
**CHARAKTERISIERUNG FUNKTIONELLER DOMÄNEN DES
GLYKOPROTEINS B DES
HUMANEN CYTOMEGALIEVIRUS**

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Biologie der
Philipps- Universität Marburg
vorgelegt von

Tanja Strive
aus Wickede/ Ruhr

Marburg/Lahn 2001

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Dezember 1997 bis Juli 2001 im Institut für Virologie, Fachbereich Medizin, der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Prof. Dr. K. Radsak durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps- Universität Marburg als Dissertation
am _____ angenommen.

Erstgutachter: Prof: Dr. W. Buckel

Zweitgutachter: Prof. Dr. K. Radsak

Tag der mündlichen Prüfung: 21. September 2001

INHALTSVERZEICHNIS

1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
2. ZUSAMMENFASSUNG	2
3. EINLEITUNG	4
3.1 TAXONOMIE	4
3.2 MEDIZINISCHE ASPEKTE DER HUMANEN CYTOMEGALIEVIRUS- INFektion	5
3.2.1 <i>Epidemiologie</i>	5
3.2.2 <i>Krankheitsverläufe</i>	6
3.2.3 <i>Therapeutische Ansätze</i>	7
3.3. MOLEKULARBIOLOGIE DES HCMV	7
3.3.1. <i>Genomstruktur</i>	7
3.3.2 <i>Virionstruktur</i>	9
3.3.3 <i>Viraler Infektionszyklus</i>	10
3.3.4 <i>Morphogenese des humanen Cytomegalievirus</i>	12
3.4 DAS GLYKOPROTEIN B (GB) DES HUMANEN CYTOMEGALIEVIRUS	13
3.4.1 <i>Struktur, Reifung und Transport des Glykoproteins B</i>	14
3.4.2 <i>Lokalisation des Glykoproteins B in der inneren Kernmembran</i>	16
3.4.3 <i>Die Hydrophobe Domäne 1</i>	17
3.4.4 <i>Die proteolytische Spaltung des Glykoproteins B</i>	17
3.5 VIRUSMUTANTEN DES HUMANEN CYTOMEGALIEVIRUS	18
3.5.1 <i>Herstellung von Virusmutanten durch Insertionsmutagenese</i>	18
3.5.2 <i>Bacterial Artificial Chromosomes (BACs)</i>	19
3.5.3 <i>Komplementierende Zellsysteme</i>	21
4. ZIELSETZUNG DER ARBEIT	23
5. MATERIAL	24
5.1 GERÄTE	24
5.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN	24
5.3 CHEMIKALIEN UND BIOCHEMIKALIEN	25
5.4 DETERGENTIEN	27

5.5 ENZYME	27
5.6 ANTIBIOTIKA	27
5.7 KITS	28
5.8 KULTURMEDIENGRUNDSTOFFE	28
5.9 ANTIKÖRPER	29
5.10 MEDIEN ZUR ANZÜCHTUNG VON BAKTERIEN	30
5.11 PUFFER	31
5.12 ZELLEN	32
5.12.1 Primäre humane Lungenfibroblasten (MRC5)	32
5.12.2 Primäre humane Hautfibroblasten (HF)	32
5.12.3 Cos7- Zellen	32
5.13 VIRUSSTÄMME	32
5.14 BAKTERIENSTÄMME	33
5.15 PLASMIDE, COSMIDE UND BACs	33
5.16 OLIGONUKLEOTIDE	35
6. METHODEN	38
6.1 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	38
6.1.1 Isolierung von Plasmid- DNA	38
6.1.2 Isolierung von BAC- DNA	38
6.1.3 Quantifizierung von Nukleinsäuren	39
6.1.4 Restriktion von Nukleinsäuren	39
6.1.5 Agarosegelelektrophorese	40
6.1.6 Elution von DNA aus Agarosegelen	40
6.1.7 Dephosphorylierung linearer DNA- Fragmente	40
6.1.8 Auffüllreaktion überhängender 5' Enden	41
6.1.9 Ligation von DNA- Fragmenten	41
6.1.10 Herstellung elektrokompeter <i>E. coli</i>	41
6.1.11 Transformation elektrokompeter Bakterien.	42
6.1.12 Polymerasekettenreaktion (PCR)	42
6.1.13 Reinigung von PCR- Produkten	43
6.1.14 Ortsgerichtete <i>in vitro</i> Mutagenese von Plasmiden	43
6.1.15 Mutagenese durch rekombinante PCR	44
6.1.16 DNA- Sequenzierung	45
6.1.17 BAC Mutagenese mit linearen Fragmenten	47

6.1.18 <i>Zwei- Schritt- Rekombinationsmutagenese im BAC- Plasmid</i>	49
6.2 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	52
6.2.1 <i>Kultivierung von humanen Fibroblasten und COS7- Zellen</i>	52
6.2.3 <i>Transiente Transfektion von COS7- Zellen</i>	53
6.2.4 <i>Transfektion von BAC- DNA</i>	53
6.2.5 <i>Cotransfektion von BAC- DNA und Expressionsplasmiden</i>	54
6.2.6 <i>Virusanzüchtung</i>	55
6.2.7 <i>Virusankonzentrierung</i>	56
6.2.8 <i>HCMV- Wachstumskurven</i>	56
6.2.9 <i>Virustitration (Plaqueassay)</i>	57
6.2.10 <i>Zellfraktionierung</i>	57
6.3 IMMUNOLOGISCHE UND PROTEINCHEMISCHE METHODEN	59
6.3.1 <i>Fixierung und indirekte Immunfluoreszenz von Zellen und isolierten Zellkernen, DAPI- Färbung</i>	59
6.3.2 <i>Oberflächenimmunfluoreszenz</i>	62
6.3.3 <i>SDS- Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS- PAGE)</i>	62
6.3.4 <i>Immunoblot</i>	64
6.3.5 <i>Endoglykosidasebehandlung</i>	66
6.3.6 <i>Elektronenoptische Untersuchungen</i>	66
7. ERGEBNISSE	67
7.1 ETABLIERUNG EINES ASSAYS ZUR EINGRENZUNG ESSENTIELLER UND NICHTESSENTIELLER DOMÄNEN DES HCMV- gB	67
7.1.1 <i>Herstellung des Rekombinationsplasmides bac2_3frt</i>	67
7.1.2 <i>Herstellung eines replikationsdefizienten HCMV- BACs (BACDgB)</i>	69
7.1.3 <i>Phänotypische Komplementation durch transient exprimiertes authentisches gB- Protein</i>	72
7.1.4 <i>Konstruktion und Überprüfung der Expressionsplasmide pRC/CMVSigDelgB und pCR/CMVDFur</i>	75
7.1.5 <i>Identifizierung essentieller und nichtessentieller Domänen des gB- Proteins im „Ein- Zyklus- Replikations- Komplementations- Assay“</i>	78
7.2 HERSTELLUNG DER VIRUSMUTANTEN HCMV Δ MHD1, HCMV Δ FUR UND HCMVsINM	81
7.2.1 <i>Herstellung des Ausgangs- BAC- Plasmids BACgB-L</i>	82

7.2.2 Klonierung der Transferkonstrukte	83
7.2.3 Herstellung der Virusmutanten <i>BACDMhdi</i> , <i>BACDFur</i> und <i>BACsINM</i>	86
7.2.4 Überprüfung der Wachstumsfähigkeit der Virusmutanten nach Transfektion von <i>BACDFur</i> , <i>BACDMhdi</i> und <i>BACsINM</i>	88
7.3 CHARAKTERISIERUNG DER VIRUSMUTANTEN <i>HCMVΔFUR</i> UND <i>HCMVsINM</i>	89
7.3.1 Nachweis der <i>gB</i> - Mutationen in der Virion- DNA	89
7.3.2 Nachweis des furinresistenten <i>gB</i> - Proteins in <i>HCMVDFur</i> infizierten Zellen	90
7.3.3 Nachweis des <i>gB</i> - Proteins in <i>HCMVsINM</i> infizierten Zellen	91
7.3.4 Glykosylierung des <i>gB</i> - Proteins der Mutanten <i>HCMVDFur</i> und <i>HVMVsINM</i>	92
7.3.5 Wachstumskinetiken der Virusmutanten <i>HVMCDFur</i> und <i>HCMVsINM</i>	94
7.3.6 Expression und subzelluläre Lokalisation des <i>gB</i> - Proteins in <i>HCMVDFur</i> - und <i>HCMVsINM</i> - infizierten Zellen	95
7.3.7 Oberflächenexpression des <i>gB</i> in <i>HCMVDFur</i> und <i>HCMVsINM</i>	97
7.3.8 Lokalisation des <i>gB</i> - Proteins aus <i>HCMVsINM</i> in der inneren Kernmembran infizierter Zellen	99
7.3.9 Ultrastrukturelle Untersuchungen <i>HCMVsINM</i> - infizierter Zellkulturen	100
8. DISKUSSION	102
8.1 KOMPLEMENTATION DER <i>HCMVΔGB</i> - MUTANTE DURCH TRANSIENT EXPRIMIERTES <i>GB</i> - PROTEIN	102
8.1.1 Essentielle/ nichtessentielle Domänen des <i>HCMV</i> - <i>gB</i> für die Replikation in Zellkultur.	104
8.1.2 Bestätigung der Funktion der eingegrenzten <i>gB</i> - Domänen mittels rekombinanter Viren	105
8.2 DIE VIRUSMUTANTE <i>HCMVΔFUR</i> : DIE FURINSPALTUNG	107
8.2.1 Die Furinspaltung der <i>gB</i> - Homologen innerhalb der Familie der Herpesviren	107
8.2.2 Die Rolle der proteolytischen Spaltung bei Fusionsprozessen	110

8.2.3 Mögliche Bedeutung der proteolytischen Prozessierung von HCMV-gB	111
8.3 DIE VIRUSMUTANTE HCMVSINM: DAS LOKALISATIONSSIGNAL FÜR DIE INNERE KERNMEMBRAN	112
8.3.1 Das Aminosäuresignal DRLRHR ist in infizierten Zellen nicht relevant für die Lokalisation des gB in der inneren Kernmembran	112
8.3.2 Die Veränderung des Aminosäuresignals DRLRHR bewirkt eine Attenuierung der Virusmutante	113
9. LITERATURVERZEICHNIS	117
10. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	126
DANKSAGUNG	127
ERKLÄRUNG	128

1. Abkürzungsverzeichnis

BGH	bovines Wachstumshormon
CD8	Plasmamembranprotein von cytotoxischen Lymphozyten
Δ	Deletion
FRT	FLP- Recombinase- Erkennungssequenz
λ cos	Verpackungssignal des Bakteriophagen λ - Genoms
mab	monoklonaler Antikörper
m.o.i.	Multiplizität der Infektion
pA	eukaryontisches Polyadenylierungssignal
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Ori _{ts}	temperatursensitiver Replikationsursprung
SV40	Simian Virus 40
TEMED	N,N,N', N'-Tetramethylethyldiamin

2. Zusammenfassung

Das humane Cytomegalievirus (HCMV) gehört zur β - Subfamilie der Herpesviren. Es ist gekennzeichnet durch eine strikte Spezies- und Zelltyp-Spezifität, einen langsamen Replikationszyklus und besitzt darüber hinaus das grösste bekannte DNA- Genom humanpathogener Viren.

Das Glykoprotein B (gB) des HCMV ist innerhalb der Familie der Herpesviren hoch konserviert und übernimmt vermutlich essentielle Funktionen beim Eintritt des Virus in die Zelle, der Ausbreitung der Viren sowie der Fusion infizierter Zellen miteinander.

Die funktionelle Analyse von viralen Proteinen erfolgt in der Regel durch die Herstellung und Charakterisierung von Virusmutanten.

Eine solche Konstruktion von HCMV- Mutanten ist durch die Klonierung der Gesamt- Virus- DNA (240 kbp) als „künstliches Bakterienchromosom“ (Bacterial Artificial Chromosome, BAC) möglich, was eine gezielte genetische Manipulation des Virusgenoms in Bakterien erlaubt.

Cytomegalieviren mit Mutationen in essentiellen Proteinen sind bislang bislang nicht beschrieben worden. Grund hierfür ist, dass kein Zellsystem existiert, mit dem es möglich ist, den Effekt einer letalen Mutation in HCMV durch phänotypische Komplementation aufzuheben.

In der vorliegenden Arbeit wird die Entwicklung eines Testsystems beschrieben, mit der dieses experimentelle Hindernis umgangen werden kann. Dieser sogenannte „Ein- Zyklus- Replikations- Komplementations- Assay“ beruht auf der Beobachtung, dass plasmidgestütztes, transient exprimiertes gB in der Lage ist, eine Virusmutante mit einem letalen Defekt in gB phänotypisch zu komplementieren. Die letale Mutation wurde durch die Insertion des *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) in die codierende Region des gB auf BAC- Ebene erreicht. Das so entstandene replikationsdefiziente $BAC\Delta gB$ wurde zusammen mit gB- Expressionsplasmiden in eukaryontische Zellen transfiziert, in denen die transiente Expression des plasmidcodierten authentischen gB zu einer phänotypischen Komplementation führte und *einen* Zyklus der Virusreplikation zuließ. Die abortive Infektion der umliegenden Zellen durch die freigesetzten Tochtervirionen führte durch die Insertion des

Fluoreszenzmarkers EGFP zur Bildung von grün fluoreszierenden Miniplaques. In diesen Assay wurden gB- Expressionsplasmide mit verschiedenen definierten Mutationen eingesetzt und hinsichtlich ihrer Fähigkeit untersucht, das BAC Δ gB zu komplementieren. Auf diesem Wege konnten definierte Bereiche des gB- Moleküls im Hinblick auf ihre Notwendigkeit für die Replikation in Zellkultur eingegrenzt werden. Essentiell waren das Signalpeptid des Moleküls, der Membrananker, eine hydrophobe, vermutlich fusionsrelevante Domäne (Mhdi) sowie ein Abschnitt im cytosolischen Anteil des Moleküls. Als nichtessentiell erwiesen sich die carboxyterminalen 51 Aminosäuren, welche sowohl die einzige Phosphorylierungsstelle des Moleküls als auch das Signalmotiv für die Lokalisation des gB in der inneren Kernmembran umfassen, sowie das Spaltmotiv des Proteins für die zelluläre Protease Furin.

Um die Ergebnisse des Assays zu verifizieren, wurden drei der gB- Mutationen durch Herstellung von Virusmutanten mittels BAC- Mutagenese überprüft. Als Beispiel für einen essentiellen Bereich wurde die Hydrophobe Domäne I (Mhdi) deletiert, als Beispiele für nichtessentielle Domänen wurden das Signal für die Lokalisation des gB in der inneren Kernmembran sowie die zerstörte Spaltstelle für Furin ausgewählt. Die so hergestellten Virusmutanten zeigten nach Transfektion in humane Fibroblastenzellen das erwartete Verhalten: Nur die Viren mit den Mutationen im Lokalisationssignal für die innere Kernmembran und der zerstörten Furinspaltstelle erwiesen sich als replikationsfähig.

Bei der anschließenden Charakterisierung der Virusmutanten zeigte sich, dass das Ausbleiben der gB Spaltung überraschenderweise keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten zeigte. Die Virusmutante mit dem substituierten Signal für die Lokalisation in der inneren Kernmembran hingegen zeigte einen leicht attenuierten Phänotyp.

In der vorliegenden Arbeit werden erstmals HCMV- Mutanten mit gezielten Mutationen in einem essentiellen Gen beschrieben.

3. Einleitung

3.1 Taxonomie

Das humane Cytomegalievirus (HCMV) gehört zur Familie der β -Herpesviren (Roizman *et al.*, 1981, Smith, 1956). Diese Virusfamilie umfasst mehr als 100 beschriebene Spezies, davon acht humanpathogene (Tab. 1). Die einzelnen Vertreter teilen eine Reihe von charakteristischen biologischen Eigenschaften:

Alle Herpesviren besitzen ein komplexes doppelsträngiges DNA- Genom und ein breites Spektrum an Enzymen, die am Nukleinsäuremetabolismus, der DNA- Replikation und der Proteinprozessierung beteiligt sind (Britt & Alford, 1996). Alle Herpesviren weisen die gleiche Architektur auf: sie bestehen aus einem ikosaedrischen Nukleokapsid, welches die DNA enthält, einer Matrixschicht und einer Lipiddoppelmembran, in welche die viralen Glykoproteine inseriert sind. Die Replikation der DNA und der Zusammenbau der Kapside erfolgt im Zellkern. Die Bildung von Tochtervirionen führt zur Zerstörung der infizierten Zelle. Ausserdem sind alle Herpesviren in der Lage, nach der Primärinfektion latent im Wirt zu persistieren.

Unterschiedliche Eigenschaften der einzelnen Herpesviren bezüglich der Dauer ihres Replikationszyklus, der speziellen Zytopathie und des Ortes ihrer Viruspersistenz haben zu einer Unterteilung der Herpesviren in drei Unterfamilien geführt (Tab.1).

Die α - Herpesviren sind durch ein breites Wirtsspektrum und einen kurzen Replikationszyklus gekennzeichnet. Diese Viren, deren bekanntester Vertreter das Herpes Simplex Virus ist, persistieren in sensorischen Ganglien des Wirtes.

Die β - Herpesviren, zu denen das HCMV gehört, zeichnen sich durch eine strikte Spezies- und Zelltypspezifität sowie einen langsamen Replikationszyklus aus. Sie können in verschiedenen Organen, wie z.B. der Leber, der Niere und lymphoretikulären Zellen persistieren. Die

Vergrößerung der infizierten Zellen ist verantwortlich für die Namensgebung (Zytomegalie).

Die Familie der γ -Herpesviren zeigt eine ausgeprägte Gewebsspezifität, sie infizieren vorwiegend B- und T- Lymphozyten und persistieren auch in lymphoiden Geweben. Viren dieser Subfamilie, zu denen das Epstein Barr Virus und das Kaposi- Sarkoma assoziierte Virus gehören, haben zudem onkogene Eigenschaften.

Tabelle 1: Klassifizierung der humanpathogenen Herpesviren (Roizman *et al.*, 1992).

<i>Subfamilie</i>	<i>Art</i>	<i>Ab- kürzung</i>	<i>Literatur</i>
<i>a- Herpesvirinae</i>	Herpes- Simplex Virus 1	HSV 1	(Gruter, 1924)
	Herpes- Simplex Virus 2	HSV 2	(Schneeweis, 1962)
	Varizella- Zoster Virus	VZV	(Dumas <i>et al.</i> , 1981)
<i>b- Herpesvirinae</i>	Humanes Cytomegalievirus	HCMV	(Smith, 1956)
	Humanes Herpesvirus 6	HHV 6	(Lindquester & Pellett, 1991)
	Humanes Herpesvirus 7	HHV 7	(Frenkel <i>et al.</i> , 1990)
<i>g- Herpesvirinae</i>	Epstein- Barr Virus	EBV	(Epstein <i>et al.</i> , 1965)
	Humanes Herpesvirus 8	HHV 8	(Chang <i>et al.</i> , 1994)

3.2 Medizinische Aspekte der Humanen Cytomegalievirus- Infektion

3.2.1 Epidemiologie

Der Mensch ist das einzige Reservoir des HCMV. Das Virus ist ubiquitär verbreitet, der Grad der Durchseuchung hängt jedoch vom sozio-ökonomischen und damit verbundenen Hygienestandard ab (Britt & Alford, 1996, Krech, 1973, Kumar & Nankervis, 1979). So liegt die Durchseuchungsrate in den westlichen Ländern in der Gruppe der 20 jährigen bei 20% und in der Gruppe der über 40 jährigen bei 50 – 80%. In

den sogenannten Entwicklungsländern lässt sich jedoch teilweise schon bei Kindern eine Durchseuchungsrate von 100% feststellen (Britt & Alford, 1996). Das Virus wird über Körperflüssigkeiten bei engem Kontakt oder durch Bluttransfusionen und Transplantationen übertragen (Britt & Alford, 1996, Doerr, 1987). Nach der Primärinfektion persistiert es lebenslang im Organismus.

3.2.2 Krankheitsverläufe

Ausschlaggebend für den klinischen Verlauf ist der Zeitpunkt der Infektion und der Immunstatus des Infizierten. Im immunkompetenten Menschen verläuft die Infektion meist symptomlos. Im Fall von pränatalen Infektionen oder bei immunsupprimierten Personen kann es allerdings zu schweren klinischen Verlaufsformen kommen. Tritt z. B. während der Schwangerschaft eine Primärinfektion der Mutter auf, hat dies in 10% der Fälle bleibende Schäden des Kindes, wie Wachstumsstörungen, Taubheit, Lernbehinderungen, u.v.m. zur Folge (Stagno, 1986). Eine besonders schwere Form der pränatalen Infektion stellt das kongenitale Cytomegaliesyndrom dar (Doerr, 1987), welches auf eine Primärinfektion der Mutter in einer frühen Phase der Schwangerschaft zurückzuführen ist. 20 – 30% der geschädigten Kinder sterben bereits im ersten Lebensjahr.

In Patienten mit Immunsuppression nach einer Organtransplantation, kann es durch die Reaktivierung des persistierenden Virus zu schweren klinischen Symptomen wie Lungenentzündung oder Hepatitis kommen, was zur Abstossung des Organs und sogar zum Tod führt.

In Patienten, deren Immunsystem durch eine Infektion mit dem *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) geschwächt ist, kann eine Reaktivierung oder eine Primärinfektion ebenfalls zu ausgeprägten Krankheitsbildern und zum Tod führen. In AIDS- (*Acquired Immunodeficiency Syndrome*) Patienten stellt eine durch HCMV verursachte Form der Lungenentzündung (atypische Interstitielle Pneumonie) eine der häufigsten Todesursachen dar (Macher *et al.*, 1983).

3.2.3 Therapeutische Ansätze

Als antivirales Chemotherapeutikum steht Ganciclovir (9-[1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl]guanin) zur Verfügung. Es wird durch eine viruseigene Kinase (pUL97) in den infizierten Zellen aktiviert (Sullivan *et al.*, 1992) und wirkt als Inhibitor der viralen DNA- Polymerase (Matthews & Boehme, 1988, Oram & Herold, 1998). Foscarnet (Phosphoameisensäure) oder Cidofovir (ein Nukleotidanalogen) werden ebenfalls als Inhibitor der viralen Polymerase eingesetzt, sind allerdings aufgrund ihrer starken Toxizität nur bedingt geeignet. Darüber hinaus sind bereits Resistenzentwicklungen beschrieben worden (Mascolini, 1996).

Ein wirksamer Impfstoff gegen HCMV existiert bislang nicht.

3.3. Molekularbiologie des HCMV

3.3.1. Genomstruktur

Das Genom des HCMV besteht aus einer doppelsträngigen, linearen DNA von etwa 230 Kilobasen (kbp) Länge und einem GC- Gehalt von etwa 59%. Damit ist es das grösste bekannte Genom humanpathogener Viren (Chee *et al.*, 1990). Es ist in zwei Abschnitte, ein nichtrepetitives langes (U_L) und ein nichtrepetitives kurzes Segment (U_S) unterteilt (Chee *et al.*, 1990) (Abb. 1). Diese können jeweils in unterschiedlichen Orientierungen zueinander vorliegen, so dass es theoretisch vier Isoformen des Genoms geben kann. Diese Isoformen werden in äquimolaren Verteilungen in jeder Viruspopulation gefunden (Oram *et al.*, 1982). In Abb. 1 ist der als "P" definierte Prototyp dargestellt. Das U_L - Segment ist eingerahmt von den invertierten repetitiven Sequenzen b und b', das U_S - Segment entsprechend von den Sequenzen c' und c. An den Enden des Virusgenoms und an der Verbindungsstelle zwischen den Segmenten U_L und U_S finden sich weitere Sequenzbereiche, die als "a- Sequenz" bezeichnet werden. In diesen Sequenzabschnitten liegen die konservierten Erkennungsregionen für die Prozessierung und Verpackung der Virus- DNA. Die Anzahl und Länge der a-Sequenzen sind variabel.

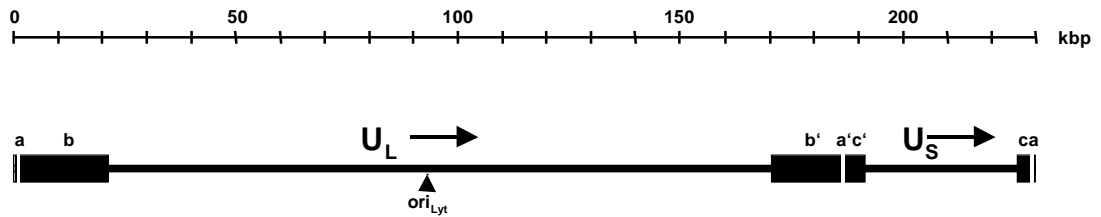


Abbildung 1: Aufbau des Prototyp- Genoms des humanen Cytomegalievirus.

Die oberste Linie zeigt eine Grössenskala mit der Einheit Kilobasenpaare (kbp). Ori_{Lyt} bezeichnet den Replikationsursprung. Dargestellt ist der Prototyp "P" des HCMV- Genoms. die Pfeile bezeichnen die Orientierung der Segmente zueinander.

Das Genom des HCMV ist seit 1990 vollständig durchsequenziert (Chee *et al.*, 1990). Eine computergestützte Analyse ergab, dass es 208 potentielle Leserahmen gibt, die für Proteine mit mehr als 100 Aminosäuren (AS) codieren können. Von diesen zeigen etwa 40 Leserahmen signifikante homologien zu Genen anderer Herpesviren. Diese Gene, deren Produkte grundlegende Virusfunktionen wie z.B. DNA- Replikation und Verpackung sowie Kapsidstruktur und Zusammenbau der Virionen steuern, sind in allen bekannten Herpesviren konserviert. Sie sind in sieben charakteristischen Genblöcken angeordnet, welche sich zwar in ihrer Position auf dem Genom und ihrer Orientierung zueinander unterscheiden können, aber bezüglich der Anordnung innerhalb des Genblocks nur wenig variieren (McGeoch *et al.*, 2000). Diese sieben "Module" stellen die genetische Grundausstattung aller bekannten Herpesviren dar, ihre Genprodukte sind für das entsprechende Virus absolut essentiell.

Die offizielle Namensgebung eines viralen Proteins basiert auf der fortlaufenden Numerierung ihrer potentiellen Leserahmen auf dem Prototyp des Genoms. So wird beispielsweise das Glykoprotein B auch als gpUL55 bezeichnet; gp weist es als Glykoprotein aus, UL bezeichnet die Lokalisation des Gens auf dem UL- Segment. Zudem wird die Nummer des Leserahmens auf diesem Segment mit angegeben (55).

3.3.2 Virionstruktur

Cytomegalieviren zeigen die typische Morphologie der Herpesviren (Abb. 2). Die elektronendichte innere Strukturkomponente (core) besteht aus einem DNA- Protein- Komplex und besitzt einen Durchmesser von ca. 75 nm. Sie wird von einem ikosaedrischen Kapsid umgeben, welches sich aus 162 Kapsomeren zusammensetzt und einen Durchmesser von 100 nm besitzt. Zwischen Nukleokapsid und Lipidhülle befindet sich das sogenannte Tegument, eine amorphe Proteinmatrix, die überwiegend aus Phosphoproteinen besteht. Der Hauptbestandteil, das Phosphoprotein pp65, kann bis zu 95% der Proteinmasse des Teguments ausmachen (Gibson & Irmieri, 1984). Die Virushülle besteht aus einer Lipiddoppelschicht von etwa 11 nm Dicke (Tooze *et al.*, 1993), in die sowohl zelluläre als auch virale Glykoproteine eingelagert sind. Sie vermitteln das Andocken der Viren an die Rezeptoren der Wirtszelle, und leiten die Fusion der Virushülle mit der Zellmembran ein. Durch ihre exponierte Position sind sie ein Hauptziel für neutralisierende Antikörper im infizierten Wirtsorganismus.

Die viralen Glykoproteine des HCMV sind in definierten Komplexen auf der Virusoberfläche organisiert. Der Glykoproteinkomplex I besteht aus Homodimeren des Glykoprotein B (gpUL55), welche über intermolekulare Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Eickmann *et al.*, 1998). Der Glykoproteinkomplex II besteht aus den Glykoproteinen M (gpUL100) und N (gpUL73), die ebenfalls kovalent miteinander verknüpft sind (Kari & Gehrz, 1993, Mach *et al.*, 2000). Der Glykoproteinkomplex III besteht aus den Glykoproteinen H, L und O (gpUL75, gpUL115 und gpUL74) (Cranage *et al.*, 1988, Huber & Compton, 1998, Huber & Compton, 1999, Kaye *et al.*, 1992). Diesem Komplex wird eine besondere Bedeutung bei der Fusion der Virushülle mit der Plasmamembran der Wirtszelle zugeschrieben (Milne *et al.*, 1998).

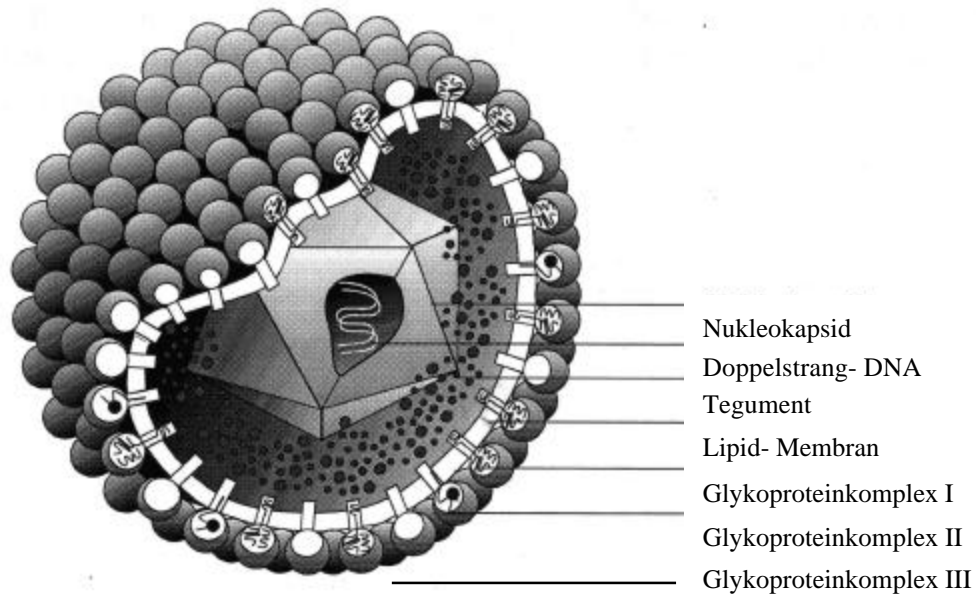


Abbildung 2: Schematische Darstellung des humanen Cytomegalievirus (HCMV) (©M. Reschke).

3.3.3 Viraler Infektionszyklus

Ein Infektionszyklus des HCMV in Zellkultur dauert von der Adsorption bis zur Freisetzung der Tochterviren etwa 72 Stunden.

Zuerst bindet das Virion unspezifisch an Heparansulfatproteoglykane der Zelloberfläche (Compton *et al.*, 1993). Für diese Bindung ist vermutlich der Glykoproteinkomplex II, möglicherweise auch der Glykoproteinkomplex I verantwortlich (Kari & Gehrz, 1992). Diese relativ unspezifische Interaktion ermöglicht den nächsten Schritt, die spezifische Bindung eines Virusliganden an den zellulären Rezeptor. Als Rezeptoren wurden einige Proteine diskutiert, z.B. ein Protein von 30-34 kDa (Adlish *et al.*, 1990, Taylor & Cooper, 1990) sowie ein Protein von 92,5 kDa (Keay & Baldwin, 1995), bislang ist aber noch kein zelluläres Protein eindeutig als Rezeptor identifiziert worden.

Nach dem Andocken der Viren fusionieren die Membranen von Virus und Zelle in einem pH- unabhängigen Prozess (Compton *et al.*, 1992), wodurch die nackten Nukleokapside ins Zytoplasma gelangen. Die Kapside werden vermutlich analog zu Herpes Simplex- Virus 1 (HSV1) mit Hilfe des zellulären Motorproteins Dynein an den Mikrotubuli entlang zum Zellkern transportiert

(Sodeik *et al.*, 1997). Durch die Bindung der Kapside an die Kernpore wird die Virus- DNA ins Nukleoplasma abgegeben (Ojala *et al.*, 2000).

Im Zellkern wird die virale DNA zirkularisiert. Danach findet die kaskadenartig gestaffelte Transkription und Expression von sehr frühen (*immediate early*, α), frühen (*early*, β) und späten (*late*, γ) Genen statt.

Die Transkription im *immediate early*- Stadium (0 bis 3 Stunden nach Infektion) führt zur Synthese von regulatorischen Proteinen (α - Genprodukte) und ist unabhängig von der Synthese anderer viraler Proteine. Die Transkription dieser Gene wird überwiegend durch den *major immediate early Promotor* reguliert, einen der stärksten bekannten eukaryontischen Promotoren.

Die regulatorischen α - Genprodukte leiten daraufhin die zweite Kaskade der Genexpression ein, die *early*- Phase (3 bis 24 Stunden nach Infektion). In dieser Phase werden die β - Genprodukte exprimiert, zu denen ebenfalls regulatorische Proteine gehören, aber auch einige virale Glykoproteine. Auch die Expression der viralen Polymerase fällt in diesen Zeitraum.

Mit dem Einsetzen der Replikation der Virus- DNA (etwa 24 bis 36 Stunden nach Infektion) beginnt die *late*- Phase der Virusvermehrung. Während dieser Phase werden überwiegend Strukturproteine, d.h. Bestandteile der reifen Virionen synthetisiert. Die γ - Proteine der späten Phase werden in zwei Gruppen unterteilt: γ_1 - Proteine können unabhängig von der Replikation viraler DNA exprimiert werden. Die Synthese von γ_2 - Proteinen ist jedoch absolut abhängig von der Replikation der Virus- DNA und der vorherigen Synthese anderer viraler Proteine.

Die Replikation des HCMV- Genoms erfolgt nach dem *Rolling circle*- Mechanismus (McVoy & Adler, 1994). Die konkatemere virale DNA wird unter Beteiligung des Proteins p130 (pUL56) an den α - Sequenzen auf Genomgröße zurechtgeschnitten und in die Kapside verpackt (Bogner *et al.*, 1998).

3.3.4 Morphogenese des humanen Cytomegalievirus

Der Reifungsprozess der Virionen beginnt mit dem Zusammenbau der Kapside im Zellkern. Bei elektronenmikroskopischen Aufnahmen infizierter Zellen können drei verschiedene Kapsidformen unterschieden werden, die A-, B- und C- Kapside: Die B- Kapside stellen unreife Vorläufer der A- und C- Kapside dar, die noch keine DNA enthalten. Wird die DNA korrekt in die Kapside verpackt, kommt es zur Bildung von reifen C- Kapsiden. Kommt es zu Fehlern bei der DNA- Verpackung, entstehen die DNA- freien A- Kapside. Die Kapside verlassen den Kern und gelangen ins Cytoplasma durch einen Vorgang, der als Transportknospung bezeichnet wird (Radsak *et al.*, 1996). Diesem Schritt geht zunächst eine Auflockerung der mit der inneren Kernmembran assoziierten Kernlamina- Proteine voraus, die durch Änderung des Phosphorylierungsstatus dieser Proteine bewirkt wird (Radsak *et al.*, 1991). Die Kapside gelangen durch diesen Knospungsprozess durch die innere Kernmembran in die perinukleäre Zisterne, wobei sie eine temporäre, von der inneren Kernmembran abgeleitete Lipidhülle erhalten (Abb. 3). Diese Hülle fusioniert anschliessend mit der äusseren Kernmembran und setzt die nackten Nukleokapside ins Cytoplasma frei. Die endgültige Umhüllung der Kapside findet an Membranen des Trans- Golgi- Netzwerkes (TGN) oder des frühen Endosoms statt (Tooze *et al.*, 1993). Die beiden Zellkompartimente sind in infizierten Zellen nicht mehr deutlich voneinander zu trennen (Sodeik *et al.*, 1993). Diese zweite Knospung, die sogenannte Reifungsknospung, führt zu Kapsiden mit einer doppelten Lipidhülle. Die äussere dieser Hüllen fusioniert mit der Innenseite der Plasmamembran und setzt die reifen, einfach umhüllten Virionen aus der Zelle frei (Abb. 3)

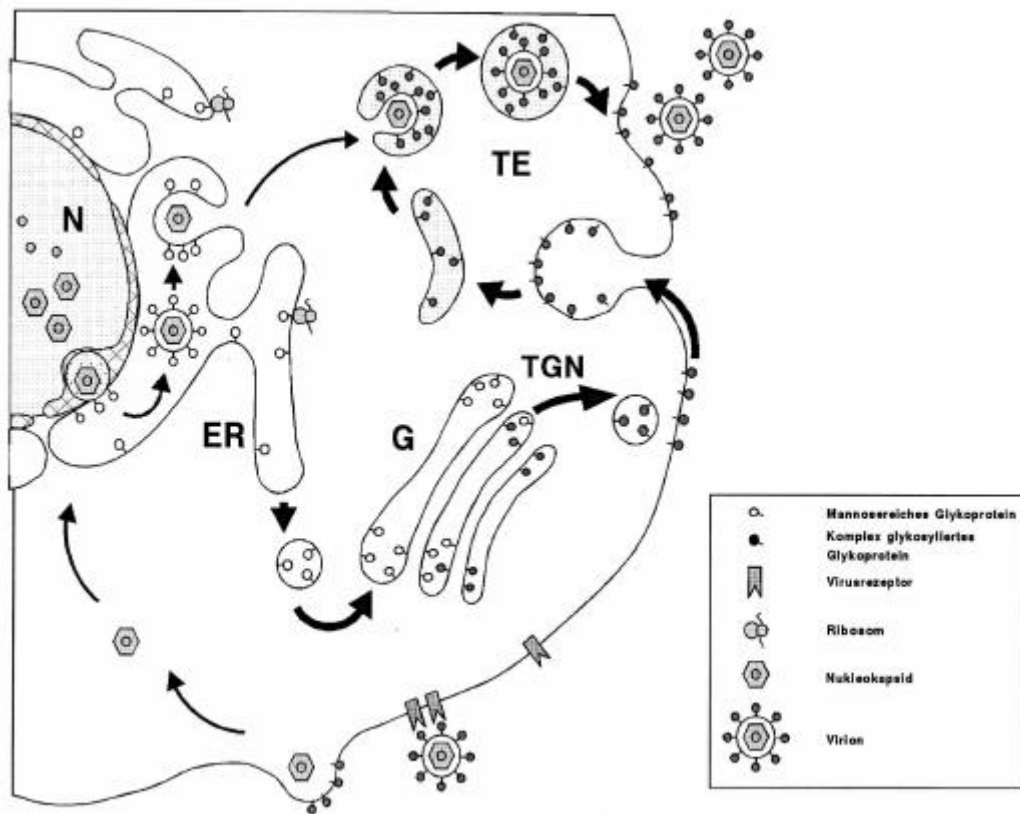


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Morphogenese des humanen Cytomegalievirus und des intrazellulären Transportes des Glykoproteins B.

Die schmalen Pfeile bezeichnen den Weg der reifenden Virionen, die stärkeren Pfeile bezeichnen die intrazelluläre Transportroute des gB (Radsak *et al.*, 1990). Abkürzungen: ER = Endoplasmatisches Retikulum, TE = tubuläres Endosom, G = Golgi, N = Zellkern, TGN = Transgolgi Netzwerk.

3.4 Das Glykoprotein B (gB) des Humanen Cytomegalievirus

Das Glykoprotein B (gB, gpUL55) ist ein innerhalb der Familie der Herpesviren hochkonserviertes Oberflächenglykoprotein. Die Aminosäureidentität verschiedener klinischer Isolate des HCMV untereinander beträgt mehr als 90% (Chou, 1992). Auch zwischen gB- Proteinen von Herpesviren verschiedener Subfamilien beträgt die Identität auf Aminosäureebene etwa 40% (Chou & Marousek, 1992).

