutation K192P feststellen (Abb. 4.29). Das am stärksten verlangsamte Wachstum zeigte allerdings die L174P-Mutante. Obwohl hier Unterschiede im Ausmaß der Replikationskapazität zwischen den beiden Klonen des TN-Stammes bestanden, war die Attenuierung klar erkennbar. Bei FIX\_L174P war sogar bis Tag 21 kein zuverlässiger Nachweis viraler DNA möglich und im Fluoreszenzmikroskop war eine Ausbreitung der Infektion erst ab Tag 23 *post infectionem* zu beobachten (nicht abgebildet).

Die Wachstumsgeschwindigkeit der Stopppmutanten A373Stopp und E421Stopp war stark verzögert, wobei die finalen DNA-Mengen bei TN ab Tag 18 bzw. bei FIX ab Tag 21 jeweils WT-Werte erzielten (Abb. 4.29). Allgemein zeigte sich beim TN-Stamm ein

zunehmender Replikationsdefekt, je größer der fehlende C-terminale Anteil des IE1-Proteins war. Die Tatsache, dass im Gegensatz dazu bei FIX die Mutation E421Stopp charakterisiert war, lässt Platz für Spekulationen über Stamm-spezifische Unterschiede.

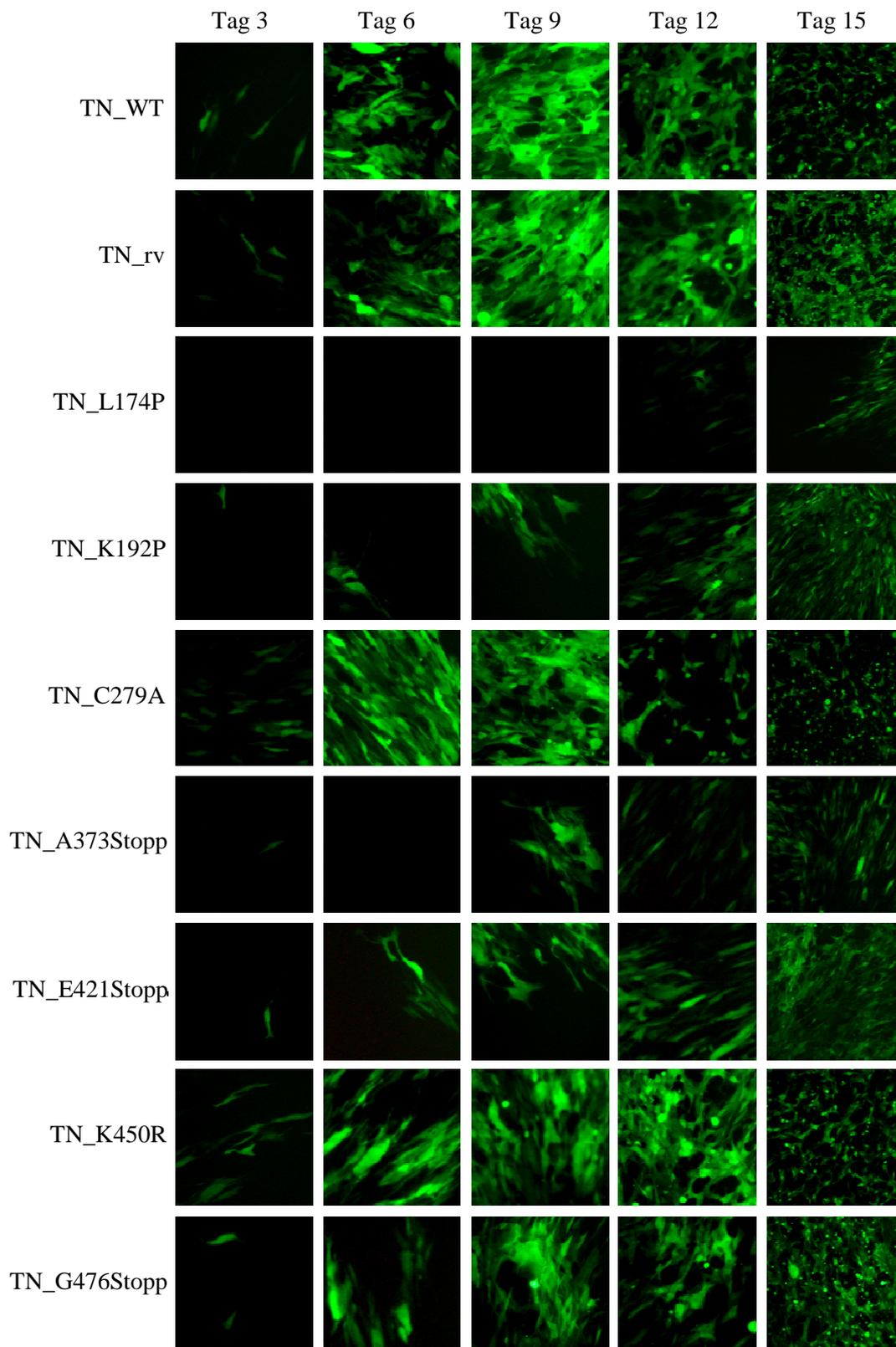


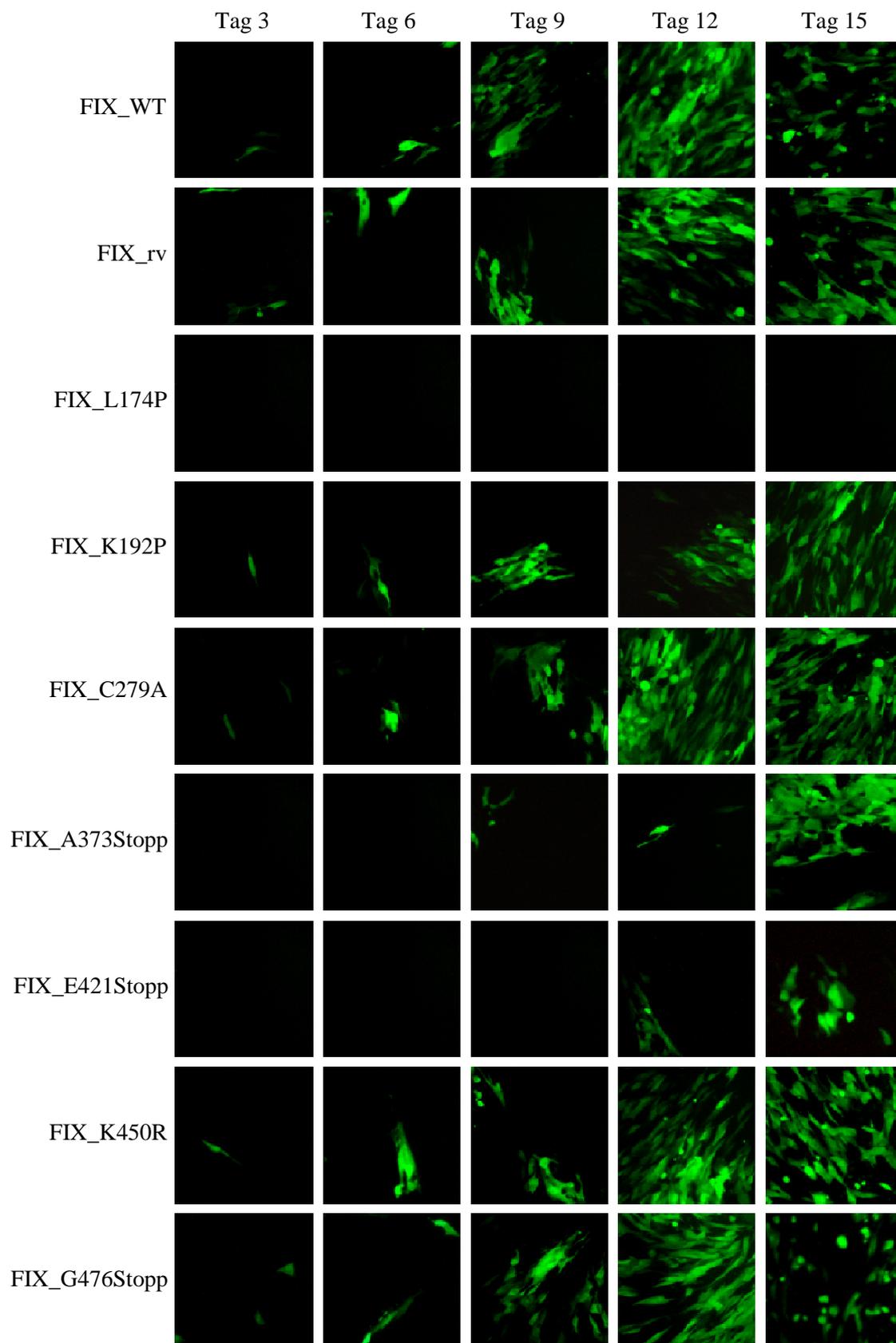


**Abb. 4.29: Wachstumskinetiken der HCMV-IE1-Mutanten.**  $6 \times 10^5$  primäre humane Fibroblasten (MRC-5) wurden bei einer MOI von  $\sim 0,25$  PFU/Zelle mit WT-Virus, Revertante oder einer der sieben IE1-Mutanten der Stämme TN bzw. FIX (jeweils zwei Klone) infiziert. Während die Abszisse die Zeitpunkte nach Infektion angibt, zu denen der Gehalt an viraler DNA in den Kulturüberständen gemessen wurde, ist auf der Ordinate die relative Menge der quantifizierten viralen DNA aufgeführt. Alle Messwerte sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten.

Da alle untersuchten Viren das grün fluoreszierende Protein EGFP exprimieren, konnte der Infektionsverlauf mit einem inversen Fluoreszenzmikroskop beobachtet und dokumentiert werden. Dazu wurde der infizierte Zellrasen alle drei Tage mit einer digitalen Kamera

fotografiert (Abb. 4.30). Die Ergebnisse der DNA-Quantifizierung der einzelnen Zeitpunkte ließen sich so im Wesentlichen bestätigen.





**Abb. 4.30: Fluoreszenzmikroskopische Dokumentation des Wachstums der HCMV-IE1-Mutanten.**  $6 \times 10^5$  primäre humane Fibroblasten (MRC-5) wurden bei einer MOI von  $\sim 0,25$  PFU/Zelle mit WT-Virus, Revertante oder einer der sieben IE1-Mutanten der Stämme TN bzw. FIX (jeweils beide Klone) infiziert. Alle drei Tage wurde ein repräsentativer Ausschnitt der Zellkulturschalen im inversen Fluoreszenzmikroskop fotografiert (Vergrößerung:  $\times 50$ ). Da sich beide Klone einer Mutante jeweils annähernd gleich verhielten, ist nur ein Klon gezeigt.

Zusammenfassend ließ sich erkennen, dass unter Infektionsbedingungen mit niedriger MOI einige Punktmutationen in der IE1-spezifischen Exon 4-Sequenz, wie L174P und K192P, zu stark attenuiertem Wachstum führten, was die bereits vermutete funktionelle Bedeutung der zugehörigen Proteindomäne für eine produktive Virusvermehrung in humanen Zellen unterstreicht. Ähnliches traf auf die Stoppmutanten A373Stopp und E421Stopp zu. Die Elimination der aziden Domänen am C-Terminus von IE1-72 kDa führt also offenbar zu einem Wachstumsdefekt im Vergleich zum WT. Dieser Effekt war zumindest bei den TN-Stoppmutanten umso stärker ausgeprägt, je größer der deletierte C-terminale DNA-Abschnitt war. Der Verlust der Chromatinbindedomäne resultierte nur beim TN-Stamm in einer verzögerten Replikationskinetik, was auf stammspezifische Unterschiede hindeutet. Im Gegensatz dazu verhielten sich die Revertanten sowie die Mutanten C279A und K450R WT-ähnlich, ein Hinweis darauf, dass weder der Verlust des putativen Zinkfingermotivs noch der SUMOylierung einen nachteiligen Effekt auf die Replikationseffizienz ausübt.

#### **4.3.4 IE1-abhängige subzelluläre Lokalisation viraler und zellulärer Proteine**

Sowohl IE1 als auch IE2 kolokalisieren bereits kurz nach Infektion mit subnukleären PML-Körpern (Korioth *et al.* 1996; Ahn *et al.* 1997). Da das virale IE1-Protein für die Auflösung und die daraus resultierende diffuse nukleäre Verteilung dieser sonst globulären Multiproteinkomplexe unabdingbar ist, stellte sich die Frage, inwiefern sich die durch Punktmutationen konstruierten Sequenzveränderungen auf diese Fähigkeit auswirken. Für immunzytochemische Doppelfärbungen wurden MRC-5-Fibroblasten auf Deckgläsern ausgesät und mit einer niedrigen MOI von  $\sim 0,1$  PFU/Zelle mit je einem Klon aller IE1-Mutanten infiziert. Sobald sich nach einigen Tagen anhand der EGFP-Expression im inversen Fluoreszenzmikroskop erste Plaques beobachten ließen, wurden die Zellen mit Methanol fixiert. Dies diente gleichzeitig der Eliminierung der Eigenfluoreszenz des virusexprimierten EGFP. Anschließend erfolgte die Immundetektion mit Primärantikörpern gegen das virale IE1-Protein und gegen Sp100 bzw. PML, zweier

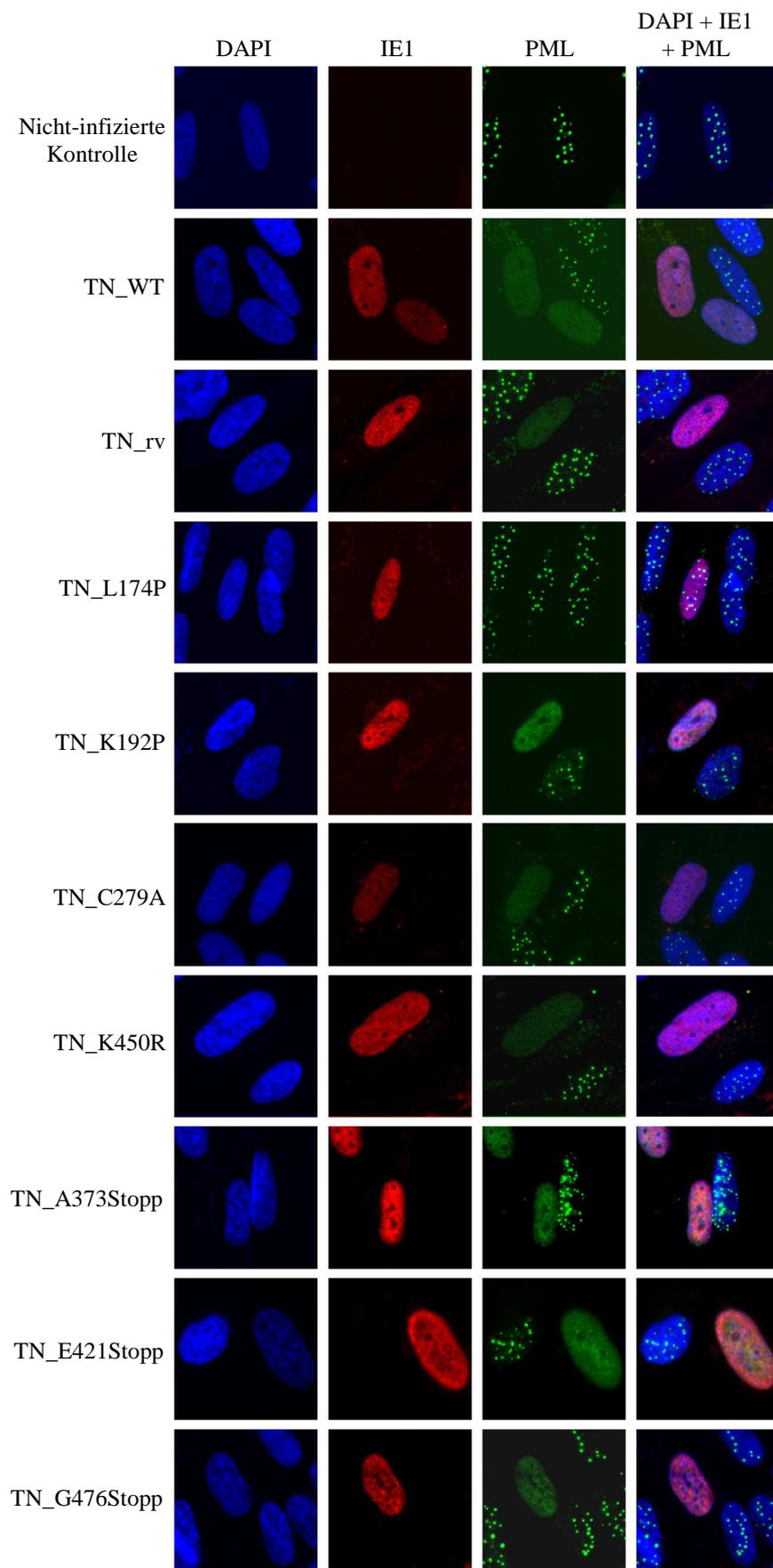
konstitutiver Strukturkomponenten der PML-Körper. Als Sekundärantikörper wurden passende fluoreszenzgekoppelte Immunglobuline verwendet. Zusätzlich wurde der Zellkern mit dem DNA-Farbstoff DAPI angefärbt.

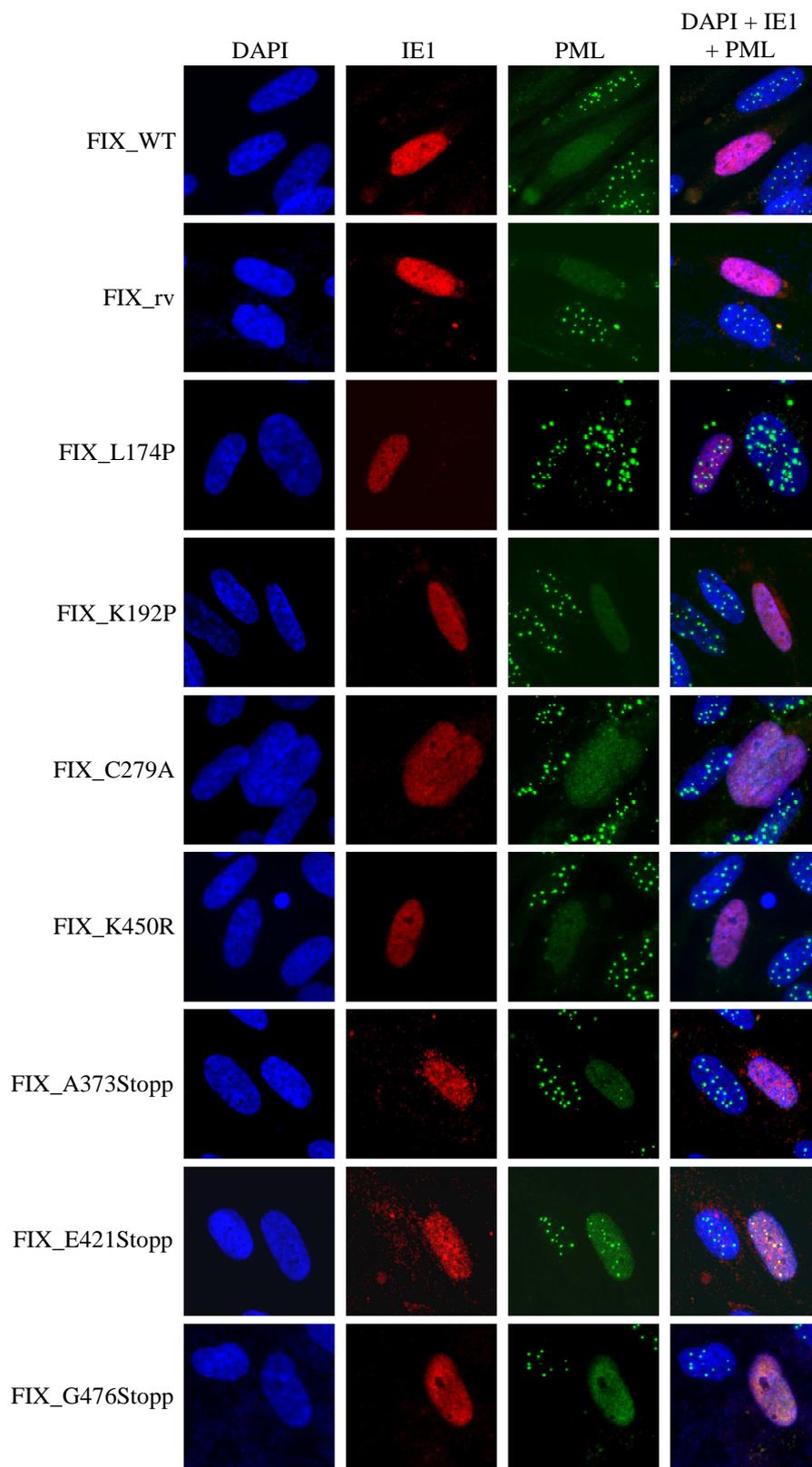
Um eine mögliche Kolo-kalisation zwischen IE1 und Sp100 bzw. PML nachzuweisen, wurden von jeder Probe repräsentative Ausschnitte mit roter (IE1), grüner (Sp100 bzw. PML) und blauer (DAPI) Fluoreszenz fotografiert und die entstandenen Einzelaufnahmen übereinander gelagert.

In einigen Vorversuchen war eine unerwartete zytoplasmatische, perinukleär betonte IE1-Anfärbung zu beobachten. Dies war wahrscheinlich bedingt durch Assoziation des aus Kaninchen stammenden Primärantikörpers gegen IE1 an unspezifische F<sub>c</sub>-rezeptorähnliche Strukturen im Zytoplasma. Durch Zugabe von humanem IgG zur Primärantikörperlösung konnten diese Bindungsstellen erfolgreich blockiert werden.

Im ersten Experiment (Abb. 4.31 A) wurde die Kolo-kalisation von PML und IE1 aller TN- und FIX-IE1-Mutanten untersucht. TN\_WT, TN\_rv, TN\_C279A und TN\_K450R wiesen wie erwartet für IE1 und PML ein vom Infektionsstadium abhängiges Bild auf, zuerst eine punktförmige Kolo-kalisation zwischen IE1 und PML und danach eine gleichmäßig nukleäre Verteilung beider Proteine.

Im Gegensatz dazu konnte in L174P-infizierten Zellen zu keinem Zeitpunkt ein diffus nukleäres PML-Muster festgestellt werden. Bezüglich der Mutanten K192P, A373Stopp und E421Stopp ergab sich ein uneinheitliches Bild, da bei gleichzeitiger nukleär diffuser IE1-Färbung PML beim Großteil der Zellen nur nukleär diffus, bei einigen Zellen jedoch nukleär diffus mit einzelnen nukleären Restpunkten vorlag.



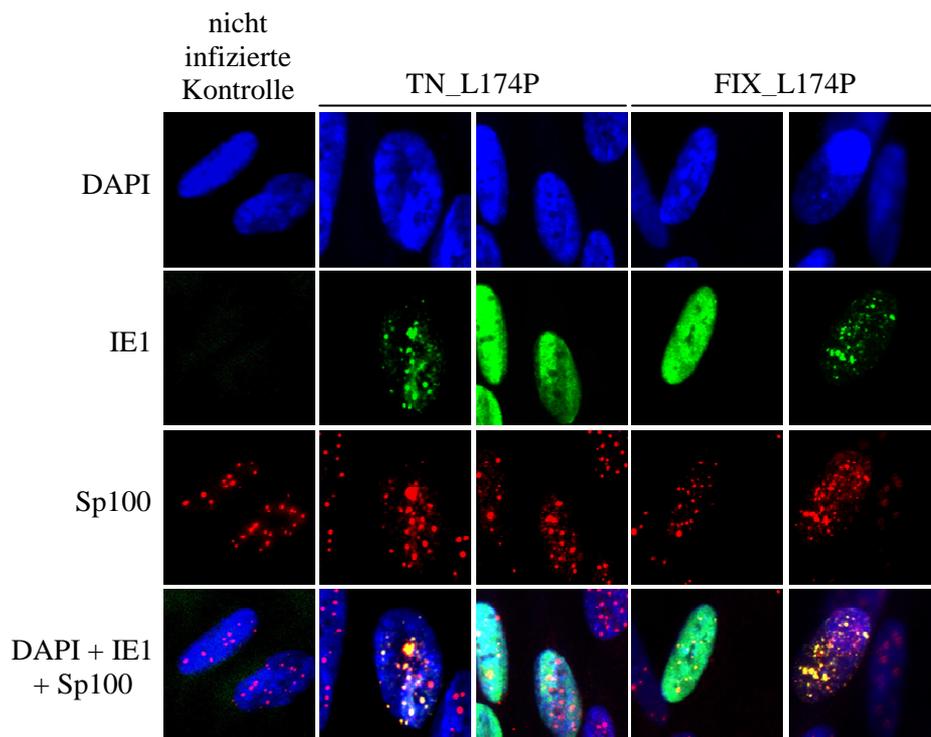


**Abb. 4.31: Immunfluoreszenzanalyse zur Integrität der PML-Körper und Lokalisation von IE1.** Für die fluoreszenten Doppelfärbungen wurden Primärantikörper gegen IE1 (GST-IE1 $\Delta$ N aus Kaninchen) und gegen PML (5E10 aus Maus) verwendet. Als Sekundärkonjugate wurden rot

fluoreszierende (Alexa Fluor 594-markierte) Immunglobuline gegen Primärantikörper aus dem Kaninchen sowie grün fluoreszierende (Alexa Fluor 488-markierte) Immunglobuline gegen Primärantikörper aus der Maus eingesetzt. Die DNA wurde zusätzlich durch den blau fluoreszierenden, interkalierenden DAPI-Farbstoff angefärbt. Zusätzlich wurden unspezifische zytoplasmatische Bindungsstellen des anti-IE1-Primärantikörpers aus dem Kaninchen mit humanem IgG blockiert.

Um noch einmal die Ergebnisse für L174P zu verifizieren, wurden erneut MRC-5-Fibroblasten, diesmal wachstumsarretiert, mit den Virusmutanten TN/FIX\_L174P infiziert, jedoch schon nach zwölf Stunden Methanol-fixiert. Die Antikörper-vermittelte Fluoreszenzfärbung der Zellpräparate erfolgte dann wie oben beschrieben. Zellkerne mit grüner (IE1), roter (Sp100) und blauer (DAPI) Fluoreszenz wurden fotografiert und die entstandenen Einzelaufnahmen übereinander gelagert.

Wieder war deutlich sichtbar, dass L174P keine Auflösung der PML-Körper mehr bewirken kann (Abb. 4.27). Es ließ sich jedoch überraschend erstmals eine im frühen Infektionsstadium noch vorhandene Kolokalisation zwischen IE1 und Sp100 nachweisen.



**Abb. 4.32: Immunfluoreszenzanalyse zur Integrität der PML-Körper und Lokalisation von IE1.** Für die fluoreszenten Doppelfärbungen wurden Primärantikörper gegen IE1 (1B12 aus Maus) und Sp100 (aus Kaninchen) eingesetzt. Als Sekundärkonjugate wurden rot fluoreszierende (Alexa Fluor 594-markierte) Immunglobuline gegen Primärantikörper aus dem Kaninchen sowie grün fluoreszierende (Alexa Fluor 488-markierte) Immunglobuline gegen Primärantikörper aus der Maus verwendet. Die DNA wurde zusätzlich durch den blau fluoreszierenden, interkalierenden DAPI-Farbstoff angefärbt.

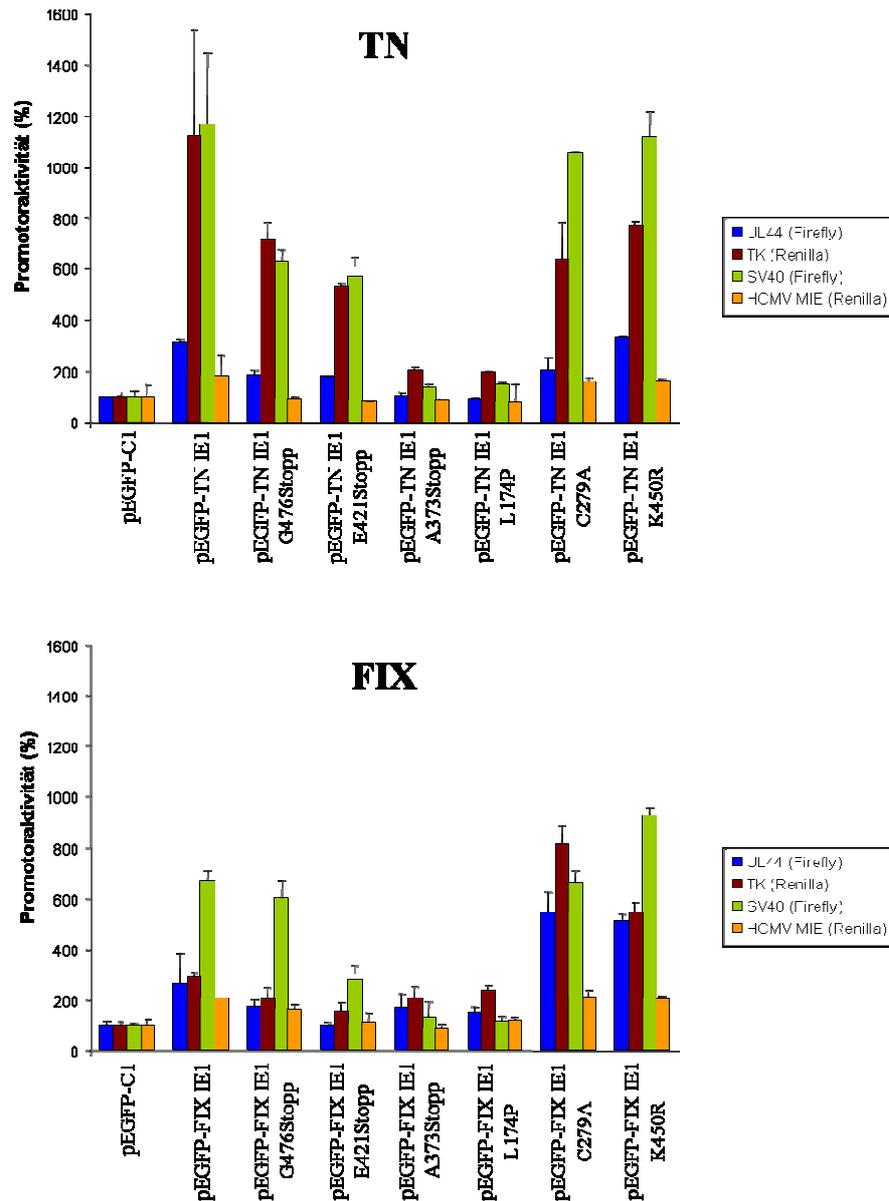
#### 4.3.5 Einfluss der Punktmutationen auf die transaktivierenden Eigenschaften von IE1-72 kDa

IE1 verstärkt bekanntlich nicht nur die IE2-vermittelte Transaktivierung vieler Gene aus der E-Phase (Chang *et al.* 1989; Stenberg *et al.* 1990; Kerry *et al.* 1994), sondern aktiviert auch einige zelluläre Promotoren, wie die der DNA-Polymerase  $\alpha$  CCAAT Box-abhängig (Hayhurst *et al.* 1995) oder der Dihydrofolat-Reduktase über E2F (Wade *et al.* 1992; Margolis *et al.* 1995).

Mit Hilfe des Dual-Luciferase Reporter Assays (3.6.10) sollte nun bestimmt werden, inwieweit die einzelnen IE1-Punktmutanten die Transaktivierungsfähigkeit des IE1-WT-Proteins erreichen. Die dafür verwendeten Plasmide pEGFP-TN IE1 bzw. pEGFP-FIX IE1 aus der laboreigenen Stammsammlung entstanden durch Subklonierung der IE1-cDNA von TN und FIX in den eukaryotischen Expressionsvektor pEGFP-C1 (Meinel 2006). Als Effektorplasmide dienten desweiteren Plasmidkonstrukte, die in der IE1-cDNA-Sequenz die in dieser Arbeit zu untersuchenden Nukleotidaustausche beinhalteten (3.2.2). Die jeweilige Reportergergenaktivierung wurde dabei anhand der enzymatischen Aktivität der exprimierten Luciferase im Vergleich zum pEGFP-C1 Vektor quantifiziert (Meinel 2006). In zwei Versuchen wurden jeweils andere Reporterkonstrukte, welche für die Firefly bzw. Renilla Luciferase kodieren, eingesetzt (Tab. 4.11). Die Luciferase-Gene werden von verschiedenen viralen oder zellulären Promotoren kontrolliert, welche durch das Wildtyp IE1-Protein aktiviert werden können. Abhängig von der durch multiple Faktoren beeinflussten Promotoraktivität werden letztlich unterschiedliche Mengen Luciferase hergestellt. Die Ergebnisse der Lumineszenzmessung sind in Abb. 4.33 dargestellt. Die Proteinmutante K192P beider Virusstämme stand zur Zeit der Versuchsdurchführung noch nicht zur Verfügung, weshalb sie hier nicht mit aufgeführt ist.

	<b>Reporterplasmid</b>	<b>Luciferase</b>	<b>enthaltene Promotorregion</b>
Versuch 1	pGL3-ICP36-Promotor	Firefly	HCMV UL44
	pRL-TK	Renilla	HSV Thymidinkinase TK
Versuch 2	pGL3-Control	Firefly	SV40
	pRL-CMV	Renilla	HCMV MIE

**Tab. 4.11: Für den Dual-Luciferase Reporter Assay eingesetzte Reporterplasmide.**



**Abb. 4.33: Relative Promotoraktivität nach Expression der verschiedenen IE1-Punktmutanten im Vergleich zur EGFP-Kontrolle.** Die Aktivität nach Transfektion des Kontrollvektors wurde auf 100% gesetzt und gemessen daran die mittlere Aktivität einer Doppelbestimmung sowie Standardfehler des IE1-Wildtyps und der IE1-Punktmutanten dargestellt.