Das gB ist die Hauptoberflächenkomponente des reifen Virions. Es kann bis zu 50% des Gesamtproteingehaltes der Virushülle ausmachen (Britt & Mach, 1996).

Der Leserahmen UL55 des gB ist in dem am stärksten konservierten Genblock des Virusgenoms zu finden (Chee *et al.*, 1990) (siehe 3.1). In diesem Genblock sind ausserdem eine Gruppe von Genen lokalisiert, die ebenso wie das gB- Gen absolut essentiell für die Virusreplikation sind, wie die DNA- Polymerase (pUL54) (Huang, 1975), das an der Verpackung der Virus- DNA beteiligte p130 (pUL56) (Bogner *et al.*, 1998) und das DNA- Einzelstrang- bindende Protein p140 (pUL57) (Anders *et al.*, 1987).

Die Expression des gB- Gens erfolgt in zwei Abschnitten: *Früh* nach Infektion erscheint ein bicistronisches Transkript, welches neben den Sequenzinformationen für gB auch noch die der benachbarten Polymerase trägt (Kouzarides *et al.*, 1987, Smuda *et al.*, 1997). Darüber hinaus wird ein monocistronisches gB- Transkript gebildet, welches erst 36 Stunden nach Infektion nachweisbar wird, also einer *late*- Kinetik folgt (3.3) (Smuda *et al.*, 1997)

3.4.1 Struktur, Reifung und Transport des Glykoproteins B

Das Glykoprotein B gehört zu den Typ1 Membranglykoproteinen, d.h. der Carboxyterminus des Moleküls ist cytoplasmatisch lokalisiert, der Aminoterminus befindet sich dagegen im Lumen des jeweiligen Zellkompartiments (Basgoz *et al.*, 1992). Es trägt am Aminoterminus ein 24 AS langes Signalpeptid (Abb. 4A) und weist 16 Cysteinreste (Eickmann *et al.*, 1998) und 16 potentielle N- Glykosilierungsstellen auf. Das 906 AS lange Molekül wird zunächst am Rauhen Endoplasmatischen Retikulum als Vorläuferprotein mit einer molekularen Masse von 102 kDa synthetisiert. Ein hydrophober Abschnitt des Moleküls zwischen AS 751 und 771 (Reschke *et al.*, 1995) dient der Verankerung in der Membran (Abb. 4A und B). Es wird kotranslational oligomerisiert und zu einer mannosereichen Form von 158 kDa N- glykosiliert. Während der Passage durch den Golgiapparat werden einige der endständigen Mannosereste entfernt und durch komplexe Zucker ersetzt, so dass die Molekularmasse auf 160 kDa ansteigt (Britt & Vugler, 1992, Gretch *et al.*, 1988). Im Transgolgi Netzwerk wird das Molekül durch die zelluläre Endoprotease Furin proteolytisch prozessiert (Vey *et al.*, 1995), wodurch ein aminoterminales 90 – 110 kDa und ein carboxyterminales 52-58

kDa Prozessierungsprodukt entstehen, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden bleiben (Abb. 4B) (Britt & Vugler, 1992, Farrar & Greenaway, 1986).

Vom Transgolgi wird das Molekül entlang dem exozytotischen Weg an die Zelloberfläche transportiert (Abb. 3) (Radsak *et al.*, 1996) und von dort in Vesikel des tubulären Endosoms reinternalisiert (Abb. 3). Es wurde beschrieben, dass die einzige Phosphorylierung des Moleküls an AS 900 bei diesem Prozess eine Rolle spielt (Fish *et al.*, 1998).

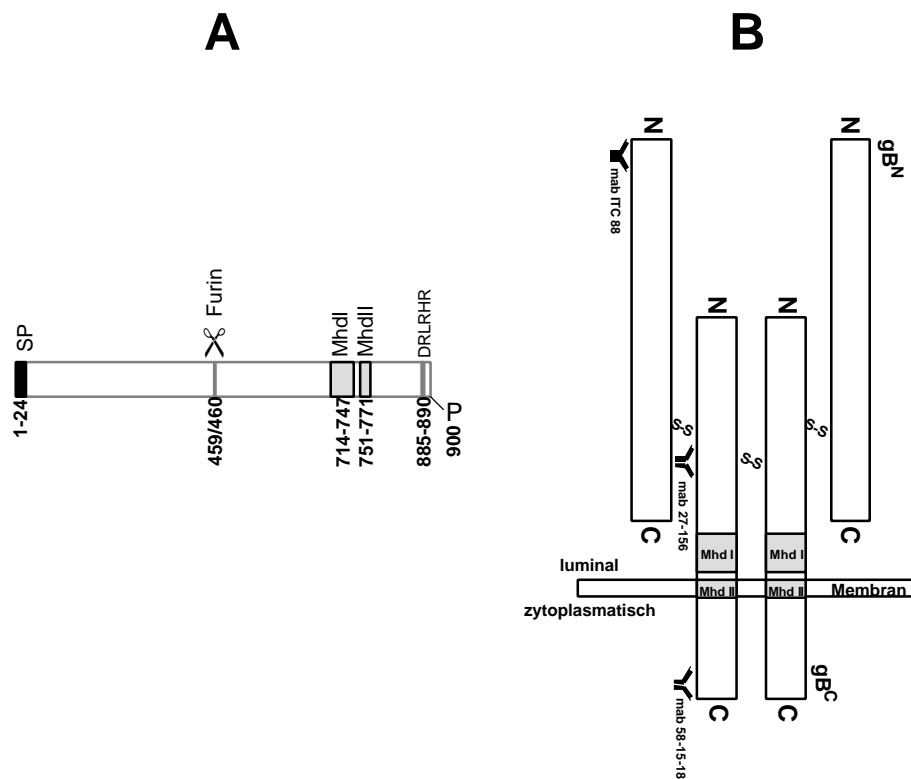


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Glykoproteins B des humanen Cytomegalievirus.

A: Darstellung des ungespaltenen Moleküls. Einige der funktionellen Domänen sind eingetragen. Die Zahlen bezeichnen die Aminosäurepositionen der hervorgehobenen Domänen. Abkürzungen: P = Phosphorylierungsstelle, SP = Signalpeptid, Furin = Spaltstelle für die zelluläre Endoprotease Furin, MhdI = Hydrophobe Domäne 1, MhdII = Hydrophobe Domäne 2, DRLRHR = Lokalisationsignal für die innere Kernmembran.

B: Darstellung des gB- Homodimers. Abkürzungen: N = Aminoterminus, C = Carboxyterminus, gBN = Aminoterminales Spaltfragment, gBC = Carboxyterminales Spaltfragment, S-S = Disulfidbrücke, mab = Bindestellen für monoklonale Antikörper.

3.4.2 Lokalisation des Glykoproteins B in der inneren Kernmembran

Ein Teil des am Endoplasmatischen Retikulum synthetisierten gB folgt jedoch einem anderen Transportweg. Es gelangt nicht in den Golgi, sondern erfährt einen retrograden Transport in die innere Kernmembran (Radsak *et al.*, 1996).

In vorangegangenen Arbeiten konnte das Aminosäuresignal eingegrenzt werden, welches für die Lokalisation des gB in der inneren Membran verantwortlich ist (Bogner *et al.*, 1998, Meyer & Radsak, 2000). Dieses Signal, welches aus den Aminosäuren DRLRHR am äussersten Carboxyterminus besteht (Abb. 4A), wurde in einem heterologen Expressionssystem identifiziert. Es ist in der Lage, nach der Übertragung auf den Carboxyterminus des Reporterprotein CD8 dieses in die innere Kernmembran umzudirigieren. Gezielte Mutationen des Signals führten dagegen sowohl im rekombinanten authentischen gB- Molekül als auch im Reporterprotein dazu, dass die Lokalisation in der inneren Kernmembran ausbleibt.

Die Vorstellung zur Lokalisation von gB in der inneren Kernmembran ist die, dass das Molekül durch Diffusion in der Membranebene konstitutiv in die innere Kernmembran gelangt. Dabei wird es membrangebunden durch laterale Kanäle an den Kernporenkomplexen vorbei transportiert (Meyer & Radsak, 2000, Smith & Blobel, 1993, Soullam & Worman, 1993, Soullam & Worman, 1995). Das Signal führt vermutlich durch Interaktion mit einem Protein der inneren Kernmembran oder des Nukleoplasmas zu einer Retention des gB im Kernkompartiment.

Die Lokalisation in der inneren Kernmembran wird auch von den gB-Homologen anderer Herpesviren beschrieben, wie z.B. denen des Epstein Barr Virus (Gong & Kieff, 1990, Quattiere & Pearson, 1979) und des Herpes Simplex Virus (Compton & Courtney, 1984). Aus diesen Beobachtungen wurde die Vorstellung entwickelt, dass die Lokalisation der viralen Glykoproteine in diesem Kompartiment der Zelle notwendig ist für den Prozess der Transportknospung durch die Kernmembranen ins Cytoplasma (3.3.4, Abb. 3).

3.4.3 Die Hydrophobe Domäne 1

Nach kotranslationaler Abspaltung des Signalpeptides besitzt das Glykoprotein B noch zwei hydrophobe Domänen (Abb 4A und B): die 21 AS lange Hydrophobe Domäne 2 (MhdII) dient der Verankerung des Moleküls in der Membran. Der Hydrophoben Domäne 1 (MhdI) wird hingegen eine Funktion bei der Fusion der Virushülle mit der Plasmamembran der Wirtszelle zugeschrieben (Bold *et al.*, 1996, Reschke *et al.*, 1995). Die Vorstellung zum Fusionsprozess bei der Infektion lipidumhüllter Viren ist die, dass zunächst ein virales Oberflächenprotein (Ligand) an seinen spezifischen zellulären Rezeptor bindet. Durch die Bindung erfährt der virale Ligand eine Konformationsänderung, bei der ein hydrophobes Fusionspeptid exponiert wird. Dieses interagiert dann mit der Zielmembran und leitet den Fusionsprozess durch die Verschmelzung der Membranen ein.

Die klassischen Fusionspeptide, z.B. des Influenza- oder des Humanen Immundefizienzvirus 1 (Hallenberger *et al.*, 1992, Klenk & Rott, 1988), sind 20 bis 25 Aminosäuren lang und liegen nach proteolytischer Prozessierung am aminoterminalen Ende des membranverankerten Molekülfragmentes. Die MhdI des gB von HCMV ist mit 34 Aminosäuren allerdings bedeutend länger und liegt nicht terminal.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Veränderung der MhdI direkt mit dem Fusionsverhalten des Moleküls korreliert. Ob aber die MhdI dabei selbst als "internes" Fusionspeptid fungiert oder ob sie lediglich für die korrekte Faltung des gB notwendig ist, ist bislang nicht geklärt (Bold *et al.*, 1996, Reschke *et al.*, 1995). Es wird auch diskutiert, dass für die Fusionsprozesse zusätzlich der aus den Glykoproteinen gH, gL und gO bestehende Glykoproteinkomplex III verantwortlich ist (Milne *et al.*, 1998).

3.4.4 Die proteolytische Spaltung des Glykoproteins B

Die gB- Homologen aller bekannten β - Herpesviren einschliesslich des humanen Cytomegalievirus besitzen das spezifische Erkennungsmotif für die zelluläre Endoprotease Furin (RXK/RR) (Abb. 4A) (Britt & Vugler, 1989, Loh, 1991, Vey *et al.*, 1995). Bei den meisten der bekannten α - Herpesviren, wie

z.B. dem Varizella Zoster Virus (Keller *et al.*, 1986), dem Bovinen Herpesvirus Typ1 (van Drunen Littel-van den Hurk & Babiuk, 1986), dem Pseudorabiesvirus (Hapl *et al.*, 1984), dem Equinen Herpesvirus (Meredith *et al.*, 1989, Sullivan *et al.*, 1989) und dem Marek's Disease Virus werden die gB- Homologe proteolytisch prozessiert. Die Ausnahme unter den α - Herpesviren stellen Herpes Simplex Virus Typ 1 und 2 dar, in denen das gB ungespalten vorliegt (Claesson-Welsh & Spear, 1986, Eberle & Courtney, 1982). Gleiches gilt für das gB- Homologe des Epstein Barr Virus (Gong *et al.*, 1987), welches zu den γ - Herpesviren gehört.

Es gibt Studien, in denen lebensfähige Mutanten von α - Herpesviren mit ungespaltenem gB hergestellt wurden. Diese erwiesen sich sogar als überlebensfähig, wenn ihr gB durch das eines anderen α - Herpesvirus ersetzt wurde (Kopp *et al.*, 1994). Diese Komplementation mit gB- Proteinen anderer Herpesviren, gespalten oder ungespalten, war jedoch nur innerhalb der Familie der α - Herpesviren möglich. Eine funktionelle Komplementation bei α - und γ - Herpesviren mit gB- Homologen von Herpesviren anderer Subfamilien konnte hingegen nicht erreicht werden (Lee *et al.*, 1997).

Diese Beobachtung impliziert, dass Aussagen zur Funktion der gB- Spaltung nicht von einer Unterfamilie auf eine andere übertragen werden können. Die Frage nach der Notwendigkeit der Spaltung ist demnach auch im Falle des HCMV mit den an anderen Herpesviren gewonnenen Ergebnissen nicht zu beantworten.

3.5 Virusmutanten des Humanen Cytomegalievirus

3.5.1 Herstellung von Virusmutanten durch Insertionsmutagenese

Der experimentelle Ansatz, die Funktion eines viralen Genproduktes aufzuklären, besteht darin, das entsprechende Gen zu entfernen oder gezielt zu mutagenisieren und den resultierenden Phänotyp zu charakterisieren.

Bei Viren mit kleinen Genomen, wie z.B. dem Adenovirus (Berkner & Sharp, 1983, Ghosh-Choudhury *et al.*, 1986) oder dem Ebolavirus (Volchkov *et al.*, 2001) ist es möglich, das Gesamtgenom in Form von cDNA in ein einziges

Plasmid zu inserieren und darin durch molekularbiologische Standardverfahren gezielt zu mutagenisieren.

Bei HCMV mit einer Genomgrösse von etwa 230 kbp ist der klassische Weg der Mutantenherstellung hingegen die gezielte Insertionsmutagenese. Bei dieser Methode wird ein Selektionsmarker- Gen auf einem Plasmid zu beiden Seiten mit flankierenden homologen Regionen versehen. Diese flankierenden Regionen sind identisch mit den DNA- Abschnitten, die das zu deletierende Gen auch auf der viralen DNA flankieren. Dieses Plasmid wird zusammen mit viraler DNA entweder durch Cotransfektion mit gereinigter Virus- DNA oder durch Transfektion und anschliessende Überinfektion in die Wirtszelle eingebracht. Durch homologe Rekombination über die flankierenden Bereiche kann das zu untersuchende Gen durch den Selektionsmarker ersetzt werden (Strive, 1997). Auf diese Weise sind einige Mutanten des HCMV hergestellt worden (Jones & Muzithras, 1992, Jones *et al.*, 1991, Patterson & Shenk, 1999, Spaete & Mocarski, 1987). Der Nachteil dieser Methode ist das gleichzeitige Entstehen von Wildtypvirus aus viraler DNA, welche nicht rekombiniert hat. Daher muss eine aufwendige Plaquereinigung angeschlossen werden, um die Mutante von Wildtypvirus zu trennen, wobei häufig das zusätzliche Problem eines Wachstumsnachteils der Mutante überwunden werden muss. Mit dieser Methode können grundsätzlich nur Virusmutanten hergestellt werden, deren Mutation nichtessentiell für die Virusvermehrung ist.

3.5.2 Bacterial Artificial Chromosomes (BACs)

Einen entscheidenden Fortschritt im Hinblick auf die Mutantenherstellung bei Herpesviren erzielten 1997 M. Messerle und Mitarbeiter (Messerle *et al.*, 1997), indem es ihnen gelang, das gesamte Genom des murinen Cytomegalievirus (MCMV) als zirkuläres künstliches Bakterienchromosom (*Bacterial Artificial Chromosome*, BAC) in Bakterien zu propagieren. BACs sind Derivate von F- Plasmiden (*fertility*- Plasmide), die in *E. coli* die Konjugation steuern. BACs werden unter anderem als Vektoren zur Herstellung von grossen eukaryontischen Genbanken verwendet (Shizuya *et al.*, 1992). Grosse Fremd- DNA Stücke bleiben in den BACs lange Zeit stabil, da sie als Plasmide mit geringer Kopienzahl in Bakterien vermehrt werden,

welche ihre Fähigkeit zur Rekombination verloren haben (Borst *et al.*, 1999, Shizuya *et al.*, 1992).

Um die virale DNA in die F- Plasmide einzubringen, wurde zunächst ein Schritt der klassischen Insertionsmutagenese (3.5.1) vorgeschaltet:

Der für die Replikation in Bakterien notwendige F- Anteil des Plasmids wurde mit flankierenden DNA- Abschnitten versehen, die homolog zu einem Bereich der viralen DNA waren. Die Integration des F- Plasmid- Anteils durch homologe Rekombination in das Virusgenom erfolgte nach Cotransfektion des Plasmides mit gereinigter Virus- DNA in eukaryontische Zellen.

Die in reifen Herpesviren lineare doppelsträngige Virus- DNA wird nach dem *rollig- circle-* Mechanismus repliziert (Pfuller & Hammerschmidt, 1996) und muss daher zur Replikation in den eukaryontischen Zellen zirkularisiert werden. Diese Zirkularisierung ermöglichte die Extraktion von ringförmig geschlossener Virus- DNA mit F- Plasmidanteilen (Hirt, 1967), die nach Transformation in *E. coli* repliziert werden konnte.

Auf diese Weise sind mittlerweile zahlreiche BACs mit den Genomen verschiedener Herpesviren hergestellt worden (Adler *et al.*, 2000, Delecluse *et al.*, 1998, Messerle *et al.*, 1997, Saeki *et al.*, 1998, Schumacher *et al.*, 2000, Smith & Enquist, 1999), unter anderem auch ein HCMV- BAC (Borst *et al.*, 1999). Durch die gut etablierten Mutagenesemethoden in Bakterien (Borst *et al.*, 2001, Messerle *et al.*, 1997, Muyrers *et al.*, 1999) kann im BAC- System jede beliebige Mutation in das herpesvirale Genom eingebracht werden.

Die mutagenisierten Virus- BACs können in grossen Mengen aus den Bakterien präpariert und in eukaryontische Zellen transfiziert werden. Durch die klonale Selektion in Bakterien entfällt die Kontamination mit Wildtypvirus- DNA, weshalb sogar eine Anzüchtung von stark attenuierten Virusmutanten möglich ist.

Virusmutanten, deren Mutation zu einem letalen Phänotyp führt, können jedoch nur gewonnen werden, wenn ihr Defekt durch Komplementation des fehlenden Genproduktes *in trans* in einem entsprechenden Wirtszellsystem kompensiert wird.

3.5.3 Komplementierende Zellsysteme

Das Fehlen derartiger komplementierender Zellsysteme ist das grösste experimentelle Problem bei der Herstellung von Mutanten des humanen Cytomegalievirus.

Mutationen in essentiellen Genen, zu denen auch das gB- Gen gehört (Hobom *et al.*, 2000), sind zwar experimentell mithilfe des BAC- Systems herzustellen, die Auswirkungen der Mutationen auf das Virus kann allerdings nur charakterisiert werden, wenn eine entsprechende Virusmutante in einem ersten Schritt der Anreicherung phänotypisch komplementiert werden kann. Eine solche Komplementation wird für gewöhnlich durch Zellklone erreicht, welche das Gen für das zu komplementierende Protein stabil ins eigene Genom integriert hatten. Bei der Selektion stabil transfizierter Zellklone müssen mehrere Zellteilungen durchlaufen werden, so dass nur Zelllinien mit unbegrenzter Wachstumsfähigkeit hierfür verwendet werden können.

Im Gegensatz zu Herpesviren anderer Subfamilien zeigt das humane Cytomegalievirus eine strikte Zelltypspezifität *in vitro*. Eine effiziente Vermehrung des Virus gelingt nur in primären humanen Fibroblasten, die jedoch nach einer begrenzten Anzahl von Passagen altern und sich daher nicht zur Herstellung stabil transfizierter Zellklone eignen.

Humane Astrozytomzellen, immortalisierte Derivate eines Neuroglia- Tumors, sind bedingt permissiv für eine Infektion mit HCMV und lassen sich für die Herstellung stabiler Transfektanten verwenden (Reis *et al.*, 1993). Die Komplementation einer letalen Virusmutante nach Transfektion mit HCMV- BACs konnte in diesem System bisher jedoch nicht erreicht werden (Pande *et al.*, 2000).

Ein anderer Ansatz zur Herstellung komplementierender Zellen ist die Verwendung von Retro- Helferviren, die das Gen für das zu komplementierende Protein tragen und ihre genetische Information nach Infektion in das Genom der Wirtszellen integrieren. Mithilfe solcher Helferviren konnten Fibroblasten in einer frühen Passage zur homogenen Expression des Glykoprotein B gebracht werden. Die Komplementation eines HCMV- BACs mit einem Defekt in gB war jedoch auch in diesem System nicht effizient möglich (Strive *et al.*, 2000).

Seit einiger Zeit ist eine permanente Fibroblastenzelllinie beschrieben, in der der Alterungsprozess durch Überexpression des Enzyms Telomerase verzögert ist (Bodnar *et al.*, 1998, Bresnahan *et al.*, 2000). In stabil transfizierten Klonen dieser Zellen konnte eine stark attenuierte Virusmutante des humanen Cytomegalievirus mit einem Defekt in dem Regulatorischen Protein pp71 (ppUL82) erfolgreich komplementiert werden (Bresnahan *et al.*, 2000). Auch in diesem System konnte jedoch die Komplementation einer letalen HCMV- gB- null- Mutante mit dem gB- Protein nach stabiler Transduktion durch Retro- Helferviren nicht beobachtet werden.

Die homogene Expression eines Proteins in einem Zellsystem ist somit nicht gleichbedeutend mit der Eignung für die Komplementation einer letalen Virusmutante. Gerade im Fall der viralen Glykoproteine ist vermutlich die komplex regulierte Expression und Interaktion mit andern viralen Komponenten entscheidend für ihren korrekten Transport und ihre Bioverfügbarkeit.

Wegen des Fehlens eines funktionellen komplementierenden Systems war eine detaillierte Analyse essentieller viraler Genprodukte des humanen Cytomegalievirus daher bislang nicht möglich.

4. Zielsetzung der Arbeit

Das Glykoprotein B des humanen Cytomegalievirus ist als multifunktionelles Protein für eine Vielzahl von Prozessen während des viralen Infektionszyklus essentiell. Es spielt eine Rolle bei der initialen Interaktion mit der Wirtszelle, der virusinduzierten Zellfusion und der Ausbreitung der Viren von Zelle zu Zelle. Genaue Vorstellungen zur funktionellen Struktur des Proteins liegen bisher nicht vor.

Für die Charakterisierung der Funktionen des gB- Proteins sollten mittels BAC- Mutagenese Virusmutanten hergestellt und ihr Phänotyp analysiert werden.

Wegen des Fehlens komplementierender Zellsysteme ist es derzeit nicht möglich, phänotypisch komplementierte Mutanten des humanen Cytomegalievirus zu generieren, in denen essentielle Gene komplett deletiert sind. Es können daher nur solche Mutationen in das gB- Gen eingeführt werden, deren Effekt nicht letal ist, sondern nur zu einer Attenuierung des Virus führt.

Ziel der Arbeit war es, eine Methode zu entwickeln, mit der sich definierte Domänen des Moleküls als essentiell oder nichtessentiell für die Virusreplikation einordnen lassen.

Die Aussagen dieses Assays hinsichtlich der Auswirkung der Mutationen in gB sollten weiterhin exemplarisch durch die Herstellung von Virusmutanten durch BAC- Mutagenese bestätigt werden. Die hergestellten wachstumsfähigen Virusmutanten mit veränderten funktionellen Domänen in gB sollten darüber hinaus biologisch charakterisiert werden.

5. Material

5.1 Geräte

ABI PRISM 377 DNA Sequencer	Applied Biosystems, Weiterstadt
Biofuge 13	Heraeus Sepatech, Hanau
Biofuge pico	Heraeus, Hanau
Digitale Kameraausrüstung Spot	
Diagnostic instruments	Michigan, USA
Fluoreszenz-Mikroskop Axioplan	Zeiss, Oberkochen
GeneAmp PCR System 2400	Applied Biosystems, Weiterstadt
GenePulser II	Biorad, München
Labovert Mikroskop	Leitz, Wetzlar
Minifuge T	Heraeus, Hanau
Minigelkammer, horizontal	Biorad, München
Photomikroskop Axiophot	Zeiss, Oberkochen
Photometer GeneQuant II RNA/DNA	
Calulator	Pharmacia, Freiburg
Photospektrometer DU40	Beckman, Glenrothes
Quarzküvette, 10mm	Hellma, Müllheim
Ultraschallgerät Sonifier® B15	Branson, Danbury, USA
Ultrazentrifuge L7-55/L8-55M	Beckman, Frankfurt
Ultrazentrifuge TL-100	Beckman, Frankfurt
Zentrifuge J2-21	Beckman, Frankfurt
Zentrifuge Rotina 48R	Hettich, Tuttlingen

5.2 Verbrauchsmaterialien

Elektroporationsküvetten	BioRad, München
Küvetten	BioRad, München
Nitrozellulose- Membran, 0,2 µm	Schleicher & Schuell, Dassel
Parafilm	American Can Company, Greenwich, USA

Röntgenfilme BioMax	Eastman Kodak, New York, USA
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg Corning Inc., Corning, Canada Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Spritzen/ Kanülen	Greiner, Nürtingen
Sterilfilter	Braun, Melsungen
Zellkulturflaschen und –schalen	Schleicher & Schuell, Dassel Greiner, Nürtingen
Zentrifugenröhrchen	Costar, Cambridge, USA Beckmann, München

5.3 Chemikalien und Biochemikalien

Accustain (Giemsa- stain, modified)	Sigma, Deisenhofen
Aceton	J. T. Baker/Holland
Acrylamidlösung Gel 30	Roth, Karlsruhe
Agarose	Life Technologies, Eggenstein
Aprotinin (Trasylo [®])	Bayer, Leverkusen
2-Amino-2-(hydromethyl)-propan-1,3-diol (Tris)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	LKB, Bromma/Schweden
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bovines Serumalbumin (BSA)	Roche, Mannheim
Calciumchlorid Dihydrat	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
4-Chloro-1-naphtol	Sigma, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Roche, Mannheim

Glucose	Sigma, Deisenhofen
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Iodixanol (Optiprep™)	Sigma, Deisenhofen
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat Heptahydrat	Roth, Karlsruhe
Methanol	Riedel-de-Haen, Seelze
2-Mercaptoethanol	Merck-Schuchard, Hohenbrunn
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
N-[2-Ethansulfonsäure] (HEPES)	Sigma, Deisenhofen
Nucleotide (dNTP)	Perkin Elmer, Norwalk, USA
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Serva, Heidelberg
Rinderserumalbumin (BSA), Fraktion V	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Sucrose	Serva, Heidelberg
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Roth, Karlsruhe

Alle nicht näher bezeichneten Chemikalien stammen von den Firmen:

BioRad	München
Roche Molecular Biochemicals	Mannheim
Merck	Darmstadt
Life Technologies	Eggenstein
Riedel-de-Haen	Seelze
Roth	Karlsruhe

Serva	Heidelberg
Sigma	Deisenhofen

5.4 Detergentien

Natriumdesoxychololat (DOC)	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
IGEPAL CA-630 (NP40)	ICN Biomedicals, Aurora, USA
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Tween 20	Merck, Darmstadt

5.5 Enzyme

Alkalische Phosphatase (calf intestine alkaline phosphatase)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
AmpliTaq [®] DNA- Polymerase	Perkin Elmer, Norwalk, USA
Endoglykosidase H (EndoH)	Applied Biosystems, Weiterstadt
Klenow Fragment	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Beverly, USA
RibonukleaseA (RNAseA)	Serva, Heidelberg
Peptid- N- Glycosidase F(PNGaseF)	New England Biolabs, Beverly, USA
<i>Pfu</i> - Turbo- DNA- Polymerase	Stratagene, La Jolla, USA
T4- DNA- Ligase	MBI Fermentas, St. Leon- Rot
Trypsin/EDTA	Life Technologies, Karlsruhe

5.6 Antibiotika

Ampicillin	Merck, Darmstadt
Penicillin	Life Technologies, Karlsruhe

Streptomycin	Life Technologies, Karlsruhe
Kanamycin	Serva, Heidelberg
Chloramphenicol	Serva, Heidelberg

5.7 Kits

Cytological Nuclear Counterstain Kit	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Lipofectamine [®] 2000 Transfection Reagent	Life Technologies, Karlsruhe
ABI PRISM BigDye Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Applied Biosystems, Weiterstadt
MBS Mammalian Transfection Kit	Stratagene, La Jolla, USA
Nucleobond PC500 Kit	Macherey Nagel, Düren
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Spin Plasmid Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Quick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Quick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Mini Kit	Qiagen, Hilden
Quick Change [™] Site Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, La Jolla, USA
SuperSignal [®] West Dura Extended Duration Substrate	Pierce, Rockford, USA

5.8 Kulturmediengrundstoffe

Bacto- Agar	Difco, Detroit
Bacto- Hefe- Extrakt	Difco, Detroit
Bacto- Trypton	Difco, Detroit
Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM)	Life Technologies, Karlsruhe
Fötales Kälberserum (FCS)	BioWhittaker, Verviers, Belgien
L- Glutamin	Life Technologies, Karlsruhe
Opti- Mem [®] 1	Life Technologies, Karlsruhe

Trypsin/EDTA- Lösung

Life Technologies, Karlsruhe

5.9 Antikörper

Erstantikörper:

Anti-HCMV-gB^c von der Maus,
mab27-156

W. Britt, Universität von
Alabama, Birmingham, USA

Anti-HCMV-gB^c von der Maus,
mab58-15

W. Britt, Universität von
Alabama, Birmingham, USA

Anti-HCMV-gB^c vom Menschen,
mabITC39

M. Ohlin, Universität Lund,
Lund, Schweden

Anti-HCMV-gB^c vom Menschen,
mabITC52

M. Ohlin, Universität Lund,
Lund, Schweden

Anti-HCMV-pp65 von der Maus,
mabpp65

W. Britt, Universität von
Alabama, Birmingham, USA

Anti-HCMV-IE-IgG von der Maus

DuPont, Dreieich

Zweitantikörper:

Alexa Fluor[™] 488 Anti-Maus-IgG,
von der Ziege

Mo Bi Tec, Göttingen

Anti-Human-IgG von der Ziege, F(ab')-
Fragmente, FITC- gekoppelt

Dianova, Hamburg

Anti-Maus IgG vom Kaninchen, Peroxidase-gekoppelt	DAKO, Hamburg
Anti-Human IgG vom Kaninchen, Peroxidase- gekoppelt	DAKO, Hamburg
Polyklonales, polyspezifisches humanes Anti-HCMV-Serum	Prof. Dr. K. Radsak, Inst. für Virologie, Marburg

5.10 Medien zur Anzucht von Bakterien

LB- Medium

Bacto- Trypton	0,5% (w/v)
Bacto- Hefeextrakt	1,0 % (w/v)
NaCl	1,0% (w/v)
MgSO ₄ (7H ₂ O)	0,25% (w/v)
<i>a. bidest</i>	

LB- Agar

Bacto- Trypton	0,5% (w/v)
Bacto- Hefeextrakt	1,0 % (w/v)
NaCl	1,0% (w/v)
MgSO ₄ (7H ₂ O)	0,25% (w/v)
Bacto- Agar	1,5% (w/v)
<i>a. bidest</i>	

SOC- Medium (pH7,0)

Bacto- Trypton	3,0% (w/v)
Bacto- Hefeextrakt	0,5% (w/v)
NaCl	10 mM
KCL	3 mM
MgCl ₂	20 mM
MgSO ₄	20 mM
Glucose	20 mM

a. bidest

Das SOC- Medium wurde sterilfiltriert.

TB- Medium

Bacto- Trypton	1,2% (w/v)
Bacto- Hefeextrakt	2,4% (w/v)
Glycerin	0,4% (v/v)
KH ₂ PO ₄	17 mM
K ₂ HPO ₄	72 mM

Die Komponenten des Phosphatpuffers wurden separat autoklaviert und später zugegeben.

5.11 Puffer*PBS- Puffer (pH 7,4)*

di-Natriumhydrogenphosphat	19,0 mM
Kaliumhydrogenphosphat	2,2 mM
Natriumchlorid	0,2 mM

*a. bidest**TBE-Puffer (10x)*

Tris	900 mM
Borsäure	900 mM
EDTA	10 mM

*a. bidest**TAE- Puffer (50x)*

Tris	2000 mM
EDTA	50 mM
Eisessig	5,71% (v/v)mM

a. bidest

5.12 Zellen

5.12.1 Primäre humane Lungenfibroblasten (MRC5)

Die primären humanen Lungenfibroblasten MRC5 (CCL-171, American Type Culture Collection (ATCC)) wurden von der Firma BioWhittaker, Verviers, Belgien, bezogen und zwischen der 18. und 26. Passage verwendet.

5.12.2 Primäre humane Hautfibroblasten (HF)

OP- Präparate humaner Vorhäute wurden aus der Praxis von Dr. A. v. Keitz in Marburg erhalten und in Kultur gebracht. Für die Versuche wurden HF zwischen der 5. und der 20. Passage verwendet.

5.12.3 Cos7- Zellen

Cos7- Zellen wurden aus CV1- Zellen (Nierenepithelkarzinom- Zellen der afrikanischen grünen Meerkatze) durch Transformation mit dem SV40- T-Antigen gewonnen. Sie wurden von der American Type Culture Collection bezogen.

5.13 Virusstämme

Das Virus RVHB5 basiert auf dem Laborstamm HCMV- AD169 (Gupta *et al.*, 1977). Es wurde nach Transfektion in humane Fibroblasten aus dem BAC-Plasmid pHB5 generiert (Borst *et al.*, 1999) (Tab. 5), welches die HCMV-AD169- DNA in zirkulärer Form trägt.

5.14 Bakterienstämme

Tabelle 2: Bakterienstämme

Stamm	Kurzbeschreibung	Referenz
<i>E. coli</i> XL1blue	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac⁻</i> F ⁻ [<i>proAB⁺ lac^f lacZΔM15 Tn10(tet^r)</i>]	(Bullock <i>et al.</i> , 1987)
<i>E. coli</i> DH10B	F ⁻ <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80dlacZΔM15</i> <i>ΔlacX74 endA1 recA1 deoR Δ(ara, leu) 7697</i> <i>araD139 galU galK nupG rpsL λ-</i>	(Lorow & Jessee, 1990)
<i>E. coli</i> JC8679	F ⁻ <i>supE44 lacY1 galK2 ara-14 xyl-5 mtl-1 thr-1 leuB6</i> <i>proA2 his-4 argE3 his-328 recB21 recC22 sbcA23</i> <i>rpsL31 phi-1 tsx-33 λ-</i>	(Gillen <i>et al.</i> , 1981)

5.15 Plasmide, Cosmide und BACs

Tabelle 3: Plasmide, Cosmide und BACs

Name	Kurzbeschreibung	Referenz
pRC/CMVgB	HCMV-IE Promotor/Enhancer, <i>Amp^r</i> , <i>Neo^r</i> , pA, HCMVgB (UL55)	(Reis <i>et al.</i> , 1993)
pRC/CMVgBP	HCMV-IE Promotor/Enhancer, <i>Amp^r</i> , <i>Neo^r</i> , pA, HCMVgB (UL55), gB-Promotor	Diese Arbeit
pRC/CMVgB(Del1)	HCMV-IE Promotor/Enhancer, <i>Amp^r</i> , <i>Neo^r</i> , pA, HCMVgB (UL55)Δaa 773-810	(Bold <i>et al.</i> , 1996)
pRC/CMVgB(Del2)	HCMV-IE Promotor/Enhancer, <i>Amp^r</i> , <i>Neo^r</i> , pA, HCMVgB (UL55)Δaa 811-855	(Bold <i>et al.</i> , 1996)
pRC/CMVgB(Del3)	HCMV-IE Promotor/Enhancer, <i>Amp^r</i> , <i>Neo^r</i> , pA, HCMVgB (UL55)Δaa 856-906	(Bold <i>et al.</i> , 1996)
pRC/CMVgB(Del4)	HCMV-IE Promotor/Enhancer, <i>Amp^r</i> , <i>Neo^r</i> , pA, HCMVgB (UL55)Δaa 856-906	(Bold <i>et al.</i> , 1996)
pRC/CMVgB(Del5)	HCMV-IE Promotor/Enhancer, <i>Amp^r</i> , <i>Neo^r</i> , pA, HCMVgB (UL55)Δaa 780-825	(Bold <i>et al.</i> , 1996)
pRC/CMVgB(MhdI)	HCMV-IE Promotor/Enhancer, <i>Amp^r</i> , <i>Neo^r</i> , pA, HCMVgB (UL55)Δaa 714-747	(Reschke <i>et al.</i> , 1995)
pRC/CMVgB(MhdII)	HCMV-IE Promotor/Enhancer, <i>Amp^r</i> , <i>Neo^r</i> , pA, HCMVgB (UL55)Δaa 751-771	(Reschke <i>et al.</i> , 1995)
pRC/CMVgB(sINM)	HCMV-IE Promotor/Enhancer, <i>Amp^r</i> , <i>Neo^r</i> , pA, HCMVgB (UL55) 885D-A,	(Meyer & Radsak, 2000)

	886R-A, 889H-E, 890R-E	
pRC/CMVgBΔFur	HCMV-IE Promotor/Enhancer, <i>Amp^r</i> , <i>Neo^r</i> , pA, HCMVgB (UL55) 456R-A, 459R-A	Diese Arbeit
pRC/CMVgBΔFur	HCMV-IE Promotor/Enhancer, <i>Amp^r</i> , <i>Neo^r</i> , pA, HCMVgB (UL55) Δaa 1-24	Diese Arbeit
bac2_3frt	<i>Amp^r</i> , <i>Kan^r</i> , 2FRT, pA, HCMVgB (UL55) partiell, gB-Promotor	Diese Arbeit
pIRESHyg	HCMV-IE Promotor/Enhancer, <i>Amp^r</i> , <i>Hyg^r</i> , pA, IRES	Clontech, Palo Alto, USA
pEGFP	<i>Amp^r</i> , <i>Hyg^r</i> , pA, IRES, EGFP	Clontech, Palo Alto, USA
pBR322	<i>Amp^r</i> , <i>Tet^r</i>	Invitrogen, Leek, Netherlands
pUC18	<i>Amp^r</i>	Invitrogen, Leek, Netherlands
pUC1854H56	<i>Amp^r</i> , UL54, UL56, pA, <i>Hyg^r</i>	(Strive, 1997)
pUC18ABΔFur-tet	<i>Amp^r</i> , UL54, PgB, gBΔFur, <i>Tet^r</i>	Diese Arbeit
pUC18ABsINM-tet	<i>Amp^r</i> , UL54, PgB, gBsINM, <i>Tet^r</i>	Diese Arbeit
pUC18ABΔMhdi-tet	<i>Amp^r</i> , UL54, PgB, gBΔMhdi, <i>Tet^r</i>	Diese Arbeit
pCP15	<i>Amp^r</i> , 2FRT, <i>Kan^r</i>	(Cherepanov & Wackernagel, 1995)
pCP20	<i>Amp^r</i> , <i>Cam^r</i> , <i>FLP^r</i> , λcl857 ⁺ , λ p _R , Rep ^{ts}	(Cherepanov & Wackernagel, 1995)
pST76K_SR	<i>Kan^r</i> , Rep ^{ts} , <i>RecA⁺</i> , <i>SacB⁺</i>	(Posfai <i>et al.</i> , 1997)
pST76K_SRΔFur	<i>Kan^r</i> , Rep ^{ts} , <i>RecA⁺</i> , <i>SacB⁺</i> , gBΔFur	Diese Arbeit
pST76K_SRsINM	<i>Kan^r</i> , Rep ^{ts} , <i>RecA⁺</i> , <i>SacB⁺</i> , gBsINM	Diese Arbeit
pST76K_SRΔMhdi	<i>Kan^r</i> , Rep ^{ts} , <i>RecA⁺</i> , <i>SacB⁺</i> , gBΔMhdi	Diese Arbeit
pACYC177	<i>Kan^r</i>	(Chang & Cohen, 1978)
pCDNA3/pp71	HCMV-IE Promotor/Enhancer, <i>Amp^r</i> , BGHpA, HCMVpp71 (UL82), SV40 Promotor, <i>Neo^r</i> , SV40pA	(Baldick <i>et al.</i> , 1997)
pCM1029	<i>Amp^r</i> , <i>Tet^r</i> , HCMV nt65450-108606, λCos	(Fleckenstein <i>et al.</i> , 1982)
pHB5	<i>Cam^r</i> HCMV nt 1-193360; nt 197398-229354	(Borst <i>et al.</i> , 1999)

5.16 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Life Technologies bezogen.

Tabelle 4: Oligonukleotide.

Die Genomposition bezieht sich auf die publizierte vollständige Sequenz des Humanen Cytomegalievirus Stamm AD169 (Chee *et al.*, 1990). * bezeichnet die Position auf dem Plasmid *pIRESHyg*, ** die Position auf *pEGFP* und *** die Position auf den Vektor *pRC/CMV*. Kursive Buchstaben bezeichnen Nukleotidsequenzen, die nicht komplementär zum Genom des AD169 sind. Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen sind unterstrichen.

Oligonukleotid	Sequenz	Genomposition
<i>bac2 5c</i>	5'- GACTGAATTCCCTGTGTATCGTCTGTCTGGGTG CTGC-3'	83428-83454
<i>bac2 3c</i>	5'-CTACCTCGAGTTCGAAGACGGACACGTTTCC-3'	82227-82247
<i>gB-(FurA)</i>	5'-CAGTCTGAATATCACTCATGCGACCCGGGCAAG TACGAGTGAC-3'	82104-82146
<i>gB-(Fur)B</i>	5'-GTCACTCGTACTTGCOCGGGTGCATGAGTGAT ATTCAGACTG-3'	82104-82146
<i>gB-L.for</i>	5'-GCGTACGTGATGAGGCTATAAATAAGTTACAGCA GATTTTCAATACTTCATACAATCAAACACTACAAGG ACGACGACGACAAGTAA-3'	82260-82321
<i>gB-L.rev</i>	5'-GTCTGACCGTCGAACATGACACCTCGCGGCACG ATCTGCAAAAAGTCTTTCTGTGGCGGCCGTGACAC AGGCACACTTAACGGCTGA -3'	80468-80529
<i>HomB XbaI</i>	5'-CAA <u>TC</u> TAGACGCGCACCGAAGCACGCACAAAG C-3'	78317-78347
<i>kontr.54V/2</i>	5'-GCAGTATCTCCACCGTCGACAGCATGATCG-3'	81577-81548
<i>kontr.pla/2</i>	5'-CCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGC-3'	3598-3627*
<i>LinkerC</i>	5'-AGCTAGGCCTCGCGAGTCATATGTCGCGGCCG <u>CTCTAGAGCTAGCAGGCCT</u> -3'	Synthetischer Linker
<i>LinkerD</i>	5'-AATTAGGCCTGCTAGCTCTAGAGCGGCCGCGA <u>CATATGACTCGCGAGGCCT</u> -3'	Synthetischer Linker

<i>pgBA</i>	5'-GGTCTACAAGCGCAACATCGTGG-3'	83112-83090
<i>pgBBR</i>	5'-GGTGTAGATGTAAGCGTAGCTACG-3'	83019-83042
<i>pgBC</i>	5'-CCCGAACTACACCATCGTTTCCG-3'	82593-82571
<i>pgBD</i>	5'-GTCCAGCATGGAATCGGTGCAC-3'	82086-82065
<i>pgBE</i>	5'-CGCATGATTGACCTCAGCAGTATCTC-3'	81593-81568
<i>pgBF</i>	5'-CCACCGTGACGTCCGGCAGCACC-3'	81109-81087
<i>pgBFR</i>	5'-TGCTGACCCAGTAGCGGGAGG-3'	84161-84181
<i>pgBGR</i>	5'-CGTGAGAATCACATCTCTGTCCGG-3'	83808-83826
<i>pgB/L</i>	5'-CGACTTTGATGATGGCCAGCAACA-3'	84670-84693
<i>pgB/R</i>	5'-ATTAGGATCCAGGTTAACGCAGACTACCAGG-3'	83451-83472
<i>ResFur2</i>	5'-TCAGACGTTCTTCTTTCGTCCGAGTCTTTCAAG TG-3'	80772-80807
<i>ResFur3</i>	5'-CACTTGAAAGACTCCGACGAAGAAGAGAACGTC TGA-3'	80807-80772
<i>RevSigDelgB</i>	5'-CTGGACAAATGAGTTGTATTATTGTCACTC-3'	82081-82110
<i>RLA</i>	5'-ATGAAGATCTTGAGGC-3'	81637-81652
<i>seq 5ω</i>	5'-GATTGACATCGATGAGC-3'	84351-84367
<i>seq-gB-15</i>	5'-CCTATCGCGTGTGTTCTATG-3'	83224-83205
<i>seq-gB-16</i>	5'-GCGCCACGATGTTGCGCTTG -3'	83087-83106
<i>seq-PgB-3'</i>	5'-CCAAGCCCTCCACCCTGAC-3'	83672-83654
<i>Seq-GFP-rev</i>	5'-CGGTGGTGCAGATGAACTTC-3'	423-442**
<i>SeqIRES</i>	5'-TGCTGCTGCCCGACAACC-3'	869-885**
<i>selec54V/2</i>	5'-CCAGTCGTAACGATTCACGGAGCACCAGC-3'	79843-79871
<i>selec56V</i>	5'-CTGCGACGAACACGAGGCTCTCGAC-3'	84532-84508
<i>SigDelgB</i>	5'-TCTTCTAGTACTTCCCATGCAACTTCTTCT-3'	83420-83391
<i>SigDelgB1T</i>	5'-CACTATAGGGAGACCCAAGCTTGGTACCG-3'	874-902***
<i>SigDelgB2T</i>	5'-GTACTAGAAGACATGTTTCGTCCGGGCCAAATC CAG-3'	83410-83420 83490-83514

<i>SigDelgB3T</i>	5'-CGACGAACATGTCTTCTAGTACTTCCCATGCAAC TTCTTCTACTCAC-3'	83386-83420 83490-83500
<i>SigDelgB4T</i>	5'-GAGTGATATTCAGACTGGAT <u>CGATT</u> GGCC-3'	82130-82158

6. Methoden

6.1 Molekularbiologische Methoden

Soweit nicht anders angegeben, entsprechen die in der Arbeit angewendeten molekularbiologischen Methoden den Standardverfahren nach Sambrook *et al.* (1989).

6.1.1 Isolierung von Plasmid- DNA

Für die Isolierung von bis zu 20 µg Plasmid- DNA aus Bakterien wurde das „QIAprep Spin Kit“ der Firma Qiagen entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet.

Für die Isolierung grosser Mengen Plasmid- DNA wurde das „QIAfilter Plasmid Maxi Kit“ nach den Angaben des Protokolls eingesetzt.

6.1.2 Isolierung von BAC- DNA

Für die Präparation kleiner Mengen BAC- DNA (bis 5 µg) wurde die Methode der alkalischen Lyse nach Sambrook *et al.* (1989) leicht modifiziert. Es wurden 9 ml einer Übernachtskultur 5 Minuten bei 3500 rpm sedimentiert (Rotina 48R) und der Überstand abgeschüttet. Das Bakterienpellet wurde in 200 µl Lsg 1 resuspendiert und in ein 2 ml Eppendorfreaktionsgefäss überführt. Zur Lyse der Zellen wurden 300 µl Lsg 2 zugegeben. Der Ansatz wurde zehnmals vorsichtig invertiert und für 5 min bei RT inkubiert. Das Abstoppen der Lyse erfolgte durch Zugabe von 300 µl Lsg 3, zehnmaligem Invertieren und anschliessender Inkubation für 10 Minuten bei 4°C. Die denaturierten Proteine und die daran assoziierte genomische DNA wurde durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 13000 rpm abgetrennt (MinifugeT) und der geklärte Überstand in einem neuen Reaktionsgefäss durch Zugabe von 600 µl Isopropanol gefällt. Die präzipitierte DNA wurde durch erneute Zentrifugation bei 13000 rpm für 20 min sedimentiert, mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen, kurz getrocknet und mit 200 µl TE- Puffer (20 µg/ml RnaseA) aufgenommen.

Lsg 1 (pH 8,0)

Glucose	50 mM
EDTA	10 mM
Tris/ HCL	25 mM
RNAseA	20 µg/ml

Lsg 2 (pH 12,5 – 13,5):

NaOH	0,2 M
SDS	1% w/v

Lsg 3:

Kaliumacetat	3 M
--------------	-----

Für die Isolierung grosser Mengen BAC- DNA wurde das „Nucleobond PC500 Kit“ der Firma Macherey/Nagel verwendet. Die Präparation wurde entsprechend dem vom Hersteller angegebenen Protokoll für die Isolation von Cosmiden/ Low Copy Plasmiden durchgeführt.

6.1.3 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA in wässriger Lösung wurde in einer Quarzküvette gegen einen Blindwert von *a. bidest* photometrisch bestimmt. Dazu wurde ein „Gene Quant II RNA/DNA Calculator“ der Firma Pharmacia verwendet. Einer ΔE_{260nm} von 1 entsprechen dabei näherungsweise Konzentrationen von 50 µg/ml für doppelsträngige DNA, 40 µg/ml für einzelsträngige DNA und 20 µg/ml Oligonukleotide (Sambrook, 1989).

6.1.4 Restriktion von Nukleinsäuren

Zur analytischen Restriktion von DNA wurden 0,2 – 1 µg Plasmid- DNA bzw. 1- 2 µg BAC- DNA eingesetzt. Präparative Restriktionen aus Plasmiden wurden mit 5- 20 µg DNA durchgeführt. Es wurden Endonukleasen und Pufferlösungen der Firma New England Biolabs den Angaben des Herstellers entsprechend verwendet.

6.1.5 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von geschnittener Plasmid- DNA zur Analyse oder zur Gewinnung definierter Fragmente erfolgte in 1%igen Agarosegelen in 1 x TAE- Puffer. Für die Elektrophorese wurde eine horizontale Gelkammer verwendet und eine Spannung von 8V/cm Gellänge angelegt.

Die Auftrennung von BAC- DNA nach analytischer Restriktion erfolgte in 0,8%igen Agarosegelen in 0,5 x TBE- Puffer. Die angelegte Spannung betrug hier 4 V/cm Gellänge.

Alle DNA- Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit 6 x DNA- Probenpuffer versetzt. Die Agarosegele enthielten eine Endkonzentration von 0,2 µg /ml Ethidiumbromid. Zur photographischen Dokumentation wurde eine Polaroid Photoausrüstung der Firma Kodak verwendet.

TBE- Puffer siehe 5.11 Puffer

TAE- Puffer siehe 5.11 Puffer

6 x DNA- Probenpuffer

Glycerin 30,00% w/v

Bromphenolblau 0,25% w/v

Xylenxyanol 0,25% w/v

a. bidest

6.1.6 Elution von DNA aus Agarosegelen

Zur Elution definierter DNA Fragmente aus Agarosegelen nach präparativer Restriktion wurde das „QIAquick Gel Extraction Kit“ der Firma Qiagen gemäss den Angaben des Herstellers verwendet.

6.1.7 Dephosphorylierung linearer DNA- Fragmente

Zur Entfernung der 5'- Phosphatgruppen linearer DNA- Fragmente wurde die „calf intestine alkaline phosphatase“ sowie die dazugehörige Pufferlösung der Firma Roche Molecular Biochemicals entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet.

6.1.8 Auffüllreaktion überhängender 5'- Enden

Für die Auffüllreaktion überhängender 5'- Enden linearisierter DNA wurde das Klenow- Fragment der DNA- Polymerase I (Roche Molecular Biochemicals) verwendet, welches noch seine 5'=> 3'- Polymerase- und 3'=> 5'- Exonuklease-, nicht aber die 5'=>3' Exonukleaseaktivität besitzt. Die Reaktion wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

6.1.9 Ligation von DNA- Fragmenten

Die Ligation linearisierter Vektor- und Insert- DNA erfolgte mittels der T4- DNA- Ligase, welche unter ATP- Verbrauch 3'- OH mit 5'- Phosphat- Enden verbindet. Die linearisierte Vektor- DNA wurde in einem molaren Verhältnis von ca. 1:10 zur Insert- DNA eingesetzt. Verwendet wurde die T4- DNA- Ligase der Firma MBI Fermentas und der mitgelieferte ATP- haltige Puffer. Die Inkubationszeiten bei 16°C variierten zwischen 2 und 24 Stunden.

6.1.10 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*

Zur Herstellung elektrokompetenter Bakterien wurden 100 ml TB- Medium 1: 400 mit einer frischen ÜN- Kultur beimpft und für 5 – 6 Stunden bis zu einer OD₅₉₅ von 2 auf einem Schüttler bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Die Verwendung von TB- Medium ermöglicht eine Kultivierung der Bakterien bis zu dieser hohen Zelldichte, ohne dass sie ihre Fähigkeit verlieren, Fremd- DNA aufzunehmen (Mülhardt, 2000). Die Bakterien wurden auf 4°C abgekühlt und durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 5000 rpm sedimentiert (Rotina48R). Das Bakterienpellet wurde 5 mal mit 50 ml eiskaltem *a. bideest* gewaschen und in 2 ml *a. bideest* mit 10% Glycerin (w/v) resuspendiert. Die Bakterien wurden entweder direkt für die Elektroporation verwendet oder als 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

TB- Medium

siehe 5.10 Medien

6.1.11 Transformation elektrokompenter Bakterien.

50 µl der elektrokompenten Bakterien wurden mit 1 µl Ligationsansatz, Plasmid- oder BAC- DNA vermischt und in eine Elektroporationsküvette (Biorad) mit einem Elektrodenabstand von 2 mm gefüllt. Ein Puls mit einer Spannung von 2,5 kV, einer Kapazität von 25 µF und einem elektrischen Widerstand von 400 Ω (Gene Pulser, Biorad) ermöglichte die Aufnahme der DNA, wobei die Zeitkonstanten zwischen 8 und 9 lagen. Die Bakterien wurden mit 950 µl SOC- Medium versetzt, in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt, für 60 Minuten bei 37°C inkubiert und anschliessend auf LB-Agarplatten ausgestrichen.

SOC- Medium (pH 7,0) siehe 5.10 Medien

LB- Agar siehe 5.10 Medien

6.1.12 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde entweder für den qualitativen Nachweis eines gesuchten DNA- Abschnittes, zur Produktion von Fragmenten für Subklonierungen oder zur gerichteten Mutagenese verwendet (6.1.14, 6.1.15).

Die Reaktionen wurden in 200 µl- Reaktionsgefässen in einem „GeneAmp PCR System 2400“ (Applied Biosystems), durchgeführt.

Zunächst wurde die DNA- Matritze je nach Grösse zwischen 30 Sekunden und 3 Minuten vollständig denaturiert. Danach folgte der Reaktionszyklus, der 30 bis 40 mal wiederholt wurde: Im ersten Schritt wurde die DNA erneut denaturiert, im zweiten folgte die Hybridisierung der Oligonukleotide für 20 bis 30 Sekunden. Die Temperatur für die Anlagerung der Oligonukleotide richtete sich nach ihren jeweiligen Schmelztemperaturen, die nach folgender Formel berechnet wurden: $T_M (^{\circ}\text{C}) = 81,5 + 0,41 \times (\% \text{ GC- Gehalt}) - 600/N + 16,6 \times \log M$, wobei N für die Anzahl der bindenden Nukleotide des Oligonukleotids steht und log M der dekadische Logarithmus der Molarität der Na^+ - und K^+ - Konzentration ist (Sambrook *et al.*, 1989). Die Dauer des folgenden Amplifikationsschrittes bei 72°C richtete sich nach der Grösse des

erwarteten Fragments und wurde mit 1 Minute/1000 bp kalkuliert. Eine abschliessende Inkubation bei 72°C für 7 Minuten diente der Vervollständigung der Amplifikate.

Die Reaktionsansätze enthielten je 200µM dATP, dCTP, dGTP und dTTP (Applied Biosystems), 10 bis 50 pmol Oligonukleotide, 20 – 200 ng DNA-Matritze und 2,5 bis 5 Einheiten DNA- Polymerase, bei einem Gesamtvolumen von 50 µl.

Es wurden Reaktionspuffer und AmpliTaq- DNA- Polymerase der Firma Applied Biosystems verwendet.

6.1.13 Reinigung von PCR- Produkten

Für die Entfernung von Salzen und Oligonukleotiden aus der abgeschlossenen PCR- Reaktion sowie für die Entsalzung von Restriktionsverdau wurde das „QIAQuick PCR Purification Kit“ entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet.

6.1.14 Ortsgerichtete *in vitro* Mutagenese von Plasmiden

Für das Einbringen von Punktmutationen in Plasmide wurde das „QuickChange site directed mutagenesis Kit“ der Firma Stratagene entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Die dazu notwendigen zwei Oligonukleotide werden so konstruiert, dass sie die gewünschten Substitutionen tragen und komplementär zueinander sind. Um die Überprüfung der Plasmide nach der Mutagenese zu erleichtern, wurden durch die Substitutionen neue Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen eingeführt. Während der Mutagenesereaktion, die in einem „GeneAmp PCR System 2400“ (Applied Biosystems) durchgeführt wurde, wurde zunächst das zu mutagenisierende Plasmid durch Hitze denaturiert. In einem zweiten Schritt konnten die Oligonukleotide an ihre jeweils komplementären Einzelstränge binden. Daraufhin erfolgte die Zweitstrangsynthese durch *Pfu-Turbo*- DNA- Polymerase. Dieser Vorgang wurde 18 mal wiederholt. Die ursprüngliche DNA- Matritze wurde durch Behandlung mit der Restriktionsendonuklease *DpnI* entfernt. *DpnI* schneidet doppelsträngige

DNA an der Basensequenz GATC, wenn das Adenosin eine Methylgruppe trägt. Da nur Bakterien, sofern sie Ihre Methylaseaktivität noch besitzen in der Lage sind, DNA zu methylieren, bleibt nach *DpnI*- Restriktion nur die *in vitro* synthetisierte, unmodifizierte DNA übrig, welche die eingeführten Mutationen trägt. Diese wurde in Bakterien transformiert (6.1.11), die Plasmid- DNA aus den Bakterienklonen extrahiert (6.1.1) und analysiert (6.1.4).

6.1.15 Mutagenese durch rekombinante PCR

Die Mutagenese durch rekombinante PCR wurde zur gezielten Deletion von DNA- Abschnitten verwendet. Bei dieser Methode werden in zwei unabhängigen PCR- Reaktionen zunächst die Abschnitte amplifiziert, welche die zu deletierende Region flankieren (Abb. 5, PCR a und b). Die an den zu deletierenden Bereich angrenzenden Oligonukleotide 2 und 3 tragen hierbei jeweils einen Abschnitt von ca. 10 überhängenden Basenpaaren am 5'-Ende, die erst wieder zur DNA jenseits der Deletion homolog sind. Da jeder dieser Primer aber auch 20 bp enthält, die diesseits der Deletion binden, kann man mit der Wahl der geeigneten Temperaturen eine zu diesem Zeitpunkt noch nicht gewünschte Hybridisierung der überhängenden Enden an ihre komplementären Bereiche verhindern. Die jeweiligen Gegenprimer 1 und 4 werden so positioniert, dass sie einen Bereich der DNA mit einschließen, in dem sich eine singuläre Schnittstelle des zu mutagenisierenden Gens befindet.

Die ursprüngliche DNA- Matritze wird durch *DpnI*- Behandlung entfernt (siehe 6.1. 14).

In einer dritten PCR werden die *DpnI* behandelten Amplifikate aus PCR a und b als Matritze eingesetzt (Abb. 5, PCR c). Durch die in den Reaktionen a und b eingebrachten Überhänge, die komplementär zueinander sind, kommt es zu einer Hybridisierung der Amplifikate aneinander, beide können jetzt mit den Oligonukleotiden 1 und 4 amplifiziert werden. Mittels Restriktion an den singulären Schnittstellen kann nun der ursprüngliche Bereich aus dem Plasmid entfernt und durch den amplifizierten Bereich mit der gewünschten Deletion in einer Ligationsreaktion (6.1.9) ersetzt werden.

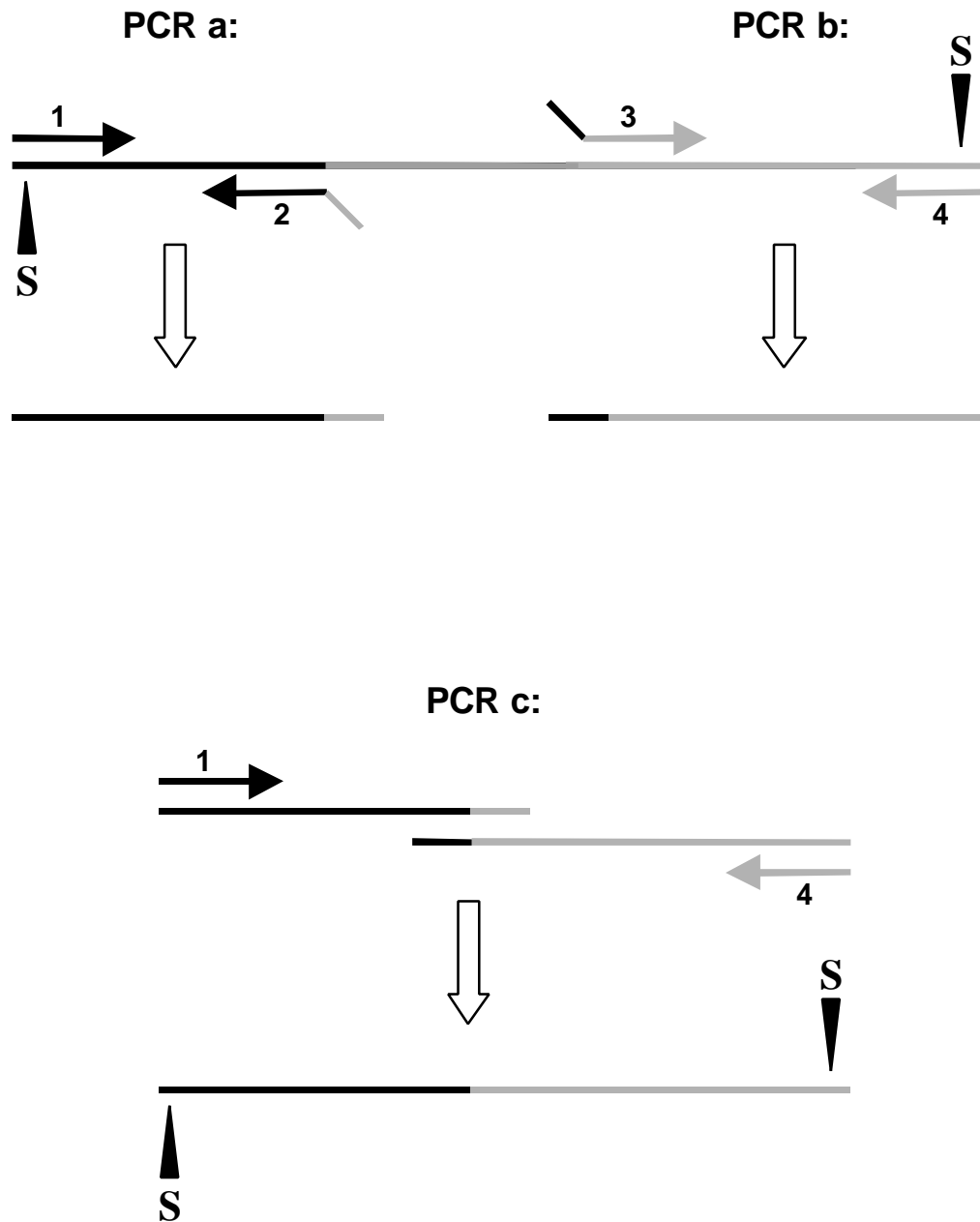


Abbildung 5: Einbringen von Deletionen in Plasmide durch rekombinante PCR.

S = singuläre Restriktionsendonukleaseschnittstelle.

6.1.16 DNA- Sequenzierung

Die hier angewandte Sequenzierreaktion basiert auf der Kettenabbruchmethode mit Didesoxynukleotiden. Dabei wurde der „ABI PRISM BigDye Terminator cycle ready reaction mix“ der Firma Applied Biosystems verwendet. Die verschiedenen Didesoxynukleotide sind hierbei

mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, so dass eine Analyse der Probe in nur einer Gelspur erfolgen kann.

Für die Reaktion wurden 1 µg DNA, 10 pmol des Sequenzier-Oligonukleotids und 4 µl des Reaktionsmixes, in dem die fluoreszenzmarkierten Oligonukleotide, der Reaktionspuffer und die Polymerase bereits enthalten waren, eingesetzt. Nach dem Auffüllen des Reaktionsvolumens mit *a. bidest* auf 20 µl konnte die zyklische Reaktion gestartet werden (GeneAmp PCR System 2400). In 25 Zyklen wurde die Probe zunächst für 30 Sekunden auf 96°C erhitzt, es folgte die Anlagerung der Oligonukleotide für 15 Sekunden bei 50°C und die anschließende Polymerisation für vier Minuten bei 60°C. Nach der Reaktion wurde die Probe mit 80 µl *a.bidest* aufgefüllt und durch Zugabe von einem zehntel Volumen 3M Natriumacetat (pH 5,2) und zweieinhalb Volumen Ethanol (96%) präzipitiert. Nach 30- minütiger Zentrifugation bei 13000 rpm (Biofuge pico) wurde der Überstand entfernt, das Sediment mit 200 µl Ethanol (70%) gewaschen und die DNA in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Das Präzipitat wurde in 4 µl Sequenzierprobenpuffer resuspendiert und vor dem Auftragen auf das Sequenziergel für fünf Minuten bei 95°C denaturiert.

Die Sequenzierproben wurden mit einem ABI PRISM™377 Sequencer der Firma Applied Biosystems aufgetrennt. Die Aufnahme der Rohdaten erfolgte mittels eines Argonlasers, der die Fluoreszenzfarbstoffe zur Emission anregt. Die Lichtimpulse wurden mit einer Kamera aufgenommen und zur Auswertung digitalisiert. Mit einem Computerprogramm (ABI PRISM™377 Data Collection Programs) konnten die Sequenzierdaten errechnet und ausgedruckt werden.

Sequenzierprobenpuffer

Formamid	80% (v/v)
Dextranblau	1% (v/v)
EDTA	5 mM
<i>a. bidest</i>	

6.1.17 BAC Mutagenese mit linearen Fragmenten

Diese Art der Mutagenese stellt eine schnelle Möglichkeit zum Einbringen gezielter Deletionen in die grossen BAC- Moleküle dar (Adler *et al.*, 2000, Borst *et al.*, 2001, Muyrers *et al.*, 1999). Dazu wird ein selektionierbarer genetischer Marker, wie z.B. das Gen für Kanamycin mittels PCR (6.1.12) amplifiziert. Die für die spezifische, gezielte Rekombination an beiden Seiten des Markers notwendigen homologen Regionen (Abb. 6, 2 a und b) sind bei dieser Methode nur 50 – 60 bp lang und werden durch nichtkomplementäre Überhänge an den 5'- Enden der Oligonukleotide zur Verfügung gestellt, so dass in nur einer PCR- Reaktion die komplette Cassette für die homologe Rekombination hergestellt werden kann. Die Resistenzcassette im linearen Fragment wird flankiert von zwei kurzen Sequenzwiederholungen von 65 bp, den FRT- Sequenzen (FRT= *Flp*- *Recombinase*- *Target* sites).

Für die Rekombination wurden zunächst Bakterien (*E.coli* JC8679) mit dem parentalen BAC- Plasmid pHB5 transformiert (6.1.11) (Abb. 6, 1).

Diese Bakterien wurden nun zusätzlich mit dem amplifizierten linearen DNA-Fragment transformiert und vor dem Ausplattieren auf LB- Agarplatten (17 µg/ml Chloramphenicol (Cam) und 30 µg/ml Kanamycin (Kan)) für eine Stunde bei 37°C in LB- Medium inkubiert. Durch homologe Rekombination zwischen dem BAC- Plasmid und dem linearen Fragment kann die Kanamycinresistenz in das BAC integrieren (Abb. 6, 2). Kanamycinresistente Bakterienklone wurden durch Restriktionsendonukleaseverdau (6.1.4) überprüft.

Um die Kanamycinresistenz wieder zu entfernen, wurde das Plasmid pCP20 (5.15) in Bakterien elektroporiert, die bereits das mutagenisierte BAC- Plasmid trugen. pCP20 codiert für das Enzym *Flp*- Recombinase (Cox, 1983), das die Rekombination zwischen zwei FRT- Sequenzen katalysiert. Die FRT- Sequenzen, die das Kanamycin- Gen flankieren, liegen in der gleichen Orientierung vor, so dass nach dem Auflösen der homologen Rekombination der dazwischenliegende Genabschnitt entfernt wird. Eine der FRT- Sequenzen verbleibt nach der Rekombination im BAC. Das *Flp*- Gen im Plasmid steht unter der Kontrolle des Bakteriophagen- λ - P_R- Promotors, der wiederum vom temperatursensitiven λ - Repressor cI857 reguliert wird.

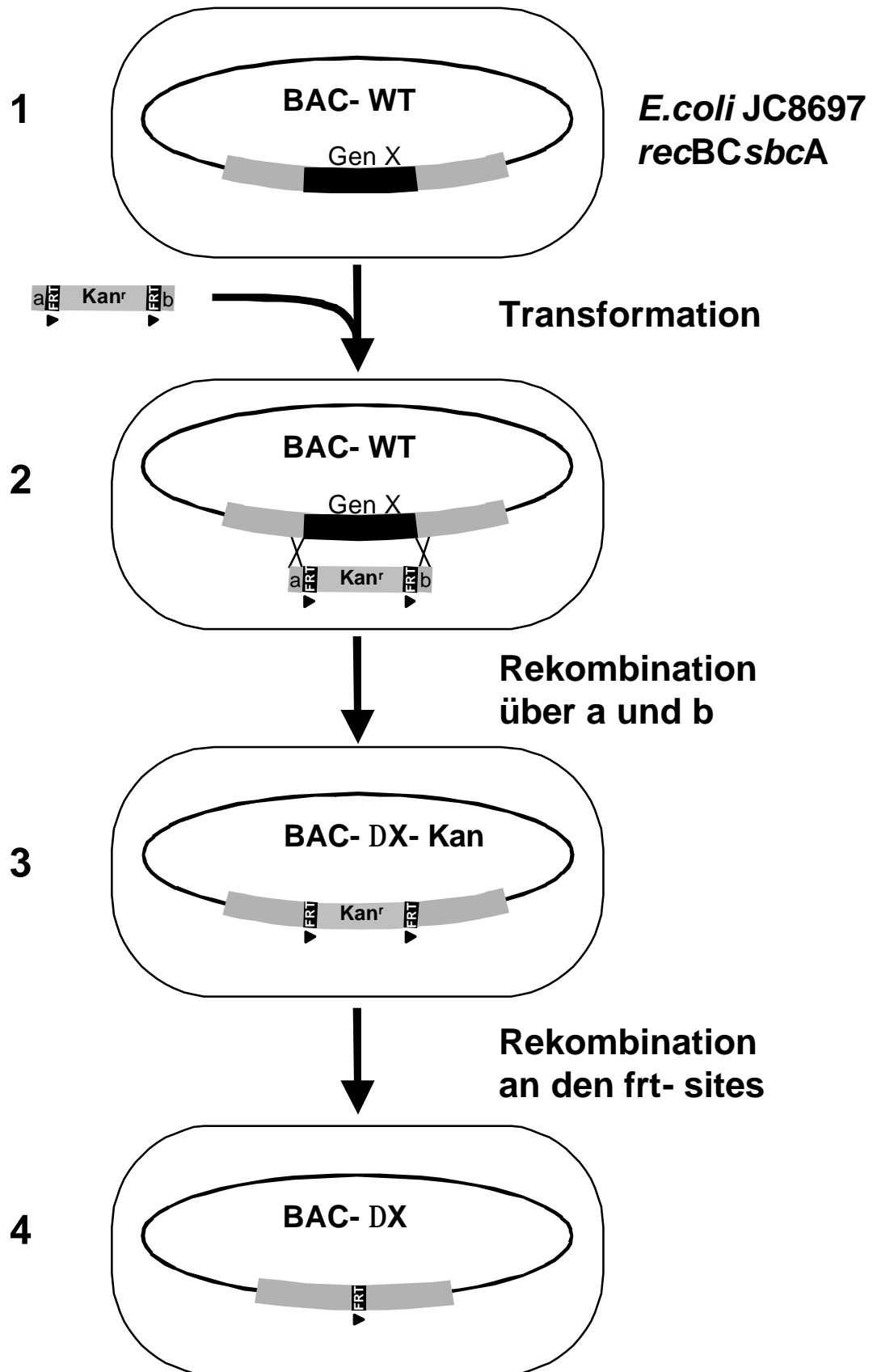


Abbildung 6: BAC- Mutagenese mit linearen Fragmenten.

Abkürzungen: Kan^r = Kanamycinresistenzgen, FRT = *F*₁*p*- Recombinase Erkennungssequenz.

Ausserdem trägt das Plasmid pCP20 einen temperatursensitiven Replikationsursprung. Die Inkubation bei 30°C erfolgte zunächst auf Agarplatten, die zur Selektion der BAC- Plasmide 17 µg/ml Cam und zur Selektion des Plasmides pCP20 100 µg/ml Ampicillin (Amp) enthielten. Die Bakterien wurden erneut ausplattiert, in diesem Schritt auf Agarplatten, die nur Chloramphenicol enthielten. Die Inkubation erfolgte für 16h bei 43°C, um die Expression der *Flp*- Rekombinase zu induzieren. Die entstandenen Klone wurden durch paralleles Ausplattieren auf Agarplatten sowohl mit Cam und Kan als auch auf Platten nur mit Cam und Inkubation bei 37°C auf den Verlust des Kan- Resistenzgens hin überprüft. Die kanamycinsensitiven Klone wurden durch Restriktionsendonukleasebehandlung (6.1.2, 6.1.4) analysiert. Zur Amplifikation der rekombinanten BAC- DNA wurde diese aus den *E. coli* JC8679 isoliert und in *E. coli* DH10B transformiert.

6.1.18 Zwei- Schritt- Rekombinationsmutagenese im BAC- Plasmid

Bei der in Abschnitt 6.1.17 beschriebenen BAC- Mutagenese mit linearen Fragmenten verbleibt nach Entfernung des Resistenzgens durch homologe Rekombination eine der FRT- Sequenzen im BAC. Bei der BAC Mutagenese mittels zwei- Schritt- Rekombination (Messerle *et al.*, 1997) können ganz gezielt nur die gewünschten Mutationen gesetzt werden; die zur Selektion notwendigen Resistenzmarker werden rückstandsfrei entfernt.

Für diese Mutagenese wurde das Transfer- Plasmid pST76K_SR (5.15) verwendet, welches sich durch folgende Eigenschaften auszeichnet: Es trägt einen temperatursensitiven Replikationsursprung, das Gen für Kanamycinresistenz, das *RecA*- Gen, welches die homologe Rekombination ermöglicht und das *SacB* Gen als Negativselektionsmarker. *SacB* codiert für das Enzym Levansucrase aus *Bacillus subtilis*, welches Sucrose in Glucose und das für die Bakterien toxische Fructan spaltet.

In dieses Plasmid wird eine Rekombinationskassette inseriert, welche den DNA- Abschnitt mit der gewünschten Mutation trägt. Dieser Abschnitt wird flankiert von zwei gleich grossen DNA- Abschnitten von 2 kb Länge, welche identisch sind mit den Genabschnitten, die auch den zu mutagenisierenden Bereich auf dem BAC- Plasmid flankieren.

Dieses Transfer- Konstrukt wurde in *E. coli* DH10B (5.14) transformiert (6.1.11), welche bereits das parentale BAC- Plasmid trugen (Abb. 7A). Die Bakterien wurden auf Agarplatten ausgestrichen, die 17 µg/ml Chloramphenicol (Cam) und 30 µg/ml Kanamycin (Kan) enthielten. Durch die Inkubation für 18 Stunden bei 30°C hatten die Bakterien die Möglichkeit, durch Rekombination über eine der flankierenden homologen Regionen ein Cointegrat zu bilden (Abb. 7C). Zur Selektion der Bakterien, die ein solches Cointegrat gebildet hatten, wurden im nächsten Schritt die Bakterien auf Agarplatten mit Cam und Kan überimpft und für 18 Stunden bei 43 °C inkubiert. Die Bakterien ohne Cointegrate konnten bei dieser nichtpermissiven Temperatur das Transfer- Plasmid nicht mehr replizieren, verloren ihre Kanamycinresistenz und starben ab (Abb. 7B).

Bei einer anschliessenden Inkubation auf Agarplatten nur mit Cam für 18 Stunden bei 37°C hatten die Bakterien die Möglichkeit, das Cointegrat durch erneute homologe Rekombination entlang einer der homologen Bereiche wieder aufzulösen. Die Bakterien, die das Cointegrat aufgelöst und dadurch den Transfer- Vektor- Anteil wieder entfernt hatten, wurden im folgenden Schritt durch eine Inkubation für 18 Stunden bei 30°C auf Agarplatten mit 17 µg/ml Cam und 5% (w/v) Sucrose selektioniert. Sucrosesensitiv sind hier nur die Bakterien, die das Cointegrat nicht wieder aufgelöst haben und noch das *SacB*- Gen tragen (Abb. 7D).

Die Bakterien mit den aufgelösten Cointegraten (Abb 7E) wurden parallel auf Agarplatten mit 17 µg/ml Cam und 30 µg/ml Kan und auf Platten mit nur 17 µg/ml Cam auf ihre Kanamycinsensitivität hin getestet. BAC- DNA Kan-sensitiver Bakterienklone wurde mittels Restriktionsanalyse auf das Vorhandensein der Mutation untersucht.

Ein Einbringen der Mutation ins BAC- Genom findet nur statt, wenn das Cointegrat durch Rekombination über den einen homologen Bereich gebildet und durch Rekombination über den anderen homologen Bereich wieder aufgelöst wird. Da die Rekombinationshäufigkeit mit der Länge der homologen Regionen zunimmt, ist es entscheidend, dass beide möglichst gleich gross sind, damit die Rekombinationen nicht nur über einen Bereich erfolgen, was das Ausgangsmolekül wieder herstellen würde. Der Anteil an

rekombinanten Molekülen nach dem Auflösen der Cointegrate kann somit bei gleich grossen homologen Bereichen A und B maximal 50% betragen.