Wie erwartet, war die Effizienz der Transaktivierung durch den IE1-WT und der IE1-Mutanten hinsichtlich der Promotoren unterschiedlich hoch. So konnte das IE1-WT-Protein die Transkription am Thymidinkinase (TK)- bzw. SV40-Promotor erfolgreicher aktivieren als am HCMV UL44- oder MIE-Promotor. Dennoch war bei allen vier Promotoren die gleiche Tendenz erkennbar. Während die Aktivität des WT-Proteins von TN und FIX im Vergleich zur Kontrolle einen im Durchschnitt etwa 5,3fach höheren Wert

aufwies, zeigte die IE1-Mutante G476Stopp nur noch eine 3,5fach so hohe Promotoraktivität. Außerdem wurde deutlich, dass die Aktivität umso stärker abnahm, je größer die C-terminale Deletion ist. Für A373Stopp und auch L174P lag die Promotoraktivität sogar nur nahe am Kontrollwert.

Dagegen erreichten die IE1-Punktmutanten C279A und K450R beider Virusstämme WT-ähnliche oder noch übertreffende Aktivitäten bezüglich aller getesteten Promotoren.

#### 4.3.6 Schlussfolgerungen

Die genaue Anzahl infektiöser Virionen in allen hergestellten Viruspräparationen der HCMV-IE1-Punktmutanten konnte dank Bestimmung der viralen DNA durch quantitative *real-time* PCR (Abb. 4.26) und Ermittlung der Partikelkonzentration mittels Plaque-Test bei den WT-Viren (Tab. 4.10) berechnet werden. Außerdem wurde exemplarisch für einige zelltrümmerfrei geerntete Präparationen die weitgehende Übereinstimmung der Werte aus der quantitativen Analyse viraler DNA und viraler Strukturproteine nachgewiesen (4.3.2). Hiermit konnten für die folgenden Infektionsexperimente gleiche Ausgangsbedingungen gewährleistet werden, die alle unter niedrigen MOI-Bedingungen ( $\text{MOI} \leq 1$  PFU/Zelle) durchgeführt wurden. In der Untersuchung der Replikationskinetiken (4.3.3) konnte gezeigt werden, dass bei den Mutanten L174P und K192P stark attenuiertes Verhalten bestand. Im Gegensatz dazu verhielten sich die Mutationen C279A und K450R WT-ähnlich. Interessanterweise war bei den TN-Stoppmutanten ein proportionaler Zusammenhang zwischen Größe des deletierten C-Terminus-Anteils und verzögerter Replikationsgeschwindigkeit feststellbar. Allerdings war dies bei den FIX-Stoppmutanten nicht so deutlich zu erkennen, FIX\_G476Stopp wies sogar keinerlei Replikationsdefekt im Vergleich zum WT auf, was Platz für weitere Spekulationen lässt. Allgemein präsentierten alle FIX-Proben gegenüber den TN-Ansätzen ein deutlich langsames Vermehrungsverhalten.

Weiterhin wurde mit Hilfe immunzytochemischer Kollokalisationsstudien (4.3.4) belegt, dass bei allen konstruierten Punktmutanten noch eine Kollokalisation zwischen IE1 und PML-Körpern möglich war (Abb. 4.32 und interne Beobachtungen). Bei der Viruspunktmutante L174P der beiden Stämme TN und FIX kam es allerdings nicht mehr zur IE1-abhängigen Auflösung nukleärer PML-Körper, wohingegen die Mutationen C279A, G476Stopp und K450R darauf keinen Einfluss hatten (Abb. 4.31). Die fehlenden

sauren Domänen der Stoppmutanten A373Stopp und E421Stopp bewirkten, dass die PML-Körper in infizierten Zellen nicht mehr vollständig aufgelöst werden konnten. Gleiches traf für den Großteil der mit K192P-infizierten Zellen zu.

Die in Transfektionsstudien getesteten transaktivierenden Eigenschaften von IE1-72 kDa wurden durch Vorhandensein der Mutationen L174P, A373Stopp, E421Stopp und in leichterem Maße durch G476Stopp beeinträchtigt (4.3.5, Abb. 4.33). Dagegen scheint sowohl die vermutete Zinkfingerdomäne als auch die SUMOylierung von IE1 für die Transaktivierung viraler oder zellulärer Promotoren durch IE1 entbehrlich.

Insgesamt bestätigen alle Ergebnisse eindeutig, dass innerhalb der IE1-spezifischen Exon-4-Sequenz dem zentralen Bereich, einschließlich des Leucinzippermotivs, sowie den im C-Terminus des Proteins enthaltenen sauren Domänen äußerst wichtige Bedeutungen hinsichtlich der produktiven Virusvermehrung in humanen Zellen, der Wechselwirkung mit PML-Körpern und der transaktivierenden Eigenschaften von IE1 zukommen.

## 5 Diskussion

### 5.1 Herstellung und Charakterisierung von HCMV-Mutanten

#### 5.1.1 Herstellung von Virusmutanten mit Hilfe des BAC-Systems

Der adäquate experimentelle Ansatz zur Erforschung und Analyse der Funktion eines viralen Genproduktes besteht darin, das entsprechende Gen zu deletieren oder gezielt zu mutagenisieren und den daraus resultierenden Phänotyp zu charakterisieren. Dazu können virale DNA-Genome bis zu einer Größe von etwa 35 kbp als normale Plasmide in *E. coli* kloniert und nach erfolgreicher *in vitro*-Mutagenese zur Rekonstitution von Viruspartikeln in permissive eukaryotische Zellen transfiziert werden. Auf Viren mit größeren DNA-Sequenzen ist dieses Verfahren jedoch aufgrund von Plasmid-Instabilitäten in *E. coli* nicht anwendbar. Wegen der Größe des HCMV-Genoms (etwa 230 kbp) stellte hier lange Zeit die gezielte Insertionsmutagenese durch homologe Rekombination in Säugerzellen den klassischen Weg der HCMV-Mutantenherstellung dar (Spaete *et al.* 1987; Manning *et al.* 1988). Nachteile dieser Methode waren die geringe Rekombinationshäufigkeit bei langsamer Replikationsgeschwindigkeit von HCMV sowie die aufwändige Selektion rekombinanter Viren und deren Abtrennung von WT-Viren. Dabei musste häufig das zusätzliche Problem eines Wachstumsnachteils der Mutanten überwunden werden. Grundsätzlich konnten nur virale Gene mutiert werden, die nicht essenziell für die Virusvermehrung sind. Weitere Fehlerquellen ergaben sich aus der Instabilität der viralen Genome aufgrund direkter und invertierter Sequenz-Wiederholungen, die zu unerwünschten Rekombinationsereignissen führen können (Spaete *et al.* 1994).

Der entscheidende Durchbruch bezüglich der Mutantenherstellung bei Herpesviren gelang Martin Messerle und Mitarbeitern im Jahre 1997 (Messerle *et al.* 1997), als sie erstmals das komplette, infektiöse Genom des murinen Zytomegalievirus (MCMV) in Form eines zirkulären „künstlichen Chromosoms“ (BACmid) in Bakterien propagierten. BACmide basieren auf dem Replikon des bakteriellen F-Plasmids und liegen nur in ein bis zwei Kopien pro Bakterium vor, was eine stabile Vermehrung von bis zu 300 kbp-langen DNA-Sequenzen in *E. coli* erlaubt (Shizuya *et al.* 1992). Damit war es endlich möglich, beliebige Mutationen mit Hilfe des bakteriellen Rekombinationsapparates und damit völlig

unabhängig von eukaryotischen Zellkultursystemen in das herpesvirale Genom einzubringen. Weitere Verbesserungen in den letzten Jahren (Wagner *et al.* 1999; Brune *et al.* 2000; Adler *et al.* 2003; Borst *et al.* 2004) und die generelle Anwendbarkeit für große DNA-Viren wie HCMV, EBV, HSV und PRV (Delecluse *et al.* 1998; Saeki *et al.* 1998; Stavropoulos *et al.* 1998; Borst *et al.* 1999; Smith *et al.* 1999) trugen dazu bei, dass die BAC-Technologie mittlerweile die bevorzugte Methode zur Konstruktion von Herpesvirusmutanten darstellt (Warden *et al.* 2011). Im Vergleich zur Rekombination in Zellkultur hat die BAC-Mutagenese folgende entscheidende Vorteile:

1. Die zur Mutagenese nötigen Manipulationen im viralen Genom können alle mit effizienten genetischen Werkzeugen in *E. coli* erreicht werden.
2. Die korrekte Mutagenese und Charakterisierung der Integrität der viralen Genomstruktur kann **vor** der Virusrekonstitution kontrolliert werden.
3. Die Mutagenese unterliegt nicht den ineffizienten, kaum kontrollierbaren (homologen) Rekombinationsmechanismen in eukaryotischen Zellen; adventive Deletionen oder inkorrekt rekombinierte Viren werden seltener beobachtet.
4. Nach Transfektion des mutierten BACs wird nur das rekombinante Virus rekonstituiert; eine Selektion gegen das WT-Virus ist damit nicht mehr erforderlich und sogar stark attenuierte Virusmutanten können angezüchtet werden.
5. Wegen der kurzen Generationszeit ist sie um ein Vielfaches schneller.

Die Herstellung von Virusmutanten mit Veränderungen in für die Virusvermehrung essenziellen Genomabschnitten, wie beispielsweise dem IE2-Gen, gestaltete sich jedoch weiterhin schwierig. Speziell für IE2 war es selbst für Bedingungen, unter denen das mutierte virale Gen durch ein ektopisch exprimiertes Protein „transkomplementiert“ wird, nicht möglich (White *et al.* 2000; Marchini *et al.* 2001; Heider *et al.* 2002; Sanchez *et al.* 2002). Darüber hinaus bereitete auch die Rekonstitution von HCMV-Mutanten mit inaktivierenden Mutationen im IE1-Gen Probleme, da ein Ausfall dieses Gens in schweren Replikationsdefekten resultiert (Mocarski *et al.* 1996).

In der vorliegenden Arbeit konnte die Technik der BAC-Mutagenese herpesviraler Genome erfolgreich in der Arbeitsgruppe etabliert werden, was eine deutlich einfachere und schnellere Konstruktion und Analyse rekombinierter Zytomegalieviren ermöglicht.

### 5.1.2 Problematik der Titerbestimmung von Virusmutanten

Für eine genaue und reproduzierbare Charakterisierung der HCMV-IE1-Mutanten in verschiedenen Infektionsexperimenten war es erforderlich, gleiche Ausgangsbedingungen zu gewährleisten. Dazu mussten zunächst die Titer, also die Konzentration infektiöser Viruspartikel der einzelnen Viruspräparationen, ermittelt werden. Für die WT-Viren wurde dazu der bewährte Plaque-Test durchgeführt (3.6.6). Auf die in dieser Arbeit konstruierten IE1-Punktmutanten ließ sich dieses Quantifizierungsverfahren jedoch nicht anwenden, weil Mutationen in funktionell wichtigen Genen oftmals eine verminderte Fähigkeit zur Plaque-Bildung zur Folge haben. Deshalb würden die tatsächlichen Titer unterschätzt werden. So wird bei IE1-defizienten HCMV-Mutanten unter Bedingungen des Plaque-Tests (niedrige MOI) ein ausgeprägter „Initiationsdefekt“ beobachtet (Greaves *et al.* 1998), wobei ein Teil der potenziell infektiösen Virionen auf normalen Fibroblasten keine detektierbaren Plaques erzeugen kann. Dasselbe trifft auch für Punktmutationen in funktionell wichtigen DNA-Bereichen solcher Gene zu. Durch Komplementation des mutierten oder fehlenden Genproduktes *in trans* könnte dieser Defekt kompensiert werden. Ein entsprechendes Wirtszellsystem mit IE1-exprimierenden primären humanen Fibroblasten stand jedoch noch nicht zur Verfügung.

In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb die Partikelkonzentrationen in den mutanten Viruspräparationen indirekt bestimmt. Durch Quantifizierung der viralen DNA mittels kinetischer PCR (4.3.1), welche unabhängig von denkbaren Replikationsdefekten ist, sowie dem anschließenden Vergleich mit der Plaque- und DNA-Quantifizierung der WT-Viren, konnten die Titer der IE1-mutierten Viruspräparationen berechnet werden. Allerdings wird in der kinetischen PCR nur die Gesamtmenge an viraler DNA ermittelt, eine Unterscheidung zwischen DNA-haltigen infektiösen und nicht-infektiösen Viren ist nicht möglich. Es wurde postuliert, dass dieses Verhältnis in den Präparationen der WT-Viren und der Mutanten jeweils gleich ist. Wenn jedoch aufgrund der DNA-Modifizierungen bei den Virusmutanten im Vergleich zur WT-Präparation relativ weniger infektiöse DNA-haltige Viren vorlägen, würde die DNA-Quantifizierung zu hohe Werte liefern. Umgekehrt wäre der tatsächliche Virustiter höher als angenommen, wenn das Verhältnis infektiöser DNA-haltiger Viren in den Präparationen der Mutanten höher als in denen der WT-Präparation wäre. Diese potentielle Fehlerquelle könnte in Zukunft dadurch eliminiert werden, dass man nicht DNA aus extrazellulären Viruspartikeln, sondern nur

intrazelluläre virale DNA für die PCR verwendet. Dazu müsste man Zellen mit identischen Volumina der jeweiligen Viruspräparationen infizieren und gleiche Mengen an DNA-Material aus den entsprechenden Zelllysaten für die quantitative PCR einsetzen. So sollte eine Fehleinschätzung der Titer durch DNA-haltige nicht-infektiöse Viruspartikel größtenteils ausgeschlossen sein, denn es ist anzunehmen, dass HCMV-DNA nur zusammen mit infektiösen Virionen in die Zellen gelangt.

## 5.2 Neue Erkenntnisse zur Funktion des 72 kDa IE1-Proteins

### 5.2.1 Verlust des 72 kDa IE1-Proteins

IE1 wird nach einer HCMV-Infektion als erstes virales Genprodukt im Überfluss synthetisiert und stellt einen Schlüsselregulator des lytischen und latenten Infektionszyklus dar (Castillo *et al.* 2002; Maul 2008). Es akkumuliert in großen Mengen im Kern der Wirtszelle, interagiert mit dem Chromatin und moduliert dort die zelluläre und virale Genexpression sowie die antivirale Interferonantwort (Lafemina *et al.* 1989; Nevels *et al.* 2004; Paulus *et al.* 2006; Krauss *et al.* 2009). Dementsprechend weist die sogenannte CR208-Virusmutante mit kompletter Exon 4-Deletion besonders nach Infektion mit niedriger MOI (MOI <1 PFU/Zelle) schwere Replikationsdefekte auf, die mit einer globalen Blockierung der Expression viraler E-Gene korrelieren (Greaves *et al.* 1998; Gawn *et al.* 2002). Nach Infektion mit mehreren infektiösen Partikeln pro Zelle (MOI  $\geq$ 1 PFU/Zelle) hingegen verhält sich die IE1-Deletionsmutante WT-ähnlich (Mocarski *et al.* 1996; Greaves *et al.* 1998). Obwohl die genauen Mechanismen für dieses MOI-abhängige Wachstum nicht bekannt sind, geht man davon aus, dass IE1 die IE2-vermittelte Expression essenzieller viraler E- und L-Gene unterstützt und verstärkt. Eine der CR208-Mutante nachempfundene, jedoch mit der BAC-Technologie generierte Virusmutante wies ebenfalls stark attenuiertes Wachstum auf (Knoblach 2006).

In unserer Arbeitsgruppe wurde nun der Versuch unternommen, eine IE1-defiziente Virusmutante des laboradaptierten Stammes TN und des pathogenen Primärisolates FIX zu generieren, die anstelle des Exon 4 der MIE-Sequenz eine kanlacZ-Kassette enthält. Eine Virusanzüchtung nach Transfektion der erfolgreich hergestellten BAC-DNA in primäre Fibroblasten war jedoch bei beiden Stämmen nicht möglich. Dies liegt möglicherweise

einerseits an der inserierten kanlacZ-Kassette selbst, die auf ungeklärte Weise die Virusvermehrung verhindern könnte. Andererseits trägt vermutlich die Akkumulation eines verkürzten MIE-Proteins, kodiert von den Exons 2/3, ebenfalls dazu bei. Für solche MIE-Genprodukte, die nach Infektion von Fibroblasten mit WT-Viren bestenfalls in sehr geringen Mengen auftreten, wird ein transdominant negativer Effekt auf die Virusreplikation vermutet (Awasthi *et al.* 2004). Diese Annahme wird auch dadurch bestätigt, dass eine von einer Laborkollegin konstruierte IE1-Deletionsmutante, bei der es ebenfalls zur Akkumulation eines putativen, verkürzten MIE-Proteins kommt, ein erheblich ausgeprägteres Wachstumsdefizit im Vergleich zu anderen IE1-Deletionsmutanten präsentierte (Knoblach 2006). Dem verkürzten IE1-Protein ähnlich ist die Spleißvariante IE9, deren mRNA-Nachweis erst kürzlich gelang (Awasthi *et al.* 2004). Sie wird von den Exons 2 und 3 der MIE-Region exprimiert und kodiert für einen 80 Aminosäuren langen Leserahmen. Versuche, das IE9-Protein im Verlauf einer HCMV-Infektion zu detektieren, scheiterten bisher. Andere in der Literatur beschriebene, kleine MIE-Genprodukte wie IE17,5, IE19 und IE55, die durch alternatives Spleißen der MIE-Sequenz gebildet werden, zeichnen sich ebenfalls durch transkriptionell reprimierende Eigenschaften aus (Shirakata *et al.* 2002; Awasthi *et al.* 2004).