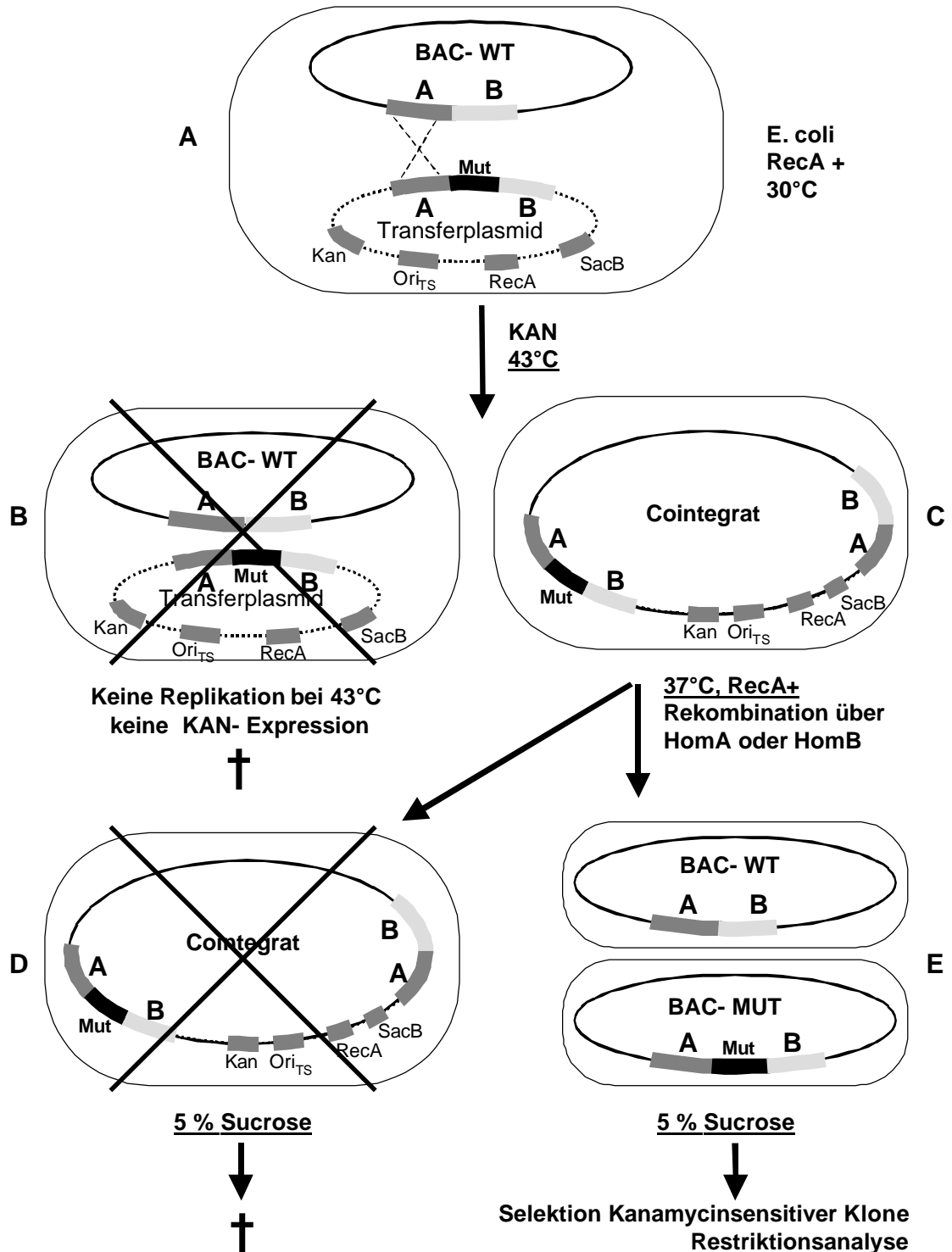


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Zwei- Schritt- Mutagenese im BAC Plasmid.

Abkürzungen: A, B = homologe Bereiche, Mut = eingebrachte Mutation.

6.2 Zellbiologische Methoden

6.2.1 Kultivierung von humanen Fibroblasten und COS7- Zellen

Die Kultivierung der primären embryonalen Lungenfibroblasten (MRC5), der primären Vorhautfibroblasten (HFF) und der COS7- Zellen erfolgte bei 37°C, bei 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit in „Dulbeccos Modified Eagles Medium“ (DMEM, Life Technologies) mit 10% fötalem Kälberserum (FCS, BioWhitaker). Bei Erreichen der Konfluenz wurde das Medium der Kulturen abgesaugt, der Monolayer einmal mit PBS- Puffer gewaschen und die Zellen mit Trypsin/EDTA- Lösung (40 µl/cm² Monolayer) (Life Technologies) bei 37° abgelöst. Durch vorsichtiges Pipettieren wurden die Zellen voneinander getrennt und im Verhältnis 1:3 (Fibroblasten) oder 1:10 (COS7- Zellen) in neue Kulturflaschen geteilt.

PBS- Puffer

siehe 5.11 Puffer

6.2.2 Einfrieren/Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren von Zellkulturen wurden diese kurz vor Erreichen der Konfluenz mit Trypsin/EDTA- Lösung abgelöst (siehe 6.2.1). Das Trypsin wurde durch Zugabe von 3 ml FCS (BioWhitaker) inaktiviert und die Zellen bei 750 rpm für 5 Minuten bei Raumtemperatur sedimentiert (Rotina 48R). Das Zellsediment wurde in eiskaltem DMEM mit 40% FCS aufgenommen (1 ml /5 x 10⁶ Zellen) und mit dem gleichen Volumen eiskaltem DMEM mit 20% Dimethylsulfoxid (DMSO) versetzt. Die Zellsuspension wurde in 1 ml Aliquots (je 2,5 x 10⁶ Zellen) in Polypropylen- Röhrchen (Nunc) gefüllt und zunächst für 24 h bei -80°C eingefroren. Zur langfristigen Lagerung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff (-196°C) aufbewahrt.

Eingefrorene Zellen wurden im 37°C Wasserbad aufgetaut und sofort in eine 25 cm²- Zellkulturflasche mit 5 ml DMEM mit 10% FCS überführt. 24 h nach dem Aussäen der Zellen wurde das Kulturmedium gewechselt, da das enthaltene DMSO bei Erwärmung toxisch auf die Zellen wirkt.

6.2.3 Transiente Transfektion von COS7- Zellen

Zur transienten Transfektion von COS7- Zellen wurde das „Lipofectamin 2000®- Reagent“ (Life Technologies) verwendet. Das Reagenz ist ein Gemisch aus kationischen Lipiden, die nach Komplexierung mit DNA die Aufnahme in die Zellen vermitteln.

Zur Transfektion wurden exponentiell wachsende COS7- Zellen verwendet, die in Zellkulturschalen (\varnothing 3 cm) mit Glasplättchen (\varnothing 12 mm) kultiviert wurden. Für die Transfektion wurde zunächst Lösung A bestehend aus 250 μ l Opti-Mem®I (Life Technologies) und 15 μ l Lipofectamin 2000®- Reagent angesetzt. Dann wurde Lösung B bestehend aus 250 μ l Opti-Mem®I und 5 μ g Plasmid- DNA zugegeben, vermischt und für 15 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit Opti-Mem®I gewaschen und mit dem Transfektionsansatz (Lösung A + B) überschichtet. Das Transfektionsmedium wurde nach 16 – 24 h durch frisches Kulturmedium ersetzt und die Transfektion nach 48 h ausgewertet.

6.2.4 Transfektion von BAC- DNA

Die Transfektion von BAC- DNA erfolgte mittels des „MBS- mammalian transfection Kit“ (Stratagene), nach der Methode der Calciumphosphat- präzipitation von Nukleinsäuren (Chen & Okayama, 1987). Dazu wurden primäre embryonale Lungenfibroblasten (MRC5) 16 Stunden vor Transfektion im Verhältnis 1:1,2 geteilt und in Zellkulturschalen (\varnothing 3 cm) ausgesät. 1 μ g BAC- DNA, 4 μ g Lachs- Sperma- DNA (Roche Molecular Biochemicals) sowie 1 μ g des Plasmides pCDNA3pp71 (5.15) wurden mit *a. bidest* auf ein Volumen von 75 μ l gebracht. Nach Zugabe von 8,3 μ l Sol I wurde der Ansatz vorsichtig durch Drehen des Gefäßes vermischt, um ein mechanisches Scheren der DNA zu vermeiden. Nach Zugabe von 83,3 μ l Sol II wurde erneut vorsichtig gemischt und der Reaktionsansatz zur Ausbildung der Präzipitate für 20 – 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Zellen wurden einmal mit DMEM gewaschen und mit 800 μ l DMEM überschichtet, welches 6% v/v Sol III enthielt. Der Präzipitationsansatz wurde

tropfenweise auf den Zellen verteilt, vorsichtig geschwenkt und für 3 – 4 Stunden im CO₂- begasten Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Um die Aufnahmeeffizienz zu verstärken, wurden die Zellen anschliessend mit einem osmotischen Schock behandelt. Dazu wurde der Transfektionsansatz abgesaugt und durch 1 ml eiskalte Glycerolschocklösung ersetzt. Nach exakt zwei Minuten wurden 2 ml DMEM zugegeben. Das Gemisch wurde abgesaugt und die Zellen vor der Zugabe von 5 ml DMEM mit 10% FCS noch zweimal mit DMEM gespült.

Sol I

CaCl₂ 2,5 M

Sol II

Die Zusammensetzung wird vom Hersteller nicht angegeben

Sol III

modifiziertes Rinderserum

Glycerolschocklösung (pH 7,13)

Hepes 25 mM

Na₂HPO₄ 0,75 mM

NaCl 140 mM

Glycerin 20% (w/v)

a. bidest

6.2.5 Cotransfektion von BAC- DNA und Expressionsplasmiden

Die Cotransfektionen von BAC- DNA und Expressionsplasmiden erfolgte ebenfalls mittels des MBS- mammalian transfection Kit (Stratagene) (siehe 6.2.4) Die primären embryonalen Lungenfibroblasten (MRC5) wurden 16 Stunden vor Transfektion im Verhältnis 1:1,2 geteilt und in 24er-Zellkulturschalen (Ø 1,2 cm) mit Deckgläsern ausgesät. 1µg BAC- DNA, 4 µg Expressionsplasmid sowie 1 µg des Plasmides pCDNA3pp71 (5.15) wurden

mit *a. bidest* auf ein Volumen von 75 µl gebracht. Nach Zugabe von 8,3 µl Sol I wurde der Ansatz vorsichtig durch Drehen des Gefäßes vermischt, um ein mechanisches Scheren der DNA zu vermeiden. Nach Zugabe von 83,3 µl Sol II wurde erneut vorsichtig gemischt und der Reaktionsansatz zur Ausbildung der Präzipitate für 20 – 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Zellen wurden einmal mit DMEM gewaschen und mit 200 µl DMEM mit 6% Sol III überschichtet. Der Präzipitationsansatz wurde tropfenweise auf vier Vertiefungen verteilt, vorsichtig geschwenkt und für 3 – 4 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Auch bei den Cotransfektionen wurden die Zellen anschliessend einem osmotischen Schock ausgesetzt. Der Transfektionsansatz wurde abgesaugt und durch 200 µl eiskalte Glycerolschocklösung ersetzt. Nach exakt zwei Minuten wurde der osmotische Schock durch Zugabe von 400 µl DMEM gestoppt. Das Gemisch wurde abgesaugt, jeder Ansatz zweimal mit 400 µl DMEM gespült und nach der Zugabe von 1 ml DMEM mit 10% FCS bis zur Auswertung im begasteten Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Sol I, Sol II, Sol III

siehe 6.2.4

Glycerolschocklösung (pH 7,13)

siehe 6.2.4

6.2.6 Virusanzüchtung

Zur Herstellung von Virusstocks wurden konfluente HF- Monolayer in 162 cm²- Kulturflaschen mit einer m.o.i. von 0,01 infiziert. Dazu wurde das Kulturmedium ausgetauscht und die Virussuspension zugegeben. Zu dem Zeitpunkt, an dem die Hälfte der Zellen eine deutliche zytopathische Veränderung zeigte, wurde das Medium erneut gewechselt, das Medienvolumen dabei auf 25 ml verringert. Nach weiteren fünf bis sechs Tagen wurde der Kulturüberstand geerntet und durch niedertourige Zentrifugation für 10 Minuten bei 3500 rpm von Zellbestandteilen getrennt (Rotina 48R). Der zellfreie virushaltige Überstand wurde aliquotiert und bei – 80°C eingefroren.

6.2.7 Virusankonzentrierung

Zur Konzentrierung von extrazellulären Virionen für biochemische Untersuchungen wurden Virusstocks (6.2.7) für 2 Stunden bei 100000g (Zentrifuge J2-21, Rotor SW28) sedimentiert, in Lysis- Puffer (Blanton & Tevethia, 1981) aufgenommen und lysiert. Die Virussuspension wurde hierbei um den Faktor 200 konzentriert.

Lysis- Puffer (pH9,0)

Tris/ HCL	20 mM
NaCl	300 mM
Glycerin	10% w/v
MgCl ₂	0,5 mM
CaCl ₂	1 mM
EDTA	2 mM
NP-40	0,5% v/v

a. bidest

6.2.8 HCMV- Wachstumskurven

Zur Bestimmung von HCMV- Wachstumskurven wurden konfluente HF-Kulturen verwendet. 5×10^5 Zellen wurden dazu 16 Stunden vor Infektion in 6er Zellkulturschalen (\varnothing 3,5 cm) ausgesät und mit einer m.o.i. von 0,1 infiziert. Die Virussuspension wurde mit DMEM auf ein Gesamtvolumen von 1 ml aufgefüllt und zur Infektion für zwei Stunden auf die Zell- Monolayer gegeben. Das Inokulum wurde entfernt, die Zellen zweimal mit PBS- Puffer gewaschen und mit 3 ml DMEM + 10% FCS im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Mit jeder Viruspräparation wurden drei unabhängige Kulturen infiziert, aus denen jeweils nach 1,3,5,7 und 9 Tagen 20 µl Kulturüberstand entnommen und für die Virustitration im Plaqueassay (6.2.10) verwendet wurden. Das Inokulum wurde ebenfalls in einer Dreifachbestimmung im Plaqueassay nachbestimmt, um die eingesetzte Virusmenge zu bestätigen.

6.2.9 Virustitration (Plaqueassay)

Zur Bestimmung der Anzahl der infektiösen Einheiten wurden Virusstocks oder Proben von Überständen infizierter Kulturen zunächst logarithmisch zur Basis zehn verdünnt. Dazu wurden in einer Zellkulturplatte mit 96 Vertiefungen zunächst mit einer Multikanalpipette 180 µl DMEM mit 10% FCS/ Vertiefung vorgelegt. Mit 20 µl der zu bestimmenden Proben wurden serielle Verdünnungen von 1:10 bis 1: 10⁶ hergestellt.

Zur Titration wurden konfluente HF- Kulturen in Kulturplatten mit 46 Vertiefungen (je 11 mm Ø) verwendet. 180 µl jeder Verdünnung wurden in eine Vertiefung pipettiert und 16 Stunden im begasten Brutschrank bei 37°C inkubiert. Das Inokulum wurde abgesaugt und durch 800 µl DMEM mit 10% FCS ersetzt, dem polyklonales humanes HCMV- positives Serum in einer Verdünnung von 1:200 beigefügt war. Das Humanserum dient der Neutralisation freigesetzter Virionen und verhindert dadurch die sekundäre Infektion weiterer Zellen nach Ablauf eines Infektionszyklusses. Nach neun Tagen wurde das Medium abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS- Puffer gewaschen und mit 95%igem Ethanol für 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Nach Absaugen des Ethanols und erneutem Waschen mit PBS- Puffer wurden die Zellen zur Identifizierung der Plaques für 10 Minuten mit 200 µl unverdünnter Giemsalösung (Sigma) angefärbt. Die Plaques wurden mit Hilfe eines Lichtmikroskopes (Labovert, Leica) ausgezählt und ausgewertet.

PBS- Puffer

siehe 5.11 Puffer

6.2.10 Zellfraktionierung

Das Abtrennen der Zellkerne von anderen Kompartimenten der Zelle ist möglich, da die innere Kernmembran resistent gegenüber der Solubilisierung durch nichtionische Detergentien ist (Davis & Blobel, 1986, Raviprakash *et al.*, 1990). Die Reinigung der Zellkerne erfolgte mittels Gradientenzentrifugation (Sinzger *et al.*, 2000). Zellkulturmonolayer wurden in Flaschen mit einer Grundfläche von 162cm² zunächst mit PBSPT- Puffer gewaschen

und mit 5 ml Trypsin/EDTA- Lösung vereinzelt (6.2.1). Das Trypsin wurde mit 3 ml FCS inaktiviert, die Zellen in ein Falcon- Röhrchen überführt und durch 5 minütige Zentrifugation bei 1000 g (Rotina 48R) sedimentiert. Anschliessend wurden die Zellen noch zweimal mit 10 ml PBSPT- Puffer und einmal mit 5 ml hypotonem Puffer gewaschen. Das Zellsediment wurde in 1,5 ml hypotonem Puffer resuspendiert und zur Quellung 30 Minuten auf Eis inkubiert. Der Grad der Quellung wurde zwischenzeitlich mikroskopisch kontrolliert. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von 1,5 ml hypotonem Puffer mit 2% NP40 und 5 minütiger Inkubation auf Eis, wodurch die Zellmembran, die Membranen des Endoplasmatischen Retikulums sowie die äussere Kernmembran aufgelöst wurden. Die Vollständigkeit der Lyse wurde ebenfalls mikroskopisch kontrolliert. Die detergentenresistenten Bestandteile wurden durch 5 minütige Zentrifugation bei 200 g (Rotina 48R) sedimentiert, einmal mit 5 ml hypotonem Puffer gewaschen und in 3 ml Kernpuffer resuspendiert. Die Lösung wurde mit dem gleichen Volumen 50%iger Iodixanol- Lösung (Fluoroprep™, Sigma) in Kernpuffer vermischt. Die Mischung wurde auf einen Iodixanol- Stufengradienten geschichtet, der aus 3 ml einer 35%igen Iodixanol- Lösung und 3 ml einer 30%igen Iodixanol- Lösung, jeweils in Kernpuffer, bestand. Nach 20 minütiger Zentrifugation bei 10000g (Zentrifuge J2-21, und Rotor SW41, Beckman) sammelten sich die Zellkerne an der Interphase zwischen der 35%igen und der 30%igen Iodixanol- Lösung. Die Kernbande wurde mit einer Spritze abgenommen. Um das Präparat vom Iodixanol zu befreien, wurde die Kernlösung mit dem 30fachen Volumen PBS- Puffer vermischt, die Kerne durch Zentrifugation für 15 Minuten bei 1000g sedimentiert und in 100 µl Kernpuffer aufgenommen. 10 bis 20 µl der Kernpräparation wurden auf einem Objektträger zur späteren Analyse durch indirekte Immunfluoreszenz (6.3.2) luftgetrocknet.

PBS- Puffer

siehe 5.11. Puffer

PBSPT- Puffer

PMSF

1 mM

Aprotinin (Trasylol®)

100 U/ml

PBS- Puffer

Kernpuffer (pH7,8)

Sucrose	250 mM
MgCl ₂	5 mM
KCL	25 mM
Tricin/NaOH	20 mM
PMSF	1 mM
Aprotinin (Trasylo [®])	100 U/ml

*a. bidest**Hypotoner Puffer (pH 7,6)*

Hepes	10 mM
MgCl ₂	1,5 mM
KCL	10 mM
PMSF	1 mM
Aprotinin (Trasylo [®])	100 U/ml

a. bidest

6.2.11 Isolierung viraler DNA für PCR

Die Gewinnung kleiner Mengen viraler DNA als Matritze für PCR- Reaktionen wurde aus 200 µl Virusstock (6.2.6) mit dem QIAamp Mini Kit nach den Angaben des Herstellers präpariert.

6.3 Immunologische und proteinchemische Methoden

6.3.1 Fixierung und indirekte Immunfluoreszenz von Zellen und isolierten Zellkernen, DAPI- Färbung

Zur Auswertung der *enhanced green fluorescent protein* (EGFP)-Autofluoreszenz von Zellen wurden Deckglaskulturen nach einmaligem Waschen mit PBS- Puffer durch Zugabe von Paraformaldehydlösung für 20 Minuten fixiert, erneut zweimal mit PBS- Puffer gewaschen und direkt in Mowiol- Lösung eingedeckt.

Die Fixierung der Objektträger mit luftgetrockneten Zellkernen erfolgte für eine Minute in Methanol (-20°C) und anschliessend für 15 Minuten in Aceton (-20°C). Nach Abdampfen des Acetons wurden die Kerne für 15 Minuten in BSA- Puffer rehydriert.

Konfluente, auf Deckgläschen gewachsene Zellkulturen wurden zunächst mit PBS- Puffer gewaschen und anschliessend mit einem Gemisch aus Ethanol/Aceton (1:1, -20°C) für 5 Minuten fixiert. Nach dem Abdampfen des Fixierungsgemisches wurden die Zellen für 15 Minuten in BSA- Puffer rehydriert.

Die fixierten und rehydrierten Deckglaskulturen oder Kernpräparationen wurden in einer feuchten Kammer für 45 – 60 Minuten mit einem spezifischen Erstantikörper inkubiert. Dieser wurde unverdünnt eingesetzt mit Ausnahme des HCMV-IE- Antikörpers, der 1:15 verdünnt wurde. Nach einem Waschschrift mit PBS- Puffer erfolgte eine Inkubation mit einem 1: 50 bis 1:500 verdünnten, Fluorochrom- markierten Zweitantikörper für 45 – 60 Minuten. Im Anschluss wurden die Präparate einmal mit PBS- Puffer und einmal mit *a. bidest* gewaschen und in Mowiol- Lösung eingedeckt.

Bei den Kernpräparaten wurde die DNA der fixierten und mit Antikörpern behandelten Zellkerne mit Hilfe des interkalierenden Farbstoffes DAPI (4,2-Diamino-2-phenylindiol) gefärbt, um die Kerne einwandfrei identifizieren zu können. Dazu wurden die Präparate in 2 x SSC- Puffer gewaschen und für 1 Minute mit einer DAPI- Lösung (Cytological Nuclear Counterstain Kit) inkubiert, welche zuvor 1:1000 in 2 x SSC- Puffer verdünnt worden war. Anschliessend wurden die Präparate in 2 x SSC- Puffer und *a. bidest* gewaschen und in Mowiol- Lösung eingedeckt.

Die Auswertung sowohl der EGFP- Autofluoreszenz als auch der indirekten Immunfluoreszenz der Kerne und Zellen erfolgte mit einem Mikroskop mit Epifluoreszenz- und Kameraausrüstung (Fluoreszenz- Mikroskop Axioplan, Zeiss, Kamera: Spot Diagnostic instruments).

PBS- Puffer siehe 5.11 Puffer

Paraformaldehydlösung

Paraformaldehyd 3 % (w/v)

PBS- Puffer

BSA- Puffer (pH 7,4)

BSA 3 % (w/v)

NaCl 200 mM

NaN₃ 0,02% (w/v)

PBS- Puffer

2 x SSC- Puffer (pH 7,0)

NaCl 300 mM

Natriumcitrat 30 mM

a. bidest

Mowiol- Lösung

2,4 g Mowiol 40-88

6 g Glycerin

6 ml *a. bidest*

Die Mischung wurde 16 Stunden zur Quellung bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach Zugabe von 12 ml 200 mM Tris/Cl (pH 8,5) und Erwärmen auf 50% °C unter Rühren löst sich das Mowiol. Ungelöste Kristalle werden durch Zentrifugation für 15 Minuten bei 4500 rpm sedimentiert (Rotina48R). Dem klaren Überstand wird 10% 1,4 Diazobicyclo-[2,2,2]- Oktan (DABCO) als Radikalfänger zugesetzt, um ein schnelles Ausbleichen der Präparate unter dem Mikroskop zu verhindern.

6.3.2 Oberflächenimmunfluoreszenz

Die spezifische Markierung von Membranproteinen, die sich an der Zelloberfläche befinden, erfolgte durch eine Bindung der Antikörper an lebende Zellen bei 4°C. Bei dieser Temperatur kann keine Endocytose der Antigen- Antikörper- Komplexe stattfinden. Dazu wurden Zellkulturen in Zellkulturplatten mit 24 Vertiefungen mit Deckgläschen zunächst für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS- Puffer gewaschen, mit 200 µl des spezifischen Erstantikörpers überschichtet und für 60 Minuten bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Zellen gründlich dreimal mit eiskaltem PBS- Puffer gewaschen und durch Zugabe von 1 ml eiskaltem Aceton/Ethanol- Gemisch (1:1, -20°C) fixiert. Alle weiteren Schritte erfolgten bei Raumtemperatur. Nach Entfernen und Abdampfen des Fixierungsgemisches wurden die Deckglaskulturen für 15 Minuten in BSA- Puffer rehydriert und anschliessend für 45 bis 60 Minuten mit einem Fluorochrom- markierten Zweitantikörper inkubiert. Danach wurden die Präparate mit PBS- Puffer und *a. bidest* gewaschen und mit Mowiol- Lösung (6.3.2) eingedeckt.

Die Auswertung erfolgte auch hier mit einem Mikroskop mit Epifluoreszenz- und Kameraausrüstung (Fluoreszenz-Mikroskop Axioplan, Zeiss, Kamera: Spot Diagnostic instruments).

PBS- Puffer

siehe 5.11 Puffer

6.3.3 SDS- Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS- PAGE)

In der SDS- PAGE (Laemmli, 1970) werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die amphipathischen SDS- Moleküle treten mit den Proteinen in Wechselwirkung, führen zur Denaturierung und Neutralisierung der Eigenladung der Proteine. Die Laufgeschwindigkeit ist bei geeigneter Vernetzung des Polyacrylamids umgekehrt proportional zur molekularen Masse der Proteine.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte in Minigelen (10 cm x 8 cm x 0,75 mm) mit einem 8 – 10%igen Polyacrylamid- Trenngel, das mit einem 3,75%igem

Polyacrylamid- Sammelgel überschichtet wurde. Die Proben wurden zunächst in Lysis- Puffer aufgenommen, mit 4fach Probenpuffer versetzt und vor dem Auftragen auf das Gel für 5 min bei 95°C erhitzt. Die Elektrophorese wurde zum Sammeln der Probenfront zunächst bei 100 V, danach bei 150 V durchgeführt, bis die Bromphenolblaufront des Probenpuffers die untere Kante des Gels erreicht hatte. Zur Abschätzung der Grösse wurde ein farbiger markierter Molekulargewichtsmarker (Rainbow™- Protein- Molecular- Weight- Marker, Amersham) mit aufgetragen.

Sammelgel

Acrylamid	3,75% (w/v)
N,N'-Methylenbisacrylamid	0,1% (w/v)
Tris/HCL, pH 6,8	125 mM
SDS	0,1% (w/v)
Ammoniumpersulfat	0,04% (w/v)
TEMED	0,1% (v/v)

a. bidest

Trenngel

Acrylamid	8% bzw. 10% (w/v)
N,N'-Methylenbisacrylamid	0,21% (w/v)
Tris/HCL, pH 8,8	370 mM
Glycerin	5% (v/v)
SDS	0,1% (w/v)
Ammoniumpersulfat	0,1% (w/v)
TEMED	0,1% (v/v)

a. bidest

Elektrophoresepuffer

Glycin	200 mM
Tris	25 mM
SDS	0,1% (w/v)

a. bidest

4x Probenpuffer, denaturierend

Tris/HCL, pH 6,8	200 mM
β- Mercaptoethanol	4% (v/v)
SDS	4% (w/v)
Glycerin	40% (v/v)
Bromphenolblau	0,01% (w/v)
<i>a. bidest</i>	

Lysis- Puffer siehe 6.2.7

6.3.4 Immunoblot

Zum Transfer der Proteine aus dem SDS- Gel auf eine Nitrozellulosemembran (0,2 µm Porengröße, Schleicher und Schuell, Dassel) wurde das Halbtrockenblot- Verfahren (Kyhse-Andersen, 1984) verwendet.

Dazu wurden zwischen zwei Graphit- Plattenelektroden drei in Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere (Schleicher und Schuell, Dassel), das Gel, die Nitrozellulosemembran, drei in Anodenpuffer 2 und drei in Anodenpuffer 1 getränkte Filterpapiere geschichtet. Durch den Transfer für eine Stunde bei einer Stromstärke von 0,8 A/ cm² Blotfläche wurden die Proteine auf die Membran übertragen. Die freien Bindungsstellen auf der Membran wurden durch einstündige Inkubation in 10% Magermilchpulver in PBSdef/ 0,1% Tween20 abgesättigt. Nach viermaligem Waschen für 5 Minuten in PBSdef/ 0,1% Tween20 erfolgte die Inkubation für 1 Stunde mit dem spezifischen Erstantikörper, der 1:10 in Antikörperpuffer verdünnt wurde. Nach dreimaligem Waschen mit PBSdef/ 0,1% Tween20 wurde die Membran eine Stunde mit einem Peroxidase- gekoppeltem Zweitantikörper inkubiert, der 1: 100000 in Antikörperpuffer verdünnt wurde. Nach weiteren drei Waschstufen in PBSdef/ 0,1% Tween20 erfolgte der Nachweis der spezifisch angefärbten Proteine mittels einer Chemilumineszenz- Reaktion (ECL). Bei dieser Reaktion katalysiert die Peroxidase des Zweitantikörpers die Oxidation von Luminol und löst dadurch Chemilumineszenz aus. Diese kann dann mittels eines Röntgenfilms dokumentiert werden. Für die ECL-

Reaktion wurde das „SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate“ der Firma Pierce gemäss den Angaben des Herstellers sowie BioMax – Röntgenfilme (Kodak) verwendet.

Anodenpuffer 1

Tris/HCL (pH 10,4)	300 mM
Methanol	20% (v/v)
<i>a. bidest</i>	

Anodenpuffer 2

Tris/HCL (pH 10,4)	25 mM
Methanol	20% (v/v)
<i>a. bidest</i>	

Kathodenpuffer

Tris/HCL (pH 9,4)	25 mM
Methanol	20% (v/v)
ϵ - Aminocaprinsäure	40 mM
<i>a. bidest</i>	

PBSdef/ 0,1% Tween20

NaCl	137 mM
KCL	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	6,5 mM
KH ₂ PO ₄	1,5 mM
Tween20	0,1% (v/v)
<i>a. bidest</i>	

Antikörperpuffer

Magermilchpulver	1% (w/v)
------------------	----------

PBSdef/ 0,1% Tween20

6.3.5 Endoglykosidasebehandlung

Um den Glykosylierungsstatus einzelner Proteine zu bestimmen, erfolgte ein Verdau mit spezifischen Endoglykosidasen. Endoglykosidase H (*EndoH*) katalysiert die Spaltung zwischen den beiden N- Acetylglucosaminresten mannosereicher Oligosaccharidketten. Peptid- N- Glykosidase F (*PNGaseF*) spaltet dagegen sowohl mannosereiche als auch komplexe N- glykosidisch gebundene Oligosaccharidseitenketten durch Hydrolyse der Bindung zwischen dem Asparaginrest des Proteins und dem Glykanrest des Zuckers. Zur Endoglykosidasebehandlung wurden die Enzyme *EndoH* und *PNGaseF* der Firma New England Biolabs entsprechend den Protokollangaben des Herstellers verwendet.

6.3.6 Elektronenoptische Untersuchungen

Infizierte Zellmonolayer wurden einmal mit PBS- Puffer gewaschen, abgeschabt und durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 3500 rpm in einem Eppendorf- Reaktionsgefäß sedimentiert. Die Zellsedimente wurden durch Zugabe von 1 ml 4%iger Paraformaldehydlösung fixiert. Die weitere Aufarbeitung der Präparate (Kontrastierung durch OsO_4 und Einbettung in Epon) wurden von Frau Dr. L. Kolesnikova, Institut für Virologie, Marburg, durchgeführt.

PBS- Puffer

siehe 5.11 Puffer

4% Paraformaldehydlösung

Paraformaldehyd

4% (w/v)

DMEM

DMEM

siehe 5.8.
Kulturmediengrundstoffe

7. Ergebnisse

7.1 Etablierung eines Assays zur Eingrenzung essentieller und nichtessentieller Domänen des HCMV- gB

Die Eingrenzung essentieller Domänen im gB- Protein ist grundsätzlich durch entsprechende direkte Mutagenese der HCMV- BACs zu erreichen. Dieser experimentelle Ansatz ist jedoch sehr arbeits- und zeitaufwendig. Darüber hinaus besteht die Gefahr, dass die Manipulation eines als essentiell bekannten Gens zu einem letalen Phänotyp führt.

Der alternative experimentelle Ansatz ist demgegenüber ein geeignetes System zur Komplementation *in trans*. Da stabil exprimierende Zellsysteme zur Zeit nicht zur Verfügung stehen, war zunächst zu prüfen, ob durch transient exprimiertes gB- Protein die phänotypische Komplementation einer gB- null- Mutante erzielt werden kann. Voraussetzung war daher die Herstellung eines HCMV- BACs, welches aufgrund einer funktionellen Deletion des gB- Gens nicht mehr replikationsfähig ist.

7.1.1 Herstellung des Rekombinationsplasmides *bac2_3frt*

Zur Herstellung eines solchen replikationsdefizienten HCMV- BACs (BAC Δ gB) wurde zunächst das Rekombinationsplasmid *bac2_3frt* mit der dafür erforderlichen Rekombinationskassette konstruiert (Abb. 8) (Plasmide siehe Tab.3).

Dazu wurde das Gen für den Fluoreszenzmarker EGFP mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Eco*RI aus dem Vektor *pEGFP* entfernt und in den Vektor *pIRESHyg* (5.15) kloniert. Der 5'- flankierende homologe Bereich des gB- Gens (Abb. 8, HomA) wurde mit den Oligonukleotiden *pgB/L* und *pgB/R* (Oligonukleotide siehe Tab. 4) aus dem Plasmid *pUC1854H56* amplifiziert, mit den Restriktionsendonukleasen *Nru*I und *Bam*HI geschnitten und in den zuvor mit *Nru*I und *Bam*HI geöffneten Vektor ligiert. In diesem flankierenden Bereich, der auch den gB- eigenen Promotor enthält, ist das Startcodon des gB zerstört.

Der 3' flankierende homologe Bereich aus dem gB- Gen (Abb. 8, HomB) wurde mit den Oligonukleotiden *bac2 5'* und *bac2 3'* amplifiziert, mit *EcoRI* und *XbaI* geschnitten und in die entsprechenden Schnittstellen des Vektors ligiert. Als Template für diese PCR diente das Cosmid *pCM 1029*. Zur Vervollständigung des Konstruktes wurde das Gen für Kanamycinresistenz aus dem Vektor *pCP15* durch Restriktion mit *SmaI* entfernt und in den Vektor inseriert. Dieser wurde zuvor mit *EcoRI* linearisiert und die überhängenden 5'- Enden durch Behandlung mit dem Klenow- Fragment aufgefüllt. Die Kanamycinresistenz, die dadurch in die Rekombinationskassette eingeführt wurde, trägt an beiden Seiten Erkennungssequenzen (FRT) für das Enzym *FLP*- Rekombinase.

Die einzelnen Klonierungsschritte wurden durch Restriktion mit geeigneten Endonukleasen überprüft. Die amplifizierten Bereiche wurden unter Verwendung der Oligonukleotide *kontr.54V/2*, *kontr.pla/2*, *SigDelgB*, *seq-gB-15*, *RLA*, *seq-5' vo*, *gBPFR*, *gBPGR*, *seq-GFP-rev* und *seq-PgB-3'* vollständig sequenziert.

Durch diese Strategie wurde der Leserahmen des Glykoprotein B durch die Insertion des Reporterproteins EGFP zerstört. Gleichzeitig stand dadurch die Expression des Markerproteins unter der Kontrolle des gB- eigenen Promotors. Der Leserahmen des gB (UL55) und der des benachbarten Leserahmens UL56 teilen sich einen überlappenden Bereich von 38 bp. Um eine Beeinträchtigung von UL56 zu vermeiden, wurde der Leserahmen des EGFP direkt hinter das Stop- Codon des UL56- Gens in die Signalpeptid-Sequenz des gB- Gens inseriert. Dadurch wurde eine korrekte Expression und Prozessierung eines möglicherweise entstehenden EGFP- gB Fusionsproteins verhindert. Durch die Mutation des gB- Startcodons wurde die Aminosäuresequenz des überlappenden UL56 nicht verändert.

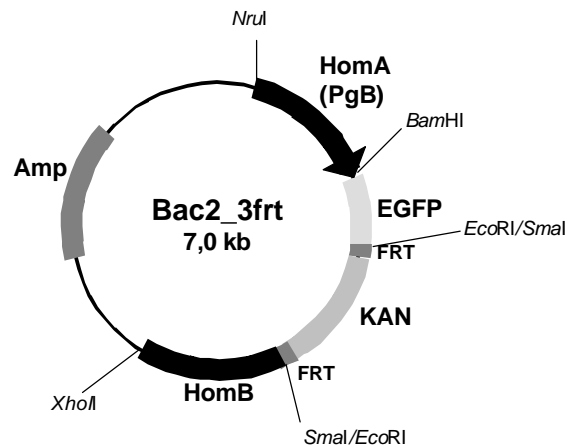


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Rekombinationsplasmides *bac2_3frt*.

Abkürzungen: HomA, HomB = homologe Bereiche für die Rekombination, FRT = *Flp*-Recombinase-Erkennungssequenz, PgB = gB- Promotor.

7.1.2 Herstellung eines replikationsdefizienten HCMV- BACs ($BAC\Delta gB$)

Aus dem Rekombinationsplasmid *bac2_3frt* (Abb. 8) wurde durch Restriktion mit *NdeI* und *DraIII* ein 4,1 kb langes, lineares Fragment entfernt, welches die Gene für EGFP, die Kanamycinresistenz sowie beide flankierenden homologen Bereiche HomA und HomB enthielt. Dieser DNA- Abschnitt wurde wie in 6.1.17 beschrieben in die BAC- Mutagenese mit linearen Fragmenten eingesetzt. Aus den entstandenen Mutanten wurde das Kanamycinresistenzgen durch *FLP*-Recombinase-vermittelte, ortsgerichtete Rekombination wieder entfernt (6.1.17) (Abb. 9A).

Das entstandene $BAC\Delta gB$ wurde vergleichend mit dem parentalen Molekül BAC- pHB5 durch Restriktion mit *NotI* analysiert. Im parentalen BAC pHB5 schneidet *NotI* 43 mal. Durch die eingeführte Mutation entstand eine neue *NotI*- Schnittstelle, wodurch ein 12,3 kb grosses Fragment verloren ging und zwei neue Fragmente von 10,2 und 3,0 kb (Abb. 9A) entstanden. Aufgrund der unterschiedlichen Grösse der Banden wurde das Gel in zwei Schritten analysiert. Zur Unterscheidung der niedermolekularen Fragmente genügte eine Elektrophoresedauer von 16 Stunden (Abb. 9B, links). Um die grösseren Fragmente zu trennen, wurde die Elektrophorese anschliessend für weitere 6 Stunden fortgesetzt und das Gel daraufhin erneut dokumentiert (Abb. 9B,

rechts). Das Bandenmuster zeigte, dass die gewünschten Mutationen in das BAC eingeführt wurden.

Dieses Experiment wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. M. Messerle von Dr. E. Borst am Max- von- Pettenkofer- Institut in München durchgeführt.

Als zusätzliche Bestätigung wurde die gesamte 5,5 kb grosse Kasette mit den Oligonukleotiden *Selec56V* und *Selec54V/2* aus der Mutante *BAC Δ gB* amplifiziert und mit den Oligonukleotiden *seq 5' vo*, *seq- PgB-3'* *SeqIRES* und *seq-gB-16* an den Insertionsstellen der eingefügten DNA- Abschnitte sequenziert.