### **5.2.2 Verlust spezifischer funktioneller Bereiche des 72 kDa IE1-Proteins**

Ziel dieser Arbeit war es, im Kontext einer authentischen Infektion mit verschiedenen IE1-Virusmutanten genauere Informationen über funktionelle Bereiche im HCMV IE1-Protein zu erlangen. So entstanden durch BAC-Mutagenese sieben infektiöse BAC-Genome mit Einzelnukleotidaustauschen in der IE1-spezifischen Exon 4-Sequenz der HCMV MIE-Transkriptionseinheit. Da alle entsprechenden Mutationen sowohl in dem attenuierten Laborstamm (TN) als auch in einem humanpathogenen Primärisolat (FIX) generiert wurden, konnte nach Rekonstitution infektiöser Virionen eine vergleichende Analyse der resultierenden Phänotypen erfolgen. Aus Zeitgründen beschränkte sich die Charakterisierung im Wesentlichen auf Versuche zum Wachstumsverhalten, der subzellulären Lokalisation viraler und zellulärer Proteine und der Transaktivierungsfähigkeit von IE1.

### 5.2.2.1 Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten

IE1 kommt in der viralen Replikation unzweifelhaft eine wichtige Rolle zu. So zeigen IE1-defiziente Viren bei Infektion mit niedriger MOI ( $\text{MOI} < 1 \text{ PFU/Zelle}$ ) ein erhebliches Wachstumsdefizit (Mocarski *et al.* 1996; Greaves *et al.* 1998). Um die dafür entscheidenden kodierenden DNA-Bereiche genauer zu identifizieren, wurden humane permissive Lungenfibroblasten mit den konstruierten Punktmutanten bei niedriger MOI ( $\text{MOI} \sim 0,25 \text{ PFU/Zelle}$ ) infiziert und die Replikation verfolgt und quantifiziert. Dabei zeigten sämtliche vom klinischen FIX-Isolat abstammende Viren eine im Vergleich zum laboradaptierten TN-Stamm leicht verzögerte Replikationskinetik. Desweiteren war eindeutig erkennbar, dass zu jedem Zeitpunkt bei allen FIX-Infektionen weniger virale DNA vorhanden war als bei den entsprechenden TN-Proben. Das liegt vermutlich daran, dass die verwendete PCR-Methode ausschließlich die Menge an viraler DNA im Kulturüberstand der infizierten Zellen bestimmt. Im Allgemeinen wird weniger virale DNA im Medium nachgewiesen, wenn Viren sich bevorzugt über Zell-Zell-Kontakte verbreiten. Das trifft für das klinische Primärisolat FIX zu, während zur Ausbreitung der Infektion mit laboradaptierten Stämmen (einschließlich TN) extrazelluläre und über interzelluläre Kontakte weitergegebene Virionen etwa jeweils die Hälfte beitragen.

Das Replikationsverhalten, das sowohl durch DNA-Quantifizierung als auch durch Betrachtungen im Fluoreszenzmikroskop analysiert wurde, war jedoch bei den analogen Virusmutanten von HCMV-TN und -FIX jeweils annähernd gleich. Einzig das Replikationsverhalten der Mutante G476Stopp, bei der durch Translationsabbruch die am äußersten C-terminalen Ende des IE1-Proteins befindliche Chromatinbindedomäne deletiert wurde, zeigte bei FIX ein WT-ähnliches, bei TN jedoch ein leicht attenuiertes Wachstumsverhalten. Worauf diese unterschiedlichen Ergebnisse zurückzuführen sind, bleibt ungeklärt. Die Deletion der Chromatinbindedomäne zeigte auch schon in früheren Komplementationsstudien keinen Phänotyp (Reinhardt *et al.* 2005). Nicht auszuschließen ist allerdings, dass eine durch diese Domäne vermittelte Funktion des IE1-Proteins beim FIX-Stamm durch andere virale Proteine ersetzt werden kann, während diese Funktion beim TN-Stamm, möglicherweise bedingt durch die hohe Anzahl an Zellkulturpassagen, fehlt. Die genaue Bedeutung der konservierten Chromatinbindedomäne bleibt aber weiterhin unklar. Bekannt ist, dass die zwei  $\gamma$ -Herpesvirusproteine EBNA-1 (*Epstein-Barr virus nuclear antigen 1*) und LANA (*Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency-*

*associated nuclear antigen*) über ihre Chromatinbindung zur Aufrechterhaltung der Latenz und zur Replikationskontrolle des Virusgenoms beitragen (Marechal *et al.* 1999; Piolot *et al.* 2001). Allerdings besteht nur begrenzte Sequenzähnlichkeit mit der Chromatinbindedomäne von IE1. Außerdem bindet IE1 nicht wie EBNA-1 und LANA direkt an DNA (Marechal *et al.* 1999; Piolot *et al.* 2001) und bislang ist für IE1 keine Funktion während der Latenzphase beschrieben worden.

Obwohl in der Literatur schon von einigen HCMV-K450R-Viruspunktmutanten berichtet wurde (Lee *et al.* 2004; Nevels *et al.* 2004), konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass die durch die posttranslationale Modifikation mit SUMO-1 am Lysinrest K<sub>450</sub> einhergehenden Eigenschaften des IE1-Proteins nicht essenziell für die Ausbreitung der Infektion in Zellkultur sind (4.3.3). Die funktionellen Konsequenzen der SUMOylierung bei anderen zellulären oder viralen Proteinen sind äußerst divers und umfassen unter anderem eine Proteinstabilisierung (Desterro *et al.* 1998; Bies *et al.* 2002), eine Veränderung der subzellulären Lokalisation von Proteinen (Pichler *et al.* 2002; Verger *et al.* 2003) oder eine modifizierte Transaktivierungsaktivität (Gostissa *et al.* 1999; Rodriguez *et al.* 1999). Frühere Transfektionsstudien zeigten ebenfalls keinen nachweisbaren Funktionsverlust eines nicht mehr SUMOylierbaren IE1-Proteins im Vergleich zum WT (Xu *et al.* 2001; Spengler *et al.* 2002). Spekulativ bleibt, inwiefern sich der geringe, durch SUMO-1 modifizierte Anteil von IE1 auf in dieser Arbeit nicht untersuchte oder noch unbekannte Funktionen von IE1 auswirkt. Möglicherweise trägt die SUMOylierung von IE1 zur Proteinstabilität bei, da Lysinreste sowohl für die SUMOylierung als auch für die Ubiquitinierung, die letztlich zu proteosomalem Abbau führt, benötigt werden. Dies könnte durch den Vergleich der Halbwertszeiten der IE1-Proteine von WT und K450R-Mutante untersucht werden. Andererseits spielen posttranslationale Modifikationen für Protein-Protein-Interaktionen eine wichtige Rolle, was beispielsweise für die genregulatorische Funktion von IE1 wichtig sein könnte.

Bezüglich der Mutation C279A und der damit verbundenen Zerstörung eines postulierten Zinkfingermotivs innerhalb des IE1-Proteins war ebenfalls keinerlei negative Auswirkung auf das Replikationsverhalten festzustellen. Da für IE1 wie erwähnt keine direkte DNA-Bindung beschrieben ist, könnte dieses Motiv unter Umständen der Wechselwirkung mit anderen Proteinen dienen.

Warum die Veränderung um Lys<sub>192</sub> bei beiden verwendeten Virusstämmen zu einem deutlich eingeschränkten Wachstumsverhalten führte, ist unklar. Vermutlich wird ein zentraler Abschnitt mit noch unklarer Funktion strukturell gestört. Das ebenso in diesem Bereich lokalisierte Leucinzipper-artige Motiv um Leu<sub>174</sub> führte nach Veränderung in Form der Virusmutanten TN/FIX\_L174P zu den am stärksten ausgeprägten Replikationsdefekten. Der beobachtete Wachstumsnachteil der L174P-Mutanten könnte sich beispielsweise daraus ergeben, dass Wechselwirkungen mit Proteinen der Transkriptionsmaschinerie gestört werden. Schon frühere Transfektionsstudien wiesen auf erhebliche Funktionsverluste nach Mutation in diesem Bereich hin (Wilkinson *et al.* 1998; Muller *et al.* 1999; Xu *et al.* 2001).

Erstaunlicherweise trägt das IE1-Protein am C-terminalen Ende drei saure Domänen, deren genaue Funktion zwar noch nicht bekannt ist, die aber im Allgemeinen bei der Transaktivierung vieler regulatorischer Proteine beteiligt sind (Berk *et al.* 1998). Ein Sequenzvergleich des C-Terminus von HCMV-IE1 mit anderen CMV-Spezies offenbarte bei Schimpanse, Affe und Rhesusaffe auffallende Ähnlichkeiten (Reinhardt *et al.* 2005), was deren Bedeutung noch unterstreicht und uns zur Konstruktion von C-terminal deletierten IE1-Virusmutanten veranlasste. Alle drei sauren Domänen sowie die SUMOylierungsstelle um Lys<sub>450</sub> und die Chromatinbindedomäne sind bei der Virusmutante A373Stopp deletiert. Die Mutante E421Stopp unterscheidet sich davon nur durch die verbliebene erste saure Domäne. Dementsprechend verhielten sich beide Mutanten ähnlich und zeigten stark attenuiertes Wachstum im Vergleich zum WT. Bei TN zeigte die A373Stopp-Mutante sogar eine noch stärker verlangsamte Replikationsgeschwindigkeit als die E421Stopp-Mutante. Ob dies jedoch mit dem zusätzlichen Verlust der ersten sauren Domäne bei A373Stopp zusammenhängt, bleibt fraglich, denn bei FIX verhielten sich beide Mutanten annähernd gleich. Allgemein scheint der beobachtete Replikationsnachteil gegenüber dem WT-Virus allein auf den Verlust des sauren Bereiches zurückzugehen, weil die SUMOylierungsmutante (K450R) und die Mutante mit fehlender Chromatinbindedomäne (G476Stopp), wie oben beschrieben, annähernd WT-ähnliches Wachstum zeigten. Nicht ganz auszuschließen ist eine für den Replikationsdefekt der beiden Stoppmutanten (A373Stopp, E421Stopp) möglicherweise verantwortliche mRNA-Instabilität. Dies scheint aber eher unwahrscheinlich, da jeweils nur ein einziges Nukleotid verändert wurde. In vorherigen Komplementationsversuchen

konnte eine IE1<sub>1-420</sub>-Proteinmutante das Wachstum einer IE1-defizienten Virusmutante weniger effizient komplementieren als das IE1-Vollängenprotein (Reinhardt *et al.* 2005), was ebenfalls die Bedeutung der aziden Bereiche unterstreicht. Es ist davon auszugehen, dass alle beobachteten attenuierten Phänotypen nur der Expression veränderter IE1-Produkte zuzuschreiben sind. Es sollte aber noch überprüft werden, inwieweit sich die Replikationsdefekte durch ektopische Expression von IE1 *trans*-komplementieren lassen. Die erhobenen Daten unterstreichen, dass kein in dieser Arbeit veränderter Sequenzbereich des MIE-Transkripts für die Rekonstitution infektiöser Viren und deren produktive Vermehrung in humanen Zellen absolut erforderlich war. Darüber hinaus üben das vermutete Zinkfingermotiv um Cys<sub>279</sub>, die SUMOylierung an Lys<sub>450</sub> und vermutlich auch die Chromatinbindedomäne (Aminosäuren 476-491) des IE1-Proteins keine essenzielle Funktion hinsichtlich des effizienten Wachstumsverhaltens aus. Im Gegensatz dazu sind für eine ungehinderte Replikationsaktivität sowohl die aziden Abschnitte am C-Terminus (Aminosäuren 373-475) als auch der zentrale Bereich einschließlich Lys<sub>192</sub> und Leu<sub>174</sub> von großer Wichtigkeit. Dadurch stellen diese Abschnitte neue potenzielle Angriffsziele für antivirale Interventionsstrategien dar.

#### **5.2.2.2 Domänen für die Wechselwirkung des IE1-Proteins mit PML-Körpern**

Als eines der ersten Ereignisse nach Infektion kolokalisiert IE1 transient mit den interchromatinischen PML-Körpern und induziert kurz danach deren Auflösung, was zu einer diffusen nukleären Verteilung der sonst globulären Multiproteinkomplexe führt (Korioth *et al.* 1996; Ahn *et al.* 1997; Ahn *et al.* 1998; Wilkinson *et al.* 1998). Bis heute sind sowohl die genaue Relevanz der PML-Körper als auch die Folgen ihrer Auflösung für die Zellfunktion und den Infektionsverlauf unklar.

Bei HCMV verläuft dieser Auflösungsprozess im Gegensatz zu HSV-1 Proteasom-unabhängig (Xu *et al.* 2001; Lee *et al.* 2004), der genaue Mechanismus ist aber noch nicht bekannt. Kürzlich wurden Theorien veröffentlicht, wonach die Modifizierung des PML-Proteins durch SUMO-1 für die Bildung von PML-Körpern unverzichtbar ist. Gleichzeitig wurde berichtet, dass IE1 diese SUMOylierung direkt oder indirekt verhindern oder rückgängig machen könnte (Ishov *et al.* 1999; Muller *et al.* 1999; Zhong *et al.* 2000; Lallemand-Breitenbach *et al.* 2001). Möglicherweise kompetiert IE1 als SUMO-Substrat mit PML um die für eine SUMOylierung nötigen Komponenten. Ein solcher Mechanismus wurde beispielsweise für das ZTA-Protein bei EBV vorgeschlagen (Adamson *et al.* 2001).

Die Konstruktion von IE1-Virusmutanten könnte zu einem genaueren Verständnis der Wechselwirkung von IE1 mit PML-Körpern verhelfen.

Unlängst wurde für das IE19-Protein, einer IE1-Spleißvariante, der die Exon 4-kodierten Aminosäuren 86 bis 404 fehlen, eine stabile Assoziation mit den PML-Körpern gezeigt, die nicht zu einer Auflösung der Multiproteinkomplexe führt (Knoblach 2006). Gleiches gilt für die in dieser Arbeit konstruierte L174P-Virusmutante, bei der keinerlei nukleär diffuse PML- bzw. Sp100-Färbung mehr nachgewiesen werden konnte (4.3.4). Vorstellbar wäre, dass durch die L174P-Mutation eine postulierte ATP-Bindedomäne innerhalb des IE1-Proteins (AA 173-179) (Pajovic *et al.* 1997) zerstört wird, die für die potenzielle Kinaseaktivität von IE1 benötigt wird. Dies resultiert möglicherweise in einer weniger starken Phosphorylierung von PML. Eine zunehmende Phosphorylierung von PML -wie auch von c-jun und p53 (Muller *et al.* 2000)- die in HCMV-infizierten Zellen durch IE1 vermittelt werden könnte, führt nämlich zu einem abnehmenden SUMOylierungsgrad und damit zu einer verminderten Stabilität der PML-Körper (Everett *et al.* 1999). Schon in früheren Transfektionsstudien wurde gezeigt, dass ein IE1-Protein mit Mutation an Leu<sub>174</sub> die Fähigkeit zur De-SUMOylierung von PML verliert (Lee *et al.* 2004). Das ist in der Zusammenschau mit unseren Ergebnissen ein weiterer Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen De-SUMOylierung von PML und der Umverteilung der PML-Körper. Die Tatsache, dass die stabile Kolo-kalisation zwischen IE1-L174P und PML nur nach HCMV-Infektion und nicht nach Plasmid-Transfektion zu beobachten ist (Wilkinson *et al.* 1998; Muller *et al.* 1999; Lee *et al.* 2004) (Abb. 4.32), deutet darauf hin, dass dafür noch ein zusätzlicher, nur im Kontext einer Infektion vorhandener Faktor eine wesentliche Rolle spielt.

Eine nur noch unvollständige Fähigkeit zur Auflösung der PML-Körper wurde bei den Mutanten A373Stopp und E421Stopp beobachtet, was höchstwahrscheinlich mit dem Verlust der sauren Domänen zusammenhängt. Das Fehlen der SUMOylierungsstelle oder der Chromatinbindedomäne führte nämlich im Vergleich zum IE1-WT-Protein zu keinem entsprechenden Funktionsverlust (4.3.4). Jedoch war kein direkt proportionaler Zusammenhang zwischen der Größe der C-terminalen Deletion und dem Funktionsverlust feststellbar. In Übereinstimmung dazu resultierte in publizierten Kotransfektionsstudien die Expression eines trunkierten IE1<sub>1-420</sub>-Proteins in einer unvollständigen De-SUMOylierung von PML (Lee *et al.* 2004).