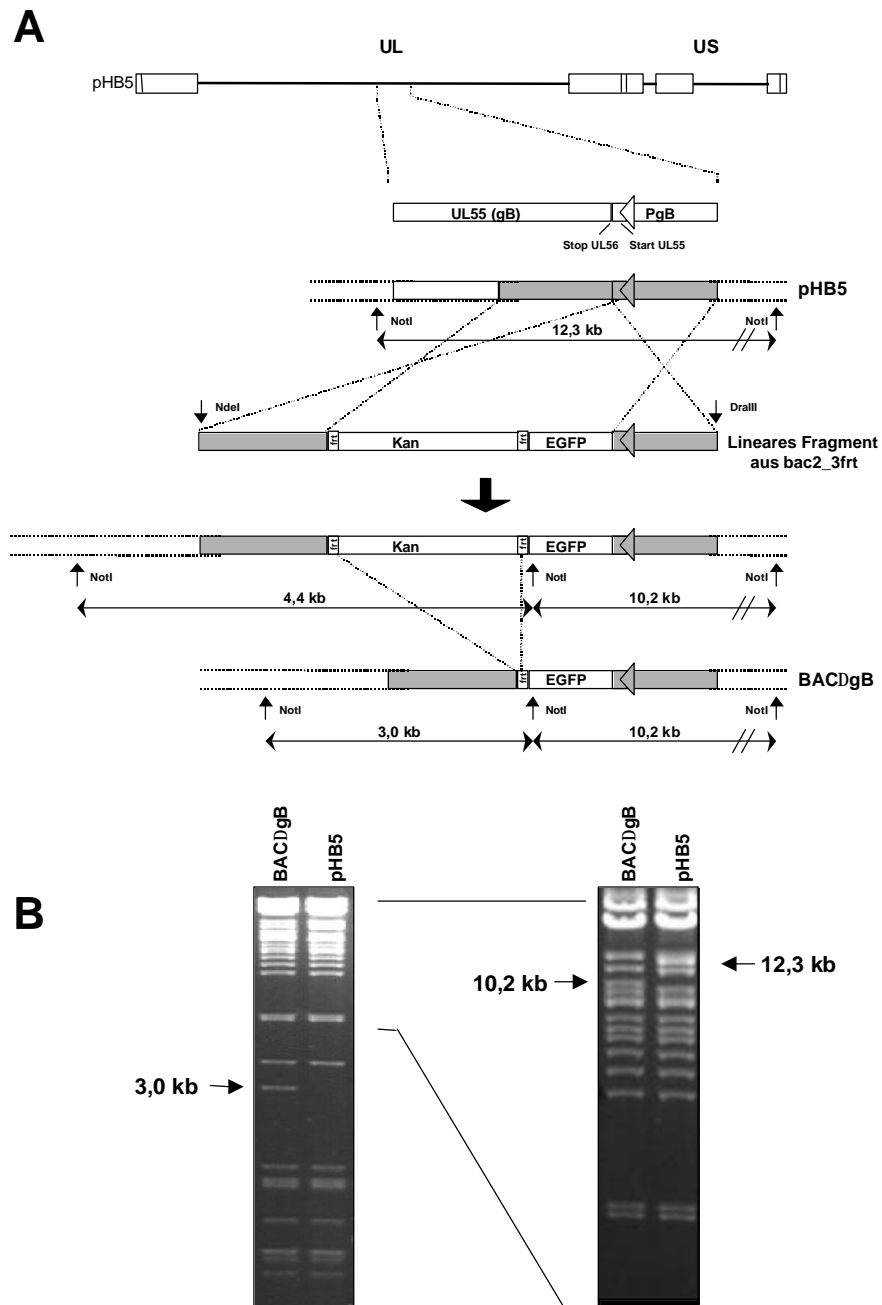


Abbildung 9: Klonierungsstrategie und Analyse des replikationsdefizienten BACΔgB.

A: Schematische Darstellung der Klonierungsschritte zur Herstellung des replikationsdefizienten BACΔgB. In der obersten Zeile ist die Struktur des parentalen BAC pHB5 schematisch dargestellt, darunter eine Vergrößerung der Region, welche den Leserahmen von gB (UL55) und dessen Promotor (PgB) enthält. Ein lineares Fragment, welches beide homologen Regionen (graue Kästchen), das EGFP- Gen und das Kanamycinresistenzgen (Kan) enthält, wurde aus dem Vektor *bac2_3frt* ausgeschnitten und durch homologe Rekombination in das Genom integriert. Das Kanamycinresistenzgen wurde durch *FLP*- Rekombinase- vermittelte ortsgerichtete Rekombination entfernt, wodurch BACΔgB entstand. Die *NotI*- Schnittstellen und die Grösse der daraus resultierenden Fragmente ist unter den schematisch dargestellten Genen eingetragen.

B: Die DNA der BACs pHB5 und BACΔgB wurde mit *NotI* geschnitten, für 16 Stunden in einem Agarosegel aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und dokumentiert (links). Um die hochmolekularen Banden aufzutrennen, wurde das Gel für weitere sechs Stunden aufgetrennt und erneut fotografiert. (rechts). Das 12,3 kb- Fragment von pHB5 ist in der Mutante BACΔgB nicht mehr nachzuweisen, statt dessen erscheinen zwei Banden mit einer Grösse von 3,0 kb und 10,2 kb (Pfeile).

7.1.3 Phänotypische Komplementation durch transient exprimiertes authentisches gB- Protein

Es sollte überprüft werden, ob durch die Cotransfektion des BAC Δ gB und eines geeigneten Plasmids zur transienten Expression von authentischem gB eine phänotypische Komplementation für eine Runde der Virusreplikation erreicht werden kann. Die in cotransfizierten Zellen gebildeten, phänotypisch komplementierten Tochtervirionen sollten freigesetzt werden und die umliegenden Zellen infizieren können. Danach sollte die Infektion zum Erliegen kommen, da in den Nachbarzellen kein weiteres, transient exprimiertes gB zur Verfügung steht. Durch die Insertion des EGFP-Markerproteins in das Virusgenom würde ein solches Ereignis fluoreszenzmikroskopisch durch die Ausbildung grün fluoreszierender Miniplaques nachweisbar sein.

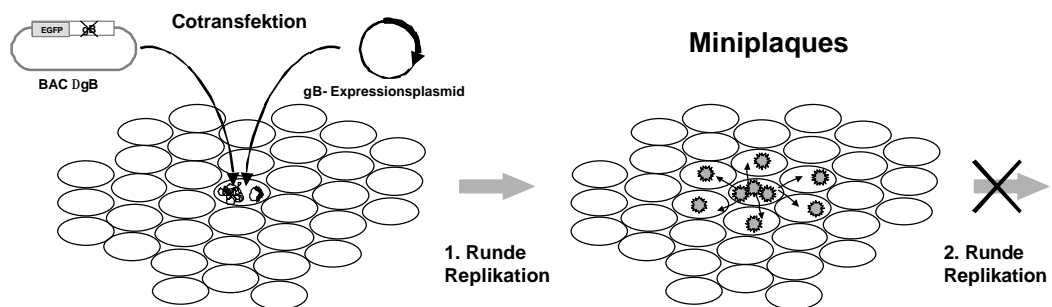


Abbildung 1: Schematische Darstellung der phänotypischen Komplementation eines BAC Δ gB durch transient exprimiertes authentisches gB für einen Replikationszyklus.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde ein gB- Expressionsplasmid mit der DNA des replikationsdefizienten BAC Δ gB in humane Fibroblastenzellen cotransfiziert, wie in 6.2.5 beschrieben. Als Kontrolle wurden sowohl BAC Δ gB als auch das gB- Expressionsplasmid allein transfiziert. Die Transfektionen wurden in Zellkulturplatten mit 24 Vertiefungen durchgeführt und jeder Transfektionsansatz auf vier mit Deckgläsern beschickte Vertiefungen verteilt.

Nach 48 Stunden wurde eines der vier Deckgläschen jedes Ansatzes mit eiskaltem Aceton/Ethanol- Gemisch (1:1) fixiert (6.3.1) und mittels indirekter

Immunfluoreszenz auf die Expression des HCMV- *immediate early antigens* (IE) hin untersucht, um die Effizienz der BAC- Transfektionen zu bestimmen. Das IE- Antigen ist ein sensitiver viraler Marker, dessen mRNA sofort nach Transfektion durch zelluläre Enzyme transkribiert wird. Diese Kontrolle wurde durchgeführt, da die Transfektionseffizienz der 230 kb grossen BAC- Moleküle in humanen Fibroblasten sehr stark variiert. Um eine Vergleichbarkeit der Transfektionsansätze zu erreichen, wurden nur solche Transfektionsansätze zur Auswertung herangezogen, bei denen mindestens 40 IE- positive Zellen pro μg transfizierter DNA detektiert werden konnten. Acht bis zehn Tage nach Transfektion wurden zwei weitere Deckglaskulturen eines jeden Transfektionsansatzes mit einer 3%igen Paraformaldehydlösung fixiert (6.3.1) und auf die Bildung von grün fluoreszierenden Miniplaques hin untersucht.

Bei den Zellen, die nur mit BAC Δ gB transfiziert waren, kam es nicht zur Bildung grün fluoreszierender Miniplaques; es konnten nur einzelne fluoreszierende Zellen beobachtet werden (Abb. 11A). Die Zellen, die nur mit dem gB- Expressionsplasmid transfiziert waren, zeigten wie erwartet keine Fluoreszenz (Abb. 11B).

Die Ansätze, die mit BAC Δ gB und dem gB- Expressionsplasmid pRC/CMVgB cotransfiziert waren, bildeten reproduzierbar grün fluoreszierende Miniplaques aus (Abb.11C).

Die Ausbildung von Plaques könnte theoretisch auch auf eine genetische Rekombination des BAC Δ gB mit dem gB- Gen des cotransfizierten Expressionsplasmides zurückzuführen sein. Eine homologe Rekombination ist auszuschliessen, da im BAC Δ gB- Genom nur an einer Seite der EGFP- Insertion ein ausreichend grosser homologer DNA- Abschnitt zur Verfügung steht. Möglich wäre jedoch eine sogenannte heterologe oder illegitime Rekombination, bei der ein funktionelles gB- Gen zufällig in einen anderen Bereich des Virusgenoms integrieren und eine replikationsfähige Revertante entstehen kann.

Um ein solches Ereignis auszuschliessen, wurde die letzte Deckglaskultur einer jeden Transfektion weitere drei Wochen inkubiert, um zu prüfen, ob

eine illegitime Rekombination mit einer daraus resultierenden Revertante stattgefunden hatte.

Unter den verwendeten Bedingungen konnte keine Ausbreitung eines replikationskompetenten Virus beobachtet werden. In allen hier beschriebenen Transfektionsansätzen wurde nur die Bildung von Miniplaques beobachtet, die sich nicht ausbreiteten und nach einem Zeitraum von etwa drei Wochen nicht mehr nachzuweisen waren.

Das transient exprimierte gB war somit in der Lage, den Defekt des BAC Δ gB in cotransfizierten Zellen für einen viralen Replikationszyklus zu komplementieren.

Die entstandenen Miniplaques waren auf die phänotypische Komplementation durch das transient exprimierte gB- Protein und nicht auf eine virale Revertante infolge einer genetischen Rekombination zurückzuführen.

Durch diese Ergebnisse waren die Voraussetzungen für einen "Ein- Zyklus- Replikations- Komplementations- Assay" erfüllt, mit dem essentielle und nichtessentielle strukturelle Domänen des gB- Proteins mit vertretbarem experimentellem Aufwand definiert werden konnten.

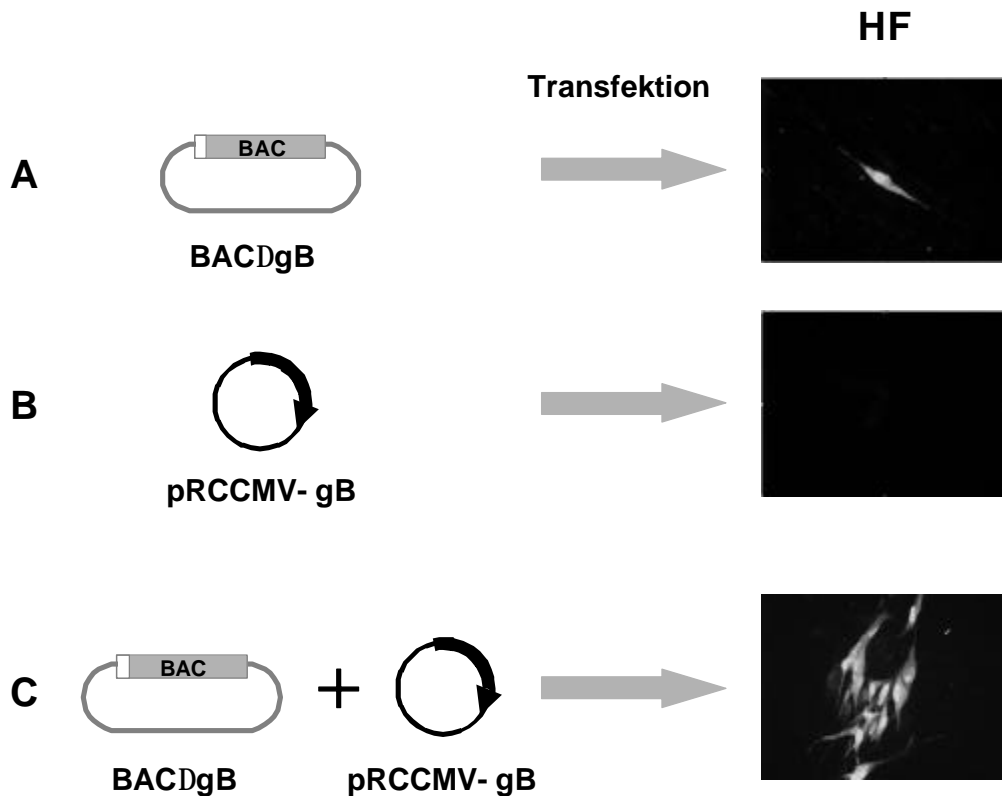


Abbildung 11: Phänotypische Komplementation des BACΔgB durch transient exprimiertes gB- Protein.

BACΔgB (A), pRC/CMVgB (B) sowie BACΔgB und pRC/CMVgB gemeinsam (C) wurden in humane Fibroblastenzellen transfiziert. 8-10 Tage nach Transfektion konnte nur in den mit beiden Molekülen cotransfizierten Kulturen die Ausbildung grün fluoreszierender Miniplaques beobachtet werden, die auf eine phänotypische Komplementation für eine Runde der Replikation zurückzuführen war.

7.1.4 Konstruktion und Überprüfung der Expressionsplasmide

pRC/CMVSigDelgB und pCR/CMVΔFur

In den "Ein- Zyklus- Replikations- Komplementations- Assay" sollten eine Reihe von gB- Expressionsplasmiden mit definierten Mutationen eingesetzt werden. Dazu mussten zusätzlich zu den bereits im Labor existierenden weitere gB- Expressionskonstrukte hergestellt werden.

Zunächst musste ein gB mit einer Deletion des Signalpeptides als Negativkontrolle für die Cotransfektion generiert werden. Des weiteren sollte ein Konstrukt mit verändertem Motif für die Endoprotease Furin kloniert werden, mit dem die Notwendigkeit der proteolytischen Spaltung des gB- Moleküls untersucht werden sollte.

Das Plasmid *pRC/CMVSigDelgB* mit einer Deletion des Signalpeptides wurde durch rekombinante PCR hergestellt, wie in 6.1.14 beschrieben. Das Fragment stromaufwärts des Signalpeptides wurde mit den Oligonukleotiden *SigDelgB1T* und *SigDelgB2T*, das Fragment stromabwärts des Signalpeptides mit den Oligonukleotiden *SigDelgB3T* und *SigDelgB4T* aus *pRC/CMVgB* amplifiziert. Die Oligonukleotide *SigDelgB2T* und *SigDelgB3T* enthalten an ihrem 5' Ende je einen überhängenden Bereich von 11 bp, der komplementär zum jeweils anderen Oligonukleotid ist, wodurch beide Amplifikate über einen Abschnitt von 22 bp homolog zueinander sind. In einer dritten PCR- Reaktion mit den Amplifikaten der ersten beiden PCR- Reaktionen als Template und den äusseren Oligonukleotiden *SigDelgB1T* und *SigDelgB4T* wurde dann ein Fragment generiert, welches noch das gB- Startcodon, aber nicht mehr das Signalpeptid trug. Das Fragment wurde über die Schnittstellen für *HindIII* und *ClaI* in den parentalen Vektor *pRC/CMVgB* kloniert. Die Insertion wurde zunächst durch Restriktionsendonuklease- Behandlung und analytische Gelelektrophorese nachgewiesen. Zusätzlich wurde der durch rekombinante PCR generierte Genabschnitt mit den Oligonukleotiden *pgBA*, *pgBBR* und *pgBC* vollständig sequenziert.

Das Plasmid *pRC/CMVgBDFur* wurde durch ortsgerichtete *in-vitro*- Mutagenese mittels des "QuickChange site directed mutagenesis Kit" wie in 6.1.15 beschrieben hergestellt. Für die Reaktion wurden die Primer *gB-(FurA)* und *gB-(FurB)* verwendet. Durch die eingeführten Aminosäuresubstitutionen wurde das Spaltmotiv für die zelluläre Endoprotease Furin von *Arg-Thr-Arg-Arg* (RTRR) zu *Ala-Thr-Arg-Ala* (ATRA) verändert und dadurch zerstört. Zusätzlich wurde durch die Oligonukleotide eine neue Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *SmaI* eingeführt. Die Plasmid- Minipräparationen der mutagenisierten Plasmide wurden durch *SmaI*- Restriktion identifiziert. Das gB- Gen eines positiven Klones wurde mit den Oligonukleotiden *pgBA*, *pgBBR*, *pgBC*, *pgBD*, *pgBE* und *pgBF* vollständig sequenziert.

Da die Konstrukte zur *trans*- Komplementation im „Ein- Zyklus- Replikations- Komplementations- Assay“ eingesetzt werden sollten, musste zunächst ihre

Expression überprüft werden. Dazu wurden die Expressionsplasmide *pRC/CMVDFur* und *pRC/CMVSigDelgB* transient in Cos7- Zellen transfiziert und ihre Expression mittels indirekter Immunfluoreszenz untersucht. Cos7- Zellen sind mit dem Simian Virus 40- (SV40) grossen T- Antigen transformiert und können daher Plasmide, welche den SV40 Replikationsursprung tragen, replizieren. Dadurch konnte auch eine verminderte Expression, wie bei einem gB- Molekül ohne Signalpeptid zu erwarten war, sichtbar gemacht werden. Als Kontrollen dienten Cos7- Zellen, die mit *pRC/CMVgB* transfiziert wurden (Abb. 12A) oder untransfizierte Cos7- Zellen (Abb. 12B).

Im Falle des Plasmides *pRC/CMVDFur* zeigte sich kein Unterschied in der Expression des gB- Proteins und seiner subzellulären Verteilung im Vergleich zum Wildtyp- gB codierenden *pRC/CMVgB* (Abb. 12C). *pRC/CMVSigDelgB* zeigte wie erwartet eine signifikant verminderte gB- Expression im Vergleich zum Kontrollplasmid *pCR/CMVgB* (Abb. 12D und A). Die charakteristische Akkumulation des gB im Golgi war zudem nicht zu erkennen, das gB- spezifische Antigen war überwiegend cytosolisch lokalisiert.

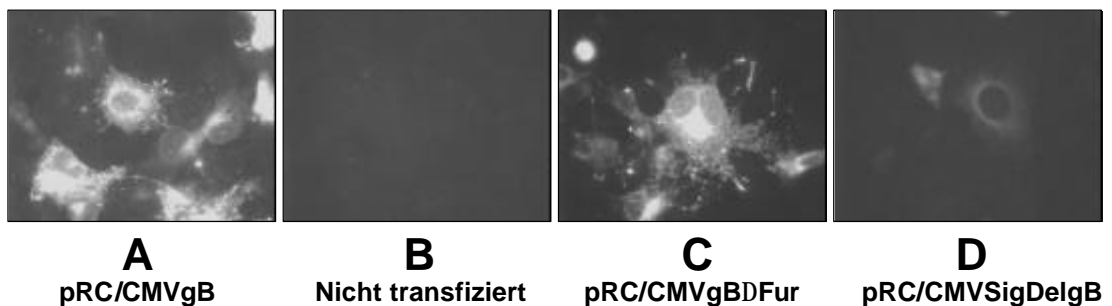


Abbildung 12: Überprüfung der Expression der Plasmide *pRC/CMVΔFur* und *pRC/CMVSigDelgB* durch indirekte Immunfluoreszenz.

Subkonfluente Cos7-Zellen auf Deckglässchen wurden 48 Stunden nach Transfektion mit Aceton:Ethanol (1:1) fixiert und mit dem monoklonalen Antikörper 27-156 nachgewiesen. Als Zweitantikörper wurde Alexa Fluor™ 488 Anti-Maus-IgG verwendet. Bezüglich der Menge und Lokalisation war das gB aus *pRC/CMVΔFur* nicht von der Wildtypkontrolle *pRC/CMVgB* (A) zu unterscheiden (C). Die Expression des von *pRC/CMVSigDelgB* codierten Proteins war deutlich reduziert mit einer homogenen Verteilung im Bereich des Cytoplasmas (D).

7.1.5 Identifizierung essentieller und nichtessentieller Domänen des gB-Proteins im „Ein- Zyklus- Replikations- Komplementations- Assay“

Bei der Testung der verschiedenen gB- Expressionskonstrukte diente als Postitivkontrolle das Plasmid *pRC/CMVgB*, welches Wildtyp- gB exprimiert (Abb. 13B, b). Als Negativkontrolle wurde zum einen das replikationsdefiziente *BACΔgB* allein transfiziert (Abb. 13B, a) und zum anderen die gB- Expressionsplasmide *pRC/CMVSigDelgB* (Abb. 13B, c) und *pRC/CMVgB(MhdII)*. In *pRC/CMVgB(MhdII)* ist die Sequenz für den Membrananker des Moleküls deletiert, was zur Bildung von löslichem gB führt, welches vom Virus ebenfalls nicht genutzt werden kann (Abb. 13B, d). In allen drei Fällen konnte nur die Ausbildung einzelner, grün fluoreszierender Zellen beobachtet werden, was zusätzlich bestätigt, dass die Transfektion der BAC- Moleküle erfolgreich war. Miniplaques wurden in diesen Ansätzen nicht beobachtet.

Es wurden weiterhin gB- Expressionsplasmide in den Assay eingesetzt, die verschiedene Deletionen im cytoplasmatischen Anteil des Moleküls aufweisen (Abb. 13B, e-i). Hierbei führte nur die Cotransfektion der Plasmide *pRC/CMVgB(Del2)*, *pRC/CMVgB(Del3)* und *pRC/CMVgB(Del5)* zur Ausbildung grüner Miniplaques. Für das Plasmid *pRC/CMVgB(Del3)* war dieses Ergebnis unerwartet, da in diesem Konstrukt die Sequenz für den äussersten Carboxyterminus des Moleküls deletiert ist. Diese Region, die sowohl die einzige Phosphorylierungsstelle des gB- Moleküls trägt als auch das Signal für die Lokalisation in der inneren Kernmembran, scheint für die Replikation des Virus nicht erforderlich zu sein.

Die Cotransfektion mit den Konstrukten *pRC/CMVgB(Del1)* und *pRC/CMVgB(Del4)* führte nicht zur Ausbildung von Miniplaques (Abb. 13B, e und h). Die Deletionen dieser Plasmide umfassen einen überlappenden Bereich von AS 773-825, der offensichtlich essentiell für die Replikation des Virus in Zellkultur ist.

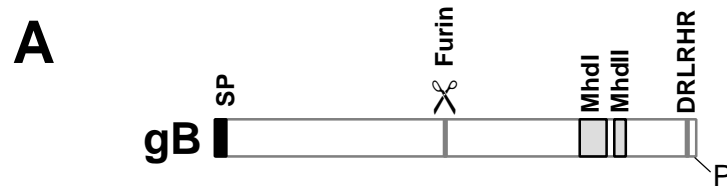
Zusätzlich wurden noch drei weitere Expressionsplasmide für die Cotransfektion eingesetzt, *pRC/CMVgB(MhdI)*, *pRC/CMVgBDFur* und *pRC/CMVgB(sINM)*. In *pRC/CMVgB(MhdI)* ist die Hydrophobe Domäne 1 deletiert, eine Region, die vermutlich bei Fusionsprozessen eine Rolle spielt

(3.4.2). Dieses Plasmid führte nicht zur Bildung von grün fluoreszierenden Plaques, sondern nur zur Bildung von einzelnen vergrößerten grünen Zellen (Abb. 13B, j).

Cotransfiziertes *pRC/CMVgBDFur* hingegen, welches für ein gB- Protein mit zerstörter Furinspaltstelle codiert, induzierte die Bildung grün fluoreszierender Miniplaques (Abb. 13B, k). Diese Beobachtung zeigte, dass die Spaltstelle für diese zelluläre Endoprotease nichtessentiell für die Virusvermehrung ist.

Auch das Plasmid *pRC/CMVgB(sINM)*, in dessen Sequenz das Aminosäuresignal für die Translokation des gB in die innere Kernmembran zerstört ist (3.4.2), führte nach Cotransfektion zur Plaquebildung (Abb. 13B, l). Dieses Resultat war nach den Ergebnissen des Plasmides *pRC/CMVgB(Del3)* zu erwarten, da das Lokalisationssignal für die innere Kernmembran in den Bereich dieser Deletion fällt.

Alle Cotransfektionsansätze wurden mindestens zweimal mit identischen Ergebnissen durchgeführt. In den Cotransfektionen, die zur Bildung von Miniplaques führten, variierte die Anzahl der Plaques zwischen zwei und 30 pro Ansatz.



B

	Deletion/ Substitution	Mini- plaques
a)	BACDgB ohne cotransfiziertes Plasmid	—
b)	pRC/CMVgB	+
c)	pRC/CMV SigDelgB aa 1-24	—
d)	pRC/CMVgB (MhdII) aa 751-771	—
e)	pRC/CMVgB (Del1) aa 773-810	—
f)	pRC/CMVgB (Del2) aa 811-855	+
g)	pRC/CMVgB (Del3) aa 856-906	+
h)	pRC/CMVgB (Del4) aa 780-825	—
i)	pRC/CMVgB (Del5) aa 826-870	+
j)	pRC/CMVgB (MhdI) aa 714-747	—
k)	pRC/CMVgB DFur aa 456/459	+
l)	pRC/CMVgB sINM aa 885/886/889/890	+

Abbildung 13: Identifizierung essentieller und nichtessentieller Domänen des HCMV- gB im "Ein- Zyklus- Replikations- Komplementations- Assay"

A: Schematische Darstellung des Glykoprotein B. Die relativen Positionen einiger funktioneller Domänen sind eingetragen. Abkürzungen: SP = Signalpeptid, Furin = Spaltstelle für die zelluläre Endoprotease Furin, MhdI = Hydrophobe Domäne 1, MhdII = Hydrophobe Domäne 2, DRLRHR = Lokalisationssignal für die innere Kernmembran.

B: Cotransfektion primärer humaner Fibroblasten mit dem replikationsdefizienten BAC Δ gB und verschiedenen gB- Expressionskonstrukten. Auf der linken Seite, von b bis l sind Schemata der unterschiedlichen gB- Moleküle mit den jeweiligen Deletionen und Substitutionen als graue Balken dargestellt. Ein schwarzes Kästchen repräsentiert das Signalpeptid. Die rechte Spalte zeigt Photos der Kulturen 8 – 10 Tage nach Cotransfektion. Die Zellen wurden mit 3% PFA fixiert und fluoreszenzmikroskopisch hinsichtlich der Ausbildung grün fluoreszierender Miniplaques untersucht (Miniplaques + oder Miniplaques -).

7.2 Herstellung der Virusmutanten HCMVDMhdI, HCMVDFur und HCMVsINM

Um die Ergebnisse des „Ein- Zyklus- Replikations- Komplementations- Assays“ zu bestätigen, sollten einige der Mutationen im viralen Zusammenhang überprüft werden. Dazu sollten Virusmutanten sowohl mit letalen als auch mit nicht letalen Mutationen hergestellt werden.

Als Beispiel für eine letale Mutation wurde die Deletion der Hydrophoben Domäne 1 ausgewählt. Als Beispiel für nicht letale Mutationen sollte zum einen die Substitution des Lokalisationssignals für die innere Kernmembran untersucht werden, da eine solche Virusmutante zur Aufklärung der Frage beitragen kann, welche Rolle das Glykoprotein B in der inneren Kernmembran bei der Reifungsknospeung der Herpesviren spielt. Des weiteren sollte die Mutation, die zur Zerstörung des Motives für die zelluläre Endoprotease Furin führt, in eine Virusmutante eingebracht werden. Mit dieser Mutante lässt sich untersuchen, welche Rolle der innerhalb der Familie der β - Herpesviren hoch konservierten Spaltung des Glykoprotein B für die Vermehrung des Virus in Zellkultur zukommt.

Für die Herstellung der Virusmutanten wurde eine andere Strategie gewählt als die Rekombination durch lineare Fragmente, welche bei der Herstellung des replikationsdefizienten BAC Δ gB zum Einsatz kam. Bei dieser Methode verbleibt nach dem Entfernen des Kanamycinresistenzgens eine der FRT- Rekombinationsstellen im Virusgenom. Da in den Virusmutanten ausschliesslich die gewünschten Mutationen enthalten sein sollten, wurde für ihre Herstellung die Zwei- Schritt- Rekombinationsmutagenese verwendet (6.1.18). Bei dieser Methode ist ausschlaggebend, dass die homologen

Genabschnitte zu beiden Seiten der Mutation möglichst gleich gross sind. Die drei Mutationen, die eingebracht werden sollten, liegen an verschiedenen Positionen im gB- Gen. Damit für alle drei Mutationen das gleiche Transfer-Konstrukt mit den identischen homologen Bereichen verwendet werden konnte, musste vor der eigentlichen Mutagenesereaktion der Abschnitt des gB- Gens im Virusgenom entfernt werden, welcher die Positionen aller drei Mutationen beinhaltet.

7.2.1 Herstellung des Ausgangs- BAC- Plasmids BACgB-L

Um die erforderliche Deletion in das Virusgenom einzuführen, kam zunächst wieder die BAC- Mutagenese mit linearen Fragmenten zum Einsatz (6.1.17). Bei dieser Mutagenese wurde das lineare Fragment für die Rekombination durch Polymerasekettenreaktion generiert. Template für die PCR war das Plasmid *pACYC177*. Mit den Oligonukleotiden *gB-L.for* und *gB-L.rev* wurde das Gen für die Kanamycinresistenz amplifiziert. Die flankierenden homologen Bereiche waren in dieser Mutagenesereaktion nur 50 bp lang und wurden in Form von 5'- Überhängen an den Oligonukleotiden eingefügt. Auf diese Weise entstand die gesamte Rekombinationskassette in nur einer PCR- Reaktion. Das Amplifikat wurde aufgereinigt (6.1.13) und zur BAC- Mutagenese mit linearen Fragmenten in Bakterien transformiert (6.1.17), die bereits das parentale BAC pHB5 trugen (Abb. 14A).

Aus den entstandenen Mutanten wurde durch *FLP*- vermittelte ortsspezifische Rekombination das Gen für Kanamycinresistenz wieder entfernt (6.1.17) (Abb. 14A). Die entstandene Mutante BACgB-L wurde mit der Restriktionsendonuklease *BglII* analysiert und mit dem parental BAC pHB5 verglichen. *BglII* schneidet 35 mal im Wildtyp- HCMV- Genom. Durch die Deletion wurde eine *BglII*- Schnittstelle entfernt, wodurch zwei Fragmente von 2,1 und 1,9 kb verschwanden und eine neue Bande von 2,6 kb in BACgB-L entstand (Abb. 14B). Dieses Experiment wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. M. Messerle von Dr. E. Borst am Max- von- Pettenkofer- Institut in München durchgeführt.

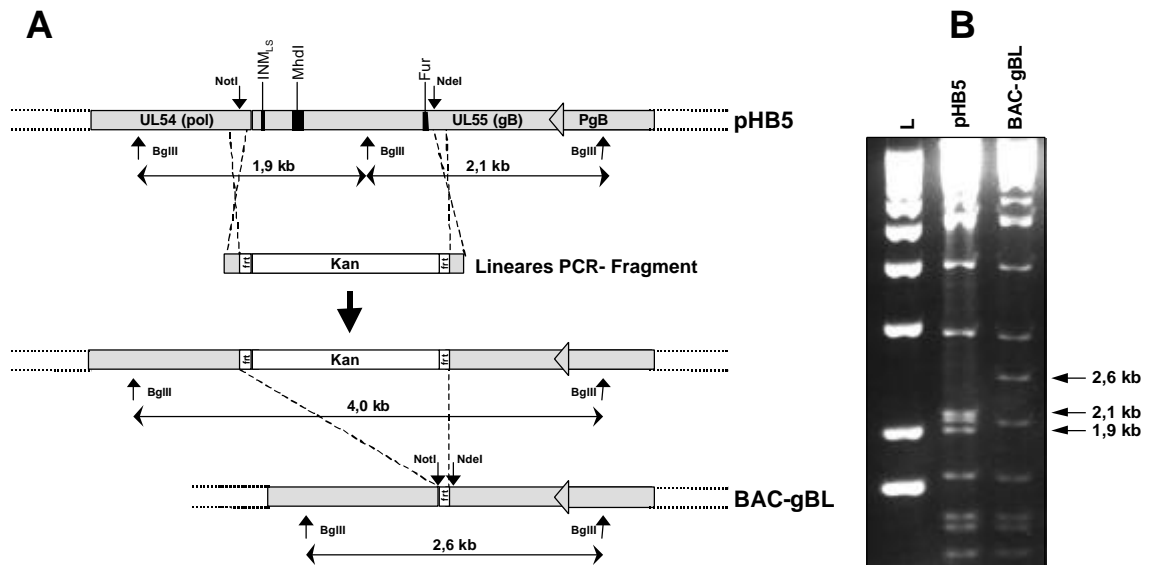


Abbildung 14: Konstruktionsschema und Analyse des Ausgangs- BAC- Plasmides BACgB-L für die Herstellung der Virusmutanten.

A: Klonierungsschema des BACgB-L. Oben ist der Ausschnitt des parentalen BAC pHB5 dargestellt, der das gB- Gen (UL55 (gB)), den gB- Promotor (PgB) und den Leserahmen der benachbarten Polymerase (UL54(pol)) enthält. Die relativen Positionen der Hydrophoben Domäne 1 (MhdI), der Furinspaltstelle (Fur) und des Lokalisationssignals für die innere Kernmembran (INM_{LS}) sind durch schwarze Balken gekennzeichnet. Die amplifizierte Cassette mit dem Kanamycinresistenzgen und den flankierenden homologen Bereichen (lineares PCR- Fragment) ersetzte nach homologer Rekombination das Fragment zwischen einer NdeI- und einer NotI- Schnittstelle in gB. Das Kanamycinresistenzgen wurde durch FLP- vermittelte ortsgerichtete Rekombination entfernt, wodurch das Ausgangskonstrukt für die Herstellung der Virusmutanten BACgB-L entstand. Die Größe der BgIII- Fragmente, welche zum Nachweis der Mutante herangezogen wurden, sind unter den jeweiligen Konstrukten angegeben.

B: Die DNA der Mutante BACgB-L und des Ausgangskonstruktes pHB5 wurde mit BgIII behandelt, auf einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Die 2,1 kb- und die 1,9 kb- Bande des pHB5 sowie die neu entstandene 2,6 kb- Bande von BACgB-L sind durch Pfeile gekennzeichnet. L bezeichnet den DNA- Grössenstandard.

7.2.2 Klonierung der Transferkonstrukte

Zunächst wurden die jeweiligen Rekombinationskassetten in einen Vektor mit hoher Kopienzahl (*pUC18*) kloniert und anschliessend vollständig in den Transfer- Vektor übertragen.

Um geeignete Schnittstellen für die weiteren Klonierungsschritte zu erhalten, wurde zunächst die NdeI- Schnittstelle des Vektors zerstört, indem dieser durch NdeI linearisiert und nach dem Auffüllen der überhängenden Enden religiert wurde. Im Anschluss daran wurde das Fragment zwischen der HindIII und der EcoRI Schnittstelle des Vektors *pUC18* entfernt und durch einen neuen DNA- Abschnitt ersetzt, welcher Erkennungsstellen für die folgenden Restriktionsendonukleasen trug: StuI- NruI- NdeI- NotI- XbaI-

NheI- *StuI*. Dieser kurze DNA- Abschnitt, dessen überhängende Enden komplementär zu denen des mit *Bam*HI und *Eco*RI linearisierten Vektors waren, wurde durch das Aneinanderlagern der komplementären Oligonukleotide *LinkerC* und *LinkerD* hergestellt, dephosphoryliert und in den nicht dephosphorylierten Vektor ligiert.

Die homologe Region A wurde durch Restriktion mit *Fsp*I und *Nde*I aus dem Plasmid *pRC/CMVgBP* entfernt und in den zuvor mit *Nru*I und *Nde*I geöffneten und dephosphorylierten Vektor ligiert. Dieses Fragment bestand aus den Nukleotiden 88457 – 82259 des HCMV- Gesamtgenoms (Chee *et al.*, 1990). Die zweite Region für die homologe Rekombination, Region B, wurde mittels der Oligonukleotide *ResFur3* und *HomXba*I durch Polymerasekettenreaktion aus dem Cosmid *pCM1029* amplifiziert. Nach Reinigung des Amplifikats wurde dieses über die Schnittstellen für *Not*I und *Xba*I in den Vektor eingefügt. Dieses Fragment enthielt den Bereich zwischen Nukleotid 80525 und 78317 des HCMV Genoms (Chee *et al.*, 1990). Dieser amplifizierte Bereich wurde mit den Oligonukleotiden *kontr.54V/2*, *kontr.Pla/2*, *SigDelgB*, *pseq-gB-15* und *RLA* vollständig sequenziert. Dieses Konstrukt mit den flankierenden homologen Bereichen wurde als Ausgangskonstrukt für die Herstellung aller drei Transfer-Konstrukte verwendet.

Die DNA- Abschnitte mit den Mutationen der Hydrophoben Domäne 1, der Furinspaltstelle und des Lokalisationssignals für die innere Kernmembran wurden durch Behandlung mit den Restriktionsendonukleasen *Nde*I und *Not*I aus den jeweiligen gB- Expressionskonstrukten *pRC/CMVgBDMhdi*, *pRC/CMVgBDFur* und *pRC/CMVgBsINM* entfernt und nach dem Öffnen des Vektors mit den gleichen Enzymen und anschließender Dephosphorylierung zwischen die beiden homologen Regionen A und B des Vektors ligiert. Um eine Umklonierung der Kasette in das Transfer- Konstrukt zu erleichtern, wurde in alle drei Konstrukte zusätzlich das Gen für Tetracyclinresistenz eingefügt. Hierzu wurden der Vektor, welcher die Mutation des Lokalisationssignals trug, mit *Xba*I- Behandlung, die anderen beiden Vektoren mit *Nhe*I- Behandlung linearisiert. Anschliessend wurden die überhängenden Enden mit dem Klenow- Fragment aufgefüllt und dephosphoryliert. Ein lineares Fragment, welches das Gen für

Tetracyclinresistenz trug, wurde aus dem Vektor *pBR322* durch Restriktion mit *HindIII* und *StuI* entfernt, ebenfalls mit Klenow- Fragment aufgefüllt und in den Vektor ligiert. Aus den drei resultierenden Plasmiden *pUC18ABDMhdI-tet*, *pUC18ABDFur-tet* und *pUC18ABsINM-tet* wurden die Rekombinationskassetten durch Restriktion mit *StuI* entfernt und in den zuvor mit *SmaI*- Behandlung linearisierten Vektor *pST76K_SR* ligiert (Abb. 15). Durch Selektion auf Agarplatten mit Tetracyclin (15 µg/ml) konnten die drei Transferplasmide *pST76K_SRDMhdI*, *pST76K_SRDfUr* und *pST76K_SRsINM* isoliert und für die Virusmutantenherstellung durch Zwei-Schritt Mutagenese eingesetzt werden.

Die Transferplasmide sowie die bei den einzelnen Klonierungsschritten entstandenen Konstrukte wurden mittels Restriktionsanalyse überprüft.

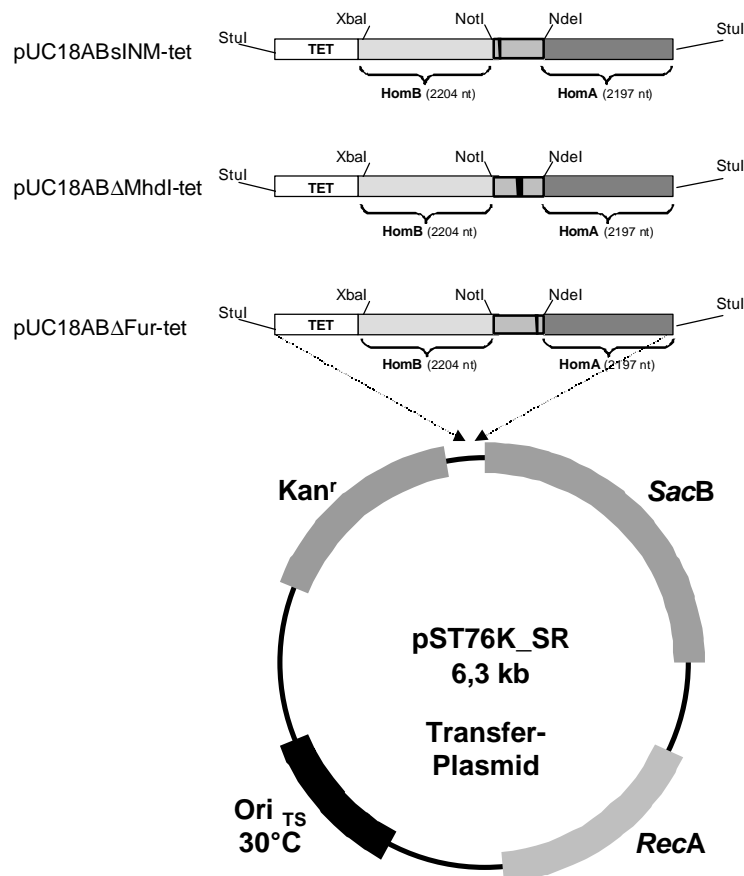


Abbildung 15: Schematische Darstellung der Herstellung der Transfer- Konstrukte *pST76K_SRsINM*, *pST76K_SRDMhdI* und *pST76K_SRDfUr*.

Die drei Rekombinationscassetten wurden aus des Plasmiden *pUC18ABDFur-tet*, *pUC18ABDMhdI-tet* und *pUC18ABsINM-tet* mit *StuI* entfernt und jeweils in den mit *SmaI* geöffneten Transfer- Vektor *pST76K_SR* kloniert. Die homologen Bereiche für die Rekombination ins BAC sind mit HomA und HomB bezeichnet .

7.2.3 Herstellung der Virusmutanten BAC Δ Mhdl, BAC Δ Fur und BACsINM

Zur Herstellung der Virusmutanten wurden die Transferkonstrukte *pST76K_SRDMhdl*, *pST76K_SRDFur* und *pST76K_SRsINM* (7.2.2) in *E.coli* DH10B transformiert, die bereits das Ausgangsplasmid BACgB-L mit der Deletion in gB trugen (7.2.1). Durch Zwei- Schritt- Mutagenese (6.1.18) wurden die gewünschten Mutationen in das Virusgenom eingeführt und die Resistenzgene nach der Selektion rückstandsfrei entfernt (Abb. 16A-C). Kanamycinsensitive Bakterienklone wurden durch Restriktionsendonuklease-Behandlung identifiziert. Für die BAC Δ Fur- und die BAC Δ Mhdl- Mutante wurden die Restriktionsmuster der Endonuklease *BglII* verwendet und mit denen des Ausgangskonstruktes BACgB-L verglichen (Abb. 16D). Im Falle des BAC Δ Fur entsprach das Restriktionsmuster dem des Wildtyps, die 2,6 kb grosse Bande aus BACgB-L war nicht mehr vorhanden und erwartungsgemäss durch zwei Fragmente von 2,1 kb und 1,9 kb Grösse ersetzt worden (Abb. 16D). Ein ähnliches Restriktionsmuster zeigte sich bei der Mutante BAC Δ Mhdl. Das zweite Fragment wies jedoch nicht eine Grösse von 1,9 kb, sondern von 1,8 kb auf, was auf die Deletion der codierenden Sequenz für die Hydrophobe Domäne 1 zurückzuführen war (Abb. 16D). Die BACsINM- Mutante wurde durch Restriktion mit dem Enzym *NheI* analysiert, für das 25 Schnittstellen im Wildtyp- Virusgenom existieren. Durch die Mutagenese wurde eine neue *NheI*- Schnittstelle eingeführt, wodurch ein Fragment von ursprünglich 20778 bp in zwei Fragmente von 13386 bp und 7392 bp zerfiel. Die beiden grösseren Fragmente sind im Restriktionsmuster nicht eindeutig sichtbar, da es mehrere Banden dieser Grösse nach *NheI*-Restriktion gibt, die sich überlagern. Durch das Auftreten der 7392 bp grossen Bande konnte die Mutante jedoch eindeutig identifiziert werden (Abb. 16E).

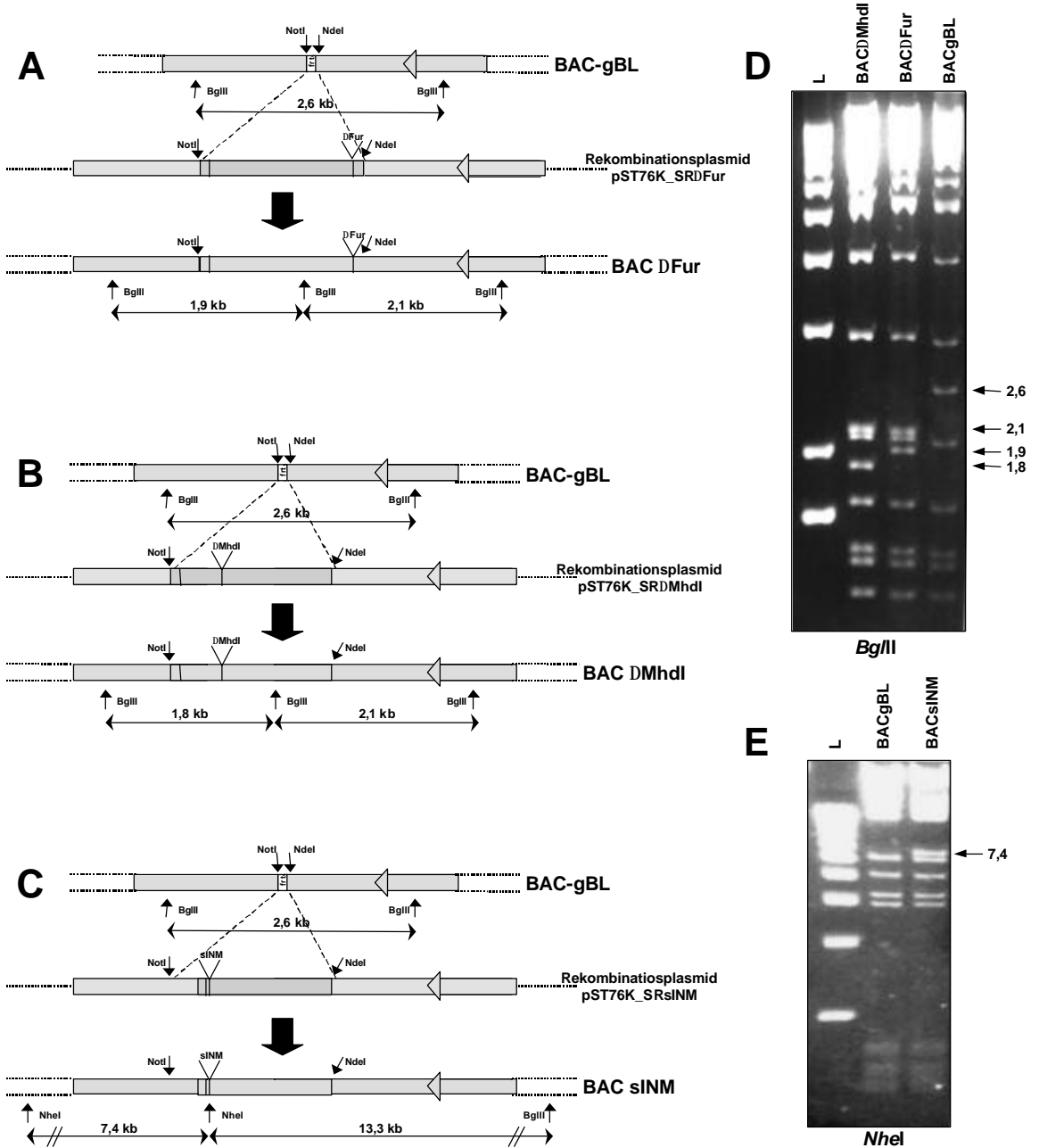


Abbildung 16: Konstruktionsschemata und Analyse der BAC- Mutanten BAC Δ Fur, BAC Δ MhdI und BACsINM.

Die obere Zeile der Schemata A, B und C zeigt den relevanten Ausschnitt des Ausgangsplasmides BACgB-L. Darunter sind die Ausschnitte der jeweiligen Transferkonstrukte dargestellt. Die jeweils untere Zeile zeigt die hergestellten BAC- Mutanten mit der Reinsertion der mutagenisierten gB-Abschnitte nach Zwei- Schritt- Mutagenese. Die BAC DNA wurde mit geeigneten Enzymen geschnitten, in einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt (D und E). Die zur Identifizierung der Mutanten verwendeten Banden mit einer Größe von 2,6 kb, 2,1 kb und 1,9 kb bei der Mutante BAC Δ Fur (D), 2,6 kb, 2,1 kb und 1,8 kb bei der Mutante BAC Δ MhdI (D) und das 7,4 kb Fragment bei der Mutante BACsINM (E) sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die relativen Positionen der *Bgl*II und *Nhe*I- Schnittstellen sind unter den schematisch dargestellten Genabschnitten eingetragen. L bezeichnet den DNA- Größenstandard.

7.2.4 Überprüfung der Wachstumsfähigkeit der Virusmutanten nach Transfektion von BAC Δ Fur, BAC Δ Mhdl und BACsINM

Um die Replikationsfähigkeit der hergestellten BAC- Mutanten zu untersuchen, erfolgte die Transfektion dieser Konstrukte in permissive primäre humane Fibroblastenzellen (6.2.4). Als Kontrolle diente das Wildtyp-BAC pHB5. Etwa eine Woche nach Transfektion setzte im Falle der Mutanten BAC Δ Fur und BACsINM sowie des Wildtyps pHB5 die Entstehung eines sich ausbreitenden cytopathischen Effektes als Anzeichen einer erfolgreichen Infektion ein. Damit bestätigten sich die Ergebnisse des Ein-Zyklus- Replikations- Assays, dass die Furinspaltstelle und das Lokalisationssignals für die innere Kernmembran keine essentiellen Domänen des gB- Moleküls sind.

Die BAC Δ Mhdl- Mutante führte auch nach mehrmaliger Wiederholung der Transfektion nicht zur cytopathischen Veränderung der Zellkultur. Auch dieses Ergebnis bestätigte die letale Auswirkung der Deletion der Hydrophoben Domäne 1.

Um sicherzustellen, dass die gezielt eingebrachte Mutation die einzige Veränderung im Virusgenom und damit auch verantwortlich für den letalen Phänotyp war, wurde eine genetische Revertante hergestellt. Dazu wurde das nicht replikationsfähige BAC Δ Mhdl zusammen mit dem Cosmid *pCM1029* cotransfiziert (6.2.5). Dieses Cosmid enthält einen Teil des HCMV- Genoms, unter anderem auch den vollständigen Leserahmen des gB. In diesen Transfektionsansätzen konnte nach etwa einer Woche ebenfalls ein progressiver cytopathischer Effekt beobachtet werden, welcher vermutlich auf homologer Rekombination zwischen BAC Δ Mhdl und *pCM1029* und der daraus resultierenden Bildung einer replikationsfähigen Virusrevertante beruhte.

7.3 Charakterisierung der Virusmutanten HCMVDFur und HCMVsINM

7.3.1 Nachweis der gB- Mutationen in der Virion- DNA

Zum Nachweis der Mutationen im gB- Gen der wachstumskompetenten Virusmutanten wurde zunächst aus dem Kulturüberstand der mit BAC Δ Fur und BACsINM sowie mit pHB5 transfizierten Zellkulturen zellfreier Virusstock gewonnen (6.2.6) und aus diesem die virale DNA präpariert (6.2.11). Mittels PCR wurde jeweils der Bereich amplifiziert, welcher die eingebrachte Mutation trug. Im Falle der HCMV Δ Fur- Mutante entstand ein 1821 pb langes Amplifikat mit den Oligonukleotiden *gBC* und *ResFur/2*. Durch die Mutation war eine zusätzliche Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease *Xmal* eingeführt worden. Nach Aufreinigung und Behandlung mit *Xmal* wurde das Amplifikat vollständig in zwei Fragmente von 1349 bp und 472 bp geteilt. Im Gegensatz dazu wurde das Kontrollamplifikat, welches mit den gleichen Oligonukleotiden aus der DNA des Wildtyps RVHB5 gewonnen wurde, erwartungsgemäss durch *Xmal* nicht geschnitten (Abb. 17A). Der Nachweis der Mutation in der HCMVsINM- Mutante, bei der durch die Mutagenese eine zusätzliche *NheI*- Schnittstelle eingeführt wurde, erfolgte analog durch die Amplifikation des mutierten Bereichs mit den Oligonukleotiden *Selec54V/2* und *kontr.54V/2*. Das entstandene 1734 bp grosse Fragment wurde durch Restriktion mit *NheI* in zwei Fragmente von 1000 bp und 734 bp Grösse gespalten. Das Amplifikat, welches mit den gleichen Oligonukleotiden aus Wildtyp- Virus- DNA entstanden war, blieb auch in diesem Fall erwartungsgemäss intakt (Abb. 17B).

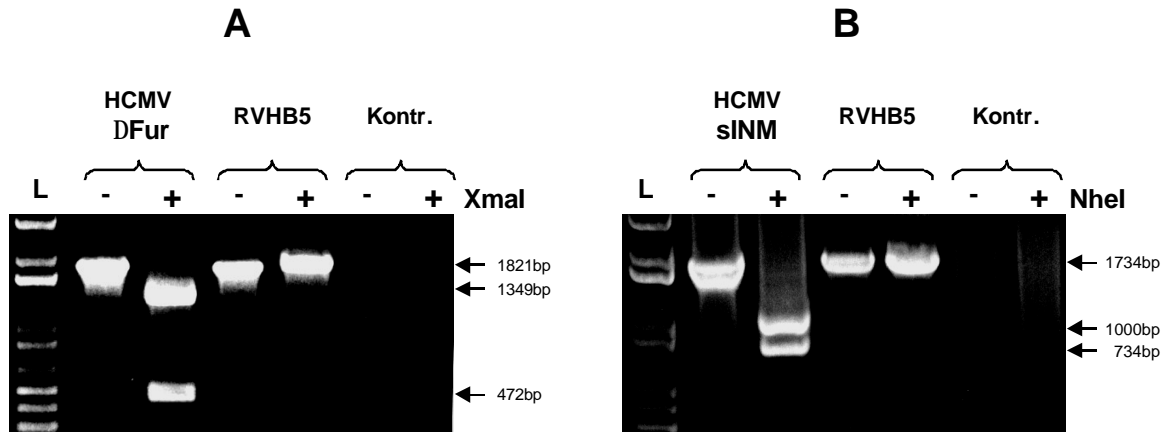
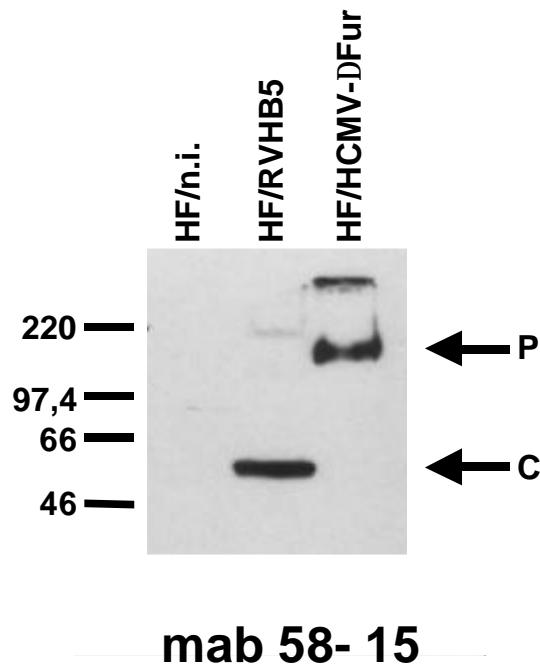


Abbildung 17: Nachweis der Mutationen in Virion- DNA mittels PCR und Restriktionsendonukleasebehandlung.

Der entsprechende Bereich des mutagenisierten gB- Gens von HCMV Δ Fur und HCMVsINM wurde amplifiziert und durch Restriktion mit den Endonukleasen *XmaI* bzw. *NheI* analysiert. Die Amplifikate aus der DNA der Virusmutanten wurden im Gegensatz zu den Kontrollamplifikaten des Wildtyps RVHB5 vollständig gespalten. In den rechten zwei Spuren ist jeweils die Kontroll- PCR ohne Template gezeigt. Die Grösse der Banden ist mit Pfeilen gekennzeichnet. L bezeichnet den DNA-Grössenstandard.

7.3.2 Nachweis des furinresistenten gB- Proteins in HCMV Δ Fur infizierten Zellen

Zur Identifizierung des ungespaltenen gB- Proteins der HCMV Δ Fur- Mutante wurden infizierte Fibroblasten 7 Tage nach Infektion geerntet und die gB- Expression mittels SDS- PAGE und Immunoblot untersucht (6.3.4, 6.3.4). Die Färbung erfolgte mit dem monoklonalen Antikörper mab 58-15. Dieser Antikörper erkennt ein Epitop des carboxyterminalen gB- Spaltfragmentes. Als Kontrolle dienten Fibroblasten, die mit dem Wildtypvirus RVHB5 infiziert waren, sowie nicht infizierte Fibroblasten. In den mit dem Wildtypvirus RVHB5 infizierten Zellen war das gB zu diesem späten Zeitpunkt nach Infektion fast vollständig gespalten, es konnte nur das carboxyterminale Spaltprodukt von 55 kDa gefärbt werden (Abb. 18). In den mit HCMV Δ Fur infizierten Zellen lag das gB vollständig ungespalten vor, es wurde nur der Vorläufer mit einer molekularen Masse von etwa 160 kDa erkannt.



mab 58- 15

Abbildung 18: Identifizierung des ungespaltenen gB in HCMV Δ Fur infizierten Zellen.

Nicht infizierte Zellen (HF/n.i.), RVHB5 infizierte Zellen (HF/RVHB5) und HCMV Δ Fur infizierte Zellen (HF/HCMV Δ Fur) wurden sieben Tage nach Infektion geerntet und mittels SDS-PAGE und Immunoblot untersucht. Das gB wurde mit dem monoklonalen Antikörper mab 58-15 nachgewiesen. Die Positionen des ungespaltenen Vorläufers (P) und des carboxyterminalen Spaltfragmentes (C) sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die Positionen der Markerproteine sind links aufgeführt. In den RVHB5- infizierten Zellen wurde nur das carboxyterminale Spaltprodukt nachgewiesen, in den HCMV Δ Fur infizierten Zellen konnte keine proteolytische Prozessierung beobachtet werden.

7.3.3 Nachweis des gB- Proteins in HCMVsINM infizierten Zellen

Zur Identifizierung des gB in HCMVsINM- infizierten Zellen diente eine Beobachtung aus vorangegangenen Arbeiten: Die Aminosäuresubstitution, die das Lokalisationssignal für die innere Kernmembran verändert, zerstört ebenfalls das Epitop für den monoklonalen Antikörper mab 58-15, so dass das gB der Mutante von diesem Antikörper nicht erkannt werden kann (Meyer & Radsak, 2000).

Parallele Fibroblastenkulturen wurden mit HCMVsINM und dem Wildtyp RVHB5 infiziert, eine Woche nach Transfektion geerntet und nach SDS-PAGE und Immunoblot mit dem monoklonalen Antikörper mab 58-15 gefärbt (Abb. 19). Ein Blot mit den gleichen Extrakten wurde parallel mit dem monoklonalen Antikörper mab 27-156 gefärbt, der ebenfalls das carboxyterminale Spaltfragment erkennt, dessen Epitop jedoch durch die Mutation des Lokalisationssignals nicht zerstört wird. Mab 27-156 erkannte

beide carboxyterminalen Spaltprodukte, mab 58-15 jedoch nur das Fragment des Wildtyp- gB.

Das gB- Protein in HCMVsINM- infizierten Zellen repräsentierte somit ausschliesslich das erwartete Produkt mit substituiertem Lokalisationssignal für die innere Kernmembran.

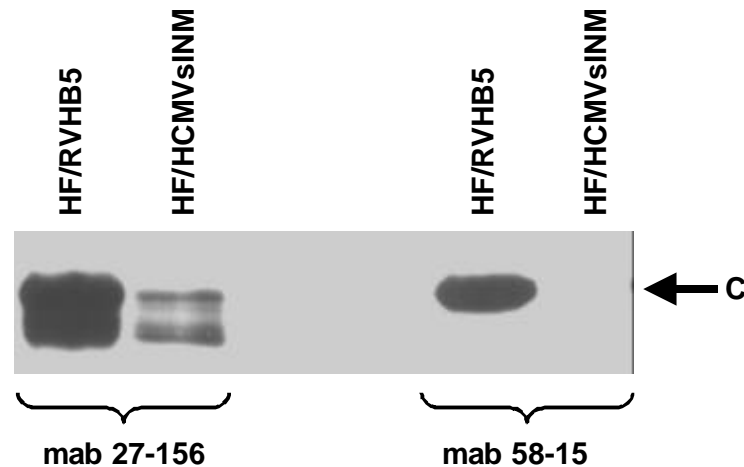


Abbildung 19: Identifizierung des gB- Proteins in HCMVsINM infizierten Zellen.

RVHB5- (HF/RVHB5) und HCMVsINM- infizierte Zellen (HF/HCMVsINM) wurden sieben Tage nach Infektion geerntet und mittels SDS-PAGE und Immunoblot untersucht. Identische Extrakte wurden mit den monoklonalen Antikörpern mab 58-15 b.z.w. mab 27-156 gefärbt. Die Positionen des carboxyterminalen Spaltfragmentes (c) ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Das gB aus den HCMVsINM infizierten Zellen wurde nur durch den Antikörper mab 27-156 erkannt. Mab 27-156 erkennt zusätzlich eine unspezifische Bande bei etwa 54 kDa.

7.3.4 Glykosylierung des gB- Proteins der Mutanten HCMV Δ Fur und HVMVsINM

Anhand der Sensitivität für bestimmte kompartimentspezifische Glykosidasen können Aussagen über den intrazellulären Transport von Glykoproteinen getroffen werden. Während das Enzym *EndoH* nur mannosereiche Zucker abspaltet, die im Endoplasmatischen Retikulum angefügt werden, entfernt das Enzym *PNGaseF* auch komplexe Zucker, mit denen Glykoproteine erst im Golgiapparat modifiziert werden.

Zellfreie Viruspräparationen von RVHB5, HCMVsINM und HCMV Δ Fur (6.2.7) wurden mit *PngaseF* und *EndoH* behandelt und anschliessend mittels SDS-PAGE und Immunoblot untersucht. Extrakte der RVHB5 und der HCMV Δ Fur- Virionen wurden mit dem monoklonalen Antikörper mab 58-15 gefärbt, die

des HCMVsINM mit mab ITC39, der ebenfalls ein Epitop des carboxyterminalen Spaltfragmentes erkennt (Abb. 20).

Die extrazellulären Virionen beider Mutanten enthielten gB.

Das gB- Protein aller Viruspräparationen erwies sich als sensitiv gegenüber beiden Glykosidasen. Die Behandlung mit *EndoH* hatte bei Extrakten aus RVHB5 und HCMVsINM durch die Abspaltung der mannosereichen Zuckerreste eine Reduktion des carboxyterminalen gB- Spaltfragmentes von 55 kDa auf etwa 52 kDa zur Folge. Bei gB aus HCMV Δ Fur wurde die molekulare Masse des ungespaltenen Moleküls von etwa 160 kDa auf 150 kDa reduziert. Die Behandlung mit *PGNaseF* bewirkte bei gB aus RVHB5 und HCMVsINM eine weitere Abnahme des Molekulargewichtes des carboxyterminalen Spaltproduktes auf etwa 50 kDa, deglykosyliertes gB aus HCMV Δ Fur wanderte bei etwa 95 kDa.

Die gB- Moleküle aus beiden Virusmutanten trugen somit sowohl mannosereiche als auch komplexe Zucker. Daraus kann geschlossen werden, dass sie analog zum Wildtyp- gB aus RVHB5 korrekt aus dem Endoplasmatischen Retikulum via Golgi- Apparat transportiert wurden.

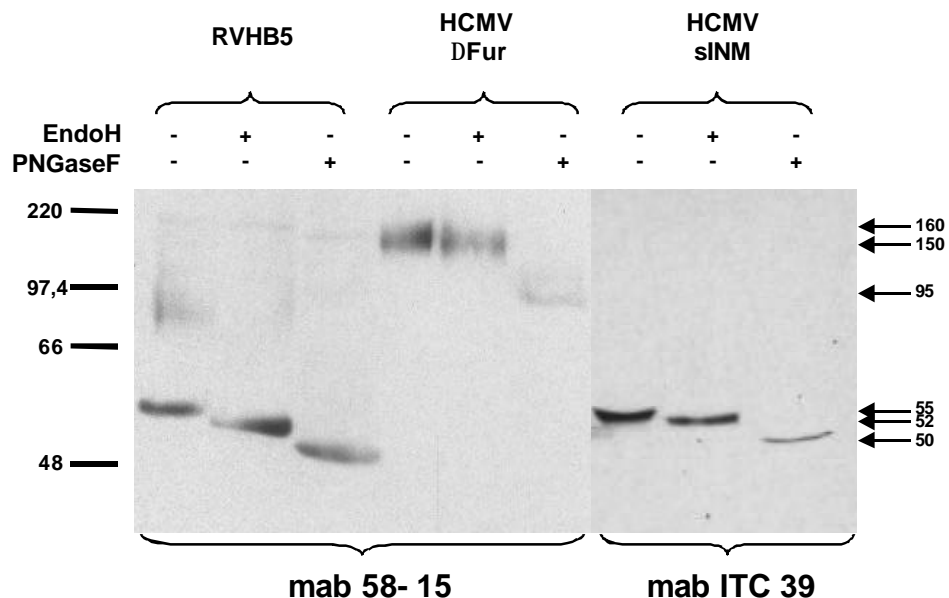


Abbildung 20: Glykosidasebehandlung des gB- Proteins aus HCMV Δ Fur und HCMVsINM.

Extrakte aus zellfreien Virionen wurden mit *EndoH* und *PGNaseF* behandelt (+ bzw. -) und anschliessend mittels SDS- PAGE und Immunoblot untersucht. Sowohl das ungespaltene gB der HCMV Δ Fur- als auch das gespaltene gB der HCMVsINM- Mutante waren analog zum Wildtyp gB sensitiv gegenüber beiden Glykosidasen. Die Pfeile markieren die molekularen Massen und unterschiedlichen Positionen der Produkte des Glykosidaseverdaus. Die verwendeten Antikörper sind unter der Abbildung, die Position der Markerproteine am linken Bildrand angegeben.

7.3.5 Wachstumskinetiken der Virusmutanten HVMC Δ Fur und HCMVsINM

Um mögliche Unterschiede im Wachstumsverhalten der hergestellten Virusmutanten festzustellen, wurde das freigesetzte Virus im Plaqueassay titriert (6.2.9) und eine Wachstumskinetik erstellt (6.2.8).

Die HCMV Δ Fur Mutante zeigte bezüglich ihres Wachstumsverhaltens keinen Unterschied zum Wildtypvirus RVHB5 (Abb. 21). Der erste Zyklus der Replikation war nach 72 Stunden beendet, zu diesem Zeitpunkt konnten erstmals Viren im Überstand nachgewiesen werden. Auch die Gesamtmenge der freigesetzten Tochtervirionen mit etwa 5×10^5 infektiösen Einheiten war vergleichbar.

Die HCMVsINM- Mutante hingegen replizierte langsamer als das Wildtypvirus. Die Freisetzung der Tochtervirionen war um mindestens 24 Stunden verzögert. Ausserdem war die Gesamtmenge der produzierten Viren etwa um den Faktor zehn geringer.

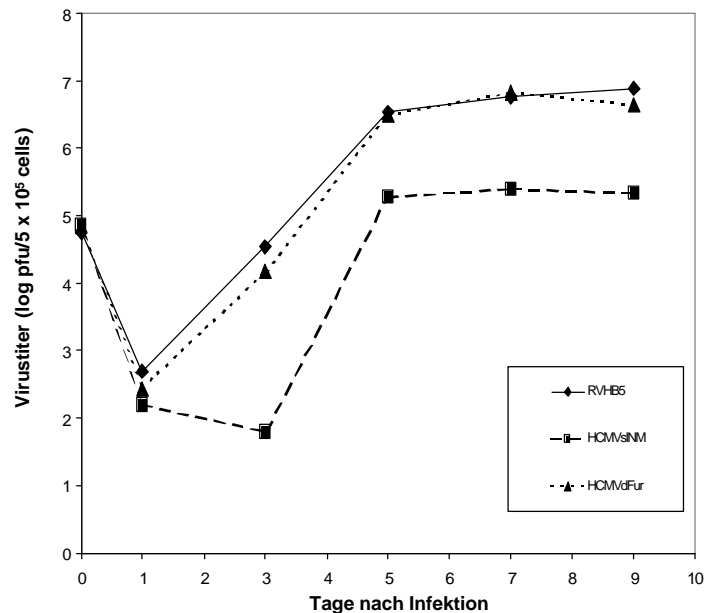


Abbildung 21: Wachstumskinetiken der Virusmutanten HCMV Δ Fur und HCMVsINM.

Parallelkulturen von jeweils 5×10^5 Fibroblasten wurden mit HCMV Δ Fur, HCMVsINM b.z.w. RVHB5 als Kontrolle infiziert. Die Abszisse kennzeichnet den Zeitpunkt nach Infektion, an dem die Kulturüberstände titriert wurden. Auf der Ordinate ist die Gesamtmenge der freigesetzten infektiösen Einheiten gezeigt, der Zeitpunkt Null repräsentiert die Gesamtmenge der für die Infektion eingesetzten infektiösen Einheiten. Die Graphik gibt Aufschluss über das Wachstumsverhalten sowie das Verhältnis zwischen Parental- und Tochtervirus.

7.3.6 Expression und subzelluläre Lokalisation des gB- Proteins in HCMV Δ Fur- und HCMVsINM- infizierten Zellen

Um die Expression und subzelluläre Lokalisation des gB- Proteins der Virusmutanten in infizierten Zellen zu untersuchen, wurden parallele Fibroblastenkulturen auf Deckgläschen mit den Mutanten HCMV Δ Fur, HCMVsINM und RVHB5 als Kontrolle mit einer m.o.i. von 0,5 infiziert. Nach Adsorption des Virusinokulums wurde das Kulturmedium abgenommen und durch frisches Medium ersetzt, welches mit humanem polyklonalem polyspezifischen anti- HCMV- Serum versetzt war (Verdünnung 1: 200). Die Serumzugabe sollte sicherstellen, dass die gB- Expression aus der initialen Infektion stammte. Die Zellen wurden 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden nach Infektion fixiert und einer indirekten Immunfluoreszenz mit einem gB- spezifischen Antikörper unterzogen (Abb. 22).

Die mit der Positivkontrolle infizierten Zellen zeigten die typische gB- Expressionskinetik: Nach 48 Stunden konnte das Antigen detektiert werden. Es war zu diesem Zeitpunkt überwiegend im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert. 72 Stunden nach Infektion war die typische Akkumulation des Moleküls im Golgi zu erkennen. Sowohl die Menge des gB- Proteins als auch die Konzentrierung im Golgi nahmen bis 96 Stunden nach Infektion zu. Zu diesem Zeitpunkt war der cytopathische Effekt bereits stark ausgeprägt. 120 Stunden nach Infektion waren noch Antigenaggregate nachzuweisen, die Kompartimentierung der Zellen war jedoch nicht mehr intakt (Abb. 22, HF/RVHB5 und HF/HCMV Δ Fur).

HCMV Δ Fur- infizierte Kulturen waren sowohl bezüglich der gB- Expressionskinetik als auch der subzellulären Lokalisation des spezifischen Antigens weitgehend identisch mit den Wildtypvirus- infizierten Zellen.

Bei der HCMVsINM- Mutante konnte die Expression des gB unter den gleichen Bedingungen erst nach 72 Stunden nachgewiesen werden. Das gB- spezifische Antigen war hier zunächst ebenfalls im ER lokalisiert. Nach 96 Stunden zeigte sich die typische Golgianfärbung, die 120 Stunden nach Infektion noch verstärkt auftrat. Auch zu diesem späten Zeitpunkt nach Infektion waren die Zellen nicht deutlich cytopathisch verändert und zeigten noch eine erkennbare subzelluläre Kompartimentierung. Darüber hinaus war

die Menge des nachweisbaren Antigens vergleichsweise geringer als in den anderen Kulturen (Abb. 22, HF/HCMVsINM).

In HCMVsINM- infizierten Kulturen war somit sowohl die gB- Expression als auch die typische Akkumulation in den entsprechenden Zellkompartimenten um etwa 24 Stunden verzögert.

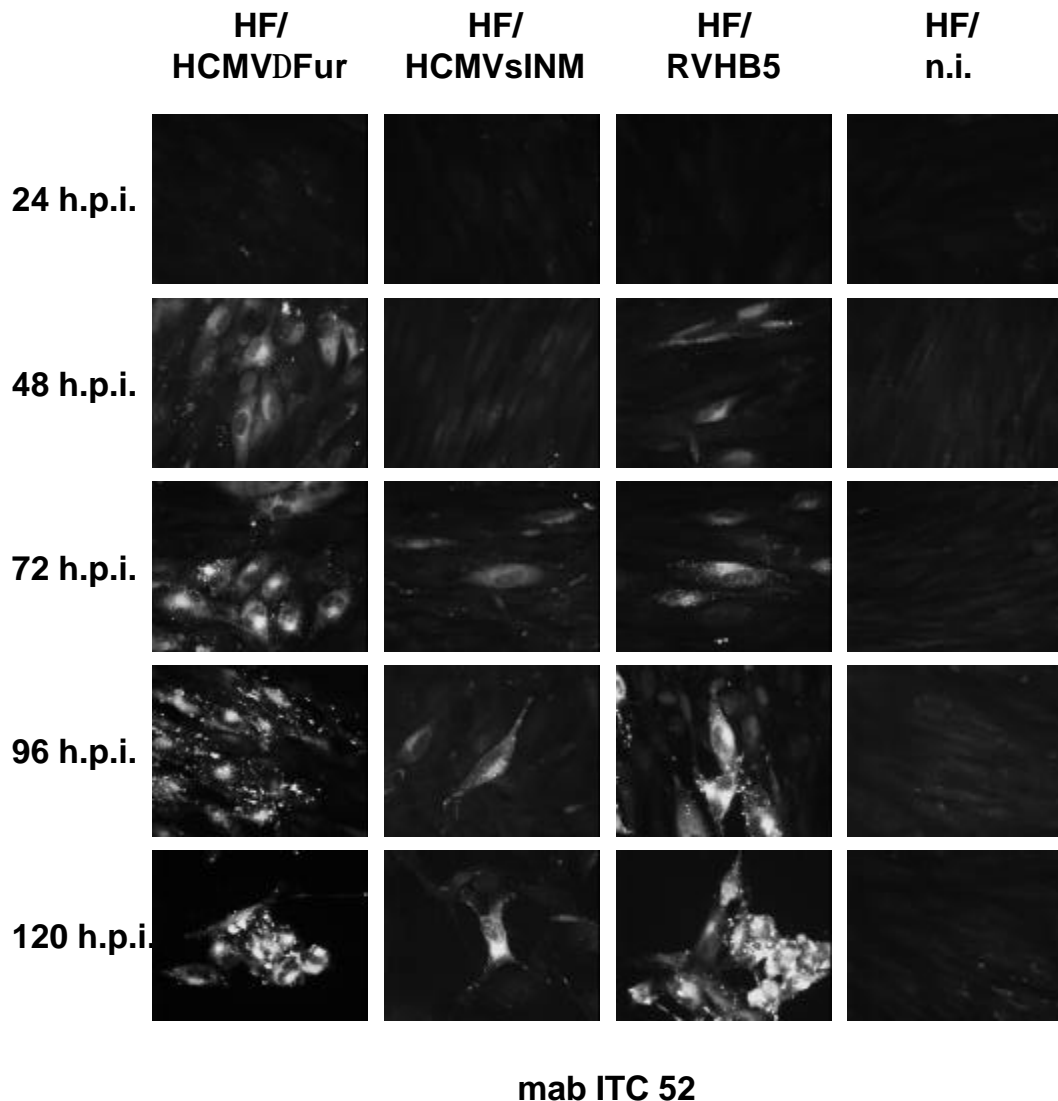


Abbildung 22: Expression und subzelluläre Lokalisation des gB- Proteins der Virusmutanten HCMVΔFur und HCMVsINM.

Konfluente Deckglaskulturen von Fibroblasten wurden mit HCMVΔFur (HF/ HCMVΔFur) und HCMVsINM (HF/HCMVsINM) infiziert. Als Kontrollen dienten RVHB5- infizierte (HF/RVHB5) und nicht infizierte Zellen (HF/n.i.). Die Kulturen wurden in Anwesenheit von neutralisierendem Serum inkubiert, nach 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden fixiert und mittels indirekter Immunfluoreszenz untersucht (1. Antikörper: mab ITC52, 2. Antikörper: Anti-Human-IgG von der Ziege, F(ab')- Fragmente, FITC-gekoppelt). Die HCMVΔFur- Mutante zeigte keinen Unterschied zum Wildtypvirus RVHB5. Die HCMVsINM- Mutante zeigte eine um etwa 24 Stunden verzögerte Expression und eine veränderte subzelluläre Verteilung des gB- Antigens gegenüber dem Wildtypvirus.

7.3.7 Oberflächenexpression des gB in HCMV Δ Fur und HCMVsINM

Das Glykoprotein B wird in infizierten Zellen durch das Endoplasmatische Retikulum und den Golgi entlang dem exozytotischen Weg an die Zelloberfläche transportiert. Von dort wird es reinternalisiert und steht im Kompartiment des Trans- Golgi- Netzwerkes und/oder des frühen Endosoms zur Umhüllung der Viruskapside zur Verfügung. Das impliziert, dass das gB reifer extrazellulärer Virionen zuvor an der Zelloberfläche war. Aus den Glykosylierungsexperimenten (7.3.4) wurde deutlich, dass die Passage der untersuchten Proteine durch den Golgi nicht beeinträchtigt war.

Zum Nachweis des Transportes des gB- Proteins zur Plasmamembran der infizierten Zellen wurden konfluente Deckglaskulturen von Fibroblastenzellen mit den Virusmutanten HCMVsINM und HCMV Δ Fur mit einer m.o.i von 1 infiziert. 72 Stunden nach Infektion wurden die Zellen einer Oberflächenimmunfluoreszenz unterzogen (6.3.2). Für jede Infektion wurde eine permeabilisierte Kontrolle mitgeführt, um die Expression des Antigens nachzuweisen. Um zu zeigen, dass in den Oberflächenimmunfluoreszenzen ausschliesslich Oberflächenantigene erkannt wurden, wurde eine parallele, mit Wildtypvirus RVHB5 infizierte Kultur auf die Expression des viralen Proteins pp65 hin untersucht. pp65 ist ein virales Tegumentprotein, welches während des gesamten Infektionszyklus intrazellulär lokalisiert ist (Abb. 23). Das gB der HCMV Δ Fur Mutante war 72 Stunden nach Infektion wie das gB des Wildtyps RVHB5 an der Oberfläche der Zellen nachzuweisen (Abb. 23, a, c). Das gB der HCMVsINM- Mutante konnte zu diesem Zeitpunkt zwar intrazellulär, nicht aber an der Zelloberfläche gefunden werden (Abb. 23,d). Erst nach 144 Stunden konnte gB aus HCMVsINM in einigen Fällen in der Cytoplasmamembran nachgewiesen werden (Abb. 23, f).