Obwohl die SUMOylierung vieler Proteine, einschließlich PML, interessanterweise für die Assoziation mit PML-Körpern notwendig ist, können unsere Ergebnisse diese Tatsache für das IE1-Protein nicht bestätigen (Abb. 4.31). Dessen SUMOylierung ist für die Bindung an PML-Körper und deren Umverteilung vollständig verzichtbar, was Ergebnisse früherer Transfektionsstudien bestätigt (Xu *et al.* 2001; Spengler *et al.* 2002; Lee *et al.* 2004).

Bezüglich der K192P-Mutation entstand ein uneinheitliches Bild. In einigen Zellen waren die PML-Körper vollständig aufgelöst, in anderen wiederum fand sich, trotz diffuser IE1-Färbung, nur ein punktförmiges PML-Verteilungsmuster im Zellkern (Abb. 4.31). Die Tatsache, dass Lys<sub>192</sub> sehr nahe am zentralen Bereich um Leu<sub>174</sub> liegt, könnte ursächlich dafür sein, dass eine Mutation an dieser Stelle zwar zu einer verminderten, aber nicht verlorenen Fähigkeit zur Auflösung von PML-Körpern führt. Dies stützt die Vermutung, dass dieser Bereich sehr sensibel auf genetische Modifikationen zu reagieren scheint.

Insgesamt deuten die erstmals im Kontext einer viralen Infektion in Zellkultur untersuchten Beobachtungen darauf hin, dass für die Wechselwirkung mit PML-Körpern im IE1-Protein mehrere genetisch trennbare, funktionelle „Domänen“ verantwortlich sind. Insbesondere sind die Bereiche, welche (direkt oder indirekt) die physikalische Interaktion mit PML-Körpern vermitteln, unabhängig von den für die Auflösung der nukleären Komplexe verantwortlichen Domänen. Alle in dieser Arbeit generierten Virusmutanten kolokalisierten mit PML-Körpern. Demnach sind dafür weder der C-Terminus (AA 373-491), einschließlich des für die SUMOylierung verantwortlichen Lys<sub>450</sub>, noch die Aminosäurereste Leu<sub>174</sub>, Lys<sub>192</sub> oder Cys<sub>279</sub> wesentlich. Die Bindung an PML allein ist hingegen nicht ausreichend für die Auflösung der PML-Körper, wie die Virusmutanten L174P, K192P, A373Stopp und E421Stopp implizieren. Essenziell dafür ist jedoch die Integrität von Leu<sub>174</sub>. Der Abschnitt innerhalb des zentralen Bereiches um Lys<sub>192</sub> sowie die C-terminalen sauren Domänen zwischen den Aminosäuren 373 und 476 scheinen dafür aber zumindest unterstützende Funktion zu haben. Man muss also von einem komplexeren Zusammenhang zwischen der Wechselwirkung von IE1 und PML-Körpern ausgehen, zu dem mehr als nur ein kontinuierlicher Bereich im viralen Protein beiträgt. Dies trifft offensichtlich auch für das HSV-1-Protein Vmw110 (ICP0) zu, wo sowohl eine RING-Fingerdomäne als auch eine C-terminale Region für die Interaktion mit PML-Körpern verantwortlich sind (Maul *et al.* 1994; Meredith *et al.* 1995).

### 5.2.2.3 Domänen für die transaktivierenden Eigenschaften des IE1-Proteins

IE1 moduliert als Schlüsselregulator der frühen Infektionsphase die virale und zelluläre Genexpression (Castillo *et al.* 2002), so kann es die IE2-vermittelte Transaktivierung verschiedener viraler E-Gene verstärken (Malone *et al.* 1990), autoreguliert den MIE-Promotor positiv (Cherrington *et al.* 1989; Sambucetti *et al.* 1989) und aktiviert zelluläre Promotoren, beispielsweise die der DNA-Polymerase  $\alpha$ , Dihydrofolatreduktase und von Prointerleukin1 $\beta$  (Hunninghake *et al.* 1992; Hayhurst *et al.* 1995; Margolis *et al.* 1995). Weiterhin interagiert es mit den Transkriptionsfaktoren SP-1 (Hayhurst *et al.* 1995), E2F1 (Margolis *et al.* 1995) und CTF-1 (Lukac *et al.* 1994). Für die Transaktivierung scheint vor allem das Exon 3 der MIE-Region von Bedeutung zu sein (Stenberg *et al.* 1990).

Mittels des Dual-Luciferase Reporter Assays wurde ermittelt, inwieweit die Fähigkeit der IE1-Punktmutanten zur Aktivierung verschiedener Promotoren im Vergleich zum IE1-WT-Protein noch vorhanden war (4.3.5).

Der Verlust der Chromatinbindedomäne hatte darauf, sowohl bei TN- als auch bei FIX-G476Stopp, einen mäßig negativen Effekt, was dafür spricht, dass die Interaktion mit zellulärem Chromatin zur Rolle von IE1 als Transaktivator beitragen könnte.

Bekanntlich sind auch saure Domänen häufig in die Transaktivierungsfunktion regulatorischer Proteine involviert, so bei VP16 von HSV (Cress *et al.* 1991) oder bei Gal4 von *Saccharomyces cerevisiae* (Gill *et al.* 1987). Zwar ist die Struktur der C-terminalen sauren Domänen von IE1 andersartig als bei klassischen Transaktivierungsdomänen, jedoch ergab sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Größe des fehlenden C-terminalen Abschnitts und einer daraus folgenden Verminderung der Transaktivierungsfähigkeit (Abb. 4.33). Für A373Stopp, bei der alle drei sauren Domänen fehlen, wurden sogar fast nur noch der Kontrolleprobe vergleichbare Werte ermittelt.

Unsere Erkenntnisse bestätigen frühere Beobachtungen, bei denen ein trunkiertes IE1<sub>1-420</sub>-Protein im Gegensatz zum IE1-Vollängenprotein die transkriptionelle Repressorfunktion von PML nicht mehr vollständig zu hemmen vermochte (Lee *et al.* 2004).

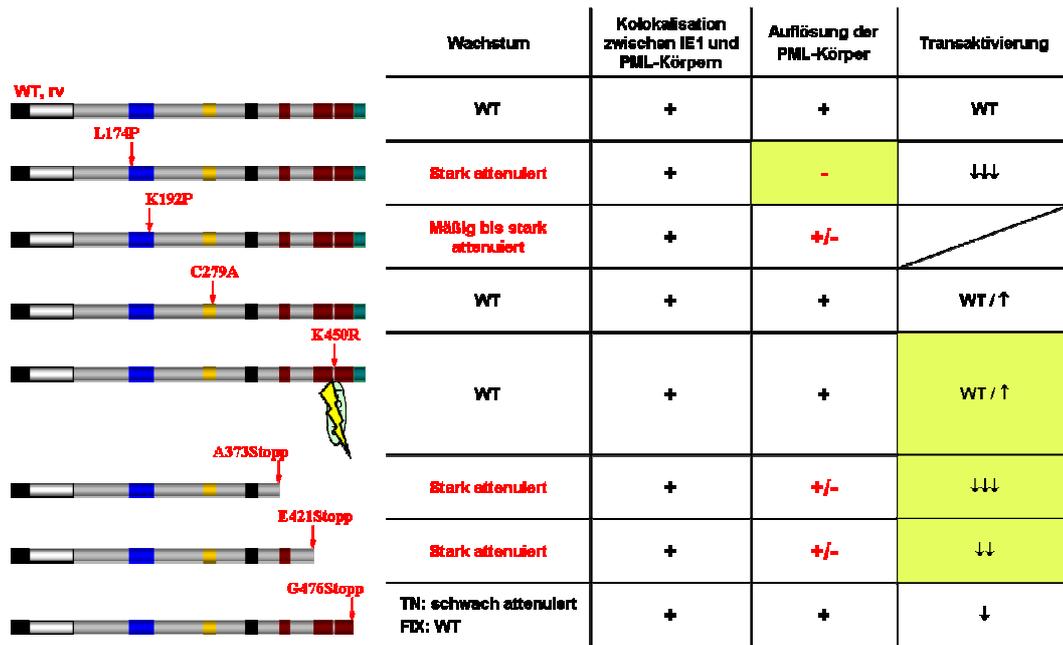
Wie schon in den letzten Versuchen, resultierte auch diesmal die Mutation L174P an einer vermuteten Leucinzipperregion in einer stark gestörten Funktion von IE1. Leucinzipper vermitteln bei zahlreichen genregulierenden Faktoren die Wechselwirkung von DNA mit Proteinen der Transkriptionsmaschinerie. Obwohl der in Frage kommende Sequenzabschnitt in IE1-72 kDa nicht zu den klassischen Leucinzippern gezählt werden

kann, scheint er unbestreitbar eine wichtige Rolle bezüglich der Transaktivatorfunktion von IE1 zu spielen.

Dagegen war die Transaktivierung durch IE1-C279A nicht beeinträchtigt, obgleich Zinkfinger als DNA-Bindemotive vieler bekannter Transkriptions-regulierender Proteine bekannt sind. Wie oben erwähnt, ist dieses Motiv vermutlich eher an Protein-Protein-Wechselwirkungen beteiligt.

Gleiches galt für die Proteinmutante K450R, die fehlende Bindung an SUMO-1 hat offensichtlich keine negativen Auswirkungen auf die Transaktivierungsfähigkeit von IE1. Da der Großteil der IE1-Proteine in nicht-SUMOylierter Form vorliegt, dürften die wichtigsten Funktionen von IE1 ohnehin eher SUMO-unabhängig verlaufen. Bei IE2-86 kDa (Hofmann *et al.* 2000; Ahn *et al.* 2001) und p53 (Rodriguez *et al.* 1999) wird durch SUMOylierung die Fähigkeit zur Transaktivierung verstärkt.

Auffällig ist, dass sämtliche Mutanten mit deutlichem Wachstumsnachteil gegenüber dem WT-Virus sowohl in ihrer Fähigkeit zur Auflösung der PML-Körper als auch zur Transaktivierung beeinträchtigt waren (L174P, K192P, A373Stopp, E421Stopp; Abb. 5.1). Am ausgeprägtesten stellte sich dies bei der L174P-Virusmutante beider Stämme dar. Sie wies den stärksten Replikationsdefekt auf, zeigte stark verminderte Transaktivierung und war als einzige Mutante nicht mehr fähig, die Zusammensetzung der PML-Körper zu verändern. Da PML ein Repressor von Zellteilung und Transkription ist (Mu *et al.* 1994; Liu *et al.* 1995) und IE1 vollständig die Unterdrückung der Transkription durch PML blockiert (Xu *et al.* 2001), könnte die Auflösung der PML-Körper zu einer effizienten lytischen Infektion und zu einer Steigerung der Transkription durch IE1 beitragen. Zumindest bei Infektionen mit niedriger MOI scheint die IE1-vermittelte Auflösung dieser Kerndomänen demnach mit der Funktion von IE1 als Transkriptionsregulator und letztlich mit einer erfolgreichen Ausbreitung der Infektion zu korrelieren. Die Beziehung zwischen der Auflösung der PML-Körper und den transaktivierenden Eigenschaften von IE1 lässt vermuten, dass PML-Körper zur Transkriptionsregulation beitragen.



**Abb. 5.1: Struktur der IE1-Proteine der verwendeten rekombinanten Virusmutanten und deren in dieser Arbeit explorierte Eigenschaften.** Rote Pfeile markieren die an diesen Stellen eingefügte Einzelnukleotidaustausche. + WT-ähnlich, - nicht nachweisbar, ↓-↓↓↓ leicht bis stark abgeschwächt im Vergleich zum WT, ↑ stärker als WT.

### 5.3 Ausblick

Auf der Grundlage der in der vorliegenden Arbeit erzielten neuen Ergebnisse zur Funktion von MIE-Genprodukten in HCMV-infizierten primären Fibroblasten bieten sich eine Reihe weiterführender wissenschaftlicher Versuche an. Mit Hilfe der konstruierten Virusmutanten wird es erstmals möglich sein, die Aktivitäten des IE1-Proteins im Kontext einer authentischen HCMV-Infektion humaner Zellen noch detaillierter zu überprüfen.

Durch die Herstellung eines Wirtszellsystems mit IE1-exprimierenden primären humanen Fibroblasten könnte künftig untersucht werden, inwieweit sich die Replikationsdefekte der konstruierten IE1-Virusmutanten durch ektopische Expression von IE1 *trans*-komplementieren lassen. Weitere Studien könnten sich die Auswirkung von spezifischen Veränderungen im IE1-Protein auf das virale Protein IE2 oder die Aktivierung Interferon-abhängiger zellulärer Gene zum Ziel machen.

Bezüglich der Wechselwirkung zwischen IE1 und PML-Körpern wäre eine Analyse des SUMOylierungsgrades von PML nach Infektion mit den verschiedenen HCMV-

Virusmutanten im Vergleich zum WT interessant. In diesem Zusammenhang könnte auch erforscht werden, welche IE1-Virusmutanten die PML-vermittelte Repression der basalen Transkription noch erfolgreich verhindern können. Zusätzlich könnte der putative transdominant negative Effekt des verkürzten Exon2/3-kodierten MIE-Proteins näher charakterisiert werden, indem das Protein erst mit einem geeigneten Expressionsplasmid in Zellen transfiziert wird, um im Anschluss daran eine Detektion mittels Western Blot-Verfahren zu erlauben. Außerdem wäre eine Wachstumsanalyse des WT-Virus in Exon2/3-Protein-exprimierenden Zellen aufschlussreich. Dies sollte weitere Rückschlüsse auf den molekularen Mechanismus zulassen, über den das kleine MIE-Protein die virale Replikation moduliert.

Langfristig gesehen könnten die Erkenntnisse aus diesen Experimenten zur Entwicklung innovativer Konzepte der antiviralen Prävention und Therapie beitragen.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

A	Alanin
AA	Aminosäure ( <i>amino acid</i> )
Abb.	Abbildung
AD	azide Domäne ( <i>acidic domain</i> )
AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>
Amp	Ampicillin
APL	Akute Promyelozyten-Leukämie
APS	Ammoniumpersulfat
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
bid	zweifach destilliert
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cystein
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Cam	Chloramphenicol
CBP	CREB-bindendes Protein
cDNA	komplementäre DNA ( <i>complementary DNA</i> )
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
CP	<i>crossing point</i>
CTD	Chromatinbindedomäne ( <i>chromatin tethering domain</i> )
Cys	Cystein
Da	Dalton
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )
DNase	Desoxyribonuklease
dATP	Desoxyadenosin-5'-Triphosphat
dCTP	Desoxycytosin-5'-Triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-Triphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA ( <i>double stranded desoxyribonucleic acid</i> )
dTTP	Desoxythymidin-5'-Triphosphat
E	Glutamat
E-Phase	frühe ( <i>early</i> )-Phase
EBNA-1	Epstein-Barr-Virus-assoziiertes nukleäres Antigen 1
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECACC	europäische Zellkultur-Sammlung ( <i>European Collection of Cell Cultures</i> )
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

EGFP	eukaryotisches grünes Fluoreszenzprotein ( <i>enhanced green fluorescent protein</i> )
<i>et al.</i>	und andere
EtBr	Ethidiumbromid
FBS	fötales Rinderserum ( <i>fetal bovine serum</i> )
FIX	HCMV-Stamm FIX ( <i>fusion inducing factor x</i> )
g	Erdbeschleunigung
G	Glycin
g/l	Gramm pro Liter
GFP	grünes Fluoreszenzprotein
h	Stunde ( <i>hour</i> )
H <sub>2</sub> O	Wasser
HAART	hochaktive antiretrovirale Therapie ( <i>highly active antiretroviral therapy</i> )
HCMV	humanes Zytomegalievirus ( <i>human cytomegalovirus</i> )
HHV	humanes Herpesvirus
HP1	Heterochromatin-Protein 1
HRP	Meerrettichperoxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
HSV	Herpes simplex Virus
ICP0	<i>infected cell protein 0</i>
IE	sehr früh ( <i>immediate-early</i> )
IE1	HCMV 72 kDa IE1-Protein
IE2	HCMV 86 kDa IE2-Protein
IE17,5	HCMV 17 kDa IE1-Protein
IE19	HCMV 19 kDa IE1-Protein
IE55	HCMV 55 kDa IE1-Protein
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosid
IRL	lange interne repetitive Sequenz ( <i>internal repeat long</i> )
IRS	kurze interne repetitive Sequenz ( <i>internal repeat short</i> )
K	Lysin
Kan	Kanamycin
kbp	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
l	Liter
L	Leucin
L-Phase	späte ( <i>late</i> )-Phase
LANA	Kaposisarkom-assoziiertes Latenz-assoziiertes nukleäres Antigen ( <i>Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency-associated nuclear antigen</i> )
LB	Luria-Bertani
Lys	Lysin
LZ	Leucinzipper
m	Meter
M	mol/l
MCMV	murines Zytomegalievirus
mg	Milligramm