Die Kontrollfärbung gegen das Tegumentprotein pp65 zeigte, dass dieses sowohl nach 72 als auch nach 144 Stunden intrazellulär vorhanden war. Zu keinem Zeitpunkt konnte jedoch ein pp65- spezifisches Signal bei den Oberflächenfluoreszenzen erkannt werden (Abb. 23, e, g). Dadurch konnte bestätigt werden, dass die Zellen durch den Vorgang der Oberflächenimmunfluoreszenz nicht permeabilisiert wurden und

ausschliesslich Antigene in der Cytoplasmamembran nachgewiesenen wurden.

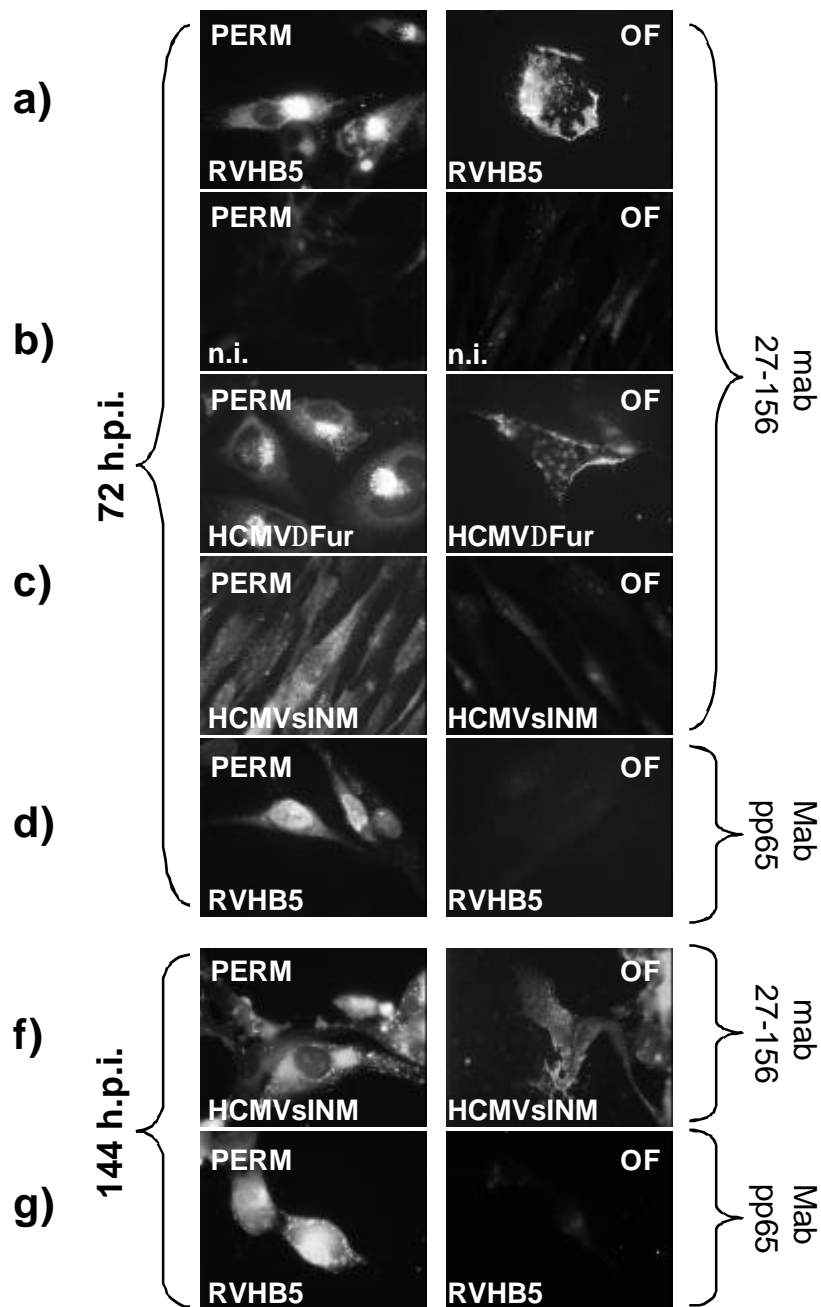


Abbildung 23: Oberflächenexpression des gB- Proteins in HCMV Δ Fur- und HCMVsINM- infizierten Zellen.

Konfluente Deckglaskulturen von Fibroblastenzellen wurden mit HCMV Δ Fur bzw. HCMVsINM infiziert und nach 72 oder 144 Stunden einer Oberflächenimmunfluoreszenz unterzogen (OF). Als Kontrollen dienten RVHB5- infizierte und nichtinfizierte Zellen. Als zusätzliche Permeabilisierungskontrollen (PERM) dienten RVHB5- infizierte Zellen, die mit einem Antikörper gegen das intrazelluläre Protein pp65 gefärbt wurden. (1. Antikörper: Anti-HCMV-gB^C vom Menschen, mabITC52 bzw. Anti-HCMV-pp65 von der Maus, mabpp65, 2. Antikörper: Alexa FluorTM 488 Anti-Maus-IgG, von der Ziege).

Nach 72 Stunden war sowohl gB aus RVHB5 als auch aus HCMV Δ Fur an der Zelloberfläche. gB aus HCMVsINM konnte erst 144 Stunden nach Infektion an der Oberfläche nachgewiesen werden.

7.3.8 Lokalisation des gB- Proteins aus HCMVsINM in der inneren Kernmembran infizierter Zellen

Die Beobachtungen, die in vorangegangenen Arbeiten bezüglich des Lokalisationssignals des gB für die innere Kernmembran im heterologen Expressionssystem gemacht wurden (Meyer & Radsak, 2000), sollten mit der HCMVsINM- Mutante im viralen Zusammenhang überprüft werden.

Dazu wurden konfluente Fibroblastenkulturen mit HCMVsINM bzw. RVHB5 mit einer m.o.i. von 1 als Kontrolle infiziert. 72 Stunden nach Infektion wurden durch Zellfraktionierung (6.2.10) Kerne mit intakter innerer Kernmembran präpariert. Die Kerne wurden auf Objektträgern fixiert (6.3.1) und mittels indirekter Immunfluoreszenz mit gB- spezifischen Antikörpern untersucht. Um die Kerne zu identifizieren, wurde eine DAPI- Färbung angeschlossen (6.3.1) (Abb. 24).

Die Morphologie der Kerne aus infizierten Zellen wies im Vergleich zu den Kernen nicht infizierter Zellen eine typische Vergrößerung auf.

Das gB- Protein war in den isolierten Kernen der RVHB5- Mutante nach 72 Stunden deutlich nachzuweisen.

Auch die Kerne der mit HCMVsINM infizierten Zellen zeigten unerwarteterweise eine deutliche gB- Fluoreszenz.

Damit wurde gezeigt, dass das Aminosäuresignal DRLRHR im viralen Zusammenhang nicht notwendig für die Lokalisation des Moleküls in der inneren Kernmembran ist. Die Mutation des Motives zu AALREE unterbindet die Lokalisation in der inneren Kernmembran nur bei solitärer Expression, offenbar jedoch nicht im Zusammenhang mit einer Infektion.

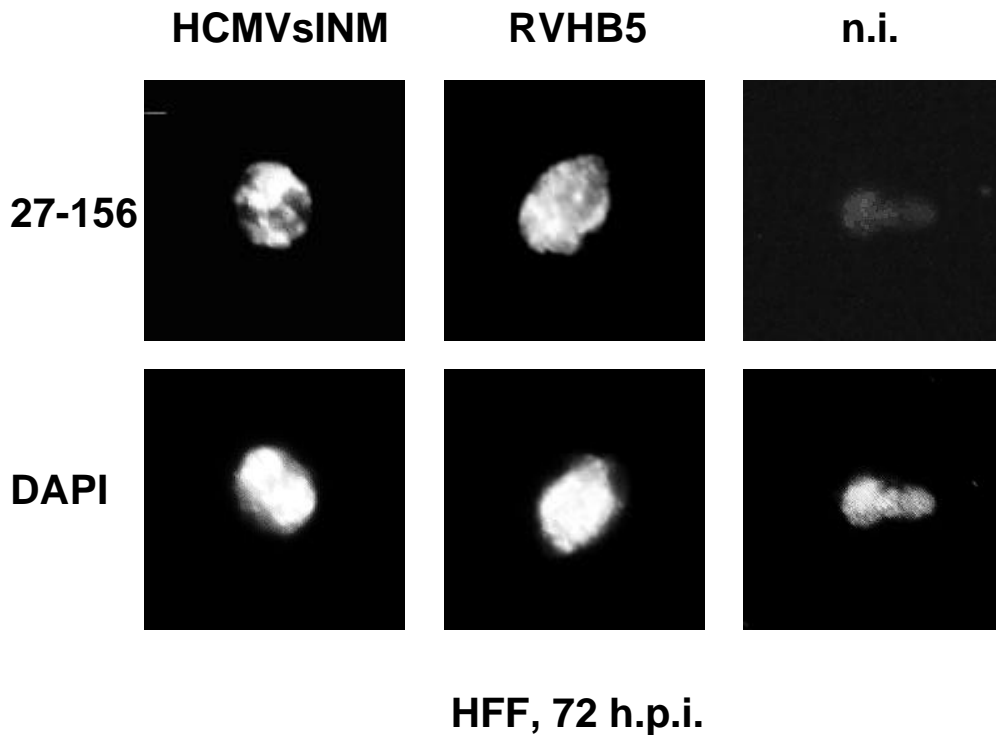


Abbildung 24: Lokalisation des gB- Proteins der Virusmutante HCMVsINM in der inneren Kernmembran infizierter Zellen.

Konfluente Fibroblastenkulturen wurden mit HCMVsINM infiziert und 72 Stunden nach Infektion einer Zellfraktionierung mit anschließender Aufreinigung der Kerne unterzogen. Als Kontrollen dienten RVHB5- infizierte Zellen sowie nicht infizierte Zellen (n.i.). Das gB- Antigen der inneren Kernmembran wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz untersucht (1, Antikörper: Anti-HCMV-gB^c von der Maus, mab27-156, 2. Antikörper: Alexa Fluor[™]488 Anti-Maus-IgG, von der Ziege), anschließend erfolgte die Anfärbung der Kerne mit DAPI.

Sowohl das gB- Protein aus RVHB5 als auch aus HCMVsINM waren 72 Stunden nach Infektion in den Präparationen isolierter Kerne nachzuweisen.

7.3.9 Ultrastrukturelle Untersuchungen HCMVsINM- infizierter Zellkulturen

Im Hinblick auf den vom Wildtyp abweichenden Phänotyp der HCMVsINM- Mutante sollten infizierte Kulturen ultrastrukturell analysiert werden.

Dazu wurden aus Fibroblastenkulturen, die mit HCMVsINM b.z.w. RVHB5 infiziert waren, 96 Stunden nach Infektion Ultradünnschnitte angefertigt und mittels Transmissionselektronenmikroskopie untersucht (6.3.6) (Abb. 25). Die Elektronenmikroskopie wurde von Dr. L. Kolesnikova, Institut für Virologie, Marburg, durchgeführt.

Die ultrastrukturellen Aufnahmen des Cytoplasmas der Wildtyp- infizierten Zellen zeigten das typische Bild spät nach HCMV- Infektion: Neben umhüllten und nicht umhüllten „dense bodies“ (DB), die überwiegend aus dem Tegumentprotein pp65 bestehen, waren nackte (Abb. 25, gefüllter Pfeil), sowie doppelt umhüllte Kapside (Abb. 25, offener Pfeil) zu erkennen. Im Vergleich dazu fielen in HCMVsINM- infizierten Zellen mehrere Veränderungen auf: Die Anzahl der „dense bodies“ sowie der nicht umhüllten Nukleokapside war deutlich erhöht. Viele der Nukleokapside wiesen zudem eine verminderte Elektronendichte im Zentrum auf. Das ist charakteristisch für sogenannte leere B- Kapside, die kein virales Genom enthalten. Die Beobachtungen lassen sich dahingehend interpretieren, dass in HCMVsINM- infizierten Zellen eine Störung der Reifungsknospong an Membranen des tubulären Endosoms und/oder des Trans- Gogi- Netzwerkes vorliegt, was eine Hemmung oder Verzögerung der Ausschleusung von reifen Virionen aus der Zelle zur Folge hat.

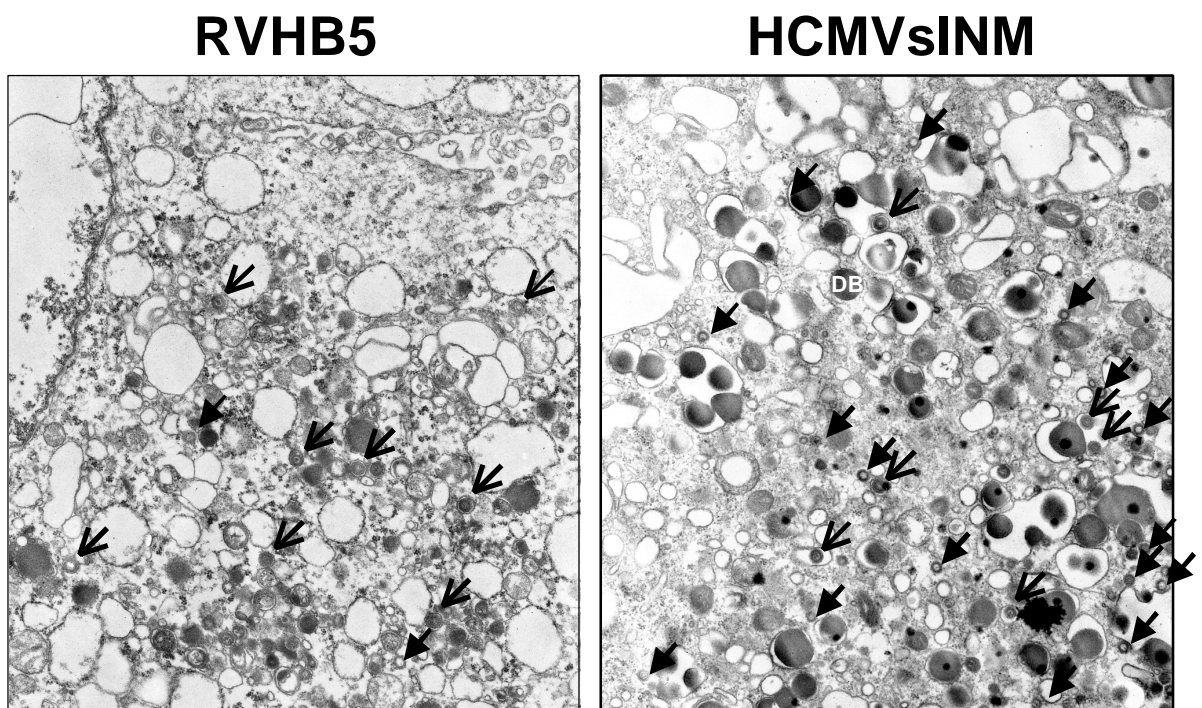


Abbildung 25: Ultrastruktur des Cytoplasmas einer HCMVsINM- infizierten Zelle spät nach Infektion.

Aus HCMVsINM- und RVHB5- infizierten Fibroblasten wurden 96 Stunden nach Infektion Ultradünnschnitte angefertigt und mittels Transmissionselektronenmikroskopie untersucht. Das Cytoplasma der mit HCMVsINM- infizierten Zellen zeigte eine deutliche Akkumulation von nicht umhüllten Kapsiden und „dense bodies“. Die gefüllten Pfeile kennzeichnen nackte, die offenen Pfeile doppelt umhüllte Kapside.

8. Diskussion

8.1 Komplementation der HCMVgB- Mutante durch transient exprimiertes gB- Protein

Das Glykoprotein B ist das Hauptmembranglykoprotein des humanen Cytomegalievirus. Seine Immundominanz und Bedeutung für die Virusadsorption und Penetration sowie seine Beteiligung an den verschiedenen Reifungsschritten während der Virusmorphogenese machen es zum vorrangigen Forschungsobjekt der funktionellen Analyse von HCMV-Glykoproteinen.

Die Klonierung des Gesamtgenoms von HCMV als künstliches Bakterienchromosom (BAC) (Borst *et al.*, 1999) hat eine gezielte Analyse von Genprodukten des HCMV entscheidend vereinfacht, da im BAC- System die gut etablierten Methoden der Mutagenese in Bakterien auch auf das herpesvirale Genom anwendbar sind. Auf diese Weise lassen sich beliebige Virusmutanten herstellen und ohne Kontamination mit Wildtypvirus klonal selektionieren, was zum ersten Mal auch die Isolierung stark attenuierter Virusmutanten ermöglicht.

Trotz dieses immensen Fortschrittes in der Mutantenherstellung von HCMV ist die Generierung von Viren mit Mutationen in essentiellen Genprodukten, wie dem Glykoprotein B, nach wie vor nicht durchführbar, da keine Zellsysteme existieren, in denen eine letale Mutation *in trans* komplementiert werden kann.

Der in dieser Arbeit vorgestellte „Ein- Zyklus- Replikations-Komplementations- Assay“ zeigt, dass transient exprimiertes gB im Gegensatz zum gB konstitutiv exprimierender Zellsysteme in der Lage ist, eine gB- null- Mutante zu komplementieren.

Zu diesem Zweck wurde ein replikationsdefizientes HCMV- BAC mit einer funktionellen Deletion von gB und einer Insertion des Fluoreszenzmarkers EGFP hergestellt (BAC Δ gB). Bei Cotransfektion dieses Moleküls mit einem eukaryontischen gB- Expressionsplasmid bewirkte die transiente Expression des plasmidgestützten gB eine phänotypische Komplementation für eine

Runde der Replikation und eine abortive Infektion der umliegenden Zellen mit den freigesetzten Tochtervirionen. Aufgrund der Insertion des EGFP konnte dieses Ereignis durch die Ausbildung grün fluoreszierender Miniplaques dokumentiert werden. Eine genetische Reversion zu einer replikationskompetenten Revertante durch homologe Rekombination konnte durch geeignete Kontrollen ausgeschlossen werden.

Im Gegensatz zu dem gB konstitutiv exprimierender Zellsysteme ist die Bioverfügbarkeit des transient exprimierten Proteins also gewährleistet. Ein Grund hierfür könnten Unterschiede im Transport oder der Prozessierung sein. Bei konstitutiv gB- exprimierenden Astrozytomzellen wurde eine Veränderung des Glykosylierungsstatus und in einigen Fällen ein Ausbleiben der proteolytischen Spaltung beschrieben (Reis *et al.*, 1993). Auch Fibroblasten, die das gB- Protein nach retroviraler Transduktion exprimierten, spalteten das Protein nicht (Strive *et al.*, 2000). Obwohl das Unterbleiben der Spaltung selbst nicht notwendigerweise entscheidend sein muss (8.2), könnte es ein Indikator für einen beeinträchtigten intrazellulären Transport des Moleküls sein.

Zur Anreicherung phänotypisch komplementierter Viren ist dieses System der Komplementation durch transiente Expression aufgrund der schlechten Transfektionseffizienzen nicht geeignet. Die wenigen freigesetzten phänotypisch komplementierten Virionen werden sofort von den umliegenden Zellen adsorbiert und dort nicht weiter vermehrt.

Es lassen sich aber Domänen im gB- Molekül als essentiell oder nichtessentiell determinieren. Da Virusmutanten mit Veränderungen in essentiellen Genen mit grosser Wahrscheinlichkeit letale Phänotypen zeigen würden, ist eine vorangehende Bestimmung der funktionellen Bedeutung der zu untersuchenden Domäne für die Virusvermehrung eine wichtige Voraussetzung für die anschliessende Herstellung von Mutanten.

8.1.1 Essentielle/ nichtessentielle Domänen des HCMV- gB für die Replikation in Zellkultur.

Um die Rolle verschiedener gB- Domänen für die Virusreplikation zu untersuchen, wurden eine Reihe von gB- Expressionsplasmiden mit definierten Deletionen bzw. Substitutionen in den „Ein- Zyklus- Replikations- Komplementations- Assay“ eingesetzt.

Mehrere der untersuchten Deletionen betrafen den cytoplasmatischen Anteil des gB. Bei den fünf verwendeten Mutanten war dieser Teil des Moleküls systematisch durch drei aufeinanderfolgende und zwei überlappende Deletionen abgedeckt. Als essentiell für die Virusreplikation stellten sich hierbei die überlappenden Deletionen 1 und 4 heraus, welche einen Bereich zwischen Aminosäure 773-825 betreffen. Ob dieser Bereich wesentlich ist für die korrekte Faltung des Proteins oder möglicherweise eine Rolle bei der Interaktion mit viralen Tegumentproteinen während der Virusumhüllung spielt, konnte in diesem Zusammenhang nicht untersucht werden.

Die Deletionen 2,3 und 5 hatten keinen Einfluss auf die Replikationsfähigkeit des Virus in Zellkultur. Dieses Ergebnis überraschte besonders im Fall der gB- Mutante mit der Deletion 3, in der die letzten 51 Aminosäuren des Moleküls fehlen. Für diesen Bereich wurden zwei funktionelle Domänen beschrieben: Zum einen befindet sich hier die einzige Phosphorylierungsstelle des Proteins (Ser900). Die Phosphorylierung gilt als wesentlicher Faktor für die Reinternalisierung des Moleküls von der Zelloberfläche (Fish *et al.*, 1998), die notwendig ist, damit das gB in Membranen des frühen Endosoms oder Transgolgi- Netzwerkes für die Umhüllung der Kapside bereitsteht (Radsak *et al.*, 1990). Zum anderen konnte das Lokalisationssignal des Moleküls für die Translokation in die innere Kernmembran in diesem Abschnitt identifiziert werden (Meyer & Radsak, 2000).

Das Fehlen beider Domänen wirkte sich offenbar nicht auf die Replikationsfähigkeit des Virus aus.

Nach diesem Resultat war auch die Beobachtung nicht unerwartet, dass ein gB- Molekül, in dem das Signal für die Lokalisation in der inneren

Kernmembran gezielt durch Aminosäuresubstitutionen zerstört wurde, in der Lage war, eine Runde der Replikation des Virus zu unterstützen (siehe 8.3).

Von den untersuchten gB- Molekülen, die Mutationen im luminalen Teil trugen, erwies sich die Deletion der Hydrophoben Domäne 1 als letal. Diese Domäne wurde als relevant für gB- vermittelte Fusionsprozesse beschrieben (Bold *et al.*, 1996). Die hydrophobe Domäne kann aufgrund ihrer Grösse und ihrer Lokalisation relativ zur proteolytischen Spaltstelle nicht direkt mit klassischen Fusionspeptiden von Influenza oder HIV (Hallenberger *et al.*, 1992, Klenk *et al.*, 1984) verglichen werden. Dennoch zeigte eine Deletion dieser Domäne im heterologen Expressionssystem in vorangegangenen Arbeiten eine drastische Reduktion der Fusionsaktivität in der Zell- Zell-Fusion (Bold *et al.*, 1996). Zudem wurde eine Beteiligung dieses hydrophoben Abschnittes an der korrekten Ausbildung von Homodimeren des Moleküls diskutiert (Eickmann *et al.*, 1998). Die Bedeutung der Hydrophoben Domäne 1 kann dahingehend interpretiert werden, dass sie für die intrazellulären Fusionsprozesse während der Virusmorphogenese oder die korrekte Anordnung der Moleküle in den Membranen absolut essentiell ist.

In der zweiten untersuchten luminalen gB- Mutante war die Spaltstelle für die zelluläre Endoprotease Furin durch Aminosäuresubstitution zerstört. Die Komplementation mit diesem gB- Molekül führte ebenfalls zur Bildung grün fluoreszierender Miniplaques; die proteolytische Spaltung ist für die Vermehrung des Virus in Zellkultur offenbar nicht essentiell (siehe 8.2).

8.1.2 Bestätigung der Funktion der eingegrenzten gB- Domänen mittels rekombinanter Viren

Die Auswirkungen der Mutationen wurde im viralen Zusammenhang durch die Herstellung von drei Virusmutanten exemplarisch überprüft. Als Beispiel für eine essentielle Mutation wurde die Deletion der Hydrophoben Domäne 1 ausgewählt; als Beispiele für nichtessentielle Mutationen wurden die Substitutionen des Lokalisationssignals für die innere Kernmembran und die des Furin- Spaltnotives in das Virusgenom eingebracht.

Alle Virusmutanten zeigten das erwartete Verhalten. Die Mutante mit der Deletion der Hydrophoben Domäne 1 erwies sich als letal und führte auch nach wiederholter Transfektion in humane Fibroblasten nicht zur Bildung replikationsfähiger Viren. Um sicherzustellen, dass keine zufällig entstandene Mutation an anderer Stelle für den letalen Effekt verantwortlich war, wurden Cotransfektionen mit einem Cosmid durchgeführt, welches sowohl das Gen für das authentische gB als auch ausreichende flankierende Homologien für die Rekombination trug. Eine solche Vorgehensweise ist üblich, wenn die hergestellten Virusmutanten stark attenuiert oder letal sind (Borst *et al.*, 2001, Britt, 2000, Wagner *et al.*, 2000). In diesen Versuchen entstanden replikationsfähige Viren, was mit grosser Wahrscheinlichkeit auf eine Reversion der Mutante durch homologe Rekombination zurückzuführen war. Damit konnte gezeigt werden, dass ausschliesslich die eingebrachte Mutation zu dem letalen Effekt führte.

Die Virusmutanten mit dem substituierten Lokalisationssignal für die innere Kernmembran (HCMVsINM) und der zerstörten Furinspaltstelle (HCMV Δ Fur) zeigten ebenfalls das erwartete Verhalten: beide Mutanten erwiesen sich als replikationsfähig und zeigten eine produktive Vermehrung in Zellkultur.

Die Aussagen des „Ein- Zyklus- Replikations- Komplementations- Assays“ bezüglich der Notwendigkeit definierter gB- Domänen für die Replikation in Zellkultur konnte somit durch die Herstellung der Virusmutanten bestätigt werden.

In folgenden Untersuchungen können weitere Domänen des gB- Moleküls hinsichtlich ihrer Notwendigkeit für die Virusvermehrung mithilfe dieses Assays eingegrenzt werden, indem eukaryontische gB- Expressionsplasmide mit weiteren Mutationen verwendet werden. Auf diese Weise könnten z.B. die Bedeutung der zahlreichen Cysteine für die Oligomerisierung des Moleküls oder die Rolle der Glykosylierungsstellen für die Replikation des Virus schnell charakterisiert werden.

Das Prinzip des hier beschriebenen Assays ist darüber hinaus auch auf andere essentielle Proteine des HCMV anwendbar. Voraussetzung dafür ist lediglich die Herstellung einer Virusmutante mit einer funktionellen Deletion des zu untersuchenden Proteins. Auf diese Weise könnten auch die

funktionellen Domänen anderer HCMV- Glykoproteine wie gH oder gL untersucht werden.

Theoretisch könnten essentielle Domänen auch durch einfache *Rescue*-Experimente, bei denen das mutagenisierte Gen des zu untersuchenden Proteins zur homologen Rekombination angeboten wird, determiniert werden.

Überlappt der Leserahmen des zu untersuchenden Proteins jedoch mit anderen codierenden oder *cis*- aktiven Bereichen wie Promotoren oder *Enhancern*, besteht die Gefahr, dass der beobachtete Effekt nicht auf die Mutation des Proteins selbst, sondern auf eine Beeinträchtigung der überlappenden Genelemente zurückzuführen ist.

Bei solchen Überlappungen, die auch für das gB- Gen zutreffen, bietet der „Ein- Zyklus- Replikations- Komplementations- Assay“ einen deutlichen Vorteil, da hier eine *trans*- Komplementation vorliegt. In diesem System sind die beobachteten Effekte auf die Eigenschaften des Proteins selbst zurückzuführen, eine Beeinträchtigung überlappender Genelemente kann ausgeschlossen werden.

8.2 Die Virusmutante HCMVDFur: Die Furinspaltung

8.2.1 Die Furinspaltung der gB- Homologen innerhalb der Familie der Herpesviren

Die proteolytische Spaltung der Glykoprotein B- Homologe ist innerhalb der Familie der Herpesviren stark konserviert. Hierbei unterscheiden sich allerdings die Subfamilien untereinander: Das Herpes Simplex Virus, ein Vertreter der α - Herpesviren, trägt ungespaltenes gB auf der Oberfläche. Das Epstein Barr Virus, das zu den γ - Herpesviren gehört, besitzt ebenfalls ungespaltenes gB, das bei diesem Virus allerdings nicht in die Virushülle eingebaut wird (Gong *et al.*, 1987). In allen bekannten β - Herpesviren, so auch bei HCMV, liegt das gB- Protein in der Virushülle gespalten vor (Tab.5).

Tabelle 5: Spaltbare und nicht spaltbare gB- Homologe innerhalb der Familie der Herpesviren. * bezeichnet gB- Proteine, deren Spaltung nicht beschrieben wurde, in deren Primärsequenz aber eine Spaltstelle vorhanden ist.

Herpesvirus	spaltbares gB	Referenz
<i>a- Herpesviren</i>		
Herpes Simplex Virus 1 (HSV1)	-	(Claesson-Welsh & Spear, 1986)
Herpes Simplex Virus 2 (HSV2)	-	(Eberle & Courtney, 1982)
Varizella Zoster Virus (VZV)	+	(Montalvo & Grose, 1987)
Bovines Herpesvirus (BHV)	+	(van Drunen Littel-van den Hurk & Babiuk, 1986)
Pseudorabiesvirus (PRV)	+	(Hampl <i>et al.</i> , 1984)
Equines Herpesvirus (EHV)	+	(Meredith <i>et al.</i> , 1989)
Monkey B Virus (SHVB)	-	(Veit <i>et al.</i> , 1996)
Mareks Disease Virus (MDV)	+	(Ross <i>et al.</i> , 1989)
<i>b- Herpesviren</i>		
Humanes Cytomegalievirus (HCMV)	+	(Britt & Vugler, 1989)
Murines Cytomegalievirus (MCMV)	+	(Loh, 1991)
Humanes Herpesvirus 6	+	(Chou & Marousek, 1992)
Humanes Herpesvirus 7	(+)	*
<i>g- Herpesviren</i>		
Epstein Barr Virus (EBV)	-	(Gong <i>et al.</i> , 1987)
Kaposi Sarkoma assoziiertes Virus (HHV8)	(+)	*

In der vorliegenden Arbeit wurde durch BAC- Mutagenese eine HCMV-Mutante generiert (BAC Δ Fur), in der die Spaltstelle für die zelluläre Protease Furin zerstört wurde. Das nach Transfektion in Fibroblastenzellen entstandene HCMV Δ Fur- Virus zeigte keine Veränderung bezüglich des Wachstumsverhaltens im Vergleich zum Wildtyp; sowohl die Replikationsdauer als auch die Menge der freigesetzten infektiösen Tochtervirionen waren vergleichbar. Die Mutante zeigte bezüglich der Expressionskinetik und subzellulären Lokalisation des gB- Proteins in infizierten Zellen ebenfalls keinen Unterschied zum Wildtypvirus. Die gB- Moleküle wurden korrekt durch den Exozytoseweg an die Plasmamembran der Wirtszellen transportiert. Die freigesetzten Tochtervirionen trugen

ausschliesslich ungespaltenes gB- Protein in ihrer Virushülle und waren in ihrer Infektiösität nicht beeinträchtigt.

Dadurch konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass auch bei β - Herpesviren die proteolytische Spaltung des gB- Proteins nicht notwendig für die Virusvermehrung in Zellkultur ist.

Wie bereits erwähnt, wird das gB- Protein des Herpes Simplex Virus nicht gespalten (Tab. 5). Von anderen Mitgliedern dieser Subfamilie, dem Bovinen Herpesvirus und dem Pseudorabies Virus wurde zudem beschrieben, dass die proteolytische Spaltung des gB nicht notwendig für die Vermehrung in Zellkultur ist (Blewett & Misra, 1991, Kopp *et al.*, 1994). Diese Beobachtungen sind nicht ohne Einschränkungen auf β - Herpesviren zu übertragen, da die Glykoproteine von Mitgliedern verschiedener herpesviraler Subfamilien funktionell nicht gleichzusetzen sind.

Weiterhin wurde berichtet, dass gB- Proteine von α - Herpesviren innerhalb ihrer eigenen Subfamilie austauschbar sind, nicht jedoch die Funktion des homologen Proteins eines Mitglieds anderer Subfamilien ersetzen können (Kopp *et al.*, 1994). Dies weist darauf hin, dass funktionelle Unterschiede zwischen den verschiedenen gB- Homologen vorhanden sind. Zudem weicht die Gesamtzahl und Verteilung der viralen Glykoproteine innerhalb der Familie der Herpesviren voneinander ab; so sind z.B. bei α - Herpesviren weit mehr Glykoproteine identifiziert worden als bei HCMV. Im Herpes Simplex Virus ist darüber hinaus die infektionsrelevante Hauptoberflächenkomponente der Virionen nicht das gB- Protein, sondern das Glykoprotein D, welches bei β - Herpesviren nicht vorkommt. Beim Epstein Barr Virus ist das Glykoprotein gp250/350 Hauptbestandteil der Virionen; das gB- Homologe befindet sich bei diesen Viren nicht in der Virushülle. Somit ist die mangelnde Austauschbarkeit der gB- Homologen innerhalb der herpesviralen Subfamilien vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Funktionen der Glykoproteine während der Infektion unterschiedlich verteilt sind, bzw. dass bei β - Herpesviren im gB- Protein Funktionen, die sonst anderen Komponenten zufallen, vereint sind.

Die proteolytische Spaltung des gB- Proteins von HCMV spielt in diesem Zusammenhang offenbar jedoch keine Rolle.

8.2.2 Die Rolle der proteolytischen Spaltung bei Fusionsprozessen

Die Furinspaltung ist bei Glykoproteinen anderer Viren, wie z.B. dem Hämagglutinin des Influenzavirus und dem gp120 des HIV als notwendiger Schritt zur Aktivierung ihres endogenen Fusionspotentials und damit als essentiell für die Infektiosität beschrieben worden. Im Falle des Influenzavirus liegt das Hämagglutinin- Molekül als Trimer in der Virushülle vor. Die Viruspartikel werden von der Zelle endocytisiert und eine Absenkung des pH- Wertes in den Endosomen bewirkt eine Konformationsänderung des Hämagglutininmoleküls. Dadurch wird das hydrophobe Fusionspeptid exponiert und die Fusion der Virus- mit der Endosomenmembran eingeleitet. Unterbleibt die Prozessierung des Moleküls durch Furin, kann dieser Vorgang nicht stattfinden. Herpesviren hingegen werden nicht endozytiert, sondern fusionieren mit der Plasmamembran der Wirtszelle. Zudem liegt das Glykoprotein B in der Virusmembran nicht als Trimer, sondern als Dimer vor. Darüber hinaus besitzt es kein klassisches Fusionspeptid, welches nach Spaltung und Konformationsänderung exponiert werden und zum Fusionsprozess beitragen könnte. Die hier beschriebene Beobachtung, dass die Spaltung des HCMV- gB nicht notwendig ist für die Infektiosität des Virus zeigt, dass das Modell der proteolytischen Aktivierung eines Fusionspeptides wie beim Influenza- Hämagglutinin für Herpesviren nicht zutrifft.

Diese Aussage wird durch die Vorstellung untermauert, dass die gB- Homologen der Herpesviren eine Rolle bei der Transportknospung der Kapside durch die innere Kernmembran infizierter Zellen spielen. Die bei diesem Vorgang durch die innere Kernmembran knospenden Kapside gelangen dabei in den perinukleären Raum und erhalten eine temporäre Lipidhülle, die von der inneren Kernmembran abgeleitet ist. In diesem Kompartiment befinden sich die gB- Homologen der Herpesviren, weshalb ihnen eine Rolle bei der anschliessenden Fusion mit der äusseren Kernmembran zur Freisetzung der Kapside ins Cytoplasma zugeschrieben wird. Die gB- Proteine gelangen auf einem retrograden Transportweg vom Endoplasmatischen Retikulum in die innere Kernmembran, ohne zuvor den

Golgiapparat passiert zu haben. Daher liegt das gB- Protein am Ort der Transportknospung ungespalten vor. Sollte es also an diesem Fusionsprozess beteiligt sein, kann die proteolytische Spaltung hierbei keine Rolle spielen.

8.2.3 Mögliche Bedeutung der proteolytischen Prozessierung von HCMV- gB

Die ausgeprägte Konservierung der Prozessierung des Glykoproteins B verbunden mit der Beobachtung, dass sie *in vitro* nichtessentiell ist, lässt auf eine Rolle im infizierten Wirtsorganismus schließen.

Die Spaltung des gB- Proteins und die daraus resultierende Konformation könnte eine mechanische Stabilisierung des Virions bewirken, was ohne den entsprechenden Selektionsdruck im Zellkultursystem nicht zum Tragen kommt. Es ist auch denkbar, dass die Spaltung des gB- Proteins zu einer Konformation führt, die *in vivo* für die Erkennung von Rezeptoren bestimmter Zelltypen notwendig ist.

Die jetzt vorhandene Mutante des HCMV mit nicht spaltbarem gB eröffnet die Möglichkeit, Studien zur Relevanz der Spaltung für den Zelltropismus durchzuführen. Es lassen sich auch eine mögliche pH- oder Temperaturabhängigkeiten der Infektion in Zellkultur untersuchen.

Ein geeignetes Tiermodell für HCMV, in dem diese Hypothese in Wechselwirkung mit dem Wirtsorganismus geprüft werden könnte, existiert jedoch nicht.

Mit Einschränkung könnte das ebenfalls zu den β - Herpesviren gehörende Maus- Cytomegalievirus (MCMV) ein entsprechendes System darstellen, um die Rolle der proteolytischen Spaltung des gB- Proteins *in vivo* zu untersuchen.

8.3 Die Virusmutante HCMVsINM: das Lokalisationssignal für die innere Kernmembran

8.3.1 Das Aminosäuresignal DRLRHR ist in infizierten Zellen nicht relevant für die Lokalisation des gB in der inneren Kernmembran

Das Aminosäuresignal DRLRHR am äussersten Carboxyterminus des gB-Proteins wurde in vorangegangenen Arbeiten sowohl als notwendig, als auch als hinreichend für die Lokalisation des Moleküls in der inneren Kernmembran beschrieben (Meyer & Radsak, 2000).

Aufgrund der Lokalisation der gB- Homologe aller Herpesviren in diesem Kompartiment existiert die Vorstellung, dass das Molekül eine Rolle bei der Transportknospung der Kapside durch die nukleären Membranen spielt (Radsak *et al.*, 1990) (vgl. 8.2.2).

Die Aminosäuresubstitution (DRLRHR => AALREE), die im heterologen Expressionssystem eine Lokalisation des Moleküls in der inneren Kernmembran verhindert, erwies sich im „Ein- Zyklus- Replikations- Komplementations- Assay“ als nichtessentiell für die Replikation des Virus. Die Aussage wurde durch Herstellung einer HCMV- BAC- Mutante mit der entsprechenden Mutation bestätigt (BACsINM). Bei der Überprüfung der gB- Expression zeigte sich, dass in Mutanten- infizierten Zellen ausschliesslich das mutagenisierte gB- Protein vorhanden war.

Nach der Isolierung von Kernen infizierter Zellen und anschliessender Immunfluoreszenz zeigte sich weiterhin das unerwartete Ergebnis, dass das gB der HCMVsINM- Mutante spät nach Infektion in der inneren Kernmembran lokalisiert war. Zudem war die Menge des gB in diesem Kompartiment im Vergleich zum Wildtyp nicht reduziert. Die Eigenschaften, die dieses Aminosäuresignal nach transienter solitärer Expression zeigt, ist also nicht übertragbar auf die Situation im Zusammenhang einer Virusinfektion.