Mg <sup>2+</sup>	zweifach positiv geladenes Magnesium
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MIE	<i>major immediate-early</i>
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure ( <i>messenger ribonucleic acid</i> )
μF	Mikrofarad
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
ND10	<i>Nuclear Domain 10</i>
ng	Nanogramm
NLS	Kernlokalisierungssignal ( <i>nuclear localization signal</i> )
nm	Nanometer
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OD	optische Dichte
p	phosphoryliert
P	Prolin
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung ( <i>phosphate-buffered saline</i> )
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
Pen	Penicillin
PFU	Plaque-bildende Einheit ( <i>plaque forming unit</i> )
PML	Promyelozytisches Leukämie-Protein ( <i>promyelocytic leukemia</i> )
POD	<i>PML Oncogenic Domains</i>
PolyA	Polyadenylierungsstelle
pp	Phosphoprotein
PRV	Pseudorabiesvirus
R	Arginin
RARα	Retinsäurerezeptor α ( <i>Retinoic Acid Receptor α</i> )
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minutes</i> )
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SCID	schwerer kombinierter Immundefekt ( <i>severe combined immunodeficiency</i> )
SDS	Sodiumdodecylsulfat
STAT2	<i>signal transducer and activator of transcription 2</i>
Strep	Streptomycin
SUMO	<i>small ubiquitin like modifier</i>
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA

---

TD	Transaktivierungsdomäne
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TK	Thymidinkinase
TN	HCMV-Stamm Towne
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRL	lange terminale repetitive Sequenz ( <i>terminal repeat long</i> )
TRS	kurze terminale repetitive Sequenz ( <i>terminal repeat short</i> )
usw.	und so weiter
U	Enzymatische Aktivität in $\mu\text{mol}/\text{min}$ ( <i>units</i> )
UL	lange nicht repetitive Sequenz ( <i>unique long</i> )
US	kurze nicht repetitive Sequenz ( <i>unique short</i> )
UV	ultraviolett
V	Volt
% (v/v)	Volumenprozent
vgl.	vergleiche
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
% (w/v)	Gewichtsprozent
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
YAC	<i>yeast artificial chromosome</i>
z. B.	zum Beispiel
ZF	Zinkfinger

## LITERATURVERZEICHNIS

- Adamson, A. L. and S. Kenney.** 2001. Epstein-barr virus immediate-early protein BZLF1 is SUMO-1 modified and disrupts promyelocytic leukemia bodies. *J Virol* **75**(5): 2388-99.
- Adler, H., M. Messerle and U. H. Koszinowski.** 2003. Cloning of herpesviral genomes as bacterial artificial chromosomes. *Rev Med Virol* **13**(2): 111-21.
- Adler, S. P.** 1995. Immunoprophylaxis against cytomegalovirus disease. *Scand J Infect Dis Suppl* **99**: 105-9.
- Ahn, J. H., E. J. Brignole, 3rd and G. S. Hayward.** 1998. Disruption of PML subnuclear domains by the acidic IE1 protein of human cytomegalovirus is mediated through interaction with PML and may modulate a RING finger-dependent cryptic transactivator function of PML. *Mol Cell Biol* **18**(8): 4899-913.
- Ahn, J. H. and G. S. Hayward.** 1997. The major immediate-early proteins IE1 and IE2 of human cytomegalovirus colocalize with and disrupt PML-associated nuclear bodies at very early times in infected permissive cells. *J Virol* **71**(6): 4599-613.
- Ahn, J. H., W. J. Jang and G. S. Hayward.** 1999. The human cytomegalovirus IE2 and UL112-113 proteins accumulate in viral DNA replication compartments that initiate from the periphery of promyelocytic leukemia protein-associated nuclear bodies (PODs or ND10). *J Virol* **73**(12): 10458-71.
- Ahn, J. H., Y. Xu, W. J. Jang, M. J. Matunis and G. S. Hayward.** 2001. Evaluation of interactions of human cytomegalovirus immediate-early IE2 regulatory protein with small ubiquitin-like modifiers and their conjugation enzyme Ubc9. *J Virol* **75**(8): 3859-72.
- Andrei, G., E. De Clercq and R. Snoeck.** 2009. Drug targets in cytomegalovirus infection. *Infect Disord Drug Targets* **9**(2): 201-22.
- Ascoli, C. A. and G. G. Maul.** 1991. Identification of a novel nuclear domain. *J Cell Biol* **112**(5): 785-95.
- Awasthi, S., J. A. Isler and J. C. Alwine.** 2004. Analysis of splice variants of the immediate-early 1 region of human cytomegalovirus. *J Virol* **78**(15): 8191-200.
- Baldick, C. J., Jr., A. Marchini, C. E. Patterson and T. Shenk.** 1997. Human cytomegalovirus tegument protein pp71 (ppUL82) enhances the infectivity of viral DNA and accelerates the infectious cycle. *J Virol* **71**(6): 4400-8.
- Baracchini, E., E. Glezer, K. Fish, R. M. Stenberg, J. A. Nelson, et al.** 1992. An isoform variant of the cytomegalovirus immediate-early auto repressor functions as a transcriptional activator. *Virology* **188**(2): 518-29.
- Bell, P., P. M. Lieberman and G. G. Maul.** 2000. Lytic but not latent replication of epstein-barr virus is associated with PML and induces sequential release of nuclear domain 10 proteins. *J Virol* **74**(24): 11800-10.
- Berk, A. J., T. G. Boyer, A. N. Kapanidis, R. H. Ebright, N. N. Kobayashi, et al.** 1998. Mechanisms of viral activators. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **63**: 243-52.
- Bies, J., J. Markus and L. Wolff.** 2002. Covalent attachment of the SUMO-1 protein to the negative regulatory domain of the c-Myb transcription factor modifies its stability and transactivation capacity. *J Biol Chem* **277**(11): 8999-9009.

- Biron, K. K., R. J. Harvey, S. C. Chamberlain, S. S. Good, A. A. Smith, 3rd, et al.** 2002. Potent and selective inhibition of human cytomegalovirus replication by 1263W94, a benzimidazole L-riboside with a unique mode of action. *Antimicrob Agents Chemother* **46**(8): 2365-72.
- Blackman, S. C., N. S. Lurain, D. P. Witte, A. H. Filipovich, P. Groen, et al.** 2004. Emergence and compartmentalization of fatal multi-drug-resistant cytomegalovirus infection in a patient with autosomal-recessive severe combined immune deficiency. *J Pediatr Hematol Oncol* **26**(9): 601-5.
- Boppana, S. B., R. F. Pass, W. J. Britt, S. Stagno and C. A. Alford.** 1992. Symptomatic congenital cytomegalovirus infection: neonatal morbidity and mortality. *Pediatr Infect Dis J* **11**(2): 93-9.
- 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**(10): 8320-9.
- Borst, E. M., G. Posfai, F. Pogoda and M. Messerle.** 2004. Mutagenesis of herpesvirus BACs by allele replacement. *Methods Mol Biol* **256**: 269-79.
- Bresnahan, W. A., I. Boldogh, E. A. Thompson and T. Albrecht.** 1996. Human cytomegalovirus inhibits cellular DNA synthesis and arrests productively infected cells in late G1. *Virology* **224**(1): 150-60.
- Brune, W., M. Messerle and U. H. Koszinowski.** 2000. Forward with BACs: new tools for herpesvirus genomics. *Trends Genet* **16**(6): 254-9.
- Carbone, R., M. Pearson, S. Minucci and P. G. Pelicci.** 2002. PML NBs associate with the hMre11 complex and p53 at sites of irradiation induced DNA damage. *Oncogene* **21**(11): 1633-40.
- Carvalho, T., J. S. Seeler, K. Ohman, P. Jordan, U. Pettersson, et al.** 1995. Targeting of adenovirus E1A and E4-ORF3 proteins to nuclear matrix-associated PML bodies. *J Cell Biol* **131**(1): 45-56.
- Castillo, J. P. and T. F. Kowalik.** 2002. Human cytomegalovirus immediate early proteins and cell growth control. *Gene* **290**(1-2): 19-34.
- Cha, T. A., E. Tom, G. W. Kemble, G. M. Duke, E. S. Mocarski, et al.** 1996. Human cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains. *J Virol* **70**(1): 78-83.
- Chang, C. P., C. L. Malone and M. F. Stinski.** 1989. A human cytomegalovirus early gene has three inducible promoters that are regulated differentially at various times after infection. *J Virol* **63**(1): 281-90.
- Chee, M. S., A. T. Bankier, S. Beck, R. Bohni, C. M. Brown, et al.** 1990. Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr Top Microbiol Immunol* **154**: 125-69.
- Chelbi-Alix, M. K. and H. de The.** 1999. Herpes virus induced proteasome-dependent degradation of the nuclear bodies-associated PML and Sp100 proteins. *Oncogene* **18**(4): 935-41.
- Cherrington, J. M. and E. S. Mocarski.** 1989. Human cytomegalovirus iel1 transactivates the alpha promoter-enhancer via an 18-base-pair repeat element. *J Virol* **63**(3): 1435-40.
- Chrisp, P. and S. P. Clissold.** 1991. Foscarnet. A review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use in immunocompromised patients with cytomegalovirus retinitis. *Drugs* **41**(1): 104-29.

- Cinatl, J., Jr., J. U. Vogel, R. Kotchetkov and H. Wilhelm Doerr.** 2004. Oncomodulatory signals by regulatory proteins encoded by human cytomegalovirus: a novel role for viral infection in tumor progression. *FEMS Microbiol Rev* **28**(1): 59-77.
- Cobbs, C. S., L. Harkins, M. Samanta, G. Y. Gillespie, S. Bharara, et al.** 2002. Human cytomegalovirus infection and expression in human malignant glioma. *Cancer Res* **62**(12): 3347-50.
- Compton, T., D. M. Nowlin and N. R. Cooper.** 1993. Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology* **193**(2): 834-41.
- Couchoud, C.** 2000. Cytomegalovirus prophylaxis with antiviral agents for solid organ transplantation. *Cochrane Database Syst Rev*(2): CD001320.
- Cress, W. D. and S. J. Triezenberg.** 1991. Critical structural elements of the VP16 transcriptional activation domain. *Science* **251**(4989): 87-90.
- Crumpacker, C. S.** 1996. Ganciclovir. *N Engl J Med* **335**(10): 721-9.
- Daniel, M. T., M. Koken, O. Romagne, S. Barbey, A. Bazarbachi, et al.** 1993. PML protein expression in hematopoietic and acute promyelocytic leukemia cells. *Blood* **82**(6): 1858-67.
- Davison, A. J., P. Akter, C. Cunningham, A. Dolan, C. Addison, et al.** 2003. Homology between the human cytomegalovirus RL11 gene family and human adenovirus E3 genes. *J Gen Virol* **84**(Pt 3): 657-63.
- de Jong, M. D., G. J. Galasso, B. Gazzard, P. D. Griffiths, D. A. Jabs, et al.** 1998. Summary of the II International Symposium on Cytomegalovirus. *Antiviral Res* **39**(3): 141-62.
- de The, H., M. Riviere and W. Bernhard.** 1960. [Examination by electron microscope of the VX2 tumor of the domestic rabbit derived from the Shope papilloma.]. *Bull Assoc Fr Etud Cancer* **47**: 570-84.
- 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**(14): 8245-50.
- DeLuca, N. A. and P. A. Schaffer.** 1985. Activation of immediate-early, early, and late promoters by temperature-sensitive and wild-type forms of herpes simplex virus type 1 protein ICP4. *Mol Cell Biol* **5**(8): 1997-2008.
- Desterro, J. M., M. S. Rodriguez and R. T. Hay.** 1998. SUMO-1 modification of I $\kappa$ B $\alpha$  inhibits NF- $\kappa$ B activation. *Mol Cell* **2**(2): 233-9.
- Doerr, H. W.** 1987. Cytomegalovirus infection in pregnancy. *J Virol Methods* **17**(1-2): 127-32.
- Donnenberg, M. S. and J. B. Kaper.** 1991. Construction of an eae deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive-selection suicide vector. *Infect Immun* **59**(12): 4310-7.
- Dyck, J. A., G. G. Maul, W. H. Miller, Jr., J. D. Chen, A. Kakizuka, et al.** 1994. A novel macromolecular structure is a target of the promyelocyte-retinoic acid receptor oncoprotein. *Cell* **76**(2): 333-43.
- Einsele, H., E. Roosnek, N. Rufer, C. Sinzger, S. Riegler, et al.** 2002. Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy. *Blood* **99**(11): 3916-22.

- Elkind, M. S., J. M. Luna, Y. P. Moon, B. Boden-Albala, K. M. Liu, et al.** 2010. Infectious burden and carotid plaque thickness: the northern Manhattan study. *Stroke* **41**(3): e117-22.
- Emery, V. C. and P. D. Griffiths.** 1990. Molecular biology of cytomegalovirus. *Int J Exp Pathol* **71**(6): 905-18.
- Endter, C., J. Kzhyshkowska, R. Stauber and T. Dobner.** 2001. SUMO-1 modification required for transformation by adenovirus type 5 early region 1B 55-kDa oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(20): 11312-7.
- Everett, R. D.** 2001. DNA viruses and viral proteins that interact with PML nuclear bodies. *Oncogene* **20**(49): 7266-73.
- Everett, R. D., P. Freemont, H. Saitoh, M. Dasso, A. Orr, et al.** 1998. The disruption of ND10 during herpes simplex virus infection correlates with the Vmw110- and proteasome-dependent loss of several PML isoforms. *J Virol* **72**(8): 6581-91.
- Everett, R. D., P. Lomonte, T. Sternsdorf, R. van Driel and A. Orr.** 1999. Cell cycle regulation of PML modification and ND10 composition. *J Cell Sci* **112** ( Pt **24**): 4581-8.
- Everett, R. D. and G. G. Maul.** 1994. HSV-1 IE protein Vmw110 causes redistribution of PML. *Embo J* **13**(21): 5062-9.
- Fowler, K. B., F. P. McCollister, A. J. Dahle, S. Boppana, W. J. Britt, et al.** 1997. Progressive and fluctuating sensorineural hearing loss in children with asymptomatic congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr* **130**(4): 624-30.
- Gawn, J. M. and R. F. Greaves.** 2002. Absence of IE1 p72 protein function during low-multiplicity infection by human cytomegalovirus results in a broad block to viral delayed-early gene expression. *J Virol* **76**(9): 4441-55.
- Ghazal, P., A. E. Visser, M. Gustems, R. Garcia, E. M. Borst, et al.** 2005. Elimination of ie1 significantly attenuates murine cytomegalovirus virulence but does not alter replicative capacity in cell culture. *J Virol* **79**(11): 7182-94.
- Gibson, W.** 1996. Structure and assembly of the virion. *Intervirology* **39**(5-6): 389-400.
- Gibson, W. and A. Irmiere.** 1984. Selection of particles and proteins for use as human cytomegalovirus subunit vaccines. *Birth Defects Orig Artic Ser* **20**(1): 305-24.
- Gilbert, M. J., S. R. Riddell, B. Plachter and P. D. Greenberg.** 1996. Cytomegalovirus selectively blocks antigen processing and presentation of its immediate-early gene product. *Nature* **383**(6602): 720-2.
- Gill, G. and M. Ptashne.** 1987. Mutants of GAL4 protein altered in an activation function. *Cell* **51**(1): 121-6.
- Gostissa, M., A. Hengstermann, V. Fogal, P. Sandy, S. E. Schwarz, et al.** 1999. Activation of p53 by conjugation to the ubiquitin-like protein SUMO-1. *Embo J* **18**(22): 6462-71.
- Grattan, M. T., C. E. Moreno-Cabral, V. A. Starnes, P. E. Oyer, E. B. Stinson, et al.** 1989. Cytomegalovirus infection is associated with cardiac allograft rejection and atherosclerosis. *Jama* **261**(24): 3561-6.
- Gravel, A., J. Gosselin and L. Flamand.** 2002. Human Herpesvirus 6 immediate-early 1 protein is a sumoylated nuclear phosphoprotein colocalizing with promyelocytic leukemia protein-associated nuclear bodies. *J Biol Chem* **277**(22): 19679-87.
- Greaves, R. F. and E. S. Mocarski.** 1998. Defective growth correlates with reduced accumulation of a viral DNA replication protein after low-multiplicity infection by a human cytomegalovirus ie1 mutant. *J Virol* **72**(1): 366-79.

- Hahn, G., H. Khan, F. Baldanti, U. H. Koszinowski, M. G. Revello, et al.** 2002. The human cytomegalovirus ribonucleotide reductase homolog UL45 is dispensable for growth in endothelial cells, as determined by a BAC-cloned clinical isolate of human cytomegalovirus with preserved wild-type characteristics. *J Virol* **76**(18): 9551-5.
- Hayajneh, W. A., A. M. Colberg-Poley, A. Skaletskaya, L. M. Bartle, M. M. Lesperance, et al.** 2001. The sequence and antiapoptotic functional domains of the human cytomegalovirus UL37 exon 1 immediate early protein are conserved in multiple primary strains. *Virology* **279**(1): 233-40.
- Hayhurst, G. P., L. A. Bryant, R. C. Caswell, S. M. Walker and J. H. Sinclair.** 1995. CCAAT box-dependent activation of the TATA-less human DNA polymerase alpha promoter by the human cytomegalovirus 72-kilodalton major immediate-early protein. *J Virol* **69**(1): 182-8.
- Heider, J. A., W. A. Bresnahan and T. E. Shenk.** 2002. Construction of a rationally designed human cytomegalovirus variant encoding a temperature-sensitive immediate-early 2 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(5): 3141-6.
- Hendrix, M. G., M. M. Salimans, C. P. van Boven and C. A. Bruggeman.** 1990. High prevalence of latently present cytomegalovirus in arterial walls of patients suffering from grade III atherosclerosis. *Am J Pathol* **136**(1): 23-8.
- Hinkle, A. M., J. A. Lee, K. A. Bell and S. Hsu.** 2000. A review of antiviral therapies in the treatment of cytomegalovirus. *Dermatol Ther.* **13**: 269-276.
- Hochstrasser, M.** 2000. Evolution and function of ubiquitin-like protein-conjugation systems. *Nat Cell Biol* **2**(8): E153-7.
- Hodson, E. M., C. A. Jones, G. F. Strippoli, A. C. Webster and J. C. Craig.** 2007. Immunoglobulins, vaccines or interferon for preventing cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *Cochrane Database Syst Rev*(2): CD005129.
- Hofmann, H., S. Floss and T. Stamminger.** 2000. Covalent modification of the transactivator protein IE2-p86 of human cytomegalovirus by conjugation to the ubiquitin-homologous proteins SUMO-1 and hSMT3b. *J Virol* **74**(6): 2510-24.
- Hofmann, H., H. Sindre and T. Stamminger.** 2002. Functional interaction between the pp71 protein of human cytomegalovirus and the PML-interacting protein human Daxx. *J Virol* **76**(11): 5769-83.
- Honess, R. W. and B. Roizman.** 1974. Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. *J Virol* **14**(1): 8-19.
- Huh, Y. H., Y. E. Kim, E. T. Kim, J. J. Park, M. J. Song, et al.** 2008. Binding STAT2 by the acidic domain of human cytomegalovirus IE1 promotes viral growth and is negatively regulated by SUMO. *J Virol* **82**(21): 10444-54.
- Hunninghake, G. W., B. G. Monks, L. J. Geist, M. M. Monick, M. A. Monroy, et al.** 1992. The functional importance of a cap site-proximal region of the human prointerleukin 1 beta gene is defined by viral protein trans-activation. *Mol Cell Biol* **12**(8): 3439-48.
- Ishov, A. M., A. G. Sotnikov, D. Negorev, O. V. Vladimirova, N. Neff, et al.** 1999. PML is critical for ND10 formation and recruits the PML-interacting protein daxx to this nuclear structure when modified by SUMO-1. *J Cell Biol* **147**(2): 221-34.
- Ishov, A. M., R. M. Stenberg and G. G. Maul.** 1997. Human cytomegalovirus immediate early interaction with host nuclear structures: definition of an immediate transcript environment. *J Cell Biol* **138**(1): 5-16.

- Ishov, A. M., O. V. Vladimirova and G. G. Maul.** 2004. Heterochromatin and ND10 are cell-cycle regulated and phosphorylation-dependent alternate nuclear sites of the transcription repressor Daxx and SWI/SNF protein ATRX. *J Cell Sci* **117**(Pt 17): 3807-20.
- Jacobs, J. P.** 1966. A simple medium for the propagation and maintenance of human diploid cell strains. *Nature* **210**(5031): 100-1.
- Jault, F. M., J. M. Jault, F. Ruchti, E. A. Fortunato, C. Clark, et al.** 1995. Cytomegalovirus infection induces high levels of cyclins, phosphorylated Rb, and p53, leading to cell cycle arrest. *J Virol* **69**(11): 6697-704.
- Jones, T. R., E. J. Wiertz, L. Sun, K. N. Fish, J. A. Nelson, et al.** 1996. Human cytomegalovirus US3 impairs transport and maturation of major histocompatibility complex class I heavy chains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(21): 11327-33.
- Kaps, J.** 2006. Diplomarbeit: Molekulare Untersuchungen zur Rolle des immediate early 1-Proteins bei der Interferonresistenz humaner Zytomegalieviren.
- Kerry, J. A., M. A. Priddy and R. M. Stenberg.** 1994. Identification of sequence elements in the human cytomegalovirus DNA polymerase gene promoter required for activation by viral gene products. *J Virol* **68**(7): 4167-76.
- Klug, A. and D. Rhodes.** 1987. Zinc fingers: a novel protein fold for nucleic acid recognition. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **52**: 473-82.
- Knoblach, T.** 2006. Diplomarbeit: Herstellung und molekulare Charakterisierung von humanen Zytomegalieviren mit spezifischen Mutationen im Immediate Early 1-Gen.
- Koriath, F., G. G. Maul, B. Plachter, T. Stamminger and J. Frey.** 1996. The nuclear domain 10 (ND10) is disrupted by the human cytomegalovirus gene product IE1. *Exp Cell Res* **229**(1): 155-8.
- Krauss, S., J. Kaps, N. Czech, C. Paulus and M. Nevels.** 2009. Physical requirements and functional consequences of complex formation between the cytomegalovirus IE1 protein and human STAT2. *J Virol* **83**(24): 12854-70.
- Krech, U.** 1973. Complement-fixing antibodies against cytomegalovirus in different parts of the world. *Bull World Health Organ* **49**(1): 103-6.
- Kumar, M. L. and G. A. Nankervis.** 1979. Cytomegalovirus infections. *South Med J* **72**(7): 854-61.
- 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): 373-89.
- Lafemina, R. L., M. C. Pizzorno, J. D. Mosca and G. S. Hayward.** 1989. Expression of the acidic nuclear immediate-early protein (IE1) of human cytomegalovirus in stable cell lines and its preferential association with metaphase chromosomes. *Virology* **172**(2): 584-600.
- Lallemand-Breitenbach, V., J. Zhu, F. Puvion, M. Koken, N. Honore, et al.** 2001. Role of promyelocytic leukemia (PML) sumolation in nuclear body formation, 11S proteasome recruitment, and As2O3-induced PML or PML/retinoic acid receptor alpha degradation. *J Exp Med* **193**(12): 1361-71.
- Landini, M. P., T. Lazzarotto, J. Xu, A. P. Geballe and E. S. Mocarski.** 2000. Humoral immune response to proteins of human cytomegalovirus latency-associated transcripts. *Biol Blood Marrow Transplant* **6**(2): 100-8.

- Landschulz, W. H., P. F. Johnson and S. L. McKnight.** 1988. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* **240**(4860): 1759-64.
- Lechner, M. S., G. E. Begg, D. W. Speicher and F. J. Rauscher, 3rd.** 2000. Molecular determinants for targeting heterochromatin protein 1-mediated gene silencing: direct chromoshadow domain-KAP-1 corepressor interaction is essential. *Mol Cell Biol* **20**(17): 6449-65.
- Lee, H. R. and J. H. Ahn.** 2004. Sumoylation of the major immediate-early IE2 protein of human cytomegalovirus Towne strain is not required for virus growth in cultured human fibroblasts. *J Gen Virol* **85**(Pt 8): 2149-54.
- Lee, H. R., D. J. Kim, J. M. Lee, C. Y. Choi, B. Y. Ahn, et al.** 2004. Ability of the human cytomegalovirus IE1 protein to modulate sumoylation of PML correlates with its functional activities in transcriptional regulation and infectivity in cultured fibroblast cells. *J Virol* **78**(12): 6527-42.
- Lee, J. M., H. J. Kang, H. R. Lee, C. Y. Choi, W. J. Jang, et al.** 2003. PIAS1 enhances SUMO-1 modification and the transactivation activity of the major immediate-early IE2 protein of human cytomegalovirus. *FEBS Lett* **555**(2): 322-8.
- Lehming, N., A. Le Saux, J. Schuller and M. Ptashne.** 1998. Chromatin components as part of a putative transcriptional repressing complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(13): 7322-6.
- Liu, B. and M. F. Stinski.** 1992. Human cytomegalovirus contains a tegument protein that enhances transcription from promoters with upstream ATF and AP-1 cis-acting elements. *J Virol* **66**(7): 4434-44.
- Liu, J. H., Z. M. Mu and K. S. Chang.** 1995. PML suppresses oncogenic transformation of NIH/3T3 cells by activated neu. *J Exp Med* **181**(6): 1965-73.
- Ljungman, P., P. Griffiths and C. Paya.** 2002. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clin Infect Dis* **34**(8): 1094-7.
- Lukac, D. M., J. R. Manuppello and J. C. Alwine.** 1994. Transcriptional activation by the human cytomegalovirus immediate-early proteins: requirements for simple promoter structures and interactions with multiple components of the transcription complex. *J Virol* **68**(8): 5184-93.
- 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**(3): 298-307.
- Macher, A. M., C. M. Reichert, S. E. Straus, D. L. Longo, J. Parrillo, et al.** 1983. Death in the AIDS patient: role of cytomegalovirus. *N Engl J Med* **309**(23): 1454.
- Malone, C. L., D. H. Vesole and M. F. Stinski.** 1990. Transactivation of a human cytomegalovirus early promoter by gene products from the immediate-early gene IE2 and augmentation by IE1: mutational analysis of the viral proteins. *J Virol* **64**(4): 1498-506.
- 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**(2): 477-84.
- Marchini, A., H. Liu and H. Zhu.** 2001. Human cytomegalovirus with IE-2 (UL122) deleted fails to express early lytic genes. *J Virol* **75**(4): 1870-8.
- Marechal, V., A. Dehee, R. Chikhi-Brachet, T. Pilot, M. Coppey-Moisan, et al.** 1999. Mapping EBNA-1 domains involved in binding to metaphase chromosomes. *J Virol* **73**(5): 4385-92.

- Margolis, M. J., S. Pajovic, E. L. Wong, M. Wade, R. Jupp, et al.** 1995. Interaction of the 72-kilodalton human cytomegalovirus IE1 gene product with E2F1 coincides with E2F-dependent activation of dihydrofolate reductase transcription. *J Virol* **69**(12): 7759-67.
- Marks, J. R. and D. H. Spector.** 1984. Fusion of the termini of the murine cytomegalovirus genome after infection. *J Virol* **52**(1): 24-8.
- Matthews, T. and R. Boehme.** 1988. Antiviral activity and mechanism of action of ganciclovir. *Rev Infect Dis* **10 Suppl 3**: S490-4.
- Maul, G. G.** 2008. Initiation of cytomegalovirus infection at ND10. *Curr Top Microbiol Immunol* **325**: 117-32.
- Maul, G. G. and R. D. Everett.** 1994. The nuclear location of PML, a cellular member of the C3HC4 zinc-binding domain protein family, is rearranged during herpes simplex virus infection by the C3HC4 viral protein ICP0. *J Gen Virol* **75 ( Pt 6)**: 1223-33.
- 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**(2): 1040-51.
- Meinel, S.** 2006. Praxissemesterarbeit: Molekulare Charakterisierung funktioneller Bereiche im IE72-Protein des humanen Zytomegalievirus.
- Melnick, J. L., E. Adam and M. E. DeBakey.** 1995. Cytomegalovirus and atherosclerosis. *Bioessays* **17**(10): 899-903.
- Meredith, M., A. Orr, M. Elliott and R. Everett.** 1995. Separation of sequence requirements for HSV-1 Vmw110 multimerisation and interaction with a 135-kDa cellular protein. *Virology* **209**(1): 174-87.
- 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**(26): 14759-63.
- Meyers, J. D.** 1989. Prevention of cytomegalovirus infection after marrow transplantation. *Rev Infect Dis* **11 Suppl 7**: S1691-705.
- Miller, J., A. D. McLachlan and A. Klug.** 1985. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *Embo J* **4**(6): 1609-14.
- Mocarski, E. S. and C. T. Courcelle.** 2001. Cytomegaloviruses and their replication. *Fields Virology*. D. M. Knipe, P. M. Howley and e. al. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins. **2**: 2629-2673.
- Mocarski, E. S., Courcelle, C. T. .** 2001. Cytomegaloviruses and their replication. *Fields Virology* 4th ed. H. D. M. Knipe, P. M., et al. (ed.). Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins. **vol. 2. : p. 2629-2673.**
- Mocarski, E. S., G. W. Kemble, J. M. Lyle and R. F. Greaves.** 1996. A deletion mutant in the human cytomegalovirus gene encoding IE1(491aa) is replication defective due to a failure in autoregulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(21): 11321-6.
- Mocarski Jr., E. S., T. Shenk and R. F. Pass.** 2007. Cytomegaloviruses. *Fields Virology*. D. M. Knipe, P. M. Howley and e. al. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. **2**: 2702-2758.
- Mu, Z. M., K. V. Chin, J. H. Liu, G. Lozano and K. S. Chang.** 1994. PML, a growth suppressor disrupted in acute promyelocytic leukemia. *Mol Cell Biol* **14**(10): 6858-67.
- Muller, S., M. Berger, F. Lehembre, J. S. Seeler, Y. Haupt, et al.** 2000. c-Jun and p53 activity is modulated by SUMO-1 modification. *J Biol Chem* **275**(18): 13321-9.

- Muller, S. and A. Dejean.** 1999. Viral immediate-early proteins abrogate the modification by SUMO-1 of PML and Sp100 proteins, correlating with nuclear body disruption. *J Virol* **73**(6): 5137-43.
- Muller, S., C. Hoegge, G. Pyrowolakis and S. Jentsch.** 2001. SUMO, ubiquitin's mysterious cousin. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(3): 202-10.
- Muller, S., M. J. Matunis and A. Dejean.** 1998. Conjugation with the ubiquitin-related modifier SUMO-1 regulates the partitioning of PML within the nucleus. *Embo J* **17**(1): 61-70.
- Murphy, E., D. Yu, J. Grimwood, J. Schmutz, M. Dickson, et al.** 2003. Coding potential of laboratory and clinical strains of human cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(25): 14976-81.
- Nevels, M., W. Brune and T. Shenk.** 2004. SUMOylation of the human cytomegalovirus 72-kilodalton IE1 protein facilitates expression of the 86-kilodalton IE2 protein and promotes viral replication. *J Virol* **78**(14): 7803-12.
- Nevels, M., C. Paulus, J. Schroerer and T. Shenk.** 2004. Presented at the Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie. Tübingen.
- Nevels, M., C. Paulus and T. Shenk.** 2004. Human cytomegalovirus immediate-early 1 protein facilitates viral replication by antagonizing histone deacetylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(49): 17234-9.
- Ojala, P. M., B. Sodeik, M. W. Ebersold, U. Kutay and A. Helenius.** 2000. Herpes simplex virus type 1 entry into host cells: reconstitution of capsid binding and uncoating at the nuclear pore complex in vitro. *Mol Cell Biol* **20**(13): 4922-31.
- Oram, R. J. and B. C. Herold.** 1998. Antiviral agents for herpes viruses. *Pediatr Infect Dis J* **17**(7): 652-3.
- Pajovic, S., E. L. Wong, A. R. Black and J. C. Azizkhan.** 1997. Identification of a viral kinase that phosphorylates specific E2Fs and pocket proteins. *Mol Cell Biol* **17**(11): 6459-64.
- Parkinson, J. and R. D. Everett.** 2000. Alphaherpesvirus proteins related to herpes simplex virus type 1 ICP0 affect cellular structures and proteins. *J Virol* **74**(21): 10006-17.
- Pass, R. F.** 2001. Cytomegaloviruses. *Fields Virology*. D. M. Knipe, P. M. Howley and e. a. (ed.). Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins. **2**: 2675-2705.
- Paulus, C., S. Krauss and M. Nevels.** 2006. A human cytomegalovirus antagonist of type I IFN-dependent signal transducer and activator of transcription signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(10): 3840-5.
- Penfold, M. E. and E. S. Mocarski.** 1997. Formation of cytomegalovirus DNA replication compartments defined by localization of viral proteins and DNA synthesis. *Virology* **239**(1): 46-61.
- Pfaffl, M. W.** 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**(9): e45.
- Pfuller, R. and W. Hammerschmidt.** 1996. Plasmid-like replicative intermediates of the Epstein-Barr virus lytic origin of DNA replication. *J Virol* **70**(6): 3423-31.
- Pichler, A. and F. Melchior.** 2002. Ubiquitin-related modifier SUMO1 and nucleocytoplasmic transport. *Traffic* **3**(6): 381-7.
- Piilot, T., M. Tramier, M. Coppey, J. C. Nicolas and V. Marechal.** 2001. Close but distinct regions of human herpesvirus 8 latency-associated nuclear antigen 1 are responsible for nuclear targeting and binding to human mitotic chromosomes. *J Virol* **75**(8): 3948-59.