Die Vorstellung zur Lokalisation des gB- Proteins in der inneren Kernmembran ist, dass es durch konstitutive laterale Diffusion entlang der Membranen des Endoplasmatischen Retikulums in die äussere Kernmembran und von dort über die Membranverbindung an den Kernporen vorbei in die innere Kernmembran gelangt. Für die Retention des Proteins in

diesem Kompartiment wird eine Interaktion mit Proteinen des Nukleoplasmas oder der inneren Kernmembran vermutet (Meyer & Radsak, 2000). In den Studien, die an solitär exprimiertem gB- Protein gemacht wurden, muss eine zelluläre Komponente hierfür verantwortlich sein.

Das abweichende Ergebnis im Infektionszusammenhang kann so interpretiert werden, dass für die Retention in der inneren Kernmembran spät nach Infektion ein virales Protein verantwortlich ist, welches das gB- Molekül in diesem Kompartiment zurückhält. Für diese Wechselwirkung muss eine andere Domäne des cytoplasmatischen Anteils verantwortlich sein als das Aminosäuresignal DRLRHR (Meyer & Radsak, 2000). Folgeexperimente, in denen die Lokalisation des gB- Proteins zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion untersucht wird, könnten Aufschluss darüber geben, wann nach Infektion eine Akkumulation des gB in diesem Kompartiment zu beobachten ist. So könnten die möglichen viralen Interaktionspartner entsprechend ihrer individuellen Expressionskinetik eingegrenzt werden.

Die Frage, ob die Lokalisation des gB in der inneren Kernmembran Einfluss nimmt auf die Transportknospung der Kapside, kann mit dieser Virusmutante nicht beantwortet werden.

8.3.2 Die Veränderung des Aminosäuresignals DRLRHR bewirkt eine Attenuierung der Virusmutante

Obwohl sich die HCMVsINM- Mutante nur durch vier Aminosäuren vom Wildtypvirus unterscheidet, zeigt sie eine signifikante Attenuierung. Der Replikationszyklus ist um mindestens 24 Stunden verzögert und die Menge der freigesetzten infektiösen Tochtervirionen ist um etwa eine Größenordnung reduziert.

Der Transport des veränderten gB- Proteins durch den Golgiapparat an die Zelloberfläche verlief korrekt, hinsichtlich der Expression und der subzellulären Lokalisation waren jedoch Unterschiede zum authentischen Protein zu beobachten.

In der indirekten Immunfluoreszenz war die Expression des Proteins verglichen mit dem Wildtyp mit einer Verzögerung von 24 Stunden nachzuweisen, auch die typische subzelluläre gB- Lokalisation im Golgi trat

erst 24 Stunden später als im Falle des Wildtyps auf. Die cytopathische Veränderung der infizierten Zellen war zudem deutlich geringer als die von Wildtyp- infizierten Zellen. Darüber hinaus war die Gesamtmenge des exprimierten gB- Proteins deutlich vermindert. Biochemische Quantifizierungen, z.B. nach radioaktiver Markierung und anschließender Immunpräzipitation in Folgeexperimenten könnten das Maß dieser Reduktion im Vergleich zu anderen viralen Proteinen genauer beschreiben.

Ultrastrukturelle Untersuchungen der HCMVsINM- infizierten Zellen zeigten im Vergleich zu Wildtypvirus- infizierten Zellen eine Anhäufung von nicht umhüllten Kapsiden im Cytoplasma. Ebenfalls auffällig war die Akkumulation der elektronendichten „dense bodies“, welche das Tegumentprotein pp65 enthalten. Die normale Situation in HCMV- infizierten Zellen ist, dass spät nach Infektion die Kapside an Membranen des Tubulären Endosoms oder des Transgolgi- Netzwerkes eine doppelte Lipidhülle erhalten und aus der Zelle ausgeschleust werden. Das abweichende Bild bei der HCMVsINM- Mutante lässt sich dahingehend interpretieren, dass der Schritt der Reifungsknospung in diesen Zellen inhibiert oder verzögert ist. Die Akkumulation der nackten Kapside im Cytoplasma und auch die starke Anhäufung des Tegumentproteins könnte dadurch erklärt werden.

Eine Behinderung der Reinternalisierung des gB von der Zelloberfläche in Vesikel des Tubulären Endosoms durch das veränderte Aminosäuresignal ist auszuschliessen, da die daraus resultierende Akkumulation des Proteins an der Zelloberfläche nicht beobachtet werden konnte.

Möglicherweise behindert das veränderte Aminosäuremotif des cytoplasmatischen Anteils die korrekte Interaktion mit einem der viralen Tegumentproteine, wodurch der Prozess der Umhüllung gestört wird.

Unter Berücksichtigung der Beobachtung, dass die Expression des gB- Proteins vermindert ist, wäre auch denkbar, dass das gB- Protein für diesen Schritt der Transportknospung limitierend ist, besonders da das gB- Protein die Hauptkomponente der viralen Hülle darstellt.

Ein Aspekt, der bei der verminderten gB- Expression eine Rolle spielen könnte, ist die für ein Strukturprotein ungewöhnliche zweigeteilte

Expressionskinetik des Proteins selbst. Es wurde gezeigt, dass bereits 24 Stunden nach Infektion ein gB- Transkript gebildet wird (Smuda *et al.*, 1997), wohingegen Transkripte anderer viraler Strukturkomponenten (auch das des gB- Homologen des Herpes Simplex Virus) erst nach dem Einsetzen der Replikation der Virus- DNA spät im viralen Infektionszyklus gebildet werden. Der Hauptanteil der gB- Transkription folgt dann einer späten Kinetik. Auch das früh exprimierte gB konnte in der inneren Kernmembran nachgewiesen werden (Smuda *et al.*, 1997). Über die Funktion dieses frühen gB kann daher spekuliert werden, dass es durch seinen im Nukleoplasma lokalisierten cytoplasmatischen Anteil Einfluss nimmt auf die Regulation der viralen Genexpression, möglicherweise sogar die der eigenen.

Es ist denkbar, dass zu diesem frühen Zeitpunkt der Expression, an dem die meisten viralen Proteine noch nicht synthetisiert sind, die Ergebnisse des heterologen Expressionssystems (Meyer & Radsak, 2000) zutreffend sind und eine Interaktion mit einem zellulären Faktor über das Aminosäuresignal DRLRHR erfolgt.

Kernlokalisationsexperimente des gB der HCMV/sINM- Mutante bei gleichzeitiger Inhibierung der viralen Polymerase und der dadurch ausbleibenden Expression später Gene könnten Aufschluss darüber geben, ob unter diesen Bedingungen eine Retention des gB- Proteins in der inneren Kernmembran ausbleibt.

Eine andere Erklärungsmöglichkeit für die Reduktion der gB- Expression könnte die Veränderung der Gensequenz selbst sein. Im Gegensatz zum „Ein- Zyklus- Replikations- Komplementations- Assay“, in dem der Effekt des Proteins selbst untersucht wird, ist beim Einbringen der Mutation in das Virusgenom eine Beeinträchtigung der cis- aktiven Bereiche nicht auszuschliessen. Der offene Leserahmen des gB (ORF UL55) überlappt mit dem Promotorbereich der benachbarten Polymerase (ORF UL54). Die Position der Mutation des Lokalisationssignals befindet sich im Bereich der 5'- nichttranslatierten Region des Polymerasetranskripts (Smuda *et al.*, 1997). Funktionelle Bereiche dieser Sequenz für die Regulation der Expression sind in diesem Abschnitt der mRNA bislang nicht beschrieben. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass durch die Mutation der Export, die

Stabilität oder die korrekte Expression der Polymerase- mRNA gestört ist. Ein solcher Polymerasedefekt würde sich auf die Expression aller späten Gene auswirken. Diese Hypothese liesse sich durch Quantifizierung der synthetisierten Virus- DNA und verschiedener spät exprimierter Proteine überprüfen. Auch Studien, in denen der Promotor und der 5'-nichttranslatierte Bereich mithilfe eines Reportergens, wie z.B. Luciferase untersucht werden, können diese Frage beantworten.

9. Literaturverzeichnis

- Adler, H., Messerle, M., Wagner, M. & Koszinowski, U. H. (2000). Cloning and mutagenesis of the murine gammaherpesvirus 68 genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *J Virol* **74**, 6964-74.
- Adlish, J. D., Lahijani, R. S. & St Jeor, S. C. (1990). Identification of a putative cell receptor for human cytomegalovirus. *Virology* **176**, 337-45.
- Anders, D. G., Kidd, J. R. & Gibson, W. (1987). Immunological characterization of an early cytomegalovirus single-strand DNA-binding protein with similarities to the HSV major DNA-binding protein. *Virology* **161**, 579-88.
- Baldick, C. J., Jr., Marchini, A., Patterson, C. E. & Shenk, T. (1997). Human cytomegalovirus tegument protein pp71 (ppUL82) enhances the infectivity of viral DNA and accelerates the infectious cycle. *J Virol* **71**, 4400-8.
- Basgoz, N., Qadri, I., Navarro, D., Sears, A., Lennette, E., Youngblom, J. & Pereira, L. (1992). The amino terminus of human cytomegalovirus glycoprotein B contains epitopes that vary among strains. *J Gen Virol* **73**, 983-8.
- Berkner, K. L. & Sharp, P. A. (1983). Generation of adenovirus by transfection of plasmids. *Nucleic Acids Res* **11**, 6003-20.
- Blanton, R. A. & Tevethia, M. J. (1981). Immunoprecipitation of virus-specific immediate-early and early polypeptides from cells lytically infected with human cytomegalovirus strain AD 169. *Virology* **112**, 262-73.
- Blewett, E. L. & Misra, V. (1991). Cleavage of the bovine herpesvirus glycoprotein B is not essential for its function. *J Gen Virol* **72**, 2083-90.
- Bodnar, A. G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S. E., Chiu, C. P., Morin, G. B., Harley, C. B., Shay, J. W., Lichtsteiner, S. & Wright, W. E. (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* **279**, 349-52.
- Bogner, E., Radsak, K. & Stinski, M. F. (1998). The gene product of human cytomegalovirus open reading frame UL56 binds the pac motif and has specific nuclease activity. *J Virol* **72**, 2259-64.
- Bold, S., Ohlin, M., Garten, W. & Radsak, K. (1996). Structural domains involved in human cytomegalovirus glycoprotein B-mediated cell-cell fusion. *J Gen Virol* **77**, 2297-302.
- Borst, E. M., Hahn, G., Koszinowski, U. H. & Messerle, M. (1999). Cloning of the human cytomegalovirus (HCMV) genome as an infectious bacterial artificial chromosome in *Escherichia coli*: a new approach for construction of HCMV mutants. *J Virol* **73**, 8320-9.
- Borst, E. M., Mathys, S., Wagner, M., Muranyi, W. & Messerle, M. (2001). Genetic Evidence of an Essential Role for Cytomegalovirus Small Capsid Protein in Viral Growth. *J Virol* **75**, 1450-1458.

- Bresnahan, W. A., Hultman, G. E. & Shenk, T. (2000). Replication of wild-type and mutant human cytomegalovirus in life-extended human diploid fibroblasts. *J Virol* **74**, 10816-8.
- Britt, W. J. (2000). Infectious clones of herpesviruses: a new approach for understanding viral gene function. *Trends Microbiol* **8**, 262-5.
- Britt, W. J. & Mach, M. (1996). Human cytomegalovirus glycoproteins. *Intervirology* **39**, 401-12.
- Britt, W. J. & Vugler, L. G. (1989). Processing of the gp55-116 envelope glycoprotein complex (gB) of human cytomegalovirus. *J Virol* **63**, 403-10.
- Britt, W. J. & Vugler, L. G. (1992). Oligomerization of the human cytomegalovirus major envelope glycoprotein complex gB (gp55-116). *J Virol* **66**, 6747-54.
- Britt, W. S. & Alford, C. A. (1996). Cytomegalovirus. In *Fields Virology*, 3. Ed.
- Bullock, W. O., Fernandez, J.-M. - & Short, J. M. (1987). XL1-blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* **5**, 376-378.
- Chang, A. C. & Cohen, S. N. (1978). Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J Bacteriol* **134**, 1141-56.
- Chang, Y., Cesarman, E., Pessin, M. S., Lee, F., Culpepper, J., Knowles, D. M. & Moore, P. S. (1994). Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* **266**, 1865-9.
- Chee, M. S., Bankier, A. T., Beck, S., Bohni, R., Brown, C. M., Cerny, R., Horsnell, T., Hutchison, C. A., 3rd, Kouzarides, T., Martignetti, J. A. & et al. (1990). Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr Top Microbiol Immunol* **154**, 125-69.
- Chen, C. & Okayama, H. (1987). High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* **7**, 2745-52.
- Cherepanov, P. P. & Wackernagel, W. (1995). Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* **158**, 9-14.
- Chou, S. (1992). Comparative analysis of sequence variation in gp116 and gp55 components of glycoprotein B of human cytomegalovirus. *Virology* **188**, 388-90.
- Chou, S. & Marousek, G. I. (1992). Homology of the envelope glycoprotein B of human herpesvirus-6 and cytomegalovirus. *Virology* **191**, 523-8.
- Claesson-Welsh, L. & Spear, P. G. (1986). Oligomerization of herpes simplex virus glycoprotein B. *J Virol* **60**, 803-6.
- Compton, T. & Courtney, R. J. (1984). Virus-specific glycoproteins associated with the nuclear fraction of herpes simplex virus type 1-infected cells. *J Virol* **49**, 594-7.
- Compton, T., Nepomuceno, R. R. & Nowlin, D. M. (1992). Human cytomegalovirus penetrates host cells by pH-independent fusion at the cell surface. *Virology* **191**, 387-95.

- Compton, T., Nowlin, D. M. & Cooper, N. R. (1993). Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology* **193**, 834-41.
- Cox, M. M. (1983). The FLP protein of the yeast 2-microns plasmid: expression of a eukaryotic genetic recombination system in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 4223-7.
- Cranage, M. P., Smith, G. L., Bell, S. E., Hart, H., Brown, C., Bankier, A. T., Tomlinson, P., Barrell, B. G. & Minson, T. C. (1988). Identification and expression of a human cytomegalovirus glycoprotein with homology to the Epstein-Barr virus BXLF2 product, varicella-zoster virus gpIII, and herpes simplex virus type 1 glycoprotein H. *J Virol* **62**, 1416-22.
- Davis, L. I. & Blobel, G. (1986). Identification and characterization of a nuclear pore complex protein. *Cell* **45**, 699-709.
- Delecluse, H. J., Hilsendegen, T., Pich, D., Zeidler, R. & Hammerschmidt, W. (1998). Propagation and recovery of intact, infectious Epstein-Barr virus from prokaryotic to human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 8245-50.
- Doerr, H. W. (1987). Cytomegalovirus infection in pregnancy. *J Virol Methods* **17**, 127-32.
- Dumas, A. M., Geelen, J. L., Weststrate, M. W., Wertheim, P. & van der Noordaa, J. (1981). XbaI, PstI, and BglII restriction enzyme maps of the two orientations of the varicella-zoster virus genome. *J Virol* **39**, 390-400.
- Eberle, R. & Courtney, R. J. (1982). Multimeric forms of herpes simplex virus type 2 glycoproteins. *J Virol* **41**, 348-51.
- Eickmann, M., Lange, R., Ohlin, M., Reschke, M. & Radsak, K. (1998). Effect of cysteine substitutions on dimerization and interfragment linkage of human cytomegalovirus glycoprotein B (gp UL55). *Arch Virol* **143**, 1865-80.
- Epstein, M., Henle, W., Aching, B. & Barr, Y. (1965). Morphological and biological studies on virus in cultures lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *J. Exp. Med.* **121**, 761-770.
- Farrar, G. H. & Greenaway, P. J. (1986). Characterization of glycoprotein complexes present in human cytomegalovirus envelopes. *J Gen Virol* **67**, 1469-73.
- Fish, K. N., Soderberg-Naucler, C. & Nelson, J. A. (1998). Steady-state plasma membrane expression of human cytomegalovirus gB is determined by the phosphorylation state of Ser900. *J Virol* **72**, 6657-64.
- Fleckenstein, B., Muller, I. & Collins, J. (1982). Cloning of the complete human cytomegalovirus genome in cosmids. *Gene* **18**, 39-46.
- Frenkel, N., Schirmer, E. C., Wyatt, L. S., Katsafanas, G., Roffman, E., Danovich, R. M. & June, C. H. (1990). Isolation of a new herpesvirus from human CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 748-52.
- Ghosh-Choudhury, G., Haj-Ahmad, Y., Brinkley, P., Rudy, J. & Graham, F. L. (1986). Human adenovirus cloning vectors based on infectious bacterial plasmids. *Gene* **50**, 161-71.

- Gibson, W. & Irmiere, A. (1984). Selection of particles and proteins for use as human cytomegalovirus subunit vaccines. *Birth Defects Orig Artic Ser* **20**, 305-24.
- Gillen, J. R., Willis, D. K. & Clark, A. J. (1981). Genetic analysis of the RecE pathway of genetic recombination in Escherichia coli K-12. *J Bacteriol* **145**, 521-32.
- Gong, M. & Kieff, E. (1990). Intracellular trafficking of two major Epstein-Barr virus glycoproteins, gp350/220 and gp110. *J Virol* **64**, 1507-16.
- Gong, M., Ooka, T., Matsuo, T. & Kieff, E. (1987). Epstein-Barr virus glycoprotein homologous to herpes simplex virus gB. *J Virol* **61**, 499-508.
- Gretch, D. R., Kari, B., Rasmussen, L., Gehrz, R. C. & Stinski, M. F. (1988). Identification and characterization of three distinct families of glycoprotein complexes in the envelopes of human cytomegalovirus. *J Virol* **62**, 875-81.
- Gruter, W. (1924). das Herpesvirus, seine aetiologische und klinische Bedeutung. *Muench. Med. Wochenschr.* **71**, 1058-1060.
- Gupta, P., St Jeor, S. & Rapp, F. (1977). Comparison of the polypeptides of several strains of human cytomegalovirus. *J Gen Virol* **34**, 447-54.
- Hallenberger, S., Bosch, V., Angliker, H., Shaw, E., Klenk, H. D. & Garten, W. (1992). Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160. *Nature* **360**, 358-61.
- Hampl, H., Ben-Porat, T., Ehrlicher, L., Habermehl, K. O. & Kaplan, A. S. (1984). Characterization of the envelope proteins of pseudorabies virus. *J Virol* **52**, 583-90.
- Hirt, B. (1967). Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *J Mol Biol* **26**, 365-9.
- Hobom, U., Brune, W., Messerle, M., Hahn, G. & Koszinowski, U. H. (2000). Fast screening procedures for random transposon libraries of cloned herpesvirus genomes: mutational analysis of human cytomegalovirus envelope glycoprotein genes. *J Virol* **74**, 7720-9.
- Huang, E. S. (1975). Human cytomegalovirus. IV. Specific inhibition of virus-induced DNA polymerase activity and viral DNA replication by phosphonoacetic acid. *J Virol* **16**, 1560-5.
- Huber, M. T. & Compton, T. (1998). The human cytomegalovirus UL74 gene encodes the third component of the glycoprotein H-glycoprotein L-containing envelope complex. *J Virol* **72**, 8191-7.
- Huber, M. T. & Compton, T. (1999). Intracellular formation and processing of the heterotrimeric gH-gL-gO (gCIII) glycoprotein envelope complex of human cytomegalovirus. *J Virol* **73**, 3886-92.
- Jones, T. R. & Muzithras, V. P. (1992). A cluster of dispensable genes within the human cytomegalovirus genome short component: IRS1, US1 through US5, and the US6 family. *J Virol* **66**, 2541-6.
- Jones, T. R., Muzithras, V. P. & Gluzman, Y. (1991). Replacement mutagenesis of the human cytomegalovirus genome: US10 and US11 gene products are nonessential. *J Virol* **65**, 5860-72.

- Kari, B. & Gehrz, R. (1992). A human cytomegalovirus glycoprotein complex designated gC-II is a major heparin-binding component of the envelope. *J Virol* **66**, 1761-4.
- Kari, B. & Gehrz, R. (1993). Structure, composition and heparin binding properties of a human cytomegalovirus glycoprotein complex designated gC-II. *J Gen Virol* **74**, 255-64.
- Kaye, J. F., Gompels, U. A. & Minson, A. C. (1992). Glycoprotein H of human cytomegalovirus (HCMV) forms a stable complex with the HCMV UL115 gene product. *J Gen Virol* **73**, 2693-8.
- Keay, S. & Baldwin, B. (1995). Update on the 92.5 kDa putative HCMV fusion receptor. *Scand J Infect Dis Suppl* **99**, 32-3.
- Keller, P. M., Davison, A. J., Lowe, R. S., Bennett, C. D. & Ellis, R. W. (1986). Identification and structure of the gene encoding gpII, a major glycoprotein of varicella-zoster virus. *Virology* **152**, 181-91.
- Klenk, H. D., Garten, W. & Rott, R. (1984). Inhibition of proteolytic cleavage of the hemagglutinin of influenza virus by the calcium-specific ionophore A23187. *Embo J* **3**, 2911-5.
- Klenk, H. D. & Rott, R. (1988). The molecular biology of influenza virus pathogenicity. *Adv Virus Res* **34**, 247-81.
- Kopp, A., Blewett, E., Misra, V. & Mettenleiter, T. C. (1994). Proteolytic cleavage of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) glycoprotein gB is not necessary for its function in BHV-1 or pseudorabies virus. *J Virol* **68**, 1667-74.
- Kouzarides, T., Bankier, A. T., Satchwell, S. C., Weston, K., Tomlinson, P. & Barrell, B. G. (1987). Sequence and transcription analysis of the human cytomegalovirus DNA polymerase gene. *J Virol* **61**, 125-33.
- Krech, U. (1973). Complement-fixing antibodies against cytomegalovirus in different parts of the world. *Bull World Health Organ* **49**, 103-6.
- Kumar, M. L. & Nankervis, G. A. (1979). Cytomegalovirus infections. *South Med J* **72**, 854-61.
- Kyhse-Andersen, J. (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* **10**, 203-9.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- Lee, S. K., Compton, T. & Longnecker, R. (1997). Failure to complement infectivity of EBV and HSV-1 glycoprotein B (gB) deletion mutants with gBs from different human herpesvirus subfamilies. *Virology* **237**, 170-81.
- Lindquister, G. J. & Pellett, P. E. (1991). Properties of the human herpesvirus 6 strain Z29 genome: G + C content, length, and presence of variable-length directly repeated terminal sequence elements. *Virology* **182**, 102-10.
- Loh, L. C. (1991). Synthesis and processing of the major envelope glycoprotein of murine cytomegalovirus. *Virology* **180**, 239-50.

- Lorow, D. & Jessee, J. (1990). Max Efficiency DH10B: A Host for Cloning Methylated DNA. *Focus*, 19-20.
- Mach, M., Kropff, B., Dal Monte, P. & Britt, W. (2000). Complex formation by human cytomegalovirus glycoproteins M (gpUL100) and N (gpUL73). *J Virol* **74**, 11881-92.
- Macher, A. M., Reichert, C. M., Straus, S. E., Longo, D. L., Parrillo, J., Lane, H. C., Fauci, A. S., Rook, A. H., Manischewitz, J. F. & Quinnan, G. V., Jr. (1983). Death in the AIDS patient: role of cytomegalovirus. *N Engl J Med* **309**, 1454.
- Mascolini, M. (1996). CMV resistance: "more complicated than we thought". *J Int Assoc Physicians AIDS Care* **2**, 37-9.
- Matthews, T. & Boehme, R. (1988). Antiviral activity and mechanism of action of ganciclovir. *Rev Infect Dis* **10 Suppl 3**, S490-4.
- McGeoch, D. J., Dolan, A. & Ralph, A. C. (2000). Toward a comprehensive phylogeny for mammalian and avian herpesviruses. *J Virol* **74**, 10401-6.
- McVoy, M. A. & Adler, S. P. (1994). Human cytomegalovirus DNA replicates after early circularization by concatemer formation, and inversion occurs within the concatemer. *J Virol* **68**, 1040-51.
- Meredith, D. M., Stocks, J. M., Whittaker, G. R., Halliburton, I. W., Snowden, B. W. & Killington, R. A. (1989). Identification of the gB homologues of equine herpesvirus types 1 and 4 as disulphide-linked heterodimers and their characterization using monoclonal antibodies. *J Gen Virol* **70**, 1161-72.
- Messerle, M., Crnkovic, I., Hammerschmidt, W., Ziegler, H. & Koszinowski, U. H. (1997). Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 14759-63.
- Meyer, G. A. & Radsak, K. D. (2000). Identification of a novel signal sequence that targets transmembrane proteins to the nuclear envelope inner membrane. *J Biol Chem* **275**, 3857-66.
- Milne, R. S., Paterson, D. A. & Booth, J. C. (1998). Human cytomegalovirus glycoprotein H/glycoprotein L complex modulates fusion-from-without. *J Gen Virol* **79**, 855-65.
- Montalvo, E. A. & Grose, C. (1987). Assembly and processing of the disulfide-linked varicella-zoster virus glycoprotein gpII(140). *J Virol* **61**, 2877-84.
- Mülhardt, C. (2000). Der Experimentator: Molekularbiologie 2. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg Berlin. In *Molekularbiologie*, 2. Auflage edn: Spektrum.
- Muyrers, J. P., Zhang, Y., Testa, G. & Stewart, A. F. (1999). Rapid modification of bacterial artificial chromosomes by ET- recombination. *Nucleic Acids Res* **27**, 1555-7.
- Ojala, P. M., Sodeik, B., Ebersold, M. W., Kutay, U. & Helenius, A. (2000). Herpes simplex virus type 1 entry into host cells: reconstitution of capsid binding and uncoating at the nuclear pore complex in vitro. *Mol Cell Biol* **20**, 4922-31.
- Oram, J. D., Downing, R. G., Akrigg, A., Dollery, A. A., Duggleby, C. J., Wilkinson, G. W. & Greenaway, P. J. (1982). Use of recombinant plasmids to investigate the structure of the human cytomegalovirus genome. *J Gen Virol* **59**, 111-29.

- Oram, R. J. & Herold, B. C. (1998). Antiviral agents for herpes viruses. *Pediatr Infect Dis J* **17**, 652-3.
- Pande, N. T., Maidji, K., Bruno, W., Kurz, M., Kosziniwski, U. L. & Pereira, L. (2000). Transcomplementation of human CMV gB- null mutant viruses: analysis of essential glycoprotein functions in the context of infected cells. In *25th International Herpesvirus Workshop*. Portland, Oregon.
- Patterson, C. E. & Shenk, T. (1999). Human cytomegalovirus UL36 protein is dispensable for viral replication in cultured cells. *J Virol* **73**, 7126-31.
- Pfuller, R. & Hammerschmidt, W. (1996). Plasmid-like replicative intermediates of the Epstein-Barr virus lytic origin of DNA replication. *J Virol* **70**, 3423-31.
- Posfai, G., Koob, M. D., Kirkpatrick, H. A. & Blattner, F. R. (1997). Versatile insertion plasmids for targeted genome manipulations in bacteria: isolation, deletion, and rescue of the pathogenicity island LEE of the Escherichia coli O157:H7 genome. *J Bacteriol* **179**, 4426-8.
- Qualtiere, L. F. & Pearson, G. R. (1979). Epstein-Barr virus-induced membrane antigens: immunochemical characterization of Triton X-100 solubilized viral membrane antigens from EBV-superinfected Raji cells. *Int J Cancer* **23**, 808-17.
- Radsak, K., Brucher, K. H., Britt, W., Shiou, H., Schneider, D. & Kollert, A. (1990). Nuclear compartmentation of glycoprotein B of human cytomegalovirus. *Virology* **177**, 515-22.
- Radsak, K., Eickmann, M., Mockenhaupt, T., Bogner, E., Kern, H., Eis-Hubinger, A. & Reschke, M. (1996). Retrieval of human cytomegalovirus glycoprotein B from the infected cell surface for virus envelopment. *Arch Virol* **141**, 557-72.
- Radsak, K. D., Brucher, K. H. & Georgatos, S. D. (1991). Focal nuclear envelope lesions and specific nuclear lamin A/C dephosphorylation during infection with human cytomegalovirus. *Eur J Cell Biol* **54**, 299-304.
- Raviprakash, K., Rasile, L., Ghosh, K. & Ghosh, H. P. (1990). Shortened cytoplasmic domain affects intracellular transport but not nuclear localization of a viral glycoprotein. *J Biol Chem* **265**, 1777-82.
- Reis, B., Bogner, E., Reschke, M., Richter, A., Mockenhaupt, T. & Radsak, K. (1993). Stable constitutive expression of glycoprotein B (gpUL55) of human cytomegalovirus in permissive astrocytoma cells. *J Gen Virol* **74**, 1371-9.
- Reschke, M., Reis, B., Noding, K., Rohsiepe, D., Richter, A., Mockenhaupt, T., Garten, W. & Radsak, K. (1995). Constitutive expression of human cytomegalovirus glycoprotein B (gpUL55) with mutagenized carboxy-terminal hydrophobic domains. *J Gen Virol* **76**, 113-22.
- Roizman, B., Carmichael, L. E., Deinhardt, F., Dethe, G., Nahmias, A. J., Plowright, W., Rapp, F., Sheldrick, P., Takahashi, M. & Wolf, K. (1981). Herpesviridae definition, provisorial nomenclature, and taxonomy. *Intervirology* **16**, 201-217.
- Roizman, B., Desroisiers, R., B., F., Lopez, C., Minson, A. & Studdert, M. (1992). The family herpesviridae: an update. *Arch. Virol.* **123**, 425-449.

- Ross, L. J., Sanderson, M., Scott, S. D., Binns, M. M., Doel, T. & Milne, B. (1989). Nucleotide sequence and characterization of the Marek's disease virus homologue of glycoprotein B of herpes simplex virus. *J Gen Virol* **70**, 1789-804.
- Saeki, Y., Ichikawa, T., Saeki, A., Chiocca, E. A., Tobler, K., Ackermann, M., Breakefield, X. O. & Fraefel, C. (1998). Herpes simplex virus type 1 DNA amplified as bacterial artificial chromosome in *Escherichia coli*: rescue of replication-competent virus progeny and packaging of amplicon vectors. *Hum Gene Ther* **9**, 2787-94.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F.; and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Schneeweis, K. (1962). Serologische Untersuchungen zur Typendifferenzierung des Herpesvirus Hominis. *Z. Immunitätsforsch. Exp. Ther.* **124**, 24-48.
- Schumacher, D., Tischer, B. K., Fuchs, W. & Osterrieder, N. (2000). Reconstitution of Marek's disease virus serotype 1 (MDV-1) from DNA cloned as a bacterial artificial chromosome and characterization of a glycoprotein B-negative MDV-1 mutant. *J Virol* **74**, 11088-98.
- Shizuya, H., Birren, B., Kim, U. J., Mancino, V., Slepak, T., Tachiiri, Y. & Simon, M. (1992). Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 8794-7.
- Sinzger, C., Kahl, M., Laib, K., Klingel, K., Rieger, P., Plachter, B. & Jahn, G. (2000). Tropism of human cytomegalovirus for endothelial cells is determined by a post-entry step dependent on efficient translocation to the nucleus. *J Gen Virol* **81 Pt 12**, 3021-35.
- Smith, G. A. & Enquist, L. W. (1999). Construction and transposon mutagenesis in *Escherichia coli* of a full-length infectious clone of pseudorabies virus, an alphaherpesvirus. *J Virol* **73**, 6405-14.
- Smith, M. G. (1956). Propagation in tissue cultures of a cytopathogenic virus from human salivary gland virus disease. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **92**, 224-230.
- Smith, S. & Blobel, G. (1993). The first membrane spanning region of the lamin B receptor is sufficient for sorting to the inner nuclear membrane. *J Cell Biol* **120**, 631-7.
- Smuda, C., Bogner, E. & Radsak, K. (1997). The human cytomegalovirus glycoprotein B gene (ORF UL55) is expressed early in the infectious cycle. *J Gen Virol* **78**, 1981-92.
- Sodeik, B., Doms, R. W., Ericsson, M., Hiller, G., Machamer, C. E., van 't Hof, W., van Meer, G., Moss, B. & Griffiths, G. (1993). Assembly of vaccinia virus: role of the intermediate compartment between the endoplasmic reticulum and the Golgi stacks. *J Cell Biol* **121**, 521-41.
- Sodeik, B., Ebersold, M. W. & Helenius, A. (1997). Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J Cell Biol* **136**, 1007-21.
- Soullam, B. & Worman, H. J. (1993). The amino-terminal domain of the lamin B receptor is a nuclear envelope targeting signal. *J Cell Biol* **120**, 1093-100.

- Soullam, B. & Worman, H. J. (1995). Signals and structural features involved in integral membrane protein targeting to the inner nuclear membrane. *J Cell Biol* **130**, 15-27.
- Spaete, R. R. & Mocarski, E. S. (1987). Insertion and deletion mutagenesis of the human cytomegalovirus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 7213-7.
- Stagno, S. (1986). Cytomegalovirus infection: a pediatrician's perspective. *Curr Probl Pediatr* **16**, 629-67.
- Strive, T. (1997). Untersuchungen zur Herstellung einer viralen Deletionsmutante mittels gezielter Insertionsmutagenese. Diplomarbeit am *Fachbereich Biologie*. Marburg: Philipps- Universität.
- Strive, T., Borst, E., Messerle, M. & Radsak, K. (2000). Phänotypische Komplementation eines essentiellen Glykoproteins des humanen Cytomegalievirus (HCMV). *Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie*. Wien.
- Sullivan, D. C., Allen, G. P. & O'Callaghan, D. J. (1989). Synthesis and processing of equine herpesvirus type 1 glycoprotein 14. *Virology* **173**, 638-46.
- Sullivan, V., Talarico, C. L., Stanat, S. C., Davis, M., Coen, D. M. & Biron, K. K. (1992). A protein kinase homologue controls phosphorylation of ganciclovir in human cytomegalovirus-infected cells. *Nature* **359**, 85.
- Taylor, H. P. & Cooper, N. R. (1990). The human cytomegalovirus receptor on fibroblasts is a 30-kilodalton membrane protein. *J Virol* **64**, 2484-90.
- Tooze, J., Hollinshead, M., Reis, B., Radsak, K. & Kern, H. (1993). Progeny vaccinia and human cytomegalovirus particles utilize early endosomal cisternae for their envelopes. *Eur J Cell Biol* **60**, 163-78.
- van Drunen Littel-van den Hurk, S. & Babiuk, L. A. (1986). Synthesis and processing of bovine herpesvirus 1 glycoproteins. *J Virol* **59**, 401-10.
- Veit, M., Ponimaskin, E., Baiborodin, S., Gelderblom, H. R. & Schmidt, M. F. (1996). Intracellular compartmentalization of the glycoprotein B of herpesvirus Simian agent 8 expressed with a baculovirus vector in insect cells. *Arch Virol* **141**, 2009-17.
- Vey, M., Schafer, W., Reis, B., Ohuchi, R., Britt, W., Garten, W., Klenk, H. D. & Radsak, K. (1995). Proteolytic processing of human cytomegalovirus glycoprotein B (gpUL55) is mediated by the human endoprotease furin. *Virology* **206**, 746-9.
- Volchkov, V. E., Volchkova, V. A., Muhlberger, E., Kolesnikova, L. V., Weik, M., Dolnik, O. & Klenk, H. D. (2001). Recovery of infectious Ebola virus from complementary DNA: RNA editing of the GP gene and viral cytotoxicity. *Science* **291**, 1965-9.
- Wagner, M., Michel, D., Schaarschmidt, P., Vaida, B., Jonjic, S., Messerle, M., Mertens, T. & Koszinowski, U. (2000). Comparison between human cytomegalovirus pUL97 and murine cytomegalovirus (MCMV) pM97 expressed by MCMV and vaccinia virus: pM97 does not confer ganciclovir sensitivity [In Process Citation]. *J Virol* **74**, 10729-36.

10. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau des Prototyp- Genoms des humanen Cytomegalievirus.....	8
Abbildung 2: Schematische Darstellung des humanen Cytomegalievirus (HCMV).....	10
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Morphogenese des humen Cytomegalievirus und des intrazellulären Transportes des Glykoproteins B.....	13
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Glykoproteins B des humanen Cytomegalievirus.....	15
Abbildung 5: Einbringen von Deletionen in Plasmide durch rekombinante PCR.....	45
Abbildung 6: BAC- Mutagenese mit linearen Fragmenten.	48
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Zwei- Schritt- Mutagenese im BAC Plasmid. ..	51
Abbildung 8: Schematische Darstellung des Rekombinationsplasmides bac2_3frt.	69
Abbildung 9: Klonierungsstrategie und Analyse des replikationsdefizienten BAC Δ gB.	71
Abbildung 10: Schematische Darstellung der phänotypischen Komplementation eines BAC Δ gB durch transient exprimiertes authentisches gB für einen Replikationszyklus.	72
Abbildung 11: Phänotypische Komplementation des BAC Δ gB durch transient exprimiertes gB- Protein.	75
Abbildung 12: Überprüfung der Expression der Plasmide pRC/CMV Δ Fur und pRC/CMVSigDelgB durch indirekte Immunfluoreszenz.	77
Abbildung 13: Identifizierung essentieller und nichtessentieller Domänen des HCMV- gB im "Ein- Zyklus- Replikations- Komplementations- Assay"	81
Abbildung 14: Konstruktionsschema und Analyse des Ausgangs- BAC- Plasmides BACgB-L für die Herstellung der Virusmutanten.	83
Abbildung 15: Schematische Darstellung der Herstellung der Transfer- Konstrukte <i>pST76K_SRsINM</i> , <i>pST76K_SRDΔMhdI</i> und <i>pST76K_SRDFur</i>	85
Abbildung 16: Konstruktionsschemata und Analyse der BAC- Mutanten BAC Δ Fur, BAC Δ MhdI und BACsINM.	87
Abbildung 17: Nachweis der Mutationen in Virion- DNA mittels PCR und Restriktionsendonukleasebehandlung.....	90
Abbildung 18: Identifizierung des ungespaltenen gB in HCMV Δ Fur infizierten Zellen.	91
Abbildung 19: Identifizierung des gB- Proteins in HCMVsINM infizierten Zellen.	92
Abbildung 20: Glykosidasebehandlung des gB- Proteins aus HCMV Δ Fur und HCMVsINM.	93
Abbildung 21: Wachstumskinetiken der Virusmutanten HCMV Δ Fur und HCMVsINM.	94
Abbildung 22: Expression und subzelluläre Lokalisation des gB- Proteins der Virusmutanten HCMV Δ Fur und HCMVsINM.	96
Abbildung 23: Oberflächenexpression des gB- Proteins in HCMV Δ Fur- und HCMVsINM- infizierten Zellen.	98
Abbildung 24: Lokalisation des gB- Proteins der Virusmutante HCMVsINM in der inneren Kernmembran infizierter Zellen.	100
Abbildung 25: Ultrastruktur des Cytoplasmas einer HCMVsINM- infizierten Zelle spät nach Infektion.	101

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. K. Radsak möchte ich mich ganz herzlich für die Bereitstellung des spannenden und vielseitigen Themas sowie für die aussergewöhnliche fachliche und persönliche Unterstützung während meiner Arbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. W. Buckel gilt mein Dank für die Betreuung der Arbeit am Fachbereich Biologie.

Frau Dr. Eva Borst und Herrn Dr. Martin Messerle vom Max- von- Pettenkofer- Institut für Virologie in München danke ich für ihre Unterstützung, ihre ständige Hilfsbereitschaft und vor allem für ihre Gastfreundschaft.

Für die Durchführung der elektronenmikroskopischen Untersuchungen danke ich Frau Dr. Larissa Kolesnikova.

Dorothee Gicklhorn, Dr. Grit Meyer, und Dr. Markus Eickmann danke ich für ihre ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft, Stephan Rinn für das Auffinden vieler Rechtschreibfehler und allen ehemaligen und gegenwärtigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die aussergewöhnlich angenehme Arbeitsatmosphäre.

An dieser Stelle sei ebenfalls meiner Familie für ihre Unterstützung während meiner Arbeit gedankt.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation "Charakterisierung funktioneller Domänen des Glykoproteins B des humanen Cytomegalievirus" selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 07.07.2001