- Plotkin, S. A.** 2001. Vaccination against cytomegalovirus. *Arch Virol Suppl*(17): 121-34.
- Plotkin, S. A., T. Furukawa, N. Zygraich and C. Huygelen.** 1975. Candidate cytomegalovirus strain for human vaccination. *Infect Immun* **12**(3): 521-7.
- 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**(1): 227-32.
- Prichard, M. N., M. E. Penfold, G. M. Duke, R. R. Spaete and G. W. Kemble.** 2001. A review of genetic differences between limited and extensively passaged human cytomegalovirus strains. *Rev Med Virol* **11**(3): 191-200.
- Quignon, F., F. De Bels, M. Koken, J. Feunteun, J. C. Ameisen, et al.** 1998. PML induces a novel caspase-independent death process. *Nat Genet* **20**(3): 259-65.
- Quinnan, G. V., Jr., M. Delery, A. H. Rook, W. R. Frederick, J. S. Epstein, et al.** 1984. Comparative virulence and immunogenicity of the Towne strain and a nonattenuated strain of cytomegalovirus. *Ann Intern Med* **101**(4): 478-83.
- Radsak, K., D. Schneider, E. Jost and K. H. Brucher.** 1989. Alteration of nuclear lamina protein in human fibroblasts infected with cytomegalovirus (HCMV). *Arch Virol* **105**(1-2): 103-12.
- Ramsay, M.** 1994. Yeast artificial chromosome cloning. *Mol Biotechnol* **1**(2): 181-201.
- Rangasamy, D., K. Woytek, S. A. Khan and V. G. Wilson.** 2000. SUMO-1 modification of bovine papillomavirus E1 protein is required for intranuclear accumulation. *J Biol Chem* **275**(48): 37999-8004.
- Reeves, M. B., P. A. MacAry, P. J. Lehner, J. G. Sissons and J. H. Sinclair.** 2005. Latency, chromatin remodeling, and reactivation of human cytomegalovirus in the dendritic cells of healthy carriers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(11): 4140-5.
- Reinhardt, J., G. B. Smith, C. T. Himmelheber, J. Azizkhan-Clifford and E. S. Mocarski.** 2005. The carboxyl-terminal region of human cytomegalovirus IE1491aa contains an acidic domain that plays a regulatory role and a chromatin-tethering domain that is dispensable during viral replication. *J Virol* **79**(1): 225-33.
- Revello, M. G., E. Percivalle, A. Di Matteo, F. Morini and G. Gerna.** 1992. Nuclear expression of the lower matrix protein of human cytomegalovirus in peripheral blood leukocytes of immunocompromised viraemic patients. *J Gen Virol* **73** ( Pt 2): 437-42.
- Riddell, S. R., K. S. Watanabe, J. M. Goodrich, C. R. Li, M. E. Agha, et al.** 1992. Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science* **257**(5067): 238-41.
- Ried, J. L. and A. Collmer.** 1987. An nptI-sacB-sacR cartridge for constructing directed, unmarked mutations in gram-negative bacteria by marker exchange- eviction mutagenesis. *Gene* **57**(2-3): 239-46.
- Rodriguez, M. S., J. M. Desterro, S. Lain, C. A. Midgley, D. P. Lane, et al.** 1999. SUMO-1 modification activates the transcriptional response of p53. *Embo J* **18**(22): 6455-61.
- Romanowski, M. J. and T. Shenk.** 1997. Characterization of the human cytomegalovirus *irs1* and *trs1* genes: a second immediate-early transcription unit within *irs1* whose product antagonizes transcriptional activation. *J Virol* **71**(2): 1485-96.
- Saeki, Y., C. Fraefel, T. Ichikawa, X. O. Breakefield and E. A. Chiocca.** 2001. Improved helper virus-free packaging system for HSV amplicon vectors using an ICP27-deleted, oversized HSV-1 DNA in a bacterial artificial chromosome. *Mol Ther* **3**(4): 591-601.

- Saeki, Y., T. Ichikawa, A. Saeki, E. A. Chiocca, K. Tobler, et al.** 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**(18): 2787-94.
- Sambrook, J. and D. W. Russell.** 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sambucetti, L. C., J. M. Cherrington, G. W. Wilkinson and E. S. Mocarski.** 1989. NF-kappa B activation of the cytomegalovirus enhancer is mediated by a viral transactivator and by T cell stimulation. *Embo J* **8**(13): 4251-8.
- Sanchez, V., C. L. Clark, J. Y. Yen, R. Dwarakanath and D. H. Spector.** 2002. Viable human cytomegalovirus recombinant virus with an internal deletion of the IE2 86 gene affects late stages of viral replication. *J Virol* **76**(6): 2973-89.
- Seeler, J. S., A. Marchio, D. Sitterlin, C. Transy and A. Dejean.** 1998. Interaction of SP100 with HP1 proteins: a link between the promyelocytic leukemia-associated nuclear bodies and the chromatin compartment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(13): 7316-21.
- Shen, Y., H. Zhu and T. Shenk.** 1997. Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins are mutagenic and mediate "hit-and-run" oncogenic transformation in cooperation with the adenovirus E1A proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(7): 3341-5.
- Shirakata, M., M. Terauchi, M. Ablikim, K. Imadome, K. Hirai, et al.** 2002. Novel immediate-early protein IE19 of human cytomegalovirus activates the origin recognition complex I promoter in a cooperative manner with IE72. *J Virol* **76**(7): 3158-67.
- Shizuya, H., B. Birren, U. J. Kim, V. Mancino, T. Slepak, et al.** 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**(18): 8794-7.
- Silva, M. C., Q. C. Yu, L. Enquist and T. Shenk.** 2003. Human cytomegalovirus UL99-encoded pp28 is required for the cytoplasmic envelopment of tegument-associated capsids. *J Virol* **77**(19): 10594-605.
- Sinzger, C. and G. Jahn.** 1996. Human cytomegalovirus cell tropism and pathogenesis. *Intervirology* **39**(5-6): 302-19.
- Skaletskaya, A., L. M. Bartle, T. Chittenden, A. L. McCormick, E. S. Mocarski, et al.** 2001. A cytomegalovirus-encoded inhibitor of apoptosis that suppresses caspase-8 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(14): 7829-34.
- Smith, B. N., B. W. Banfield, C. A. Smeraski, C. L. Wilcox, F. E. Dudek, et al.** 2000. Pseudorabies virus expressing enhanced green fluorescent protein: A tool for in vitro electrophysiological analysis of transsynaptically labeled neurons in identified central nervous system circuits. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(16): 9264-9.
- 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**(8): 6405-14.
- Smith, G. B. and E. S. Mocarski.** 2005. Contribution of GADD45 family members to cell death suppression by cellular Bcl-xL and cytomegalovirus vMIA. *J Virol* **79**(23): 14923-32.
- Smith, M. G.** 1956. Propagation in tissue cultures of a cytopathogenic virus from human salivary gland virus (SGV) disease. *Proc Soc Exp Biol Med* **92**(2): 424-30.

- Sodeik, B., M. W. Ebersold and A. Helenius.** 1997. Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J Cell Biol* **136**(5): 1007-21.
- Soderberg-Naucler, C., D. N. Streblow, K. N. Fish, J. Allan-Yorke, P. P. Smith, et al.** 2001. Reactivation of latent human cytomegalovirus in CD14(+) monocytes is differentiation dependent. *J Virol* **75**(16): 7543-54.
- Spaete, R. R., R. C. Gehrz and M. P. Landini.** 1994. Human cytomegalovirus structural proteins. *J Gen Virol* **75** ( Pt 12): 3287-308.
- 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**(20): 7213-7.
- Spector, D. H.** 1996. Activation and regulation of human cytomegalovirus early genes. *Intervirology* **39**(5-6): 361-77.
- Spengler, M. L., K. Kurapatwinski, A. R. Black and J. Azizkhan-Clifford.** 2002. SUMO-1 modification of human cytomegalovirus IE1/IE72. *J Virol* **76**(6): 2990-6.
- Stagno, S.** 1986. Cytomegalovirus infection: a pediatrician's perspective. *Curr Probl Pediatr* **16**(11): 629-67.
- Stagno, S., R. F. Pass, M. E. Dworsky and C. A. Alford, Jr.** 1982. Maternal cytomegalovirus infection and perinatal transmission. *Clin Obstet Gynecol* **25**(3): 563-76.
- Stasiak, P. C. and E. S. Mocarski.** 1992. Transactivation of the cytomegalovirus ICP36 gene promoter requires the alpha gene product TRS1 in addition to IE1 and IE2. *J Virol* **66**(2): 1050-8.
- Stavropoulos, T. A. and C. A. Strathdee.** 1998. An enhanced packaging system for helper-dependent herpes simplex virus vectors. *J Virol* **72**(9): 7137-43.
- Stenberg, R. M.** 1996. The human cytomegalovirus major immediate-early gene. *Intervirology* **39**(5-6): 343-9.
- Stenberg, R. M., J. Fortney, S. W. Barlow, B. P. Magrane, J. A. Nelson, et al.** 1990. Promoter-specific trans activation and repression by human cytomegalovirus immediate-early proteins involves common and unique protein domains. *J Virol* **64**(4): 1556-65.
- Stuurman, N., A. de Graaf, A. Floore, A. Josso, B. Humbel, et al.** 1992. A monoclonal antibody recognizing nuclear matrix-associated nuclear bodies. *J Cell Sci* **101** ( Pt 4): 773-84.
- Sullivan, V., C. L. Talarico, S. C. Stanat, M. Davis, D. M. Coen, et al.** 1992. A protein kinase homologue controls phosphorylation of ganciclovir in human cytomegalovirus-infected cells. *Nature* **359**(6390): 85.
- Tavalai, N., P. Papior, S. Rechter, M. Leis and T. Stamminger.** 2006. Evidence for a role of the cellular ND10 protein PML in mediating intrinsic immunity against human cytomegalovirus infections. *J Virol* **80**(16): 8006-18.
- Tooze, J., M. Hollinshead, B. Reis, K. Radsak and H. Kern.** 1993. Progeny vaccinia and human cytomegalovirus particles utilize early endosomal cisternae for their envelopes. *Eur J Cell Biol* **60**(1): 163-78.
- van Zijl, M., W. Quint, J. Briaire, T. de Rover, A. Gielkens, et al.** 1988. Regeneration of herpesviruses from molecularly cloned subgenomic fragments. *J Virol* **62**(6): 2191-5.
- Verger, A., J. Perdomo and M. Crossley.** 2003. Modification with SUMO. A role in transcriptional regulation. *EMBO Rep* **4**(2): 137-42.

- Wade, M., T. F. Kowalik, M. Mudryj, E. S. Huang and J. C. Azizkhan. 1992. E2F mediates dihydrofolate reductase promoter activation and multiprotein complex formation in human cytomegalovirus infection. *Mol Cell Biol* **12**(10): 4364-74.
- 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**(8): 7056-60.
- Walter, E. A., P. D. Greenberg, M. J. Gilbert, R. J. Finch, K. S. Watanabe, *et al.* 1995. Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N Engl J Med* **333**(16): 1038-44.
- Wang, W., C. E. Patterson, S. Yang and H. Zhu. 2004. Coupling generation of cytomegalovirus deletion mutants and amplification of viral BAC clones. *J Virol Methods* **121**(2): 137-43.
- Wang, Z. G., D. Ruggero, S. Ronchetti, S. Zhong, M. Gaboli, *et al.* 1998. PML is essential for multiple apoptotic pathways. *Nat Genet* **20**(3): 266-72.
- Warden, C., Q. Tang and H. Zhu. 2011. Herpesvirus BACs: past, present, and future. *J Biomed Biotechnol* **2011**: 124595.
- Weis, K., S. Rambaud, C. Lavau, J. Jansen, T. Carvalho, *et al.* 1994. Retinoic acid regulates aberrant nuclear localization of PML-RAR alpha in acute promyelocytic leukemia cells. *Cell* **76**(2): 345-56.
- Weller, T. H., J. B. Hanshaw and D. E. Scott. 1960. Serologic differentiation of viruses responsible for cytomegalic inclusion disease. *Virology* **12**: 130-2.
- White, K. L., B. Slobedman and E. S. Mocarski. 2000. Human cytomegalovirus latency-associated protein pORF94 is dispensable for productive and latent infection. *J Virol* **74**(19): 9333-7.
- Wiebusch, L. and C. Hagemeyer. 1999. Human cytomegalovirus 86-kilodalton IE2 protein blocks cell cycle progression in G(1). *J Virol* **73**(11): 9274-83.
- Wilkinson, G. W., C. Kelly, J. H. Sinclair and C. Rickards. 1998. Disruption of PML-associated nuclear bodies mediated by the human cytomegalovirus major immediate early gene product. *J Gen Virol* **79** ( Pt 5): 1233-45.
- Woodhall, D. L., L. A. Teague, G. W. Wilkinson, S. Efstathiou, and J. H. Sinclair. 2003. 28th International Herpesvirus Workshop, Madison, WI, USA.
- Xu, Y., J. H. Ahn, M. Cheng, C. M. apRhys, C. J. Chiou, *et al.* 2001. Proteasome-independent disruption of PML oncogenic domains (PODs), but not covalent modification by SUMO-1, is required for human cytomegalovirus immediate-early protein IE1 to inhibit PML-mediated transcriptional repression. *J Virol* **75**(22): 10683-95.
- Yeager, A. S., F. C. Grumet, E. B. Hafleigh, A. M. Arvin, J. S. Bradley, *et al.* 1981. Prevention of transfusion-acquired cytomegalovirus infections in newborn infants. *J Pediatr* **98**(2): 281-7.
- Yeh, E. T., L. Gong and T. Kamitani. 2000. Ubiquitin-like proteins: new wines in new bottles. *Gene* **248**(1-2): 1-14.
- Yilmaz, S., P. K. Koskinen, E. Kallio, C. A. Bruggeman, P. J. Hayry, *et al.* 1996. Cytomegalovirus infection-enhanced chronic kidney allograft rejection is linked with intercellular adhesion molecule-1 expression. *Kidney Int* **50**(2): 526-37.
- Zhong, S., S. Muller, S. Ronchetti, P. S. Freemont, A. Dejean, *et al.* 2000. Role of SUMO-1-modified PML in nuclear body formation. *Blood* **95**(9): 2748-52.

- Zhong, S., P. Salomoni and P. P. Pandolfi.** 2000. The transcriptional role of PML and the nuclear body. *Nat Cell Biol* **2**(5): E85-90.
- Zhu, H., Y. Shen and T. Shen.** 1995. Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins block apoptosis. *J Virol* **69**(12): 7960-70.

## **Danksagung**

Beim ehemaligen Leiter, Herrn Prof. Dr. Dr. Hans Wolf sowie beim jetzigen Leiter des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Herrn Prof. Dr. Dr. André Gessner, bedanke ich mich herzlich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums Regensburg.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Christina Paulus und Herrn PD Dr. Michael Nevels für die außergewöhnlich engagierte Betreuung dieser Arbeit in wissenschaftlicher und menschlicher Hinsicht und für die Erstellung des Erstgutachtens. Sie waren stets bemüht, mit sowohl kritischen als auch anerkennenden Anmerkungen die Leistung jedes Einzelnen zu würdigen und zu fördern. So wurde mir die Aneignung eines breiten Methodenspektrums ermöglicht. Viele Diskussionen und wissenschaftliche Seminare begleiteten den praktischen Laboralltag und trugen zu einer steten Wissensvermehrung bei.

Desweiteren danke ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die überaus freundschaftliche, lockere Arbeitsatmosphäre und die bereitwillige Unterstützung bei jeglichen Fragen oder Problemen. Insbesondere richtet sich meine Danksagung an Steffen Krauss, Ines Tschertner, Theresa Knoblach, Sandra Meinel, Nathalie Czech und Julia Kaps für ihre experimentelle Hilfe.

Ferner sei allen nicht namentlich genannten Kolleginnen und Kollegen des Instituts für die gute Kooperation in den vergangenen Jahren gedankt.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, Großeltern und Geschwistern, die mir durch ihren selbstlosen Beistand in allen Lebenslagen während meines Medizinstudiums zur Seite standen und deren Unterstützung auch im jetzigen Arbeitsleben unersetzlich ist.

Außerdem danke ich meinem Verlobten Roland für sein Verständnis und seine aufmunternden Worte, vor allem in der Abschlussphase dieser Arbeit.

# Lebenslauf

## Persönliche Angaben

Name	Hauer
Vornamen	<u>Eva-Maria</u> Margarete
Anschrift	Schronfeld 72, 91054 Erlangen
Telefon	0176/22722601
E-mail	Eva.Hauer@gmx.de
Geburtsdatum	06.11.1981
Geburtsort	Hirschau
Staatsangehörigkeit	deutsch
Konfession	römisch-katholisch
Familienstand	ledig
Eltern	Prof. Dr. Johann Hauer, Dipl. Physiker, geb. am 07.10.1952 Martha Hauer, geb. Auers, Lehrerin, geb. am 21.12.1953

## Schulbildung

09/1988 – 07/1992	Grund- und Teilhauptschule, Poppenricht
09/1992 – 05/2001	Dr.-Johanna-Decker-Gymnasium, Amberg

## Studium

10/2001 – 05/2008	Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg
06/2008	Erfolgreicher Abschluss des Medizinstudiums und Approbation als Ärztin

## Beruflicher Werdegang

seit 07/2008	Assistenzärztin in Weiterbildung zur Fachärztin für Neurologie an der Neurologischen Klinik des Universitätsklinikums Erlangen Leitung: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Stefan Schwab
--------------	--

Erlangen, 03.07.2011